

Nature, réactivité et biodégradation des matières organiques associées aux argiles d'un bassin sédimentaire

Corinne Germain

▶ **To cite this version:**

Corinne Germain. Nature, réactivité et biodégradation des matières organiques associées aux argiles d'un bassin sédimentaire. Science des sols. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1995. Français. NNT : 1995NAN10165 . tel-01747128

HAL Id: tel-01747128
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747128

Submitted on 31 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Centre de Pédologie Biologique
54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Université Henri POINCARE, NANCY I

U.F.R S.T.M.P.
Groupe de Formation Doctorale
des Sciences de la Terre

Thèse

présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Géomicrobiologie

par

Corine GERMAIN

NATURE, REACTIVITE ET BIODEGRADATION DES MATIERES ORGANIQUES ASSOCIEES AUX ARGILES D'UN BASSIN SEDIMENTAIRE

Soutenue publiquement le 6 juillet 1995 devant la commission d'examen :

Membres du Jury :

MM.	J. BERTHELIN, Directeur de Recherche au CNRS, Nancy	Examinateur
	A. HERBILLON, Professeur à l'Université Henri Poincaré, Nancy I	Président
	A. MARCE, Ingénieur à l'Ademe, Paris	Examinateur
	M. METCHE, Professeur à l'INPL (ENSAIA), Nancy	Rapporteur
	J.M. PORTAL, Ingénieur de Recherche au CNRS, Nancy	Examinateur
	J. TRICHET, Professeur à l'Université d'Orléans	Rapporteur

Résumé

Les matières organiques associées aux argiles (kaolins) de vingt échantillons représentatifs d'un bassin sédimentaire se révèlent être de nature humique puisqu'elles renferment de 4 à 32 % d'acides fulviques et de 2 à 58 % d'acides humiques. L'ensemble des résultats conduit à la proposition d'une typologie des kaolins de ce bassin en distinguant trois groupes d'argiles en fonction des teneurs en matières organiques, acides fulviques et humiques. Les acides humiques, étudiés plus en détails, présentent des structures condensées et polyaromatiques. Ils sont relativement pauvres en azote mais portent de nombreux groupements fonctionnels oxygénés (notamment carboxyliques et phénoliques), ils sont également facilement oxydables à moyenne température (250°C à 350°C).

Placées en conditions favorables (humidité, température, aération, apports de nutriments minéraux), les communautés microbiennes autochtones, dont certaines apparaissent comme oligotrophes, se développent rapidement en utilisant les matières organiques associées aux argiles comme source de carbone et d'énergie. Elles assurent selon la nature des matières organiques (donc selon le type de kaolin), sur des durées relativement courtes, la minéralisation en CO_2 de 12 à 25 % des matières organiques, leur transformation en biomasse microbienne, la production de composés hydrosolubles de type polysaccharidique ainsi que la transformation des acides humiques qui sont essentiellement oxydés au niveau des structures polyaromatiques.

La stimulation des peuplements microbiens hétérotrophes conduit donc à la biodégradation ainsi qu'à la biotransformation de matières organiques réputées stabilisées.

Suite à la biodégradation des matières organiques, le comportement thermique des argiles n'est pas modifié, la viscosité des suspensions semble varier légèrement et la blancheur, qualité importante des kaolins, s'améliore.

Mots cles : Matières organiques, composés humiques, kaolin, communautés micobienne, biodégradation

Summary

The organic matter of 20 clay samples representative of a sedimentary basin was studied. It appears to be humic substances constituted by fulvic acids (4 to 32 %) and humic acids (2 to 58 %). The results lead to propose a typology of these kaolins. In that way three groups are distinguished relatively to the organic carbon, fulvic and humic acids contents. The humic acids, particularly studied, present condensed and polyaromatic structures. Their total N contents are relatively low. They are rich in oxygen-containing functional groups (especially carboxylic and phenolic). Moreover, they are easily oxydable during pyrolysis at medium temperature (250°C to 350°C).

Under favourable conditions (moisture, temperature, mineral nutrient inputs), the autochtonous microbial communities grow rapidly by using organic matter associated to the clay as carbon an energy source. Some of the micro-organisms involved appear to be oligotrophic. Depending on the organic matter constituents and for relatively short-time incubations, heterotrophic bacteria are able to mineralize in CO_2 12 to 25 % of the organic matter. This activity promotes the production of microbial biomass and polysacharidic hydrosoluble compounds. It also leads to the transformation of humic acids essentially by oxidation of polyaromatic structures.

The stimulation of heterotrophic micro-organisms promotes the biodegradation and biotransformation of highly recalcitrant organic matter.

After the biodegradation of organic matter, the clay thermic properties are still the same but the suspension viscosity seems to be slightly modified and the whiteness, a main quality of the kaolins, is improved.

Key words : Organic matter, humic compounds, clay, microbial communities, biodegradation

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Centre de Pédologie Biologique du CNRS à Vandoeuvre-lès-Nancy grâce à une bourse de recherche accordée par l'Ademe (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) avec le soutien et la collaboration de la société DAMREC et du BRGM.

Je remercie Monsieur Adrien HERBILLON, Professeur à l'Université Henri Poincaré Nancy I, de m'avoir accueillie au Centre de Pédologie Biologique ainsi que d'avoir présidé le jury de cette soutenance.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à Monsieur Maurice METCHE, Professeur à l'INPL-Nancy, et à Monsieur Jean TRICHET, Professeur à l'Université d'Orléans, qui tous deux ont immédiatement accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Mes remerciements vont également à Monsieur Adrien MARCE, Ingénieur à l'Ademe, pour ses encouragements constants lors de chacune de nos rencontres. Je le remercie d'être à l'origine de ce projet et d'avoir accepté de participer à ce jury.

Il m'est très agréable d'associer à ce travail Monsieur Jean Marie PORTAL, Ingénieur de Recherche au CNRS-CPB. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance tant pour son aide, ses conseils et ses compétences que pour sa sympathie. Je le remercie de m'avoir accueillie à mi-temps (voire même plus) dans ses laboratoires ainsi que d'avoir accepté de juger ce travail.

Je n'oublie pas Monsieur Jacques BERTHELIN, Directeur de Recherche au CNRS-CPB, qui est également mon directeur de thèse. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant ce sujet ainsi que pour la liberté qu'il m'a laissé afin de le mener à bien. Son intérêt et ses suggestions pour le progrès de mes recherches ainsi que pour la réalisation de ce mémoire m'ont toujours été une source de motivation et d'inspiration.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Monsieur FILLOUX, membre de la direction Développement et Marketing de la société DAMREC, qui a montré un grand intérêt pour ce projet. Nos réunions semestrielles ont toujours engendré des discussions instructives et stimulantes.

Mon séjour au centre de Pédologie Biologique a été très enrichissant au niveau scientifique tout comme au niveau relationnel.

Il me tient tout d'abord à coeur d'exprimer ma reconnaissance et mon amitié à Bernadette GERARD. Non seulement elle a participé de façon très active à ce travail grâce à son expérience, sa qualification et au nombre d'analyses qu'elle a réalisé, mais elle a également fait preuve à mon égard d'une grande sympathie. J'associe à ces remerciements Thérèse OREL et leur dis à nouveau à toutes deux mon amitié.

Je remercie pour leur bonne humeur et leur gentillesse Christine HENRION et Geneviève JEANDAT, fidèles animatrices de la laverie du second étage, toujours promptes à récolter points et preuves pour la réalisation de jeux en tout genre.

Je souhaite également exprimer mon amitié à Fabienne MELINE, qui s'est obstinée à me poursuivre depuis le lycée, et à Valérie TONIAZZO. Nos nombreuses discussions n'ont jamais manqué d'intérêt et je leur souhaite bonne chance pour la suite.

Mes remerciements vont également à Geneviève VILLEMIN. Elle a accepté de me "sous-louer" une partie de son bureau et sa bonne humeur tout comme ses coups de colère ont toujours contribué à y mettre de l'ambiance.

Il m'est impossible de citer toutes les personnes du Centre de Pédologie et j'espère qu'elles ne m'en tiendront pas rigueur. J'adresse toute ma sympathie à ceux et celles qui, par leur accueil amical ainsi que par leur compétence, ont contribué à réaliser ce travail et à rendre mon séjour agréable. Je réserve une attention particulière aux célèbres "Hors statut" du CPB et je les remercie pour avoir activement participé à la bonne ambiance de travail qui règne dans les laboratoires.

Je suis heureuse et émue d'exprimer ma profonde reconnaissance à mes parents, sans l'aide matérielle et affective desquels ce mémoire n'aurait vu le jour, et à Philippe, dont la compréhension et le soutien de chaque instant en ont permis l'aboutissement. Je leur dédie ce travail.

Sommaire

Introduction générale 1

Première Partie :

Nature, Réactivité et Typologie des matières organiques associées aux argiles

Chapitre I : Les matières organiques des sols et des milieux naturels continentaux superficiels : définitions et état des connaissances 3

Chapitre II : Les argiles étudiées 13

II-1 Présentation du bassin 13
II-2 L'échantillonnage 13

Chapitre III : Moyens et méthodes mises en oeuvre pour l'étude des matières organiques 16

III-1 Les argiles 16
III-2 Analyses élémentaires des argiles, des composés humiques alcalino-solubles et des résidus de pyrolyse 16
III-3 Extraction alcaline des matières organiques 16
III-4 Coefficients aromatiques Q 4/6 (ou rapport E4/E6) des liqueurs alcalines 17
III-5 Traitements hydrolytiques des argiles 19

III-5-1 Extraction à l'eau chaude 19
III-5-2 Hydrolyse sulfurique 19

III-6 Purification des acides humiques et des acides fulviques 20
III-7 Spectrophotométrie infrarouge des acides humiques et des résidus de pyrolyse 20
III-8 Stabilité thermique des acides humiques 21

Chapitre IV : Nature et propriétés chimiques des matières organiques associées aux argiles 23

IV-1 Définitions des principaux constituants des matières organiques : application à un essai de typologie des kaolins prélevés 23

IV-1-1 Comparaison et choix de méthodes d'extraction 23
IV-1-2 Répartition des acides fulviques, acides humiques et humine dans les divers échantillons de kaolins 27

IV-2 Composition élémentaire, étude des groupements fonctionnels et origine des composés humiques purifiés 33

IV-2-1 Composition élémentaire organique et origine des composés humiques 34
IV-2-2 Etude des groupements fonctionnels des composés humiques 40

IV-3 Conclusions 46

Chapitre V : Réactivité physico-chimique des acides humiques : comportement thermique 47

V-1 Pertes de poids et évolution de la composition élémentaire des acides humiques au cours des pyrolyses 47
V-2 Evolution de la structure et des groupements fonctionnels des acides humiques au cours des pyrolyses 54

V-2-1 Pyrolyses réalisées sous atmosphère inerte 54
V-2-2 Pyrolyses réalisées sous atmosphère réductrice 56
V-2-3 Pyrolyses réalisées sous atmosphère oxydante 56

V-3 Conclusions 59

Chapitre VI : Conclusions de la première partie 61

Deuxième Partie :

Biodégradation des matières organiques associées aux argiles

Chapitre I : Biodégradation des matières humiques : définitions et état des connaissances 66

Chapitre II : Dispositifs et méthodes mises en oeuvre 72

II-1 Les argiles 72
II-2 Principes des méthodes 72

II-2-1 Dénombrements des microflores autochtones 72
II-2-2 Etudes respirométriques 73

II-3 Détermination des conditions opératoires favorables à la biodégradation : méthodes expérimentales, analyses, milieux et solutions 73

II-3-1 Méthodes expérimentales 73
II-3-2 Analyses 77
II-3-3 Milieux et solutions 77

II-4 Incubations de longues durées : méthodes expérimentales, analyses, milieux et solutions 78

II-4-1 Méthodes expérimentales 78
II-4-2 Analyses 80
II-4-3 Milieux et solutions 80

Chapitre III : Etude des microflores associées aux argiles sédimentaires et des paramètres intervenant sur leur aptitude à la biodégradation des matières organiques 81

III-1 Les microflores autochtones 81
III-2 Influence de l'aérobiose et effet d'un apport de nutriments minéraux et organique (glucose) sur la minéralisation des matières organiques 82
III-3 Influence de l'anaérobiose 89
III-4 Optimisation des paramètres de biodégradation 95

III-4-1 Apports d'oligo-éléments et de facteurs de croissance 97
III-4-2 Effets du séchage des argiles 100
III-4-3 Disponibilité des nutriments minéraux 101
III-4-4 Amélioration des conditions d'oxygénation 104

III-5 Conclusions 110

Chapitre IV : Evolution et transformation des matières organiques au cours de leur biodégradation 112

IV-1 Mise en évidence d'une modification de la répartition des différentes formes de matières organiques et de l'évolution des acides humiques. 112

IV-1-1 Minéralisation des matières organiques : incidence sur la répartition de ses diverses formes (acides humiques, acides fulviques et humine) 112
IV-1-2 Effets de la biodégradation des matières organiques sur la nature des acides humiques 117

IV-2 Biotransformation des composés humiques et développement des communautés bactériennes autochtones au cours d'incubations en conditions contrôlées 121

IV-2-1 Relation entre le développement de la microflore autochtone et la minéralisation du carbone organique 122
IV-2-2 Evolution des teneurs en nutriments minéraux du milieu en cours d'incubation 125
IV-2-3 Evolution des différentes formes de matières organiques associées aux argiles 127
IV-2-4 Relation entre la biotransformation des matières organiques et l'évolution des peuplements bactériens 136
IV-2-5 Conclusions 138

Chapitre V : Conclusions de la deuxième partie 140

Troisième Partie :

Influence de la biodégradation des matières organiques et du développement microbien sur certaines propriétés des argiles et des acides humiques

Chapitre I : Introduction 144

Chapitre II : Méthodes d'étude mises en oeuvre 146

II-1 Analyse thermique différentielle et analyse thermogravimétrique des argiles 146
II-2 Estimation du degré de viscosité des pulpes argileuses 148
II-3 Mesure de la blancheur des argiles 148
II-4 Comportement thermique des acides humiques 148
II-5 Caractérisation des produits de pyrolyses des acides humiques par couplage chromatographie phase gazeuse - spectrométrie de masse 149

Chapitre III : Influence de la biodégradation des matières organiques sur les propriétés des argiles 151

III-1 Influence de la biodégradation sur le comportement thermique des argiles 151

III-1-1 Analyse thermique différentielle 151
III-1-2 Analyse thermogravimétrique 154

III-2 Influence de l'activité bactérienne sur le degré de viscosité des pulpes argileuses 154
III-3 Influence de la biodégradation des matières organiques et/ou de l'élimination des composés alcalino-solubles sur la blancheur des argiles. 158
III-4 Conclusions 159

Chapitre IV : Influence de la biodégradation des matières organiques sur certaines propriétés des acides humiques 160

IV-1 Influence de la biodégradation sur le comportement thermique des acides humiques 160

IV-1-1 Pertes de poids et évolution de la composition élémentaire au cours des pyrolyses 160
IV-1-2 Evolution de la structure et des groupements fonctionnels au cours des pyrolyses 165

IV-2 Identification des produits de pyrolyses par spectrométrie de masse 168
IV-3 Conclusions 173

Chapitre IV : Conclusions de la troisième partie 174

Conclusion générale 176

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Première Partie :

Figure 1-1 : Les différents types de matières organiques des sols.

Figure 1-2 : a) Modèle d'acide fulvique proposé par Schnitzer (1978).
b) Modèle d'acide humique présenté par Stevenson (1982).

Figure 1-3 : Structure de substances humiques présentée sous forme d'un réseau chimique flexible (Schulten *et al.*, 1991).

Figure 1-4 : Schéma structural de deux macromolécules de type humique (Andreux et Munier Lamy, 1994).
A) Masse moléculaire supérieure à 50 000 ; nucleus volumineux et enroulements compacts.
B) Masse moléculaire inférieure à 5 000 ; nucleus peu développé et enroulements lâches.

Figure 1-5 : Schéma général de l'évolution de la matière organique du moment de dépôt jusqu'à la fin de la métagénèse (d'après Tissot and Welte, 1978).

Figure 1-6 : Carte géologique de la région de Breuillet.

Figure 1-7 : Carte des sites échantillonnés dans le cadre de l'étude.

Figure 1-8 : Fixation des acides humiques sur les argiles (Stevenson, 1982).

Figure 1-9 : Méthode d'extraction des matières organiques associées aux kaolins.

Figure 1-10 : Localisation des composés humiques dans un diagramme de Van Krevelen (d'après Bach, 1980) (* Rapport atomique).

Figure 1-11 : Spectre infrarouge des acides humiques AHS4, extraits à partir de l'échantillon d'argile SEIG4.

Figure 1-12 : Spectre infrarouge des acides humiques AHM3, extraits à partir de l'échantillon d'argile MOMB3.

Figure 1-13 : Spectre infrarouge des acides fulviques AFS4, extraits à partir de l'échantillon d'argile SEIG4.

Figure 1-14 : Effets des pyrolyses, menées sous trois atmosphères différentes, vis-à-vis de la perte de poids des acides humiques AHS4.

Figure 1-15 : Perte de poids, de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4 réalisés sous courant d'azote.

Figure 1-16 : Perte de poids, de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4 réalisés sous courant d'hydrogène.

Figure 1-17 : Perte de poids, de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4 réalisés sous courant d'air.

Figure 1-18 : Spectres infrarouge des résidus de pyrolyse des acides humiques AHS4, sous courant d'azote à 150°C, 250°C, 350°C et 450°C.

Figure 1-19 : Spectres infrarouge des résidus de pyrolyse des acides humiques AHS4, sous courant d'hydrogène à 150°C, 250°C, 350°C et 450°C.

Figure 1-20 : Spectres infrarouge des résidus de pyrolyse des acides humiques AHS4, sous courant d'air à 150°C, 250°C, 350°C et 450°C.

Figure 1-21 : Composition chimique comparative de quelques organismes (d'après Huc, 1980).

Figure 1-22 : Localisation des acides humiques AHS4 et AHM3 dans un diagramme de type Van Krevelen.

Deuxième Partie :

Figure 2-1 : Schéma général du cycle du carbone (d'après Dommergues et Mangenot, 1970).

Figure 2-2 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1 incubé en aérobiose.

Figure 2-3 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1, mis en suspension en aérobiose, dans différentes solutions.

Figure 2-4 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4 incubé en aérobiose.

Figure 2-5 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4, mis en suspension en aérobiose, dans différentes solutions.

Figure 2-6 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1 incubé en anaérobiose.

Figure 2-7 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1 incubé, en anaérobiose, dans différentes solutions.

Figure 2-8 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4 incubé en anaérobiose.

Figure 2-9 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4 incubé, en anaérobiose, dans différentes solutions.

Figure 2-10 : Influence d'un apport d'extrait de levure (EL) sur la minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4 incubé en aérobiose.

Figure 2-11 : Influence de la température de séchage sur la minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4 lors d'incubations en aérobiose.

Figure 2-12 : Influence de l'agitation sur la minéralisation du carbone organique de l'échantillon MOMB3 incubé en aérobiose en présence d'une solution minérale.

Figure 2-13 : Influence de la densité des pulpes sur la minéralisation du carbone organique de l'échantillon MOMB3 lors d'essais réalisés en conditions agitées.

Figure 2-14 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1, incubé pendant 3 mois en aérobiose, en présence de solution minérale nutritive.

Figure 2-15 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4, incubé pendant 3 mois en aérobiose, en présence de solution minérale nutritive.

Figure 2-16 : Spectres d'absorption dans l'infrarouge des acides humiques extraits et purifiés à partir de l'argile SEIG4 (AHS4) et de cette même argile après 3 mois d'incubation (AHS4/3m).

Figure 2-17 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon MOMB3 et dénombrements des peuplements bactériens lors d'une incubation de 3 mois en aérobiose et en présence de solution nutritive minérale.

Figure 2-18 : Spectres d'adsorption dans l'infrarouge des acides humiques associés à l'argile MOMB3 initiale ainsi qu'à cette même argile après respectivement 1 semaine, 1 mois, 2 mois et 3 mois d'incubation.

Troisième Partie :

Figure 3-1 : Schématisation des données obtenues grâce au système de couplage Chromatographie phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse (GC-MS).

Figure 3-2 : Analyse thermique différentielle (ATD) de l'argile SEIG1 (a) et de cette même argile après 3 mois d'incubation (SEIG1/3m) (b).

Figure 3-3 : Analyse thermique différentielle (ATD) de l'argile SEIG4 (a) et de cette même argile après 3 mois d'incubation (SEIG4/3m) (b).

Figure 3-4 : Analyse thermogravimétrique (ATD) de l'argile SEIG1 (a) et de cette même argile après 3 mois d'incubation (SEIG1/3m) (b).

Figure 3-5 : Analyse thermogravimétrique (ATD) de l'argile SEIG4 (a) et de cette même argile après 3 mois d'incubation (SEIG4/3m) (b).

Figure 3-6 : Effets des pyrolyses, menées sous atmosphère oxydante vis-à-vis des pertes de poids des acides humiques AHS4 et AHS4/3m.

Figure 3-7 : Pertes de poids, de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4/3m réalisées sous courant d'air.

Figure 3-8 : Pertes comparées de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4 et AHS4/3m réalisées sous courant d'air.

Figure 3-9 : Spectres infrarouges des résidus de pyrolyse des acides humiques AHS4/3m (extraits et purifiés après biodégradation), sous courant d'air à 150°C, 250°C et 350°C.

Figure 3-10 : Chromatogrammes des produits, piégeables dans le dichlorométhane, dégagés après pyrolyses des acides humiques AHS4/3m en condition oxydante à 150°C (I), 250°C (II), 350°C (III) et 450°C (IV).

Figure 3-11 : Pyrolyse à 150°C : spectre de masse du composé correspondant au pic 1684.

Figure 3-12 : Pyrolyse à 350°C : spectre de masse du composé correspondant au pic 1665.

Annexes :

Figure A-1 : Représentation d'un feuillet de kaolinite.

Figure A-2: Courbes d'étalonnage des gels : évolution des Kav en fonction de la masse moléculaire de protéines globulaires (d'après Andrew, 1964).

Figure A-3 : Schéma du viscosimètre à torsion de Gallencamp.

Liste des tableaux

Première Partie :

Tableau 1-I : Assignation des bandes d'absorption infrarouge des composés humiques

Tableau 1-II : Comparaison entre l'extraction des matières organiques par la soude N/10 et par le mélange soude N/10 + pyrophosphate de sodium 1%.

Tableau 1-III : Cinétique d'extraction des matières organiques par le mélange soude N/10 et pyrophosphate de sodium 1%.

Tableau 1-IV : Principales caractéristiques des matières organiques des kaolins lors d'extractions réalisées avec le mélange soude N/10 + pyrophosphate de sodium 1% (première série d'échantillons).

Tableau I-V : Principales caractéristiques des matières organiques des kaolins lors d'extractions réalisées avec le mélange soude N/10 + pyrophosphate de sodium 1% (deuxième série d'échantillons).

Tableau 1-VI : Caractéristiques des échantillons, représentatifs des trois groupes, sélectionnés pour des études complémentaires.

Tableau 1-VII : Taux d'extraction par l'eau chaude des matières organiques associées aux kaolins.

Tableau 1-VIII : Analyses organiques élémentaires des acides humiques (AH) et fulviques (AF) purifiés.

Tableau 1-IX : Analyses organiques élémentaires de quelques acides humiques d'origines diverses.

Tableau 1-X : Analyses organiques élémentaires de quelques acides fulviques de trois sols différents.

Tableau 1-XI : Evolution des rapports C/N et H/C des résidus d'acides humiques AHS4 après pyrolyses dans diverses conditions.

Deuxième Partie :

Tableau 2-I : Réservoirs en carbone et temps de résidence (d'après Brock et Madigan, 1988).

Tableau 2-II : Dénombrement de la microflore autochtone initiale de six échantillons d'argile.

Tableau 2-III : Teneurs en carbone organique des échantillons après divers traitements.

Tableau 2-IV : Dénombrements des populations microbiennes hétérotrophes présentes en fin d'incubation des échantillons SEIG1 et SEIG4, en aérobiose et en présence de solution nutritive $SM1^{EL}$.

Tableau 2-V : Activité dénitrifiante : dosage des nitrates et des nitrites.

Tableau 2-VI : Dénombrements des communautés bactériennes présentes en fin d'incubations anaérobies.

Tableau 2-VII : Dénombrements des peuplements microbiens hétérotrophes présents dans l'échantillon SEIG4 préalablement séché à 100°C lors de la préparation des échantillons.

Tableau 2-VIII : Dénombrements des peuplements microbiens hétérotrophes présents dans l'échantillons SEIG4 séché à 40°C.

Tableau 2-IX : Concentrations des éléments minéraux en solution dans les divers traitements lors de l'incubation de l'échantillon SEIG4 en présence de la solution nutritive SM.

Tableau 2-X : Dénombrements des peuplements microbiens hétérotrophes présents dans l'échantillon MOMB3 après incubation de 21 jours dans la solution nutritive minérale SM.

Tableau 2-XI : Répartition des différentes formes de matières organiques de l'échantillon SEIG1 avant et après incubation de 3 mois, en aérobiose, et en présence de solution minérale.

Tableau 2-XII : Répartition des différentes formes de matières organiques de l'échantillon SEIG4 avant et après incubation de 3 mois, en aérobiose, et en présence de solution minérale.

Tableau 2-XIII : Matières organiques hydrosolubles (extraction à l'eau chaude) pour les échantillons SEIG1 et SEIG4 avant et après incubation de 3 mois, en aérobiose, et en présence de solution minérale.

Tableau 2-XIV : Analyses élémentaires des acides humiques AHS4 et AHS4/3m purifiés à partir des argiles initiales et après biotraitements.

Tableau 2-XV : Concentrations en éléments minéraux et pH des solution dans divers traitements relatifs à la biodégradation des matières organiques associées à l'argile MOMB3.

Tableau 2-XVI : Teneur en carbone organique, après lavages à l'eau, des échantillons à différents temps d'incubation de l'argile MOMB3 en aérobiose.

Tableau 2-XVII : Extractions à l'eau chaude du carbone organique réalisées sur les échantillons, préalablement lavés, après différents temps d'incubation.

Tableau 2-XVIII : Répartition des diverses formes de matières organiques associées à l'argile MOMB3 au cours d'une expérience de biodégradation.

Tableau 2-XIX : Analyses élémentaires organiques des acides humiques extraits à partir de l'argile MOMB3 au cours d'incubation en aérobiose.

Tableau 2-XX : Tableau récapitulatif concernant la répartition des diverses formes de matières organiques des échantillons avant et après biodégradation de trois mois.

Troisième Partie :

Tableau 3-I : Signature thermique de divers événements pouvant avoir lieu au cours de la calcination (Villieras, 1993).

Tableau 3-II : Mesures du degré de viscosité des pulpes (suspension à 30% d'argile) au cours de l'incubation de l'argile MOMB3 en aérobiose.

Tableau 3-III : Mesures de la blancheur de l'argile MOMB3 suite à divers traitements.

Tableau 3-IV : Evolution comparée des rapports C/N et H/C des résidus d'acides humiques AHS4 et AHS4/3m après pyrolyses en condition oxydante.

Tableau 3-V : Identification par spectrométrie de masse de certains des composés volatils dégagés lors des pyrolyses des acides humiques AHS4/3m à 150°C et 250°C.

Conclusion Générale :

Tableau 4-I : Typologie des argiles en fonction des teneurs en carbone organique et de la répartition des diverses formes de matières organiques.

Introduction générale

Le cycle du carbone occupe une situation dominante dans le fonctionnement de l'écosystème terrestre tant par sa fonction propre que par la régulation qu'il impose aux autres cycles biogéochimiques. La répartition du carbone dans les compartiments continentaux, atmosphériques et océaniques, ainsi que les temps de résidence qui peuvent être observés et les transferts qui en résultent, soulignent son immobilisation plus ou moins temporaire, voire quasi définitive, sous forme de matières organiques "mortes" dans les sols et les zones superficielles des continents.

Une partie de ce carbone organique s'est fixée et se retrouve "immobilisée" sous forme de composés humiques *sensu lato* dans les dépôts sédimentaires comme ceux de kaolins. Dans ces systèmes confinés, les matières organiques apparaissent stabilisées vis-à-vis des phénomènes de biodégradation et de minéralisation. Par ailleurs, ces dépôts sédimentaires, réservoirs à argiles et à matières organiques, présentent également un grand intérêt industriel comme le souligne la production annuelle mondiale de kaolin qui était de l'ordre de 25 millions de tonnes en 1989 (Harben, 1992).

En tant que minéraux industriels, les kaolins possèdent des propriétés très intéressantes et connaissent des domaines d'utilisation très variés (charges minérales : papiers, peintures, câbleries, polymères ; produits céramiques ; industrie des réfractaires). Mais la présence d'impuretés peut affecter grandement leurs propriétés et donc leurs aptitudes industrielles.

L'un des principaux critères de qualité de ces minéraux est leur blancheur mais cette dernière peut être affectée par la présence, entre autre, d'oxyhydroxydes de fer et de matières organiques même à l'état de traces. Les impuretés organiques sont communément éliminées par des traitements chimiques conventionnels dérivés des techniques de blanchiment des pâtes à papier. Ils sont fondés sur la solubilisation alcaline, la dégradation par le chlore, l'oxydation par l'hypochlorite de sodium, le dioxyde de chlore ou l'ozone. Fréquemment, l'élimination de la pigmentation due à la matière organique requiert des traitements étagés par plusieurs réactifs dans lesquels chacun permet la dégradation ou l'oxydation d'un composant spécifique de la matière organique. De ce fait le blanchiment oxydant des charges minérales s'avère complexe. De plus il est souvent inapplicable car les conditions économiques sont défavorables.

Outre ces problèmes de pigmentation, la présence de matières organiques est également gênante car elle provoque, au cours des cuissons rapides, l'apparition de boursouflures ou de résidus noirs entraînant l'élimination des pièces et des objets produits.

Ces défauts, qui entraînent des problèmes de fabrication et de qualité, représentent dans de nombreux cas un blocage technique au développement d'un matériau naturel peu coûteux vers les utilisations nobles des charges minérales. Un biotraitement impliquant une biodégradation des matières organiques pourrait constituer une solution de remplacement plus simple et moins onéreuse que la voie chimique conventionnelle. Ce blanchiment biologique offrirait également l'avantage de limiter la pollution industrielle et

donc s'intégrerait parfaitement dans une politique de protection de l'environnement.

Le blanchiment des kaolins par voie biologique pourrait correspondre à une minéralisation (transformation en CO_2 et H_2O) aussi complète que possible des matières organiques présentes dans ces minéraux industriels. Mais très peu de connaissances ont été jusqu'ici acquises sur les matières organiques rencontrées dans les bassins sédimentaires associés aux dépôts d'argile.

Ce travail de recherche a donc pour but, par le biais d'un objectif industriel, d'améliorer les connaissances fondamentales concernant la nature, la réactivité et la stabilité des matières organiques présentes dans les gisements de kaolins afin d'envisager leur biodégradation et leur minéralisation par des micro-organismes autochtones.

De ce fait, la première partie de ce mémoire portera sur la caractérisation des matières organiques associées aux kaolins grâce à la mise en oeuvre de méthodes adaptées de celles habituellement utilisées pour les études des matières organiques des sols. Les résultats correspondant permettront de déterminer la nature et l'origine des matières organiques et pourront conduire à une typologie de ces composés ainsi qu'à une définition de leur réactivité et de leur aptitude à la biodégradation.

La seconde partie de ce travail correspondra aux études de biodégradation des matières organiques. Les expériences viseront à favoriser le développement et l'activité des microflores hétérotrophes autochtones en mettant en oeuvre divers dispositifs expérimentaux et en déterminant l'influence de divers paramètres fondamentaux et opérationnels.

Ces expériences conduiront non seulement à l'optimisation de ces paramètres mais également à l'étude de l'évolution des peuplements bactériens ainsi que de la nature et des propriétés physico-chimiques des matières organiques.

Enfin, une troisième partie abordera l'influence de la biodégradation des matières organiques et du développement de l'activité microbienne sur les propriétés des argiles et des acides humiques. Elle permettra d'appréhender, entre autre, les effets du biotraitement sur la blancheur et les propriétés rhéologiques des kaolins.

Première Partie :

Nature, Réactivité et Typologie des matières organiques associées aux argiles

Chapitre I : Les matières organiques des sols et des milieux naturels continentaux superficiels : définitions et état des connaissances

Le terme de matière organique désigne un ensemble hétérogène de substances de natures et de propriétés très variées. D'un point de vue global, la matière organique d'un sol est constituée de débris végétaux, animaux et microbiens à différents stades de décomposition, de substances issues des métabolismes ainsi que des organismes du sol (Schnitzer, 1991). Afin de simplifier ce système complexe, une subdivision est généralement effectuée entre les substances non humiques et les substances humiques.

Les **substances non humiques**, peu ou pas transformées, ne sont pas liées à la fraction minérale. Il est possible de distinguer des composés de faibles masses moléculaires, souvent hydrosolubles ou colloïdaux, et d'autres de masses moléculaires plus élevées à l'état plus ou moins dispersé.

Il s'agit par exemple d'hydrates de carbone, de protéines, de peptides ou d'acides gras. Ces composés, aux caractéristiques chimiques définies, sont relativement faciles à dégrader dans les sols et ont un bref temps de vie.

Il convient également de souligner l'existence possible de matières organiques dites figurées (débris végétaux) qui, le cas échéant, avant tout fractionnement chimique, seront éliminées par tamisage ou par méthode densimétrique.

La part la plus importante de la matière organique des sols est constituée par les **substances humiques**. Ces substances, néoformées ou très fortement transformées, sont souvent liées à la fraction minérale. Elles sont amorphes, colorées, partiellement aromatiques, chimiquement complexes et ont un poids moléculaire très élevé. Ces nombreuses caractéristiques leurs confèrent une certaine stabilité du point de vue chimique et biologique.

La figure 1-1 présente les différents types de matières organiques qui peuvent coexister dans un sol. La proportion relative des diverses fractions dépend essentiellement de l'activité biologique du milieu, elle même liée à la nature de la végétation, à celle de la roche mère et aux conditions pédoclimatiques (Bruckert, 1994).

Les substances humiques sont constituées de trois types de produits, les acides humiques, les acides fulviques et l'humine, tous trois définis sur des bases uniquement méthodologiques (Andreux et Munier-Lamy, 1994) :

- les **acides humiques** sont des colloïdes organiques extraits du sol en milieu alcalin et refloculés par acidification à pH inférieur à 2.

- les **acides fulviques** correspondent aux substances non floculées par acidification des extraits alcalins du sol. D'une manière générale, ils constituent l'unique fraction de substances humiques qui soit "soluble" à tous les pH.

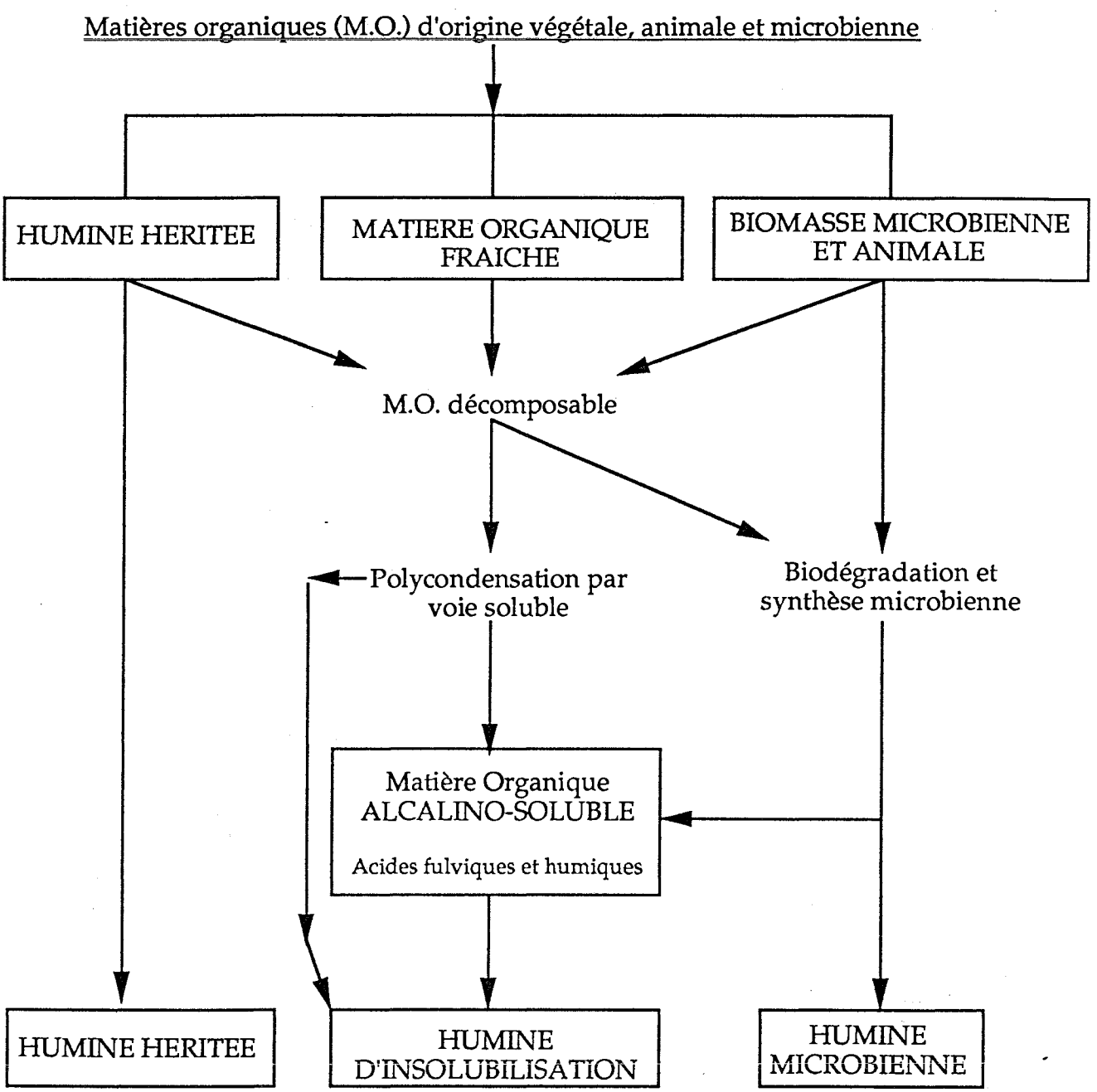


Figure 1-1 : Les différents types de matières organiques des sols

- l'**humine** est constituée par l'ensemble des substances organiques insolubles en milieu alcalin. En réalité il serait plus judicieux de dire "les humines" car cette fraction regroupe des composés de natures très différentes. Il est possible de distinguer (Duchaufour, 1991) : l'**humine microbienne** formée de corps microbiens et des biomolécules qui en dérivent ; l'**humine héritée** formée de certains constituants (lignine, tanin, ...) peu transformés et faiblement liés aux constituants minéraux ; l'**humine d'insolubilisation** correspondant à la matière organique étroitement associée aux constituants minéraux et formée par insolubilisation et polycondensation des composés humiques. Les humines microbiennes et héritées sont considérées comme des humines jeunes tandis que l'humine d'insolubilisation, présentant un caractère humique prononcé, constitue une humine évoluée très stable.

Dans l'état actuel des connaissances, il n'est plus possible de considérer les acides fulviques, les acides humiques et les humines évoluées comme des groupes de substances bien individualisées et parfaitement distinctes (Chamayou et Legros, 1989 ; Duchaufour, 1991 ; Andreux et Munier-Lamy, 1994). Au contraire il convient de souligner les analogies de structures entre ces composés.

La structure chimique des substances humiques est très complexe. Sa détermination constitue un champ d'hypothèse et un sujet de recherche depuis de nombreuses années comme en témoigne l'abondante littérature correspondante. De nombreux modèles ont été avancés. A titre d'exemple il est possible de citer :

- la structure partielle d'acide fulvique proposée par Schnitzer (1978) (figure 1-2a). Elle est constituée d'acides phénoliques et de benzènes carboxyliques liés entre eux par des liaisons hydrogènes pour former des polymères de grande stabilité.

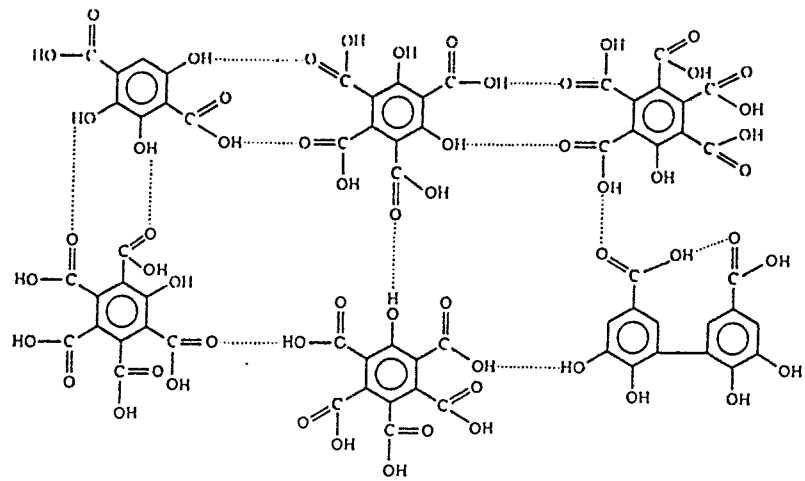
- le modèle d'acide humique présenté par Stevenson (1982) (figure 1-2b) comprenant des groupes phénoliques OH libres et liés, des structures quinoniques, des ponts N et O ainsi que des groupes acides sur des noyaux aromatiques.

- une représentation sous forme d'un réseau structural formé de noyaux aromatiques joints par de longues chaînes alkyls, l'ensemble étant flexible (Schulten *et al.*, 1991 : figure 1-3).

En résumé, il s'agit de polymères tridimensionnels de masses moléculaires élevées et de natures plus ou moins aromatiques. Schématiquement il est également considéré que ces substances seraient formées de nucleus polycycliques aromatiques sur lesquels seraient fixées des chaînes latérales pouvant présenter des caractères polypeptidiques et portant des groupements fonctionnels à caractère acide. Ce concept de nucleus et de chaînes latérales est représenté sur la figure 1-4 d'après une illustration d'Andreux et Munier-Lamy (1994).

L'étude des matières organiques donc des substances humiques nécessite obligatoirement le passage par des étapes de fractionnement et de purification.

a)



b)

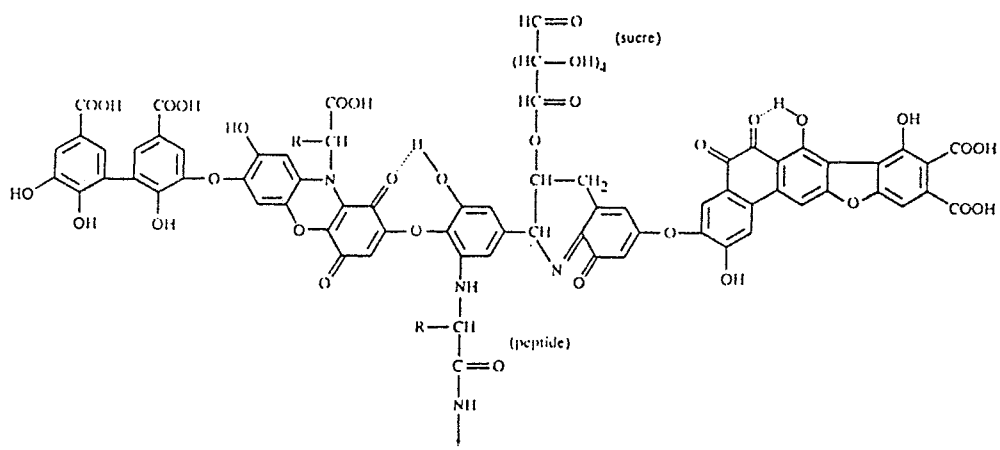


Figure 1-2 : a) Modèle d'acide fulvique proposé par Schnitzer (1978)
b) Modèle d'acide humique présenté par Stevenson (1982)

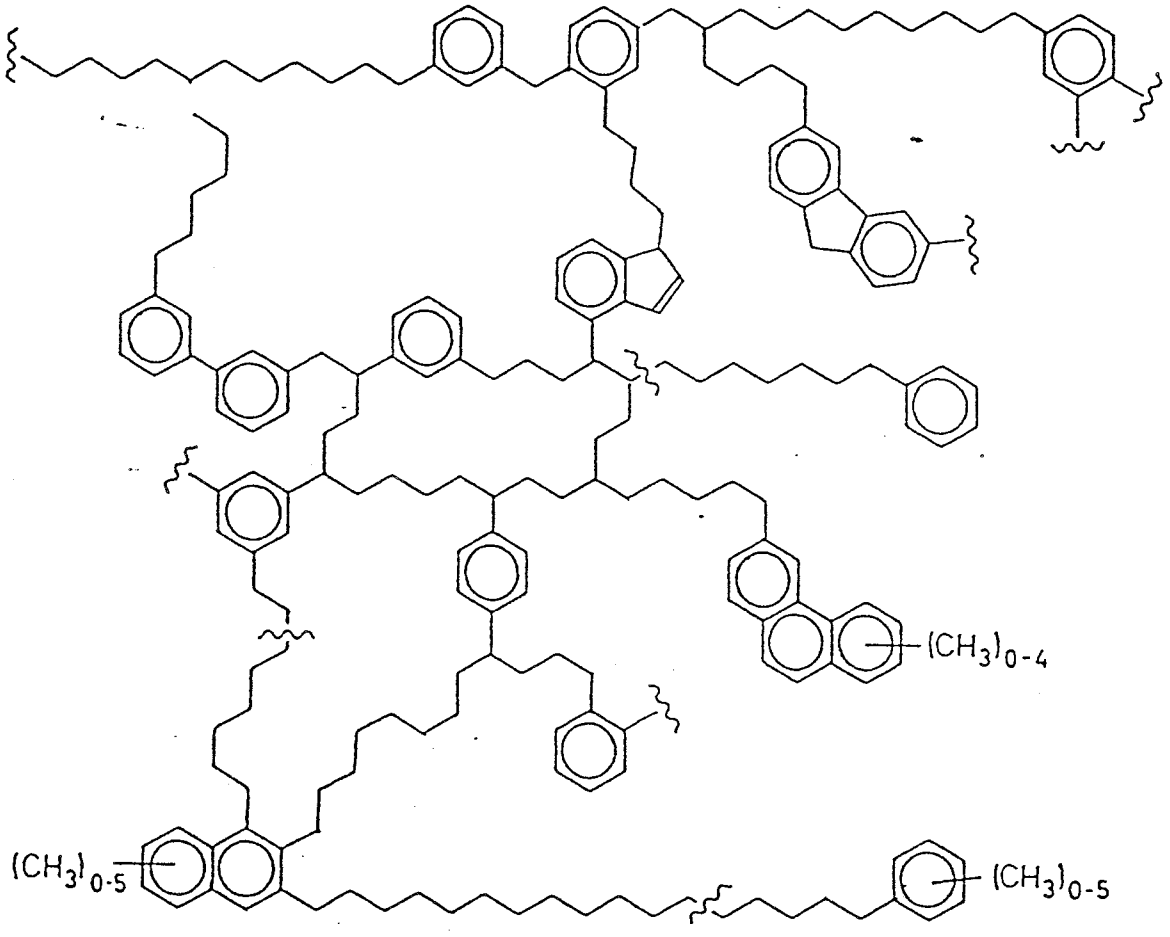


Figure 1-3 : Structure de substances humiques présentée sous forme d'un réseau chimique flexible (Schulten *et al.*, 1991)

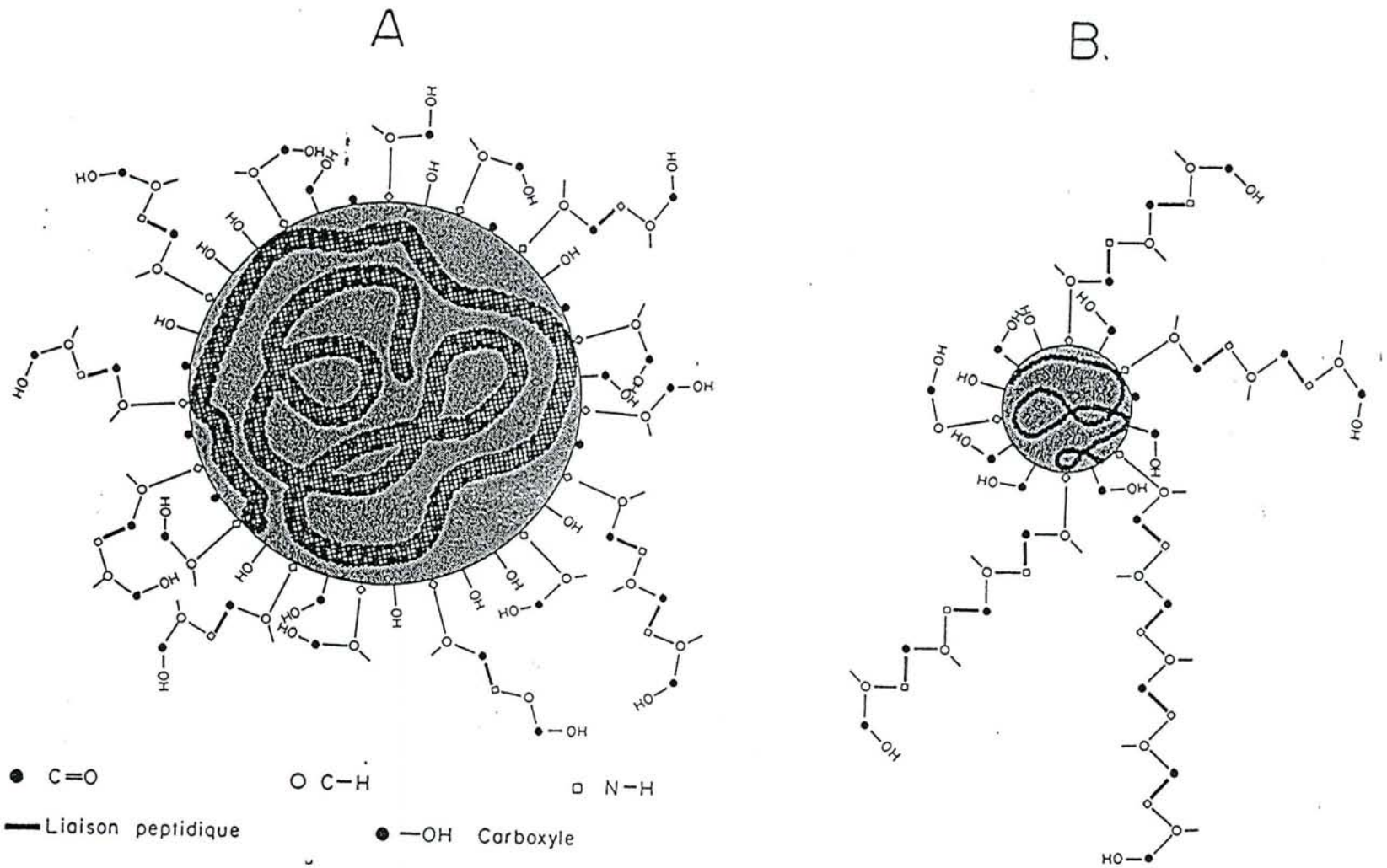


Figure 1-4 : Schéma structural de deux macromolécules de type humique (Andreux et Munier Lamy, 1994)
A) Masse moléculaire supérieure à 50 000 ; nucleus volumineux et enroulements compacts
B) Masse moléculaire inférieure à 5 000 ; nucleus peu développé et enroulements lâches

Le fractionnement des composés humiques est fondé sur leur dispersion et leur solubilité en milieu alcalin. L'extractant idéal devrait, en théorie, présenter plusieurs qualités (Stevenson, 1982) :

- permettre l'isolement de composés inaltérés et exempts de contaminants inorganiques.
- mener à une extraction complète des matériaux.
- être utilisable de façon universelle pour tous les sols.

Un tel extractant n'a hélas pas encore été découvert. A l'heure actuelle les réactifs les plus efficaces et les plus employés sont la soude et le pyrophosphate de sodium. La soude diluée (NaOH 0,1 M ou 0,5 M) est fréquemment utilisée en raison de son haut rendement d'extraction. De nombreuses controverses dans l'emploi de ce réactif viennent en particulier de la surestimation du taux d'extraction en raison d'une néoformation de composés humiques par oxydation des matières organiques fraîches (Stevenson, 1982) ou par autooxydation et hydrolyse des substances humiques. Le pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$ 0,1 % ou 0,1 M) est également utilisé car, par son pouvoir complexant des cations (Ca, Fe, Al, ...), il favorise la dissociation et la mise en solution des colloïdes humiques et organo-minéraux (Duchaufour et Jacquin, 1966 ; Schnitzer and Schuppli, 1989). Il est aussi efficace de combiner les effets décomplexant et salifiant en mélangeant la soude à la solution de pyrophosphate de sodium (Andreux et Munier Lamy, 1994).

Comme les problèmes qui interviennent lors de l'utilisation de solutions alcalines de pH élevés (> 10) sont essentiellement liés aux risques de néoformation de produits humiques à partir de matière organique fraîche, il est préférable d'effectuer un fractionnement préalable, par méthode densimétrique, afin d'éviter de fausser les résultats (Schnitzer and Khan, 1972).

La séparation des acides fulviques est obtenue par précipitation des acides humiques à pH compris entre 1 et 2, celle ci pouvant être incomplète au dessus ou au dessous de ces valeurs.

A ce stade, la séparation des trois classes de matières organiques est terminée. Le fractionnement en acides fulviques, acides humiques et humine donne des renseignements sur le taux d'extraction des substances humiques ainsi que sur leur degrés de polymérisation par l'intermédiaire du rapport AF/AH.

L'obtention de données plus précises sur les acides humiques et les acides fulviques, en vue de leur caractérisation, nécessite une phase de purification afin d'éliminer les réactifs d'extraction et les constituants minéraux ou non humiques qui leur sont associés.

La méthode la plus générale de purification des acides humiques consiste à les dialyser contre l'eau distillée puis à les décationiser sur résine échangeuse d'ions (Barriuso *et al.*, 1985). Les acides fulviques posent d'avantage de problèmes de purification en raison de leur petite taille et de leur grande réactivité. De plus, étant dans la fraction soluble à tous les pH, ils sont associés à tous les sels solubles

ou pseudo-solubles. Après précipitation et élimination du β humus (essentiellement de la silice et des hydroxydes de fer et d'aluminium), ils sont dialysés contre l'eau distillée puis décationnisés sur résines échangeuses d'ions.

Les composés ainsi purifiés puis lyophilisés peuvent être caractérisés grâce à de nombreuses méthodes. La première et la plus fondamentale consiste a effectuer une analyse élémentaire organique. Celle ci va tout d'abord fournir la composition en éléments majeurs, c'est à dire carbone (C), hydrogène (H), oxygène (O) et azote (N), des composés étudiés et permettra également d'établir les rapports H/C et O/C qui sont couramment utilisés pour déterminer le degré d'aromaticité ainsi que l'origine des substances humiques. Suite à cela, tout un ensemble de méthodes plus ou moins fondamentales peuvent être envisagées selon la problématique posée. Il est possible de citer, de façon non exhaustive, les analyses fonctionnelles par voie chimique, celles par spectroscopie (UV, visible, IR, RMN ...), les techniques dégradatives chimiques ou pyrolytiques. Ces dernières, couplées à des systèmes chromatographie - spectrométrie de masse, permettent des approches très intéressantes pour la connaissance des éléments structuraux des composés humiques.

Les connaissances, les définitions et les techniques issues de l'étude des matières organiques des sols sont, par analogie, parfaitement valables et applicables dans tout type d'études d'associations organo-minérales. Ce principe de base a été largement suivi pour l'étude et la caractérisation des substances humiques présentes dans d'autres milieux que les sols (sédiments récents ou peu diagénétisés, sédiments lacustres et marins) ainsi que pour les substances humiques aquatiques (rivières, mers, océans, lacs, ...) (Aiken *et al.*, 1985).

Les sédiments récents contiennent une grande variété de matériaux organiques très voisins de ceux présents dans les sols et les appellations "acide fulvique", "acide humique" et "humine" ont été conservées.

L'évolution des sédiments est divisée, par les géochimistes, en trois étapes principales : diagénèse, catagénèse et métagénèse. Un schéma général de l'évolution de la matière organique du dépôt à la fin de la métagénèse est donné figure 1-5. Il s'avère qu'une fraction très importante de la matière organique des sédiments récents est constituée de substances humiques dont l'extractibilité par des solutions alcalines diminue avec l'enfouissement (Huc, 1973 ; Georgakopoulos, 1984). L'évolution de cette fraction organique dans la diagénèse conduit vers la formation de pétrole et de gaz.

De nombreuses études, développées par la recherche pétrolière donc orientées vers l'évolution des kérogènes et la formation des hydrocarbures, ont été effectuées sur les matières organiques des sédiments marins récents (Huc, 1973, 1980 ; Jocteur Monrozier, 1984). Une revue d'ensemble sur ce sujet est proposée par Vandenbroucke *et al.* (1985).

D'autres travaux sur les matières organiques sédimentaires ont été réalisés sur des sédiments uranifères dans le cadre d'études sur les liaisons uranium/matière organique (Capus, 1979 ; Bach, 1980 ; Landais, 1986) ainsi que sur la solubilisation de l'uranium.

Les matières organiques associées aux dépôts de phosphates ont également été étudiées afin, entre autre, de mieux appréhender les processus de phosphatogénèse (Trichet *et al.*, 1990).

Mais par contre, jusqu'à présent, très peu de connaissances ont été acquises au sujet des matières organiques rencontrées dans les bassins sédimentaires associés aux dépôts d'argiles. De ce fait, la première partie de ce travail correspond à l'étude de la nature ainsi que des propriétés chimiques et physico-chimiques des matières organiques associées aux kaolins. Les résultats obtenus, outre de caractériser les composés étudiés, permettront également d'aborder leur aptitude à la biodégradation.

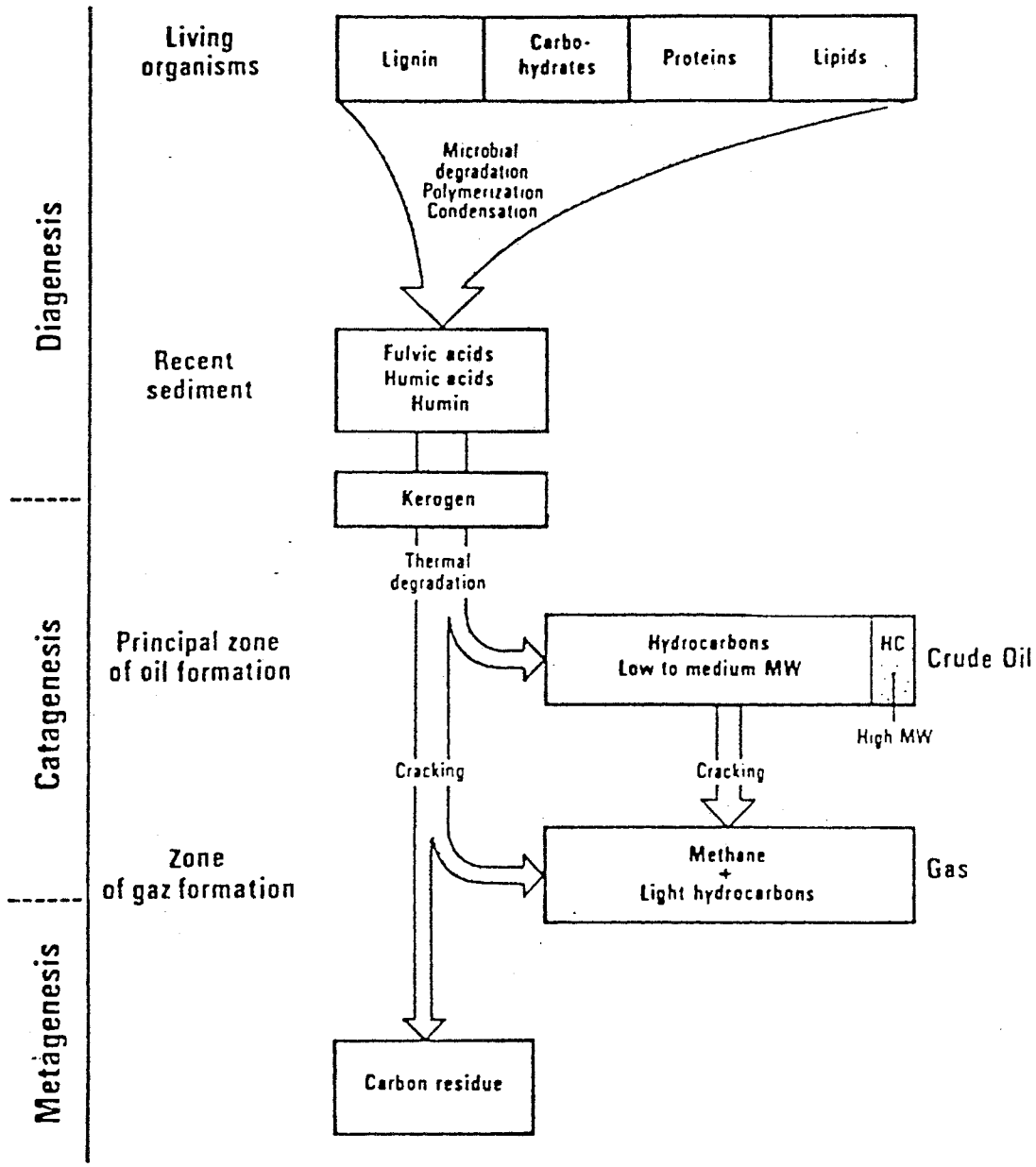


Figure 1-5 : Schéma général de l'évolution de la matière organique du moment de dépôt jusqu'à la fin de la métagénèse (d'après Tissot and Welte, 1978)

Chapitre II : Les argiles étudiées

II-1 Présentation de bassin

Les "Argiles Plastiques" étudiées font partie de la formation des Argiles Plastiques qui s'étend depuis la Normandie jusqu'en Brie. Ce sont des sédiments continentaux, déposés pendant le Sparnacien, au début de la période tertiaire, il y a 50 à 55 millions d'années. On y distingue deux faciès principaux qui se succèdent dans le temps : les Argiles Plastiques bariolées dans l'ouest du bassin et les Argiles Plastiques des parties méridionales et orientales (Thiry, 1981 cité par Thiry et Rayot, 1993).

Les Argiles Plastiques bariolées sont de nature smectitique et donc tout à fait impropres à une utilisation céramique.

Les Argiles Plastiques étudiées sont kaolinitiques et exploitées pour la céramique et le réfractaire. Ces argiles sont accessibles à l'affleurement ou à faible profondeur en bordure du plateau de Brie (le long de la cuesta de l'Ile de France) et dans la région de Breuillet, à la faveur de la remontée anticlinale de la Remarde (figure 1-6). Elles seules sont concernées par la présente étude.

La couche d'argile est variable tant en épaisseur (interstratification de sables), qu'en composition (argiles quasi pures ou mélangées à des proportions variables de quartz). Une reconnaissance de ces argiles nécessite un échantillonnage large, sur toute l'extension du bassin ainsi qu'une subdivision de la couche en plusieurs échantillons.

II-2 L'échantillonnage

En ce qui concerne cette étude relative aux matières organiques associées aux argiles, l'échantillonnage a uniquement porté sur les carrières exploitées actuellement par la société DAMREC.

Toutes les coupes échantillonnées ont été décrites et la position des échantillons repérée. La couche exploitée a été systématiquement subdivisée, généralement en trois parties, et le toit ainsi que le pied de la couche ont également été échantillonnés. Les échantillons ont été décrits macroscopiquement lors du prélèvement (couleur, matière organique, pyrite, grain de silice, présence de racines, ...). La localisation des sites est donnée par la carte présentée figure 1-7.

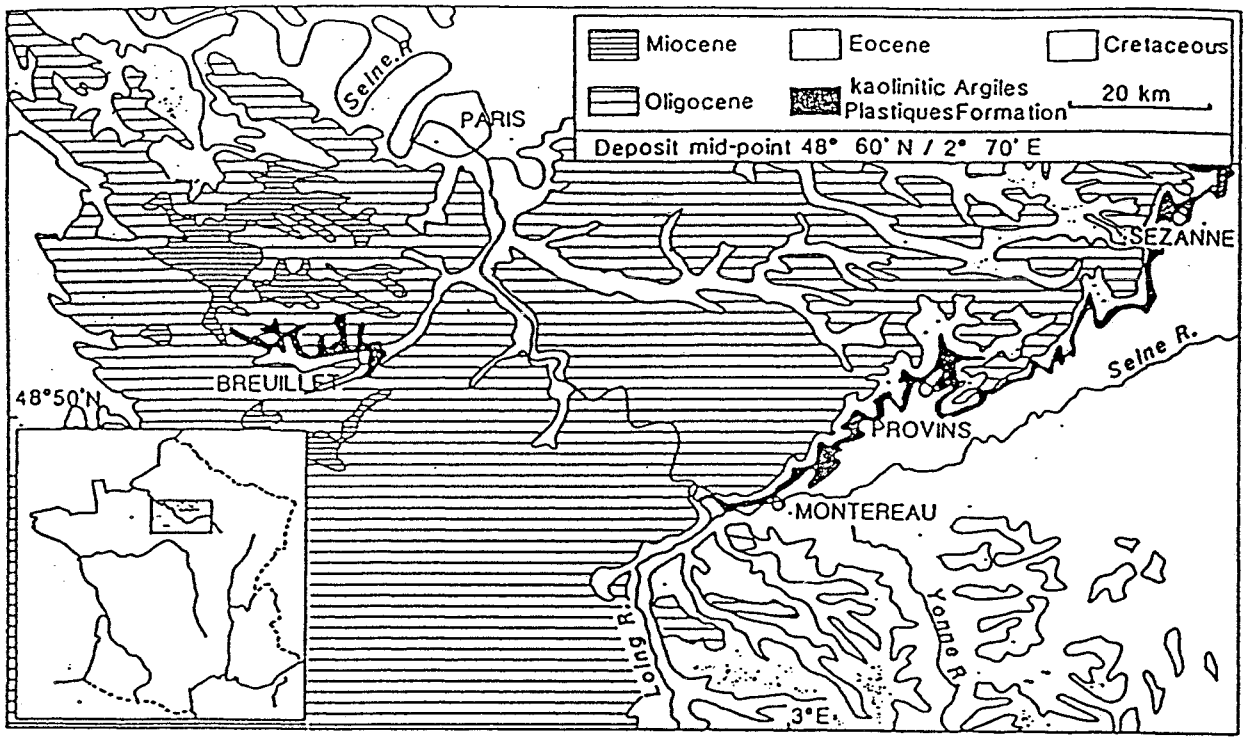


Figure 1-6 : Carte géologique de la région de Breuillet

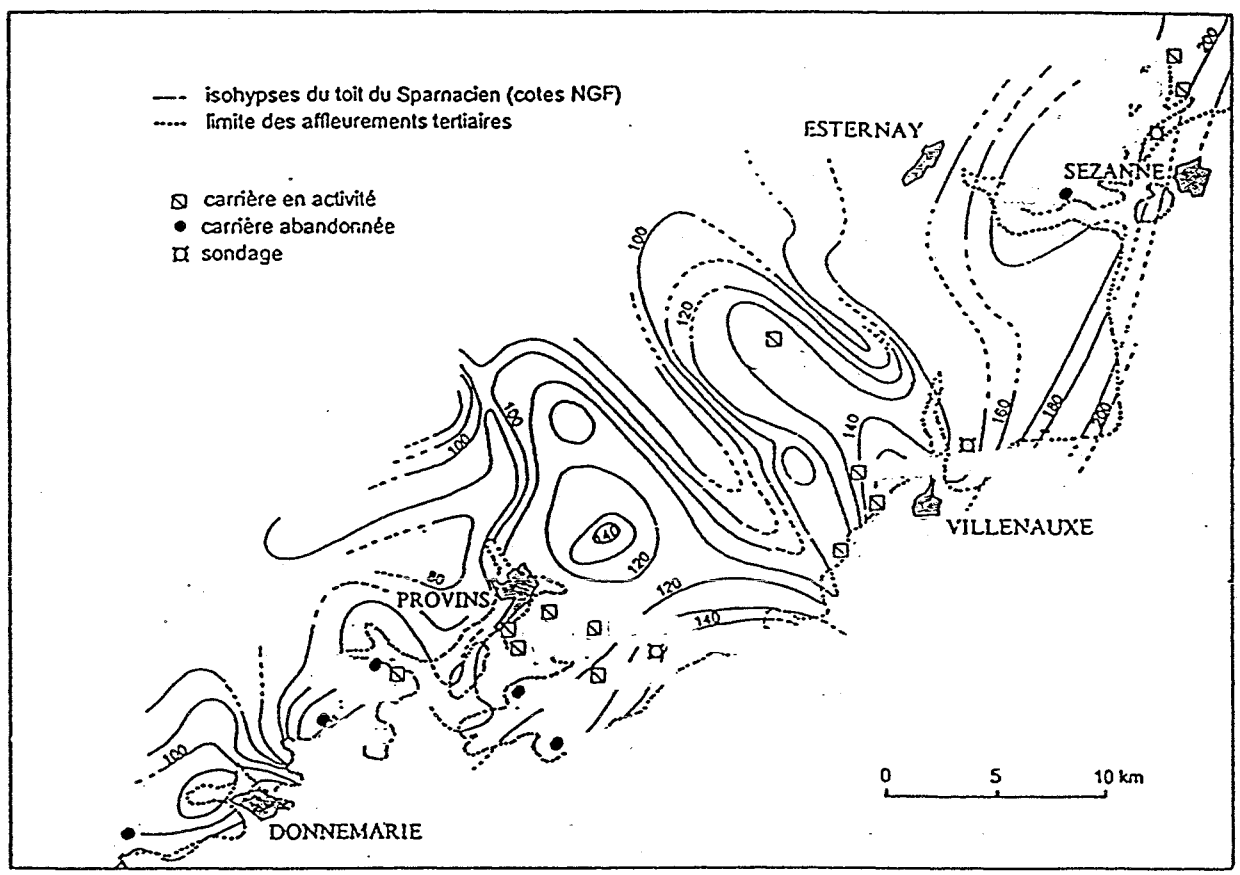


Figure 1-7 : Carte des sites échantillonnés dans le cadre de l'étude

L'échantillonnage s'est déroulé de la façon suivante :

- repérage des couches sur le front de taille
- extraction d'une quantité minimum de 200 kg d'argile à la pelle mécanique
- repérage de chaque échantillon par un code de quatre lettres et un chiffre. Les quatre lettres étant une abréviation du nom de la carrière, le chiffre correspondant au niveau de la couche dans le front de taille (les numéros croissent avec la profondeur)
- déchiquetage grossier des 200 kg d'échantillon
- déchiquetage plus fin avec adaptation d'un système à quatre canaux de manière à quarter l'échantillon

Il est également important d'apporter quelques précisions sur la méthode de quartage : 200 kg d'argile sont introduits dans le déchiqueteur, 50 kg sont récupérés à la sortie du canal 1. Ces 50 kg sont réintroduits dans le déchiqueteur, 12 kg sont récupérés à la sortie du canal 1. Ces 12 kg sont réintroduits dans le déchiqueteur et 3 kg sont prélevés à la sortie du canal 1. Puis des prélèvements de 1 kg sont réalisés dans les sacs de 3 kg pour être envoyés aux laboratoires pour les diverses analyses.

Au total, 63 échantillons de carrières en exploitation ont été prélevés. Sur chacun d'eux des analyses minéralogiques et chimiques ont été réalisées, et le traitement statistique qui a suivi a permis d'effectuer une sélection. Nous avons ainsi reçu 18 échantillons pour l'étude des matières organiques.

Les descriptions des carrières dont sont issus les échantillons, les descriptions des échantillons eux mêmes ainsi que les analyses correspondantes sont fournies par les annexes 1, 2 et 3.

Chapitre III : Moyens et méthodes mises en oeuvre pour l'étude des matières organiques

Les échantillons d'argiles choisis pour cette étude ont été prélevés, comme cela est indiqué précédemment (chapitre II), dans des sites représentatifs du bassin sédimentaire concerné.

L'étude des matières organiques associées aux argiles est réalisée en faisant appel à des méthodes analytiques propres à l'étude des matières organiques des sols : détermination des teneurs en carbone organique, extractibilité dans des réactifs alcalins, fractionnement en acides fulviques, acides humiques et humine.

Elle vise également à mettre en évidence et à quantifier des composés organiques, autres que les substances humiques, tels que les hydrates de carbone et les polysaccharides.

De plus un intérêt particulier est porté sur la nature ainsi que sur certaines propriétés physico-chimiques des substances alcalino-solubles, notamment les acides humiques.

III-1 Les argiles

La présentation des sites de prélèvements ainsi que des caractéristiques minéralogiques et chimiques des échantillons sont présentés dans les annexes 1, 2 et 3. Les échantillons d'argiles étudiés sont séchés, broyés et tamisés à 0,5 mm.

III-2 Analyses élémentaires des argiles, des composés humiques alcalino-solubles et des résidus de pyrolyse

Les éléments C, H, N et O sont dosés à l'autoanalyseur CHNS+O 1108 Carlo Erba. Pour les argiles seuls le carbone et l'azote sont déterminés. Pour les acides humiques et fulviques, les teneurs en carbone, azote, hydrogène et oxygène sont mesurées à partir des matériaux extraits et lyophilisés.

En ce qui concerne les acides humiques et fulviques, les teneurs en cendres minérales sont déterminées par analyse thermogravimétrique sous air et chauffage jusqu'à 900 °C (thermogravimètre Mettler BE 20).

III-3 Extraction alcaline des matières organiques

La complexation des composés humiques avec des cations métalliques (humates) et des minéraux argileux (complexes argilo-humiques) constitue un sérieux obstacle vis-à-vis de l'analyse des fractions organiques (figure 1-8). Afin

d'extraire les matières organiques il convient donc de déstabiliser ces complexes par l'emploi de réactifs adaptés. La méthode la plus utilisée est l'extraction par les réactifs alcalins. Cette technique, induisant l'utilisation de solutions à pH élevés (pH > 12), peut cependant provoquer une néoformation artificielle de composés humiques au dépend de la matière organique fraîche (Duchaufour et Jacquin, 1966). Cet inconvénient n'a toutefois pas lieu d'être dans le cas des échantillons concernés par cette étude car ils sont exempts de matières organiques fraîches.

La soude diluée (0,1 à 0,5 N) ainsi que le pyrophosphate de sodium (1 %) sont les réactifs les plus utilisés, seuls ou combinés.

Le protocole appliqué, schématisé figure 1-9, est le suivant :

35 g d'argile sont mis en agitation pendant 1 heure en présence de 175 ml de solution alcaline (NaOH N/10 ou NaOH N/10 + $Na_4P_2O_7$ 1%), l'ensemble est ensuite centrifugé 15 mn à 10 000 tr/mn, les extractions successives se poursuivent jusqu'à épuisement (2 ou 3 extractions suffisent généralement).

Les complexes organo-argilliques dispersés dans les extraits alcalins sont refloculés par KCl 2%. Après une nuit à 4°C les particules floculées sont séparées par centrifugation 15 mn à 10 000 tr/mn. Le culot est réuni au résidu insoluble du sol. Le surnageant obtenu renferme les composés alcalino-solubles.

Les acides fulviques et les acides humiques sont séparés par floculation des seconds à pH = 2 par HCl 2N puis centrifugation 20 mn à 10 000 tr/mn après une nuit de repos à 4°C.

La teneur en carbone des solutions alcalines est déterminée au Carmograph Wöhstoff, celle des solutions d'acides fulviques par autoanalyseur TCM 480 Carlo Erba.

III-4 Coefficients aromatiques Q 4/6 (ou rapports E4/E6) des liqueurs alcalines

La couleur des solutions humiques obtenues après extraction alcaline peut être un critère de classification. En effet des comparaisons peuvent être effectuées à partir du rapport des densités optiques à 465 nm et 665 nm. Ce rapport noté Q 4/6 (ou E4/E6) est également appelé coefficient d'aromaticité, il varie de façon inversement proportionnelle au degré de condensation et d'aromaticité des composés concernés (Barriuso, 1985).

Les coefficients aromatiques Q 4/6 des extraits alcalins sont obtenus par mesures des densités optiques sur un spectrophotomètre Beckman Modèle 25, en utilisant des cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur.

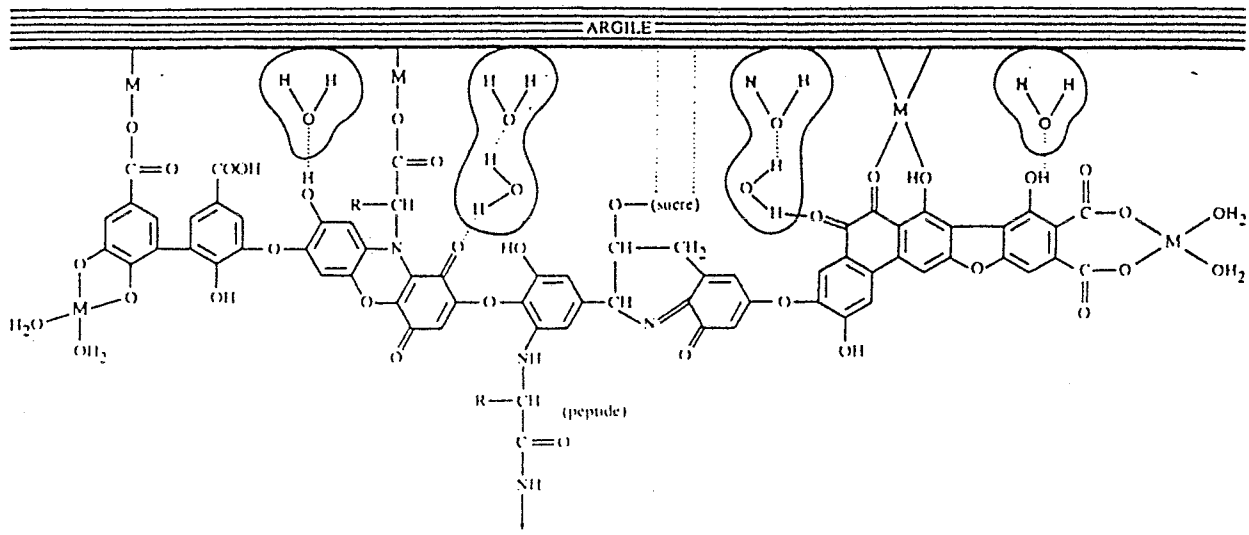


Figure 1-8 : Fixation des acides humiques sur les argiles (Stevenson, 1982)

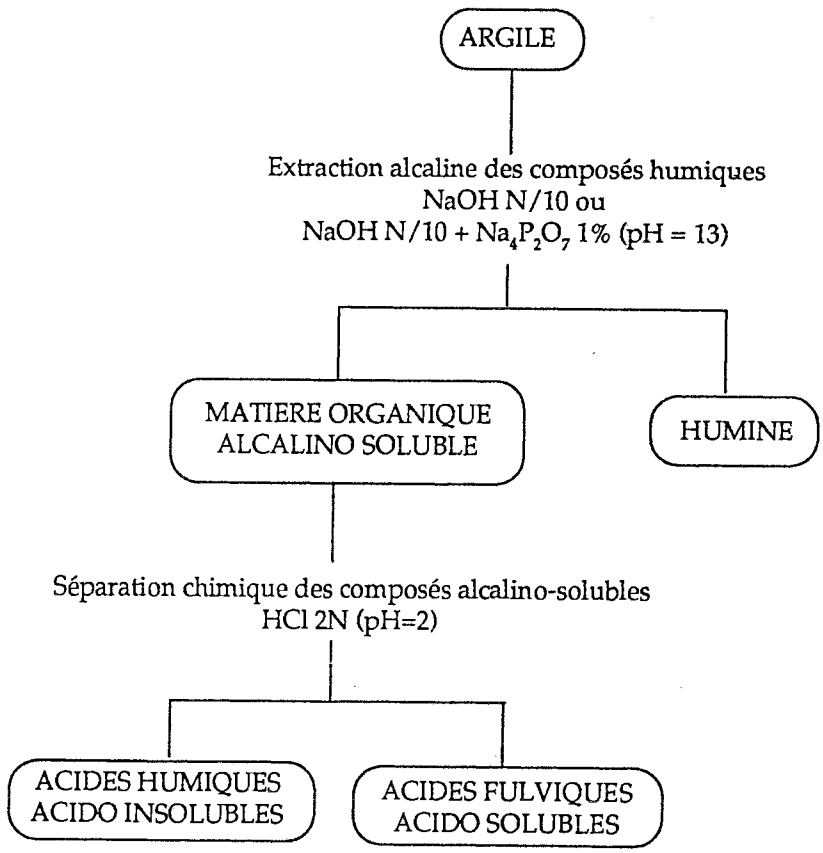


Figure 1-9 : Méthode d'extraction des matières organiques associées aux kaolins

III-5 Traitements hydrolytiques des argiles

Les hydrates de carbone représentent entre 5 et 10 % de la matière organique des sols. Dans cet ensemble complexe ils constituent une des principales sources de carbone et d'énergie pour les différentes populations microbiennes. Les oses libres, rapidement assimilables, sont fugaces et peu abondants. La part la plus importante des carbohydrates est formée de polysaccharides plus ou moins complexes (Cheshire, 1979).

Leur approche peut être réalisée en effectuant des extractions à l'eau chaude ainsi que des hydrolyses acides.

III-5-1 Extraction à l'eau chaude

Cette méthode permet d'estimer les quantités de matières organiques facilement disponibles, c'est à dire les hydrates de carbone solubles. Le protocole appliqué est le suivant :

10 g d'argile et 90 ml d'eau distillée sont homogénéisés puis autoclavés à 120 °C pendant 20 minutes. La solution est ensuite centrifugée. Le surnageant est récupéré, filtré à 0,45 µm, sa teneur en carbone organique est déterminée par analyseur (Carlo Erba TCM 480).

III-5-2 Hydrolyse sulfurique :

L'hydrolyse acide est la principale technique de dégradation chimique utilisée pour les études des matières organiques des sols et des sédiments. Ce traitement provoque la rupture des liaisons ester, éther et/ou amide, entraînant la libération de molécules plus petites, plus polaires et donc solubles (Barriuso, 1985).

L'efficacité (temps, température, concentration en acide) des méthodes hydrolytiques utilisées est fonction de la nature des composés à étudier ainsi que de la nature des liaisons présentes dans ces composés (Cheshire, 1979).

Afin de pouvoir s'intéresser aux molécules glucidiques, les conditions d'hydrolyses retenues sont les suivantes :
le poids d'échantillon correspondant à 10 mg de carbone organique, dispersé dans 100 ml de H_2SO_4 N est hydrolysé à reflux pendant 6 heures. Après refroidissement les hydrolysats sont obtenus par centrifugation. Sur chacun d'eux sont réalisés un dosage de carbone (autoanalyseur Carlo Erba TCM 480) ainsi qu'un dosage des "sucres" neutres selon la méthode de Dubois *et al.* (1956) (annexe 4).

III-6 Purification des acides humiques et des acides fulviques

La purification des acides humiques et fulviques bruts obtenus après extraction se fait en trois étapes : dialyse des composés solubles, décationisation, lyophilisation.

Les acides fulviques bruts sont amenés à pH = 8 avec de la soude N. Après une nuit à 4°C le β humus précipité est séparé par centrifugation 10 mn à 10 000 tr/mn. Le surnageant contenant les acides fulviques est dialysé contre eau distillée dans des boudins de dialyse "Spectra Por" (seuil de coupure 2 000 D) plongeant dans des cuvettes où l'eau est renouvelée.
Les acides humiques bruts sont ressolubilisés avec de la soude N/10 et dialysés contre eau distillée dans des boudins "Visking" (seuil de coupure 4 000 D). Le contrôle, dans les solutions dialysées, de la présence de soude (mesure du pH), permet de s'assurer que la dialyse est terminée.

Les solutions d'acides humiques et fulviques dialysés sont passées sur une résine polystyrène-sulfoné "Dowex 50 W x 8" (50/100 mesh, capacité d'échange 4,9 à 5,2 m.e./g de résine), le débit de percolation étant assez lent, de l'ordre du goutte à goutte. A la sortie des colonnes le pH des solutions est contrôlé afin de vérifier l'absence de Na^+. Avant toute utilisation les résines, préalablement gonflées dans l'eau et décantées, sont équilibrées par élutions successives de soude 2N, d'eau, d'HCl 2N et d'eau.

En dernier lieu, les solutions d'acides humiques et fulviques purifiés récupérées à la sortie des colonnes sont congelées rapidement et lyophilisées.

III-7 Spectrophotométrie infrarouge des acides humiques et des résidus de pyrolyse

La spectrophotométrie infrarouge permet d'obtenir des renseignements sur les groupements fonctionnels, et par la même, sur la structure du composé concerné. A partir du spectre obtenu, il est possible de caractériser les fonctions majeures (C=C, C=O, C-H, O-H, C-O, C-N) et de quantifier leur abondance. Il est également possible de contrôler l'absence d'impuretés minérales et également d'effectuer des comparaisons entre molécules.

Les spectres infrarouge des acides humiques, des acides fulviques et des résidus de pyrolyses ont été obtenus avec un appareil Beckmann ou avec un appareil Shimadzu.

Pour chaque cas, 1 mg d'échantillon déshydraté est mélangé intimement avec 300 mg de KBr également déshydraté. Le mélange, introduit dans un moule, est vitrifié sous une pression de 10 T/cm^2 et sous vide. Les spectres sont enregistrés en absorbance sur une gamme de longueur d'onde allant de 4 000 à 200 cm^{-1}.

Les interprétations des spectres sont faites selon Schnitzer et Griffith (1975) et Bellamy (1975), et le tableau 1-I récapitule les attributions des principales bandes d'absorption (Barriuso, 1985).

III-8 Stabilité thermique des acides humiques

La dégradation thermique ou pyrolyse est surtout adaptée à l'étude des charbons et des kérogènes, mais elle peut également être appliquée aux composés humiques. Il s'agit d'une technique de caractérisation globale qui tient compte de la composition et de la structure des composés. Elle permet, dans ce cas, de préciser la nature et la stabilité des acides humiques ainsi que d'approcher leur comportement à la cuisson.

Des prises d'essais de 20 mg d'acides humiques déshydratés sont traitées à 5 températures différentes (150°C - 250°C - 350°C - 450°C - 550°C) et sous 3 atmosphères différentes (inerte - réductrice - oxydante) pendant des durées de une heure (four Mettlet BE 20). Chaque prise d'essai subit donc un seul traitement à une seule température et sous une seule atmosphère.

Pour chaque essai envisagé (toujours réalisé en double), la perte de poids est déterminée, les éléments C, N et H sont dosés dans le résidu et le spectre infrarouge du résidu est réalisé.

Tableau 1-I : Assignation des bandes d'absorption infrarouge des composés humiques

Description	Localisation	Vibration	Assignation
Large bande à 3400 cm^{-1}	3700-3500 cm^{-1} 3600-3200 cm^{-1} 3500-3100 cm^{-1} 3090-3070 cm^{-1}	Valence Valence Valence Valence	O-H libres O-H liés N-H amides-peptides, encombrée par la précédente C-H aromatiques et oléfiniques à peine visibles
Double pic centré à 2920 cm^{-1}	2962-2853 cm^{-1}	Valence	C-H aliphatiques
Epaulement à 2500 cm^{-1}	2700-2400 cm^{-1}	Valence	O-H liés, chélatés ou pontés (H) dans des acides carboxyliques
Pic à 1710 cm^{-1}	1730-1700 cm^{-1}	Valence	C=O carboxyliques, cétoniques ou esters
Large bande à 1630 cm^{-1}	1690-1630 cm^{-1}	Déformation Valence Valence Valence Déformation	H-O-H C=C aromatiques et oléfiniques O=C quinoniques pontés (H) à OH acides O=C associés à des amides N-H amides, amines primaires
Pics sur la bande précédente	1570-1515 cm^{-1}	Déformation Vibrations du	N-H amides, amines secondaires squelette aromatique
Large bande à 1400 cm^{-1}	1460-1450 cm^{-1} 1420-1300 cm^{-1} 1395-1365 cm^{-1}	Déformation Vibration Déformation	asymétriques C-H de CH2 et CH3 symétriques stucture résonnante carboxylate symétriques C-H de (CH3)n
Large bande à 1230 cm^{-1}	1320-1200 cm^{-1} 1200 cm^{-1} 1160-1130 cm^{-1}	Valence Déformation Déformation Vibrations	C-O O-H O-H phénoliques squelette aliphatique
Pic à 1030 cm^{-1}	1100-1040 cm^{-1} 1100-1000 cm^{-1}	Valence Valence	C-O alcooliques Si-O
1800-930 cm^{-1}	grand massif dû à plusieurs vibrations, principalement du squelette carboné et des groupements C-OR (éther, hydroxyl, ...)		
930-660 cm^{-1}	bandes d'intensités variables, pas toujours visibles, dues à des vibrations symétriques, asymétriques et hors du plan des C-H aromatiques		

Chapitre IV : Nature et propriétés chimiques des matières organiques associées aux argiles

L'étude de la nature et des propriétés chimiques et physico-chimiques des matières organiques associées aux argiles est abordée à l'aide de méthodes classiquement mises en oeuvre pour la caractérisation des substances humiques (acides humiques, acides fulviques et humine) des sols (Hayes, 1985 ; Swift, 1985 ; Andreux et Munier Lamy, 1994).

Toutefois, depuis l'extraction, la répartition et la caractérisation globale de ces composés organiques jusqu'à la définition plus précise de leurs propriétés (composition élémentaire, groupements fonctionnels, etc) il a été souvent nécessaire d'adapter les méthodes et de faire des choix en raison des teneurs et de la nature des matières organiques.

IV-1 Définition des principaux constituants des matières organiques : application à un essai de typologie des kaolins prélevés

IV-1-1 Comparaison et choix de méthodes d'extraction

L'efficacité de deux réactifs alcalins utilisés habituellement pour extraire les matières organiques des sols est comparée pour l'étude des matières organiques associées aux argiles. Elle est déterminée en examinant la quantité de matière organique alcalino-soluble obtenue ainsi que les caractéristiques (DO) des extraits. Cette comparaison est effectuée sur huit échantillons représentant la gamme des teneurs en carbone organique des argiles étudiées (de 0,07 % à 0,66 %).

Pour l'ensemble des échantillons, comme l'indiquent les résultats présentés par le tableau 1-II, la soude N/10 n'a permis l'extraction que d'une faible quantité de matière organique puisque les pourcentages du carbone organique extrait varient de 8 % pour le plus faible (CHAL3) à 31 % pour le plus élevé (MOMB4). Par contre le mélange soude N/10 et pyrophosphate de sodium 1 % est plus efficace puisque les valeurs de carbone organique extrait s'échelonnent de 38 % (SEIG1) à 77 % (MOMB4).

Ces données sont complétées par la mesure des coefficients d'aromaticité des extraits. Ce coefficient défini pour les solutions d'acides humiques et fulviques, noté Q 4/6, est obtenu en faisant le rapport des densités optiques à 465 nm et 665 nm (Jacquin, 1963 ; Flaig 1970). Il est indépendant de la concentration en carbone et est couramment utilisé pour la caractérisation des composés humiques. L'augmentation du degré de condensation et d'aromaticité se traduit par une diminution du Q 4/6 (Barriuso, 1985).

Tableau 1-II : Comparaison entre l'extraction des matières organiques par la soude N/10 et par le mélange soude N/10 + pyrophosphate de sodium 1%.

	CHAL 3	MOMB 1	SEIG 1	CHAL 4	LACH 3	SEIG 4	SEIG 2	MOMB4
COT (%)	0,07	0,08	0,11	0,20	0,25	0,41	0,59	0,66
Extraction à la soude N/10								
C de l'humine*	92	85	89	91	80	84	88	69
C MO alcalino-soluble*	8	15	11	9	20	16	12	31
Q4/6	17	17,3	13,3	14,7	12,6	12,5	9,7	7,2
Extraction par le mélange soude N/10 + pyrophosphate de sodium 1%								
C de l'humine*	58	58	62	48	39	33	34	23
C MO alcalino-soluble*	42	42	38	52	61	67	66	77
Q4/6	7,1	5,4	4,5	5,9	5,4	6,8	5,5	5,8

* Résultats exprimés en % du carbone organique total
(COT = Carbone Organique Total ; C MO = Carbone des Matières Organiques)

Les extraits alcalins obtenus avec la soude seule ont des coefficients Q 4/6 plus élevés que ceux obtenus avec le réactif soude - pyrophosphate de sodium. Dans le premier cas les coefficients Q4/6 sont, dans l'ensemble, supérieurs à 10 tandis que dans le deuxième cas ils sont tous inférieurs à 7,1. Les composés humiques extraits par le mélange soude plus pyrophosphate de sodium sont donc plus aromatiques et plus condensés que ceux extraits par la soude seule.

L'efficacité du mélange pyrophosphate de sodium et soude en tant qu'agent extractant des matières organiques associées aux argiles est ainsi démontrée puisque les matières organiques sont extraites en quantité deux à cinq fois plus importantes qu'avec la soude seule. Ce mélange, comme le suggère Bruckert (1994), favorise la dissolution des complexes organo-minéraux et permet l'extraction de composés humiques peu disponibles et relativement condensés. *A contrario,* la soude seule ne permet l'extraction que des matières organiques facilement disponibles et peu condensées, c'est à dire moins humifiées. Comme les deux réactifs testés ont des pH identiques, c'est bien à l'effet complexant et dispersant du pyrophosphate de sodium que doit être attribué ce rôle important. Ces remarques révèlent ou au moins suggèrent la force des liaisons qui associent particules minérales et composés organiques, ainsi que les difficultés à séparer ces combinaisons. Les différences observées résulteraient donc de l'incapacité de la soude N/10 à séparer efficacement les matières organiques de la fraction minérale.

Cette étape préliminaire portant sur le choix de la solution alcaline (pH, force ionique, ...) en vue d'une séparation des composés organiques est primordiale. De nombreux auteurs s'y sont déjà intéressés (Levesque and Schnitzer, 1966 ; Barriuso, 1985 ; Schnitzer and Schuppli, 1989) car les critères permettant la caractérisation des matières organiques sont reliés aux résultats obtenus par l'extraction de celles ci (taux d'extraction, taux d'humification, ...). Comme nous venons de le constater, pour un même échantillon, ces critères sont sujet à variation puisqu'ils dépendent de la méthode d'extraction utilisée. Ils n'ont donc qu'une signification relative et doivent être comparés pour des méthodes semblables.

Dans le cas présent, l'agent extractant utilisé sera le plus adapté aux échantillons à étudier : il s'agit donc du mélange soude N/10 et pyrophosphate de sodium 1 %. Il est ensuite impératif de déterminer le nombre de cycle d'extraction nécessaire et suffisant pour obtenir le rendement maximum en matières organiques alcalino-solubles, c'est à dire l'extraction maximum de composés humiques et fulviques.

Le tableau 1-III indique les proportions de carbone obtenues à chaque extraction, exprimées en pourcentage du carbone alcalino-soluble total. Le choix de trois cycles se révèle judicieux. La première extraction entraîne 72 à 82 % des matières organiques alcalino-solubles. Un deuxième traitement est utile et extrait 15 à 28 % des matières organiques alcalino-solubles mais par contre le troisième apporte peu. Comme les échantillons d'argile présentent des teneurs en carbone organique peu élevées, dans certains cas les extraits issus du troisième traitement renferment si peu de carbone que celui ci n'est plus détectable. Les résultats exposés ci dessus permettent de limiter le nombre d'extraction à trois ou même à

Tableau 1-III : Cinétique d'extraction des matières organiques par le mélange soude N/10 et pyrophosphate de sodium 1 %.

	CHAL 3	MOMB 1	SEIG 1	CHAL 4	LACH 3	SEIG 4	SEIG 2	MOMB 4
COT (%)	0,07	0,08	0,11	0,20	0,24	0,41	0,59	0,66
1 er cycle : C extrait *	82,1	72,2	72,3	78,8	76,0	76,7	72,1	77,9
2 ème cycle : C extrait *	17,9	27,8	27,7	14,9	16,3	17	21,9	17,7
3 ème cycle : C extrait *	nd	nd	nd	6,3	7,7	6,3	6	4,4

* Résultats exprimés en pourcentage du carbone alcalino-soluble total extrait
COT = Carbone Organique Total
nd : non détectable

deux pour des échantillons dont les teneurs en carbone organique initial sont inférieures à 0,1.

IV-1-2 Répartition des acides fulviques, acides humiques et humine dans les divers échantillons de kaolins

Le protocole d'extraction des matières organiques associées aux argiles a été appliqué aux dix huit échantillons disponibles. Pour chacun d'eux un ensemble de caractères assez complet a été déterminé.

Les premiers paramètres importants concernent l'analyse élémentaire en carbone organique (C) et en azote (N) ainsi que le rapport C/N. Ils sont présentés dans les tableaux 1-IV et 1-V. A ces valeurs de base s'ajouteront diverses caractéristiques :

-le taux d'extraction des matières organiques alcalino-solubles exprimé par le pourcentage du carbone extrait à pH=12 par rapport au carbone organique initial

- le coefficient d'aromaticité des liqueurs alcalines (Q 4/6 = DO 465 nm/DO 665 nm)

- le taux d'extraction des acides fulviques (AF) exprimé par le pourcentage du carbone correspondant aux acides fulviques par rapport au carbone organique initial

- le taux d'extraction des acides humiques (AH) exprimé par le pourcentage du carbone correspondant aux acides humiques par rapport au carbone organique initial

- le rapport AF/AH

Les rapports C/N et AF/AH sont souvent interprétés en terme de biodégradabilité potentielle. Des valeurs basses de C/N indiquent une meilleur biodégradabilité, de même qu'un rapport AF/AH élevé car les acides fulviques, par leur structure et leur nature chimique, sont potentiellement plus facilement biodégradables que les acides humiques.

Dans l'ensemble les teneurs en carbone organique sont faibles puisqu'elles varient de 0,04 % pour le plus faible (BROY2 et TUNL2) à 0,66 % pour le plus élevé (MOMB4) (tableaux 1-IV et 1-V). Pour les sols les teneurs en carbone organique dépendent étroitement de l'origine de l'échantillon : elles sont statistiquement inférieures à 0,5 % dans les sols "désertiques", supérieures à 50 % dans les sols très organiques et comprises entre 0,5 et 3 % dans les quinze premiers centimètres d'un sol cultivé (Schnitzer, 1991).

Les pourcentages en azote sont également très faibles (tableaux 1-IV et 1-V). La valeur maximale observée est 0,02 % mais dans plus de la moitié des cas les teneurs en azote n'ont pu être déterminées car elles sont inférieures à 0,01 %. Dans ce cas, l'azote est considéré comme traces.

Tableau 1-IV : Principales caractéristiques des matières organiques des kaolins lors d'extractions réalisées avec le mélange soude N/10 + pyrophosphate de sodium 1 % (Première série d'échantillon).

	BROY 2	TUNL 2	CHAL 3	MOMB 1	TUNL 4	SEIG 1	GENE 2	BROY 4	CHAL 4
COT (%)	0,04	0,04	0,07	0,08	0,09	0,11	0,12	0,20	0,20
Azote (%)	traces	traces	traces	traces	traces	traces	0,01	0,01	traces
C/N							12	20	
C de l'humine*	60	66	58	58	67	62	70	50	48
C MO alcalino-soluble*	40	34	42	42	33	38	30	50	52
Q4/6	7,9	6,8	7,1	5,4	4,6	4,5	4,8	6,1	5,9
C AF*	23	32	27	32	25	23	16	19	20
C AH*	17	2	15	10	8	15	14	31	32
AF/AH	1,3	16,0	1,8	3,2	3,1	1,5	1,1	0,6	0,6

* Résultats exprimés en pourcentage du carbone organique total
(COT = Carbone Organique Total ; C MO = Carbone des Matières Organiques ; C AF = Carbone des Acides Fulviques ; C AH = Carbone des Acides Humiques)

Tableau 1-V : Principales caractéristiques des matières organiques des kaolins lors d'extraction réalisées avec le mélange soude N/10 + pyrophosphate de sodium 1 % (Deuxième série d'échantillon).

	LACH 3	LACH 4	BROY 6	SEIG 4	LACH 2	MOMB 3	SEIG 2	PGNY 3	MOMB 4
COT (%)	0,24	0,32	0,38	0,41	0,46	0,52	0,59	0,65	0,66
Azote (%)	traces	traces	traces	0,01	0,01	0,02	0,01	traces	0,02
C/N				41	46	26	59		33
C de l'humine*	39	40	35	33	42	38	34	35	23
C MO alcalino-soluble*	61	60	65	67	58	62	66	65	77
Q4/6	5,4	5,1	5,2	6,8	4,8	4,2	5,5	5,6	5,8
C AF*	11	7	15	27	8	4	15	8	21
C AH*	50	53	50	40	50	58	51	57	56
AF/AH	0,2	0,1	0,3	0,7	0,2	0,1	0,3	0,1	0,4

* Résultats exprimés en pourcentage du carbone organique total
(COT = Carbone Organique Total ; C MO = Carbone des Matières Organiques ; C AF = Carbone des Acides Fulviques ; C AH = Carbone des Acides Humiques)

Un échantillon (GENE2) présente un C/N de 12, deux autres (BROY4 et MOMB3) ont des C/N de, respectivement, 20 et 26, et MOMB4 présente un C/N égal à 33. Dans les trois autres cas où les teneurs en azote sont mesurables, les C/N varient de 41 à 59

Ces très faibles teneurs en azote sont à considérer comme un facteur négatif vis-à-vis de la biodégradabilité potentielle des matières organiques. En effet l'azote est un élément essentiel au développement des micro-organismes (bactéries et champignons) et des rapports C/N élevés sont défavorables à la biodégradation car ils indiquent une forte disproportion entre les teneurs relatives de ces deux éléments.

L'extraction des matières organiques alcalino-solubles (tableau 1-IV et 1-V) souligne que 30 à 77 % du carbone organique est extractible. Pour certains échantillons, comme GENE2 et TUNL4, les matières organiques semblent peu mobiles et peu accessibles à la biodégradation car elles se trouvent essentiellement sous forme d'humine.

Parmi les matières organiques alcalino-solubles, les acides fulviques sont relativement majoritaires pour les kaolins à faibles teneurs en carbone organique (COT < 0,12 %) tandis que pour les échantillons à teneurs plus importantes en carbone organique (COT > 0,2 %) , les acides humiques dominent dans la fraction alcalino-soluble.

Les coefficients d'aromaticité utilisés habituellement pour caractériser les extraits alcalins indiquent des valeurs comprises entre 4,2 et 7,9. Celles ci sont donc relativement basses et traduisent la présence, pour l'ensemble des échantillons, de matières organiques plutôt aromatiques et condensées. Aucun classement de ces coefficients Q 4/6 ne peut être établi en relation avec les teneurs en matières organiques alcalino-solubles ou en acides fulviques et humiques des kaolins.

Les résultats de ces analyses chimiques des échantillons permettent de les classer en trois groupes selon les teneurs en carbone organique, en acides fulviques et acides humiques et les valeurs des rapports AF/AH obtenus.

Le **premier groupe** correspond aux échantillons présentant les critères suivants:
- une faible teneur en carbone organique (comprise entre 0,04 et 0,12 %)
- une teneur en matières organiques inextractibles (humine) supérieure à celle en matière organique alcalino-soluble
- un rapport AF/AH élevé, supérieur à 1

Ces caractéristiques correspondent aux "profils chimiques" des échantillons : BROY2, TUNL2, CHAL3, MOMB1, TUNL4, SEIG1 et GENE2 (tableau 1-IV).

Le **second groupe** concerne les kaolins remarquables par :
- une teneur en carbone organique élevée (comprise entre 0,24 et 0,66 %)
- une teneur en humine inférieure à celle en matières organiques extractibles en milieu alcalin
- un rapport AF/AH faible, inférieur à 0,4

Cette série d'échantillons regroupe : LACH3, LACH4, BROY6, LACH2, MOMB3, SEIG2, PGNY3 et MOMB4 (tableau 1-IV et 1-V).

Le **troisième groupe** envisagé est formé des échantillons pour lesquels :
- la teneur en carbone organique est moyenne (comprise entre 0,12 % et 0,24 %)
- le rapport AF/AH est également moyen (compris entre 0,6 et 0,7)

Ce groupe faisant figure d'intermédiaire vis à vis des deux autres précédemment décrits contient les échantillons : BROY4, CHAL4 et SEIG4 (tableau 1-V).

L'ensemble des argiles du groupe 1 présente des teneurs en carbone organique extrêmement faibles, et une forte proportion d'humine (de 58 à 70 %) tandis qu'à l'opposé les kaolins du groupe 2 sont plus chargés en matières organiques, celles ci étant à dominante alcalino-solubles (de 58 à 77 %). Le troisième groupe, en position intermédiaire, rassemble des échantillons moins proches. Si BROY4 et CHAL4 sont très voisins en ce qui concerne leurs teneurs en carbone organique et la répartition des composés humiques, SEIG4 a des caractéristiques différentes.

Parmi les critères retenus pour faire cette classification, les teneurs en composés alcalino-solubles et les valeurs des rapports AF/AH apparaissent particulièrement intéressantes pour illustrer la biodégradabilité potentielle des matières organiques associées aux kaolins. En effet, un fort pourcentage d'acides fulviques peut être considéré comme un facteur favorable à la biodégradation (ce qui est le cas pour le groupe 1) tandis qu'un rapport AF/AH faible fait figure de facteur plutôt limitant (les échantillons du second groupe étant concernés par ce cas). Toutefois la présence d'une forte ou d'une faible proportion d'humine, respectivement pour les échantillons des groupes 1 et 2, peut modifier cette hypothèse. En effet la fraction alcalino-soluble plus mobile et sans doute plus accessible à la biodégradation est plus importante pour les échantillons du groupe 2 que pour ceux du groupe 1.

Suite à ce classement, des échantillons caractéristiques sont choisis, dans chacun des trois groupes, pour effectuer des analyses complémentaires ainsi que pour être soumis à des expériences de biodégradation.

Pour le premier groupe, BROY2 et TUNL2 ne sont pas retenus car leurs teneurs en carbone organique sont trop faibles pour garantir des résultats exploitables. Le choix se porte sur SEIG1 et MOMB1. Les échantillons MOMB3 et SEIG2 sont retenus pour représenter le groupe 2. Le troisième groupe est représenté par SEIG4 et BROY4. Le tableau 1-VI récapitule les données relatives à ces six échantillons.

Des analyses complémentaires des matières organiques ont été réalisées sur ces six échantillons. Les matières organiques facilement solubles, donc potentiellement disponibles pour les micro-organismes, ont été estimées par extraction à l'eau chaude.

Les taux d'extraction obtenus par ce procédé (tableau 1-VII) sont relativement faibles puisqu'inférieurs à 17 %. Les composés extraits à l'eau chaude, constitués au moins en partie de hydrates de carbone solubles, sont donc peu abondants. Pour certains échantillons, comme MOMB1, la quantité de matières organiques hydrosolubles à chaud correspond quand même à 50 % des acides fulviques ou

Tableau 1-VI : Caractéristiques des échantillons, représentatifs des trois groupes, sélectionnés pour des études complémentaires

	MOMB 1	SEIG 1	BROY 4	SEIG 4	MOMB 3	SEIG 2
COT (%)	0,08	0,11	0,20	0,41	0,52	0,59
Azote (%)	traces	traces	0,01	0,01	0,02	0,01
C/N			20	41	26	59
C de l'humine*	58	62	50	33	38	34
C M.O alcalino-soluble*	42	38	50	67	62	66
Q4/6	5,4	4,5	6,1	6,8	4,2	5,5
C AF*	32	23	19	27	4	15
C AH*	10	15	31	40	58	51
AF/AH	3,2	1,5	0,6	0,7	0,1	0,3

* Résultats exprimés en pourcentage du carbone organique total
(COT = Carbone Organique Total ; C MO = Carbone des Matières Organiques ; C AF = Carbone des Acides Fulviques ; C AH = Carbone des Acides Humiques)

38% des composés alcalino-solubles. Pour SEIG1 cette fraction hydrosoluble correspond aussi à plus de 50 % des composés fulviques et 32 % des composés alcalino-solubles. Pour les autres échantillons cette proportion est plus variable et nettement plus faible. Ces fractions sans doute plus facilement biodégradables sont importantes à prendre en considération et ont mérité une étude plus détaillée. Mais celle ci s'est révélée difficile à mener à bien en raison des faibles teneurs en matières organiques des kaolins.

Tableau 1-VII : Taux d'extraction par l'eau chaude des matières organiques associées aux kaolins

	MOMB 1	SEIG 1	BROY 4	SEIG 4	MOMB 3	SEIG 2
COT (%)	0,08	0,11	0,20	0,41	0,52	0,59
Taux* d'extraction par l'eau chaude	16	12	5	9	5	8
Matières* organiques alcalino-solubles	42	38	50	67	62	66

* Résultats exprimés en pourcentage du carbone organique initial
COT = Carbone Organique Total

Les tentatives d'étude des polysaccharides par le biais d'hydrolyses acides ne se sont pas non plus révélées concluantes car les quantités de carbone extraites étaient trop faibles pour être étudiées en détail.

IV-2 Composition élémentaire, étude des groupements fonctionnels et origine des composés humiques purifiés

Les matières organiques alcalino-solubles (acides humiques et acides fulviques) constituent les fractions les plus réactionnelles et donc les plus intéressantes à étudier. D'autant plus que ces composés peuvent être extraits, purifiés et caractérisés par l'emploi simultané de l'analyse élémentaire et de la spectrophotométrie infrarouge.

Ce sont les raisons pour lesquelles les acides humiques de deux échantillons (MOMB3 et SEIG4) ont été étudiés en détail. Ils sont appelés respectivement AHM3 et AHS4. Tandis que les acides fulviques d'un seul échantillon (SEIG4), beaucoup plus difficiles à extraire en quantité importante et surtout à purifier, ont été analysés plus simplement à titre de comparaison. Ils sont notés AFS4.

IV-2-1 Composition élémentaire organique et origine des composés humiques

Le tableau 1-VIII présente les résultats des analyses élémentaires organiques des composés purifiés ainsi que les valeurs des rapports atomiques H/C et O/C déterminés pour chacun d'eux. Ces rapports sont couramment utilisés pour définir l'origine et la nature des substances humiques.

Le rapport atomique H/C définit un indice d'aromaticité : la valeur 1 est acceptée comme une limite supérieure pouvant caractériser les macromolécules les plus aromatiques (Andreux et Munier-Lamy, 1994) ; les valeurs supérieures à 1,25 sont considérées comme significatives de la prédominance des structures aliphatiques. Le rapport O/C, quant à lui, reflète l'abondance des groupements fonctionnels oxygénés.

Pour les acides humiques AHS4 et AHM3, les résultats donnés sont corrigés en fonction des taux de cendres qui étaient très faibles. Les éléments prédominants sont le carbone et l'oxygène. Les teneurs en éléments C, H, N, O ainsi que les rapports atomiques H/C et O/C caractérisent des édifices moléculaires de natures aromatiques (H/C proches de 0,7) relativement riches en groupements fonctionnels oxygénés et pauvres en azote.
Si les deux acides humiques étudiés ont en commun un caractère fortement aromatique ainsi que la forte présence de groupements oxygénés, ils diffèrent par certains aspects. En effet AHS4 est plus riche en carbone que AHM3 tandis que ce dernier affiche un pourcentage en oxygène plus élevé que celui de AHS4.

Les analyses élémentaires d'acides humiques purifiés à partir de sols d'origines différentes (tableau 1-IX) indiquent qu'en moyenne le carbone constitue 45 à 60 % du total des éléments, l'oxygène de 35 à 45 %, l'hydrogène de 3 à 6 % et l'azote de 2 à 4 %. Des valeurs de cet ordre étant également citées par Schnitzer (1978).

Les résultats obtenus avec les acides humiques associés aux argiles, c'est à dire AHS4 et AHM3, correspondent à ces ordres de grandeurs. Ils montrent des rapports H/C plus faibles, donc une aromaticité plus grande que celle des acides humiques des divers sols et indiquent également des teneurs en azote beaucoup plus faibles pour les acides humiques associés aux argiles.
Ces faibles teneurs en azote pourraient être rapprochées des conditions de formation plutôt anoxiques de ces dépôts d'argiles qui favoriseraient au cours de la minéralisation de l'azote la production d'ammoniaque ou d'oxyde d'azote (nitrique, nitreux) et donc une perte par volatilisation.

Les données obtenues lors de l'analyse des spectres infrarouge permettront de caractériser les fonctions majeures portées par les acides humiques étudiés, et en particulier de préciser la nature de leur structure carbonée et de leurs groupements fonctionnels oxygénés.

Comme cela a été mentionné au début de ce paragraphe, pour ce qui concerne les acides fulviques AFS4, les résultats sont à considérer avec prudence car de nombreux problèmes ont été rencontrés au cours de la purification. En effet le pyrophosphate de sodium utilisé pour les extractions alcalines a été très difficile à

Tableau 1-VIII : Analyses organiques élémentaires des acides humiques (AH) et fulviques (AF) purifiés.

	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	H/C*	O/C*
AHS4	59,38	3,36	0,95	36,31	0,68	0,46
AHM3	53,94	3,20	1,27	41,59	0,71	0,58
AFS4	27,79	2,98	1,32	47,91	1,29	1,29

* : rapport atomique

Tableau 1-IX : Analyses organiques élémentaires de quelques acides humiques d'origines diverses

	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	H/C*	O/C*	Références
AH chernozem	53,1	3,6	3,1	40,2	0,81	0,57	Andreux (1978)
AH A1 podzol	51,7	5,3	1,8	41,3	1,23	0,60	Andreux (1978)
AH Bh podzol	49,7	4,4	1,8	44,1	1,06	0,67	Andreux (1978)
AH A1 sol brun lessivé	44,0	5,4	3,6	47,0	1,47	0,80	Andreux (1978)
AH A1 rendzine	46,3	5,0	3,1	45,6	1,30	0,74	Andreux (1978)
AH A12 sol brun acide	54,4	4,9	5,2	35,5	1,08	0,49	Barriuso (1985)
AH Ah andosol	45,3	4,5	4,4	45,8	1,19	0,76	Faivre (1988)
AH Ah mollisol	56,4	5,5	4,1	35	1,17	0,46	Schnitzer (1991)
AH sol humocalcique	50,5	4,2	3,4	41,9	0,99	0,62	Bruckert *et al.* (1994)
AH sol brun calcique	48,5	5,1	4,0	42,4	1,26	0,66	Bruckert *et al.* (1994)

* : rapport atomique

éliminer. De ce fait l'étape de dialyse a du être prolongée et même répétée après passage des solutions sur une colonne de résine échangeuse d'ions. La multiplicité de ces manipulations ayant favorisé le contact entre les solutions d'acides fulviques et l'air ambiant, le contenu des tubes de dialyse a été soumis à une contamination microbienne. Cette contamination, bien qu'éliminée, a sans doute provoqué une modification de la composition et de la structure des acides fulviques recueillis.

La composition élémentaire des acides fulviques AFS4 associés aux argiles, présentée tableau 1-VIII, tient compte du taux de cendre égal à 20 %. La détermination de ce taux de cendre est très importante surtout au niveau de l'analyse élémentaire car le pourcentage en oxygène est obtenu par différence. De ce fait il n'y a pas de problème si il est très faible ou nul. En revanche, certains résultats peuvent être faussés dans le cas où la présence de cendres est négligée alors qu'elle est importante.

Il apparaît tout d'abord que les acides fulviques étudiés sont riches en oxygène. Ce pourcentage élevé peut s'expliquer par une teneur théoriquement importante en groupements fonctionnels -COOH et -OH qui pourra être mise en évidence avec les données obtenues lors de l'analyse du spectre IR.

Cet ensemble de valeurs, notamment le rapport H/C égal à 1,29, suggère une structure plutôt aliphatique de ces acides fulviques. Cette hypothèse pourrait concorder avec la structure théorique des acides fulviques qui sont généralement présentés comme des composés moins polycondensés que les acides humiques et dont les rapports nucleus/chaînes latérales sont inférieurs à ceux des acides humiques.

En moyenne les acides fulviques sont considérés comme contenant 40 à 50 % de carbone, 40 à 50 % d'oxygène, 3 à 6 % d'hydrogène et 1 à 4 % d'azote (Schnitzer, 1978). Ce que soulignent aussi les valeurs présentées par le tableau 1-X à titre de références. Comparativement à ces chiffres, AFS4 apparaît extrêmement pauvre en carbone (28 %). Cette teneur assez faible n'est pas uniquement à relier aux problèmes rencontrés lors de la purification. En effet, même en estimant le pourcentage de carbone en tenant compte de la teneur en cendres, celui ci reste faible ce qui est donc une caractéristique de ces acides fulviques.

A titre de comparaison, il est intéressant de noter que les acides fulviques contiennent moins de carbone mais plus d'oxygène que les acides humiques, et qu'une certaine similitude apparaît au niveau des teneurs en azote et en hydrogène.

Il est également important de localiser les composés purifiés dans un diagramme de Van Krevelen (H/C* en fonction de O/C*). Ce type de diagramme, conçu pour l'étude des charbons (Van Krevelen, 1961), puis utilisé pour situer les kérogènes de sédiments anciens par rapport à trois lignées évolutives (Tissot *et al.*, 1974), définit également les domaines d'existence des acides humiques et fulviques de différentes origines (Flaig, 1970 ; Huc, 1973 ; Bach, 1980).

Ces domaines d'existence ont été reportés sur la figure 1-10, tout comme les valeurs relatives aux acides humiques et fulviques cités en référence dans les

Tableau 1-X : Analyses organiques élémentaires de quelques acides fulviques de trois sols différents

	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	H/C*	O/C*	Références
AF A12 sol brun acide	49,4	5,1	2,6	42,9	1,24	0,65	Barriuso (1985)
AF Ah andosol	43,7	5,6	4,0	46,7	1,54	0,80	Faivre (1988)
AF Bh spodosol	50,9	3,3	0,7	45,1	0,78	0,66	Schnitzer (1991)

* : rapport atomique

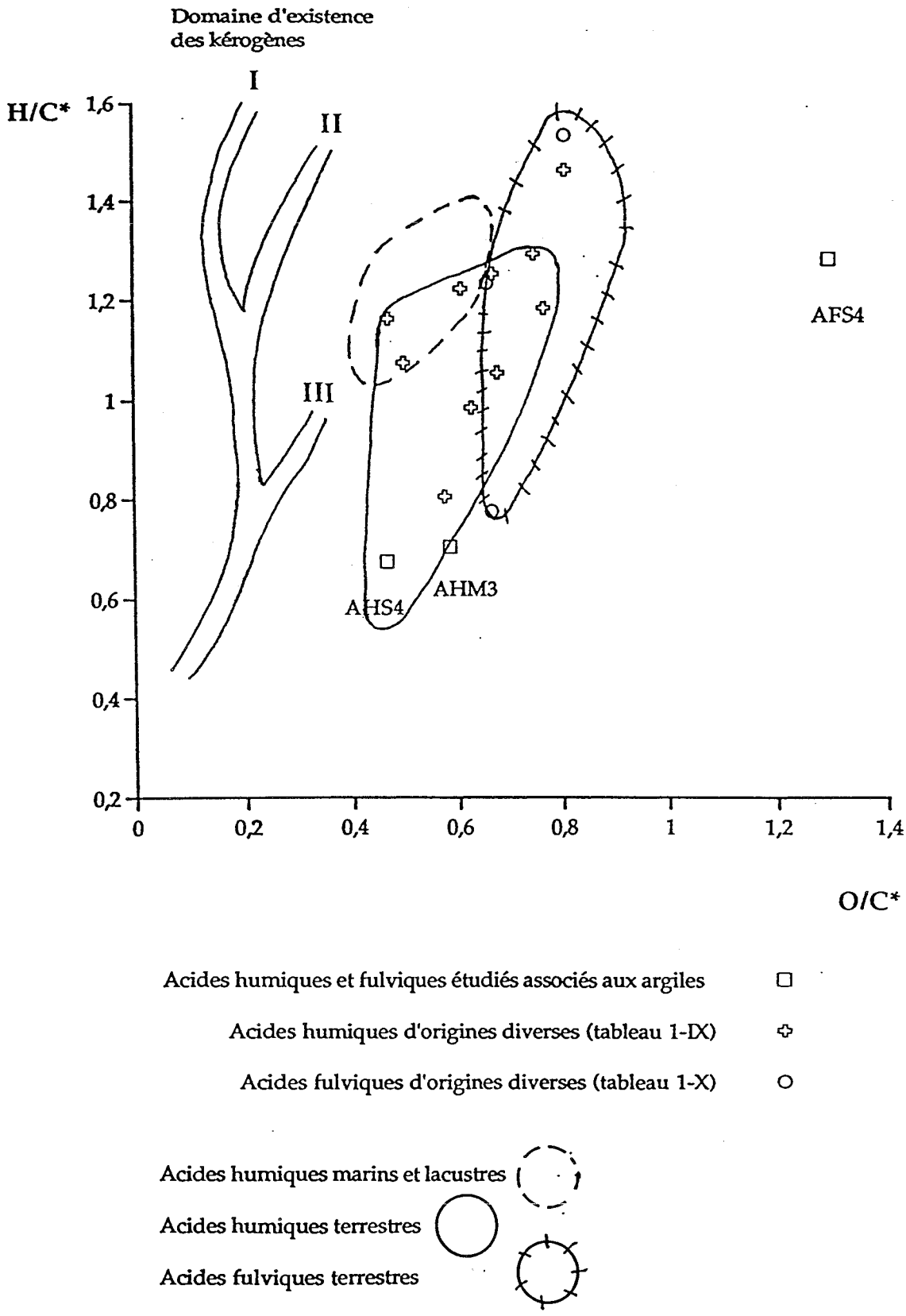


Figure 1-10 : Localisation des composés humiques dans un diagramme de Van Krevelen (d'après Bach, 1980) (* Rapport atomique)

tableaux 1-IX et 1-X et celles des composés humiques et fulviques purifiés provenant des dépôts de kaolins étudiés (tableau 1-VIII).

Le caractère peu aromatique des acides humiques d'origine marine et lacustre est bien souligné sur cette représentation. Ceux ci sont essentiellement formés à partir de plancton (riche en protéines et exempt de lignine) et de ce fait portent de nombreuses chaînes aliphatiques (Huc, 1980). Les acides humiques terrestres, quant à eux, ont pour précurseurs des débris de végétaux supérieurs (riches en cellulose, en lignine et en tanins). Forts de cet héritage, ils affichent un caractère aromatique plus marqué.

En raison de leurs faibles rapports atomiques H/C, les acides humiques AHS4 et AHM3 se placent dans la partie inférieure du domaine d'existence des acides humiques terrestres. La situation des acides fulviques AFS4 est plus problématique car le rapport O/C exagérément élevé les situe hors du domaine correspondant aux acides fulviques terrestres déjà étudiés. La présence d'oxygène dans les cendres explique en grande partie l'obtention du pourcentage élevé (48 %) et donc la surestimation de celui ci.

IV-2-2 Etude des groupements fonctionnels des composés humiques

La spectrophotométrie infrarouge permet d'obtenir des renseignements qualitatifs et quantitatifs sur les groupements fonctionnels présents dans le composé étudié. L'obtention de telles informations nécessite tout d'abord la connaissance de la situation des bandes d'absorption relatives aux différentes fonctions chimiques. Pour les composés humiques, ceci est réalisé selon les indications de Bellamy (1975) :

- les **fonctions oxygénées** donnent des bandes d'absorption aux fréquences 3 400 cm^{-1} (vibration de la liaison O-H associée à la présence d'acides carboxyliques, d'alcools ou de phénols), 2 500 cm^{-1} (vibration des OH liés, chélatés ou pontés dans des acides carboxyliques), 1 710 cm^{-1} (vibration de la liaison C=O des acides carboxyliques et des cétones), 1 630 cm^{-1} (vibration de la liaison C=O quinonique et amidique) et 1 050 cm^{-1} (vibration de la liaison C-O des alcools primaires, secondaires et tertiaires).

- les **fonctions azotées** sont représentées par les bandes amide I à 1 650 - 1 620 cm^{-1}, amide II à 1 570 - 1 515 cm^{-1} et amine à 3 080 cm^{-1}. Il s'agit des absorptions dues à la déformation des liaisons de ces groupements car les vibrations de valence des liaisons N-H sont le plus souvent masquées par les vibrations des liaisons O-H.

- les absorption dues aux **groupements carbonés** se situent autour de 2 920 cm^{-1} (vibration de la liaison C-H aliphatique), et de 1 630 cm^{-1} (liaison C=C aromatique).

Le spectre obtenu avec les acides humiques AHS4 est présenté figure 1-11. Plusieurs pics et bandes caractéristiques peuvent être observés :

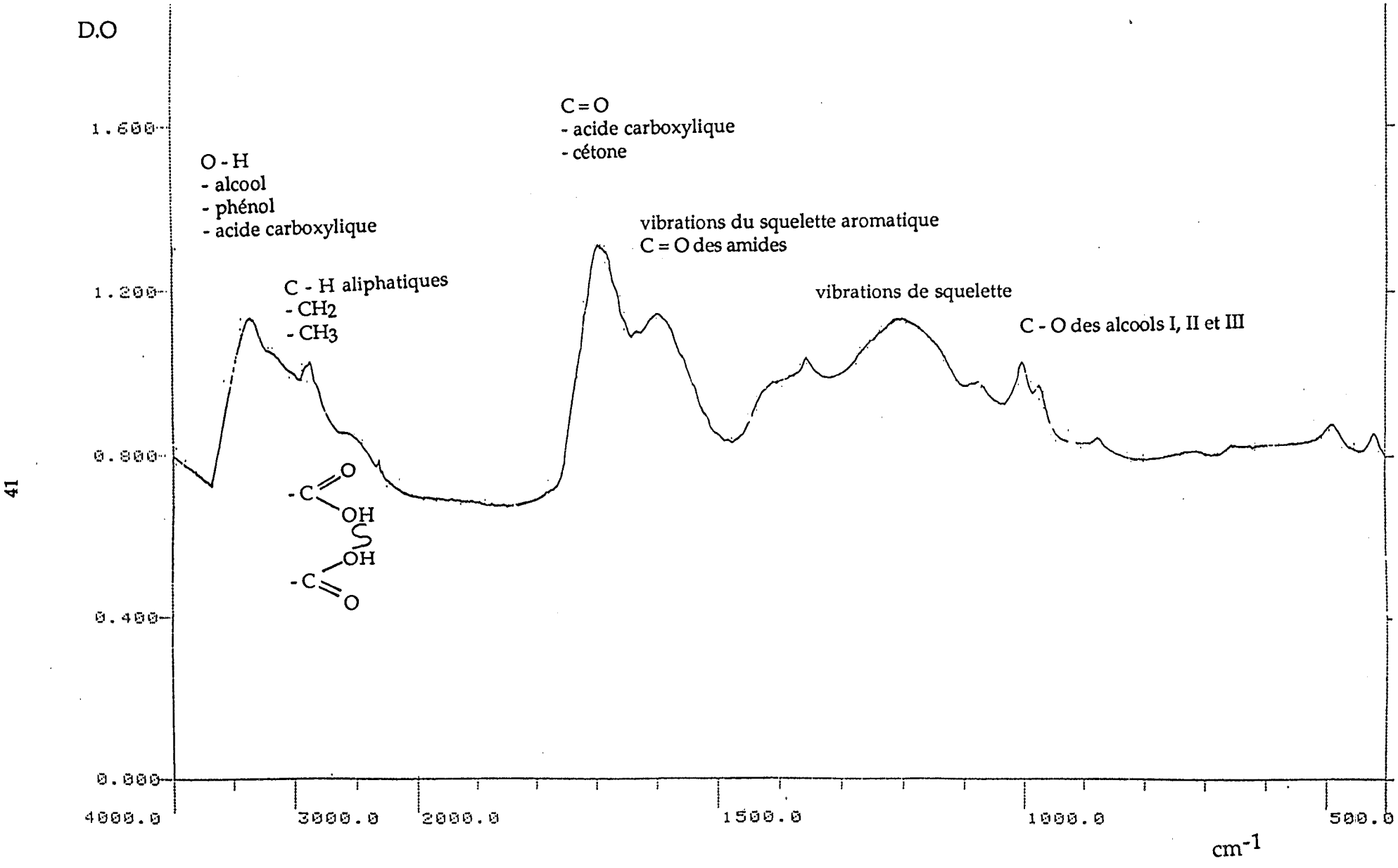


Figure 1-11 : Spectre infrarouge des acides humiques AHS4, extraits à partir de l'échantillon d'argile SEIG4

- une large bande à 3 400 cm-^{1}
- un double pic, centré vers 2950 cm^{-1}, d'intensité moyenne
- un épaulement nettement visible à 2 500 cm^{-1}
- un pic très prononcé vers 1710 cm^{-1}
- un pic marqué à 1 630 cm^{-1}
- un massif vers 1 300 cm^{-1}
- un pic d'intensité moyenne à 1 050 cm^{-1}

Cet ensemble permet de conclure que les acides humiques AHS4 sont **peu aliphatiques** (faible intensité du pic à 2 950 cm^{-1}) et sont porteurs **de fonctions alcools** (pic à 1 050 cm^{-1} marqué). Le point important à souligner est leur **caractère acide** (pic à 1 700 cm^{-1} et épaulement à 2 500 cm^{-1}) ainsi que leur **aromaticité** (pic à 1 630 cm^{-1}).

Ces informations fournies par l'observation du spectre infrarouge corroborent pour certaines et étayent pour d'autres celles issues des analyses élémentaires. Le caractère peu aliphatique, donc aromatique, de AHS4 a été mis en évidence par un rapport H/C bas (égal à 0,68). La faible intensité du pic à 2 950 cm-^{1} (liaisons C-H aliphatiques) et l'importance non négligeable du pic à 1 630 cm^{-1} (dans lequel les liaisons C=C aromatiques sont prises en compte) sont en accord avec cette remarque.

L'analyse élémentaire et les rapports O/C indiquaient que les fonctions oxygénées étaient bien représentées. L'intensité de la bande à 1 720 cm^{-1} (C=O carboxyliques et cétoniques), la netteté de l'épaulement vers 2 500 - 2 700 cm^{-1} (O-H carboxyliques), ainsi que la forte bande à 3 400 cm^{-1} (O-H alcooliques, phénoliques et carboxyliques) indiquent que les fonctions carboxyliques sont abondantes. Le pic assez moyen à 1 050 cm^{-1} (C-O des alcools) signale que les fonctions alcooliques sont peu présentes. De ce fait la teneur en oxygène de AHS4 est à mettre en étroite relation avec son caractère acide.
Les vibrations caractéristiques des fonctions azotées sont invisibles, l'analyse élémentaire avaient également indiqué cette pauvreté en azote.

Des conclusions du même ordre sont obtenues avec les acides humiques AHM3. En effet le spectre infrarouge de ces composés (figure 1-12) est très semblable à celui des acides humiques AHS4. Les pics et bandes d'absorption présentés par le spectre de AHM3 sont identiques, que ce soit au niveau localisation comme au niveau intensité, à ceux relevés sur le spectre de AHS4. Une certaine similitude entre ces deux composés avait déjà été relevée par les analyses élémentaires. Donc, tout comme pour AHS4, les acides humiques extraits à partir de l'échantillon MOMB3 sont des composés **peu aliphatiques** et **moyennement hydroxylés**. Ils sont également et surtout **très acides** et **aromatiques**.

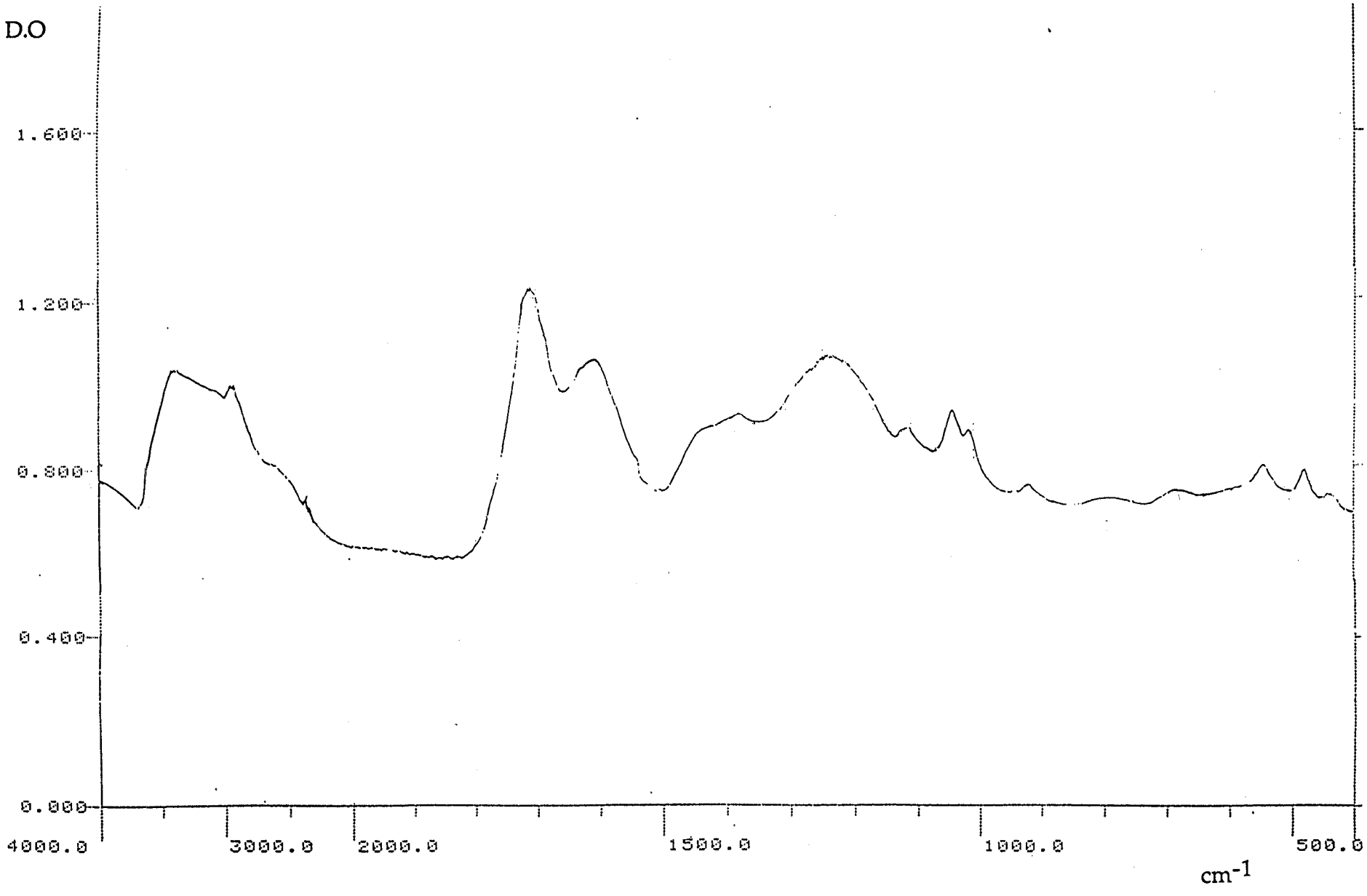


Figure 1-12 : Spectre infrarouge des acides humiques AHM3, extraits à partir de l'échantillon d'argile MOMB3.

Comme cela a été précisé antérieurement, la purification des acides fulviques AFS4 a posé problème. De ce fait les résultats s'y rapportant sont signalés à titre d'exemple et de comparaison vis-à-vis des acides humiques étudiés, mais sont à considérer avec prudence.

Le spectre correspondant est reporté figure 1-13. Plusieurs observations peuvent être faites, notamment la présence :

- d'une bande importante à 3 400 cm^{-1}, caractéristique des vibrations de la liaison O-H.
- d'un pic peu marqué centré vers 2 950 cm^{-1}, correspondant aux structures aliphatiques.
- d'une bande bien visible mais d'intensité moyenne à 1 710 cm^{-1}, relative aux vibrations de la liaison C=O des acides carboxyliques et des cétones. Ceci est à mettre en relation avec l'absence d'épaulement, du aux vibrations des OH carboxyliques liés, à 2 500 cm^{-1}. Ce fait remarquable peut également être considéré comme un élément en faveur de la structure plutôt "linéaire" des acides fulviques, en effet ce type de conformation ne permettrait pas la formation de liaisons intramoléculaires.
- d'un pic net à 1 380 cm^{-1}, preuve des problèmes rencontrés au cours de la purification puisqu'il indique probablement la présence d'anions carboxylates (Exemple : R - COO - Na).
- d'un massif allant de 1 300 cm^{-1} à 1 000 cm^{-1} qui regroupe à la fois les vibrations d'ensemble du squelette et celles dues aux liaisons C-O des alcools primaire (I), secondaire (II) et tertiaire (III). La part des fonctions alcools est donc très importante, ce qui explique l'intensité de la bande 3 400 cm^{-1}. Les liaisons O-H vibrant à cette fréquence sont celles portées par les fonctions alcools présentes.

Ces observations suggèrent que les acides fulviques isolés et purifiés sont **riches en fonctions alcools**, donc très oxygénés, ce qui avait été mis en évidence par l'analyse élémentaire qui avait révélé une teneur en oxygène égale à 48 %. Ils sont également **d'aliphaticité très moyenne**, alors que le rapport H/C proche de 1,3 suggérait un caractère aliphatique plus marqué. Ce comportement pourrait être du, puisqu'il reste des éléments minéraux, à des phénomènes de complexations des molécules, ce qui aurait bien entendu une influence sur l'allure des spectres obtenus. En dernier il est possible d'ajouter que ces acides fulviques sont **moyennement acides** car peu carboxylés.

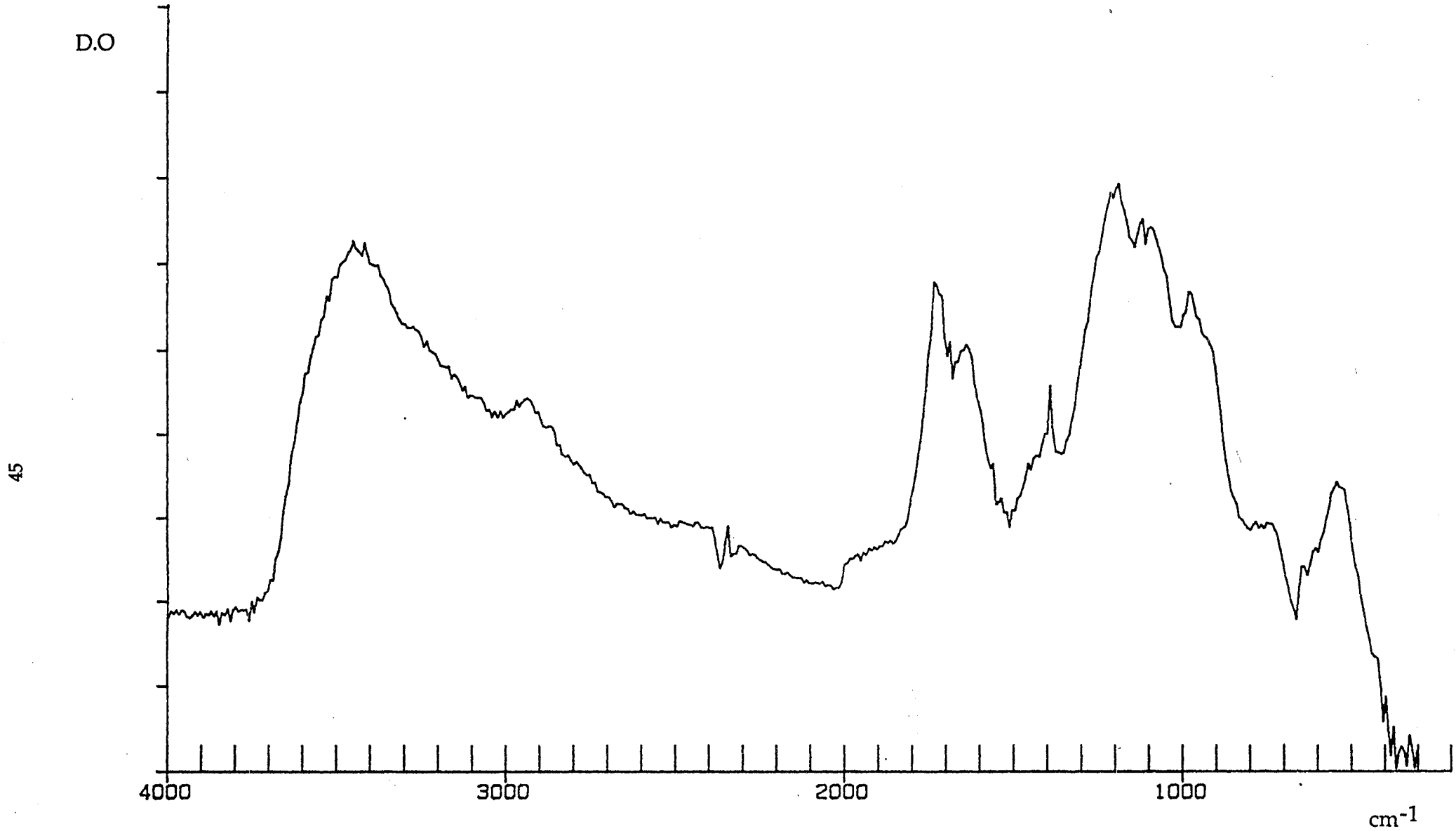


Figure 1-13 : Spectre infrarouge des acides fulviques AFS4, extraits à partir de l'échantillon d'argile SEIG4.

IV-3 Conclusions

L'étude des matières organiques associées aux kaolins du bassin sédimentaire étudié a mis en évidence, tout d'abord, des teneurs en carbone organique faibles comprises entre 0,04 et 0,66 % ainsi que des teneurs en azote très faibles de l'ordre de 0,01 à 0,02 % pour la moitié des échantillons et inférieures à 0,01 % pour l'autre moitié.

Les matières organiques étudiées se sont révélées de nature humique et les essais visant à souligner la présence d'une fraction plus labile donc plus facilement accessible aux micro-organismes ont confirmé ce fait.

Il est apparu que le mélange soude N/10 et pyrophosphate de sodium 1 % était l'extractant le plus efficace tandis que la soude N/10 seule donnait des rendements d'extraction trop faibles pour être intéressants. Les matières organiques concernées ont pu être, pour chaque échantillon, séparées en trois catégories qui sont :

- les acides humiques solubilisés en milieu alcalin et refloculés en milieu acide
- les acides fulviques solubilisés en milieu alcalin et toujours solubles en milieu acide
- l'humine insoluble à tout les pH, donc inextractible

Les teneurs en matières organiques, leur nature (acides fulviques, acides humiques, humine), le rapport AF/AH et leur degré d'aromaticité ont permis la répartition d'un ensemble de 18 échantillons en trois groupes.

Par la suite deux échantillons caractéristiques ont été choisis dans chacun de ces groupes afin d'effectuer des études plus précises des composés humiques alcalino-solubles (acides fulviques et acides humiques) ainsi que pour la mise au point, dans la seconde partie de ce travail, de tests de biodégradation.

Les acides humiques de deux échantillons, SEIG4 et MOMB3, appartenant à deux groupes différents ont été purifiés et étudiés plus en détails. Leurs analyses élémentaires et leurs caractéristiques spectrales UV-visibles et infrarouges se sont révélées assez semblables et ont mis en évidence plusieurs caractères, dont : une faible teneur en azote, une prédominance des structures aromatiques sur les structures aliphatiques, des origines terrestres, la présence de groupements fonctionnels de diverses natures notamment carboxyliques et phénoliques ainsi qu'un caractère acide marqué.

Des renseignements équivalents n'ont pu être obtenu avec les acides fulviques car ces composés ont été trop délicats à purifier du fait de leur grande réactivité avec le pyrophosphate de sodium entrant dans la composition de la solution d'extraction.

Chapitre V : Réactivité physico-chimique des acides humiques : comportement thermique

L'étude des matières organiques des sols peut mettre en oeuvre des traitements thermiques destinés à acquérir des connaissances sur les éléments structuraux entrant dans la composition des substances humiques. De tels travaux, dont Bracewell *et al.* (1989) proposent une synthèse, ont déjà été rapportés par plusieurs auteurs.

Par ailleurs, l'étude du comportement thermique de composés humiques, sous l'effet d'un gradient de température (150°C, 250°C, 350°C, 450°C et 550°C) et sous atmosphère variable (inerte, réductrice ou oxydante), peut également apporter des informations sur la stabilité et la réactivité des composés étudiés ainsi que sur leur attitude lors de la cuisson des kaolins.

Nos travaux ont été effectués en utilisant uniquement les acides humiques AHS4 pour diverses raisons :

- tout d'abord, comme cela a été constaté, parce que les acides humiques AHS4 et AHM3 sont très semblables
- ensuite, parce que l'obtention de données nécessite un travail analytique très lourd (dosages des éléments C, N et H et réalisation des spectres infrarouge pour chaque étape de la pyrolyse)
- finalement, parce qu'il a été impossible de purifier correctement et en quantité suffisante les acides fulviques AFS4 contrairement aux acides humiques, qui, de plus, sont dominants dans les fractions alcalino-solubles de ces échantillons

V-1 Pertes de poids et évolution de la composition élémentaire des acides humiques au cours des pyrolyses

Les pertes de poids observées, sous les trois atmosphères envisagées, en fonction de la température appliquée (figure 1-14) permettent de constater que les acides humiques étudiés sont thermiquement stables puisqu'en condition inerte (sous azote) et en condition réductrice (sous hydrogène), à 550°C, la perte de poids atteint seulement 55 %.

Par ailleurs ces acides humiques ne possèdent pas de fonctions chimiques facilement réductibles puisque les variations observées sous atmosphère inerte et sous atmosphère réductrice sont semblables.

Enfin, les composés humiques AHS4 sont sensibles à l'oxydation car sous air la totalité du poids est perdue à 550°C et 60 % de matière sont déjà perdus à 350°C.

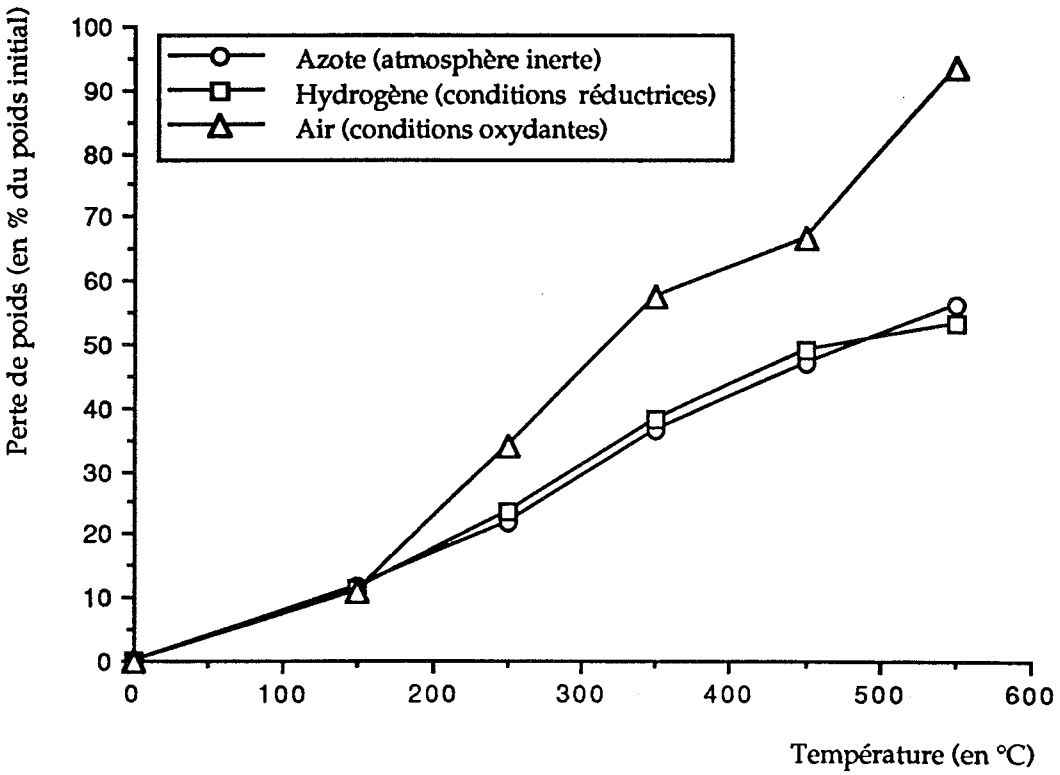


Figure 1-14 : Effets des pyrolyses, menées sous trois atmosphères différentes, vis à vis de la perte de poids des acides humiques AHS4.

En cherchant à relier ces pertes de poids à l'évolution de la composition élémentaire des acides humiques, c'est-à-dire en effectuant une étude comparée des pertes de poids, de carbone et d'azote (figure 1-15, 1-16 et 1-17) il apparaît que dans tous les cas les pertes de poids suivent étroitement les pertes de carbone.

Si, quelles que soient les conditions, les pertes de carbone s'enregistrent dés le début c'est à dire dés le chauffage à 150°C, il faut atteindre 350°C, et voir même plus, pour pouvoir observer un départ d'azote. Là encore les résultats obtenus sous atmosphère inerte et réductrice sont identiques tandis que ceux observés sous atmosphère oxydante révèlent un comportement très différent.

Dans ce type de traitement oxydant, jusqu'à 350°C la perte de poids importante est due quasiment exclusivement à une décarboxylation des acides humiques. Au delà de cette température la décarboxylation s'atténue au profit d'une minéralisation brutale de l'azote.

La stabilité thermique de l'azote est importante à souligner car elle indique que cet élément est très probablement inclus dans des structures hétérocycliques peu accessibles.

Il est également possible de suivre l'évolution des acides humiques AHS4 au cours de ces essais par l'intermédiaire des valeurs des rapports C/N et H/C (indice d'aromaticité) des résidus (tableau 1-XI).

Les résultats obtenus sous courant d'azote et d'hydrogène sont semblables. Ils indiquent que les valeurs des C/N varient dans une gamme assez étroite au cours des pyrolyses et traduisent le fait que jusqu'à 350 °C, la minéralisation du carbone prime sur celle de l'azote. Les rapports H/C n'ont pu être déterminés que pour les trois premières températures envisagées car au delà les teneurs en hydrogène des résidus n'étaient plus mesurables. Il apparaît, grâce à ces valeurs, que l'aromaticité des résidus ne cesse de croître avec la température. Le degré de compaction de ceux ci à 350 °C est déjà remarquable puisqu'à cette température les rapports H/C calculés sont proches de 0,4.

Les valeurs et les fluctuations relevées pour les pyrolyses réalisées en atmosphère oxydante divergent par rapport à celles observées pour les deux autres conditions. En effet, sous courant d'air, la stabilité de l'azote et la sensibilité du carbone sont telles qu'à 350 °C le résidu présente un C/N inférieur à 30. La brusque minéralisation de l'azote, passé cette température, ramène ce rapport aux environs de 40 pour la mesure réalisée après pyrolyse à 450 °C. Dans ce cas, seul l'indice H/C du résidu issu des pyrolyses à 150 °C a pu être déterminé. Il est déjà bien plus faible que celui des composés initiaux (proche de 0,7) et traduit la forte aromaticité du résidu. La sensibilité et la réactivité des acides humiques sous atmosphère oxydante sont donc à nouveau soulignées.

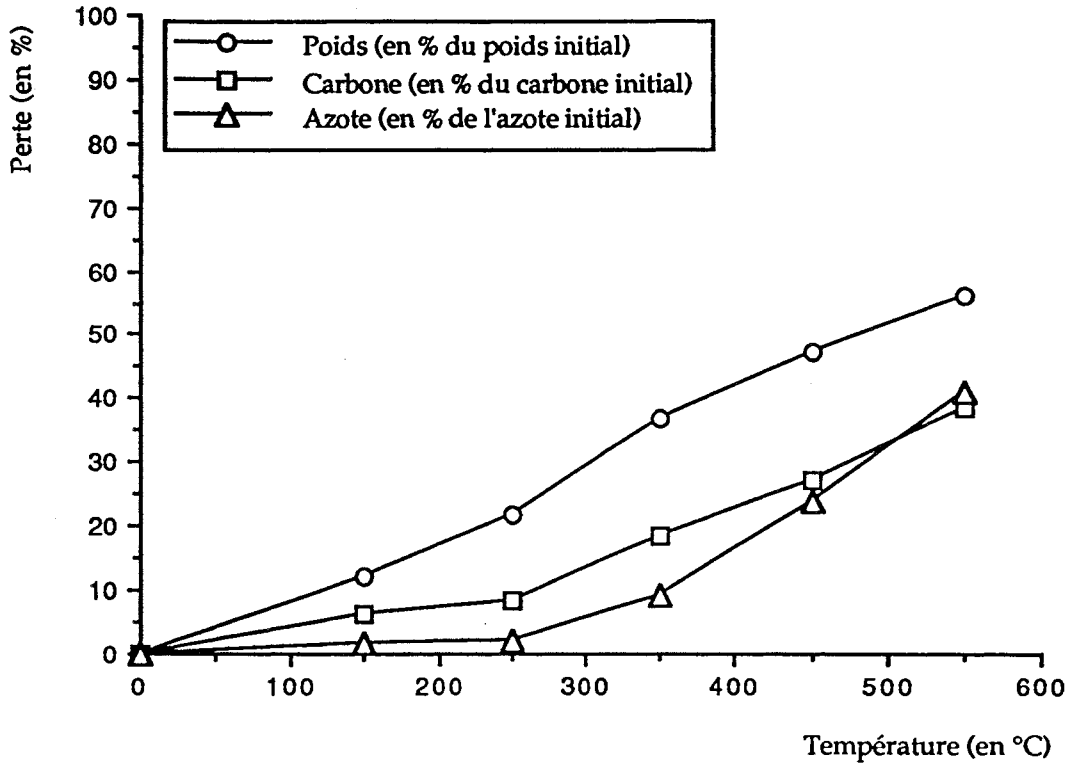


Figure 1-15 : Pertes de poids, de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4 réalisées sous courant d'azote

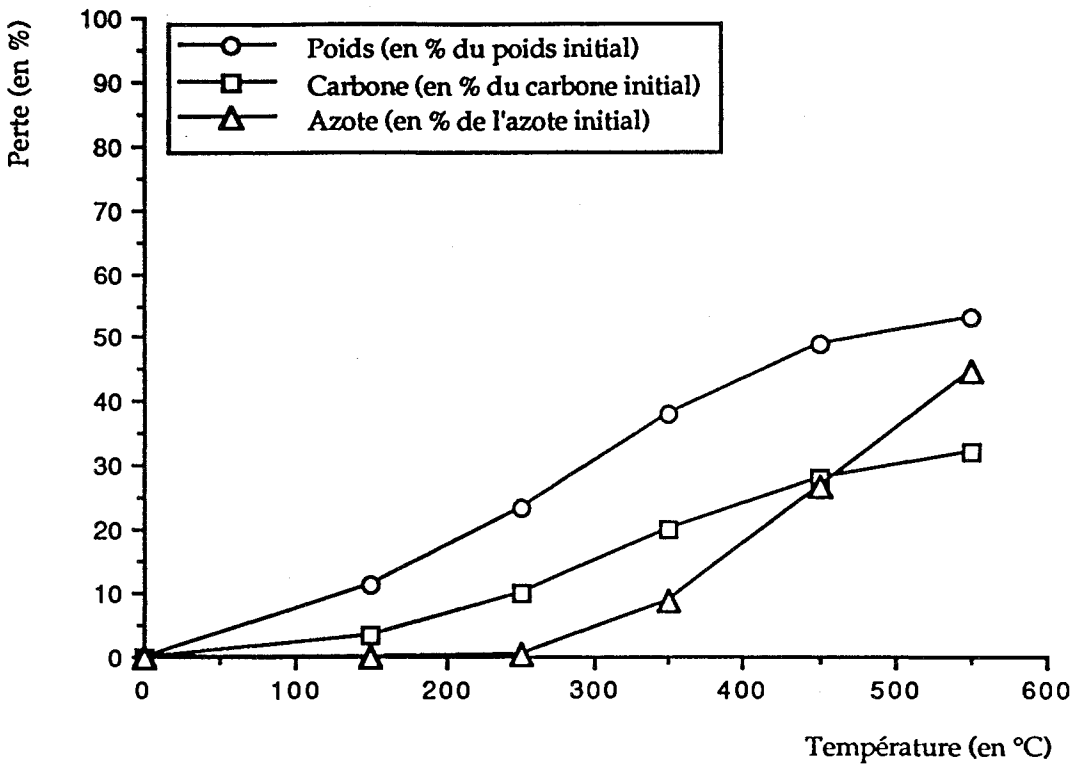


Figure 1-16 : Pertes de poids, de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4 réalisées sous courant d'hydrogène.

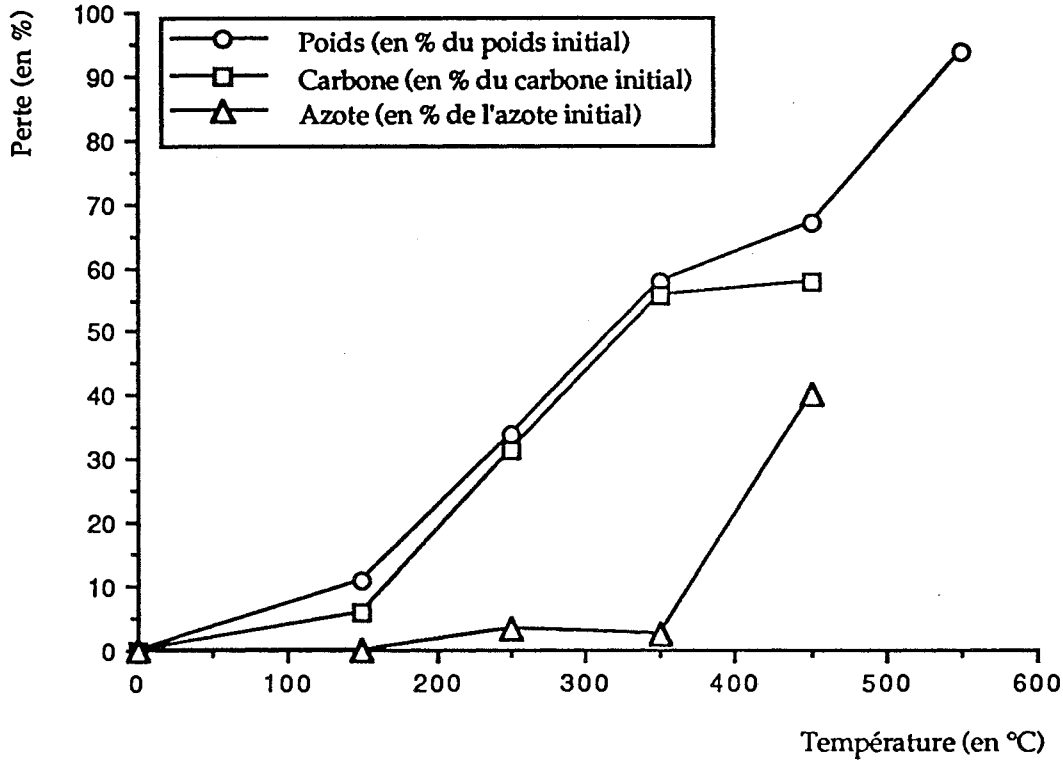


Figure 1-17 : Pertes de poids, de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4 réalisées sous courant d'air.

Tableau 1-XI : Evolution des rapports C/N et H/C des résidus d'acides humiques AHS4 après pyrolyses dans diverses conditions.

Atmosphère	Température (en °C)	C/N	H/C (rapport atomique)
Echantillon	initial	62,5	0,68
Courant d'azote	150	59,5	0,62
	250	58,3	0,61
	350	56,4	0,44
	450	59,5	nd
	550	65,1	nd
Courant d'hydrogène	150	59,9	0,64
	250	56,4	0,56
	350	54,9	0,41
	450	61,4	nd
	550	76,7	nd
Courant d'air	150	57,5	0,55
	250	44,1	nd
	350	28,7	nd
	450	43,8	nd

nd : non déterminé

V-2 Evolution de la structure et des groupements fonctionnels des acides humiques au cours des pyrolyses

Pour chaque essai envisagé, les modifications subies par les acides humiques ont été suivies non seulement par l'intermédiaire des variations de poids, de pourcentage de carbone et de pourcentage d'azote, mais également par les changements de caractéristiques spectrales infrarouge, ce biais permettant d'aborder l'évolution des structures et des groupements fonctionnels au cours des pyrolyses.

V-2-1 Pyrolyses réalisées sous atmosphère inerte

A 150°C les modifications du spectre (figure 1-18) sont peu importantes, elles sont dues en partie à la déshydratation et à un début de décarboxylation (perte de 5% du carbone initial). Une diminution modérée de la bande 3 400 cm^{-1}, une faible décroissance de celle à 1 710 cm^{-1}, une atténuation de l'épaulement à 2 500 cm^{-1} ainsi que l'apparition d'un épaulement à 1 780 cm^{-1} peuvent être observées.

D'un point de vue général, les acides carboxyliques sont considérés comme stables vis-à-vis de la perte de CO_2 et leur décarboxylation s'effectue dans des conditions plus ou moins drastiques en fonction de la structure de l'acide et de son environnement (nature des groupements présents en position γ, β ...) (Caubère, 1987). Ce comportement explique la faible décarboxylation observée à 150°C. L'atténuation de l'épaulement à 2 500 cm^{-1} résulte de la destruction des liaisons hydrogènes des groupements carboxyliques.

L'épaulement apparu vers 1 780 cm^{-1} refléte des cyclisations dues aux déshydratations au niveau des fonctions carboxyliques.

Les mêmes phénomènes, légèrement amplifiés, sont constatés à 250°C, il faut attendre le chauffage à 350°C pour obtenir d'importantes modifications structurales. A ce stade il y a disparition quasi totale de la bande des alcools à 1 050 cm^{-1}, de celle correspondant aux acides carboxyliques à 1 710 cm^{-1} et de celle due aux C-H aliphatiques à 2 950 cm^{-1}. L'élimination des groupements hydroxyles des alcools ainsi que la décarboxylation des acides carboxyliques provoquent une nette diminution de la bande 3 400 cm^{-1}. La décarboxylation et l'élimination incomplète des chaînes aliphatiques à 350°C, le deviennent à 450°C. A cette température seules les vibrations du squelette sont observées.

Le spectre du résidu obtenu à 550°C n'est pas présenté ici car à cette température la structure polycondensée est la seule à subsister et le spectre ne présente donc plus qu'un massif vers 1 600 cm^{-1}.

De plus, d'un point de vue pratique, l'homogénéisation des résidus et du KBr lors de la fabrication des pastilles n'a pas toujours été facile ni parfaite. Enfin les traitements thermiques à haute température ont apparemment causé la formation de graphites qui absorbent dans les fortes fréquences et perturbent

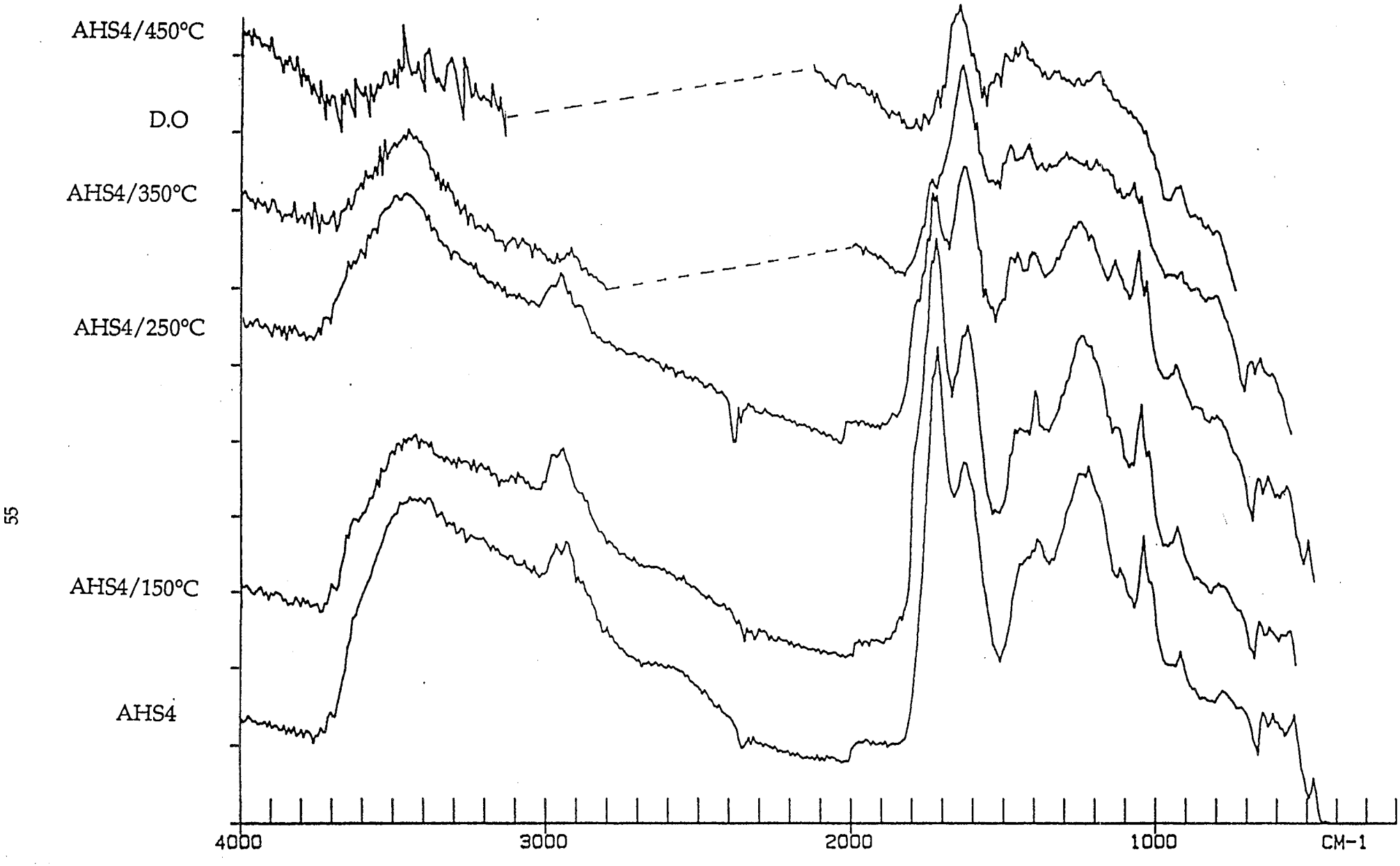


Figure 1-18 : Spectres infrarouge des résidus de pyrolyse des acides humiques AHS4, sous courant d'azote à 150°C, 250°C, 350°C et 450°C.

également les spectres. Cet ensemble de facteurs a déjà des répercutions sur l'aspect des spectres des acides humiques chauffés à 450°C qui sont de qualité moyenne.

A 550°C la dégradation n'est pas complète. Seul subsiste un résidu, encore important puisqu'il représente 45 % du poids initial, résultant de la perte des groupements fonctionnels les moins thermostables et formé par un ensemble compact et complexe de composés aromatiques. Ces résultats sont en accord avec le concept figurant les acides humiques sous forme de nucleus polycondensés et de chaînes latérales : les traitements thermiques jusqu'à 550°C provoquent l'élimination des chaînes tandis que le nucleus polycyclique subsiste.

V-2-2 Pyrolyses réalisées sous atmosphère réductrice

Les acides humiques étudiés sont très riches en groupements carboxyliques, or ce type de fonction est très difficilement réduit. C'est pourquoi les résultats obtenus dans ce cas sont identiques à ceux présentés lors des essais réalisés sous atmosphère inerte. Les descriptions et interprétations des spectres (figure 1-19) sont les mêmes que celles exposées ci dessus.

V-2-3 Pyrolyses réalisées sous atmosphère oxydante

Lorsque les dégradations thermiques se déroulent sous air (figure 1-20), comme pour les cas précédents, à 150°C les changements du spectre sont discrets et reflètent des phénomènes de perte d'eau et de décarboxylation limitée. Par contre il semble que la bande aliphatique située à 2 950 cm^{-1} soit modifiée ce qui n'était pas apparu pour les conditions inertes et réductrices. Cette observation se vérifie à 250°C, température à laquelle la bande aliphatique a disparu alors qu'en parallèle une perte de presque 30 % du carbone initial est notable, tandis que pour les autres conditions à cette température les pertes en carbone n'excédaient pas 10 %. L'oxygène de l'air permet une oxydation rapide et totale des parties aliphatiques des acides humiques. Les fonctions alcools y sont également sensibles car la bande 1 050 cm^{-1} s'étiole plus rapidement que sous les deux autres atmosphères.

Exceptées ces remarques concernant les bandes à 2 950 cm^{-1} et 1 050 cm^{-1}, les autres observations sont semblables à celles énoncées lors des essais sous azote c'est-à-dire que l'étape comprise entre 150°C et 350°C est caractérisée principalement par l'élimination des groupements carboxyles.

Le fait important à noter est que sous air, l'ensemble des acides humiques est sensible à la dégradation thermique et non pas seulement la périphérie comme c'était le cas sous azote ou sous hydrogène. En effet dès 350 °C il ne reste que 45 % du poids initial, et à 550°C tout est minéralisé. L'effet combiné de l'air et des températures élevées permet l'ouverture des cycles constituant la partie condensée de la molécule et l'élimination de l'ensemble.

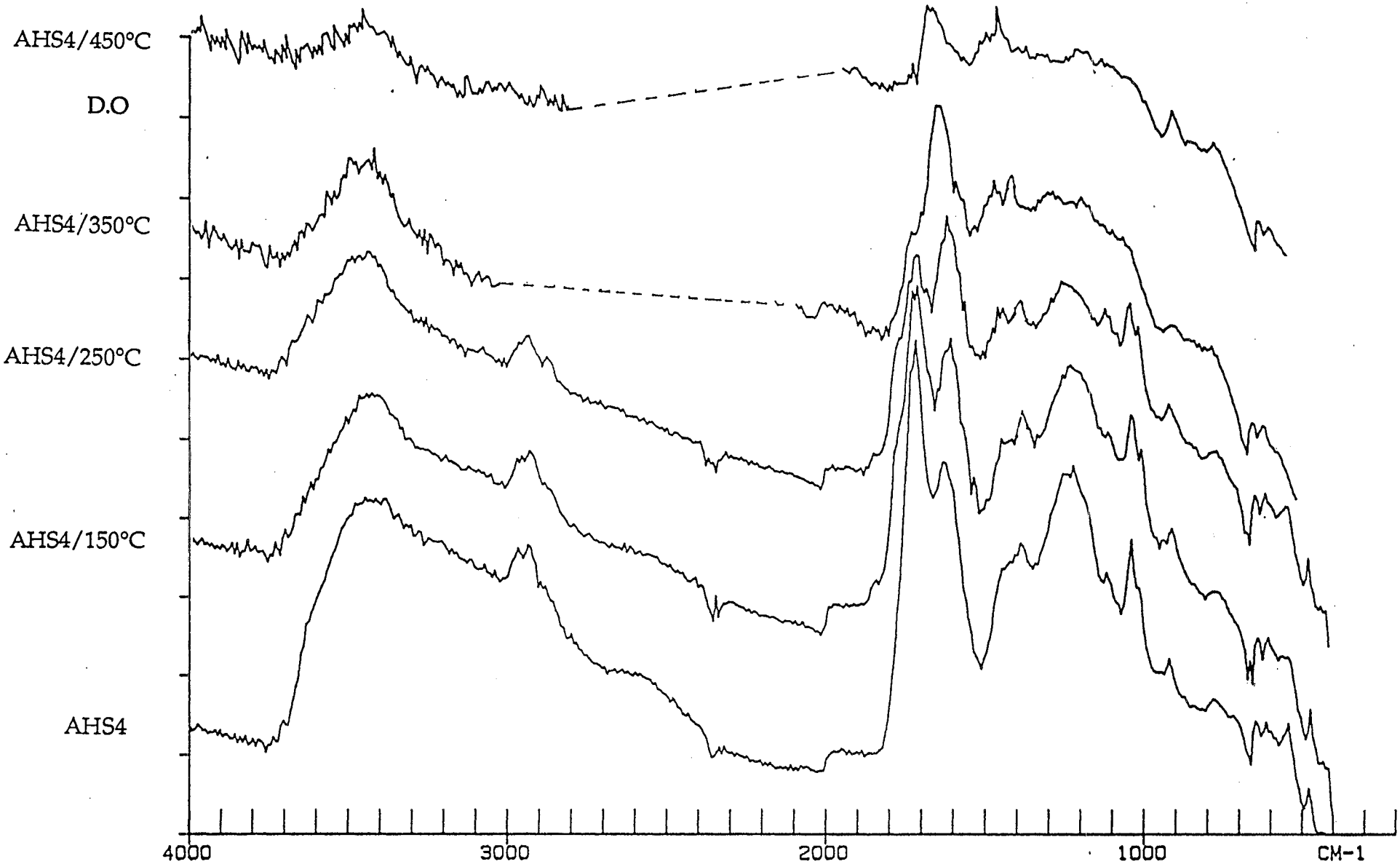


Figure 1-19 : Spectres infrarouge des résidus de pyrolyse des acides humiques AHS4, sous courant d'hydrogène à 150°C, 250°C, 350°C et 450°C.

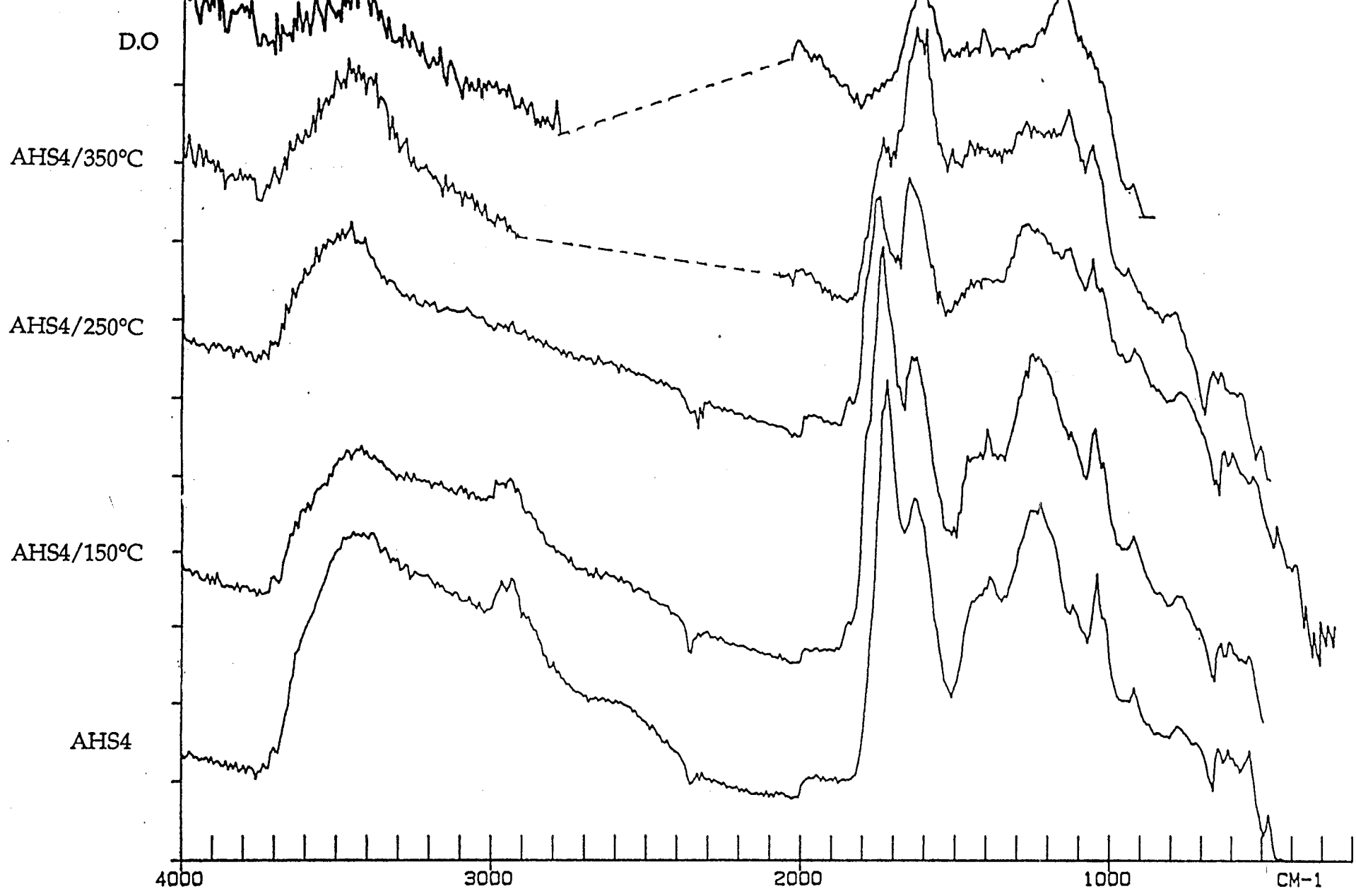


Figure 1-20 : Spectres infrarouge des résidus de pyrolyse des acides humiques AHS4, sous courant d'air à 150°C, 250°C, 350°C et 450°C.

V-3 Conclusions

L'ensemble des résultats indiquent que les acides humiques AHS4 sont relativement stables, pour des gradients thermiques élevés, en milieux réducteur et neutre, mais particulièrement sensibles à l'oxydation puisque dans ce dernier cas une dégradation totale peut être observée pour une pyrolyse à 550°C. Ces résultats soulignent également que, sous air, l'ensemble des acides humiques est sensible à la dégradation thermique tandis que pour les deux autres conditions des résidus encore importants (45 % du poids initial) subsistent après les conditions les plus drastiques (1 heure de chauffage à 550°C).

Les travaux de Barriuso (1985) ont mis en évidence des conclusions semblables aux nôtres. Il a, en effet, remarqué que la sensibilité des acides humiques (extraits à pH 12) aux dégradations thermiques en conditions oxydantes se présentait comme suit :

- le processus dominant, jusqu'à 120°C, est la déshydratation
- l'étape comprise entre 120°C et 380°C est caractérisée principalement par l'élimination des groupements carboxyles et hydroxyles ainsi que des chaînes aliphatiques
- au delà de 400°C, seul subsiste un résidu aromatique compact présentant encore quelques groupements hydroxylés
- la décomposition totale peut s'opérer à des températures supérieures à 550°C

Il a, par contre, pu remarquer l'apparition d'une bande nitrile à 2 200 cm^{-1} suite aux pyrolyses à 380°C. Cette bande étant considérée comme provenant de la déshydratation des groupements amides non substitués. Il n'en n'est pas de même pour les acides humiques AHS4. La faible teneur en azote dans ces composés ainsi que l'absence de bandes caractéristiques des groupements azotés sur les spectres infrarouge ont déjà été soulignées. La "non apparition" de cette bande nitrile est une observation supplémentaire indiquant que les acides humiques AHS4 portent peu ou pas de groupements amides. La stabilité de l'azote jusqu'à des températures supérieures à 300°C indique également que celui ci n'est pas amidique mais très probablement inclus dans des structures stables hétérocycliques.

Comme cela était mentionné au début de ce chapitre, de telles expérimentations n'ont pu être tentées avec des acides fulviques. Toutefois, en considérant les résultats obtenus par Barriuso (1985) pour les acides fulviques d'un sol ocre humifère, extraits à pH = 12, on peut estimer que les étapes de dégradation sont assez semblables à celles observées pour les acides humiques. C'est-à-dire, dans un premier temps (chauffage à 120°C) des phénomènes partiels de déshydratation et de décarboxylation, puis une élimination totale des chaînes aliphatiques, des fonctions hydroxyles et des groupements carboxyles pour des pyrolyses à température élevée (proche de 400°C), enfin la destruction quasi totale du matériel pour une pyrolyse à 550°C.

Ces techniques thermiques apportent donc des informations sur la stabilité des composés humiques : ceux ci, à l'état purifié, c'est à dire exempts de liaisons avec des constituants minéraux, sont relativement sensibles à l'oxydation puisqu'ils peuvent être totalement dégradés sous oxygène et à 550°C.

Chapitre VI : Conclusions de la première partie

Les principaux objectifs de cette partie de l'étude étaient de décrire les matières organiques associées aux kaolins et d'établir les caractéristiques des acides humiques extraits de ces échantillons afin, d'une part, de mieux connaitre la nature et les propriétés chimiques de ces matières organiques et d'autre part d'aborder leur aptitude à la biodégradation.

Tout au long de ce travail, les méthodes d'analyses chimiques appliquées ont été calquées sur celles mises habituellement en oeuvre dans le cadre d'études des matières organiques des sols.

La première étape a consisté à déterminer les teneurs en carbone organique et en azote de ce type de sédiment : carbone et azote étant les deux principaux éléments constitutifs de la matière organique. Pour ce qui concerne le carbone, les teneurs se sont révélées assez faibles puisqu'elles sont comprises entre 0,04 % et 0,66 %. Or, bien que les argiles appartiennent à la famille des roches sédimentaires à faibles ou très faibles teneurs en carbone organique, celles ci sont en moyenne plutôt comprises entre 1 % et 5 % (Combaz, 1980). Les teneurs en azote peuvent, quant à elle, être qualifiées d'extrêmement faibles puisque dans plus de la moitié des cas cet élément n'a pu être dosé.

Ensuite il y a eu lieu d'établir un procédé d'extraction des matières organiques adapté à notre étude. En effet les matières organiques sont susceptibles de salifier ou complexer les cations ainsi que de se fixer à la surface des colloïdes minéraux. Ces multiples liaisons sont donc à prendre en compte dans le choix d'un réactif d'extraction.

L'utilisation des liqueurs alcalines pour extraire les matières organiques s'est révélée tout à fait adéquate et la recherche de l'extractant le plus efficace a permis de mettre en évidence l'association étroite contractée entre les composés humiques et les composés minéraux. En effet il a fallu, pour obtenir des rendements intéressants, correspondants à des extractions de 40 et 75 % du carbone organique total, conjuguer les effets de la soude et du pyrophosphate de sodium. C'est-à-dire employer un réactif capable à la fois de complexer les métaux, de solubiliser les humates et de détruire les liaisons organo-minérales (Bruckert, 1994). La soude seule ne permettant l'extraction que de 5 à 30 % du carbone organique total.

L'étape suivante a été une étape de fractionnement des substances humiques qui a permis la définition, pour chaque échantillon concerné, de trois classes de composés organiques (acides humiques, acides fulviques et humine) ainsi que de plusieurs valeurs caractéristiques des composés humiques.

L'ensemble des données recueillies révèle que ces matières organiques alcalino-solubles sont constituées d'acides fulviques (4 à 32 %) et d'acides humiques (2 à 58 %) présents sous forme essentiellement condensée. Cette

première série de résultats a servi de base à un classement des 18 échantillons utilisés **pour aboutir à une répartition en trois goupes selon les teneurs en carbone organique, en acides fulviques, en acides humiques et les valeurs des rapports AF/AH.**

Le premier groupe correspond aux échantillons présentant les critères suivants:

- une faible teneur en carbone organique (comprise entre 0,04 et 0,12 %)
- une teneur en matières organiques inextractibles (humine) supérieure à celle en matière organique alcalino-soluble
- un rapport AF/AH élevé, supérieur à 1

Le second groupe concerne les kaolins remarquables par :

- une teneur en carbone organique élevée (comprise entre 0,24 et 0,66 %)
- une teneur en humine inférieure à celle en matières organiques extractibles en milieu alcalin
- un rapport AF/AH faible, inférieur à 0,4

Le troisième groupe envisagé est formé des échantillons pour lesquels :

- la teneur en carbone organique est moyenne comprise entre 0,12 % et 0,24 %)
- le rapport AF/AH est également moyen (compris entre 0,6 et 0,7)

Ce groupe faisant figure d'intermédiaire vis-à-vis des deux autres précédemment décrits.

Suite à ce classement, des échantillons caractéristiques ont été choisis dans chacun des trois groupes (tableau 1-VI, chapitre IV) afin d'effectuer des analyses complémentaires et pour être soumis, par la suite, à des essais de biodégradation.

Certains compléments importants semblaient devoir être apportés pour caractériser les fractions organiques potentiellement disponibles pour les micro-organismes tels que les hydrates de carbone et les polysaccharides. Mais ces tentatives sont restées infructueuses et ont surtout souligné la faible teneur des kaolins en matières organiques facilement assimilables.

Afin d'établir les caractéristiques des acides fulviques et des acides humiques précédemment fractionnés, la purification de ces matériaux a été réalisée pour deux échantillons (MOMB3 et SEIG4). Si les résultats obtenus pour les acides humiques AHS4 et AHM3 se sont révélés être très complets et très intéressants, il n'a pu en être de même pour les acides fulviques AFS4. En effet les problèmes de purification rencontrés avec les acides fulviques ont été nombreux et leur répercussion sur les résultats recherchés (analyse élémentaire, spectre infrarouge) importants. Ce point, relaté en détail dans le chapitre IV, ne sera pas soulevé à nouveau dans cette conclusion. Seules les données relatives aux acides humiques vont donc être prises en compte.

La composition élémentaire des acides humiques AHS4 et AHM3 a fourni un inventaire des éléments majeurs constituants ces composés : le carbone et l'oxygène étant prédominants, le teneur en azote étant relativement faible.

La détermination des rapports atomiques H/C et O/C a été utilisée afin de déterminer l'origine des acides humiques et de mieux appréhender leur nature et leur structure : le rapport H/C pris isolement reflète le niveau d'aromaticité des composés, tandis que la confrontation des ratios H/C et O/C dans un diagramme de Van Krevelen permet de situer leur origine.

Comme l'indique la figure 1-21, les matériaux organiques d'origine marine et lacustre ont des compositions différentes de ceux d'origine terrestre, or la nature des composés humiques est intimement liée à celle de leurs produits précurseurs. De ce fait, les composés humiques d'origine marine et lacustre présenteront un caractère aliphatique supérieur à celui des composés d'origine terrestre qui, eux, hériteront d'un caractère plutôt aromatique du, en partie, à la lignine présente exclusivement dans les plantes terrestres supérieures.

Les données relatives aux acides humiques AHS4 et AHM3, rappelées figure 1-22, les placent donc tous deux parmi les composés évolués, d'origine terrestre, constitués de structures aromatiques qui prédominent sur les structures aliphatiques.

Les caractéristiques tirées de l'interprétation des analyses chimiques ont été étayées par l'étude des spectres infrarouges. Ceux ci ont confirmé le caractère aromatique prononcé des acides humiques et ont rendu compte de leur richesse en fonctions oxygénées, en grande partie de nature carboxylique. Cette dernière particularité leur conférant un fort caractère acide.

La dernière étape de cette partie de l'étude a consisté à étudier le comportement thermique des acides humiques AHS4 sous l'effet d'un gradient de températures et de trois atmosphères différentes (neutre, réductrice et oxydante). Cette approche a permis d'obtenir de nombreux renseignements sur la nature et la réactivité de ce type de matières organiques. Elle a également été utilisée pour illustrer le "comportement" des acides humiques lors de la cuisson des kaolins.

Ainsi, il est apparu que les acides humiques AHS4 étaient relativement stables pour des gradients thermiques élevés en milieux neutres et réducteurs puisque, pour ces deux conditions, à 550°C la dégradation était loin d'être complète. En effet des résidus importants, représentant presque la moitié du poids initial et formés d'un ensemble compact de composés polyaromatiques, subsistaient encore. Les composés étudiés se sont, par contre, révélés plus sensibles à l'oxydation car dans ce cas l'ensemble des molécules a pu être dégradé, contrairement aux cas précédents pour lesquels seules les périphéries semblaient être réactives. Sous courant d'air, à 350°C le résidu ne représentait plus que 45 % du poids initial et à 550°C tout était minéralisé. Dans tous les cas l'azote est apparu très stable jusqu'à 350°C, ce qui semble signifier qu'il n'est pas de nature protéique mais plus probablement hétérocyclique donc peu disponible.

A l'issu de cette étude, il est possible de faire apparaître plusieurs caractéristiques des acides humiques associés aux kaolins. Ils sont relativement pauvres en azote mais riches en groupements fonctionnels oxygénés (surtout carboxyliques), et semblent se présenter sous forme de macromolécules compactes pour lesquelles le rapport nucleus/chaînes latérales est élevé.

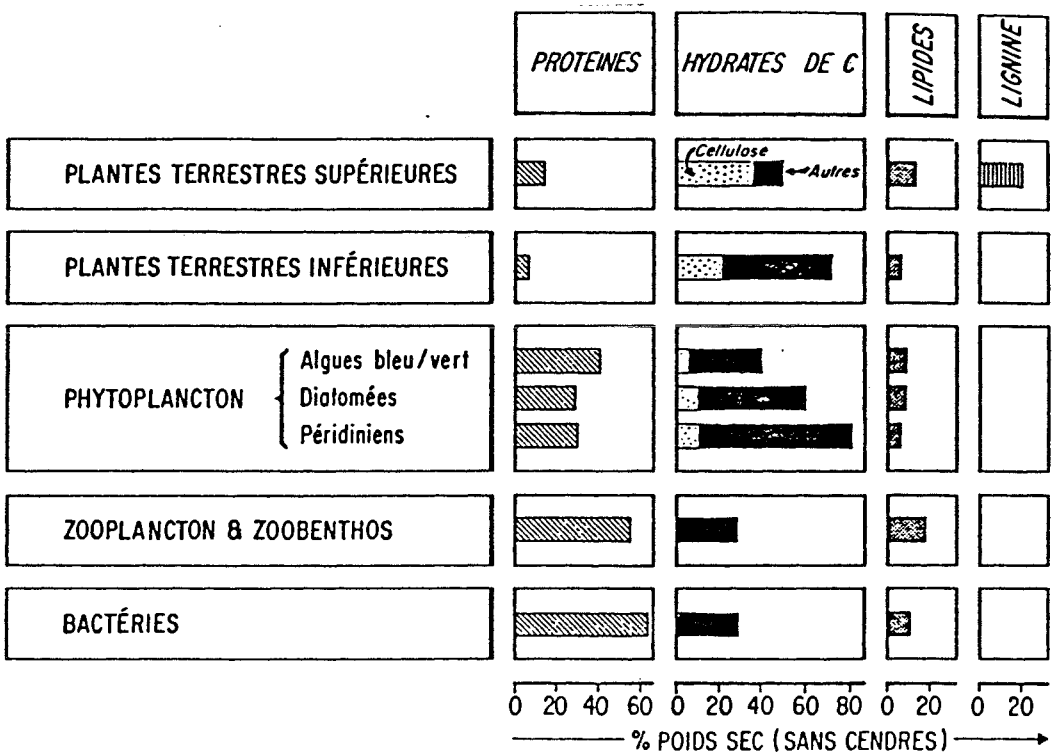


Figure 1-21 : Composition chimique comparative de quelques organismes (d'après Huc, 1980)

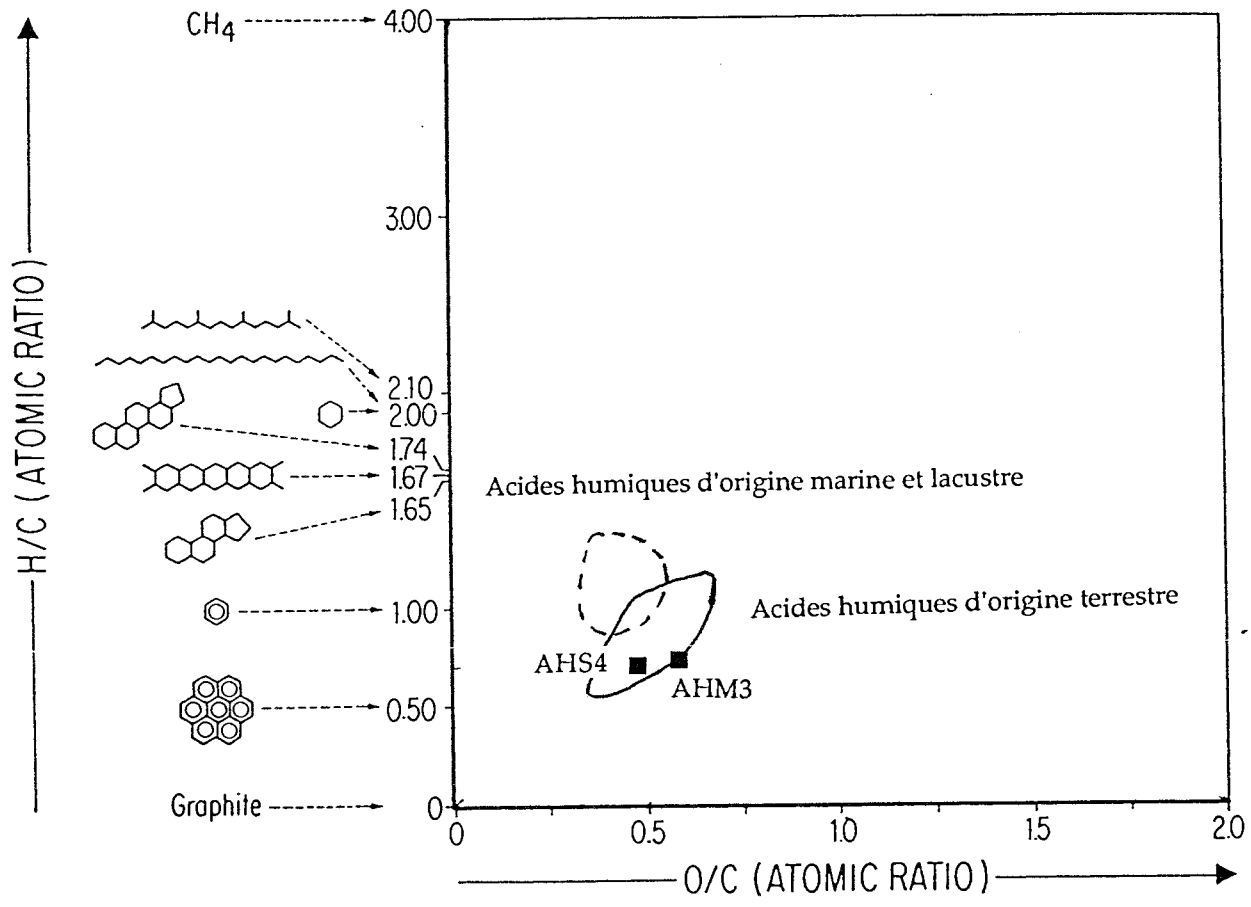


Figure 1-22 : Localisation des acides humiques AHS4 et AHM3 dans un diagramme de type Van Krevelen

Les propriétés chimiques qui viennent d'être définies au sujet des matières organiques associées aux kaolins précisent la nature des composés impliqués et vont également permettre d'établir des prévisions concernant leur aptitude à la biodégradation.

Les facteurs favorables à la biodégradation des matières organiques étudiées sont de plusieurs ordres. Tout d'abord, la présence de composés humiques et fulviques suggère, au moins pour ces fractions, une biodégradabilité potentielle. En effet la fraction alcalino-soluble est plus mobile que l'humine, donc sans doute plus accessible aux microflores. La présence de divers groupements fonctionnels oxydables (structures aliphatiques, groupements carboxyliques, fonctions alcools, ...) est également un point positif. Enfin, la sensibilité certaine des acides humiques vis-à-vis des dégradations thermiques, notamment en conditions oxydantes, prouve que ce sont des composés relativement réactifs.

Plusieurs facteurs défavorables doivent également être relevés. Ceux ci sont à considérer comme des preuves en faveur d'une certaine récalcitrance ou inadaptation des matières organiques vis-à-vis des dégradations biologiques. Le premier d'entre eux concerne la part extrêmement faible que représente les hydrates de carbone par rapport aux matières organiques totales. Ce type de composé aurait pu constituer une excellente source de carbone et d'énergie pour les populations microbiennes et de ce fait aurait aisément et rapidement été dégradé. Le second point qui peut être relevé tient aux faibles pourcentages en azote de l'ensemble des échantillons ainsi qu'à son inaccessibilité. Ces faibles teneurs induisent une disproportion entre le carbone et l'azote qui risque d'être un facteur limitant vis-à-vis de l'action des micro-organismes, tout comme sa nature plutôt hétérocyclique qui le rend peu disponible. Dans un troisième temps il y a lieu de souligner le caractère aromatique des matières organiques impliquées mis en évidence tant par les coefficients aromatiques Q4/6 des liqueurs alcalines que par les indices d'aromaticité H/C des acides humiques. Pour ce qui concerne ce dernier point, c'est surtout la condensation des structures moléculaires des matières humiques qui peut représenter un frein à la biodégradation en masquant ou en réduisant l'accessibilité des sites d'actions aux enzymes.

L'ensemble des données recueillies permet donc de considérer les matières organiques associées aux argiles comme des composés potentiellement "bioattaquables" par action microbienne. Bien entendu la minéralisation totale de ces biopolymères organiques n'est sans doute pas envisageable. Mais les données qui viennent d'être acquises fournissent des arguments suggérant que les composés humiques peuvent être considérés comme des substrats pour certaines microflores. D'autant plus que de nombreux micro-organismes sont capables de dégrader des composés aromatiques plus ou moins complexes. Le rappel des connaissances concernant cet aspect va d'ailleurs faire l'objet d'une partie de l'introduction de la suite de ce travail.

Deuxième Partie :

Biodégradation des matières organiques associées aux argiles

Chapitre I : Biodégradation des matières humiques : définitions et état des connaissances

D'un point de vu quantitatif mais aussi fondamental pour la vie sur terre, le cycle du carbone apparaît comme le plus important des cycles biogéochimiques. En considérant l'écosystème "plante - sol - atmosphère" dont les micro-organismes du sol font partie intégrante, il est possible de distinguer, d'une part, plusieurs compartiments qui correspondent aux réservoirs et formes essentielles du carbone (tableau II-1 d'après Brock et Madigan, 1988) et, d'autre part, quelques grandes étapes de transformation comme le représente la figure 2-1 (d'après Dommergues et Mangenot, 1970).

Il apparaît (tableau II-1) que les matières organiques des sols (litières, composés humiques, ...) constituent un réservoir en carbone très important dont la masse est équivalente et même supérieure à celle que représente le dioxyde de carbone atmosphérique. La transformation de ces matières organiques est essentiellement assurée par les micro-organismes du sol, donc étroitement dépendante de leur activité.

Les quatre grandes étapes du cycle du carbone correspondent aux processus et transferts présentés par la figure 2-1 et résumés ci dessous :

- la première étape consiste dans la fixation du carbone par les plantes et par les micro-organismes photolithotrophes (algues et bactéries) au cours de la photosynthèse ainsi que par les organismes chimiolithotrophes. Le CO_2 atmosphérique se retrouve alors à l'état de substances organiques formant les constituants cellulaires des plantes et des micro-organismes.

- la deuxième étape se rapporte à la consommation des produits carbonés qui sont oxydés et utilisés comme source de carbone et d'énergie par les organismes (respiration des organismes photosynthétiques eux-mêmes, animaux, micro-organismes).

- la troisième étape correspond à la décomposition des constituants organiques des cellules animales ou végétales mortes par les micro-organismes hétérotrophes.

- la quatrième étape concerne la mise en réserve d'une partie du carbone soit sous forme de dépôts minéraux de carbonate soit sous forme de dépôts organiques plus ou moins résistants à la biodégradation (humus, tourbes, charbon, pétrole, ...).

La grande diversité des populations et des capacités métaboliques des micro-organismes du sol leur fait jouer un rôle absolument capital dans le cycle du carbone puisque leur inactivité entraînerait un blocage du "turnover" de cet

Tableau 2-I : Réservoirs en carbone et temps de résidence (d'après Brock et Madigan, 1988).

Compartiment	Quantités (en tonnes)	Temps de résidence (en années)	Processus de dégradation
Atmosphère			
CH_4 (1,6 ppm)	3 à 6 . 10^9	3,6	Oxydation photochimique
CO (0,1 ppm)	0,3 . 10^9	0,1	Oxydation photochimique
CO_2 (320 ppm)	670 . 10^9	4	Photosynthèse
Terres (continents)			
Organismes vivants	500 à 800 . 10^9	16	Mort et prédation
Matière organique morte (humus)	700 à 1200 . 10^9	40	Décomposition microbienne
Océans			
Organismes	6,9 . 10^9	0,14	Mort et prédation
Matière organique morte	760 . 10^9	19	Décomposition microbienne
Matière inorganique	40 000 . 10^9	100 000	Formation de carbonate et échanges avec l'atmosphère
Sédiments et roches	72,5 . 10^{15}	300 . 10^6	Altération et combustion des fluides fossiles

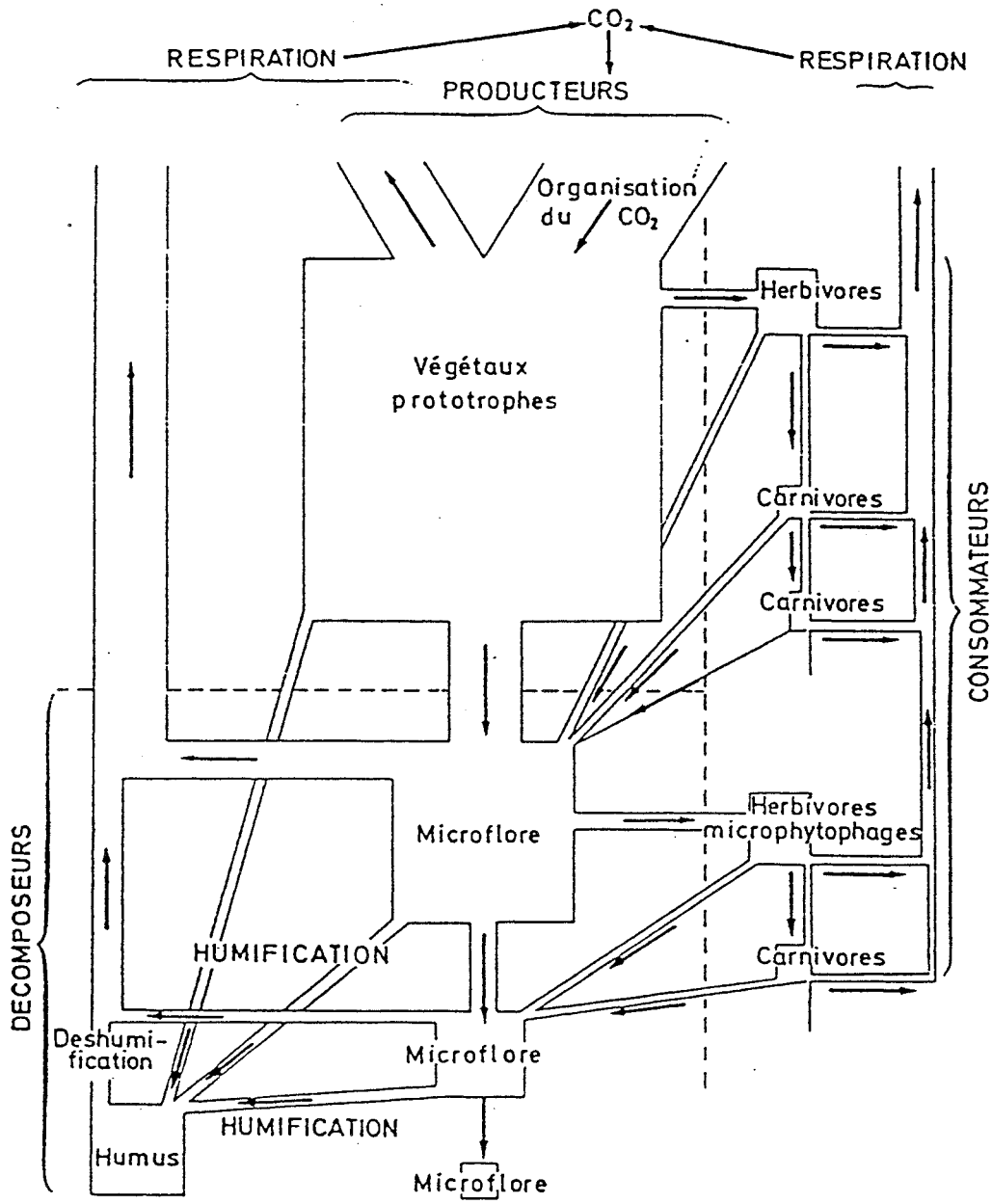


Figure 2-1 : Schéma général du cycle du carbone (d'après Dommergues et Mangenot, 1970).

élément se traduisant par l'accumulation de composés organiques. En effet la biodégradation aérobie de la matière organique est considérée comme la fonction la plus importante de la microflore tellurique (Pelmont, 1993). Le terme de **biodégradation** correspond à l'élimination des composés organiques (endogènes et exogènes) par transformation en produits simples par les organismes vivants et/ou les enzymes du sol. Le stade ultime conduit à la **minéralisation** (transformation en CO_2 et H_2O) des matières organiques. La notion de **biotransformation** quant à elle implique généralement un métabolisme incomplet des substrats.

Parmi les composés organiques du sol, les matières humiques *sensu lato* constituent des composés beaucoup plus stables vis-à-vis de la biodégradation que les matières organiques fraîches (d'origines animales ou végétales).
La résistance des composés humiques à la biodégradation peut s'expliquer par leurs structures dues aux transformations particulières que subissent, au cours des synthèses humiques, les différentes molécules organiques qui, avant incorporation dans ces substances humiques, étaient facilement biodégradées (Stevenson, 1982 ; Andreux et Munier Lamy, 1994).

Ces transformations, qui contribuent à la genèse de composés stables voire récalcitrants, sont de plusieurs ordres avec tout d'abord des étapes de polymérisation et de formation de complexes. Elles peuvent induire l'irrégularité des motifs constitutifs de l'architecture et la non reproductibilité des liaisons entre ces motifs conduisant à une certaine inaccessibilité pour les enzymes extra cellulaires (Blondeau, 1988). La stabilité des composés humiques peut également découler de l'adsorption des substances humiques sur les surfaces des colloïdes argileux ou de réactions avec certains cations qui, en formant des composés organo-minéraux, ralentiraient les possibilités de biodégradation par la microflore (Stevenson, 1985 ; Schnitzer, 1986).

Les composés humiques sont constitués à partir des produits de la décomposition des végétaux et des animaux ainsi que de résidus d'excrétion d'origines diverses. De ce fait leur composition varie considérablement en fonction du milieu impliqué. Cette grande diversité dans la structure des substances humiques explique également les variations qui peuvent être observées quant à leur biodégradabilité. Certains composés humiques peuvent se conserver très longtemps, c'est le cas des humus de podzols ou de tourbes dont l'age peut être de l'ordre du millier d'années et plus (Guillet, 1979). Ce temps de résidence très élevé est du essentiellement à une structure chimique particulièrement résistante à la biodégradation ainsi qu'à de faibles activités microbiennes (Mc Keague *et al.*, 1986). Il est également des cas où la durée de vie des substances humiques est plus courte, comme cela est observé dans les sols tropicaux ou lorsque ces substances se sont formées au niveau d'un horizon supérieur de sol normalement aéré (Mann, 1986).

En fait la persistance d'un composé organique dans un milieu peut être due à de nombreux facteurs (Alexander, 1981). Elle peut être inhérente à la structure chimique récalcitrante du composé ou à des conditions "environnementales"

insatisfaisantes pour l'action de la microflore (Leslie-Grady, 1985). Si le premier paramètre peut uniquement être constaté, il est par contre possible d'intervenir sur le second en réunissant des conditions de milieu favorables à la biodégradation.

L'humidité et la température sont deux facteurs importants qui gouvernent l'activité microbienne. Mais la texture du milieu et des matériaux, avec essentiellement le rôle des argiles, est également primordiale. En effet, sur le plan biologique, les argiles jouent un rôle conséquent puisqu'une de leur caractéristique est d'adsorber à leur surface des cations minéraux, des composés organiques ainsi que les micro-organismes eux-mêmes (Stotzky, 1986). Ce rôle peut s'avérer à la fois favorable et défavorable vis-à-vis de la biodégradation des matières organiques par les micro-organismes .

Les argiles ont un effet protecteur pour les micro-organismes car elles offrent, en raison de leurs propriétés de rétention d'eau, d'agrégation et leur capacité d'échange, un rempart vis-à-vis de diverses agressions. Elles protègent les micro-organismes contre la dessiccation et assurent leur survie pendant de longues périodes de sécheresse (Stotzky, 1986). Elles possèdent un pouvoir tampon et évitent ainsi les variations de pH auxquelles les micro-organismes sont très sensibles (Dommergues et Mangenot, 1970). Enfin elles peuvent également assurer une protection contre les métaux lourds (Babich et Stotzky, 1983 ; Stotzky, 1986) ou contre des substances antibiotiques grâce à leurs capacités d'échange et d'adsorption (Martin et Haider, 1986).

La présence d'argile, leur teneur et leur nature peut également modifier l'activité et le développement des populations microbiennes de façon assez variable. Mais malgré les nombreux travaux effectués sur ce sujet, peu de conclusions définitives ont pu être établies (Marshman et Marshall, 1981 a et b).

Si la présence d'argile induit un effet protecteur pour les micro-organismes, elle exerce également une protection des composés organiques contre les attaques microbiennes par la formation de complexes argilo-humiques. Cette complexation rend ces substrats potentiels moins accessibles, ce qui évidement ne favorise pas la biodégradation (Oades, 1988 ; Van Veen et Kuikman, 1990).

Les travaux relatifs à l'étude de la biodégradation des molécules complexes sont nombreux lorsqu'ils se rapportent par exemple aux celluloses et hemicelluloses (composés végétaux présents dans de nombreux déchets), aux lignines (considérées comme la principale source d'humus) ou encore aux mélanoïdines. Par contre ils sont beaucoup plus rares lorsqu'il s'agit de la biodégradation des substances humiques car ce type d'étude est peu développé.

Par comparaison avec les micro-organismes actifs dans la dégradation de la lignine, la capacité des champignons et des actinomycètes à décomposer les molécules humiques a tout d'abord été envisagée par Mathur et Paul (1966), Mathur (1970), Khandelwal et Gaur (1980) et Haider et Martin (1988). Puis certains auteurs ont montré que des bactéries hétérotrophes étaient susceptibles d'initier la dégradation des composés humiques par utilisation de ces molécules comme seule source de carbone et d'énergie (De Haan, 1977 ; Rifai et Bertru, 1980 ; Blondeau, 1988) ou par un processus plus ou moins proche du co-métabolisme (Rifai et Bertru, 1980 ; Mangler et Tate, 1982 ; Blondeau 1987).

Des études préliminaires n'ont jamais permis d'isoler des germes capables, en culture pure, d'utiliser les substances humiques comme seule source de carbone et d'énergie. Mais des résultats plus probants ont pu être obtenu avec une communauté bactérienne dont l'action n'est pas stimulée par l'incorporation d'une source annexe de carbone facilement métabolisable (Blondeau, 1988 ; Kontchou et Blondeau, 1990). Stout *et al.* (1981) estiment également qu'en dépit de leur nature complexe les composés humiques sont enclins à la dégradation bactérienne s'ils sont auparavant libérés de leur liaison avec les ions métalliques et/ou les argiles. Enfin il faut noter que des essais de biodégradation ont également été envisagés avec des polycondensats humiques synthétiques (Andreux, 1981 ; Kontchou et Blondeau, 1990) ou des mélanoïdines de synthèse (Ivarson et Benzing-Purdie, 1987 ; Kontchou et Blondeau, 1990). Dans tous les cas ces composés synthétiques ont fait preuve d'une grande stabilité en présence des micro-organismes du sol et ce sont même certaines fois révélés plus stables que les composés humiques naturels.

L'action d'une microflore sur des substances humiques peut être étudiée selon différentes approches. Les deux principales méthodes expérimentales consistent soit à extraire les composés carbonés de l'échantillon d'origine puis à les mettre en présence de cultures bactériennes soit à ne pas isoler substrats et microflores de leur milieu d'origine afin de pouvoir étudier l'ensemble "micro-organismes - substances humiques". Si le premier choix permet d'effectuer une étude de la biodégradation des composés humiques extractibles et d'obtenir une minéralisation précise des composés étudiés, le second permet de considérer les substances humiques associées, tel qu'elles le sont dans les argiles, et correspond mieux à la réalité dans laquelle les composés humiques sont stabilisés à plusieurs niveaux (protection physique au coeur des agrégats, association avec des ions métalliques et des argiles, ...).

En conséquence de quoi la seconde approche précédemment proposée a été choisie dans cette partie de l'étude avec comme principal objectif de favoriser l'activité des microflores hétérotrophes autochtones associées aux argiles afin d'induire le biodégradation des matières organiques présentes dans ces sédiments pour essayer de les éliminer au moins en partie.

Chapitre II : Dispositifs et méthodes mises en oeuvre

II -1 Les argiles

Les six échantillons utilisés pour les essais de biodégradation ont été choisis au terme de la première partie de cette étude. Il s'agit des argiles MOMB1, SEIG1, BROY4, SEIG4, MOMB3 et SEIG2. Leurs caractéristiques minéralogiques et chimiques sont données dans les annexes 2 et 3. Les principales caractéristiques des matières organiques associées à ces kaolins sont résumées dans le tableau 1-XII.

Les argiles utilisées sont séchées à 100 °C ou à 40 °C, broyées et tamisées à 0,5 mm.

II-2 Principes des méthodes

L'étude de l'activité et de l'évolution d'une communauté microbienne au cours du temps peut être réalisée grâce à des approches méthodologiques variées portant : sur les mesures du nombre de cellule, sur l'évaluation de la biomasse ou sur des mesures d'activité cellulaire spécifique ou globale.

Tout au long de cette étude, l'évaluation de l'activité ainsi que l'évolution des peuplements microbiens seront suivies en utilisant en parallèle deux de ces types d'approche. En effet les mesures concerneront d'une part le nombre de cellules présentes en effectuant des dénombrements en boite de Pétri sur divers milieux et d'autre part l'activité cellulaire en évaluant la production d'un des produits finaux du métabolisme cellulaire : le CO_2.

II-2-1 Dénombrement des microflores autochtones

Le dénombrement des micro-organismes viables est une méthode communément utilisée. La technique la plus habituelle est le dénombrement par la méthode des suspensions-dilutions avec culture en boite de Pétri.

Pour se faire une solution mère est réalisée par suspension de l'échantillon à étudier dans de l'eau osmosée stérile ou dans une solution physiologique. Des dilutions successives sont alors effectuées et un volume connu de chacune d'elles est étalé sur boite de Pétri, à la surface d'un milieu gélosé.

Après incubation dans des conditions bien définies (aération, température, pH, ...), le nombre de colonies qui se sont développées est compté en choisissant les boites qui contiennent entre 30 et 300 colonies. En considérant, en théorie, que

chacune de ces colonies est issue d'un micro-organisme, il est possible d'obtenir le nombre de micro-organismes présents dans l'échantillon initial.

Il faut remarquer que les chaînettes, les amas ou les agglomérats microbiens ne donnent qu'une seule colonie. C'est pourquoi les résultats sont exprimés non pas en nombre de cellules mais en Unités Formant une Colonie : UFC.

Enfin, pour donner à la méthode le maximum de garantie et de précision, chaque résultat porte sur trois répétitions.

II-2-2 Etudes respirométriques

Il s'agit de réaliser des incubations en flacons sérum contenant l'échantillon à étudier ainsi qu'une solution (eau, solution nutritive, ...). Les flacons sont fermés par des bouchons en caoutchouc assurant l'étanchéité des systèmes et permettant le prélèvement, à la seringue, d'aliquotes de 1 ml de l'atmosphère dans laquelle des dosages de CO_2 sont réalisés.

L'activité biologique est donc suivie dans chaque flacon par la mesure de l'activité respiratoire et plus précisément par le dosage du CO_2, ceci tout au long des incubations ce qui permet d'obtenir des cinétiques de minéralisation globale des matières organiques.

Afin de distinguer la part des processus physico-chimiques de celle des processus biologiques, pour chaque essai des témoins stériles (sans activité microbienne) sont réalisés. Ces témoins sont obtenus par autoclavage deux fois à 120°C pendant 20 mn, à 48 heures d'intervalle. De plus chaque mesure correspond à trois répétitions afin de contrôler la reproductibilité des résultats.

Les mesures de CO_2 sont effectuées avec un appareil IRGA-LCA2-ADC dont le principe est fondé sur l'absorption du CO_2 dans l'infrarouge.

Les concentrations obtenues grâce à cet appareil sont exprimées en Volume Par Million (vpm). Il est ensuite nécessaire de les transformer, par calcul, en mg de carbone ce qui permet, en rapportant cette valeur à la quantité de carbone organique initiale présente dans l'échantillon, d'avoir une expression des résultats sous forme de pourcentage de carbone organique minéralisé.

Les détails concernant ce dosage sont donnés en annexe 5.

II-3 Détermination des conditions opératoires favorables à la biodégradation : méthodes expérimentales, analyses, milieux et solutions

II-3-1 Méthodes expérimentales

Pour obtenir une biodégradation efficace des matières organiques associées aux argiles par stimulation de l'activité microbienne autochtone il apparaît nécessaire

de déterminer et d'optimiser les différents paramètres qui peuvent intervenir. Ceux ci sont en effet fort nombreux et variés, ils portent sur :

- l'accessibilité des matières organiques vis-à-vis des micro-organismes (broyage, dispersion des argiles, densité des pulpes)
- les conditions d'oxygénation, c'est à dire la disponibilité des accepteurs d'électrons en aérobiose ainsi qu'en anaérobiose
- la nature et l'influence des constituants de la solution nutritive (apports d'azote, de phosphore, de sels minéraux en général)
- la disponibilité réelle des éléments apportés par cette solution
- l'effet de la température de séchage des échantillons

Pour cela des incubations de durées relativement courtes sont réalisées en flacon sérum de 250 ml contenant 20 g d'échantillon d'argile sec et 50 ml de solution. L'ensemble des essais s'opère en flacons fermés, pendant 21 jours, les incubations se déroulant à 28°C et à l'obscurité. Des prélèvements de l'atmosphère des flacons, pour les dosages de CO_2, sont effectués régulièrement tout au long des 21 jours.

Ces conditions sont appliquées à l'ensemble des essais, à l'exception de ceux correspondant à l'amélioration des conditions d'oxygénation. En effet dans ce dernier cas, différents rapports échantillon/solution sont également envisagés.

Ces incubations sont non seulement suivies par le biais des mesures de CO_2, mais également par un ensemble d'analyses et de tests adaptés aux paramètres étudiés. Le choix des milieux solides pour les dénombrements ainsi que celui des solutions nutritives est bien entendu également fonction des paramètres étudiés.

Pour bien préciser ces démarches et les paramètres étudiés, il nous a semblé nécessaire d'exposer séparément les conditions expérimentales particulières relatives aux différentes expériences effectuées.

Activité des microflores lors d'incubations en aérobiose : effets d'apports en nutriments minéraux et organiques.

Les échantillons sont incubés en aérobiose, et mis en suspension dans différentes solutions, à savoir :

- dans l'eau
- dans une solution nutritive minérale notée SM_1^{EL}
- dans une solution nutritive identique à la précédente mais contenant également 100 mg/l de glucose notée SMG_1^{EL}

A la fin des essais, des dosages de carbone organique sont réalisés sur l'ensemble des échantillons récupérés par centrifugation. Dans certains cas un dénombrement des communautés microbiennes est également effectué. Différents milieux sont utilisés pour en apprécier la variété. En intervenant sur

la concentration en éléments nutritifs du milieu NB (Nutrient Broth) conventionnel il est possible de mettre en évidence des microflores oligotrophes (NB/100). Un milieu contenant de l'acétate comme source de carbone ainsi qu'un milieu propice au développement des champignons (Potato Dextrose Agar : PDA) sont également employés.

Les boites de Pétri sont incubées à 28 °C pendant 5 jours pour les milieux NB, NB/10, Acétate et PDA et jusqu'à 10 jours ou plus pour le milieu NB/100.

Activité des microflores lors d'incubations en anaérobiose : recherche d'activités ferri-réductrice ou dénitrifiante associées à la dégradation des matières organiques

Différentes conditions énergétiques et nutritionnelles sont envisagées ce qui conduit à utiliser différentes conditions de milieu. De ce fait les échantillons d'argiles sont mis en suspension dans trois solutions différentes :

- dans l'eau
- dans une solution nutritive minérale identique à celle utilisée lors des expériences en aérobiose : SM_1^{EL}
- dans une solution nutritive minérale dans laquelle l'azote est apporté sous forme de nitrate de potassium : SM_2^{EL}

Les flacons sont placés sous atmosphère d'azote afin de créer l'anaérobiose. Pour le premier traitement (mise en suspension dans l'eau), à la fin des cinétiques de minéralisation, un dénombrement des communautés microbiennes est effectué sur milieu NB (Nutrient Broth) qui permet la croissance de nombreux micro-organismes.

Dans le deuxième traitement, la présence d'une activité bactérienne ferri-réductrice est recherchée. Pour cela des dosages de fer ferreux sont réalisés tout au long des incubations et des dénombrements sont effectués sur milieu de Bromfield "fer". Ce milieu spécifique permet en effet la mise en évidence des bactéries ferri-réductrices par formation d'une auréole translucide de dissolution des oxydes de fer rouges autour des colonies.

Dans le troisième traitement, l'intérêt se porte sur l'aptitude des bactéries présentes à réduire les nitrates. De ce fait, nitrates et nitrites sont dosés tout au long des incubations et les numérations en fin d'expérience se font sur milieu de Bromfield modifié par ajout de KNO_3 en remplacement de Fe_2O_3 en tant qu'accepteur d'électrons.

Toutes les boites de Pétri sont incubées en anaérobiose dans des jarres dans lesquelles l'oxygène est éliminé par le traitement "Gaspack", à 28 °C et les dénombrements sont effectués après 5 jours.

Optimisation des paramètres de la biodégradation : intérêt d'un apport de facteurs de croissance, disponibilité des nutriments minéraux, effet du séchage des argiles, amélioration des conditions d'oxygénation.

L'intérêt d'un apport de facteurs de croissance par l'intermédiaire d'extrait de levure, la disponibilité des sels minéraux présents dans la solution nutritive ainsi que l'influence du séchage des argiles sont trois facteurs dont l'influence doit être prise en compte et sera donc déterminée par cette série d'expériences.

Pour cela les échantillons séchés à deux températures différentes (40°C et 100°C) sont mis en suspension, en aérobiose, dans des solutions nutritives différentes. La première, notée SM_1^{EL} contient des sels minéraux et de l'extrait de levure. La seconde notée **SM** ne contient que les éléments minéraux.

Dans le cas d'un échantillon mis en suspension, en parallèle, dans SM_1^{EL} et dans **SM**, en plus du suivi de l'activité respiratoire des dénombrements sont réalisés sur deux milieux différents : NB/10 et NB/100.

Dans le cas d'un échantillon séché à deux températures différentes mis en suspension dans des solutions identiques, en l'occurrence **SM**, des dénombrements sont réalisés sur quatre types de milieux gélosés: NB, NB/100, Actinomycète et PDA.

En ce qui concerne les échantillons séchés à 100°C mis en suspension dans la solution **SM**, les dosages de certains éléments minéraux en solution (K, Mg, P et N) sont effectués avant et après incubation. Les solutions nutritives en contact avec les argiles étant recueillies par centrifugation puis filtrées à 0,45 µm.

L'optimisation des conditions d'oxygénation est envisagée en étudiant d'une part l'influence du rapport échantillon/solution nutritive (densité de pulpe) et d'autre part l'intérêt d'une aération par agitation des milieux réactionnels. Pour cela les incubations correspondantes sont réalisées en plaçant 20 g d'échantillon sec en présence de quantités différentes de solution nutritive minérale **SM**, c'est à dire :

- soit 20 ml de solution minérale ce qui équivaut à une pulpe à 50 % d'argile
- soit 40 ml de solution minérale ce qui équivaut à une pulpe à 33 % d'argile
- soit 50 ml de solution minérale ce qui équivaut à une pulpe à 29 % d'argile
- soit 60 ml de solution minérale ce qui équivaut à une pulpe à 25 % d'argile

Une condition supplémentaire intervenant dans les transferts d'oxygène est ajoutée puisque pour chaque pulpe testée trois flacons sont incubés sous agitation permanente et trois autres restent immobiles.

Pour l'ensemble des cas des dénombrements sont réalisés sur milieu NB, NB/100, Actinomycète et PDA.

Les boites ensemencées dans le cadre de ces deux séries expérimentales sont incubées en aérobiose, à 28 °C, pendant 5 jours pour les milieux NB, NB/10, Actinomycète et PDA et jusqu'à 10 jours ou plus pour le milieu NB/100.

II-3-2 Analyses

Les teneurs en carbone organique des échantillons issus des différents traitements sont déterminées par auto-analyseur CHNS+O 1108 Carlo Erba après les avoir séchés, broyés et tamisés à 0,5 mm.

Les dosages semi quantitatifs de Fe^{2+}, des nitrates et des nitrites sont réalisés en employant des tests Merck (Merckoquant, Eisen test et Merckoquant, Nitrat test).

Le potassium, le magnésium et le phosphore sont dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique (Spectrophotomètre AA6 de chez VARIAN). Les quantités d'azote ammoniacal sont déterminées en utilisant des tests Merck (Merckoquant, Test ammonium).

II-3-3 Milieux et solutions

Les compositions des solutions minérales nutritives sont les suivantes :

- **SM_1^{EL}** : KH_2PO_4 (0,44 g/l) ; NH_4Cl (0,38 g/l) ; $MgSO_4, 7H_2O$ (0,1 g/l) ; NaCl (0,02 g/l) ; extrait de levure (0,01 g/l)

- **SMG_1^{EL}** : KH_2PO_4 (0,44 g/l) ; NH_4Cl (0,38 g/l) ; $MgSO_4, 7H_2O$ (0,1 g/l) ; NaCl (0,02 g/l) ; extrait de levure (0,01 g/l) ; glucose (0,1 g/l)

- **SM_2^{EL}** : KH_2PO_4 (0,44 g/l) ; KNO_3 (0,72 g/l) ; $MgSO_4, 7H_2O$ (0,1 g/l) ; extrait de levure (0,01 g/l)

- **SM** : KH_2PO_4 (0,44 g/l) ; NH_4Cl (0,38 g/l) ; $MgSO_4, 7H_2O$ (0,1 g/l) ; NaCl (0,02 g/l)

Les milieux solides utilisés pour les dénombrements sont :

- **NB** : Nutrient Broth (DIFCO) 8g/l, agar noble 12 g/l et cycloheximide 0,1 g/l (ajouté comme antifongique)

- **NB/10** : Nutrient Broth (DIFCO) 0,8 g/l, agar noble 12 g/l et cycloheximide 0,1 g/l

- **NB/100** : Nutrient Broth (DIFCO) 0,08 g/l, agar noble 12 g/l et cycloheximide 0,1 g/l

- **AA** : Actinomycète Agar (DIFCO)

- **PDA** : Potato Dextrose Agar (DIFCO), streptomycine (0,1 g/l) (ajoutée comme antibiotique)

- **Acétate** : KH_2PO_4 (0,44 g/l) ; NH_4Cl (0,38 g/l) ; $MgSO_4$, 7 H_2O (0,1 g/l) ; CH_3COONa, 3 H_2O (0,27 g/l) ; agar noble 12 g/l

- **Bromfield "fer"** : KH_2PO_4 (0,5 g/l) ; $MgSO_4$, $7H_2O$ (0,5 g/l) ; $(NH_4)_2SO_4$ (1 g/l) ; $CaCO_3$ (5 g/l) ; Fe_2O_3, H_2O (0,5 g/l) ; extrait de levure (0,15 g/l) ; glucose (1 g/l) ; agar noble (12 g/l)

- **Bromfield "nitrate"**: KH_2PO_4 (0,5 g/l) ; $MgSO_4$, $7H_2O$ (0,5 g/l) ; $(NH_4)_2SO_4$ (1 g/l) ; $CaCO_3$ (5 g/l) ; KNO_3 (0,2 g/l) ; extrait de levure (0,15 g/l) ; glucose (1 g/l) ; agar noble (12 g/l)

II-4 Incubations de longues durées : méthodes expérimentales, analyses, milieux et solutions

Les expériences visant à définir et à optimiser les différents paramètres favorables au développement des microflores autochtones, se sont déroulés sur 21 jours en utilisant des quantités d'argiles assez faibles (20 g). Il s'agit maintenant de réaliser des incubations sur des durées plus longues et en augmentant les quantités d'argiles traitées afin de pouvoir aborder l'étude des effets de l'activité microbienne sur la transformation et la répartition des différentes formes de matières organiques associées aux argiles.

II-4-1 Méthodes expérimentales

Deux séries d'expériences ont été menées sur des périodes de 90 jours. L'ensemble des essais a été conduit en aérobiose, l'atmosphère des flacons étant renouvelée une fois par semaine en se plaçant en conditions stériles afin d'éviter les contaminations microbiennes. Les milieux réactionnels ont été incubés à 28 °C et à l'obscurité.

Globalement, les conditions expérimentales et les analyses réalisées sont semblables puisqu'elles découlent des essais relatifs à la détermination des conditions opératoires favorables à la biodégradation. Pourtant la première série d'incubations de longues durées a également permis d'obtenir des conclusions qui ont été appliquées par la suite lors de la mise en oeuvre de la deuxième série d'essais. De ce fait, afin de préciser clairement les démarches suivies dans cette partie, les méthodes expérimentales relatives aux deux expérimentations vont être exposées séparément.

Premiers essais de biodégradation des matières organiques associées aux argiles

Les incubations sont menées en flacon sérum de 500 ml contenant 50 g d'échantillon d'argile sec et 120 ml de solution nutritive **SM**. Les flacons sont agités en continu sur un agitateur à plateau. La minéralisation est suivie par des dosages hebdomadaires de CO_2 dans l'atmosphère des flacons. A la fin des essais, les argiles sont récupérées et traitées de la façon suivante :

- séchage puis broyage
- dosage du carbone organique
- extraction des matières organiques par la méthode présentée en première partie et détermination de leur répartition dans les différentes classes : acides fulviques, acides humiques et humine
- purification des acides humiques, détermination de leur composition élémentaire organique, de leur encombrement moléculaire ainsi que de leurs caractéristiques spectrales infra rouge.

Deuxième série d'expériences de longue durée: biodégradation maximale des matières organiques associées aux argiles

La démarche choisie pour la réalisation de ces essais est la suivante : 150 g d'argile séchée et 375 ml de solution minérale **SM** (pulpes à 29 % d'argile) sont mis à incuber dans des flacons sérums de 1 litre. Ces flacons sont agités en continu sur un agitateur à retournement afin de favoriser la disponibilité de l'oxygène, des éléments minéraux et le contact des argiles vis à vis des micro-organismes, d'homogénéiser l'ensemble et d'éviter la formation de croûtes ou de zones d'anaérobiose.

Le développement et l'activité de la microflore autochtone sont suivis, à un rythme hebdomadaire, par des mesures de dégagements de CO_2 ainsi que par des dénombrements de micro-organismes réalisés sur milieu NB et sur milieu NB/100.

Un ensemble assez complet de résultats est obtenu après différents temps d'incubation, c'est à dire après respectivement une semaine, un mois, deux mois et trois mois d'incubation, puisque chaque flacon est traité comme suit :

- mesure du pH
- prélèvement d'un aliquote de la solution afin d'effectuer le dosage de certains éléments minéraux
- lavage, à l'eau, de l'échantillon en vue d'éliminer les produits hydrosolubles issus de l'activité microbienne
- séchage puis broyage de l'argile

- dosage du carbone organique
- extraction des matières organiques et détermination de leur répartition dans les différentes classes : acides fulviques, acides humiques et humine
- purification des acides humiques et détermination de leur composition élémentaire organique ainsi que de leurs caractéristiques spectrales infra rouge

Les boites de Pétri ensemencées pour les dénombrements microbiens dans le cadre de cet essai de biodégradation des matières organiques sont incubées en aérobiose, à 28 °C, pendant 15 jours pour les milieux NB et NB/100.

II-4-2 Analyses

Le potassium, le magnésium et le phosphore sont dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique (Spectrophotomètre AA6 VARIAN). Les quantités d'azote ammoniacal sont déterminées en utilisant des tests d'analyses Merck (Merckoquant, Test ammonium).

Les teneurs en carbone organique des échantillons issus des différents traitements ainsi que les compositions élémentaires organiques des acides humiques sont déterminées par auto-analyseur CHNS+O 1108 Carlo Erba.

Les teneurs en carbone des solutions alcalines obtenues lors des extractions des matières organiques sont déterminées au Carmograph Wöhstoff, celles des solutions d'acides fulviques par auto-analyseur TCM 480 Carlo Erba.

Les spectres infrarouge des acides humiques sont obtenus avec un appareil Shimadzu.

L'encombrement moléculaire des acides humiques est estimé par chromatographie sur gel Séphadex. La méthode est donnée en annexe 6.

II-4-3 Milieux et solutions

La composition de la solution minérale nutritive est la suivante :

- **SM** : KH_2PO_4 (0,44 g/l) ; NH_4Cl (0,38 g/l) ; $MgSO_4$, $7H_2O$ (0,1 g/l) ; NaCl (0,02 g/l)

Les milieux gélosés utilisés pour les dénombrements sont :

- **NB** : Nutrient Broth (DIFCO) 8 g/l, agar noble 12 g/l et cycloheximide 0,1 g/l (ajouté comme antifongique)

- **NB/100** : Nutrient Broth (DIFCO) 0,08 g/l, agar noble 12 g/l et cycloheximide 0,1 g/l

Chapitre III : Etude des microflores associées aux argiles sédimentaires et des paramètres intervenant sur leur aptitude à la biodégradation des matières organiques

La connaissance, au moins globale, des microflores associées aux échantillons d'argile est nécessaire pour appréhender le peuplement microbien autochtone et/ou contaminant communément rencontré. Cette approche des communautés microbiennes s'accompagnera ensuite d'études de leur activité biodégradante globale en utilisant la mesure de la minéralisation des produits organiques en CO_2. Enfin il s'agira de déterminer l'influence de plusieurs paramètres de première importance vis-à-vis de la biodégradation des matières organiques (présence et nature d'accepteurs d'électrons pour différents modes de respiration, apports de nutriments minéraux, ...) en utilisant des dispositifs d'incubation en cuve mis en oeuvre dans différentes conditions de milieu.

III-1 Les microflores autochtones

La première démarche est destinée à déterminer l'importance et la nature des peuplements microbiens sur les six échantillons, représentatifs des trois classes d'argiles, sélectionnés dans la première partie de ce travail. Elle consiste à dénombrer les microflores présentes sur différents milieux. Deux d'entre eux sont des milieux "généraux" permettant la croissance de nombreux micro-organismes, ils sont utilisés à des concentrations différentes en nutriments (NB/10 : milieu mésotrophe ; NB/100 : milieu oligotrophe). Le troisième est favorable au développement des champignons.

Les micro-organismes hétérotrophes, dénombrés sur milieu NB/10, utilisent les composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Ce sont eux qui interviennent directement dans les processus de biodégradation des matières organiques. Leur présence dans les argiles est donc intéressante dans la mesure où ils participent à la minéralisation des composés organiques, ou à leur transformation en composés simples hydrosolubles et lixiviables.

Parmi les hétérotrophes, les micro-organismes oligotrophes, dénombrés sur milieu NB/100, sont particulièrement importants. La microflore oligotrophe est constituée d'organismes capables de croître dans des niches écologiques caractérisées par de faibles concentrations en substrat et de faibles flux d'énergie (Semenov, 1990). Ce type de micro-organismes est généralement présent dans les milieux pauvres en carbone, c'est pourquoi ils devraient constituer une microflore active dans des milieux tels que les argiles étudiés pour lesquels la quantité de matière organique est faible.

Les résultats de ces numérations (tableau 2-II) sont surprenants car quasiment aucune croissance n'a pu être observée pour pratiquement l'ensemble des

échantillons. Par ailleurs les densités microbiennes déterminées, dans quelques cas seulement, sont plus qu'anormalement faibles puisqu'on peut considérer que la population moyenne d'un sol est de l'ordre de plusieurs millions d'individus par gramme d'échantillon sec. Ces très faibles peuplements en micro-organismes suggèrent que la microflore autochtone a été fortement perturbée par les traitements subit par les échantillons lors de leur préparation (stockage, séchage, broyage).

Tableau 2-II : Dénombrements de la microflore autochtone initiale de six échantillons d'argile.

	MOMB 1	SEIG 1	MOMB 3	SEIG 2	BROY 4	SEIG 4
NB/10	0	200	0	100	0	300
NB/100	0	100	0	0	0	0
PDA	100	300	200	0	0	300

Résultats exprimés en UFC par gramme d'échantillon sec.

Dans une telle situation, il va être nécessaire de stimuler au mieux les micro-organismes présents afin de rétablir une microflore plus abondante. Ceci est envisageable en plaçant les argiles dans un milieu favorable et en agissant surtout dans un premier temps sur la température et l'humidité. En effet les micro-organismes sont capables de se protéger vis-à-vis de conditions de milieu drastiques par exemple en sporulant, en adhérant aux particules d'argiles, en colonisant les pores, etc. De ce fait le rétablissement de paramètres "environnementaux" favorables devrait permettre aux cellules présentes de se multiplier. Si malgré tout une microflore se développant en minéralisant les matières organiques des argiles ne peut être restaurée, il faudra envisager l'apport de micro-organismes étrangers aptes à coloniser les argiles et à dégrader les matières organiques.

La stimulation des micro-organismes présents est réalisée par la mise en suspension des échantillons d'argile dans différentes solutions

III-2 Influence de l'aérobiose et effet d'un apport de nutriments minéraux et organique (glucose) sur la minéralisation des matières organiques.

Parmi les six échantillons sélectionnés, SEIG1 et SEIG4 semblent renfermer les populations microbiennes les plus nombreuses. De ce fait, les essais concernant le rétablissement de microflores actives ainsi que le suivi de leur activité minéralisatrice ont été réalisés uniquement sur ces deux argiles. Celles ci ont été

mise en suspension soit dans l'eau, soit dans une solution nutritive SM_1^{EL} apportant des éléments minéraux, soit dans une solution nutritive SMG_1^{EL} contenant des éléments minéraux ainsi que du glucose.

La solution nutritive utilisée est simple mais convenable pour le développement des germes aérobis courants du sol. En effet de très nombreuses bactéries présentes naturellement dans les sols acceptent des conditions frustres et se contentent de milieux assez dilués (Pelmont, 1993).

La composition qualitative de la solution nutritive SM_1^{EL} appelle quelques remarques générales.

L'azote, indispensable pour la synthèse des protéines, est apporté sous forme d'ion ammonium (NH_4^+) plus facilement assimilable que les autres sources azotées. Le phosphate joue le rôle de source de phosphore : élément faisant partie des acides nucléiques, de nombreux coenzymes et surtout de l'ATP. Le soufre tient également une place de choix, il est apporté sous forme d'ion sulfate et est nécessaire pour la synthèse de certains acides aminés donc *a fortiori* de protéines (la méthionine et la cystéine contiennent en effet des groupements thiols).

Certains des éléments minéraux apportés jouent un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la cellule. Ce sont notamment le sodium, le potassium et le magnésium.

D'autres, beaucoup plus nombreux, sont partie constituante d'enzymes ou de coenzymes. Ils interviennent à de nombreux endroits du métabolisme cellulaire et sont nécessaires au fonctionnement de divers constituants. Ces éléments minéraux (fer, calcium, manganèse, cobalt, cuivre, molybdène, ...) requis à l'état de traces sont les oligo-éléments. Ils sont apportés par l'extrait de levure.

Le glucose, apporté en supplément dans une des solutions nutritive utilisée, est une source de carbone facilement assimilable. Cet apport a été envisagé en tant que source de carbone et d'énergie d'appoint car ce sucre simple constitue un substrat carboné de choix par rapport aux composés organiques humiques présents dans les échantillons.

Le suivi de l'activité respiratoire endogène et de la minéralisation des matières organiques des argiles mises en suspension s'effectue par une mesure de l'activité microbienne globale. Ce suivi permet d'établir une relation entre le CO_2 dégagé et la matière organique dégradée puisque le CO_2 mesuré correspond à la minéralisation de la matière organique par la microflore hétérotrophe. C'est pourquoi les résultats présentés correspondent aux quantités de carbone minéralisé exprimées en pourcentage du carbone organique total en fonction du temps d'incubation.

* Les témoins abiotiques

Les figures 2-2 et 2-4 indiquent que pour tous les traitements envisagés les productions de dioxyde de carbone des témoins abiotiques sont faibles mais pas nulles. En effet pour les deux échantillons et les trois solutions nutritives

utilisées un faible dégagement de CO_2 se produit, essentiellement lors des deux à trois premiers jours d'incubation. Il est peu probable que ce dégagement soit du à une activité microbienne car les sols ont subi une stérilisation par autoclavages successifs. De ce fait même si le premier autoclavage n'a pas détruit toutes les spores ou micro-organismes protégés dans des micro-aggrégats, le second, effectué à 48 heures d'intervalle, a stoppé les activités qui auraient pu débuter. Pour le vérifier des numérations ont été réalisées en fin d'incubation. L'ensemble des résultats obtenus n'est pas rapporté ici car aucune croissance n'a été observée quelque soit l'origine de l'inoculum et le milieu utilisé (NB, NB dilué, PDA).

Il semble donc qu'il s'agisse d'un processus physico-chimique de dégagement de CO_2. Mais ce phénomène est limité et ne perturbe pas la suite des résultats. Exception faite du cas de SEIG1 incubé en présence d'eau pour lequel les dégagements de CO_2 mesurés à 3 jours sont de même amplitude pour les essais et pour les témoins mais il faut noter que ces dégagements sont faibles et que la production de CO_2 dans les témoins n'évolue pas par la suite.

Ce CO_2 peut correspondre au dégazage des suspensions au cours des premiers jours d'incubation et serait bien d'origine abiotique.

* Les essais biotiques

Les figures 2-2 à 2-5 permettent de constater que les dégagements de CO_2 pour l'ensemble des traitements réalisés ont un aspect identique. En effet dans tous les cas une augmentation rapide de la quantité de carbone minéralisé est observée pendant la première semaine, suivi d'un ralentissement puis d'une stabilisation au cours de la troisième semaine. La première phase de ce phénomène est due à l'apport d'eau et à la mise en suspension des argiles dans les systèmes expérimentaux ainsi qu'au choix d'une température d'incubation de 28° C. Ces facteurs à eux seuls favorisent déjà beaucoup le développement microbien. En effet l'eau est indispensable au développement des organismes vivants. Elle intervient également au niveau des échanges gazeux ainsi que pour le transport des substrats énergétiques et des micro-organismes eux mêmes.

Ces premières phases de minéralisation peuvent s'expliquer par une consommation des éléments les plus facilement métabolisables du milieu suivie d'une inhibition ou d'un ralentissement de la minéralisation du à la production de CO_2 et à la moindre accessibilité des matières organiques.

Les figures 2-3 et 2-5 permettent également d'apprécier les capacités variables des trois solutions à stimuler la croissance des microflores donc la minéralisation des produits organiques.

Lorsque les échantillons sont mis en suspension dans l'eau, la minéralisation des matières organiques est faible. Ce résultat met en évidence et confirme la présence de populations autochtones, il montre également que les micro-organismes présents, malgré leur petit nombre, sont aptes à se développer dans ces milieux à faible teneur en matières organiques en les utilisant sans doute comme source de carbone et d'énergie.

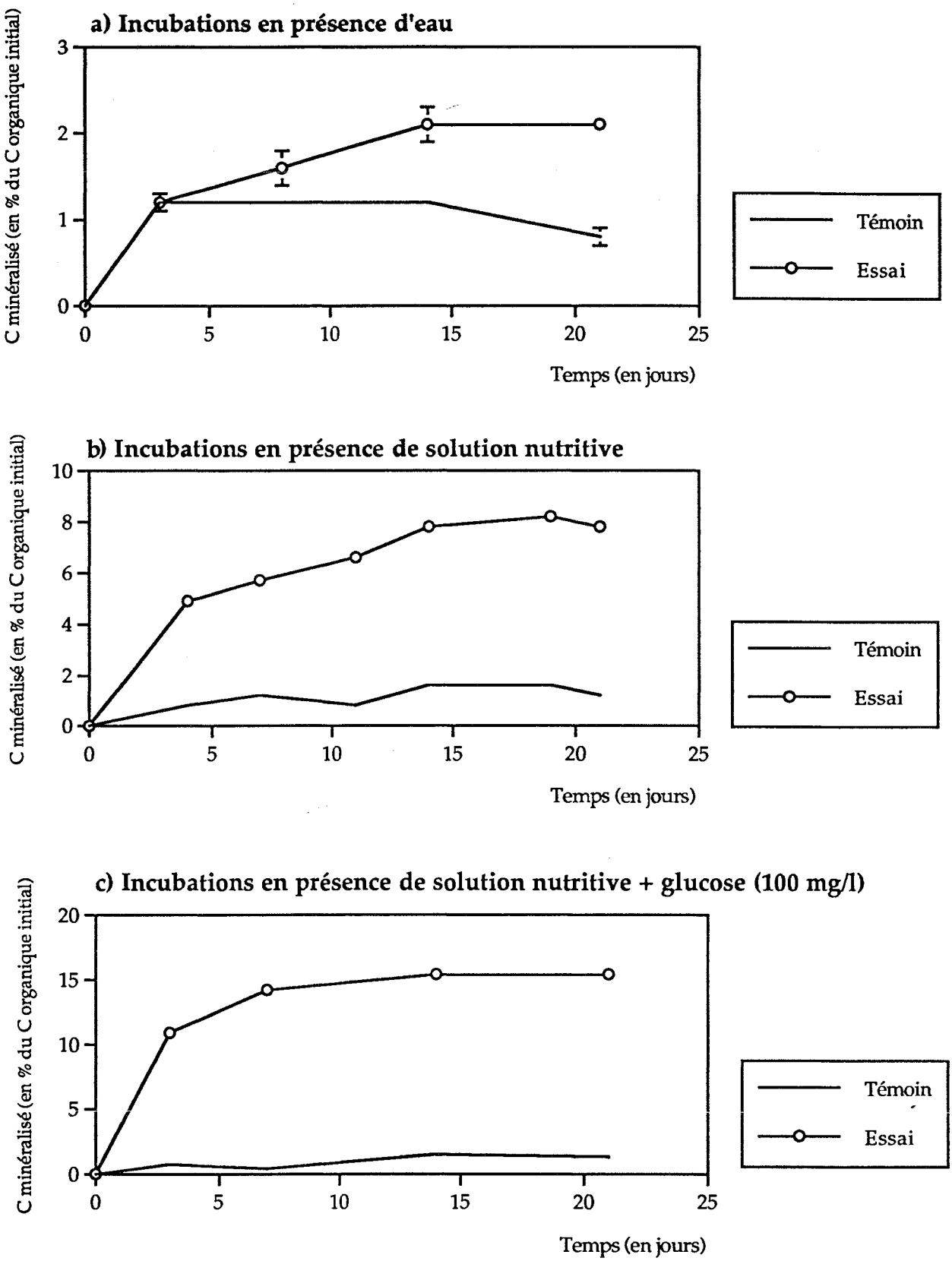


Figure 2-2 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1 incubé en aérobiose.

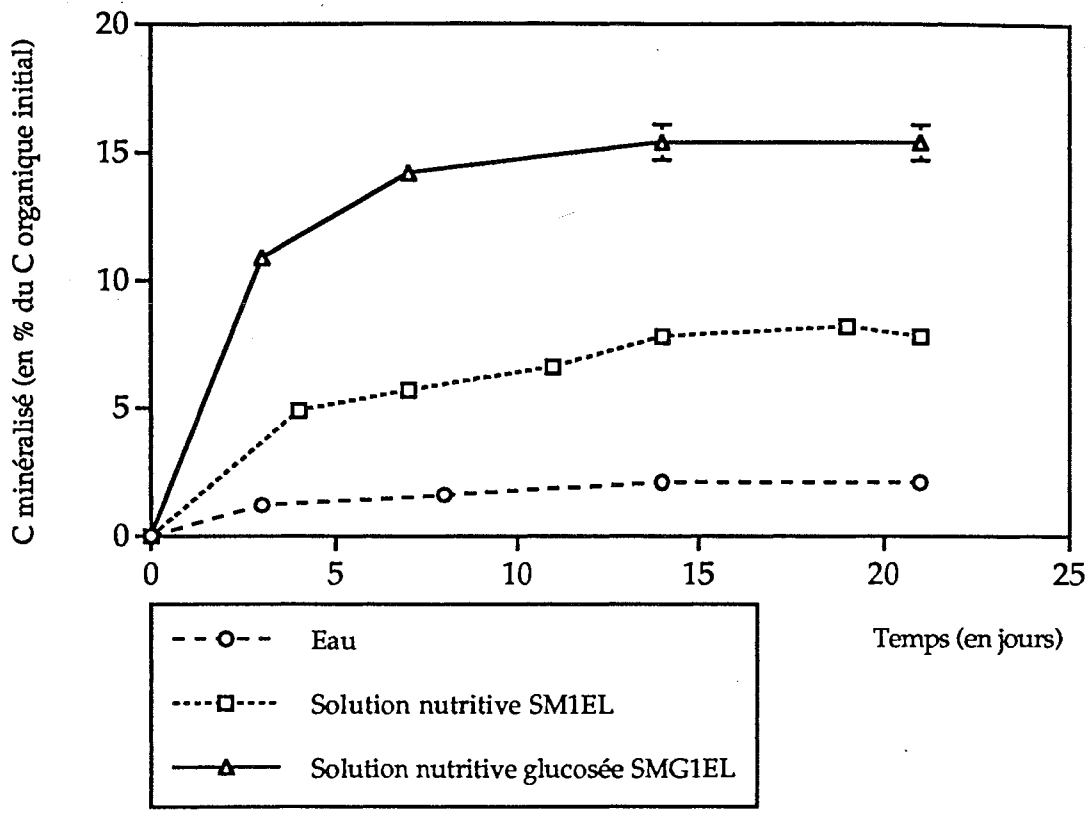


Figure 2-3 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1, mis en suspension en aérobiose, dans différentes solutions

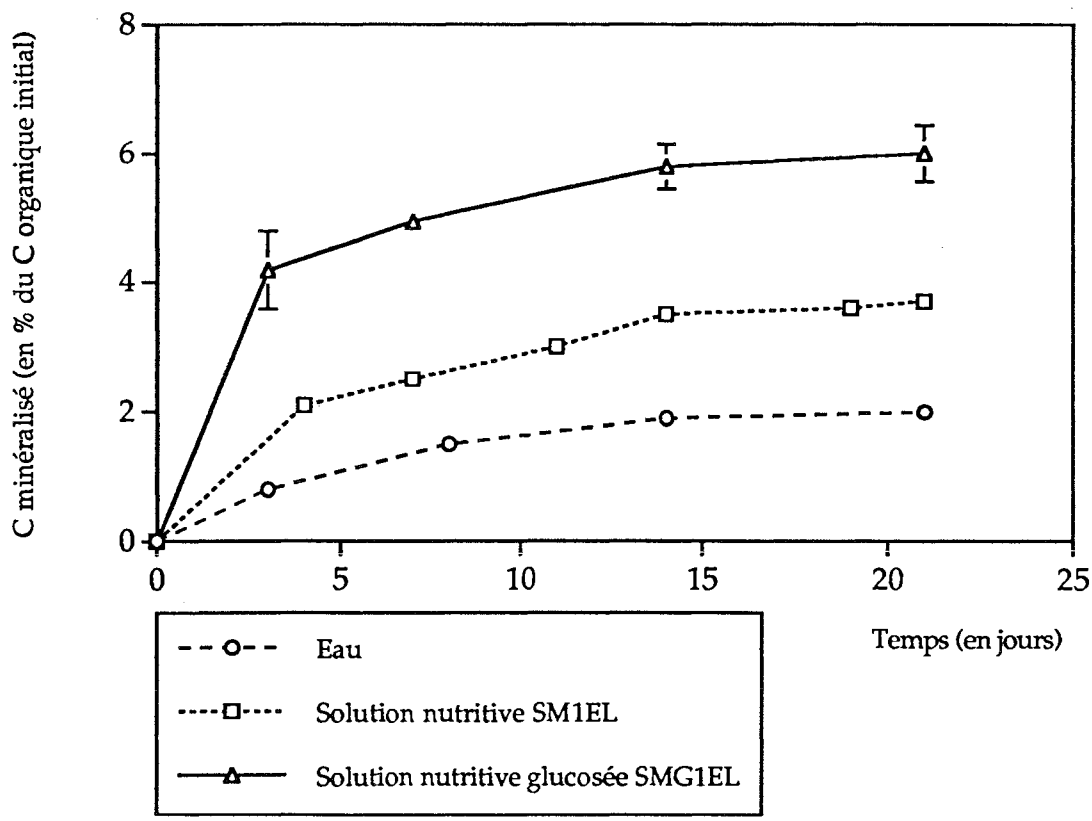


Figure 2-5 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4, mis en suspension en aérobiose, dans différentes solutions

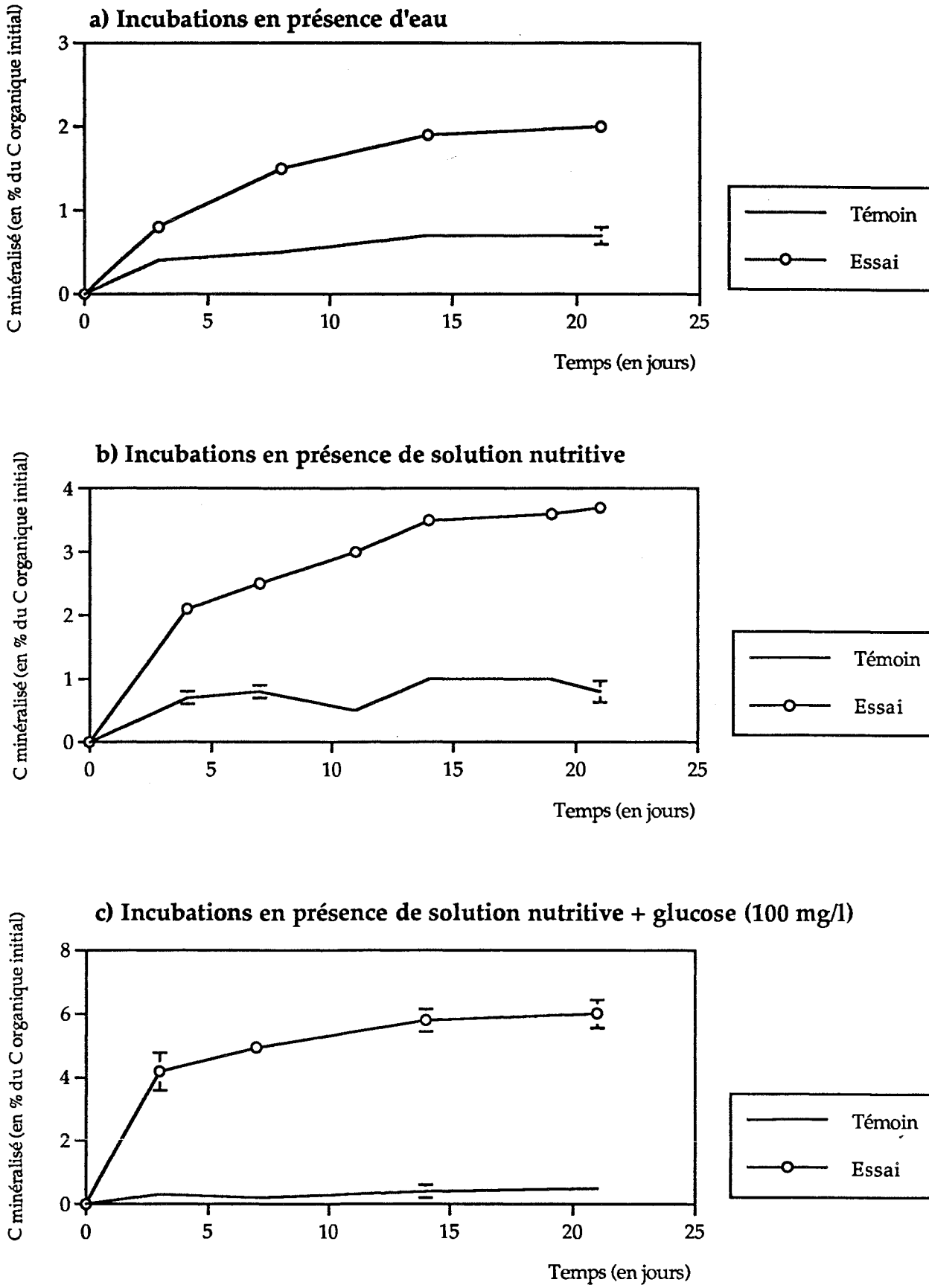


Figure 2-4 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4 incubé en aérobiose

La solution nutritive SM_1^{EL} apporte des sels minéraux ainsi que des facteurs de croissance et des oligo-éléments sous forme d'extrait de levure. L'apport en carbone de cet extrait de levure est négligeable, il n'intervient donc pas au niveau des bilans carbonés puisque sa minéralisation est équivalente à 0,1 % du carbone organique initial pour SEIG1 et à 0,06 % pour SEIG4. Il apparaît que cette solution stimule de façon significative, par rapport à l'eau, la croissance des microflores et leur activité de biodégradation puisqu'elle permet de multiplier, par 4 pour SEIG1 et par 2 pour SEIG4, les quantités de carbone minéralisé.

Dans le troisième traitement, correspondant à l'apport d'une solution de composition identique à la précédente mais enrichie en glucose, un accroissement significatif de la biodégradation est observé. En effet les quantités de carbone minéralisé atteignent 15 % pour SEIG1 et 6 % pour SEIG4 alors qu'elles étaient de 2 % dans les 2 cas en présence d'eau et respectivement de 7 % et 4 % en présence de solution nutritive. La différence de minéralisation des matières organiques relevée lors de l'utilisation des solutions SM_1^{EL} et SMG_1^{EL} est due exclusivement à l'apport de glucose car ce sucre simple est rapidement assimilable par les micro-organismes. Pour SEIG1 la minéralisation du glucose équivaut à 9 % du carbone organique initial, ceci ajouté à une minéralisation des matières organiques de l'ordre de 7 % en présence de SM_1^{EL} permet bien d'aboutir à un résultat final proche des 15 % mesurés lors d'une mise en suspension dans SMG_1^{EL}. De même, en ce qui concerne SEIG4, la minéralisation du glucose représente 2,4 % du carbone organique initial. Cette valeur cumulée aux 4 % mesurés en présence de la solution SM_1^{EL} permet d'obtenir un résultat identique à celui déterminé par les mesures en présence de SMG_1^{EL}.

L'ensemble de ces résultats indique que, pour les deux échantillons et les trois solutions nutritives, la minéralisation donc la production de CO_2 augmente respectivement de la mise en solution de l'argile dans l'eau, à l'apport de solution nutritive et à celui d'une solution nutritive enrichie en glucose.

A la fin des incubations des dosages de carbone organique sont réalisés sur l'ensemble des échantillons récoltés, tandis que des dénombrements de populations microbiennes le sont uniquement pour les argiles mis en suspension en présence de solution minérale SM_1^{EL}. En effet les résultats obtenus lors d'incubations dans l'eau et dans la solution nutritive enrichie en glucose ne font pas preuve d'un intérêt important : dans le premier cas la quantité de carbone minéralisé est faible tandis que dans le deuxième la minéralisation plus importante n'est due qu'à l'apport de glucose, ce qui ne correspond pas aux objectifs de dégradation des matières organiques des argiles alors que la stimulation observée grâce à SM_1^{EL} est tout à fait significative et intéressante.

Les dosages de carbone organique ont été effectués afin de vérifier si les incubations réalisées avaient eu un effet "mesurable" sur la teneur totale en matières organiques. Les résultats, présentés dans le tableau 2-III, ne montrent aucun changement significatif de la teneur en carbone des argiles issus des

incubations. Ceci n'est guère surprenant étant donné les faibles teneurs en carbone de ces échantillons et les limites des méthodes utilisées dues en particulier aux prises d'essais de faibles quantités (20 g) ainsi qu'à la non élimination des produits de métabolisme et des micro-organismes

Les dénombrements de populations microbiennes ont été réalisés sur différents milieux en faisant varier d'une part la concentration en éléments nutritifs (NB, NB/10, NB/100) et d'autre part la nature de la source carbonée (peptone ou acétate). L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le tableau 2-IV. En fin d'incubation les populations sont importantes quel que soit le milieu utilisé puisque pour tous les cas elles sont de l'ordre du million de cellules par gramme d'échantillon sec tandis qu'elles étaient uniquement de l'ordre de la centaine dans les échantillons initiaux. Il faut souligner l'existence d'une microflore oligotrophe abondante qui peut croître sur un milieu dilué (NB/100); Ce résultat est encourageant pour la suite des travaux car les teneurs en carbone des échantillons n'excédent pas 0,66 %. Notons également l'aptitude d'une partie des micro-organismes à utiliser l'acétate comme source de carbone ainsi que la présence d'une forte communauté se développant sur milieu PDA. Ce milieu est surtout favorable au développement des champignons mais permet également la croissance de bactéries, ce qui explique les chiffres élevés relevés. Par la suite, il sera utile d'ajouter un antibiotique lors de la réalisation du milieu PDA afin de s'assurer que seule la microflore fongique sera réellement dénombrée.

Ces travaux préliminaires ont permis de constater que la mise en suspension des argiles stimule une activité microbienne endogène se traduisant globalement par une production de CO_2 correspondant à la biodégradation des matières organiques. Une minéralisation intéressante a pu être obtenue lors d'essais effectués en aérobiose et en présence d'une solution nutritive.

III-3 Influence de l'anaérobiose

La dégradation des matières organiques peut aussi se produire en anaérobiose par utilisation d'accepteurs d'électrons autres que l'oxygène. Des études en anaérobiose correspondent à la mise en évidence de la minéralisation des matières organiques par des microflores hétérotrophes anaérobies ou aéro-anaérobies. Dans ces conditions les micro-organismes utilisent les composés carbonés comme source de carbone et d'énergie et des accepteurs finaux d'électrons (respiration anaérobie) tels que les nitrates (bactéries dénitrifiantes), le manganèse (bactéries manganiques) ou le fer ferrique (bactéries ferri-réductrices).

En conséquence de quoi, l'étude de l'activité minéralisatrice des microflores anaérobies (ou aéro-anaérobies) est réalisée par la mise en suspension des échantillons SEIG1 et SEIG4 dans trois solutions différentes, à savoir : dans l'eau, dans une solution nutritive SM_1^{EL} apportant des éléments minéraux, dans une solution nutritive SM_2^{EL} différant de la précédente par l'apport d'azote sous forme de nitrate de potassium.

Tableau 2-III : Teneurs en carbone organique des échantillons après divers traitements.

	Référence	Témoin	Eau	$S.M_1^{EL}$	$S.M.G_1^{EL}$
SEIG1 C organique (en %)	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13
SEIG4 C organique (en %)	0,42	0,43	0,41	0,46	0,45

Référence : échantillons n'ayant subit aucun traitement
Témoin : échantillons issus des témoins stérilisés par autoclavage
Eau : échantillons issus des incubations en présence d'eau
$S.M_1^{EL}$: échantillons issus des incubations en présence de solution nutritive $S.M_1^{EL}$
$S.M.G_1^{EL}$: échantillons issus des incubations en présence de solution nutritive glucosée $S.M.G_1^{EL}$

Tableau 2-IV : Dénombrements des populations microbiennes hétérotrophes présentes en fin d'incubation des argiles SEIG1 et SEIG4, en aérobiose et en présence de solution nutritive $S.M_1^{EL}$.

	NB	NB/10	NB/100	Acétate	PDA
SEIG 1	$50,4 .10^6$	$32,7 .10^6$	$2,8 .10^6$	$3,6 .10^6$	$1,6 .10^6$
SEIG 4	$74,9 .10^6$	$64,6 .10^6$	$9,1 .10^6$	$6,9 .10^6$	$12,2 .10^6$

Résultats exprimés en UFC par gramme d'échantillon sec.

Les figures 2-6 et 2-8 présentent les dégagements de CO_2 donc la minéralisation des matières organiques sous des conditions anoxiques (mise sous azote des flacons d'incubation) pour les deux échantillons utilisés.

Dans cette étude, comme dans la précédente, un faible dégagement de CO_2 se manifeste dans les témoins abiotiques. L'hypothèse d'une libération de CO_2 par dégazage des suspensions, donc sous l'influence de processus physico-chimiques, au cours des trois premiers jours d'incubation semble se vérifier. Mais là encore ces phénomènes sont de faible amplitude.

En ce qui concerne les essais biotiques, les quantités de carbone minéralisé sont faibles puisqu'elles n'excèdent pas 3% dans le meilleur des cas, mais elles sont cependant supérieures aux phénomènes chimiques précédemment mentionnés.

Les résultats présentés par les figures 2-6 à 2-9 sont à rapprocher de ceux correspondants aux dosages de fer ferreux, de nitrates et de nitrites effectués tout au long des incubations. Aucune activité ferri-réductrice n'a pu être mise en évidence pour l'ensemble des traitements envisagés, de ce fait aucun tableau ne rapporte ces résultats. Les valeurs relatives aux dosages de nitrates et de nitrites sont regroupés dans le tableau 2-V.

Pour SEIG1, aucune différence n'est notable entre les quantités de carbone minéralisé lors d'une mise en suspension dans l'eau ou dans la solution nutritive SM_1^{EL}, le maximum atteint est seulement de 1,5 %. L'apport d'éléments minéraux ne modifie pas significativement le dégagement de CO_2. Les dosages semi quantitatifs de Fe^{2+} n'indiquent aucune apparition de cet élément pour les témoins abiotiques comme pour les essais biotiques, la microflore qui s'est développée ne présente donc pas d'activité ferri-réductrice. Par contre des incubations dans la solution nutritive nitratée SM_2^{EL} permettent d'obtenir des pourcentages de minéralisation de l'ordre de 3, ce qui reste modeste mais représente quand même le double de ceux observés dans les deux autres cas. La présence de nitrates est donc favorable à l'action des bactéries anaérobies ou aéro-anaérobies capables de dégrader les matières organiques. L'existence de ces bactéries dénitrifiantes aptes à transformer les nitrates est vérifiée puisqu'il y a apparition de nitrites dès le troisième jour d'incubation. Les résultat sont semi-quantitatifs car les dosages ont été effectués en estimant les teneurs en nitrites par des colorations de bandelettes indicatrices. Cependant il est certain que cette dénitrification est due à une activité bactérienne car il n'y a pas d'apparition de nitrites dans les témoins stériles. Enfin il faut remarquer que la réduction n'est pas complète car les dosages indiquent que la totalité des nitrates ne disparaît pas au profit d'une accumulation de nitrites ou d'un dégagement d'azote. Cette limitation peut être due à l'absence de bactéries assurant une dénitrification totale ou à une insuffisance de source de carbone et d'énergie.

Des conclusions semblables sont obtenues avec SEIG4 à la différence que pour cet échantillon la solution SM_1^{EL} permet d'obtenir une minéralisation un peu plus forte que lors des incubations d'argiles en suspension dans l'eau seule.

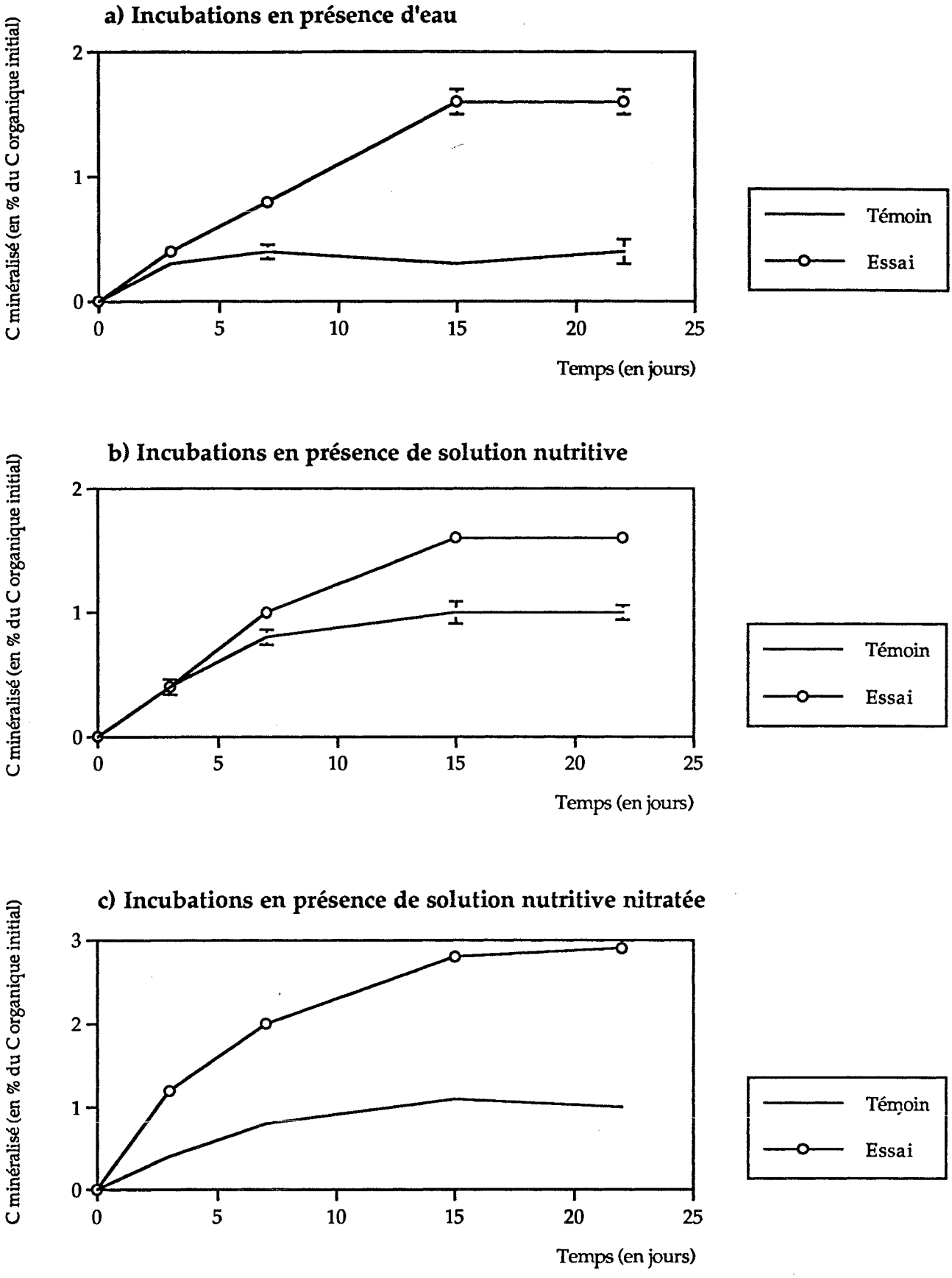


Figure 2-6 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1 incubé en anaérobiose.

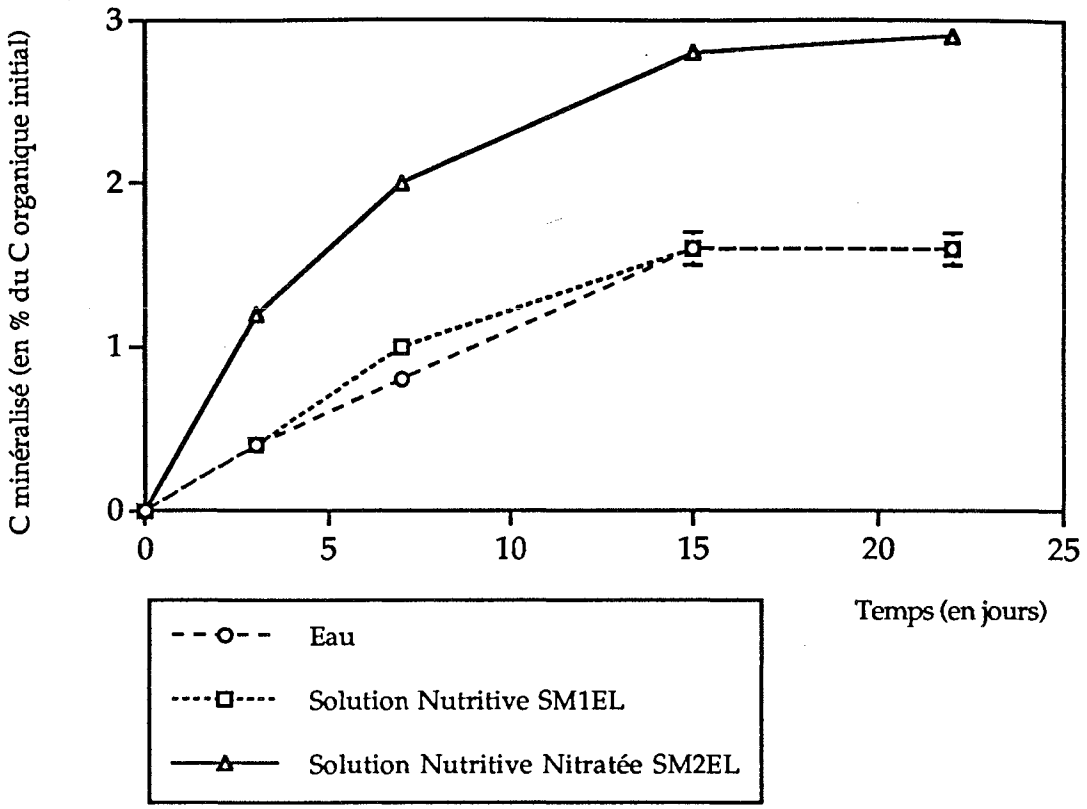


Figure 2-7 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1 incubé, en anaérobiose, dans différentes solutions

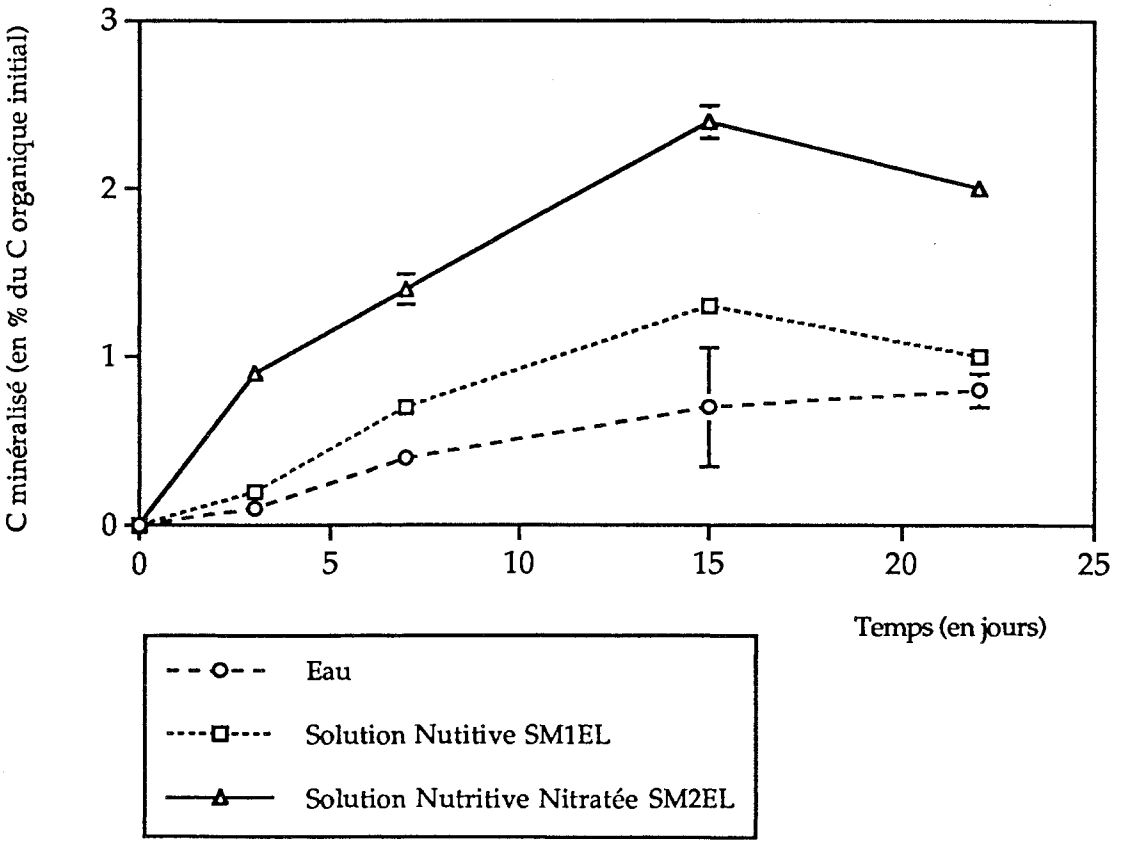


Figure 2-9 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4 incubé, en anaérobiose, dans différentes solutions

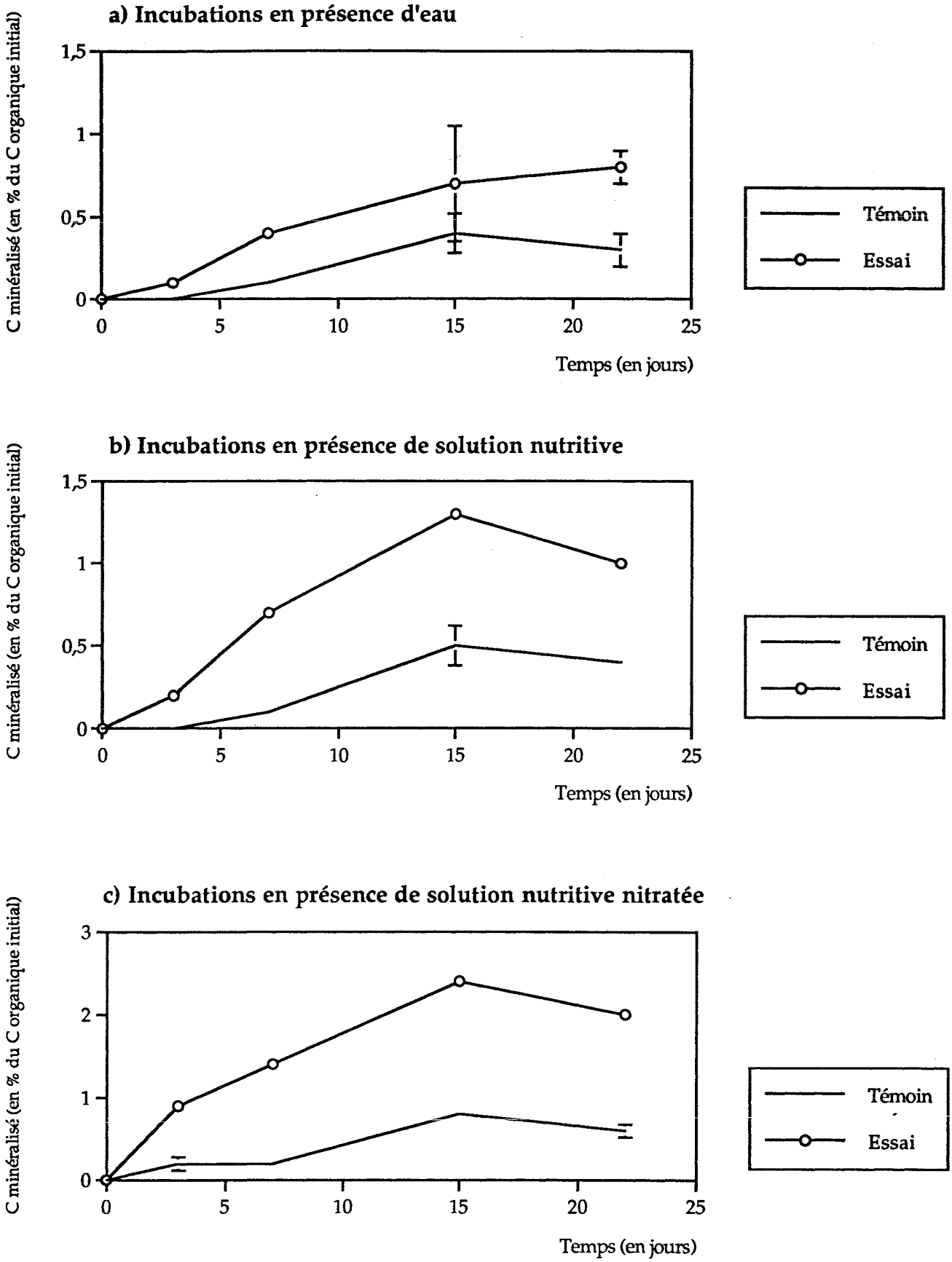


Figure 2-8 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4 incubé en anaérobiose.

Les résultats des numérations effectuées en fin d'incubation sont présentés dans le tableau 2-VI.

Pour les deux échantillons, les populations dénombrées sur NB sont importantes puisqu'elles sont de l'ordre du million de cellules par gramme d'échantillon sec, mais leur présence ne se traduit pas par de forts dégagements de CO_2. Il est donc possible que les bactéries présentes où les conditions de cultures qui leurs sont imposées ne soient pas adaptées à la dégradation des substances humiques.

Le milieu de Bromfield "fer" permet de mettre en évidence les bactéries ferri-réductrices par formation d'une auréole translucide de dissolution des oxydes de fer rouges autour des colonies. Pour SEIG1 aucune croissance n'est obtenue sur ce type de milieu, ce qui correspond aux résultats des dosages de Fe^{2+} effectués. Par contre il n'en n'est pas de même pour SEIG4 car une croissance relativement importante peut être observée. Pourtant il ne s'agit pas nécessairement de bactéries ferri-réductrices car aucune zone claire caractéristique de la réduction du fer ferrique n'apparaît.

En revanche les résultats concernant les numérations effectuées sur milieu Bromfield nitrate sont surprenants surtout pour SEIG1. En effet, dans ce cas, aucune colonie n'est apparue sur les boites alors que les dosages avaient mis en évidence une réduction de nitrates en nitrites. Cette absence de croissance peut être due à l'absence de source de carbone et d'énergie utilisable par les bactéries dénitrifiantes présentes dans ce milieu, le glucose n'étant pas le substrat qui leur conviendrait le mieux. Mais il peut également s'agir de dilutions ou d'étalements mal effectués ou encore de mauvaises conditions d'incubation dues à une anaérobiose insuffisante.

Les essais réalisés dans cette partie de l'étude visaient à favoriser le développement des microflores anaérobies (ou aéro-anaérobies), mais les activités minéralisatrices constatées se sont révélées assez faibles et peu intéressantes vis à vis de l'objectif recherché. En effet, comparativement aux dispositifs aérés, les taux de minéralisation sont beaucoup plus faibles

III-4 Optimisation des paramètres de biodégradation

Différents paramètres liés aux conditions nutritionnelles, énergétiques ainsi qu'aux facteurs physico-chimiques du milieu ont été étudiés afin d'améliorer l'aptitude des microflores autochtones à la biodégradation des matières organiques associées aux argiles. Dans les premières expériences les résultats les plus remarquables ont été obtenus lors d'une mise en suspension des échantillons à 28 °C dans une solution nutritive et en présence d'oxygène. Il s'agit maintenant d'optimiser ce système de biodégradation en précisant le rôle des principaux paramètres impliqués qui peuvent être maitrisés.

Tableau 2-V : Activité dénitrifiante : dosage des nitrates et nitrites.

Temps (en jours)	T0		T3		T7		T15		T22	
	NO_3^-	NO_2^-	NO_3^-	NO_2^-	NO_3^-	NO_2^-	NO_3^-	NO_2^-	NO_3^-	NO_2^-
SEIG1 Témoin	500	0	500	0	500	0	500	0	500	0
SEIG1 Essai dans SM_2EL	500	0	500 à 250	+	500 à 250	+	500 à 250	+	500 à 250	+
SEIG4 Témoin	500	0	500	0	500	0	500	0	500	0
SEIG4 Essai dans SM_2EL	500	0	500 à 250	+	500 à 250	+	500 à 250	+	500 à 250	+

Pour les nitrates les résultats sont exprimés en ppm de NO_3^-.
Pour les nitrites, les résultats sont obtenus par estimation d'une coloration dans une gamme allant de 0 (absence de coloration) à ++ (coloration soutenue).

Tableau 2-VI : Dénombrements des communautés bactériennes présentes en fin d'incubations anaérobies.

Milieux	NB	Bromfield fer	Bromfield nitrate
SEIG 1	$1{,}3 . 10^6$	0	0
SEIG 4	$1{,}6 . 10^6$	$10{,}5 . 10^3$	$2{,}1 . 10^3$

Résultats exprimés en UFC par gramme d'échantillon sec.

III-4-1 Apports d'oligo-éléments et de facteurs de croissance

Un des paramètres étudié concerne la disponibilité réelle des éléments minéraux et des facteurs de croissance, apportés par la solution nutritive, nécessaires aux microflores présentes pour assurer une bonne biodégradation des matières organiques. Cet aspect nécessite une bonne connaissance et une bonne maîtrise de la composition des solutions nutritives. L'extrait de levure contenu dans SM_1^{EL} apporte au milieu des facteurs de croissance et des oligo-éléments mais sa composition est mal connue. De ce fait son influence sur l'activité biodégradante a été déterminée par différence en l'ajoutant ou non à une solution nutritive élémentaire simple.

Pour cela l'échantillon SEIG4 est mis en incubation dans deux solutions nutritives : la première (SM_1^{EL}) contenant des sels minéraux et de l'extrait de levure, la seconde (SM) ne contenant que des éléments minéraux.

La figure 2-10 permet d'observer que la présence d'extrait de levure ne favorise pas sensiblement la minéralisation des matières organiques. Ce résultat peut sembler surprenant mais il ne signifie pas pour autant que les oligo-éléments et les facteurs de croissance qu'il apporte sont inutiles. On peut en effet supposer que les oligo-éléments, nécessaires à l'état de traces, sont présents dans les produits utilisés pour préparer les milieux de culture, sur les surfaces des dispositifs utilisés et dans les argiles elles même.

Les dénombrements effectués en fin d'incubation sont présentés par le tableau 2-VII. Ils ont été réalisés sur deux milieux permettant de distinguer les organismes mésotrophes, dénombrés sur milieu NB/10, des organismes oligotrophes comptés sur milieu NB dilué (NB/100). Aucune différence n'est observée entre les peuplements provenants de culture en présence ou en absence d'extrait de levure que ce soit pour le nombre de colonies ou pour l'aspect de ces colonies. Cette dernière remarque étant surtout valable pour le milieu NB/10 sur lequel, dans les deux cas, trois types de colonies sont préférentiellement retrouvés. En revanche, et pour les deux cas envisagés, le nombre de cellules se développant sur milieu oligotrophe est environ dix fois plus faible qu'en conditions mésotrophes.

L'ajout d'extrait de levure dans la solution nutritive n'est pas nécessaire pour favoriser la biodégradation des matières organiques sans doute parce que les organismes présents sont oligotrophes et que certains des composés que cet extrait contient, tels que les oligo-éléments, sont en réalité déjà présents dans le milieu à l'état de traces (produits chimiques, surface des dispositifs, argiles elles mêmes).

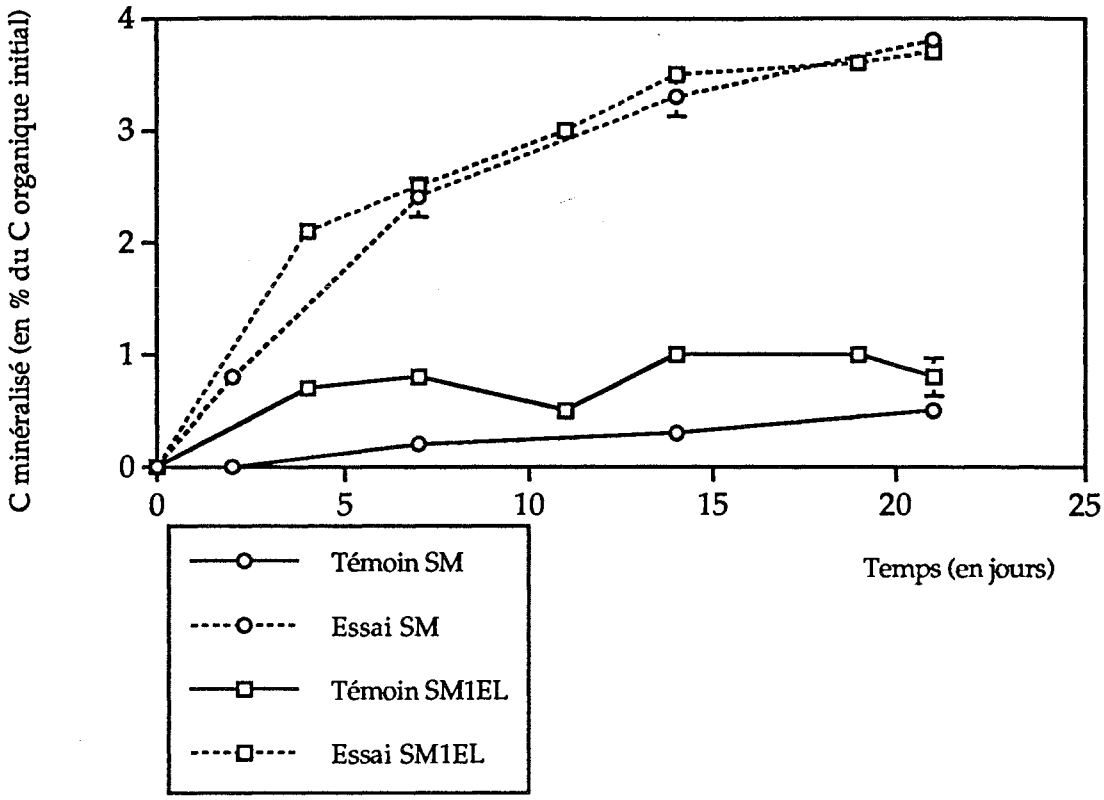


Figure 2-10 : Influence d'un apport d'extrait de levure (EL) sur la minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4 incubé en aérobiose

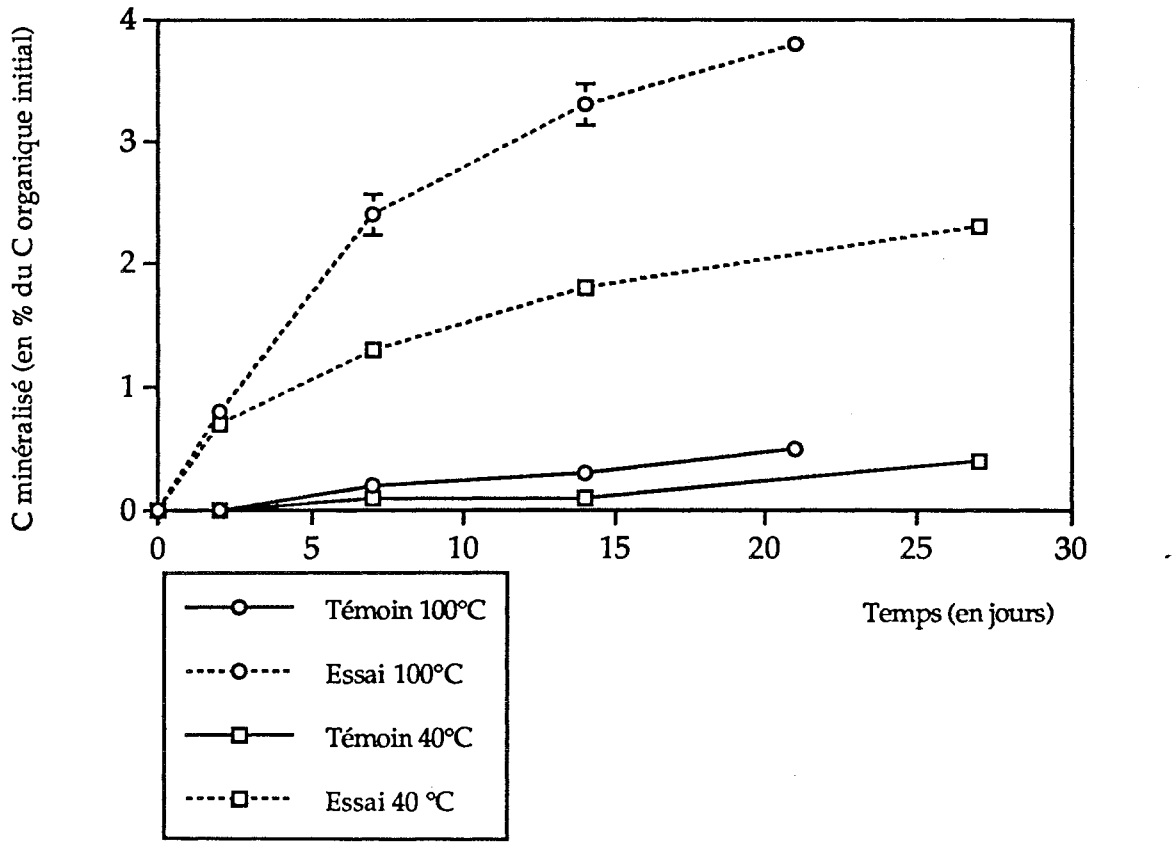


Figure 2-11 : Influence de la température de séchage de l'échantillon SEIG4 sur la minéralisation du carbone organique lors d'incubations en aérobiose

Tableau 2-VII: Dénombrements des peuplements microbiens hétérotrophes présents dans l'échantillon SEIG4 préalablement séché à 100°C lors de la préparation des échantillons

	NB/10	NB/100
échantillon initial	300	0
échantillon après 21 jours d'incubation, en aérobiose, dans SM_1^{EL}	$64,6 .10^6$	$9,1 .10^6$
échantillon après 21 jours d'incubation, en aérobiose, dans SM	$77 .10^6$	$6,5 .10^6$

Résultats exprimés en UFC par gramme d'échantillon sec.

Tableau 2-VIII : Dénombrements des peuplements microbiens hétérotrophes présents dans l'échantillon SEIG4 séché à 40°C.

	NB	NB/100	AA	PDA
échantillon initial	$2,8 .10^6$	$1,8 .10^5$	$5 .10^6$	1 000
échantillon après 21 jours d'incubation dans SM	$51,8 .10^6$	$7,9 .10^6$	$42 .10^6$	3 500

Résultats exprimés en UFC par gramme d'échantillon sec.

III-4-2 Effet du séchage des argiles

L'étude de ce paramètre est suggérée par les résultats des dénombrements réalisés sur les échantillons initiaux présentés au tout début de ce chapitre. Le nombre de micro-organismes s'était, en effet, révélé étonnement faible, ce qui laissait à penser que les argiles avaient subi des traitements gênants pour la survie des micro-organismes. Ce qui, par la suite s'est révélé exact car nous avons appris que les argiles avaient été séchées à 100°C. Suite à cette remarque, quelques échantillons séchés à 40°C ont été utilisés afin d'évaluer l'activité minéralisatrice d'une microflore non perturbée par un traitement thermique.

La figure 2-11 présente les résultats de minéralisation du carbone organique, sous l'influence de la microflore autochtone, pour l'échantillon SEIG4 séché soit à 100°C soit à 40°C. Dans les conditions adoptées il apparaît que la microflore présente dans l'argile séchée à 100°C, donc qui a été fortement perturbée, permet d'obtenir une meilleure minéralisation que la microflore de cette même argile mais séchée à 40°C. En effet dans le premier cas une minéralisation de 3,6 % du carbone organique initial est obtenue après 20 jours tandis que pour les argiles séchées à 40°C cette minéralisation n'excède pas 2,1 %.

Pourtant la microflore initiale de l'échantillon SEIG4 séché à 40°C (tableau 2-VIII) est importante et diversifiée puisqu'elle est composée de bactéries, d'actinomycètes et de champignons. De plus cette microflore est active tout au long des 21 jours d'incubation puisqu'une production de CO_2 peut être mesurée et que les numérations effectuées après cette incubation montrent des peuplements équivalents à ceux obtenus avec SEIG4 séché à 100°C. La seule différence réside essentiellement dans la variété des types de colonies observées avec l'échantillon séché à 40°C. En effet si les trois types de colonies mis en évidence à partir de SEIG4 séché à 100°C sont bien présents, de nombreuses colonies d'aspects différents peuvent également être observées.

Il apparaît donc que la microflore des échantillons réhumidifiés, après avoir subi un traitement favorisant certainement une stérilisation partielle par chauffage à température élevée, est modifiée et acquiert des caractéristiques différentes de celles qu'elle possédait auparavant. Ces modifications se traduisent par un changement des peuplements qui dans les conditions adoptées dégradent plus efficacement les matières organiques. Après avoir observé ce même genre de phénomène, Bottner (1985) pense que la biomasse tuée par le chauffage correspond à une biomasse "active" se développant de préférence sur les substrats carbonés aisément métabolisables, tandis que la population survivante, qui jusqu'alors était plutôt dormante et protégée, est, quant à elle, capable d'utiliser plus facilement les matières organiques humifiées.

Cet ensemble de données permet également de souligner, comme cela a été remarqué par d'autres auteurs (Mc Keague *et al.*, 1986) qu'il ne faut pas confondre activité microbienne et densité de la microflore. Pour preuve les populations microbiennes présentes dans l'échantillon SEIG4 séché à 40°C sont importantes mais leur présence ne se traduit pas par de forts dégagements de CO_2. Les micro-

organismes qui ont pu résister à une température de 100°C, soit en sporulant soit parce qu'ils étaient protégés, car plus ou moins intimement associés à des particules d'argile, semblent être les plus adaptés à la biodégradation des matières organiques.

Ces expériences réalisées dans le but d'obtenir une meilleure biodégradation grâce à une microflore initiale plus importante, plus diversifiée et non perturbée par un choc thermique ont conduit à des résultats inattendus et d'un grand intérêt. Ils ont permis de constater que les expériences réalisées précédemment se sont déroulées dans de bonnes conditions puisque ce sont des échantillons séchés à 100°C renfermant des microflores potentiellement très actives qui ont été utilisés.

III-4-3 Disponibilité des nutriments minéraux

Afin d'étudier la disponibilité des sels minéraux de la solution nutritive SM vis à vis des micro-organismes, le dosage des éléments apportés a été effectué dans différentes conditions. Quatre traitements ont été envisagés en utilisant l'échantillon SEIG4 séché à 100 °C :

- **(1)** : la solution nutritive seule est placée 24 heures en flacon sérum afin d'estimer la fixation des composés minéraux sur le verre.

- **(2)**: l'échantillon d'argile autoclavé (conditions abiotiques) est mis en suspension dans la solution pendant 24 heures afin d'estimer la part des éléments minéraux qui s'adsorbe sur l'argile.

- **(3)** : l'échantillon d'argile autoclavé (conditions abiotiques) est mis en suspension dans la solution pendant 28 jours afin d'observer une éventuelle évolution dans le temps.

- **(4)** : l'échantillon d'argile est mis en suspension pendant 28 jours, en conditions biotiques, dans la solution afin d'estimer la nature et la teneur des éléments minéraux.

Les résultats présentés dans le tableau 2-IX indiquent que :

- certains éléments minéraux présents dans la solution s'adsorbent sur le verre (traitement **1**). En effet, pour les ions K, Mg et P, les quantités dosées en solution après 24 heures ne représentent plus que la moitié de celles apportées initialement.

- aucune différence importante ne peut être relevée entre les valeurs obtenues dans les traitements **2, 3 et 4** et ceci pour les quatre éléments dosés. Ces traitements ont en commun la présence d'argile. Les traitements **2** et **3** diffèrent par le temps de contact et les traitements **3** et **4** par la présence ou l'absence d'activité microbienne.

Tableau 2-IX : Concentrations des éléments minéraux en solution dans les divers traitements lors de l'incubation de l'argile SEIG4 en présence de la solution nutritive SM.

	K (ppm)	Mg (ppm)	P (ppm)	N (ppm)
Solution initiale **SM**	126	10	100	100
(1) SM seule après 24 H	47,1	5,7	54,9	80 à 120
(2) ech autoclavé + SM après 24 H	14,5	23,2	18,9	25 à 45
(3) ech autoclavé + SM après 28 j	15,1	23,4	18,3	25 à 45
(4) ech + SM après 28 jours d'incubation	14,8	23,0	19,3	25 à 45

La différence entre le traitement **1** et le traitement **2** peut s'expliquer par la présence d'argiles. En effet les particules d'argile possèdent une charge électrique qui se manifeste essentiellement lorsqu'elles sont en suspension dans l'eau. Cette charge variable avec le pH de la suspension a son origine dans le comportement des groupements fonctionnels de bordure. Dans la kaolinite la maille est électriquement neutre et la charge fixe est nulle (annexe 6), la seule charge importante est due à l'ionisation des groupements fonctionnels de bordure (Si-OH). Cette charge, répartie sur l'ensemble de la surface des particules, leur permet de fixer temporairement des ions (cations et anions). Ces ions restent facilement disponibles et passent aisément dans la solution du sol par échange avec d'autres ions présents dans cette solution, d'où la notion de capacité d'échange. Il est possible de distinguer la capacité d'échange cationique et la capacité d'échange anionique. L'une et l'autre sont sous la dépendance de la nature des échangeurs en cause, de leur proportion et des conditions de milieu (en particulier le pH) (Chamayou et Legros, 1989).

Les composés humiques jouent également un rôle au niveau de l'échange car ils possèdent des groupes fonctionnels acides (-COOH) et alcools (-OH) qui s'ionisent et peuvent fixer plus ou moins fortement des cations. La capacité d'échange de cations des acides organiques est élevée mais la fixation des composés humiques sur l'argile pour former le complexe argilo-humique monopolise une partie de leurs groupements fonctionnels. L'ionisation des groupes acides et alcools augmente avec le pH.

Ceci permet d'aborder le concept de complexe adsorbant. On désigne par cette expression l'ensemble des constituants du sol ayant des propriétés d'échange (composés humiques et argiles).

Dans le traitement **2** l'échantillon a été autoclavé, il est donc certain que les pertes notables au niveau de trois des quatre ions dosés ne sont pas dues à une activité microbienne mais a une adsorption sur l'argile. La nature même de l'échantillon implique que les particules ne sont pas inertes vis-à-vis des éléments minéraux apportés. En milieu légèrement acide, le pH des solutions étant égal à 6,55, les groupes silanol (-Si-OH), acide (-COOH) et alcool (-OH) sont ionisés. Les cations K^+ et NH_4^+ ont donc été fixés sur le kaolin, soit directement soit par échange avec Mg^{++} puisque les concentrations respectives de ces ions dans la solution ont diminué pour K^+ et NH_4^+ et augmenté pour Mg^{++}.

Les argiles possèdent également une capacité d'échange d'anions. Ceux ci sont adsorbés sur les surfaces à charges positives (bordures aluminiques ou couverture d'hydroxyde d'aluminium) mais aussi dans le nuage d'ions de la couche double diffuse. Ces phénomènes expliquent l'adsorption des ions PO_4^{3-} et donc leur faible concentration en solution en présence de l'échantillon d'argile SEIG4.

Les résultats obtenus dans le traitement **3** sont comparables à ceux précédemment décrits. Il semble donc qu'un équilibre se soit installé dans la répartition des ions entre la solution et les particules d'argile, ceci en moins de 24 heures (traitement **2**) et que cet équilibre soit stable puisqu'après 28 jours il n'y a aucune variation des concentrations ioniques.

La présence d'une microflore active pourrait entraîner des fluctuations de pH, résultant de l'activité métabolique des micro-organismes. Ces changements pourraient modifier la charge des particules d'argile et de ce fait influer sur l'adsorption des ions. Mais de telles variations n'ont pas été observées car l'argile a joué un rôle tampon et le pH a été maintenu à un niveau assez constant : pH initial = 6,55 et pH final = 6,65.

Les différences pouvant être relevées entre les concentrations ioniques du traitement **3** (en absence d'activité biologique) et celles du traitement **4** (en conditions biotiques) sont de très faibles amplitudes et voir même inexistantes. Sachant, comme l'ont montré les résultats précédents, que l'apport de sels minéraux est bénéfique au développement et à l'activité microbienne, deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la constance des teneurs entre les traitements **3** et **4** :

- soit, lorsque la solution du sol s'appauvrit en éléments minéraux, suite à leur utilisation par les micro-organismes, le complexe absorbant libère des ions pour rétablir l'équilibre avec son environnement aqueux. Ce phénomène d'échange et d'équilibre se manifeste régulièrement puisqu'il entre en jeu dans les régulations de pH contribuant au pouvoir tampon des argiles.

- soit, sur 28 jours, la consommation des ions en solution, par la microflore active, génère uniquement de très faibles variations de concentration. De ce fait elles pourraient ne pas être décelables par les méthodes d'analyses utilisées

Les éléments minéraux présents dans les solutions nutritives utilisées dans ces expériences se fixent de façon importante sur le verre des flacons tout comme ils s'adsorbent sur les particules d'argile. En effet dans les deux cas ces éléments minéraux sont mis en présence de composés chargés électriquement (la silice des flacons de verre et de l'argile, les composés humiques). Malgré tout, un pourcentage limité mais largement suffisant pour couvrir les besoins nutritionnels reste en solution, à la disponibilité des micro-organismes.

III-4-4 Amélioration des conditions d'oxygénation

Comme l'ont montré les premiers résultats l'aération semble favorable à la biodégradation des matières organiques par les microflores autochtones des argiles. Il est donc nécessaire que l'oxygène présent dans les systèmes soit le plus accessible possible aux micro-organismes impliqués.

Pour cela des incubations sont réalisées avec l'argile MOMB3, pour lesquelles sont étudiés d'une part le rapport quantité d'argile/solution minérale (densité de pulpe) et d'autre part l'application ou non d'une agitation favorable aux échanges gazeux. Cet ensemble de traitements permet d'étudier diverses conditions d'oxygénation.

La figure 2-12 présente les pourcentages de carbone organique minéralisé en fonction du temps de réaction en effectuant une distinction entre les différentes densités de pulpes envisagées. Pour chacune de ces pulpes une comparaison est établie entre les résultats obtenus en présence ou en absence d'agitation afin de pouvoir juger de l'intérêt de celle ci.

Pour les deux traitements où les pulpes sont soit très concentrées (50 % d'argile) soit très diluées (25 % d'argile), aucune différence de minéralisation n'apparaît que les flacons soient ou non agités. Pour la pulpe la plus concentrée, ceci s'explique par la consistance très pâteuse des suspensions. La texture compacte de cette pâte a donc totalement annulé l'effet potentiel de l'agitation. Pour les pulpes à 25 % d'argile la quantité de solution minérale ajoutée est importante (60 ml) et de ce fait une bonne partie de celle ci n'a pas été mélangée à l'argile, une couche superficielle s'est formée sur l'échantillon et n'a pas été réellement brassée par l'agitation.

Le cas (c) présenté par la figure 2-12, correspondant à des pulpes à 29 % d'argile, est le seul pour lequel une différence significative est observée entre les essais en dispositifs agités et les essais immobiles. En effet les pourcentages de carbone minéralisé déterminés pour les dispositifs agités sont supérieurs à ceux relatifs aux dispositifs immobiles Cette différence qui se manifestait déjà pour la pulpe à 33 % d'argile est statistiquement significative pour celle à 29%.

La densité des communautés microbiennes présentes en fin d'incubation a été déterminée et est présentée par le tableau 2-X. Les résultats indiquent que pour l'ensemble des cas il y a des développements bactériens importants et variés puisqu'on retrouve des bactéries mésotrophes et oligotrophes ainsi que des actinomycètes. En revanche les champignons sont peu nombreux ou inexistants. Ils doivent se développer plus difficilement que les bactéries dans ces pâtes argileuses. Leur absence peut également être due à un mode d'ensemencement ne leur convenant pas.

Les différences notées au sujet des dégagements de CO_2 (reflet de la biodégradation) ne dépendent donc pas de la nature et de la quantité de micro-organismes présents mais de l'activité de ces micro-organismes. Cette activité étant étroitement liée aux conditions environnementales c'est-à-dire, entre autre, dans le cas présent à la disponibilité de l'oxygène dans les milieux.

Remarque : le tableau 2-X ne contient pas de résultats relatifs aux pulpes à 50 % d'argile car leur texture n'ont pas permis d'avoir des prises d'essais fiables pour les numérations.

Ces résultats montrent donc que l'agitation des pulpes peut influencer favorablement la minéralisation de la matière organique par les microflores autochtones. Mais il y a lieu maintenant de déterminer si la teneur des pulpes en argile intervient aussi significativement. La figure 2-13 rassemble les résultats obtenus au cours d'expériences de minéralisation avec différentes densités de pulpes.

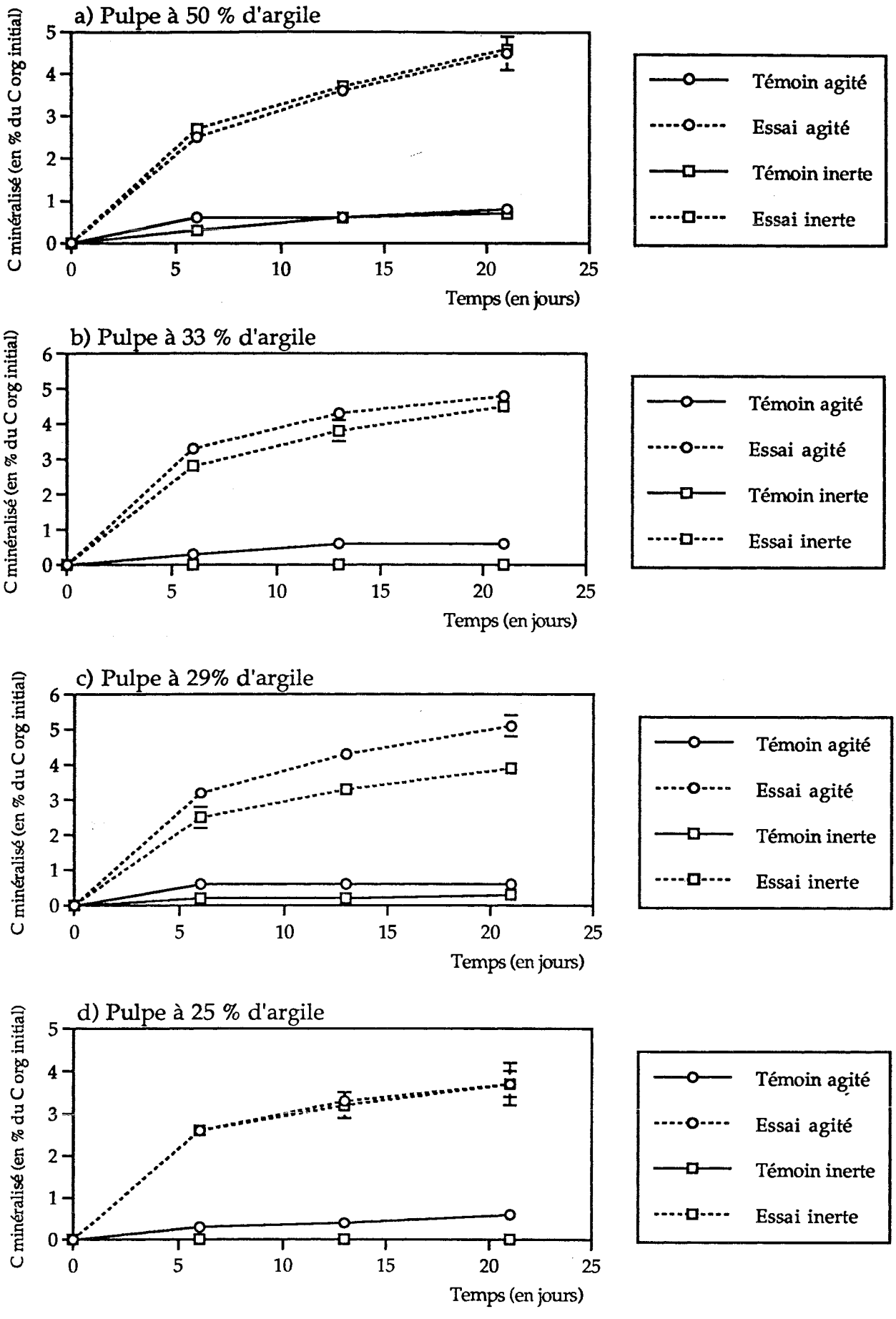


Figure 2-12 : Influence de l'agitation sur la minéralisation du carbone organique de l'échantillon MOM3 incubé en aérobiose en présence d'une solution minérale

Tableau 2-X : Dénombrements des peuplements microbiens hétérotrophes présents dans l'échantillon MOMB3 aprés incubation de 21 jours dans la solution nutritive minérale SM.

concentration de la pulpe	agitation des dispositifs	NB	NB/100	AA	PDA
33 %	oui	84.10^6	26.10^6	94.10^6	0
33 %	non	16.10^6	5.10^6	$5,9.10^6$	$3,8.10^5$
29 %	oui	$46,2.10^6$	$6,7.10^6$	13.10^6	$3,5\ 10^5$
29 %	non	$25,6.10^6$	$14,4.10^6$	$19,4.10^6$	0
25 %	oui	$28,3.10^6$	$10,5.10^6$	$20,2.10^6$	0
25 %	non	$31,2\ 10^6$	36.10^6	$23,2.10^6$	0

Résultats exprimés en UFC par gramme d'échantillon sec

Les pourcentages de minéralisation du carbone organique les plus importants sont mesurés avec les pulpes à 29 %, 33 % et 50 % d'argile. En effet pour ces trois traitements aucune différence significative ne peut relevée au niveau des résultats mesurés à 21 jours. Les minéralisations les plus faibles sont à rapporter aux pulpes à 25 % d'argile. En ce qui concerne les pulpes à 25 % et à 29 %, le pourcentage de carbone minéralisé sur 21 jours passe presque du simple au double (3 % pour la pulpe à 25 % et plus de 5 % pour celle à 29 %). Outre cette constatation, un fait remarquable concerne l'importance de la concentration de la pulpe, donc du rapport quantité d'argile/solution minérale, sur l'activité recherchée. En effet de faibles variations de ce rapport peuvent modifier de manière sensible la minéralisation mesurée. Ainsi pour une pulpe à 29 % d'argile le résultat est aussi intéressant qu'avec une pulpe à 33 % d'argile. Tandis que pour une pulpe à 25 % la minéralisation à 21 jours est la moins intéressante malgré une bonne vitesse initiale.

Ces essais réalisés dans le but d'améliorer les conditions nécessaires à la biodégradation des matières organiques par les microflores autochtones ont permis de préciser deux points supplémentaires importants qui sont :

- l'intérêt de soumettre les pulpes à une agitation suffisante afin de favoriser le brassage et l'oxygénation

- la concentration en argile la plus favorable à la minéralisation soit environ 29% de densité de pulpe (rapport quantité d'argile/solution minérale).

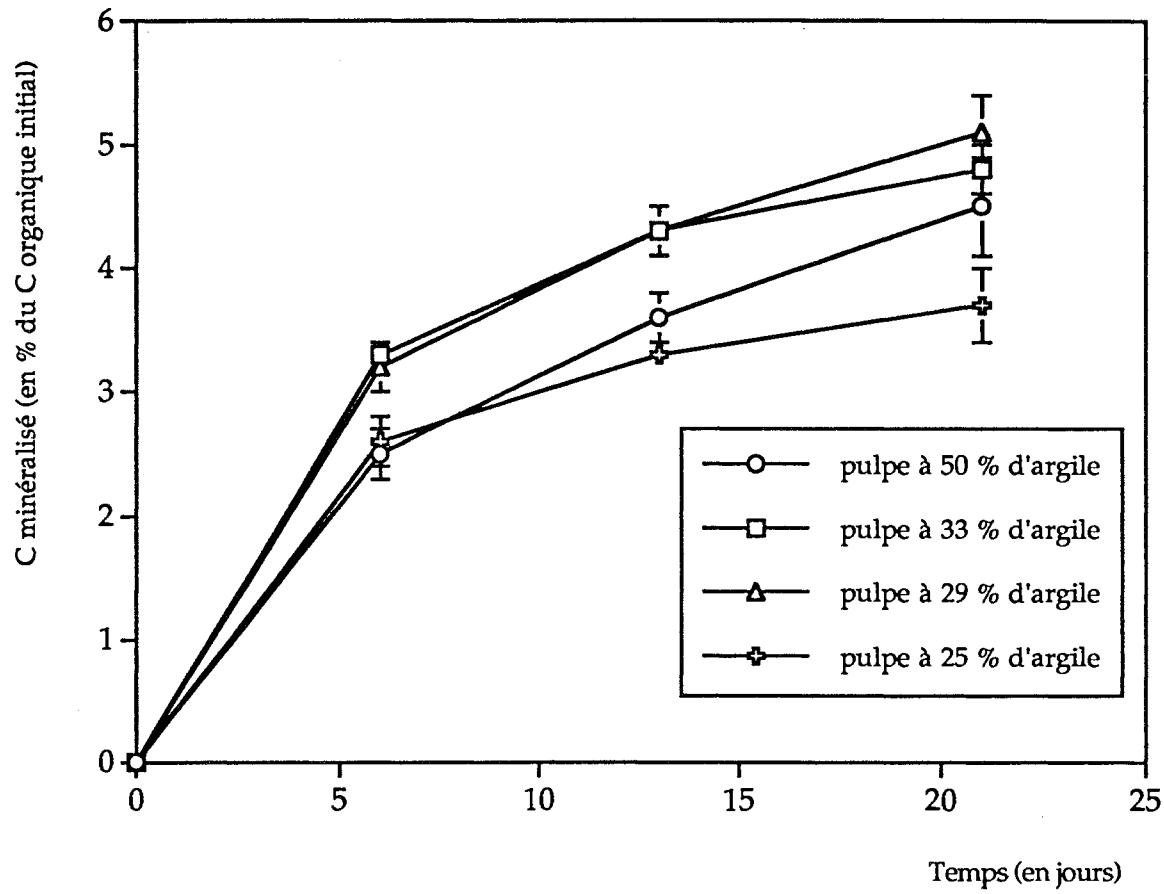


Figure 2-13 : Influence de la densité des pulpes sur la minéralisation du carbone organique de l'échantillon MOMB3 lors d'essais réalisés en conditions agitées

III-5 Conclusions

L'approche microbiologique développée dans ce chapitre est relative à la mise en évidence de la présence d'une microflore apte à utiliser les matières organiques associées aux kaolins comme source de carbone et d'énergie.

Les argiles, tout comme les sols, renferment des peuplements microbiens autochtones et/ou contaminants relativement abondants (de l'ordre de 10^6 UFC/g) et très diversifiés (eubactéries, actinomycètes, champignons). Dans les échantillons séchés à température élevée (100°C), c'est-à-dire ayant subi une stérilisation partielle, subsistent des microflores peu abondantes (quelques centaines d'UFC/g) et peu diversifiées mais qui ont conservé une capacité de développement efficace. En effet, placés dans des conditions favorables (humidité, température, apports de nutriments minéraux) ces peuplements peuvent atteindre des valeurs de l'ordre de 10^6 à 10^7 UFC/g, ce qui est équivalent aux valeurs obtenues avec les argiles séchées à température moyenne (40°C).

Parmi les peuplements se trouvent des micro-organismes qui peuvent être considérés comme oligotrophes car ils se développent lorsqu'ils sont cultivés sur des milieux très dilués (NB/100, c'est-à-dire 80 mg/l de bouillon nutritif). Ces micro-organismes sont nombreux et constituent une microflore fort bien adaptée aux faibles teneurs en matières organiques des kaolins étudiés.

De plus il est apparu que les communautés subsistant au séchage à 100°C, malgré leur petit nombre initial, semblaient constituer un inoculum plus efficace que la microflore non perturbée par un traitement thermique. En effet les minéralisations des matières organiques obtenues lors des expériences réalisées avec des échantillons séchés à 100°C sont deux fois plus importantes que celles mesurées avec les échantillons séchés à 40°C. La biomasse qui a pu résister aux températures élevées est capable d'utiliser plus facilement les matières organiques humifiées et de les minéraliser en partie en CO_2 et H_2O.

L'incidence de nombreux paramètres sur le taux de minéralisation des matières organiques a également été envisagée. Pour cela, les argiles ont été mises en suspension dans différentes solutions nutritives et dans des conditions d'oxygénation variables.

Une minéralisation (transformation en CO_2) limitée des matières organiques a été mesurée pour l'ensemble des essais menés mais l'aérobiose s'est rapidement révélée favorable pour les activités de biodégradation. En effet les minéralisations obtenues en anaérobiose, en envisageant différents accepteurs d'électrons, sont restées assez faibles et donc peu intéressantes vis à vis de l'objectif recherché. L'agitation des réacteurs ainsi que l'utilisation de pulpes d'argiles peu denses ont permis d'améliorer les conditions nécessaires à la biodégradation des matières organiques en favorisant les échanges gazeux ainsi que l'accessibilité de l'oxygène vis-à-vis des micro-organismes impliqués. Enfin, l'utilisation d'une solution nutritive minérale de composition assez simple, apportant notamment de l'azote, du potassium, du sodium et du magnésium, est également favorable. Par

contre, l'apport d'extrait de levure est inutile car il est probable que certains des composés qu'il contient, tels que les oligo-éléments, sont déjà présents dans le milieu à l'état de traces.

Les résultats les plus intéressants ont donc été observés lors d'incubations en aérobiose, à 28°C, avec des échantillons d'argiles séchés à 100°C, en présence d'une solution minérale nutritive (SM) et avec des pulpes peu denses (30 % d'argile) et agitées. L'ensemble de ces paramètres et des valeurs sélectionnées va donc être appliqué à la mise au point et à la réalisation d'incubations de durées plus longues grâce auxquelles l'effet de l'activité microbienne sur la transformation et la répartition des diverses formes de matières organiques sera étudié.

Chapitre IV : Evolution et transformation des matières organiques au cours de leur biodégradation

Les études réalisées précédemment ont démontré que la mise en suspension des argiles, dans des conditions propices, stimule une activité microbienne endogène se traduisant globalement par une minéralisation des matières organiques et une production de CO_2.

Dans cette seconde série expérimentale il s'agit d'étudier les effets de l'activité microbienne sur la transformation et la répartition des diverses formes de matières organiques associées aux argiles ainsi que de déterminer la ou les familles de matières organiques les plus sensibles à la biodégradation. Pour cela des expériences de longues durées ont été effectuées dans des conditions sensiblement différentes mais toujours en aérobiose et en présence de solution minérale nutritive afin d'offrir, comme l'ont montré les résultats précédents, les meilleures conditions opératoires pour la biodégradation de ces matériaux.

IV-1 Mise en évidence d'une modification de la répartition des différentes formes de matières organiques et de l'évolution des acides humiques

Dans une première expérience des échantillons des argiles SEIG1 et SEIG4 sont incubés en aérobiose en présence de solution nutritive minérale SM. Ces essais se déroulent sur une période de 3 mois afin d'observer des transformations significatives des matières organiques. Pour maintenir des conditions d'aération suffisantes et éviter l'asphyxie ainsi que des surpressions dues au CO_2 dégagé, l'atmosphère des flacons est renouvelée hebdomadairement.

IV-1-1 Minéralisation des matières organiques : incidence sur la répartition de ses diverses formes (acides humiques, acides fulviques et humine)

Les figures 2-14 et 2-15 représentent la minéralisation du carbone organique au cours du temps, en comparant des conditions biotiques et abiotiques. Les valeurs cumulées permettent tout d'abord de vérifier que les dégagements de CO_2 mesurés lors des essais sont dus au développement d'une activité microbienne puisque ceux observés dans les témoins abiotiques sont faibles et n'évoluent pas dans le temps.

En ce qui concerne les essais biotiques, la minéralisation est importante puisqu'après 90 jours elle représente 12 % du carbone organique initial pour SEIG4 et 25 % pour SEIG1.

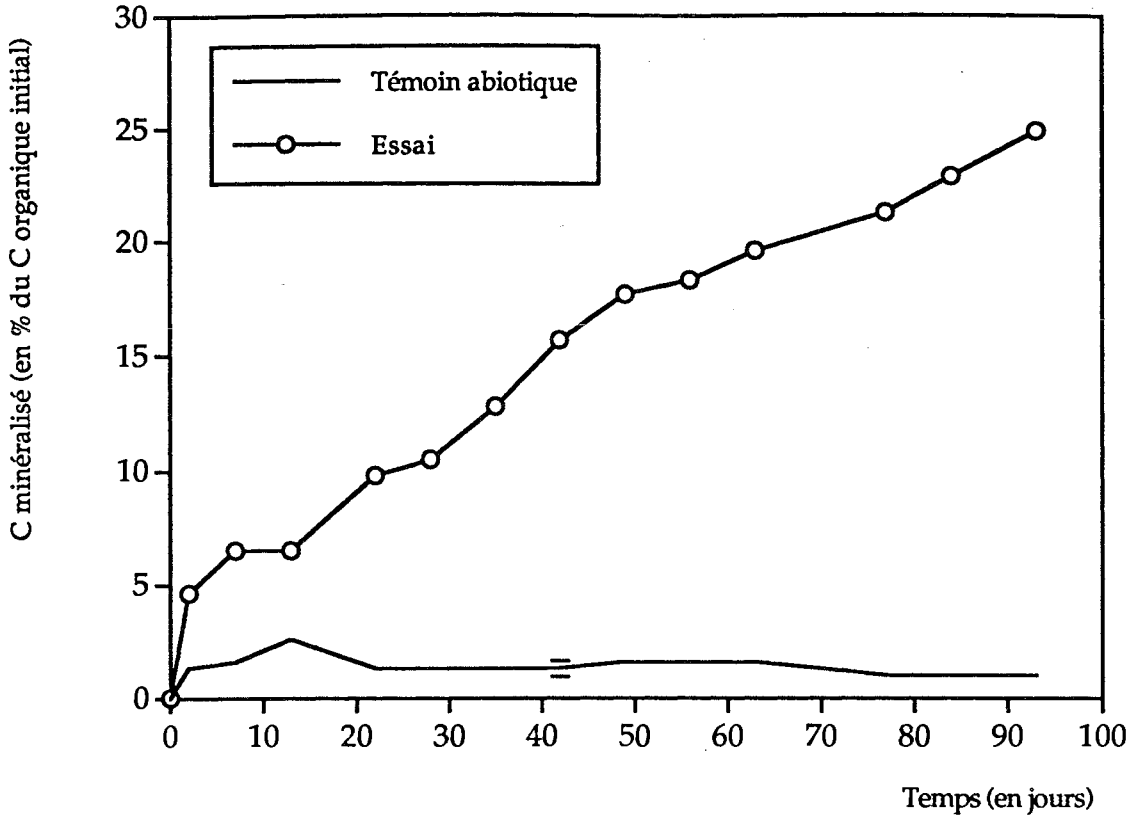


Figure 2-14 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG1, incubé pendant 3 mois en aérobiose, en présence de solution minérale nutritive

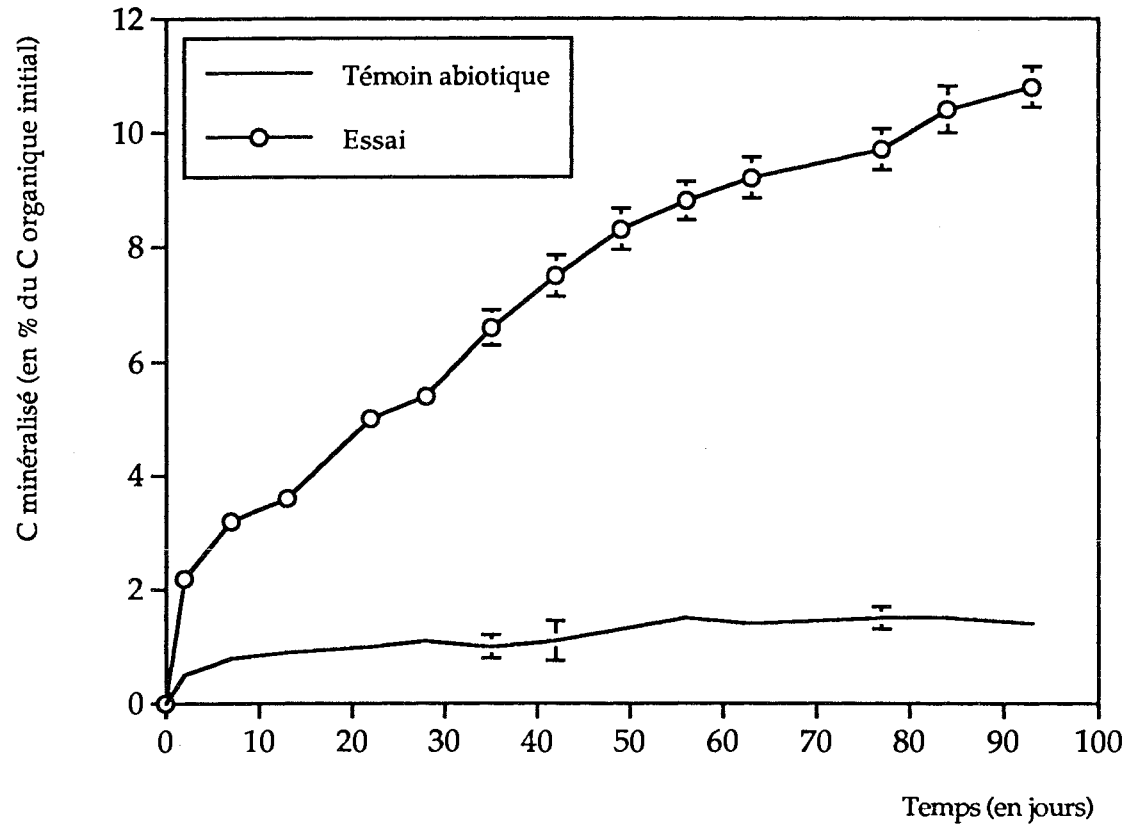


Figure 2-15 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon SEIG4, incubé en aérobiose pendant 3 mois, en présence de solution minérale nutritive

Pour les deux échantillons étudiés les courbes cumulées obtenues ont des aspects identiques, à savoir : une augmentation rapide de la quantité de carbone minéralisé dans les 10 premiers jours, suivie par un léger ralentissement puis par une augmentation plus faible mais régulière dans les jours suivants. Ainsi, par exemple, dans le cas de SEIG1, s'il faut 10 jours en début d'incubation pour passer d'un taux de carbone minéralisé de 0 à 7 %, il faut 25 jours par la suite pour que celui ci passe de 7 à 14 %. Le ralentissement de la croissance après le dixième jour d'incubation pourrait s'expliquer par une baisse de la disponibilité des nutriments minéraux présents en solution. En effet pour favoriser une bonne activité microbienne donc une bonne minéralisation du carbone, un renouvellement de l'atmosphère, donc des apports d'oxygène, a été effectué. Mais un tel renouvellement n'a pas été réalisé en ce qui concerne les sels minéraux. Un autre facteur, relatif à la texture du mélange argile-solution minérale, a pu être limitant. En effet ce mélange étant très pâteux et l'agitation étant limitée, il est fort probable que le coeur des pulpes n'ait pas été suffisamment oxygéné. Or, comme les études préliminaires l'ont mis en évidence, l'anaérobiose n'est pas favorable à la biodégradation des matières organiques alors que l'oxygène semble être un bon accepteur d'électrons pour l'activité minéralisatrice de la microflore. Ce ralentissement peut également être du à la nature des matières organiques moins biodégradables au delà de cette première phase de minéralisation

Après 3 mois d'incubation, des dosages de carbone organique ainsi que des extractions de substances humiques sont réalisés sur les échantillons jusqu'alors en suspension dans la solution minérale SM. Les résultats obtenus pour les deux échantillons traités sont présentés dans les tableaux 2-XI et 2-XII. Ces tableaux rappellent également les teneurs déterminées pour les échantillons initiaux afin de pouvoir établir des comparaisons et juger de l'effet des actions microbiennes.

Pour SEIG1 comme pour SEIG4 aucune variation des teneurs en carbone organique n'est décelable dans les conditions adoptées et avec les méthodes d'analyses utilisées. Il faut tout d'abord rappeler que les échantillons présentent de faibles teneurs en carbone organique et que si les mesures du CO_2 dégagé (figures 2-14 et 2-15) mettent respectivement en évidence la minéralisation de 25 % et de 12 % du carbone initial, ces valeurs ne représentent en réalité que de faibles quantités de matières organiques. Ces variations ramenées au niveau du carbone organique total peuvent donc ne pas induire de différences importantes. D'autant plus que les dispositifs utilisés sont des systèmes fermés c'est-à-dire sans élimination des composés simples éventuellement hydrosolubles qui ont pu se former au cours de la biodégradation. Ces composés, issus de la dégradation des matières organiques, restent associés aux argiles et sont donc présents dans les échantillons récupérés. De ce fait ils sont toujours pris en compte dans les dosages de carbone organique. Il semble donc judicieux de laver les résidus de minéralisation avant de procéder aux étapes de séchage et d'extraction.

Afin de vérifier cette hypothèse, les composés organiques extractibles à l'eau chaude, qui peuvent être de nature polysaccharidiques, ont été évalués.

Tableau 2-XI : Répartition des différentes formes de matières organiques de l'échantillon SEIG1 avant et après incubation de 3 mois, en aérobiose, et en présence de solution minérale.

	SEIG1 échantillon initial	SEIG1 échantillon après 3 mois d'incubation
COT (%)	0,11	0,11
C Humine*	62	59
C M.O alcalino-soluble*	38	41
Q4/6	4,5	6,4
C A.F*	23	24
C AH*	15	17
AF/AH	1,5	1,4

* Résultats exprimés en pourcentage du carbone organique total (COT)

Tableau 2-XII : Répartition des différentes formes de matières organiques de l'échantillon SEIG4 avant et après incubation de 3 mois, en aérobiose, et en présence de solution minérale.

	SEIG4 échantillon initial	SEIG4 échantillon après 3 mois d'incubation
COT (%)	0,41	0,41
C Humine*	33	42
C M.O alcalino-soluble*	67	58
Q4/6	6,8	5,7
C A.F*	27	11
C AH*	40	47
AF/AH	0,7	0,2

* Résultats exprimés en pourcentage du carbone organique total (COT)

Les résultats exposés dans le tableau 2-XIII indiquent que l'action des micro-organismes a permis de doubler pour SEIG1, et de tripler pour SEIG4, les quantités de carbone extractible à l'eau chaude. Ils vérifient ainsi l'hypothèse qu'une partie des composés dégradés reste faiblement liée aux argiles.

Tableau 2-XIII : Matières organiques hydrosolubles (extraction à l'eau chaude) pour les échantillons SEIG1 et SEIG4 avant et après incubation de 3 mois en aérobiose et en présence de solution minérale.

	SEIG1 initial	SEIG1 après 3 mois d'incubation	SEIG4 initial	SEIG4 après 3 mois d'incubation
C organique (en %)	0,11	0,11	0,41	0,41
Taux* d'extraction	12,5	25,6	9,2	27,1

*Résultats exprimés en pourcentage du carbone organique initial

Considérons les résultats présentés par les tableaux 2-XI et 2-XII et plus particulièrement la répartition des différentes formes de matières organiques.

En ce qui concerne SEIG1, seules de très faibles variations apparaissent entre les valeurs obtenues pour l'échantillon initial et celles déterminées pour l'échantillon après trois mois d'incubation (noté SEIG1/3m). La fraction humine diminue peu au profit d'une légère augmentation des matières organiques alcalino-solubles tandis que les proportions relatives d'acides humiques et fulviques ne sont quasiment pas modifiées. La variation la plus nette concerne le coefficient aromatique Q4/6 des matières organiques alcalino-solubles qui est plus élevé pour l'échantillon biodégradé que pour l'échantillon initial. Cette augmentation du Q4/6 indique que les composés présents (acides humiques et acides fulviques) sont moins condensés dans les extraits alcalins issus de l'échantillon SEIG1/3m. Cet ensemble de remarques suggère que, dans le cas de l'argile SEIG1, l'action des micro-organismes s'est manifestée par une simplification chimique des produits qui constituent l'humine et les matières alcalino-solubles. Celles ci apparaissent moins condensées.

Les résultats obtenus pour l'argile SEIG4 sont d'un tout autre ordre puisque dans ce cas, après trois mois d'incubation, une évolution très significative apparaît dans la répartition des différentes formes de matières organiques. La fraction humine augmente sensiblement, ce qui bien entendu s'accompagne d'une diminution des matières organiques alcalino-solubles. La composition de cette dernière est également modifiée puisqu'il est possible de noter une forte diminution des acides fulviques et une augmentation des acides humiques. Ceci

se manifeste également par des diminutions des valeurs du rapport AF/AH et du coefficient aromatique Q 4/6 .

Il est possible d'expliquer ces phénomènes en envisageant qu'au cours de l'incubation les produits facilement oxydables ont été dégradés ce qui a d'une part provoqué un dégagement de CO_2 important et d'autre part donné naissance à des composés de solubilité différente observés avec l'augmentation de la teneur en composés hydrosolubles à chaud, la baisse importante de la teneur en acides fulviques et l'augmentation de celle des acides humiques. Il convient à ce niveau de souligner l'analogie de structure entre les acides fulviques et les acides humiques ainsi que l'existence entre eux de multiples interactions (Andreux et Munier-Lamy, 1994). La différence de solubilité entre ces composés s'explique en partie par un rapport nucleus/chaînes latérales plus faible pour les acides fulviques que pour les acides humiques. Il peut donc se produire une évolution dans le sens Acides Fulviques --> Acides Humiques par polymérisation des noyaux aromatiques avec diminution de l'importance relative des chaînes aliphatiques. Par ailleurs, au cours de l'incubation il y a développement bactérien, c'est-à-dire création "d'humine microbienne", qui peut expliquer l'augmentation du pourcentage d'humine mentionnée plus tôt. Cette hypothèse se vérifie par l'augmentation du taux de carbone extractible à l'eau chaude qui révèle des produits de nature polysaccharidique ce qui est, au moins en partie, le cas de l'humine microbienne.

En fait deux phénomènes se superposent. Il y a d'une part minéralisation mais aussi modification de la nature des matières organiques de l'échantillon initial et d'autre part formation d'un nouveau type de matière organique du au développement microbien. Afin d'analyser uniquement les matières organiques résiduelles associées aux argiles il aurait fallu, sur une partie de l'échantillon récolté après incubation, effectuer en premier lieu des lavages pour éliminer une partie des produits issus du développement bactérien, et ensuite seulement procéder aux extractions alcalines afin d'obtenir une analyse plus précise des modifications de la nature des matières organiques de ces argiles.

Après 90 jours d'incubation dans des dispositifs en cuve avec renouvellement hebdomadaire de l'atmosphère, l'évolution des matières organiques initiales suit deux voies différentes. Pour SEIG1 les modifications sont faibles et correspondent plutôt à une simplification du degré de condensation des produits organiques dans leur ensemble tandis que dans le cas de SEIG4 la répartition des différents types de matières organiques est modifiée, les acides fulviques sont préférentiellement biodégradés.

IV-1-2 Effets de la biodégradation des matières organiques sur la nature des acides humiques

Les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent que l'activité biologique qui s'est développée au cours de l'incubation de l'argile SEIG4 a provoqué des modifications dans la répartition des différents types de matières organiques.

Afin de préciser ces transformations et d'approcher au plus près les phénomènes qui se sont déroulés, les acides humiques de l'échantillon récolté après 3 mois d'incubation sont extraits, purifiés et étudiés par diverses techniques.

Le tableau 2-XIV présente les analyses élémentaires des acides humiques associés à l'échantillon d'argile initial (ils sont notés AHS4) et au même échantillon après trois mois de biotraitement (ils sont notés AHS4/3m).

Tableau 2-XIV: Analyses élémentaires organiques des acides humiques AHS4 et AHS4/3m purifiés à partir des argiles initiales et après biotraitement.

	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	H/C*	O/C*
AHS4	59,38	3,36	0,95	36,31	0,68	0,46
AHS4/3m	54,24	4,07	1,05	40,64	0,90	0,56

* : rapport atomique

Les valeurs obtenues indiquent que les principales variations se situent au niveau des teneurs en carbone et en oxygène puisqu'il y a perte de carbone et gain notable d'oxygène. La modification des teneurs relatives en carbone a bien entendu provoqué un changement dans l'indice d'aromaticité H/C, d'autant plus que les pourcentages d'hydrogène ont très peu variés. La valeur de H/C égale à 0,9 calculée pour AHS4/3m révèle donc une diminution de l'aromaticité. Ces premières constatations indiquent que les acides humiques ont bien été concernés par les processus de biodégradation microbiens. L'étude des groupements fonctionnels par spectrophotométrie infra-rouge apporte des précisions complémentaires sur la nature des groupements et des structures moléculaires impliqués dans les phénomènes de biodégradation.

Il est ainsi possible de constater, en comparant les deux spectres obtenus (figure 2-16), qu'il n'y a aucune différence dans la distribution des bandes mais qu'il y en a au niveau de l'intensité de celles ci. La variation la plus nette est relevée pour la bande présente à 3 400 cm^{-1}. Elle est caractéristique de la vibration des liaisons O-H et est beaucoup plus importante pour AHS4/3m. Elle traduit un niveau élevé d'oxydation pour cet acide humique.

Globalement, les différences relatives au spectre des acides humiques AHS4/3m par rapport à celui des acides humiques AHS4 portent sur les points suivants :

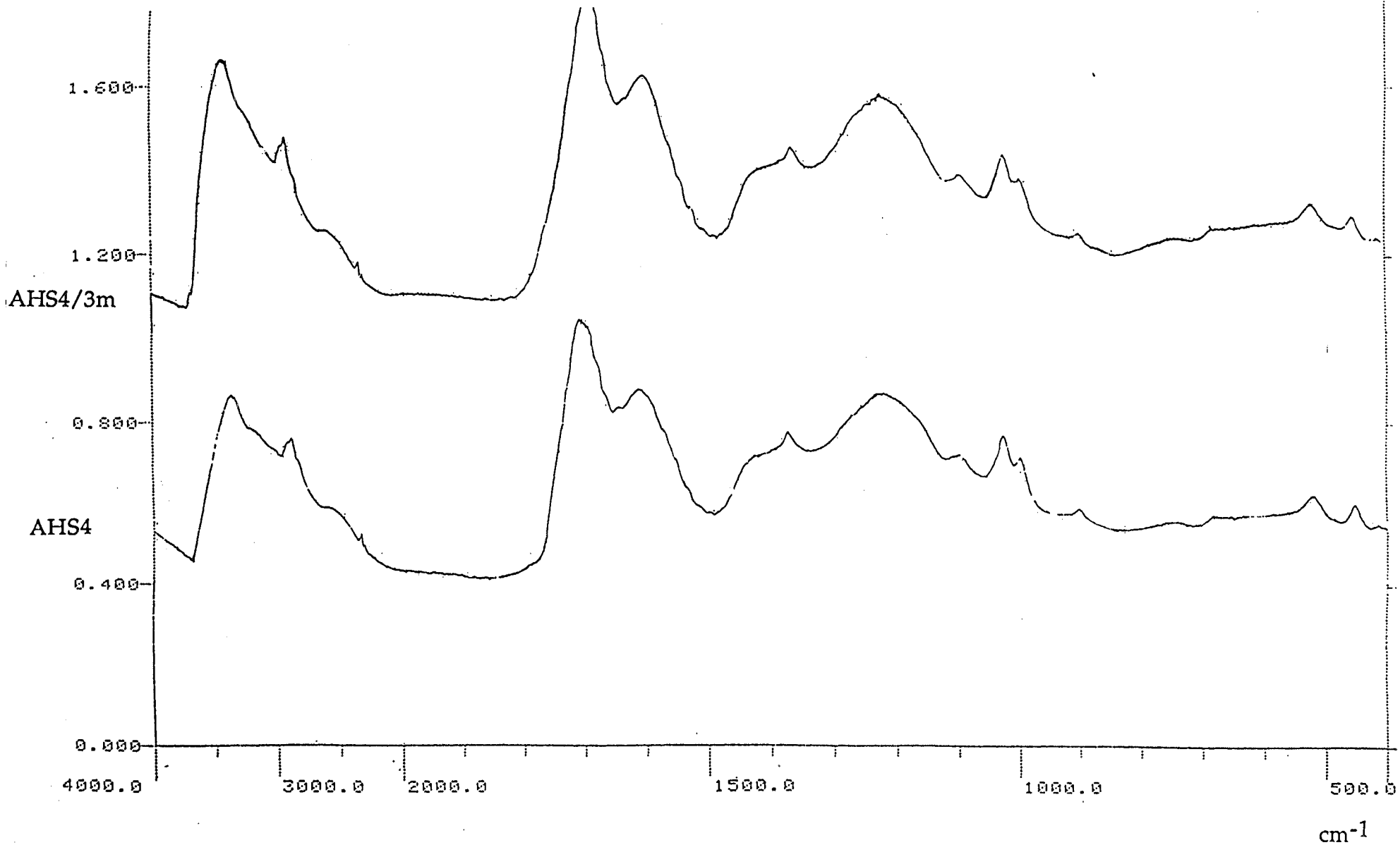


Figure 2-16 : Spectres d'absorption dans l'infrarouge des acides humiques extraits et purifiés à partir de l'argile SEIG4 (AHS4) et de cette même argile après trois mois d'incubation (AHS4/3m).

- la bande aliphatique (double pic à 2 950 cm^{-1}) est légèrement modifiée. Elle semble un peu plus prononcée.

- la bande correspondant aux vibrations des groupements carboxyliques et cétoniques (C=O à 1 710 cm^{-1}) semble un peu plus importante, tandis que le pic du aux fonctions alcools (C-O à 1 050 cm^{-1}) reste inchangé. Tout ceci n'indique pas une oxydation significative des alcools en acides carboxyliques.

- le pic du aux vibrations du squelette aromatique associées à celles de la liaison C=O des amides situé à 1 630 cm-1 est un peu plus intense, tout comme celui correspondant aux vibrations d'ensemble du squelette (1 300 cm^{-1}).

Afin de caractériser l'action des microflores sur les acides humiques de l'échantillon SEIG4, il est nécessaire de considérer l'ensemble des données obtenues sur la nature de ces composés.

La première observation concerne la diminution de la condensation des composés au cours de l'incubation puisque le rapport H/C est passé de 0,68 pour AHS4 à 0,90 pour AHS4/3m.

Un second point à noter montre que le phénomène d'oxydation relevé par l'analyse élémentaire peut être mis en relation avec l'importance des groupements hydroxylés révélée par le spectre infrarouge de AHS4/3m. Il ne semble pas que l'oxydation observée se soit faite sur les structures aliphatiques. L'abondance des groupements hydroxylés doit plutôt être imputée à une oxydation des cycles au niveau de la partie polyaromatique des acides humiques. Ces phénomènes ont donné naissance à des chaînes aliphatiques hydroxylées (génération de fonctions alcools) ou carboxylées ainsi qu'à des ouvertures de cycle. Une information complémentaire en faveur de cette dernière suggestion se rapporte aux résultats des chromatographies d'exclusion sur gel Séphadex qui mettent en évidence une légère augmentation de l'encombrement moléculaire de AHS4/3m (estimé à 2.10^4 Dalton) comparativement à AHS4 (estimé à $1,5.10^4$ Dalton) sans pour autant influer de façon significative sur la polydispersion des molécules. En conséquence de quoi, il semble bien que l'action des microflores ait concerné la partie aromatique complexe plus difficilement accessible plutôt que les chaînes aliphatiques potentiellement plus accessibles. Toutefois il faut remarquer que pour cet échantillon SEIG4 la biodégradation microbienne a dégradé préférentiellement les acides fulviques dont la teneur a diminué très sensiblement.

Au cours de trois mois d'incubation, en aérobiose et en présence d'une solution minérale nutritive, les acides humiques de l'échantillon SEIG4 ont été modifiés par des processus de biotransformation. Ils ont, semble t'il, été essentiellement oxydés au niveau des cycles constituants la partie polyaromatique des composés.

IV-2 Biotransformation des composés humiques et développement des communautés bactériennes autochtones au cours d'incubations en conditions contrôlées.

Les principales conclusions obtenues avec l'échantillon d'argile SEIG4 soulignent plusieurs résultats d'un grand intérêt, notamment : une minéralisation de 12 % du carbone organique initial, la biodégradation préférentielle des acides fulviques, l'augmentation relative des teneurs en acides humiques, une modification de la nature et de la structure de ces acides humiques (accroissement remarquable des groupements hydroxylés, légère augmentation de l'encombrement moléculaire) ainsi qu'une augmentation du compartiment humine. Par contre aucune variation notable n'a été remarquée en ce qui concerne la teneur en carbone organique total car, entre autre, les composés organiques hydrosolubles formés au cours de la biodégradation n'ont pas été éliminés et ont donc toujours été pris en compte dans les dosages.

Ces résultats encourageants ont incité à reprendre de telles expériences en cherchant à optimiser l'ensemble des conditions pouvant intervenir afin de favoriser au maximum la biodégradation en suivant au mieux l'évolution de divers paramètres fortement impliqués dans ces processus.

Cette nouvelle expérimentation a été réalisée avec l'argile MOMB3 tandis que les précédentes avaient été faites avec les argiles SEIG1 et SEIG4. Ce changement s'explique en se référant à la classification des échantillons en trois groupes effectuée dans la première partie de cette étude. En effet il s'avère que les argiles SEIG1 et SEIG4 appartiennent respectivement au premier et au troisième groupe, il était donc également intéressant d'étudier la minéralisation des matières organiques avec un échantillon appartenant au deuxième groupe, ce qui est le cas pour MOMB3.

Pour cela, les valeurs et le contrôle des paramètres opératoires déterminés dans l'étude initiale (chapitre III) sont bien entendu respectés. Mais, suite aux quelques problèmes rencontrés dans l'expérience précédente, une attention particulière a été portée sur plusieurs points :

- le choix de l'agitation s'est orienté vers un système à retournement afin de favoriser le brassage et surtout d'éviter la formation de croûtes ou de zones d'anaérobiose

- les échantillons prélevés sont tous lavés à l'eau en vue d'éliminer les produits hydrosolubles issus de l'activité microbienne

- de nombreux paramètres (disponibilité de l'oxygène, pH du milieu, teneurs en éléments minéraux dans la solution nutritive) bénéficient d'un suivi régulier afin d'être assuré qu'aucune carence ne freine le développement microbien

IV-2-1 Relation entre le développement de la microflore autochtone et la minéralisation du carbone organique

La figure 2-17 présente l'ensemble des résultats relatifs au suivi des peuplements bactériens autochtones tout au long des trois mois d'incubation.

Les courbes de croissance ont été réalisées à partir des résultats des dénombrements effectués sur deux types de milieux : le milieu NB qui permet la croissance des bactéries hétérotrophes mésotrophes et le milieu NB/100 (100 fois plus dilué que le précédent) encore appelé DNB (Diluted Nutrient Broth) utilisé ici pour la culture des micro-organismes oligotrophes.

En raison de certaines difficultés relatives à la texture des pulpes la croissance des bactéries a été étudiée en milieux non renouvelés. En effet il a bien été tenté, après un mois d'incubation, de soutirer une partie du milieu afin de réalimenter les réacteurs avec de la nouvelle solution nutritive. Mais, même en laissant les systèmes au repos pendant plusieurs heures, la décantation n'était pas parfaite et le prélèvement de surnageant aurait automatiquement entraîné une partie de l'argile ce qui aurait donné naissance à des incertitudes trop importantes lors des bilans carbonés. Le rajout de solution nutritive sans soutirage préalable aurait également été défavorable car il aurait modifié la densité des pulpes en les rendant trop liquide. Or, il a été établit (chapitre III) que la minéralisation du carbone organique était freinée dans les pulpes argileuses trop diluées.

Les deux courbes de croissance obtenues (figure 2 -17) sont d'allures semblables, mais légèrement décalées. Trois phases peuvent être distinguées :

- une phase exponentielle, au cours de la première semaine, pendant laquelle les bactéries se multiplient rapidement.
- une phase stationnaire qui se déroule entre le septième et le soixantième jour. Elle correspond à un équilibre entre le nombre de cellules provenant de la multiplication et le nombre de cellules viables qui disparaissent.
- une phase de déclin qui s'amorce à partir du soixantième jour. Au cours de celle ci les bactéries ne se divisent plus et beaucoup d'entre elles meurent.

Comme les résultats précédents l'ont déjà souligné, les peuplements initiaux sont de faible importance puisque les dénombrements réalisés en début d'incubation n'ont pu mettre en évidence que quelques UFC/g d'échantillon sec sur milieu NB et quelques centaines sur milieu DNB. Ces micro-organismes, quoique peu nombreux, sont parfaitement viables et, une fois placés en conditions favorables d'humidité et de température, ils se multiplient rapidement pour atteindre des valeurs de l'ordre de 10^7 UFC/g d'échantillon sec en une semaine.

Des dénombrements effectués de façon assez rapprochée dans les deux premiers jours d'incubation ont permis de voir que dés 6 heures après la mise en contact entre argile et solution minérale, les peuplements microbiens étaient égaux à 5.10^4 UFC/g d'échantillon sec sur milieu NB et 25.10^4 UFC/g sur milieu DNB tandis qu'ils atteignaient 5.10^5 UFC/g sur NB et 17.10^5 UFC/g sur DNB

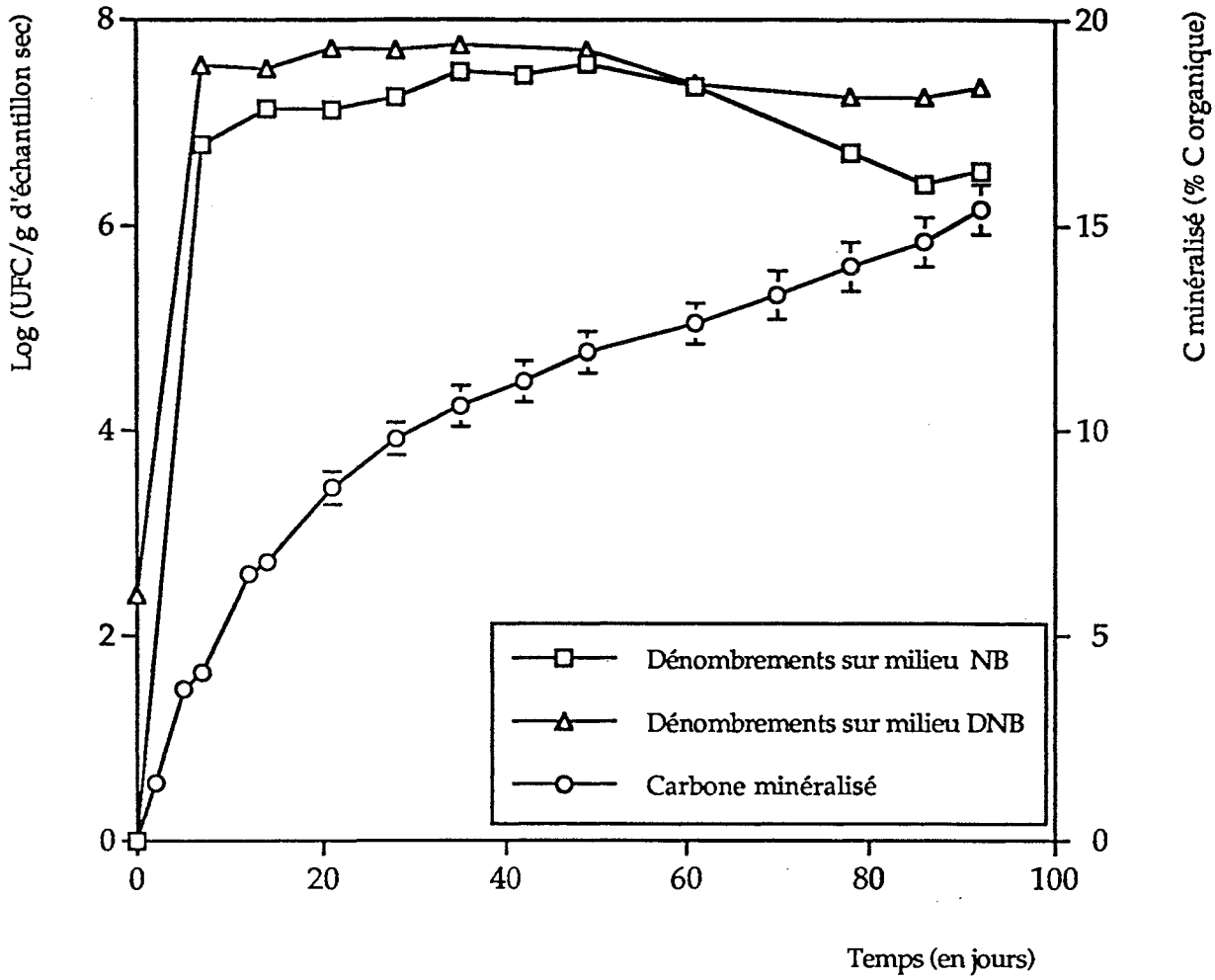


Figure 2-17 : Minéralisation du carbone organique de l'échantillon MOMB3 et dénombrements des peuplements bactériens lors d'une incubation de 3 mois en aérobiose et en présence de solution nutritive minérale

après 2 jours. Etant donné la faible densité et l'état perturbé de l'inoculum initial, le temps de latence nécessaire avant le début de la croissance exponentielle est relativement court puisque pendant les six premières heures de culture le temps de génération est de 0,5 heures pour l'ensemble des micro-organismes. Par la suite la multiplication est moins rapide puisque, entre 6 heures et 48 heures d'incubation, le temps de génération est proche de 13 heures pour les micro-organismes mésotrophes et de 15 heures pour les oligotrophes tandis qu'entre 2 jours et 7 jours d'incubation il passe à 33 heures pour les mésotrophes et à 27 heures pour les oligotrophes.

La microflore oligotrophe semble mieux adaptée aux conditions de milieu puisqu'elle est initialement plus nombreuse et reste supérieure en nombre tout au long de la phase stationnaire. Elle est également moins sensible à la phase de déclin que la population hétérotrophe mésotrophe globale.

Pourtant, malgré ce décalage, les deux populations réagissent de façon identique puisque dans les deux cas la phase exponentielle se déroule dans les sept premiers jours et la phase de déclin s'amorce à partir du soixantième jour. C'est probablement pendant cette phase de déclin que la différence est la plus marquée car la population hétérotrophe totale chute rapidement tandis que les micro-organismes oligotrophes sont moins sensibles.

Cette prédominance des bactéries oligotrophes n'est pas surprenante car l'échantillon utilisé pour ces expériences, tout comme l'ensemble des échantillons d'argiles provenant du bassin sédimentaire concerné, n'est pas très riche en carbone organique (0,52 % dont seulement 4 % sous forme d'acides fulviques). Elles sont donc mieux adaptées que les bactéries hétérotrophes classiques puisqu'elles ne nécessitent pas de flux carbonés importants pour se développer. De façon générale, dans un sol, les bactéries oligotrophes constituent une composante de base au sein de la communauté autochtone car elles colonisent les microsites pauvres en substrats (Hattori, 1981 ; Kaszubiak and Muszynska, 1992).

En parallèle de ces dénombrements, l'activité minéralisatrice a été suivie en dosant le CO_2, résultant de l'oxydation des substrats carbonés, et libéré dans la phase gazeuse des milieux. Les résultats indiquent, qu'en 90 jours, 15 % du carbone organique initial a pu être minéralisé. Là encore le phénomène observé peut être découpé en phases successives :

- une première phase, correspondant aux 15 premiers jours d'essai, au cours de laquelle les dégagements de CO_2 sont importants puisqu'ils correspondent à une minéralisation égale à 7 % du carbone organique initial.
- une seconde phase, entre le quinzième et le vingt huitième jour, au cours de laquelle la minéralisation amorce un ralentissement.
- une troisième phase, après 28 jours, tout au long de laquelle la minéralisation est plus faible que pendant les phases précédentes mais continue à se manifester régulièrement.

En comparant les deux types de mesures réalisées, il est possible de constater que la forte activité respirométrique initiale correspond à une période de

multiplication intense des bactéries ainsi qu'à une "mise en oeuvre" des systèmes enzymatiques, ces phénomènes nécessitant beaucoup d'énergie.

La phase stationnaire de croissance, quant à elle, s'accompagne d'une activité minéralisatrice significative qui résulte d'une biodégradation importante : les bactéries se multiplient sans doute encore mais plus lentement et continuent à oxyder des substrats pour se procurer de l'énergie.

Il faut également souligner qu'en fin de phase stationnaire et en phase de déclin, c'est-à-dire aux alentours et passés 60 jours, les peuplements sont encore importants (supérieurs à 10^6 UFC/g d'argile sèche) et les dégagements de CO_2 se poursuivent : la diminution du nombre de cellules s'amorce, elle ne s'accompagne pas d'un arrêt de l'activité. C'est généralement à ce moment que les métabolismes secondaires sont activés afin de faire face aux stress extérieurs (présence de produits toxiques, diminution des nutriments et des éléments minéraux disponibles, ...).

Le suivi de l'évolution des peuplements microbiens et de leur activité, par des dénombrements et de mesures d'activités minéralisatrices, indique que les incubations réalisées favorisent la prolifération rapide de communautés microbiennes complexes et variées comprenant une majorité d'organismes présentant des caractères oligotrophes. Le peuplement maximum est atteint dès le septième jour. La phase de déclin s'amorce à partir du soixantième jour. L'activité de ces communautés se traduit par une minéralisation importante des matières organiques au cours de la phase de croissance exponentielle et en début de phase stationnaire. Mais la minéralisation se poursuit de façon significative pendant la phase stationnaire ainsi qu'en début de la phase de déclin. Les peuplements restent toujours importants, supérieurs à 10^6 UFC/g, même au niveau de la phase de déclin.

IV-2-2 Evolution des teneurs en nutriments minéraux du milieu en cours d'incubation

Le développement des microflores autochtones a été favorisé en mettant les échantillons d'argile en présence d'une solution nutritive exclusivement minérale. Les sources énergétiques et carbonées sont directement apportées par les argiles sous formes des matières organiques naturelles qui leur sont associées et qui sont souhaitées être biodégradées et minéralisées par les micro-organismes autochtones.

Afin de vérifier la disponibilité, pour la microflore, des éléments minéraux apportés par la solution nutritive des dosages de certains d'entre eux ont été réalisés tout au long des trois mois d'incubation. Le pH des solutions a également été relevé (tableau 2-XV).

Les résultats observés sont semblables à ceux obtenus au cours des incubations de courtes durées (21 jours) réalisées pour l'étude des conditions opératoires. Les conclusions peuvent donc être confirmées ici. Il est en effet possible de relever :

Tableau 2-XV : Concentrations en éléments minéraux et pH des solution dans divers traitements relatifs à la biodégradations des matières organiques associées à l'argile MOMB3.

	K (ppm)	Mg (ppm)	P (ppm)	N (ppm)	pH
Solution initiale : SM	126	10	100	100	5,2
Ech autoclavé + SM après 24 heures	53	33	67	80 à 45	5,9
Ech autoclavé + SM après 1 mois	53	33	67	80 à 45	5,9
1 semaine incubation	53	33	67	45	5,9
1 mois incubation	53	33	59	45	5,9
2 mois incubation	53	33	58	45	5,9
3 mois incubation	53	34	56	45	5,8

- le maintien du pH à un niveau constant (pH initial = 5,92, pH final = 5,84) grâce au rôle tampon joué par les argiles
- la fixation d'une partie de certains éléments minéraux sur le verre des flacons et sur les argiles (K^+, PO_4^{3-} et NH_4^+) au profit de la désorption de certains autres éléments (Mg^{2+})
- l'établissement d'un équilibre stable dans la répartition des ions entre la solution et le kaolin pour des conditions abiotiques
- l'absence de variations entre les concentrations ioniques initiales et finales suggérant la mise en place d'un équilibre entre la solution du sol et le complexe absorbant au cours de l'incubation. Le complexe absorbant libérerait des ions lorsque la solution s'appauvrirait en éléments minéraux suite à leur utilisation par les micro-organismes.

Cet équilibre qui compenserait la consommation des éléments ne serait vérifié que pour les cations mais pas pour le seul anion dosé : PO_4^{3-}. En effet la concentration en phosphate diminue de façon sensible pendant l'incubation puisqu'elle passe de 67 ppm à 56 ppm. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :
- la consommation en ions phosphates par la microflore
- la précipitation des phosphates et leur adsorption sur les argiles

Les différentes phases observées au cours de la croissance et de l'activité minéralisatrice des communautés microbiennes autochtones ne sont pas imputables à un appauvrissement du milieu en éléments nutritifs minéraux ni à une modification du pH puisque ces paramètres sont stables ou varient très peu au cours des trois mois d'incubation.

IV-2-3 Evolution des différentes formes de matières organiques associées aux argiles

Au cours des incubations l'activité minéralisatrice des microflores autochtones a été suivie par la mesure des dégagements de CO_2. Les résultats, exprimés en pourcentage du carbone organique initial, ont mis en évidence une minéralisation équivalente à 15 % de ce carbone organique après trois mois.

Cette minéralisation doit se traduire par des diminutions des teneurs en carbone organique ainsi que par des modifications dans la nature et la répartition des principales formes de matières organiques (acides humiques, acides fulviques et humine).

* Evolution des teneurs en carbone organique

Des dosages de carbone organique total ont été effectués sur les argiles prélevées aux différents temps d'incubation. Mais, dès leur récupération les échantillons ont été lavés à l'eau afin d'éliminer les composés hydrosolubles qui

auraient pu se former au cours de la biodégradation et resteraient plus ou moins associés aux argiles.

Les résultats correspondants sont présentés dans le tableau 2-XVI. Une diminution évidente des teneurs en carbone organique peut être remarquée puisqu'elles passent de 0,52 % pour l'échantillon initial à 0,45 % après 3 mois d'incubation. Cette diminution des teneurs n'est pas importante mais elle n'est pas non plus négligeable compte tenu de la nature complexe et de la stabilité des matières organiques disponibles. Ces valeurs, obtenues par dosage du carbone organique total, peuvent également être évaluées par calcul à partir des mesures du carbone minéralisé fournies par les quantités de CO_2 dégagées. Les résultats rapportés dans le tableau 2-XVI sous la rubrique intitulée "carbone organique estimé après minéralisation" présentent une grande similitude avec les mesures des teneurs finales. Cette similitude peut signifier soit que la biodégradation correspond à la seule minéralisation du carbone organique, soit qu'une partie des produits de biodégradation n'est pas hydrosoluble à froid par simple rinçage à l'eau. Cette dernière hypothèse, déjà suggérée par des résultats précédents qui montraient une production de composés hydrosolubles à chaud de nature sans doute polysaccharidique, mérite d'être vérifiée.

Les échantillons, déjà lavés à l'eau froide, ont donc été repris et les quantités de carbone organique extractible à l'eau chaude ont été déterminées. Ce type d'extraction, plus efficace que de simples lavages à l'eau froide, permettra de mesurer les composés encore éventuellement liés aux argiles.

Il apparaît ainsi (tableau 2-XVII) que pour les cinq essais réalisés les quantités de carbone extractible à l'eau chaude sont faibles mais légèrement plus importantes après incubation, essentiellement après 3 mois.
Les lavages à l'eau froide réalisés sur les argiles semblent donc permettre l'élimination d'une grande part des composés générés au cours de l'incubation mais un traitement supplémentaire à l'eau chaude semble nécessaire pour éliminer des composés qui pourraient être de nature polysaccharidique.

* Les matières organiques concernées par la biodégradation

En complément de l'observation de la diminution des teneurs en matières organiques, il semble nécessaire et d'un grand intérêt de déterminer la nature des composés humiques sensibles à la biodégradation. Il est en effet fondamental d'estimer la façon dont cette évolution s'est répercutée au niveau des divers types de matières organiques. Le tableau 2-XVIII présente les répartitions en acides humiques, acides fulviques et humine pour les cinq échantillons correspondant aux différents temps d'incubation. Souhaitant approcher au plus près les phénomènes qui se sont déroulés au cours de ces processus de biodégradation, et notamment l'effet de l'activité microbienne sur la nature des matières organiques, une attention particulière a été portée sur les acides humiques. Ainsi pour chaque cas envisagé les acides humiques correspondants ont été extraits, purifiés et étudiés par des méthodes telles que l'analyse organique élémentaire et la spectrophotométrie infrarouge.

Tableau 2-XVI : Teneur en carbone organique, après lavages à l'eau, des échantillons prélevés à différents temps d'incubation de l'argile MOMB3 en aérobiose.

	Temps d'incubation				
	initial	1 semaine	1 mois	2 mois	3 mois
C organique dosé	0,52	0,50	0,48	0,46	0,45
C organique estimé après minéralisation*	0,52	0,50	0,47	0,46	0,44

* estimations des pourcentages en carbone organique calculées par différence avec le CO_2dégagé

Tableau 2-XVII : Extractions à l'eau chaude du carbone organique réalisées sur les échantillons, préalablement lavés, après différents temps d'incubation.

	Temps d'incubation				
	initial	1 semaine	1 mois	2 mois	3 mois
C organique (%)	0,52	0,50	0,48	0,46	0,45
Taux* d'extraction (%)	3,5	4,2	4,2	4,4	5,6

* en pourcentage du carbone organique présent au temps d'incubation correspondant

Au regard des résultats du tableau 2-XVIII, il apparaît que la répartition des matières organiques n'a cessé d'être modifiée tout au long de l'essai. Ainsi au cours de la première semaine la fraction humine diminue au profit d'une augmentation des matières organiques alcalino-solubles, après 1 mois cette tendance s'inverse complètement puisque dans ce cas la fraction humine est plus importante qu'au départ. Au temps T=2 mois une certaine stabilité semble s'être installée, les résultats correspondants sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus à 1 mois. Mais cette tendance ne s'affirme pas car les données obtenues avec l'échantillon prélevé à 3 mois sont d'un tout autre ordre. A ce moment les matières organiques alcalino-solubles représentent presque les trois quarts des matières organiques totales tandis qu'elles n'en représentaient que 60 % après 2 mois d'incubation.

L'étude plus précise de l'évolution des matières organiques et de l'analyse élémentaire des acides humiques au cours de l'incubation (tableaux 2-XVIII et 2-XIX) conduit aux observations suivantes.

Entre l'échantillon initial et celui prélevé après 1 semaine d'incubation, une évolution non négligeable peut être notée dans la répartition des matières organiques et dans la composition des acides humiques impliqués. En effet l'humine qui représente 38 % du carbone organique total pour l'échantillon initial n'en représente plus que 33 % après 1 semaine tandis qu'en contre partie les matières organiques alcalino-solubles ont progressé de 5 % avec essentiellement formation d'acides fulviques. Au regard de ces seuls résultats il semble que les acides humiques n'ont pas été concernés au cours de cette première phase puisque ce compartiment n'a gagné qu' 1 %. Pourtant les teneurs présentées dans le tableau 2-XIX montrent que leur composition a été modifiée car ces résultats des analyses élémentaires mettent en évidence une perte de carbone qui peut correspondre à des décarboxylations ainsi qu'une oxydation (gain d'oxygène) des composés humiques. Ces deux modifications correspondent bien à une oxydation microbienne des acides humiques.

Face à cet ensemble de données, il est possible d'imaginer que les micro-organismes présents ont utilisé le carbone organique mis à leur disposition pour leur développement et que cette activité a donné naissance à des acides fulviques par biotransformation d'acides humiques mais aussi et surtout d'humine. En effet, comme les teneurs en acides humiques n'ont pas diminué mais que leur composition élémentaire a été modifiée, il est tout à fait envisageable de proposer que les acides fulviques (considérés comme plus facilement biodégradables) présents en très faibles proportions n'ont pu être les seuls substrats et que de ce fait les acides humiques ainsi que l'humine ont été utilisés par les micro-organismes pour leur croissance. En effet les teneurs relatives en humine diminuent sensiblement avec la teneur en matières organiques. Ces observations permettent de souligner d'une part la bioaccessibilité de composés réputés stables et même relativement récalcitrants à la biodégradation ainsi que leur biodégradabilité quand les conditions de milieu deviennent favorables et d'autre part les relations qui existent entre les différentes formes de matières organiques.

Tableau 2-XVIII : Répartition des diverses formes de matières organiques associées à l'argile MOMB3 au cours d'une expérience de biodégradation

	Temps d'incubation				
	échantillon initial	1 semaine	1 mois	2 mois	3 mois
C organique (%)	0,52	0,50	0,48	0,46	0,45
C humine*	38	33	40	41	27
C M.O alcalino soluble*	62	67	60	59	73
Q4/6	4,20	4,58	4,66	4,60	4,24
C A.F*	4	8	9	7	6
C A.H*	58	59	51	52	67
AF/AH	0,07	0,14	0,18	0,13	0,09

* exprimé en pourcentage du carbone organique de l'échantillon prélevé au temps correspondant

Tableau 2-XIX : Analyses élémentaires organiques des acides humiques extraits à partir de l'argile MOMB3 au cours d'incubation en aérobiose.

	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	H/C*	O/C*
Echantillon initial	53,94	3,20	1,27	41,59	0,71	0,58
Incubation : 1 semaine	52,41	2,77	1,52	43,30	0,63	0,62
Incubation : 1 mois	55,14	2,84	1,56	40,46	0,62	0,55
Incubation : 2 mois	54,35	2,92	1,54	41,19	0,65	0,57
Incubation : 3 mois	49,32	2,68	1,41	46,59	0,65	0,71

* Rapport atomique

En poursuivant l'incubation, donc la biodégradation, on constate pour l'échantillon prélevé après 1 mois que les processus amorcés au cours de la première semaine ne semblent pas se maintenir. En effet l'humine s'accroît et représente dans ce cas 40 % du carbone organique total (ce qui est même plus que pour l'échantillon initial) tandis que les matières organiques alcalino-solubles ne représentent plus que 60%. Parmi celles ci le compartiment "acides fulviques" reste stable tandis que le pourcentage d'acides humiques a diminué de façon importante. La composition des acides humiques a également été modifiée puisque les composés isolés sont relativement plus riches en carbone et moins en oxygène que ceux purifiés après 1 semaine et même que les acides humiques initiaux.

De toute évidence il s'agit là d'un phénomène très différent de celui observé au cours de la première semaine d'incubation. Il semblerait en effet que les micro-organismes aient développés une activité orientée vers la production d'humine au détriment des acides humiques. Mais la création d'humine microbienne associée à la croissance doit sans doute jouer un rôle, même si le lavage des échantillons permet d'en éliminer une partie.

Après 2 mois d'incubation, aucun changement important ne semble être intervenu. Les résultats obtenus après le premier et le deuxième mois d'incubation sont très similaires que ce soit pour la répartition des trois classes de matières organiques ou pour la composition élémentaire des acides humiques. Seul le pourcentage en acides fulviques a légèrement diminué.

Cette stabilité apparente, malgré la minéralisation du carbone, est de courte durée. En effet au cours du dernier mois d'incubation la perte du carbone organique total sous forme de CO_2 n'est que de 0,01 % mais de grandes modifications ont eu lieu en ce qui concerne la distribution des matières organiques et la composition des acides humiques. L'humine décroît au profit d'une augmentation des matières organiques alcalino-solubles qui représentent alors 73 % du carbone organique total. Cette augmentation de la teneur en produits alcalino-solubles s'accompagne de celle des acides humiques qui atteint 67 % du carbone organique total contre seulement 52 % le mois précédent et 58 % pour l'échantillon initial. Le changement observé dans la composition élémentaire des acides humiques est également de grande ampleur puisque durant ce dernier mois ils ont perdu 5 % de carbone et ont gagné 5 % d'oxygène.

Par ailleurs, il est également très important de souligner l'existence d'une parfaite corrélation entre l'extractibilité des matières organiques alcalino-solubles et la teneur en oxygène des acides humiques (tableaux 2-XVIII et 2-XIX). En effet le taux d'extractibilité augmente quand la teneur en oxygène des acides humiques augmente, et à l'inverse, il diminue quand la teneur en oxygène des acides humiques diminue. Ceci est du au fait que les composés oxydés sont plus hydrophyles donc plus extractibles.

L'activité microbienne semble favoriser dans un premier temps la production d'humine puis d'acides humiques en oxydant les matières organiques. Cette évolution pourrait, en accord avec les dénombrements de peuplements

microbiens, correspondre à la production d'humine microbienne puis à son oxydation et à sa biodégradation. La microflore apparaît ainsi comme un agent fondamental de l'oxydation des matières organiques.

Les matières organiques alcalino-solubles étudiées tout au long de cet essai sont en forte proportion constituées d'acides humiques, de ce fait les rapports Q 4/6 déterminés sont très faibles et varient peu. Ces valeurs indiquent que les composés présents sont condensés. Ce fait est confirmé par les rapports d'aromaticité H/C des acides humiques puisque ceux ci sont compris entre 0,6 et 0,7 : chiffres caractéristiques de structures à dominantes aromatiques.

Les matières organiques associées aux argiles subissent donc des transformations dues à l'activité microbienne au cours des trois mois qu'a duré cet essai. Ces modifications se répercutent au niveau de la répartition des différentes classes de matières organiques et de la composition élémentaire des acides humiques. Ce dernier point amène à réaliser et à étudier les spectres infrarouges des acides humiques purifiés, afin d'obtenir des informations sur la nature des groupements fonctionnels et des structures moléculaires concernés par les biotransformations et les dégradations.

Les acides humiques extraits à partir de l'échantillon MOMB3 initial (figure 2-18 : AHM3/init) sont des composés peu aliphatiques (pic à 2 950 cm^{-1} de faible intensité). Ils sont porteurs de fonctions alcools (pic à 1 050-1080 cm^{-1} bien marqué) et sont également et surtout très acides (pic à 1 710 cm^{-1} et épaulement à 2 500 cm^{-1} importants) et aromatiques (bande centrée vers 1 630 cm^{-1} intense).

Le spectre des acides humiques purifiés à partir de l'échantillon prélevé après une semaine d'incubation (AHM3/1s) témoigne de quelques modifications puisque la bande due aux vibrations des liaisons C-H aliphatiques (2 950 cm^{-1}) est moins marquée tandis que celle relative aux liaisons C-O des groupements alcools (1 050 cm^{-1}) est plus intense. Ceci est en accord avec les variations observées au niveau des analyses élémentaires : perte de carbone et oxydation des composés. Les chaînes aliphatiques présentes, ainsi que les structures aromatiques, ont pu être oxydées, sous l'action des micro-organismes, au profit d'une augmentation des fonctions alcools.

En observant les spectres relatifs aux acides humiques issus des échantillons prélevés après 1 mois et 2 mois (AHM3/1m et AHM3/2m), il est possible de constater qu'ils sont semblables entre eux et qu'ils différent de celui précédemment décrit par la faible expression de la bande alcool. En effet celle ci s'est totalement amenuisée et est même plus discrète que dans les composés initiaux. Là encore les compositions élémentaires des acides humiques concernés suggéraient cette variation car les pourcentages en oxygène sont plus faibles pour AHM3/1m et AHM3/2m que pour tous les autres cas.

Les variations les plus remarquables se situent au niveau du spectre des acides humiques correspondants à l'échantillon après 3 mois d'incubation (AHM3/3m). Il a déjà été possible avec cet échantillon d'observer des modifications importantes dans la répartition des différentes classes de matières organiques

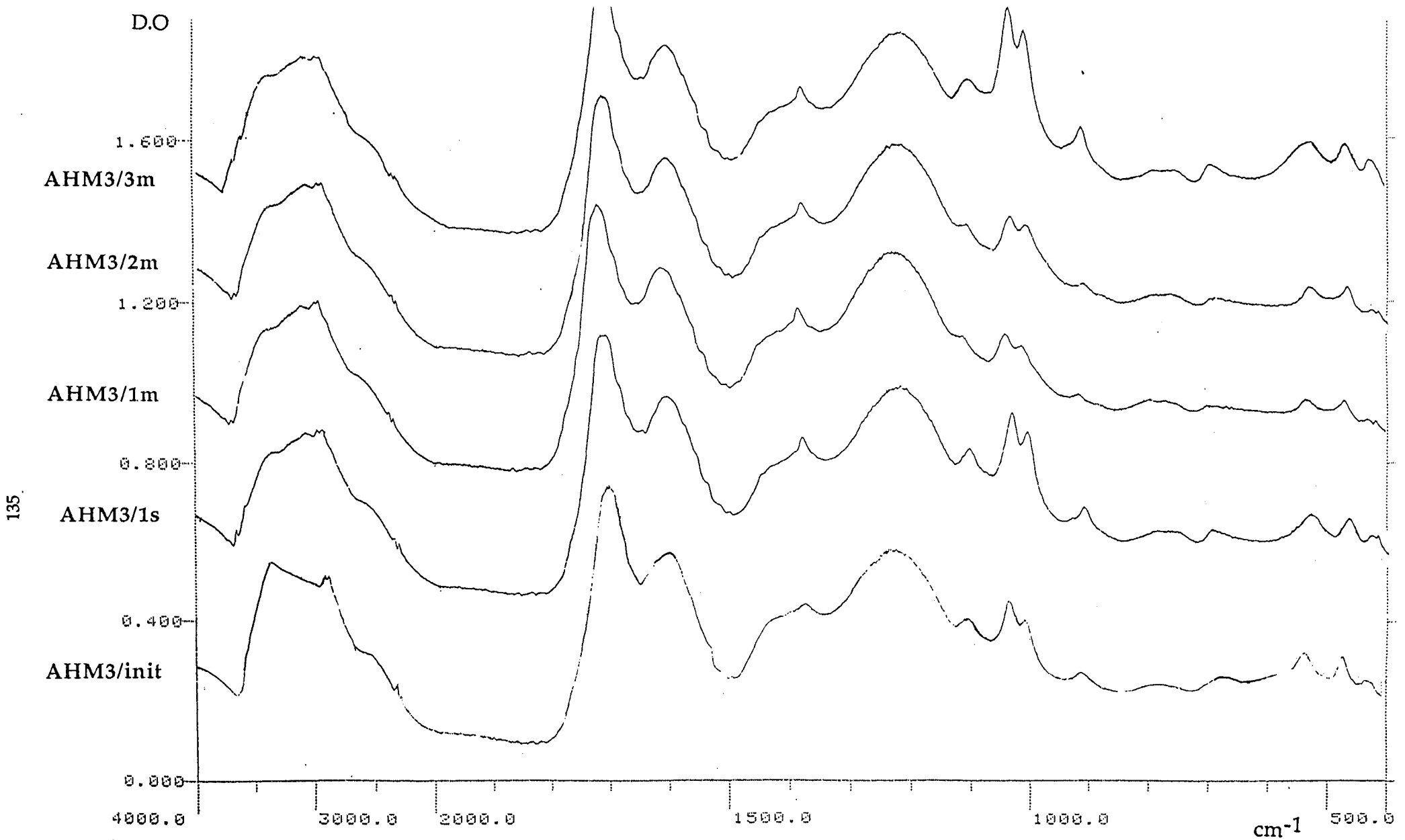


Figure 2-18 : Spectres d'absorption dans l'infrarouge des acides humiques associés à l'argile MOMB3 initiale ainsi qu'à cette même argile après respectivement 1 semaine, 1 mois, 2 mois et 3 mois d'incubation.

ainsi que dans la composition élémentaire organique des acides humiques. Ces changements sont maintenant révélés grâce au spectre infrarouge, lequel met en évidence la quasi disparition de la bande aliphatique et l'ampleur prise par la bande alcool.

Ces remarques sont identiques à celles émises au sujet du spectre obtenu avec AHM3/1s. Il y a donc une corrélation entre l'intensité de la bande alcool et la teneur en oxygène des acides humiques. Les compositions élémentaires des composés purifiés après une semaine et après trois mois d'incubation affichent en effet des pourcentages en oxygène assez élevés, respectivement égaux à 43,3 % et 46,6 %. Les phénomènes d'oxydation, relevés par l'analyse organique élémentaire, mis en relation avec les observations des groupements fonctionnels concernés suggèrent une oxydation des chaînes aliphatiques et des cycles aromatiques sous l'action des microflores, l'augmentation du nombre de fonctions alcools découlant directement de cette action.

Dans l'ensemble, les spectres réalisés à partir des acides humiques permettent de constater que certaines fonctions chimiques sont plus touchées que d'autres par l'action des micro-organismes. Ainsi il apparaît que les liaisons C-H aliphatiques ou aromatiques ont été concernées en priorité par des phénomènes d'oxydation puisque ce type de groupement fonctionnel a diminué au profit de l'augmentation des fonctions alcools (liaison C-O) tout au long de la biodégradation mais plus sensiblement dans la première et la dernière phase. Par contre les groupements carboxyliques ne semblent pas avoir été modifiés par les bactéries ou ont été renouvelés au cours des oxydations car le pic vers 1 710 cm^{-1} et l'épaulement à 2 500 cm^{-1} restent inchangés pour l'ensemble des spectres.

Les matières organiques associées aux argiles de l'échantillon MOMB3 ont été fortement modifiées par l'activité microbienne qui s'est développée au cours de l'incubation. En plus d'un taux de carbone minéralisé de l'ordre de 15 %, des modifications importantes dans la répartition des trois classes que sont les humines, les acides humiques et les acides fulviques ainsi que dans la structure même des acides humiques ont pu être relevées. Les principaux phénomènes observés, après trois mois, correspondant à une évolution dans le sens Humine --> Acides Humiques, ceux ci étant oxydés, avec une légère augmentation de la part prise par les acides fulviques. Ces transformations impliquent des réactions d'oxydation qui se font au détriment des liaisons C-H des structures aliphatiques et aromatiques pour aboutir à des fonctions alcools. Les groupements carboxylés, malgré le fort dégagement de CO_2, ne sont pas concernés ou sont renouvelés au fur et à mesure du déroulement de ces oxydations et biodégradations bactériennes.

IV-2-4 Relations entre la biotransformation des matières organiques et l'évolution des peuplements bactériens

Après avoir observé le développement des microflores autochtones présentes dans les argiles d'une part et l'évolution des matières organiques naturelles en

présence de ces micro-organismes d'autre part, il semble important de chercher à établir d'éventuelles relations entre ces deux types d'approche.

Ainsi, en comparant les différentes phases de la croissance bactérienne et les changements intervenus dans la répartition des matières organiques durant les 90 jours d'incubation, les faits suivants sont à souligner :

- au cours de la première semaine faisant suite à la mise en contact entre argile et solution minérale, un important développement bactérien peut être observé. Celui ci s'accompagne d'une phase de simplification des structures des matières organiques puisque les pourcentages d'humine diminue au profit des matières organiques alcalino-solubles avec notamment un gain de 4 % des teneurs relatives en acides fulviques.
- entre 1 semaine et 2 mois d'incubation, les bactéries sont en phase de croissance stationnaire. Au cours de cette phase les cellules continuent à se diviser, plus lentement, et la dégénérescence d'une partie de la population compense toute augmentation du nombre de cellules. La lyse bactérienne libère sans doute dans le milieu des matières organiques réutilisées par les autres cellules. Les conséquences physiologiques d'un tel phénomène ne sont pas négligeables car les taux de synthèse de diverses enzymes doivent être modifiés. Il est certain que les bactéries en phase stationnaire n'ont plus les mêmes propriétés que celles en phase exponentielle de croissance (Pelmont, 1993).

Dans le cas présent, les changements se traduisent par des modifications différentes des matières organiques. Cette période correspond à une augmentation des composés inextractibles puisque les pourcentages d'humine sont de l'ordre de 40 %. L'activité bactérienne semble donc participer à la création d'humine probablement en favorisant d'une part la synthèse de composés complexes, et d'autre part la formation d'humine dite microbienne constituée de composants cellulaires.

- au cours de la phase de déclin, correspondant au dernier mois d'incubation, le nombre de bactéries diminue. Beaucoup d'entre elles meurent et sont lysées par les enzymes qu'elles libèrent. Là encore les conséquences physiologiques sont importantes et la nutrition des bactéries change. En ce qui concerne les matières organiques, c'est pendant cette période que les modifications les plus importantes ont pu être relevées. Il s'est produit un véritable bouleversement qui a conduit à la diminution de l'humine et à l'augmentation relative des acides humiques dont la structure a par ailleurs été très fortement modifiée par la formation de fonctions alcools.

Cet ensemble de remarques permet d'établir un lien entre l'évolution des populations microbiennes et celle des matières organiques associées aux argiles. En effet, le développement de l'activité microbienne provoque des modifications du milieu et en particulier des matières organiques sources de carbone et d'énergie. Il est ainsi possible de distinguer trois grandes phases de modification de la nature et de la structure des matières organiques et des acides humiques qui correspondent aux phases de la croissance microbienne (phase exponentielle, phase stationnaire et phase de déclin).

IV-2-5 Conclusions

Des expériences de biodégradation des matières organiques associées aux argiles MOMB3, sur une longue période (3 mois), ont mis en évidence une minéralisation de 15 % du carbone organique total. Cette minéralisation, évaluée par la mesure du CO_2 dégagé, a également été vérifiée par l'analyse élémentaire des échantillons. Elle a montré une diminution de la teneur en carbone qui est passée de 0,52 % à 0,45 %.

La densité microbienne initiale de l'argile MOMB3 s'est révélée assez faible mais les micro-organismes présents étaient parfaitement viables et, une fois placés en conditions favorables d'humidité et de température, ils se sont multipliés rapidement avec des temps de génération de 0,5 heures au cours des six premières heures de culture. Le peuplement maximum, de l'ordre de 10^7 UFC/g, a été atteint dès le septième jour d'incubation et la phase de déclin s'est amorcée à partir du soixantième jour. Il est apparu que la communauté bactérienne autochtone comprenait une majorité d'organismes à caractère oligotrophe.

L'activité de ces microflores s'est traduit par une minéralisation importante des matières organiques au cours de la phase de croissance exponentielle et en début de phase stationnaire. La minéralisation s'est poursuivie de façon moins importante mais toujours significative pendant la phase stationnaire ainsi qu'en début de la phase de déclin. Les résultats obtenus ont permis de distinguer trois grandes phases de modification de la nature et de la structure des matières organiques et des acides humiques qui correspondent aux phases de la croissance microbienne. Ainsi, la croissance exponentielle des microflores s'est accompagnée d'une étape de simplification des structures des matières organiques. La phase stationnaire a conduit à une augmentation des composés inextractibles et un véritable bouleversement s'est produit au cours du début du déclin de la croissance. En effet, à la fin du troisième mois de biotraitement, une diminution brutale de l'humine ainsi qu'une augmentation relative des acides humiques ont été observés.

Les matières organiques associées aux argiles ont donc été fortement modifiées par cette activité microbienne. En plus d'un taux de carbone minéralisé de l'ordre de 15 %, des modifications importantes dans la répartition des trois catégories que sont les humines, les acides humiques et les acides fulviques ainsi que dans la structure même des acides humiques ont pu être relevées. Les principaux phénomènes observés, après trois mois, correspondent à une évolution dans le sens Humine --> Acides Humiques avec une légère augmentation de la part prise par les acides fulviques. Il semble que les acides humiques impliqués ont été oxydés à plusieurs niveaux, d'une part sur les fonctions aliphatiques avec création de groupements hydroxyles et d'autre part sur les cycles aromatiques avec génération de fonctions aliphatiques hydroxyles. Le développement microbien a également généré la production de composés organiques dont une grande partie est hydrosoluble à froid. Un traitement supplémentaire à l'eau chaude étant nécessaire pour éliminer une autre partie de ces composés qui sont, au moins en partie, de nature polysaccharidique.

La microflore autochtone est apparue comme un agent fondamental de l'oxydation des matières organiques qui, dans leur ensemble, ont été concernées par la biodégradation. Les résultats obtenus ont donc également permis de souligner l'existence de multiples interactions entre les différentes formes de matières organiques

Chapitre V : Conclusions de la deuxième partie

Il s'agissait, dans cette deuxième partie, d'étudier la minéralisation ainsi que les transformations des matières organiques associées à des argiles soumises à la dégradation microbienne. Pour cela, après avoir déterminé les paramètres favorables à l'activité des peuplements bactériens autochtones, des incubations ont été réalisées sur des périodes longues (trois mois), avec trois échantillons différents dénommés SEIG1, SEIG4 et MOMB3.

L'ensemble des essais a été mené dans des conditions identiques et certaines mesures ainsi que l'évolution de divers paramètres permettent d'établir des comparaisons entre les différentes séries de résultats. L'absence de lavages, après incubation, des échantillons SEIG1 et SEIG4 n'a toutefois pas permis d'établir des bilans précis en analysant les résidus d'incubation car une partie importante des matières organiques résiduelles (hydrosoluble à chaud et en partie de nature polysaccharidique) était toujours prise en compte. Malgré cet inconvénient il faut souligner que dans les trois cas les consortiums bactériens ont pu agir dans des conditions analogues et minéraliser des quantités importantes de matières organiques.

L'évolution des matières organiques a été plus particulièrement déterminée par quelques unes des propriétés telles que : les teneurs en carbone organique, la répartition des diverses formes de matières organiques ainsi que, pour les argiles SEIG4 et MOMB3, la structure et la nature des acides humiques concernés. En effet, le compartiment "acides humiques" est le seul qui puisse être approché très précisément puisque l'humine, par définition, est inextractible tandis que les acides fulviques, présents en faibles quantités, sont trop difficiles à purifier.

En regroupant les résultats relatifs à ces essais de biodégradation (tableau 2-XIX), il apparaît que les actions bactériennes sont des plus variées.

Pour des argiles à faibles teneurs en matières organiques : SEIG1 (Carbone organique initial = 0,11 %), il n'y a que de très faibles variations entre les propriétés initiales et celles déterminées après trois mois d'incubation. Avec une minéralisation de 25 % du carbone organique, il semble que les modifications correspondent plutôt à une simplification du degré de condensation des produits.

Pour des argiles à teneurs plus importantes en matières organiques : SEIG4 (Carbone organique initial = 0,41 %) présentant 67 % de matières organiques alcalino-solubles dont 27 % d'acides fulviques, une évolution très significative est observée dans la répartition des différentes familles. En effet, dans ce cas, les acides fulviques sont préférentiellement biodégradés. Les acides humiques, dont la teneur relative augmente, sont oxydés au niveau de leurs cycles aromatiques et/ou polyaromatiques. Avec cet échantillon, 12 % du carbone organique est minéralisé.

Tableau 2-XX : Tableau récapitulatif concernant la répartition des diverses formes de matières organiques des échantillons avant et après biodégradation de trois mois.

	SEIG1 initial	SEIG1(1) 3 mois	SEIG4 initial	SEIG4(1) 3 mois	MOMB3 initial	MOMB3 3 mois
COT (%)	0,11	0,11	0,41	0,41	0,52	0,45
Carbone humine*	62	59	33	42	38	27
C M.O alcalino solubles*	38	41	67	58	62	73
Q4/6	4,5	6,4	6,8	5,7	4,2	4,3
C A.F*	23	24	27	11	4	6
C A.H*	15	17	40	47	58	67
A.F/A.H	1,53	1,41	0,68	0,23	0,07	0,09
Carbone minéralisé*		0,25		0,12		0,15
Carbone hydrosoluble à chaud *	12,5	25,6	9,2	27,1	3,5	5,6

(COT : Carbone Organique Total ; C MO alcalino-solubles : Carbone des matières organiques alcalino-solubles ; C AF : Carbone des Acides Fulviques ; C AH : Carbone des Acides Humiques)

* exprimé en pourcentage du carbone organique correspondant

(1) échantillons non lavés après biodégradation

Pour des argiles à teneurs en matières organique encore plus élevées : MOMB3 (Carbone organique initial = 0,52 %) dont la matière organique alcalino-soluble est présente en quantité importante (62 % du carbone organique total) et est essentiellement constituée d'acides humiques (58 %), l'évolution après 3 mois d'action bactérienne est conséquente. Avec une minéralisation de 15 % du carbone organique, les principaux phénomènes observés correspondent à une évolution dans le sens Humine --> Acides Humiques. Cette évolution correspond à une simplification de la structure des composés organiques, tandis qu'une légère augmentation des acides fulviques peut être notée. Par ailleurs, les acides humiques semblent avoir été oxydés sur les chaînes aliphatiques mais également et surtout sur les cycles aromatiques avec formation de groupements hydroxyles.

Les kaolins SEIG1, SEIG4 et MOMB3 différent entre eux par les teneurs en carbone organique ainsi que par les répartitions des principales familles de matières organiques associées aux argiles. Pour ces trois types d'échantillons représentatifs, la stimulation des microflores autochtones a provoqué une minéralisation et une biotransformation différente des matières organiques. Les peuplements bactériens paraissent pourtant assez proches car les colonies observées sur boites dans les différents cas étaient en grande partie semblables. Il y aurait donc, en fait, une "adaptation" des bactéries hétérotrophes vis-à-vis des matières organiques en vue de l'utilisation de sources carbonées différentes plus ou moins accessibles.

Dans tous les cas les acides humiques ont été oxydés. Ces étapes d'oxydation sont souvent rencontrées dans la biodégradation de substrats insolubles et récalcitrants car l'introduction de groupes polaires à pour effet d'accroître le caractère hydrophile des composés et de faciliter leur dégradation ultérieure (Pelmont, 1993). De nombreux auteurs étudiant la biodégradation de la lignine (Kirk et Farrell, 1987 ; Haider, 1991) ont pu observer des phénomènes semblables à ceux que nous avons mis en évidence pour les acides humiques. En effet ils ont soulignés que l'attaque par les micro-organismes ligninolytiques induisait des oxydations (augmentation des groupements hydroxyles et carboxyles) aussi bien sur les structures aliphatiques que sur les structures aromatiques ainsi que des ouvertures des cycles aromatiques.

Des transformations semblables à celles observées après biodégradation, c'est à dire entre autre des simplifications des structures des matières organiques, ont également été mises en évidence dans les matières organiques associées aux dépôts de phosphates quand ceux-ci sont mis en conditions oxydantes ou sont remis à l'affleurement (Benalioulhaj et Trichet, 1990).

Ces résultats montrent que la modification des conditions de milieu peut conduire à la stimulation de peuplements microbiens hétérotrophes capables d'oxyder et de minéraliser, significativement, des matières organiques considérées comme stabilisées. Les altérations des molécules organiques correspondent à une biodégradation ainsi qu'à une biotransformation. Les acides humiques peuvent subir des modifications importantes de leur composition ainsi que de leur structure chimique.

Des résultats obtenus par Blondeau (1988) et par Kontchou et Blondeau (1990) après observation de la dégradation d'acides humiques purifiés par une culture bactérienne préalablement adaptée leur avaient suggéré que la biotransformation des molécules conduisait à une diminution des teneurs en hydrates de carbone et à quelques modifications des contenus en groupements carboxyliques avec des composés humiques naturels (acides humiques et acides fulviques). Ces résultats, en se référant à quelques modèles structuraux (Stevenson, 1982 ; Andreux et Munier-Lamy, 1994), sont plutôt en faveur d'une action des micro-organismes sur les chaînes et les parties périphériques des molécules. Ramunni et al (1987) ont également établi des conclusions semblables en décrivant une utilisation préférentielle des constituants les plus labiles et les plus accessibles. Nos résultats apportent un point de vue nouveau puisqu'il apparaît que les structures aromatiques des acides humiques AHS4 et AHM3 ont été concernées et sont sensibles aux phénomènes d'oxydation bactérienne. Mais il faut remarquer que les auteurs précédemment cités ont utilisé des composés humiques relativement peu condensés (H/C > 1,1 dans tous les cas) donc plus riches en structures aliphatiques que ceux mis en évidence dans les argiles.

Kontchou et Blondeau (1990) ont également étudié l'effet d'une communauté microbienne sur deux types de mélanoïdines de synthèse (glucose + glycine et glucose + acide glutamique) ainsi que sur un polymère synthétique (catéchol-glycine) modèle d'acide humique (Mal et al, 1983). Mais tout comme Ivarson et Benzing-Purdie (1987) ils ont pu constater que ces composés humiques de synthèse sont exceptionnellement récalcitrants, et sont moins sensibles à l'action bactérienne que les acides humiques naturels.

Il aurait également été intéressant d'observer l'effet d'une biodégradation sur la structure et la nature des acides fulviques, mais les essais menés dans le cadre de cette étude n'ont permis d'approcher précisément que le compartiment "acides humiques". Toutefois il est possible de faire une analogie avec les résultats obtenus par Kontchou et Blondeau (1990).

Théoriquement les acides fulviques devraient être considérés comme plus aisément dégradables que les acides humiques car ils sont présentés comme des molécules plus sensibles à l'hydrolyse acide (Barriuso et al, 1987), disposant d'un plus grand nombre de chaînes aliphatiques et présentant un moindre degré d'aromaticité (Andreux, 1994), ainsi qu'un temps de résidence (estimé par datation au C^{14}) moyen plus court (Campbell et al, 1967). Mais les résultats observés (Kontchou et Blondeau, 1990) ont révélés que les acides fulviques n'étaient pas apparu plus sensibles à la biodégradation que les acides humiques.

Troisième Partie :

Influence de la biodégradation des matières organiques et du développement microbien sur certaines propriétés des argiles et des acides humiques

Chapitre I : Introduction

Historiquement la dénomination "kaolin" dérive directement du nom "Kau ling", village de Chine (province de Jiangxi) près duquel un gisement de kaolin était exploité dès le troisième siècle avant J.C (Kuzvart, 1984). Dans ces temps anciens, l'ingéniosité des chinois, servie par des matières premières favorables, avait permis de perfectionner et de faire varier les procédés de fabrication afin d'obtenir des céramiques et des porcelaines dont la délicatesse et la résistance sont bien connues.

Une technique traditionnelle héritée des anciens potiers chinois est le "pourrissage" des suspensions argileuses avant façonnage. Ce procédé ancestral appliqué, selon les historiens, depuis le deuxième siècle avant J.C consistait à stocker les argiles mélangées à de l'eau dans des caves de vieillissement durant plusieurs mois parfois même des années (Glick, 1936). Ce moyen avait plusieurs effets car il permettait d'améliorer les qualités des argiles destinées au façonnage et faisait diminuer la fréquence d'apparition des défauts tels que les cloques et les fentes au séchage (Brongniart, 1877).

Les modifications subies par les suspensions argileuses au cours du vieillissement ont rapidement été imputées au développement d'une activité microbienne et de nombreux éléments en faveur de cette hypothèse ont pu être relevés : l'intérêt d'inoculer les suspensions argileuses avec une petite quantité de pâte vieillie afin de gagner sur le temps de repos, l'apparition de dégagements de CO_2, le choix judicieux d'un apport d'eau et d'une température ambiante comprise entre 26°C et 32°C (Glick, 1936).

Le procédé de vieillissement des argiles consiste donc à recréer des conditions de milieu favorables au développement des microflores autochtones afin d'agir sur les propriétés des argiles, notamment au niveau de leur comportement rhéologique (viscosité, plasticité), ces modifications se répercutant ultérieurement sur toutes les phases de la fabrication céramique.

Les expériences mises en oeuvre dans la deuxième partie de ce travail visaient à induire la biodégradation des matières organiques associées aux argiles en favorisant l'activité des micro-organismes hétérotrophes autochtones. Elles peuvent donc être mises en étroite relation avec le procédé de vieillissement puisque dans les deux cas le développement des microflores autochtones est privilégié.

Les résultats obtenus dans la deuxième partie de l'étude ont mis en évidence des minéralisations importantes du carbone organique ainsi que des modifications dans la répartition et dans les structures des diverses formes de matières organiques. Jusqu'à présent les composés humiques et leur devenir au cours des incubations ont été les principaux sujets d'études. Or, comme cela vient

d'être rappelé, il a été proposé que le développement des activités biologiques pouvait intervenir de façon conséquente sur diverses propriétés des argiles. Il est donc important de vérifier de telles hypothèses.

De plus en complément de l'intérêt particulier qui a été porté aux acides humiques tout au long de ce travail, il semble indispensable d'envisager l'effet de la biodégradation sur les propriétés de ces composés car ils sont apparus très réactifs et ont été des sites d'action privilégiés pour les micro-organismes.

Chapitre II : Méthodes d'étude mises en oeuvre

La transformation des matières organiques associées aux kaolins sous l'action d'une activité microbienne peut avoir une incidence tant sur les propriétés des argiles que sur celles des acides humiques. Diverses techniques ont donc été choisies afin de vérifier de telles hypothèses.

L'influence de la biodégradation des matières organiques ainsi que du développement des microflores a été envisagée en déterminant le comportement thermique, le comportement rhéologique ainsi que la blancheur des kaolins.

Pour ce qui concerne les acides humiques, l'intérêt s'est essentiellement porté vers leur comportement thermique lors de pyrolyses en atmosphère oxydante. De plus, pour cette étude, des tentatives d'identification des produits de pyrolyse ont été réalisés par spectrométrie de masse.

II-1 Analyse thermique différentielle et analyse thermogravimétrique des argiles

Deux techniques sont décrites dans cette partie :

- l'Analyse Thermique Différentielle (ATD) qui mesure la différence de température entre l'échantillon et une référence lors d'un gradient de chauffage
- L'Analyse ThermoGravimétrique (ATG) qui mesure l'évolution de la masse de l'échantillon en fonction de la température appliquée

Le principe de l'ATD est de mettre en évidence la quantité de chaleur produite ou consommée résultant des transformations physiques et chimiques subies par l'échantillon. Les mesures sont effectuées au cours d'une montée en température continue et les écarts de température sont évalués en comparant la température de l'échantillon étudié à celle d'un échantillon inerte. Le tableau 3-I présente le caractère énergétique des phénomènes les plus souvent rencontrés en ATD.

Le principe de l'ATG est d'indiquer les pertes de poids d'un échantillon soumis à un traitement thermique.

Ces deux techniques pouvant être réalisées seules ou couplées.

Les ATD et ATG des argiles SEIG1, SEIG1/3m, SEIG4 et SEIG4/3m ont été réalisées au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (Vandoeuvre-lès-Nancy) avec l'analyseur thermique SETARAM B70 équipé d'une tête universelle ATD-ATG. Les pertes de masse sont mesurées par compensation magnétique, la température et l'ATD le sont à l'aide de thermocouples Pt-Pt rhodié.

Tableau 3-I : Signature thermique de divers évènements pouvant avoir lieu au cours de la calcination (Villieras, 1993)

PHENOMENE	ENDOTHERMIQUE	EXOTHERMIQUE
Transition cristaline	+	+
Fusion	+	
Vaporisation - Sublimation	+	
Adsorption -Absorption		+
Désorption	+	
Chimiosorption	+	+
Désolvatation - Déshydratation	+	
Déhydroxylation	+	
Décomposition	+	
Oxydation - Réduction	+	+
Réactions à l'état solide	+	+

Les analyses sont réalisées en atmosphère auto-engendrée, à des vitesses de chauffe de 10 °C/min. Les prises d'essai sont de 200 mg. La matière inerte utilisée comme référence est une chlorite calcinée.

II-2 Estimation du degré de viscosité des pulpes argileuses

Les mesures de degré de viscosité des pulpes argileuses sont réalisées en utilisant un viscosimètre pendulaire à torsion de Gallencamp. Le degré de viscosité du produit analysé est caractérisé par la valeur de l'angle d'amortissement obtenu.

Les détails relatifs au mode opératoire sont donnés en annexe 8.

Ce type de mesure a été effectué à divers moment au cours de l'incubation de l'argile MOM3 (Deuxième partie, chapitre IV) afin de pouvoir déterminer l'effet de l'activité microbienne sur la texture des suspensions argileuses.

II-3 Mesures de la blancheur des argiles

La blancheur de pastilles d'argile est mesurée par réflexion diffuse à trois longueurs d'onde : une dans le jaune (Rx), une dans le vert (Ry) et une dans le bleu (Rz). L'appareil utilisé (DR LANGE Micro Color Arbeitsstandard) est étalonné à partir d'un témoin standard : la barytine. Ces mesures ont été réalisées dans les laboratoires du département Géomatériaux et géoprocédés du BRGM (Orléans).

Ces mesures de blancheur ont été effectuées sur l'argile MOM3 initiale ainsi que sur cet échantillon issu de trois traitements différents, c'est à dire :
- sur MOMB3 après extraction des matières organiques alcalino-solubles
- sur MOMB3/3m qui correspond à l'argile après trois mois d'incubation
- sur MOMB3/3m (cas précédent) après extraction des matières organiques alcalino-solubles

II-4 Comportement thermique des acides humiques

Le comportement thermique des acides humiques AHS4/3m (extraits et purifiés à partir de l'argile SEIG4 après trois mois d'incubation) est étudié en appliquant un protocole identique à celui mis au point dans la première partie de ce travail. Ceci permettra, bien entendu, d'effectuer des comparaisons entre les résultats obtenus pour les acides humiques AHS4 et les acides humiques AHS4/3m.

Des prises d'essais de 20 mg d'acides humiques déshydratés sont traitées à 5

atmosphère oxydante pendant une durée d'une heure (four Mettler BE 20).

Pour chaque essai envisagé (toujours réalisé en double), les mesures porteront sur la perte de poids, les teneurs des éléments C, N et H dans le résidu (autoanalyseur CHNS + O Carlo Erba) et l'absorption dans l'infrarouge du résidu (spectrophotomètre Shimadzu).

II-5 Caractérisation des produits de pyrolyses des acides humiques par couplage chromatographie phase gazeuse - spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet d'obtenir des renseignements sur les masses moléculaires et les structures des composés à étudier. Le fonctionnement du système de détecteur à piégeage d'ions qui a été utilisé peut se résumer très succinctement en quatre étapes successives:

- séparation des composés issus du mélange complexe injecté par chromatographie gazeuse capillaire
- ionisation des molécules de l'effluent chromatographique (en impact électronique ou en ionisation chimique)
- calcul des masses ioniques et obtention du spectre de masse de chacun des composés séparés précédemment
- identification des produits à partir de leur spectre de masse par recherche comparative dans une bibliothèque

Cet ensemble, illustré par la figure 3-1, procure donc un moyen d'identification structural grâce à la double information sur les temps de rétention et les spectres de masse des composés.

Les analyses ont été réalisées lors des pyrolyses des acides humiques AHS4/3m précédemment décrites. Les composés gazeux entraînés par le flux d'air ont été piégés en sortie de four dans un solvant (le dichlorométhane) pour être étudiés en spectrométrie de masse.

L'appareil utilisé est un couplage GC-MS de marque VARIAN constitué par :

- un chromatographe en phase gazeuse VARIAN 3400 CX
- un détecteur ION-TRAP système SATURN 3
- un injecteur SPI
- une colonne DB5 MS 30 mètres ID 0,25 mm 0,25 µm

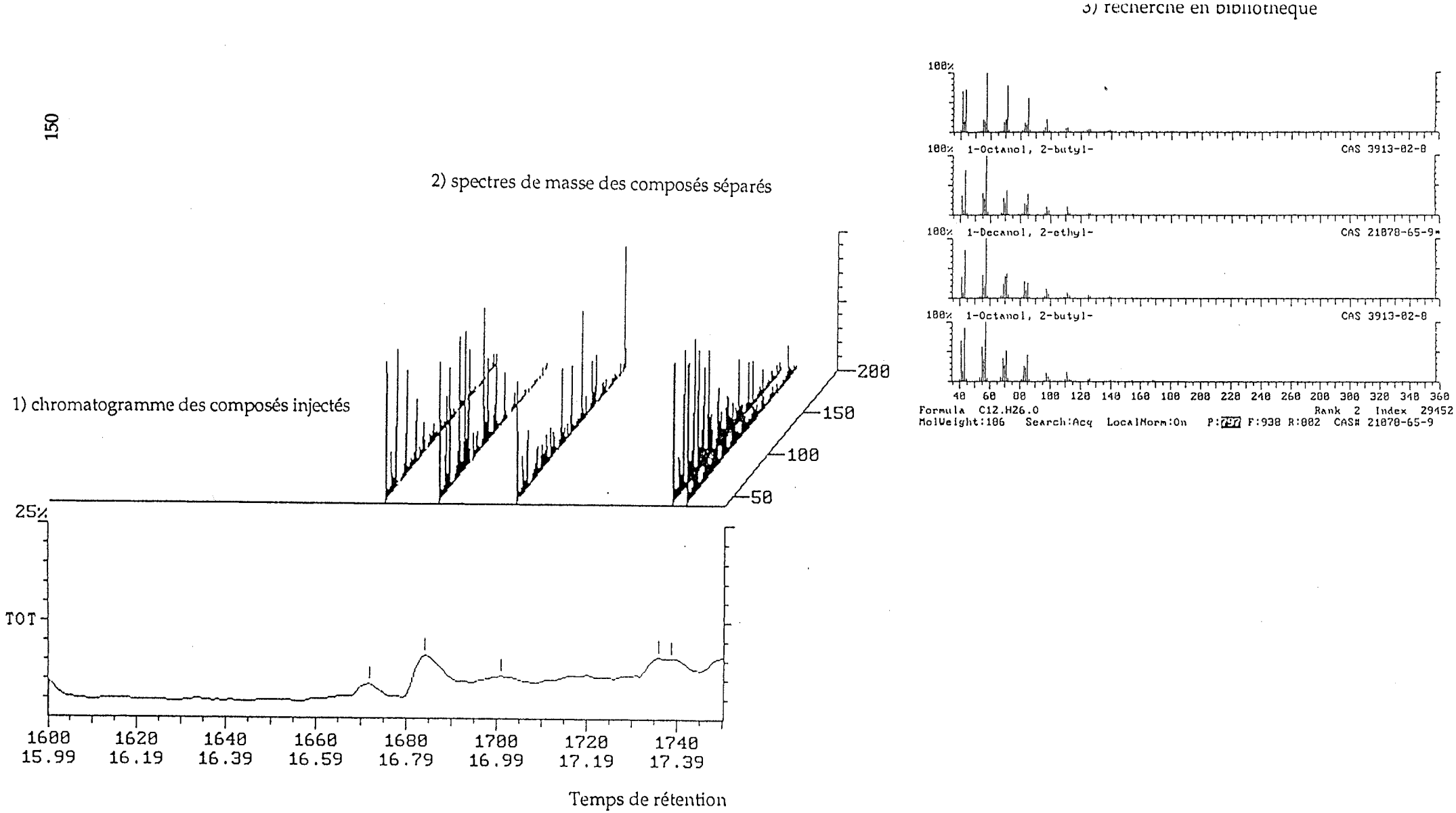


Figure 3-1 : Schématisation des données obtenues grâce au système de couplage Chromatographie phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse (GC-MS).

Chapitre III : Influence de la biodégradation des matières organiques sur les propriétés des argiles

Le développement d'une microflore bactérienne aux dépends des matières organiques associées aux argiles peut modifier les propriétés de ces argiles soit directement, en agissant sur les kaolins eux-mêmes, soit indirectement, en modifiant les matières organiques. Pour cette raison, diverses méthodes d'études ont été appliquées aux échantillons afin d'observer d'éventuelles variations de leurs propriétés.

III-1 Influence de la biodégradation sur le comportement thermique des argiles

L'ATD et l'ATG sont deux techniques thermiques habituellement utilisées pour obtenir des renseignements qualitatifs et quantitatifs sur les matériaux argileux. Elles peuvent aider à la caractérisation de la nature des argiles, seules ou en mélange, et donner également des indications précieuses sur leurs comportements au cours d'une cuisson. Sachant que la présence de matières humiques intervient sur l'allure des courbes obtenues, il semble possible que ces méthodes puissent mettre en évidence une éventuelle incidence de la biodégradation des matières organiques sur les propriétés thermiques des kaolins étudiés (Jouenne, 1979).

III-1-1 Analyses thermique différentielle

Les courbes d'ATD présentent en abscisse les températures appliquées et en ordonnée les différences de températures mesurées, à l'aide de thermo-couples, entre l'échantillon à analyser et un témoin. Sur les figures 3-2 (a et b) et 3-3 (a et b) les réactions exothermiques se traduisent par des crochets orientés vers le bas alors que les réactions endothermiques provoquent l'apparition de crochets orientés vers le haut.

Les argiles SEIG1, SEIG1/3m, SEIG4 et SEIG4/3m, correspondant à des échantillons avant et après trois mois d'incubation, sont toutes caractérisées par des pics identiques situés à des températures semblables : trois pics endothermiques vers 130°C, 180°C et 560°C ainsi qu'un pic exothermique vers 940°C.

Les pics endothermiques à basse température (< 200°C) sont liés au départ de l'eau d'hydratation (ou eau libre) ainsi qu'à la minéralisation des matières humiques. Celui à haute température (> 500°C) correspond à la perte de l'eau de constitution de la kaolinite (passage à la métakaolinite) et à la destruction

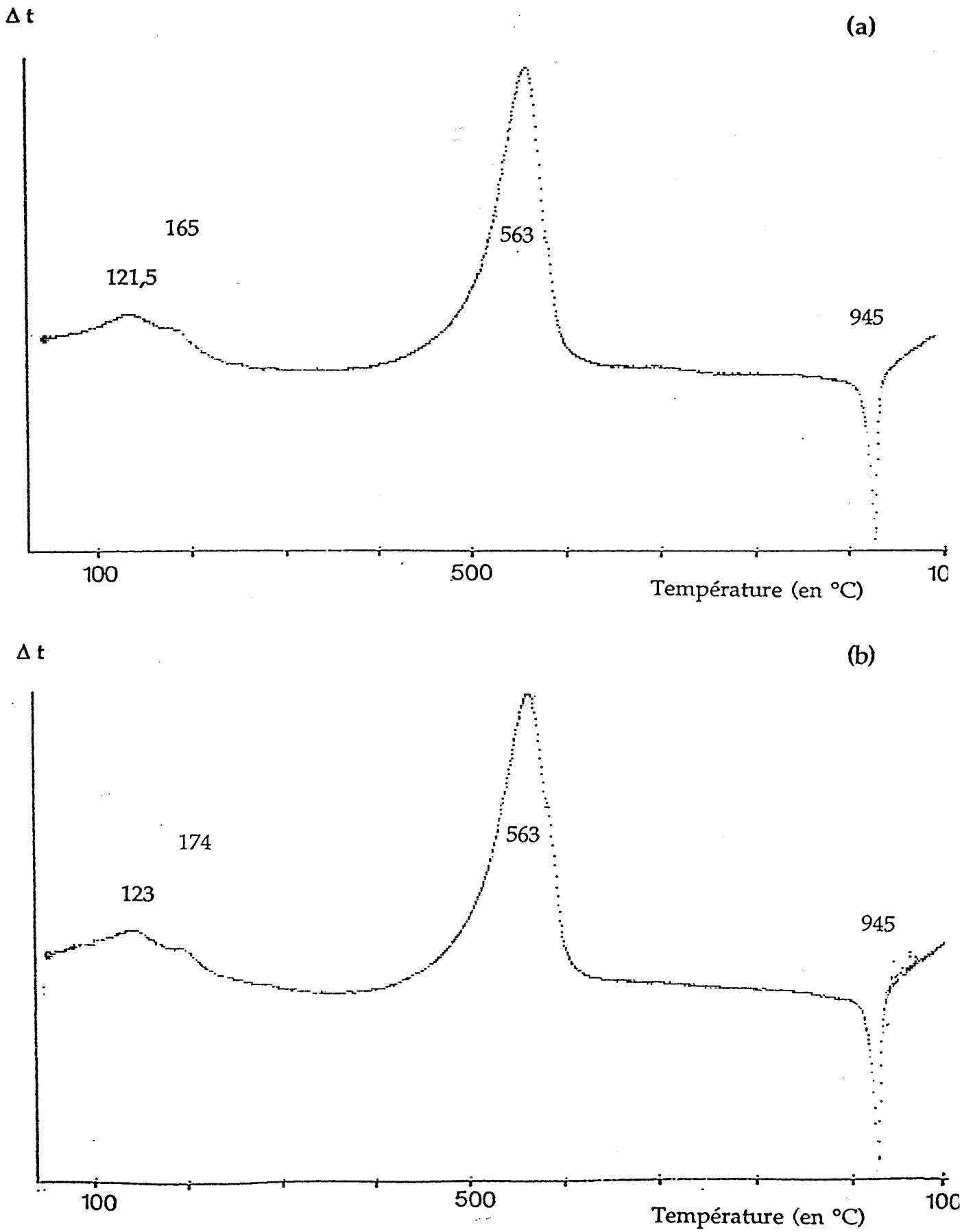


Figure 3-2 : Analyse thermique différentielle (ATD) de l'argile SEIG1 (a) et de cette même argile après 3 mois d'incubation (SEIG1/3m) (b).

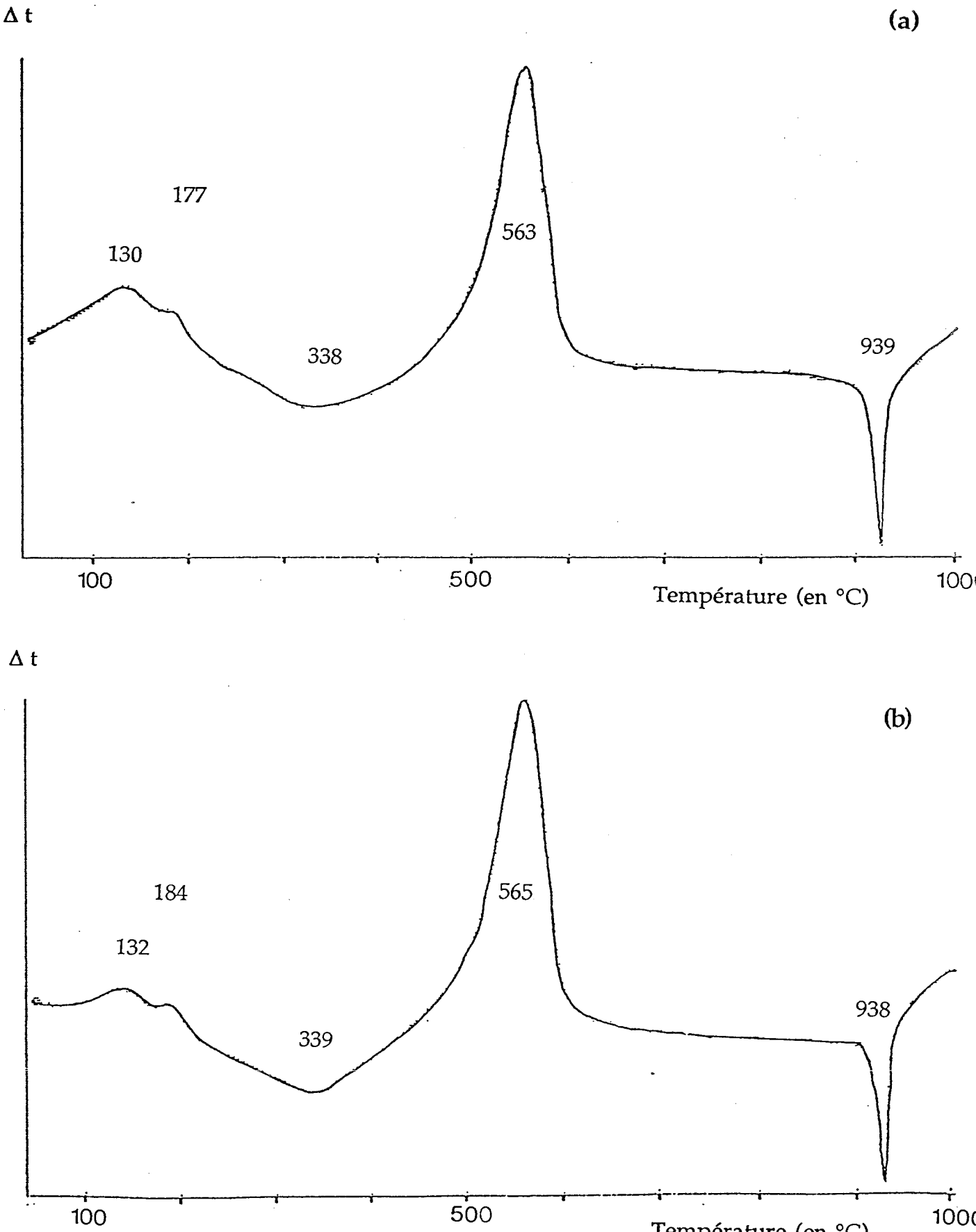


Figure 3-3 : Analyse thermique différentielle (ATD) de l'argile SEIG4 (a) et de cette même argile après 3 mois d'incubation (SEIG4/3m) (b).

partielle de la structure de la kaolinite. Le pic exothermique noté à plus de 900°C marque une recristallisation des produits de décomposition de la kaolinite en une phase de type spinelle riche en aluminium et en mullite (Jouenne, 1979).

III-1-2 Analyse thermogravimétrique

Les courbes d'ATG présentent en abscisse les températures et en ordonnée les variations de poids. Ici encore les résultats obtenus sont identiques pour SEIG1 et SEIG1/3m (figure 3-4 a et b) ainsi que pour SEIG4 et SEIG4/3m (figure 3-5 a et b). Les variations de poids enregistrées correspondent à la déshydratation des échantillons qui se déroule en plusieurs temps en fonction de la nature de l'eau éliminée.

Le faible décrochement noté entre 100°C et 200°C est du au départ de l'eau d'hydratation. Le départ de ce type d'eau ne détruit pas la structure cristalline et donne lieu à des phénomènes réversibles.

Le palier se détachant très nettement entre 500°C et 600°C correspond à l'élimination de l'eau de constitution. Le départ de cette eau détruit la structure du minéral et donne lieu à des phénomènes irréversibles.

III-2 Influence de l'activité biologique sur le degré de viscosité des pulpes argileuses

Lors des incubations de l'argile MOMB3, en présence de solution minérale nutritive et en aérobiose, des évolutions très significatives des populations microbiennes et des matières organiques ont été observées (deuxième partie, chapitre IV). Il a donc semblé particulièrement intéressant d'effectuer des mesures de degré de viscosité sur les pulpes argileuses afin de déterminer si des changements pouvaient être relevés à ce niveau.

Ce type de mesure a été réalisé sur la pulpe initiale (à 30 % d'argile) ainsi que sur les pulpes issues de, respectivement, 1 mois, 2 mois et 3 mois de traitement de biodégradation. Les résultats obtenus (tableau III-2) indiquent qu'un freinage significatif, correspondant à une augmentation du degré de viscosité, apparaît dès le premier mois et qu'il reste d'intensité constante pour les deux mesures suivantes. En effet, l'angle d'amortissement est identique à T = 1 mois, 2 mois et 3 mois. Le développement et l'activité des populations microbiennes induisent donc une augmentation du degré de viscosité des pulpes argileuses dès le premier mois.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

- soit, au cours de l'incubation, s'est produit une modification des relations entre les particules due à des changements de la répartition des charges (Coussot et Piau, 1993). Mais il a été établit que le pH du milieu restait stable (Deuxième

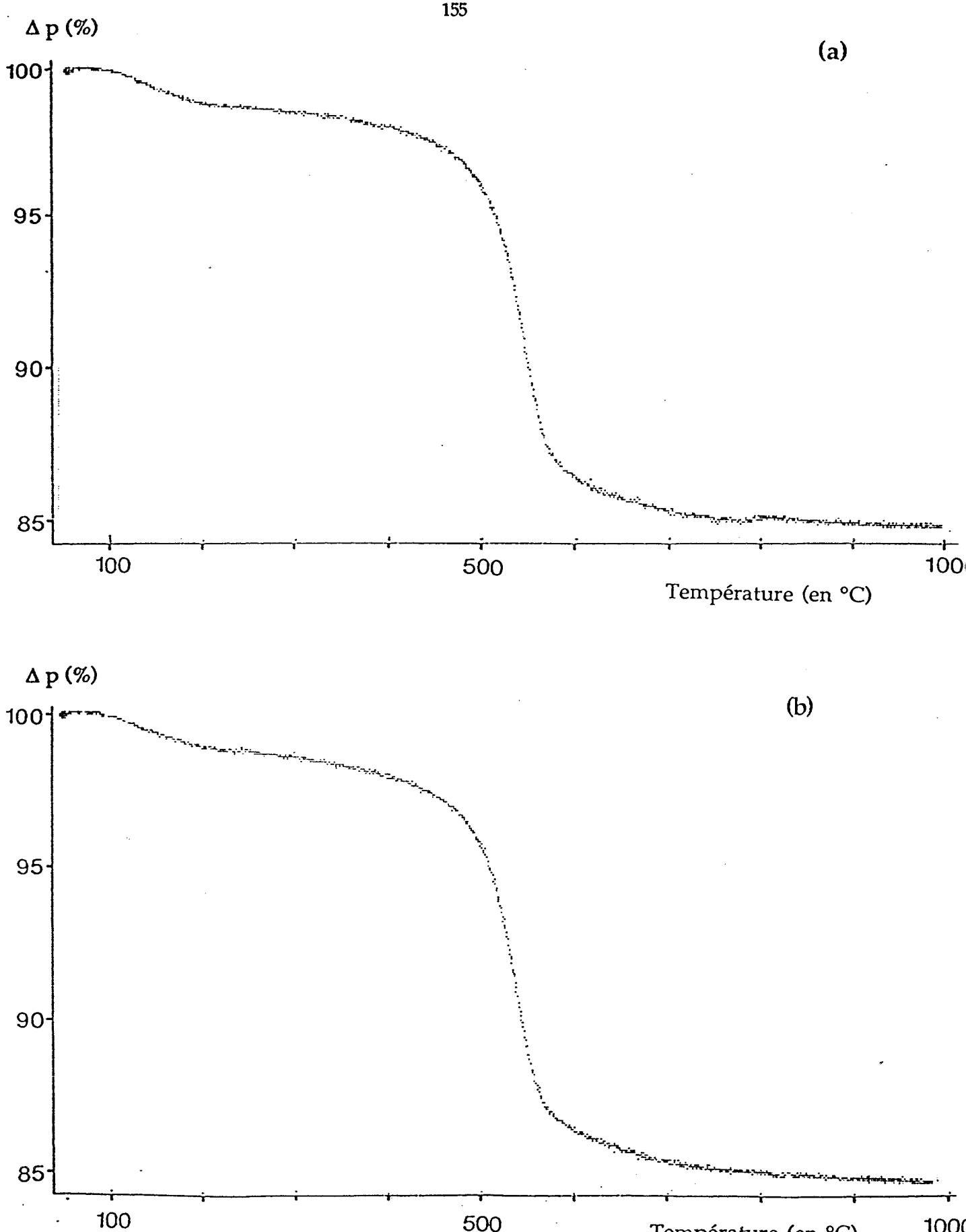


Figure 3-4: Analyse thermogravimétrique (ATG) de l'argile SEIG1 (a) et de cette même argile après 3 mois d'incubation (SEIG1/3m) (b).

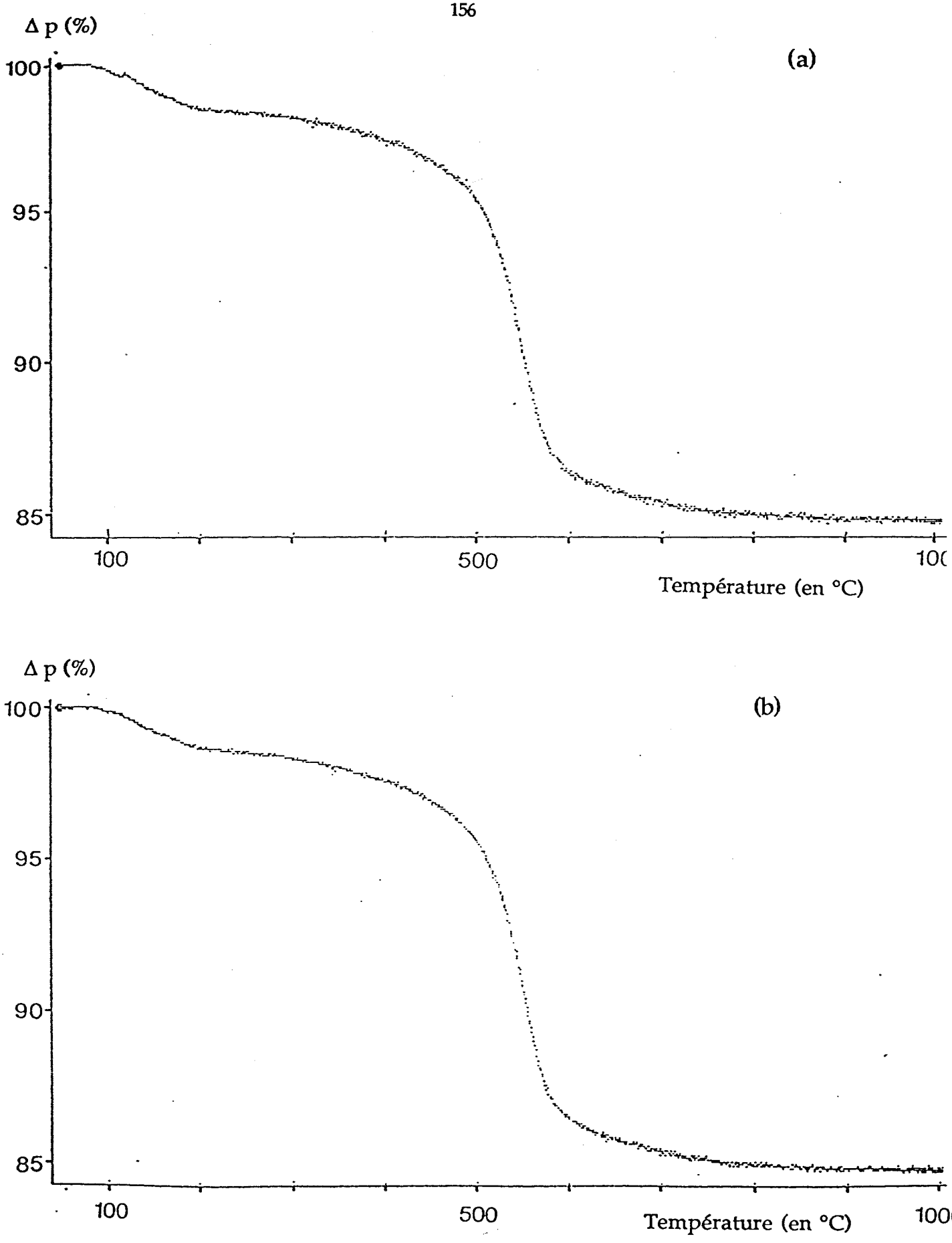


Figure 3-5: Analyse thermogravimétrique (ATG) de l'argile SEIG4 (a) et de cette même argile après 3 mois d'incubation (SEIG4/3m) (b).

Tableau 3-II : Mesures du degré de viscosité des pulpes (suspension à 30% d'argile) au cours de l'incubation de l'argile MOMB3 en aérobiose.

	T 0	T 1 mois	T 2 mois	T 3 mois
Lecture (en ° Gallencamp)	360	325	325	330
Angle d'amortissement	0	35	35	30

Tableau 3-III : Mesures de la blancheur de l'argile MOMB3 suite à divers traitements

	REFLEXION		
	Rx (%) ambre jaune	Ry (%) vert	Rz (%) bleu
(1) : MOMB3 initial	45,8	42,8	36,3
(2) : MOMB3/humine	61,6	59,3	53,8
(3) : MOMB3/3m	48,4	45,8	39,4
(4) : MOMB3/3m/humine	60,2	58,0	52,6
Barytine : étalon de référence	100	100	100

MOMB3/humine : MOMB3 après extraction des matières organiques alcalino-solubles (AF et AH)
MOMB3/3m : MOMB3 après trois mois de traitement de biodégradation
MOMB3/3m/humine : MOMB3/3m après extraction des matières organiques alcalino-solubles

partie, Chapitre IV) tout au long de l'essai, donc une éventuelle acidification provenant de la production d'acides organiques par les micro-organismes ne peut être mise en cause. En revanche les composants organiques et minéraux du milieu sont chargés. Ils ont été transformés au cours du temps et la répartition des charges a évoluée avec en particulier l'apparition ou la disparition de groupements ionisables pour ce qui concerne les matières organiques, et l'échange de cations et d'anions pour les argiles.

- soit le développement des populations microbiennes s'est accompagnée d'une production de polysaccharides extracellulaires qui agiraient au niveau de la micro organisation entre les particules d'argiles. En effet certains polysaccharides bactériens ont des propriétés visqueuses connues (Chenu, 1981) et leur association avec les minéraux argileux a une influence sur la structure des matériaux donc sur leur comportement rhéologique.

Il est raisonnable de penser que l'évolution de la viscosité des pulpes argileuses est due à l'ensemble de ces phénomènes. Il y aura lieu, dans des travaux complémentaires, de vérifier certaines de ces hypothèses.

III-3 Influence de la biodégradation des matières organiques et/ou de l'élimination des composés alcalino-solubles sur la blancheur des argiles

Des mesures de blancheur ont été effectuées sur l'argile MOMB3 issue de divers traitements afin de juger de l'effet de la biodégradation des matières organiques et/ou de l'élimination chimique des matières organiques alcalino-solubles (acides humiques et acides fulviques).

Les résultats présentés dans le tableau 3-III pour les argiles ayant subi ces divers traitements (**2, 3** et **4**) indiquent, pour les trois cas, une amélioration significative de la blancheur par rapport à l'échantillon brut initial (**1**). De façon générale les comparaisons sont surtout établies par rapport aux résultats obtenus pour l'absorption dans le bleu, c'est-à-dire selon Rz.

L'influence du biotraitement est significative mais apparaît de faible amplitude. Elle permet de passer d'une réflexion de 36,3 % à une réflexion de 39,4 %, ce qui indique un gain de blancheur. L'extraction alcaline des acides humiques et des acides fulviques permet d'obtenir un résultat nettement supérieur puisque la réflexion mesurée avec MOMB3/humine (**2**) est proche de 54 % alors qu'elle est égale à 36,3 % avec l'échantillon initial.

Cette différence entre le traitement biologique et le traitement chimique n'est pas surprenante car la biodégradation a permis une minéralisation de 15 % du carbone organique initial tandis que l'extraction des matières organiques alcalino-solubles correspond à l'élimination de 62 % du carbone organique initial.

L'effet cumulé du biotraitement suivi d'une extraction chimique n'est pas supérieur à celui du traitement chimique seul puisque les réflexions mesurées

dans les cas **2** et **4** sont du même ordre.

La minéralisation d'une partie des matières organiques associées aux kaolins par action des microflores hétérotrophes autochtones permet donc d'améliorer sensiblement la blancheur des argiles concernées.

III-4 Conclusions

Outre la blancheur, le comportement thermique et rhéologique des kaolins sont également d'un grand intérêt.

Pour ce qui concerne le comportement thermique de ces argiles, les méthodes utilisées (ATD et ATG) n'ont pas permis de déceler de différences dues à la biodégradation. Elles ne sont sans doute pas assez sensibles pour mettre en évidence des variations dues aux évolutions des matières organiques et ce en raison des faibles teneurs des échantillons.

Les courbes obtenues avec ces analyses thermiques sont en fait caractéristiques du minéral argileux concerné : la kaolinite. Elles indiquent la présence de matières organiques par de légers accidents situés vers les basses températures (aux environs de 200 °C) sans distinguer d'effet du à la biodégradation car les quantités de matières organiques sont beaucoup trop faibles pour pouvoir modifier l'allure de ces courbes.

Par contre des modifications ont pu être observées au niveau des propriétés rhéologiques des pulpes argileuses ainsi qu'au niveau de la blancheur des argiles. En effet, une augmentation de la viscosité des suspensions ainsi qu'une légère amélioration de l'indice de blancheur ont pu être noté. La modification de la viscosité des pulpes apparaît dès le premier mois d'incubation.

Mais, si un meilleur indice de blancheur est dans tous les cas un facteur favorable, une augmentation de la viscosité peut s'avérer pénalisante d'un point de vue industriel. En effet elle peut induire une compaction du matériel concerné et entraîner des problèmes au niveau des différentes étapes de traitement des argiles.

Chapitre IV : Influence de la biodégradation des matières organiques sur certaines propriétés des acides humiques

Dans la première partie de cette étude, la nature et la réactivité des acides humiques AHS4 ont été étudiées, entre autre, par le biais de leur comportement thermique lors de pyrolyses. Les résultats obtenus ont mis en évidence leur stabilité en milieu neutre ou réducteur ainsi que leur sensibilité à l'oxydation.

Les études réalisées dans la deuxième partie de ce travail ont, quant à elles, souligné la biodégradabilité des matières organiques associées aux argiles en démontrant qu'elles n'étaient pas inertes vis-à-vis de l'activité bactérienne mais subissaient des biotransformations.

Il s'agit maintenant de vérifier si les modifications de structures dues à l'action microbienne ont des incidences sur le comportement thermique des acides humiques. Pour cela, le comportement thermique des acides humiques AHS4/3m, extraits et purifiés après trois mois d'incubation, est étudié comparativement à celui des acides humiques AHS4 initiaux.

Ces essais ont également été mis à profit pour obtenir une image des composés libérés au cours des pyrolyses car, jusqu'à présent, seuls les résidus obtenus lors des dégradations thermiques des acides humiques ont été étudiés.

IV-1 Influence de la biodégradation sur le comportement thermique des acides humiques

Pour les pyrolyses réalisées dans la première partie de ce travail (chapitre V), trois atmosphères différentes avaient été envisagées mais pour cette nouvelle série d'expériences, seule la condition oxydante a été appliquée. Les principales raisons de ce choix sont que, premièrement, la quantité d'acides humiques biotraités disponible était limitée et que, deuxièmement, les résultats déjà acquis avaient mis en évidence une certaine sensibilité des acides humiques vis-à-vis de l'oxydation.

IV-1-1 Pertes de poids et évolution de la composition élémentaire au cours des pyrolyses

Les études de dégradations thermiques réalisées avec les acides humiques AHS4 avaient mis en évidence que seule une condition oxydante permettait la destruction de la totalité des composés. Il apparaît (figure 3-6) que les acides humiques biotransformés AHS4/3m sont également sensibles à l'oxydation puisque pour eux aussi, sous air et à 550°C, la perte de poids est totale.

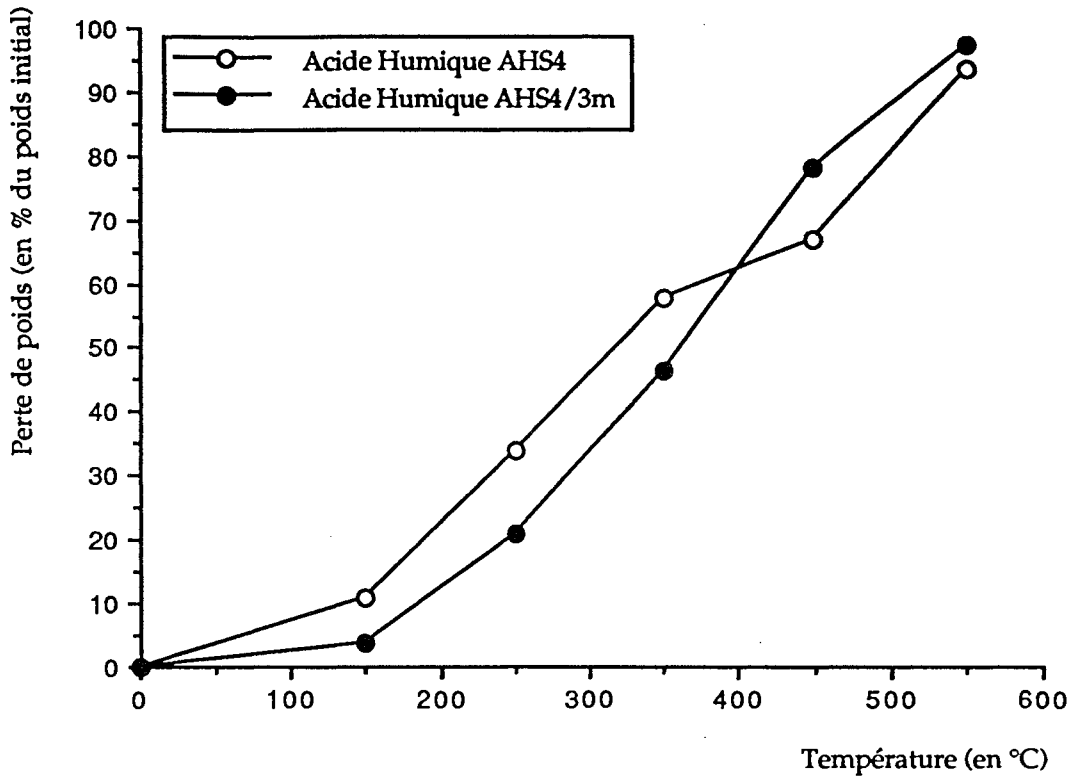


Figure 3-6 : Effets des pyrolyses, menées sous atmosphère oxydante, vis à vis des pertes de poids des acides humiques AHS4 et AHS4/3m.

Il faut noter que la dégradation est déjà importante à 450°C car, à ce stade, ne subsiste plus que 20 % du poids initial.

La figure 3-6 permet également de constater que les deux acides humiques étudiés ne réagissent pas de façon semblable aux différentes températures appliquées.

En effet jusqu'à 350°C les courbes obtenues ont des allures similaires mais sont décalées puisque celle correspondant à AHS4/3m est en retrait, ce qui révèle une moins grande sensibilité. Dans les deux cas les pertes de poids sont faibles à 150°C et augmentent rapidement aux deux températures suivantes. Pourtant les acides humiques AHS4/3m sont moins sensibles que les acides humiques AHS4 sur cette gamme de température car les pertes de poids enregistrées sont toujours plus faibles dans le premier cas.
Par contre, à partir de 400°C, cette tendance s'inverse : une pyrolyse de une heure à 450°C entraîne la dégradation de 65 % des composés AHS4 et de 80 % pour ce qui concerne AHS4/3m.

En effectuant une étude des pertes de poids, de carbone et d'azote (figure 3-7) lors des pyrolyses de AHS4/3m il apparaît que les pertes de carbone ne s'enregistrent qu'à partir de 250°C et qu'elles sont encore timides à cette température, tandis qu'il faut atteindre 350°C pour pouvoir observer un départ d'azote. Dans l'ensemble les pertes de carbone et d'azote se font de concert : jusqu'à 250°C les décarboxylations sont faibles tandis que les pertes d'azote sont nulles ; pour les températures supérieures ces deux phénomènes deviennent plus intenses.

Cette similitude entre les pertes de carbone et d'azote n'avait pas été observée pour ce qui concerne AHS4.

L'étude des pertes comparées de carbone et d'azote (figure 3-8) pour les composés AHS4 et AHS4/3m donne des renseignements très intéressants sur la réactivité de chacun de ces acides humiques.
Les courbes relatives à l'azote sont d'allure semblable pour les deux composés humiques mais elles sont légèrement décalées. Ceci semble indiquer que cet élément est plus accessible pour les acides humiques biotraités, donc certainement moins enclavé dans les structures de AHS4/3m que dans celles des acides humiques initiaux.
Les courbes figurant le carbone sont, quant à elles, d'allure très différentes. Pour AHS4, la décarboxylation est importante de 150°C à 350°C et s'atténue fortement passé ce stade tandis que pour AHS4/3m les pertes de carbone sont faibles de 150°C à 250°C et s'intensifient au delà de 250°C. Ainsi, pour obtenir une minéralisation de 5 % de carbone il faut atteindre 250°C pour AHS4/3m alors qu'un traitement à 150°C suffisait pour AHS4. De même une perte de 30 % de carbone se mesure à 350°C pour AHS4/3m et à 250°C pour AHS4. La différence la plus marquante se situant entre 350°C et 450°C, en effet au cours de cet intervalle la vitesse de décarboxylation de AHS4 est très faible tandis que celle de AHS4/3m provoque la perte de 50 % de carbone.

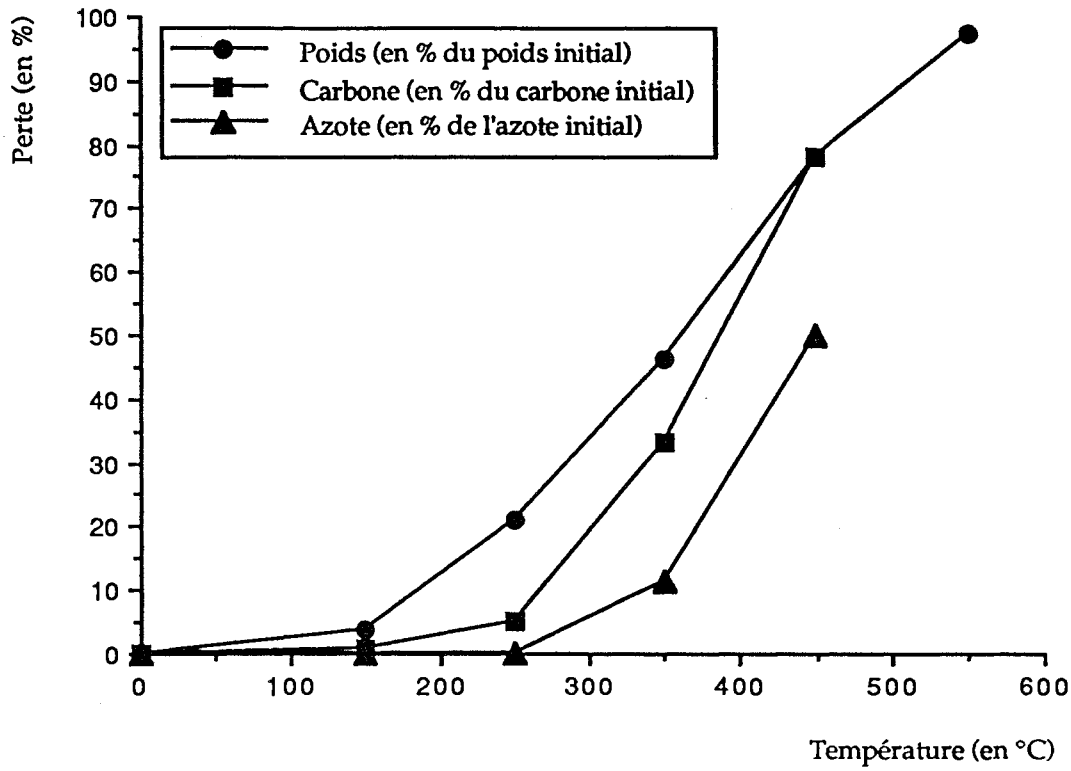


Figure 3-7 : Pertes de poids, de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4/3m réalisées sous courant d'air.

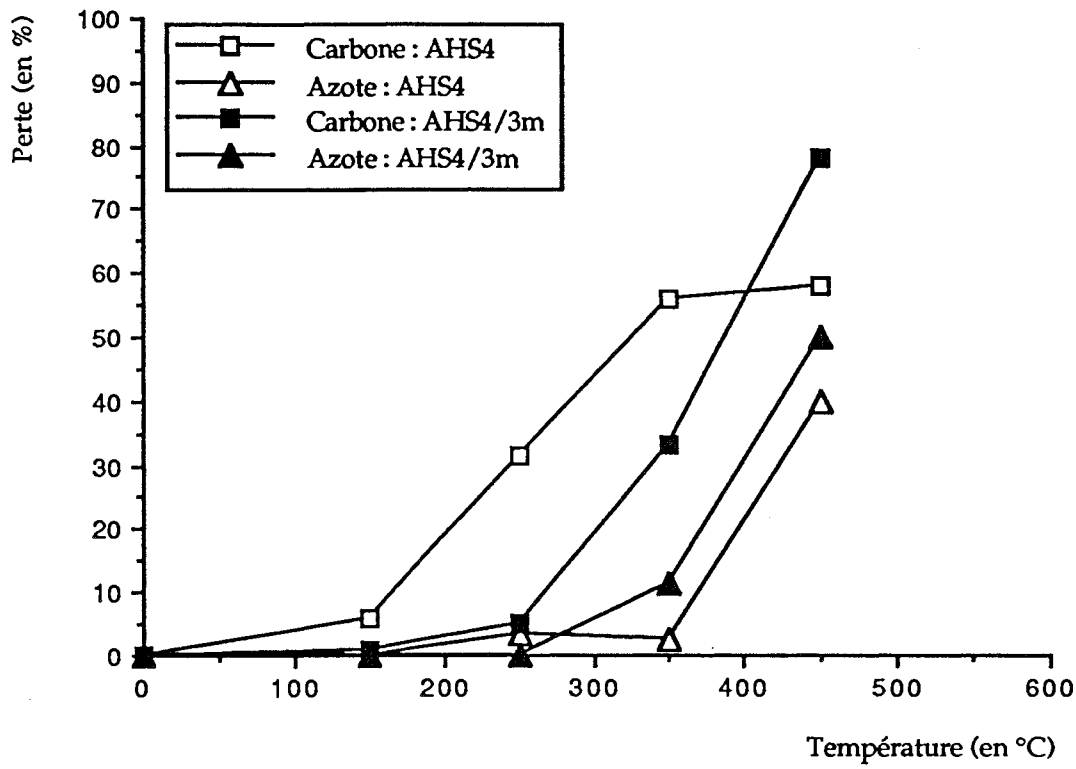


Figure 3-8 : Pertes comparées de carbone et d'azote au cours des pyrolyses des acides humiques AHS4 et AHS4/3m réalisées sous courant d'air.

Après biodégradation, les acides humiques résiduels apparaissent beaucoup plus sensibles à la pyrolyse oxydante à haute température.

Les analyses élémentaires ont également permis de déterminer les rapports C/N et H/C pour chacun des résidus de pyrolyses. Les valeurs obtenues (tableau 3-IV) soulignent la stabilité des acides humiques AHS4/3m pour des températures inférieures à 250°C ainsi que leur sensibilité pour les températures comprises entre 250°C et 450 °C.

En effet les résidus correspondant aux pyrolyses réalisées aux deux températures les plus basses (150°C et 250°C) présentent des rapports C/N et des indices d'aromaticité H/C qui varient peu ou pas par comparaison à ceux des composés initiaux. Par contre, les valeurs relatives aux résidus issus des pyrolyses aux températures les plus élevées (350°C et 450°C) indiquent un fort degré de "compaction" (H/C inférieur à 0,3) ainsi que la minéralisation simultanée du carbone et de l'azote puisque les C/N ne cessent de décroître.

La présentation des résultats par l'intermédiaire des rapports C/N et H/C est donc également une façon d'indiquer que les acides humiques AHS4 et AHS4/3m ont des comportements thermiques très différents. La sensibilité plus faible des acides humiques AHS4/3m vis-à-vis des basses températures ainsi que la plus grande réactivité de l'azote et du carbone de ces composés pour des températures comprises entre 250°C et 450°C révèlent un comportement qui pourrait être différent à la cuisson avec une forte dégradation des acides humiques issus de biotraitement.

IV-1-2 Evolution de la structure et des groupements fonctionnels au cours des pyrolyses

Les spectres infrarouges des composés issus des pyrolyses de AHS4/3m aux températures de 150°C, 250°C et 350°C sont présentés sur la figure 3-9. Les résidus obtenus suite aux traitements à 450°C et 550°C n'ont pas pu être étudiés car il s'agissait de cendres, qui plus est en quantités infimes.

A 150°C les modifications de spectres se situent essentiellement au niveau de la bande à 3 400 cm^{-1} et du pic à 1 710 cm^{-1}. Ces modifications reflètent des phénomènes de déshydratation ainsi qu'un début de décarboxylation.

Il faut atteindre la température suivante, soit 250°C, pour pouvoir observer des changements remarquables dans l'allure du spectre. En effet dans ce cas la bande aliphatique a largement diminué et les groupements carboxyliques ont également été touchés puisque le pic à 1 710 cm^{-1} a nettement régressé tout comme la bande à 3 400 cm^{-1} et l'épaulement à 2 500 cm^{-1}. Par contre le pic caractéristique des fonctions alcools à 1 050 cm^{-1} est toujours clairement présent.

Ces phénomènes se vérifient à 350°C, température à laquelle presque 60 % du poids initial subsiste encore. Ainsi, à 350°C la bande aliphatique a totalement disparu et celle située à 1 050 cm^{-1} indique que les acides humiques sont toujours porteurs de fonctions alcools. A ce stade il subsiste aussi des groupements carboxyliques (pic 1 710 cm^{-1}) ainsi que le massif céto-aromatique vers 1 600 cm^{-1}.

Tableau 3-IV : Evolution comparée des rapports C/N et H/C des résidus d'acides humiques AHS4 et AHS4/3m après pyrolyses en condition oxydante.

Echantillon	C/N	H/C (rapport atomique)
AHS4 initial	62,5	0,68
AHS4/150 °C	57,5	0,55
AHS4/250 °C	44,1	nd
AHS4/350 °C	28,7	nd
AHS4/450 °C	43,8	nd
AHS4/3m initial	51,7	0,90
AHS4/3m/150 °C	48,6	0,90
AHS4/3m/250 °C	45,8	0,64
AHS4/3m/350 °C	38,3	0,27
AHS4/3m/450 °C	16,3	nd

nd : non déterminé

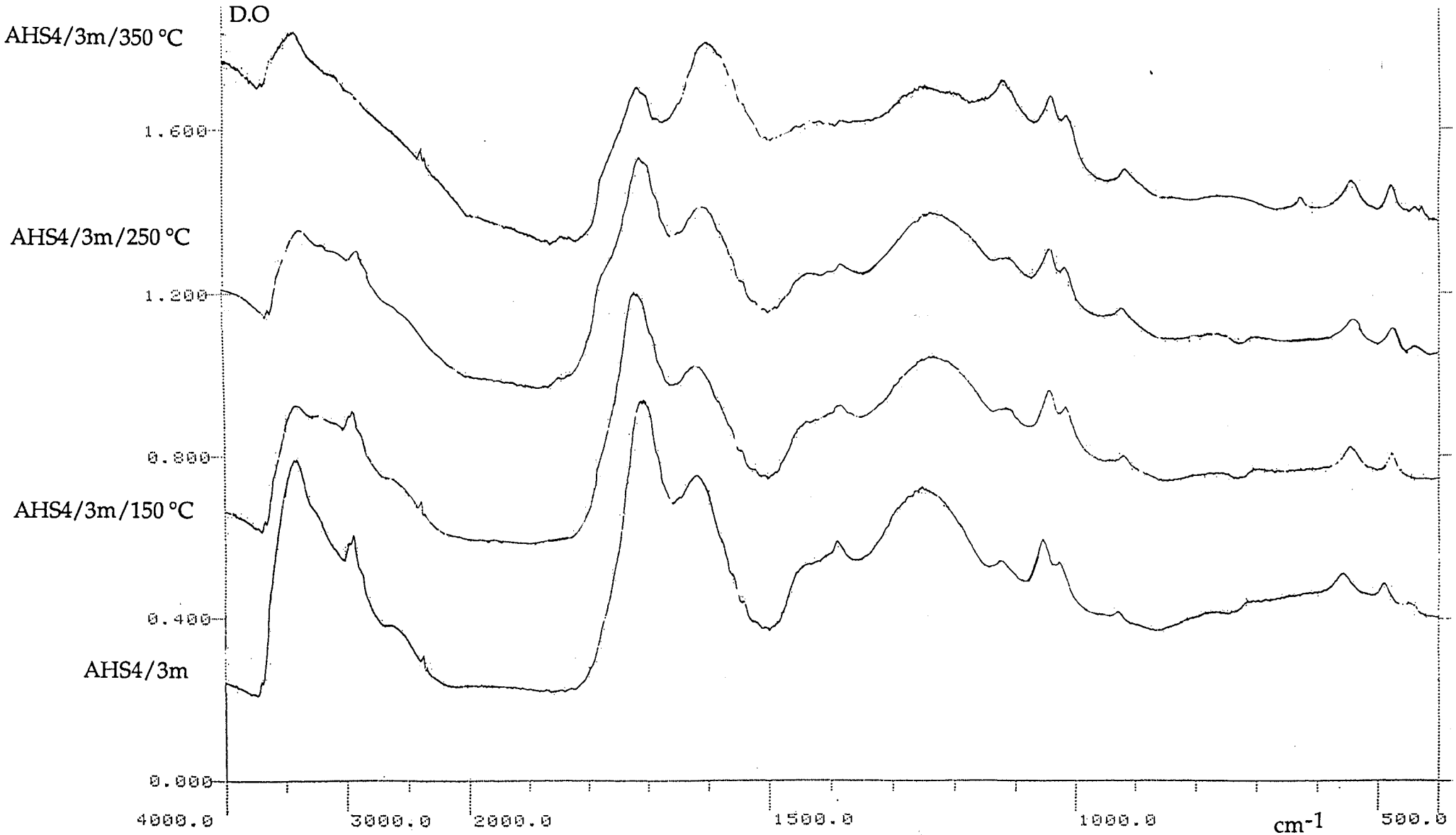


Figure 3-9 : Spectres infrarouges des résidus de pyrolyse des acides humiques AHS4/3m (extraits et purifiés après biodégradation), sous courant d'air à 150 °C, 250 °C et 350 °C.

Il est également intéressant de remarquer, pour les résidus des pyrolyses à 250°C et à 350°C, l'apparition d'épaulements vers 1 780 cm^{-1} reflétant des cyclisations dues aux déshydratations au niveau des fonctions carboxyliques. La température doit être élevée jusqu'à 450°C pour que l'ensemble des molécules soit touché puisqu'à ce stade 80 % du poids initial est perdu ainsi que 80 % du carbone.

Le décalage mis en évidence, pour les pyrolyses réalisées aux températures inférieures à 400°C, entre les pertes de poids des deux acides humiques AHS4 et AHS4/3m apparaît également au niveau des spectres infrarouges. En effet les divers phénomènes observés se déroulent chronologiquement de façon identique dans les deux cas mais avec un "temps" de retard pour AHS4/3m. Par exemple il faut attendre 350°C pour que la bande aliphatique de AHS4/3m disparaisse totalement tandis que c'est déjà le cas à 250°C pour AHS4. De même les spectres obtenus avec AHS4 montrent que la bande 1 050 cm^{-1} relative aux fonctions alcools s'amenuise assez rapidement avec l'élévation des températures alors que pour AHS4/3m elle est toujours présente à 350°C.

IV-2 Identification des produits de pyrolyse par spectrométrie de masse

Les composés volatils produits lors des pyrolyses ont été piégés, en sortie de four, par du dichlorométhane et étudiés en spectrométrie de masse. La technique utilisée est assez "artisanale" puisque le four à pyrolyse n'a pas été relié directement au spectromètre de masse. De ce fait il a été nécessaire de passer par une étape intermédiaire de piégeage dans un solvant. Cette étape par elle seule étant déjà restrictive puisqu'elle limite le spectre des composés détectés à celui des composés solubles dans le solvant choisi.

Le but de ces quelques essais n'est nullement d'obtenir une caractérisation exhaustive et précise des produits dégagés au cours des pyrolyses. Il ne s'agit que d'une simple étude préliminaire réalisée afin d'avoir une vue d'ensemble des familles de composés présentes.

Il s'avère (figure 3-10) que seuls les chromatogrammes correspondants aux composés dégagés lors des pyrolyses à basses températures (150°C et 250°C) présentent des pics définis. Ceux correspondant aux pyrolyses à plus hautes températures (350°C et 450°C) montrent une sorte de massif hérissé de pics. Ces séries de pics appelées "séries homologues" ou "séries alcanes" sont caractéristiques des molécules complexes et sont difficiles à exploiter correctement. Quant au chromatogramme relatif à la dernière température testée, c'est-à-dire 550°C, il est vide de tout pic et de tout massif, ce qui reflète très probablement des difficultés au niveau de la récupération des produits de pyrolyse.

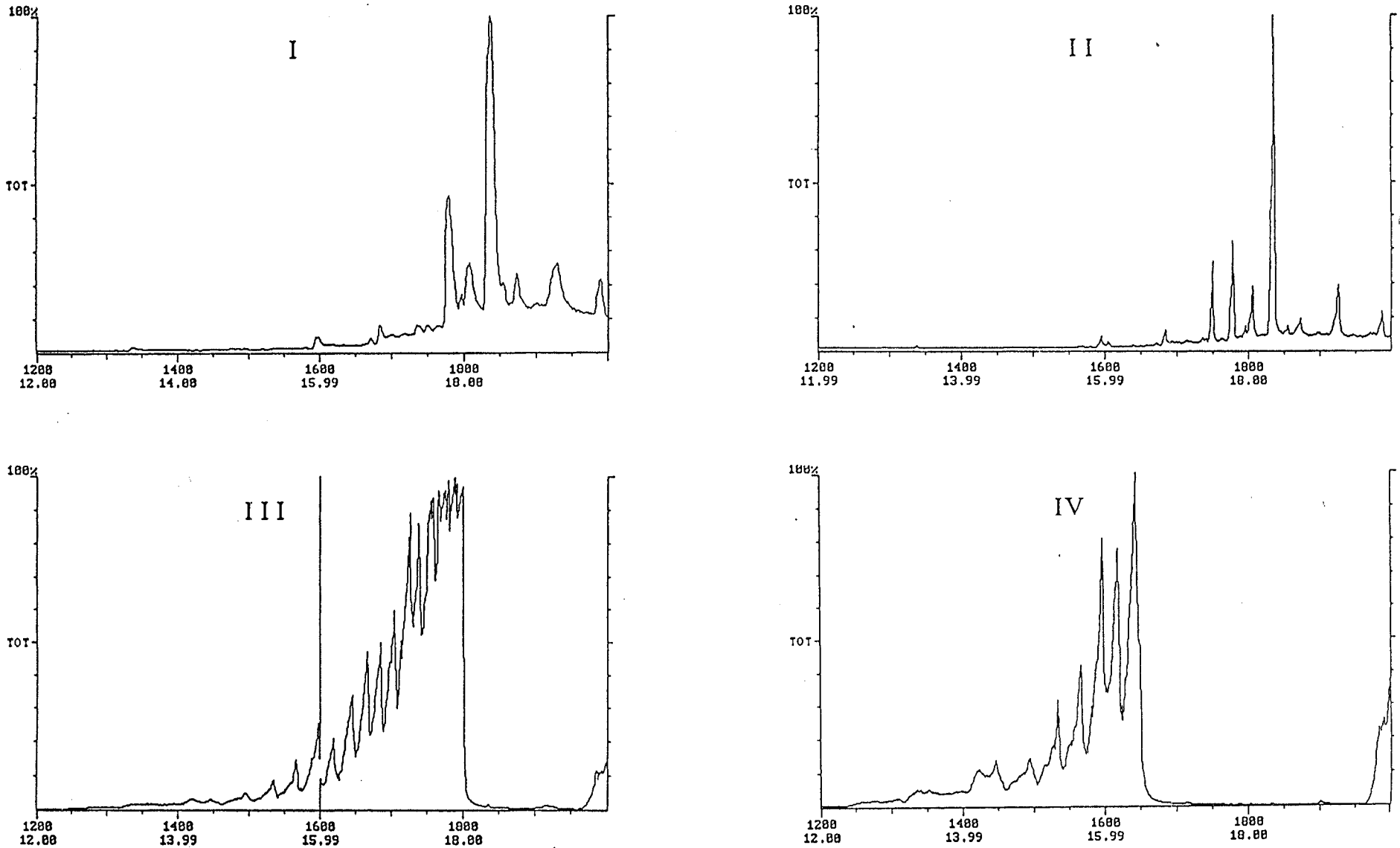


Figure 3-10 : Chromatogrammes des produits, piégeables dans le dichlorométhane, dégagés après pyrolyses des acides humiques AHS4/3m en condition oxydante à 150 °C (I), 250 °C (II), 350 °C (III) et 450 °C (IV).

L'aspect de ces chromatogrammes traduit la diversité et la complexité des produits étudiés. Les traitements thermiques aux températures inférieures à 300°C ont surtout conduit à l'élimination de composés "simples". Ces molécules, dont les poids moléculaires varient autour de 200 Da, donnent des spectres de masse exploitables comme le prouve la figure 3-11. Les recherches en bibliothèque à partir de tels spectres sont fiables et permettent de caractériser les produits obtenus. Par contre les traitements aux températures plus élevées ont entraîné le départ de blocs structuraux, c'est à dire de composés de poids moléculaires élevés. De ce fait les spectres de masse correspondant deviennent assez fournis (figure 3-12) et les identifications donnent des résultats relativement inexploitables.

Suite à la distinction de ces deux étapes au cours de la dégradation thermique en conditions oxydantes des acides humiques AHS4/3m, il est possible d'identifier des composés simples produits avant 300°C. Seuls les structures identifiées sans ambiguïté sont présentées dans le tableau 3-V.

Il apparaît que la dégradation thermique a libéré des constituants aliphatiques et aromatiques. Les aliphatiques formés sont des alcools, des alcènes, des acides carboxyliques et des acides gras, tous à plus de 10 carbones. Le produit aromatique majeur est l'acide benzène di-carboxylique, la structure benzénique se retrouvant dans l'ensemble des composés aromatiques isolés.

Ces éléments structuraux dérivent de séquences et de constituants typiques des acides humiques (Schulten 1987 ; Schulten *et al.*, 1991). Certains des produits de pyrolyse peuvent donner des indications sur l'origine des acides humiques, ainsi :

- les furanes peuvent être reliés aux polysaccharides d'origine microbienne
- les phénols indiquent que des fragments de lignine sont présents dans les macromolécules.

D'autres permettent d'approcher la structure des blocs constitutifs des acides humiques puisqu'il vient d'être établit que leur dégradation oxydative produit des acides benzo-carboxyliques en proportion importante mais également des chaînes aliphatiques de longueur moyenne.

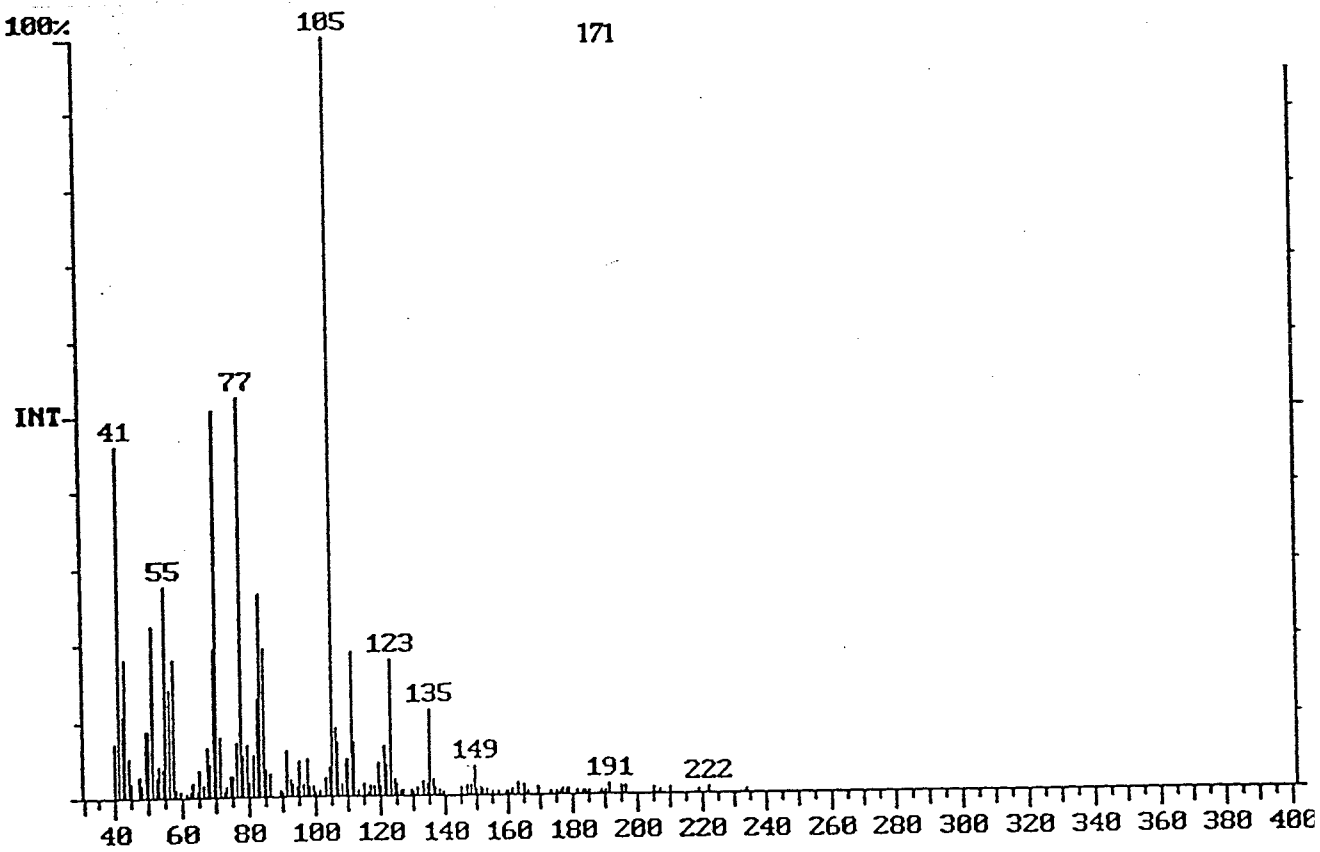


Figure 3-11 : Pyrolyse à 150 °C : spectre de masse du composé correspondant au pic 1684.

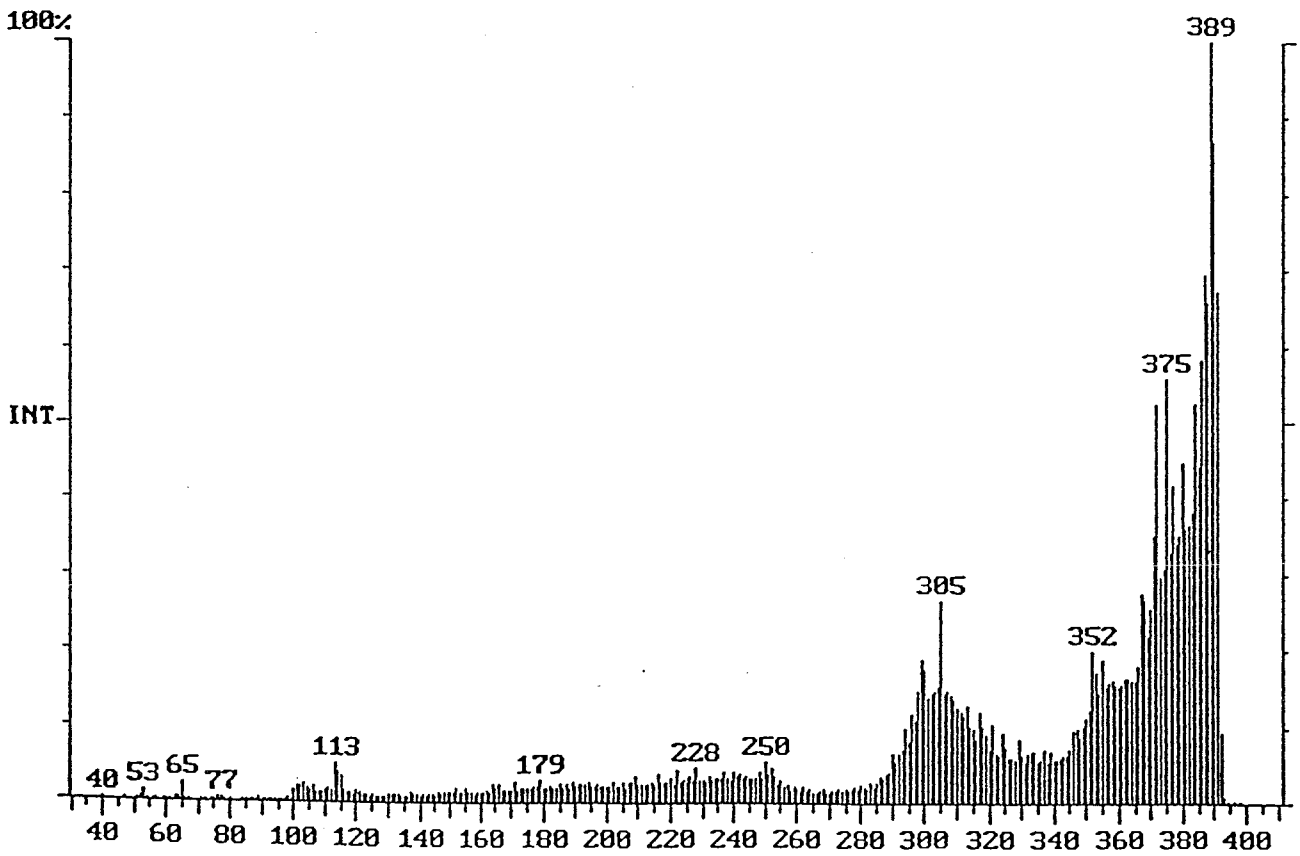


Figure 3-12 : Pyrolyse à 350 °C : spectre de masse du composé correspondant au pic 1665.

Tableau 3-V : Identification par spectrométrie de masse de certains des composés volatils dégagés lors des pyrolyses des acides humiques AHS4/3m à 150 °C et 250 °C.

	150 °C	250 °C
Composés non aromatiques:		
Décanol	+ + +	+ +
Décène	+ + +	+ +
Acide décanoïque	+	
Myristate		+ + +
Composés aromatiques :		
Acide benzoïque	+	+
Acide benzène di-carboxylique	+ + + + +	+ + + +
Benzofurandione		+
Alkylphénol		+
Biphényle benzène		+ + +

+ : intensité

IV-3 Conclusions

L'étude du comportement thermique des acides humiques biotransformés AHS4/3m a permis d'une part d'appréhender l'incidence des modifications de structures dues à l'activité biologique sur les propriétés thermiques de ces composés et d'autre part d'apporter des précisions supplémentaires sur le caractère de ces modifications.

Les deux acides humiques étudiés, avant et après biotransformation (AHS4 et AHS4/3m), ont présentés des comportements différents lors de pyrolyses menées dans des conditions oxydantes identiques. Les composés humiques AHS4/3m se sont révélés moins sensibles que les acides humiques initiaux vis-à-vis des pyrolyses réalisées aux températures inférieures à 350°C et plus sensibles pour les températures supérieures ou égales à 350°C. Il est apparu qu'une pyrolyse à 450°C permet la destruction de 60 % (en poids) des acides humiques AHS4 et de 80 % (en poids) de ceux issus du biotraitement. Le biotraitement favoriserait donc l'élimination du carbone à la cuisson.

Des différences de comportement ont également pu être relevées au niveau des pertes de carbone et d'azote. Dans le cas de AHS4/3m, tout comme dans celui des acides humiques AHS4, les pertes de poids et de carbone se suivent étroitement. Mais les départs du carbone et de l'azote se produisent à compter de seuils de température différents et à des vitesses différentes. Ainsi le carbone de AHS4 est plus sensible à l'oxydation à 250°C et 350°C alors que pour AHS4/3m il le devient à 350°C et 450°C. Pour les deux acides humiques étudiés l'azote n'est sensible à la pyrolyse qu'au delà de 350°C et il est plus sensible pour AHS4/3m que pour AHS4.

Cette dernière remarque concernant l'azote apporte un élément supplémentaire à propos des différences structurales relevées entre les acides humiques AHS4 et AHS4/3m : elle est en faveur d'une ouverture des cycles constitutifs de ces biopolymères lors de l'oxydation par les microflores autochtones. En effet, lors de l'étude du comportement thermique des acides humiques AHS4, l'azote est apparu très stable et son appartenance à la partie hétérocyclique des composés en a été déduite. Or suite au biotraitement cet élément est devenu plus accessible ce qui suggère que l'action microbienne a eu lieu sur les structures polycycliques des acides humiques. Ceci est en accord avec les hypothèses établies dans la deuxième partie de ce travail (Deuxième partie, chapitre IV).

Les essais d'identification par spectrométrie de masse, réalisés dans un second temps, n'ont concerné pour des raisons pratiques, que les acides humiques AHS4/3m. Aucune comparaison n'a donc pu être établie entre les familles de composés dégagées lors des pyrolyses des acides humiques initiaux et celles des acides humiques biotransformés.

Les principales conclusions établies sont relatives aux structures identifiées avec certitude. Elles correspondent essentiellement à la mise en évidence de la présence prépondérante de l'acide benzène dicarboxylique, et de façon plus générale de la structure benzénique.

Chapitre V : Conclusions de la troisième partie

Le développement de communautés bactériennes autochtones, utilisant les matières organiques associées aux kaolins comme source de carbone et d'énergie, modifie la nature de ces matières organiques, dont une partie est minéralisée en CO_2, et influe directement ou indirectement sur certaines propriétés des kaolins.

Le comportement thermique des argiles, étudié par l'analyse thermique différentielle et l'analyse thermogravimétrique, ne semble pas être modifié par la biodégradation et la minéralisation d'une partie (12%) des matières organiques ainsi que la biotransformation des acides humiques. Cette similarité du comportement entre l'échantillon initial et l'échantillon ayant subi la biodégradation peut sans doute être imputé aux faibles teneurs en matières organiques des kaolins concernés. Les deux méthodes mises en oeuvre ne sont pas assez sensibles pour traduire des variations qui proviendraient du compartiment organique car, il faut le rappeler, les échantillons étudiés contiennent moins de 1% de carbone organique.

Par contre les propriétés rhéologiques et la blancheur du kaolin sont affectées par un tel traitement. En effet, dès le premier mois de biodégradation une augmentation de la viscosité des suspensions argileuses a pu être notée. Il est raisonnable de relier ce phénomène à des modifications des interactions entre les particules formant le mélange eau - argile (propriétés des solutions et charges de surface) ainsi qu'à la production de polysaccharides bactériens. Cette augmentation de la viscosité présente un inconvénient qu'il faudra limiter. En revanche, la biodégradation des matières organiques a également permis d'observer une amélioration notable de l'indice de blancheur des kaolins.

Si la biodégradation des matières organiques n'a pas eu d'influence sur le comportement thermique des argiles, il n'en a pas été de même pour les acides humiques. En effet il est apparu que les acides humiques AHS4/3m (extraits et purifiés à partir des argiles soumises à trois mois de biotraitement) présentaient un comportement différent de celui des acides humiques AHS4 lors de pyrolyses menées en atmosphère oxydante. Les composés biotransformés se sont révélés moins sensibles que les acides humiques initiaux pour les températures les plus basses (inférieures à 350°C) mais plus sensibles pour les températures les plus élevées (égales et supérieures à 350°C). Cette modification des propriétés des acides humiques qui conduit, sous atmosphère oxydante et à températures élevées (de 350°C à 450°C), à une dégradation de 80% des acides humiques pourrait être favorable à une meilleure élimination des matières organiques en évitant la formation et le piégeage de bulles ou de tâches noires dans les argiles au cours des cuissons. Ceci correspondrait à limiter ce qui est communément appelé "coeur noir".

Les résultats obtenus indiquent une tendance qui doit bien entendu être vérifiée par d'autres essais dans des dispositifs de laboratoire mais aussi dans des dispositifs pilotes sur site industriel comme cela avait été envisagé. Malheureusement, ce type d'essai au niveau industriel n'a pu être mis en place et suivi comme prévu.

Par ailleurs, l'étude de l'influence d'une biodégradation sur les propriétés des argiles par la mise en oeuvre d'un plus grand nombre de méthodes associées à l'utilisation industrielle des kaolins pourrait représenter un complément à cette partie de l'étude. Par exemple, et de façon non exhaustive, il serait intéressant de caractériser les propriétés rhéologiques des suspensions argileuses à l'aide d'un deuxième paramètre tel que la plasticité ou de porter intérêt à d'autres propriétés importantes telles que la résistance à la rupture ou le comportement à la filtration. Dans le cas présent ce type de mesures aurait nécessité la mise à disposition de quantités très importantes d'argile biotraitée, ce qui n'aurait pas été possible au stade de cette étude.

Conclusion générale

Le carbone et l'azote sont les deux principaux éléments constitutifs des matières organiques "mortes" présentent dans les sols mais aussi dans les couches superficielles des continents. Pour ce qui concerne les matières organiques associées aux kaolins d'un bassin sédimentaire, qui à ce jour sont assez mal connues, la détermination de leurs teneurs a été une étape préliminaire primordiale nécessaire à leur étude.

Il est apparu, pour l'ensemble des échantillons représentatifs choisis, que les teneurs en carbone organique étaient relativement faibles et que celles en azote étaient très faibles. En effet les mesures effectuées ont révélé des teneurs en carbone organique comprises entre 0,04 % et 0,66 % ce qui, comparativement aux valeurs communément déterminées et aux statistiques établies, place ces dépôts de kaolins dans la catégorie des milieux pauvres en matières organiques (Combaz, 1980 ; Schnitzer, 1991). Toujours par rapport aux intervalles de valeurs statistiquement établis, les teneurs en azote sont apparues très faibles puisque la teneur maximale observée a été de 0,02 % et que pour 10 échantillons l'azote a été considéré comme étant présent à l'état de traces (%N < 0,01 %). Ces très faibles teneurs pourraient être rapprochées des conditions de formation plutôt anoxiques de ces dépôts d'argiles qui auraient favorisées la minéralisation anaérobie de l'azote et/ou des phénomènes de dénitrification donc des pertes par volatilisation (production d'ammoniaque, d'oxyde d'azote ou d'azote moléculaire).

Les sédiments, tout comme les sols, contiennent une grande variété de matériaux organiques qui peuvent être groupés en substances humiques et non humiques et qui proviennent de la dégradation chimique et biologique des débris de plantes et d'animaux ainsi que de l'activité de synthèse des micro-organismes (Schnitzer, 1991). La caractérisation des différents types de matières organiques a été réalisée en mettant en oeuvre diverses techniques d'extraction. Ces méthodes ont révélé la nature fortement humifiée des matières organiques associées aux kaolins. Les trois familles de composés humiques classiquement rencontrés dans les sols se retrouvent en proportions variables dans les sédiments et l'emploi d'un réactif alcalin adapté a permis de déterminer, pour chacun des échantillons, les proportions relatives en acides humiques (AH), acides fulviques (AF) et humine.

Les résultats des analyses chimiques des échantillons ont conduit à un classement en trois groupes selon les teneurs en carbone organique, la nature des matières organiques (AF, AH et humine) et les valeurs des rapports AF/AH.

Dans l'ensemble, les matières organiques alcalino-solubles extraites sont apparues relativement condensées. Cet état a été confirmé par les études plus précises réalisées avec les acides humiques. En effet, afin de définir au mieux ces composés et en particulier leur nature, leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leur réactivité, ils ont fait l'objet de divers travaux et ont été caractérisés par l'emploi simultané de plusieurs techniques. Les résultats correspondants établissent que les acides humiques présents dans les kaolins sont relativement riches en carbone (C) et en oxygène (O) mais pauvres en azote (N). Ils ont également permis de calculer les valeurs des rapports H/C et O/C habituellement

utilisés pour préciser les origines des composés humiques ainsi que pour appréhender leur nature et leur structure. Ainsi, les acides humiques étudiés ont pu être placés dans un diagramme de Van Krevelen et se situent parmi les composés évolués d'origine terrestre constitués de structures aromatiques qui prédominent sur les structures aliphatiques ($0,6 < H/C < 0,7$). L'analyse par spectrophotométrie infrarouge a complété cette approche en confirmant le caractère aromatique prononcé des acides humiques et en rendant compte de leur richesse en fonction oxygénées notamment de nature carboxylique mais aussi phénolique et alcoolique. Ils sont apparus relativement sensibles à l'application conjointe de hautes températures (> 450°C) et de conditions oxydantes mais dès 250°C des pertes importantes de carbone sont relevées. Les résultats de ces derniers traitements ont également souligné la grande stabilité de l'azote ce qui suggère, pour cet élément, une nature très probablement hétérocyclique.

L'étude des acides humiques associés aux kaolins révèlent que ces composés ont de nombreux caractères communs avec les acides humiques des sols car ils semblent se présenter sous forme de macromolécules compactes et complexes avec des rapports nucleus/chaînes latérales élevés. Toutefois une distinction relative aux faibles teneurs en azote ainsi qu'à son "emprisonnement" dans les structures polyaromatiques doit être soulignée.

Cet ensemble de résultats, tout en conduisant à la proposition d'une typologie des kaolins (tableau 4-I) en fonction de la nature et de la teneur des matières organiques présentes et tout en précisant la nature des acides humiques a également permis d'établir des prévisions concernant l'aptitude des matières organiques à la biodégradation. Les facteurs favorables sont de plusieurs ordres. Tout d'abord, la présence de composés humiques et fulviques suggère, au moins pour ces fractions, une biodégradabilité potentielle. En effet la fraction alcalino-soluble est plus "mobile" que l'humine, donc sans doute plus accessible aux micro-organismes. La présence de divers groupements fonctionnels hydrolysables et oxydables (structures aliphatiques, groupements carboxyliques, fonctions alcools, ...) est également un paramètre favorable. Enfin, la sensibilité certaine des acides humiques vis-à-vis des dégradations thermiques, notamment en conditions oxydantes, prouve que ces composés sont relativement réactifs.

Des expériences de biodégradation ont mis en évidence la présence, dans les argiles, d'une communauté microbienne autochtone ou contaminante apte à se développer en utilisant les matières organiques associées aux kaolins comme source de carbone et d'énergie. Cette microflore initialement peu abondante (10 à 10^3 UFC/g) se développe très rapidement (10^6 à 10^8 UFC/g) et est très diversifiée (bactéries, actinomycètes, champignons). Mais, de façon surprenante, les communautés microbiennes qui ont résisté à une stérilisation partielle des argiles par séchage à 100°C se sont révélées plus efficaces que la microflore non perturbée vis-à-vis de la minéralisation des matières organiques. La biomasse qui a pu résister aux températures élevées semble donc capable d'utiliser plus facilement les matières organiques humifiées. Dans l'ensemble les micro-organismes présents ont montré une grande capacité à se développer dès que les conditions de milieu devenaient favorables (humidité, température). Les taux de minéralisation les plus intéressants ont été mesurés en conditions aérobies, lors

Tableau 4-I : Typologie des argiles en fonction des teneurs en carbone organique et de la répartition des diverses formes de matières organiques.

	Premier Groupe	Deuxième Groupe	Troisième Groupe
Teneur en Carbone organique total	faible 0,04 < %C < 0,12	élevée 0,24 < %C < 0,66	Moyenne 0,12 < %C <0,24
Type des matières organiques dominantes	Humine	Matières organiques alcalino-solubles (AF + AH)	Matières organiques alcalino-solubles (AF + AH)
Rapport AF/AH	élevé > 1	faible < 0,4	moyen 0,6 < AF/AH < 0,7

AF = acides fulviques ; AH = acides humiques

d'apports d'éléments minéraux nutritifs essentiels à la croissance (azote, magnésium, potassium, phosphore), et avec des pulpes peu denses (suspension à 30% d'argile). Une bonne agitation de ces suspensions est également favorable car elle améliore les échanges gazeux ainsi que l'accessibilité de l'oxygène qui est apparu comme l'accepteur d'électron le plus efficace pour la respiration des communautés microbiennes et la biodégradation des matières organiques.

Parmi les peuplements dénombrés dans les argiles se trouvent des micro-organismes qui peuvent être considérés comme oligotrophes car ils se développent lorsqu'ils sont cultivés sur des milieux très dilués (NB/100) ne contenant que 80 mg/l de bouillon nutritif. Ces micro-organismes sont nombreux et constituent sans doute une microflore fort bien adaptée aux faibles teneurs en matières organiques des kaolins étudiés. Des essais d'isolement et d'identification de ces bactéries "oligotrophes" n'ont pu être mené à bien en raison de la difficulté de repiquage et de culture de ces bactéries. Après quelques cultures successives sur milieu dilué (NB/100 gélosé) la croissance de l'inoculum n'est plus observé. Il y aurait lieu de trouver un milieu et des conditions de culture convenables pour étudier plus précisément ces organismes.

Au cours d'expériences de biodégradation menées sur de longues durées (3 mois), des minéralisations importantes de 12 %, 15 % et 25 % du carbone organique total, respectivement pour les échantillons d'argiles SEIG4, MOMB3 et SEIG1, ont pu être mises en évidence. Ces minéralisations, évaluées par les mesures du CO_2 dégagé, ont également pu être vérifiés par l'analyse élémentaire des résidus d'incubation à condition que les échantillons aient été préalablement rincés à l'eau froide afin d'éliminer les produits organiques hydrosolubles formés au cours du biotraitement.

L'ensemble des matières organiques apparaît sensible à la biodégradation bactérienne puisque les acides fulviques, les acides humiques et l'humine ont été concernés et leur répartition ainsi que leur nature modifiées. Ces observations soulignent la bioaccessibilité de composés réputés stables ainsi que leur biodégradabilité quand les conditions de milieu deviennent favorables.

Il a également été possible d'observer une relation entre l'évolution des populations bactériennes et celle des matières organiques associées aux argiles. En effet les trois grandes phases de modification de la nature et de la structure des matières organiques et des substances humiques qui ont pu être distinguées semblent bien correspondre aux phases de développement des communautés bactériennes. Ainsi, la croissance exponentielle des microflores s'est accompagnée d'une étape de simplification des structures des matières organiques. La phase stationnaire a conduit à une augmentation relative des composés inextractibles qui est à son tour suivi, en début de phase de déclin, par une diminution brutale de l'humine s'accompagnant d'une augmentation relative des acides humiques.

Enfin des résultats très complets ont pu être obtenus pour les acides humiques car ces composés représentent la seule fraction qui a pu être extraite et purifiée en quantité suffisante. Sous l'action des micro-organismes les acides humiques ont

été oxydés sur les structures aliphatiques mais aussi et surtout sur les structures aromatiques. Les dégradations microbiennes, auraient généré des oxydations au niveau des noyaux aromatiques mais auraient également permis, dans certains cas, d'aboutir à des ouvertures des cycles constituants la partie polyaromatique des acides humiques.

Ces modifications de structures ainsi que les processus impliqués ont été déduits d'analyses physiques et chimiques concernant les acides humiques extraits et purifiés. Mais des dosages d'activités enzymatiques (de type oxygénase par exemple) pouvant intervenir dans ces mécanismes réactionnels devraient être envisagés pour préciser la biochimie de ces processus.

Enfin, un des objectifs de ce travail était également de contribuer à l'évaluation des modifications possibles des propriétés de ces argiles en tant que minéraux industriels. Les propriétés rhéologiques, la blancheur et le comportement à la cuisson sont les principaux paramètres à prendre en compte.

Le développement bactérien et la biodégradation des matières organiques n'ont pas d'influence sur le comportement thermique des argiles mais "l'oxydabilité" par voie thermique sous courant d'air, la viscosité des pulpes et la blancheur des kaolins subissent des modifications qui sont soit bénéfiques (blancheur et dégradation des matières organiques) soit pénalisantes (viscosité). L'amélioration de la blancheur observée après biodégradation des matières organiques est un résultat encourageant vis-à-vis de l'amélioration des propriétés des kaolins. Mais il n'en est pas de même pour la viscosité qui s'accroît au cours de la biodégradation sans doute en raison de modifications des solutions, de l'état des charges de surface et de la production de substances de type polysaccharidiques. En effet toute modification du comportement rhéologique peut avoir des répercussions ultérieures sur les phases de fabrication et cette tendance doit être vérifiée.

En revanche, "l'oxydabilité" au cours de chauffages suggère que la minéralisation du carbone qui s'opère au cours de la biodégradation peut éventuellement donner lieu à une amélioration des conditions de cuisson. Ces résultats n'ont pas pu être confirmés lors d'essais réalisés en se plaçant dans des conditions semi-industrielles. En effet, des études en tas ont bien été envisagées mais plusieurs paramètres comme l'apport en éléments minéraux nutritifs ainsi que la mise en place d'une lixiviation n'ont pu être réalisés de même que l'amélioration des conditions d'aération du tas. De ce fait, dans ces conditions, le suivi de l'évolution des matières organiques n'a mis en évidence, sur six mois d'essai, que de très faibles variations des teneurs en carbone organique et de la répartition des diverses formes de matières organiques tandis que la composition ainsi que la structures des acides humiques concernés se sont révélés inchangés. De tels essais seraient à reprendre en conditions contrôlées.

Cette étude ouvre de nombreuses perspectives de recherche qui méritent d'être soulignées car leur réalisation permettrait de compléter ce travail tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué.

Il serait tout d'abord judicieux d'étudier les organismes impliqués dans les phénomènes de biodégradation-minéralisation afin d'améliorer leur efficacité et de préciser les mécanismes mis en jeu. En effet les argiles "contiennent" une microflore oligotrophe abondante qui semble être très active. Cette microflore particulière mériterait d'être mieux caractérisée en mettant au point des milieux de sélection et des conditions de culture adaptées à ces bactéries.

Par ailleurs la communauté bactérienne qui se développe dans les échantillons partiellement stérilisés (chauffage à 100°C) et réhumidifiés semble plus active vis-à-vis de la dégradation des matières organiques humifiées. Il serait intéressant de vérifier ce phénomène et de réaliser une étude (identification, diversité, ...) des micro-organismes efficaces. Les résultats obtenus permettraient d'améliorer la biodégradation des matières organiques en adaptant au mieux les conditions nutritionnelles et environnementales et donc les paramètres opérationnels d'une mise en oeuvre des processus de biodégradation.

La connaissance des mécanismes biochimiques de la biodégradation qui passe par la définition des activités enzymatiques impliquées apporterait des données fondamentales et permettrait là aussi d'améliorer la compréhension des phénomènes, la mise en oeuvre et la gestion des processus.

Enfin il serait d'un grand intérêt de mettre en place des dispositifs pilotes en conditions semi-industrielles afin de vérifier la faisabilité de ces processus, les paramètres qui les déterminent et de disposer de suffisamment de matériel pour pouvoir caractériser correctement l'incidence de la biodégradation des matières organiques sur les propriétés des argiles. Ceci permettrait d'une part de vérifier les tendances mises en évidence pour ce qui concerne le blanchiment et la viscosité et d'autre part de réaliser d'autres mesures relatives à la plasticité et à la filtrabilité ainsi que des contrôles des propriétés de floculation-dispersion.

Références Bibliographiques

Aiken, G., Mc Knight, D., Wershaw, R. et Mc Carthy, P. 1985. Humic substances in soil, sediment and water (geochemistry, isolation and characterization). *Wiley Interscience Publication.*

Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science.* 211. 132-211.

Andreux, F. 1978. Etude de la stabilisation physicochimique et biologique d'acides humiques modèles. *Thèse Doct. Etat, Nancy I.* 174 p.

Andreux, F. 1981. Utilisation de molécules modèles de synthèse dans l'étude des processus d'insolubilisation et de biodégradation des polycondensats humiques. *Science du Sol.* 4. 271-291.

Andreux, F. et Munier-Lamy, C. 1994. Génèse et propriétés des molécules humiques. *Pédologie, Constituants et propriétés du sol, BONNEAU, M. & SOUCHIER, B., Masson éd.* Chap. VI. Tome II. 109-142.

Andrews, P. 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91. 222-233.

Babich, H. et Strotsky, G. 1983. Toxicity of nickel to microbes : environmental aspects. *Adv. Appl. Microbiol.* 29. 195-265.

Bach, A. 1980. Evolution dans les conditions d'affleurement de shales uranifères à matière organique (bassin permien de l'Aumance, France). *Thèse 3ème cycle. Univ. Nancy I - I.N.P.L.* 100 p. + annexes.

Barriuso, E. 1985. Caractérisation des fractions organo-minérales et des constituants humiques d'un sol de pelouse subalpine. *Thèse Univ. Nancy I.*

Barriuso, E., Andreux, F. et Portal, J.M. 1985. Quantification des acides humiques et fulviques d'un sol acide de montagne. Discussion méthodologique. Science du Sol. 1. 23-35.

Bellamy, L. J. 1975. The infrared spectra of complex molecules. *Wiley & Sons éd, New York.*

Benalioulhaj, S. et Trichet, J. 1990. Comparative study by infrared spectroscopy of the organic matter of phosphate-rich (Oulad Abdoun basin) and black shale (Timahdit basin) series (Morocco). *Org. Geochem.* 16. (4-6). 649-660.

Blondeau, R. 1987. Generation of hydroxyl analogous radicals by *Arthrobacter sp. FEMS Microbiol Lett.* 41. 263-267.

Blondeau, R. 1988. Evolution des acides humiques soumis à l'activité d'une microflore bactérienne hétérotrophe. *Science du Sol.* 26. (1). 41-50.

Bottner, P. 1985. Response of microbial biomass to alternate moist and dry conditions in a soil incubated with 14C and 15N labelled plant material. *Soil Biol. Biochem.* 17. (3). 329-337.

Bracewell, J. M., Haider, K., Larter. S.R. et Schulten, H. R. 1989. Thermal degradation relevant to structural studies of humic substances. *Humic substances II. Search of structure, HAYES, M.H.B., Mac CARTHY, R.L. & SWIFT, R.S. éd, Wiley, New York.* 181-222.

Brock, T. D. et Madigan, M. T. 1988. *Biology of microorganisms, Fifth edition, Prentice Hall, Englewood Chiffs, New Jersey.*

Brongniart, A. 1877. *Traité des arts céramiques ou des poteries, considérés dans leur histoire, leur pratique et leur théorie. 3ème éd., Librairie de la faculté de médecine, Paris.* 759 p.

Bruckert, S. 1994. Analyse des complexes organominéraux des sols. *Pédologie, Constituants et propriétés du sol, BONNEAU, M. & SOUCHIER, B., Masson éd.* Chap IX., Tome II. 275-295.

Bruckert, S., Gaiffe, M., Blondé, J. L. et Portal, J.M. 1994. Fractionnement de la matière organique et analyse des composés humiques des sols calcimagnésiens humifières du Jura (France). *Geoderma.* 61. (269-280).

Caillère, S., Hénin, S. et Rautureau. 1989. Structure et types de minéraux argileux. *Les bases physiques, chimiques et minéralogiques de la science du sol, CHAMAYOU, H. & LEGROS, J. P. éd, PUF.*

Capus, G. 1979. Matières organiques et minéralisations uranifères : exemple des bassins permo-carbonifères de l'Aumance (Allier) et de Lodève (Hérault). *Thèse I.N.P.L.* 392 p.

Caubère, P. 1987. *Comprendre et apprendre la chimie organique. Presses Universitaires de Nancy.* 356 p.

Chamayou, H. et Legros, J.P. 1989. Les bases physiques, chimiques et minéralogiques de la science du sol. *Presses Universitaires de France.*

Chenu, Cl. 1981. Etude expérimentale du rôle des polysaccharides dans la micro-organisation des argiles. *Mémoire de DEA, Paris VII.*

Cheshire, M. V. 1979. Nature and origin of carbohydrates in soils. *Academic Press, London.*

Combaz, A. 1980. Les kérogènes vus au microscope. *Kerogen, DURAND, B. éd, Technip, Paris.* Chap. 3. 55-111.

Coussot, Ph. et Piau, J.-M. 1993. L'écoulement des boues. *La Recherche.* N° 258. Vol 24. 1084-1091.

De Haan, H. 1977. Effect of benzoate on microbial decomposition of fulvic acids in Tjeukemeer (The Netherlands). *Limnol. Oceanogr.* 22. 39-44.

Dommergues, Y. et Mangenot, F. 1970. *Ecologie microbienne des sols. Masson et Cie. éd, Paris,.* 796 p.

Dubois, M. I., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robert, P. A. et Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chemical.* 28. 350-356.

Duchaufour, Ph. 1991. *Pédologie : Sol, Végétation, Environnement, 3ème édition, Masson éd.* 289 p.

Duchaufour, Ph. et Jacquin, F. 1966. Nouvelles recherches sur l'extraction et le fractionnement des composés humiques. *Bull. E.N.S.A.N.* VIII. (1). 1-24.

Faivre, P. 1988. Lessivage et planosolisation dans les séquences de sols caractéristiques des milieux intrandins de Colombie. *Thèse Doct. Etat, Nancy I.* 563 p.

Flaig, W. 1970. Contribution à la connaissance de la constitution et de la synthèse des acides humiques. *Bull. A.F.E.S., Science du Sol.* 2. 39-72.

Georgakopoulos, A. 1984. Contribution à l'analyse des sédiments récents par la pyrolyse de type Rock Eval. *Thèse Doct. 3ème cycle, Univ. Paris Sud, Centre Orsay.*

Glick, D. P. 1936. The microbiology of aging clays. *J. of Am. Ceram. Soc.* 19. (6). 169-175.

Guillet, B. 1979. Etude du renouvellement des matières organiques des sols par les radioisotopes (^{14}C). *Pédologie, DUCHAUFOUR, Ph. & SOUCHIER, B., Masson éd.,* Tome 2. 210-226.

Haider, K. 1991. Regulation of the formation and degradation of humic substances in soil. *Developments in geochemistry, N°6 : Diversity of environmental biogeochemistry.* 381-389.

Haider, K. et Martin, J. P. 1988. Mineralization of ^{14}C-labelled humic acids and of humic-acid bound ^{14}C xenobiotics by *Phanerochaete chrysosporium. Soil Biol. Biochem.* 20. (4). 425-429.

Harben, P. W. 1992. *The industrial minerals handbook. A guide to markets, spécifications and prices.*

Hattori, T. 1981. Enrichment of oligotrophic bacteria at microsites of soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27. 43-55.

Hayes, M. H. B. 1985. Extraction of humic substances from soils. *Humic substances in soil, sediment and water. Geochemistry, isolation and characterization. AIKEN, G. et al. éd., Wiley & sons publication.* Chap 13. 329-362.

Huc, A. Y. 1973. Contribution à l'étude de l'humus marin et de ses relations avec les kérogènes. *Thèse Doct. Ing. Univ. Nancy I.* 83 p.

Huc, A. Y. 1980. Origine and formation of organic matter in recent sediment and its relation to kerogen. *Kerogen, insoluble matter from sedimentary rocks. DURAND, B. éd., Technip, Paris Publ.* 465-474.

Ivarson, K. C. et Benzing-Purdie, L. M. 1987. Degradation of melanoidins by soil microorganisms under laboratory conditions. *Can. J. Soil. Sci.* 67. 409-414.

Jacquin, P. 1963. Contribution à l'étude des processus de formation et d'évaluation de divers composés humiques. *Thèse Doct. Etat, Nancy I.* 156 p.

Jocteur Montrozier, L. 1984. Nature et évolution de l'azote organique dans les sols et sédiments marins récents. *Thèse Doct. Etat Univ. Nancy I.* 260 p.

Jouenne, C. 1979. Traité de céramiques et matériaux minéraux. *Edition septima, Paris.*

Kaszvbiak, H. et Muszynska, M. 1992. The occurence of obligatory oligotrophic bacteria in the soil. *Zentralbl. Mikrobiol.* 147. 143-149.

Khandelwal, K. C. et Gaur, A. C. 1980. Degradation of humic acids extracted from manure ad soil by some streptomycetes and fungi. *Zbl. Bakteriol. Parasitenkde. Infekt. Krankh Hyg.* 135. 119-122.

Kirk, T. K. et Farell, R. L. 1987. Enzymatic combustion : the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41. 465-505.

Kontchou, C. Y. et Blondeau, R. 1990. Effect of heterotrophic bacteria on different humic substances in mixed batch cultures. *Can. J. Soil Sci.* 70. 51-59.

Kuzvart. 1984. Developments in economic geology. *Industrial Minerals and Rocks.* 18. 307-315.

Landais, P. 1986. Analyse des matières organiques associées aux minéralisations uranifères : implications génétiques. *Géol. Géochem. Uranium, Mém. Nancy.* 10. 257 p.

Leslie-Grady, C. P., 1985. Biodegradation : its measurment and microbiological basis. *Biotechnology and Bioengineering.* Vol XXVII. 660-674.

Levesque, M. et Schnitzer, M. 1966. Effect of NaOH concentration on the extraction of organic matter of major inorganic constituents from a soil. *Can. J. of Soil Sci.* 46. 7-12.

Mangler, J. E. et Tate, R. L. 1982. Source and role of peroxidase in soil organic matter oxidation in Pahokee muck. *Soil Science.* 134. 226-232.

Mann, L. K.. 1986. Changes in soil carbon storage after cultivation. *Soil Sci.* 142. 279-288.

Marshman, N. A. et Marshall, K. C. 1981. Bacterial growth on proteins in the presence of clay minerals. *Soil Biol. Biochem.* 13. 127-134.

Marshman, N. A. et Marshall, K. C. 1981. Some effects of montmorillonite on the growth of mixed microbial cultures. *Soil Biol. Biochem.* 13. 135-141.

Martin, P. M. et Haider, K. 1986. Influence of Mineral Colloids on turnover rates of soil organic matter. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes., S.S.S.A. Special publication.* 17. (Chap 9). 283-304.

Mathur, S. P. 1970. Degradation of soil humus by the fairy ring mushroom. *Plant Soil.* 33. 717-720.

Mathur, S. P. et Paul, E. A. 1966. A microbiological approach to the problem of soil humic acid structures. *Nature.* 212. 646-647.

Mc Keague, J. A., Cheschire, M. V., Andreux, F. et Berthelin, J. 1986. Organo-mineral complexes in relation to pedogenesis. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes., S.S.S.A. Special publication.* Chap 15. 549-592.

Oades, J. M. 1988. The retention of organic matter in soils. *Biogeochemistry.* 5. 35-70.

Pelmont, J. 1993. *Bactéries et environnement. Presses Universitaires de Grenoble.* 899 p.

Rifai, M. et Bertru, G. 1980. La biodégradation des acides fulviques. *Hydrobiologia.* 75. 181-184.

Schnitzer, M. 1978. *Humic substances, chemistry and reactions in soil organic matter. SCHNITZER, M. & KHAN, S. V. éd., Elsevier.* 1-64.

Schnitzer, M. 1986. Binding of humic substances by soil mineral colloids. *Soil Sci. Soc. of Am., Special publication.* 17. 77-101.

Schnitzer, M. 1991. Soil organic matter. The next 75 years. *Soil Science.* 151. (1). 41-58.

Schnitzer, M. et Khan, S. V. 1972. *Humic substances in the environment, DEKKER, M. éd, New York.*

Schnitzer, M. et Griffith, S. M. 1975. Novel method for estimating hydrogen bonded CO2H groups in humic substances. *Can. J. of Soil Sci.* 55. 491-493.

Schnitzer, M. et Schuppli, P. 1989. The extraction of organic matter from selected soils and particle size fractions with 0,5M NaOH and 0,1M $Na_4P_2O_7$ solutions. *Can. J. of Soil Sci.* 69. 253-262.

Schulten, H. R., Plage, B. et Schnitzer, M. 1991. A chemical structure for humic substances. *Naturwissenschaften.* 78. 311-312.

Semenov, A. M. 1991. Physiological bases of oligotrophy of microorganisms and the concept of microbial community. *Microb. ecol.* 22. 239-247.

Stevenson, F. J. 1982. *Humus chemistry : genesis, composition, reactions, Wiley Intersciences, New York.* 443 p.

Stotzky, G. 1986. Influence of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion, and ecology of microbes and viruses. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes., S.S.S.A. Special publication.* Chap. 10. 305-428.

Stout, J. D., Goh, K. M. et Rafter, T. A. 1981. Chemistry and turnover of naturally occuring resistant organic compounds in soil. *PAUL & LADD éd. Soil Biochemistry.* Vol 5. 1-73.

Schulten, H. R. 1987. Time-resolved pyrolysis field ionization mass spectrometry of humic material isolated from freshwater. *Environ. Sci. technol.* 21. 349-357.

Swift, R. S. 1985. Fractionation of soil humic substances. *Humic substances in soil, sediment and water. Geochemistry, isolation and characterization. AIKEN, G. et al. éd., Wiley & sons publication.* Chap. 15. 387-408.

Thiry, M. et Rayot, V. 1993. Optimisation de la valorisation des argiles de Provins pour une diversification des utilisations. Echantillonnage et caractéristiques minérales. *ADEME/DAMREC/ARMINES 1.02.0015.* LHM/RD/93/07.

Tissot, B. et Welte, D. H. 1978. *Petroleum formation and occurence. Springer-verlag.*

Tissot, B., Durand, B., Espitalie, J. et Combaz, A. 1974. Influence of the nature and diagenesis of organic matter in formation of petroleum. *Am. Ass. Petr. Geol. Bul.* 58. 499-506.

Trichet, J., Rachidi, M. et Belayouny, H. 1990. Organic geochemistry of phosphorites : relative behaviors of phosphorus and nitrogen during formation of humic compounds in phosphate-bearing sequences. *Phosphate deposits of the world, Neogene to modern phosphorites. BURNETT, W.C. and RIGGS, S.R.ed. Cambridge University Press.* 3. 87-96.

Van Krevelen, D. W. 1961. Typology, chemistry, physics and constitution. *Elsevier Publ. Co.* 514 p.

Van Veen, J. A. et Kuikman, P. J. 1990. Soil structural aspects of decomposition of organic matter by microorganisms. *Biogeochemistry.* 11. 211-233.

Vandenbroucke, M., Pelet, R. et Debyser, Y. 1985. Geochemistry of humic substances in marine sediments. *Humic substances in soil, sediment and water, AIKEN, G., Mc KNIGHT, D., WERSHAW, R. and Mc CARTHY éd., Wiley Interscience.*

Villieras, F., 1993. Etude des modifications des propriétés du talc et de la chlorite par traitement thermique. *Thèse Doct. INPL, Nancy.* 568 p.

Annexes

ANNEXE 1

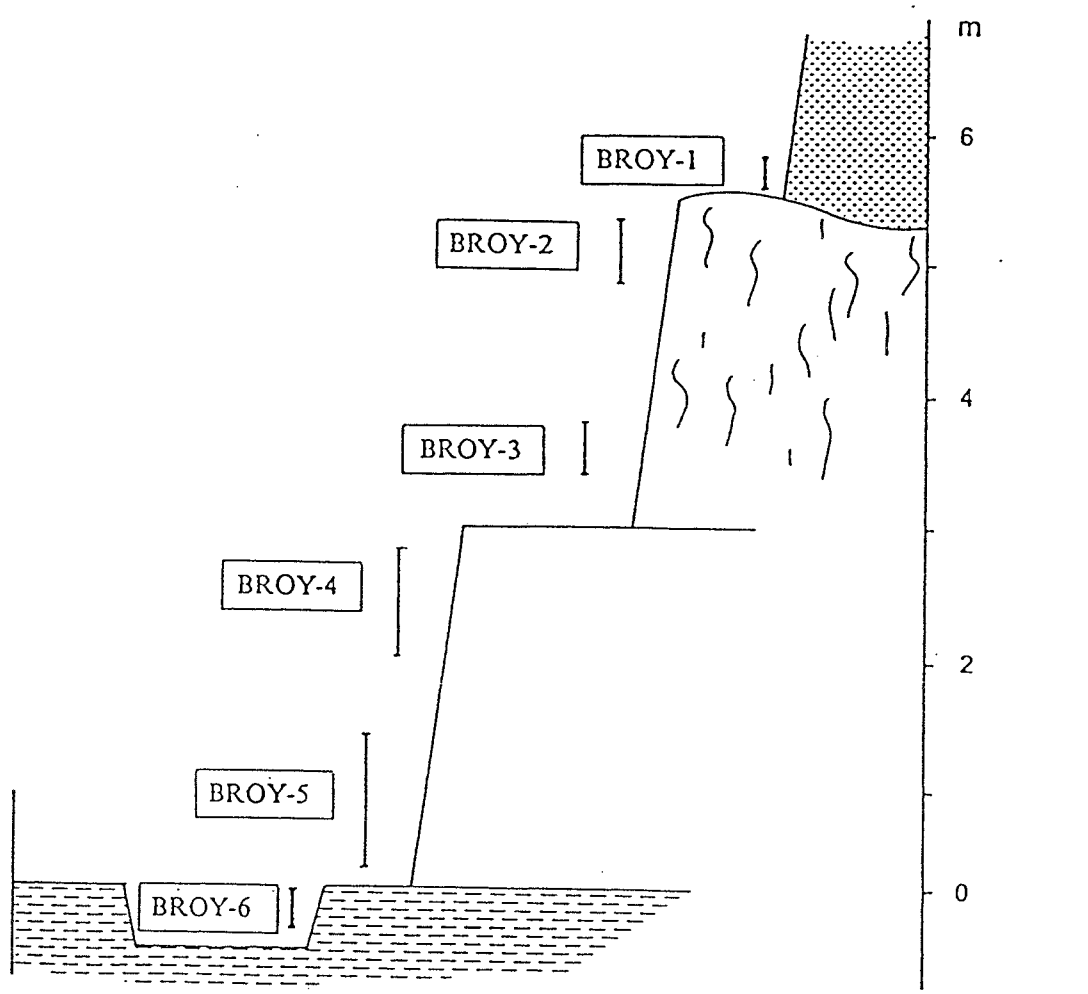
Description des carrières et des échantillons (d'après Thiry et Rayot, 1993)

Echantillon BROY

Carrière proche de la cuesta de l'Ile de France et donc à très faible découverte, inférieure à 1 m par endroits. De ce fait il y a par place de nombreuses racines actuelles dans l'argile et qui par place la pénètre jusqu'à 3 m de profondeur.

A la partie supérieure de la carrière, le sable argileux gris-beige ravine la couche d'argile sous-jacente par de larges ondulations (20-30 m) peu profondes (1-1,50 m).

Couche supérieure d'argile beige bariolée rouge et ocre. Couche inférieure, faïence, gris-brun à gris-beige, avec quelques fentes ferrugineuses espacées. Pied de couche, argile grasse, gris beige avec zones plus sombres de matière organique (dans fentes ?) et taches pyriteuses .



- Coupe de la carrière et situation des échantillons prélevés.

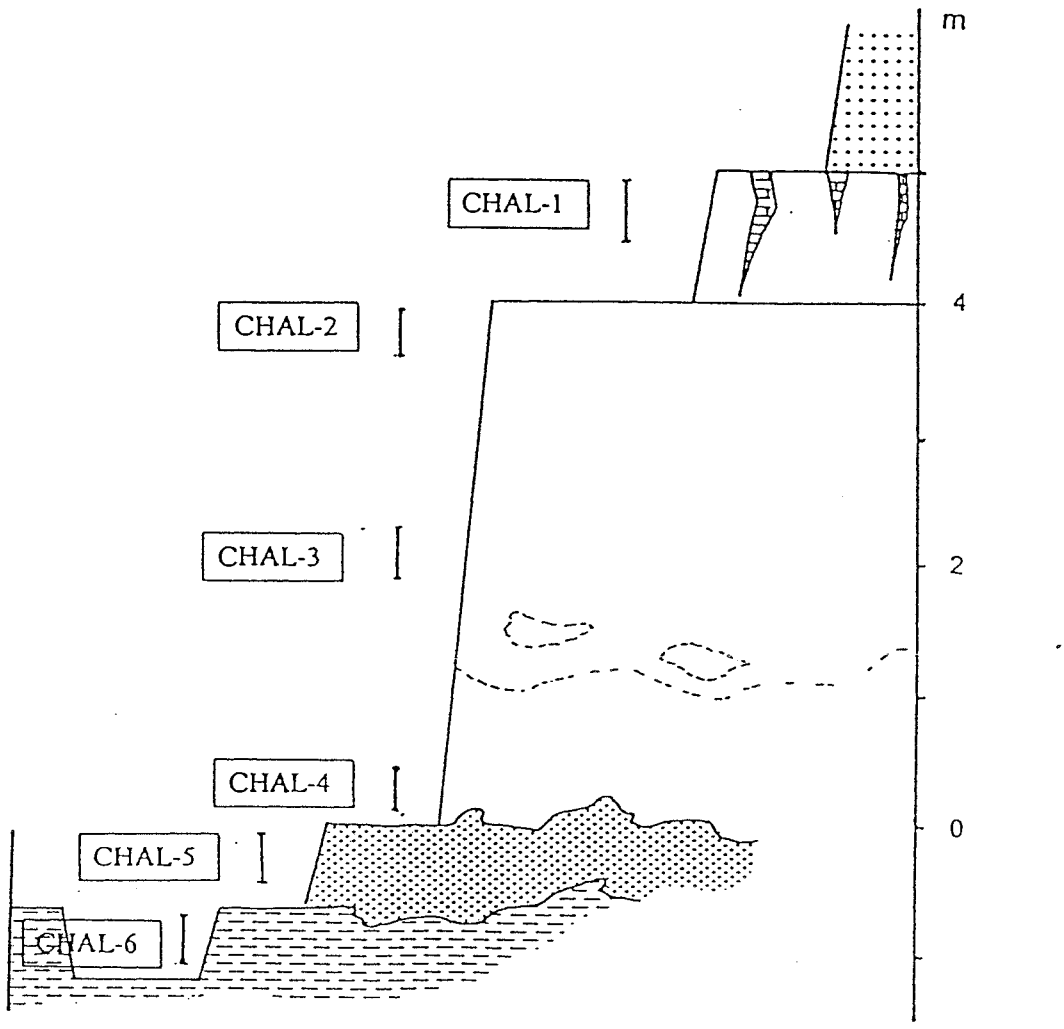
BROY-2 Partie supérieure de l'argile bariolée, BDR bariolée. Echantillon sur 0,5 m. Argile beige et ocre, avec quelques taches rouges. Grasse, à grain perceptible au toucher. Nombreuses figures de glissement. Texture hétérogène, pseudo-bréchique ou amygdalaire centimétrique, en petites écailles superposées. Pas de striotubule d'observé.

BROY-4 Partie supérieure de la faïence, BDR28. Echantillon 0,80 m. Argile maigre, à grain perceptible. Couleur brun-gris avec petites mouches et taches rouges. Présence de quelques racines actuelles. Débit en blocs irréguliers limités par des fentes de glissement. Texture homogène au centre des blocs (0,50 à 1,00 m), puis texture pseudo-bréchique et glomérulaire limitées à des zones décimétriques. Présence de fentes avec oxydes granuleux ocre et argile verdâtre.

BROY-6 Pied de couche, BDR30-35. Echantillon sur 0,30 m. Argile grasse, à grain perceptible. Argile plus riche en matière organique (brune) dans les fentes et en petits éléments millimétriques. Texture homogène par endroit, ailleurs texture pseudo-bréchique et glomérulaire à terriers. Fentes avec argile verdâtre (bileuse).

Echantillon CHAL

En tête de la couche exploitée , une couche de 0,50 à 1,50 m est mise en décharge parce qu'elle est polluée par des infiltrations synsédimentaire de calcaire. L'exploitation se fait sur une couche d'environ 4,50 m d'épaisseur. La partie supérieure de la couche est claire, la partie inférieure plus sombre, couleur chocolat. Le passage d'un faciès à l'autre se fait suivant un front très irrégulier avec invaginations et faciès relictuels. Les rapports entre les 2 couches montrent assez clairement que la couche claire s'est développée au dépend de la couche sombre inférieure après dépôt des argiles. Cette évolution est probablement récente et reliée aux circulations et dissolutions liées à la proximité d'un chenal sableux majeur qui atteint la craie . La couche exploitée est limitée à sa base par une transition sableuse d'environ 0,70 m de puissance. Cette transition est très irrégulière et présente de nombreuses invaginations dans la couche supérieure et la couche inférieure. A la base de l'exploitation est laissé en place une couche d'argile plus grasse (CH28-35).



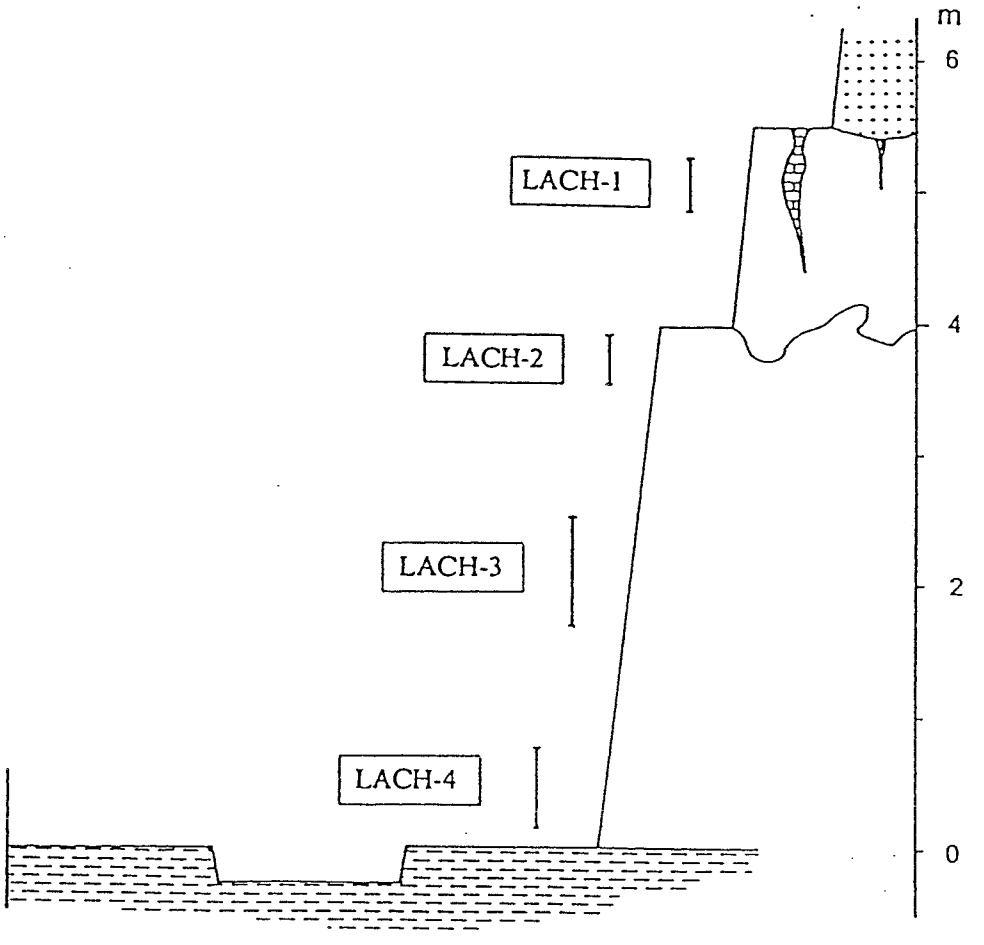
- Coupe de la carrière et situation des échantillons prélevés.

CHAL-3 Partie moyenne de la couche exploitée, CH24. Echantillon sur 0,40 m. Argile gris clair, aspect relativement gras, pas de grain discernable au toucher. Texture homogène. Quelques mouches dispersées de pyrite et amas diffus de 2 à 4 cm de diamètre, espacés de 0,50 à 0,80 m.

CHAL-4 Base de la couche exploitée, CH24. Echantillon sur 0,30 m. Argile assez grasse, couleur chocolat. Taches de 2 à 3 cm et fentes brunes correspondant probablement à de la matière organique. Egalement taches diffuses de pyrite à espacement métrique.

Echantillon LACH

En tête d'exploitation , couche d'argile faïence gris clair sur environ 1,5 m de puissance. Dans certaines zones d'exploitation la couche est polluée par des infiltrations de calcaire et de marne claires dans de larges fentes irrégulières. Le passage à la couche sous-jacente est plus ou moins progressif. La couche principale est exploitée sur environ 4 m en une seule prise. Il s'agit d'une argile brune assez sombre.



- Coupe de la carrière et situation des échantillons prélevés.

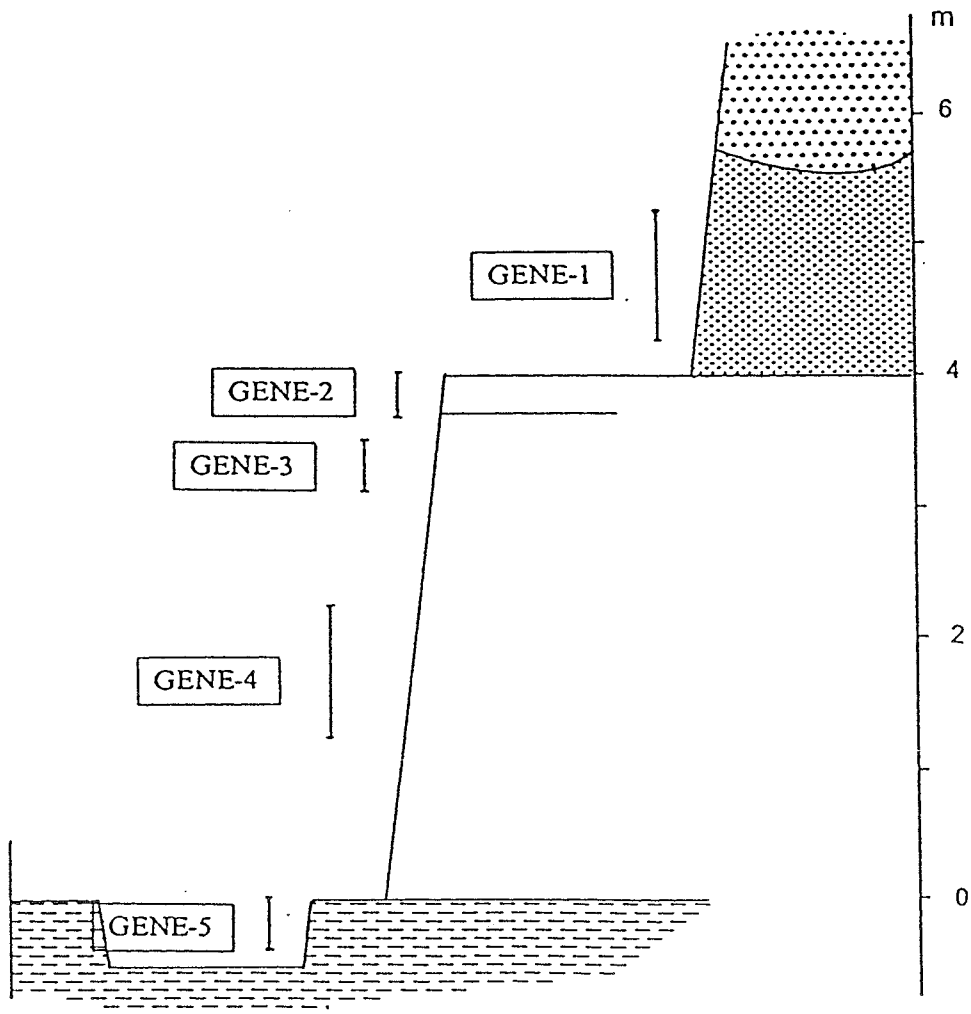
LACH-2 Partie supérieure de la couche principale, LA24. Echantillon sur 0,40 m. Argile sombre, brun noir. Pas de grain discernable. Texture glomérulaire à pseudo-bréchique. Taches pyriteuses diffuses et nodules et plaçages de pyrite dans les fentes. Nombreux réseaux de racines dans les fentes. Mouches brunes de matière organique. Débit en blocs grossiers.

LACH-3 Milieu de la couche principale, LA28. Echantillon sur 0,80 m. Argile gris brun sombre. Relativement maigre à grain perceptible au toucher. Débit en blocs irréguliers. Fentes soulignées par des plaçages noirs de pyrite (plus importants dans fentes horizontales) et plaçages bruns de matière organique. Présence réseaux de radicelles jusqu'à plus de 2,00 m sous le sommet de la couche mais leur densité diminue progressivement avec la profondeur. Argile entièrement bioturbée par des striotubules de 2 à 3 mm de diamètre.

LACH-4 Base de la couche exploitée, LA30. Echantillon sur 0,60 m. Argile relativement plus grasse, gris brun assez soutenu. Grain de silice perceptible au toucher. Très nombreuses fentes de glissement avec mouches brunes (matière organique vraisemblablement) et taches noires pyriteuses. Texture glomérulaire apparemment faite de striotubules. Dans cette partie inférieure des plaçages organiques semblent correspondre à des traces de racines entièrement déformées et étirées.

Echantillon GENE

La carrière présente un toit de couche très accidenté, résultant vraisemblablement des glissements panaméens qui se sont fait lors de l'exploitation. Sous la dalle de quartzite et les sables argileux du sommet de la formation, se trouve une couche d'argile grasse, jaune, riche en TiO_2, qui est mise en remblais . Une couche d'argile brun jaune très régulière, d'environ 0,30 m, fait la transition avec la couche d'extra alumineuse exploitée. la couche exploitée est brun-noir en tête et brun plus clair plus bas. Au pied apparaît graduellement de l'argile bileuse.

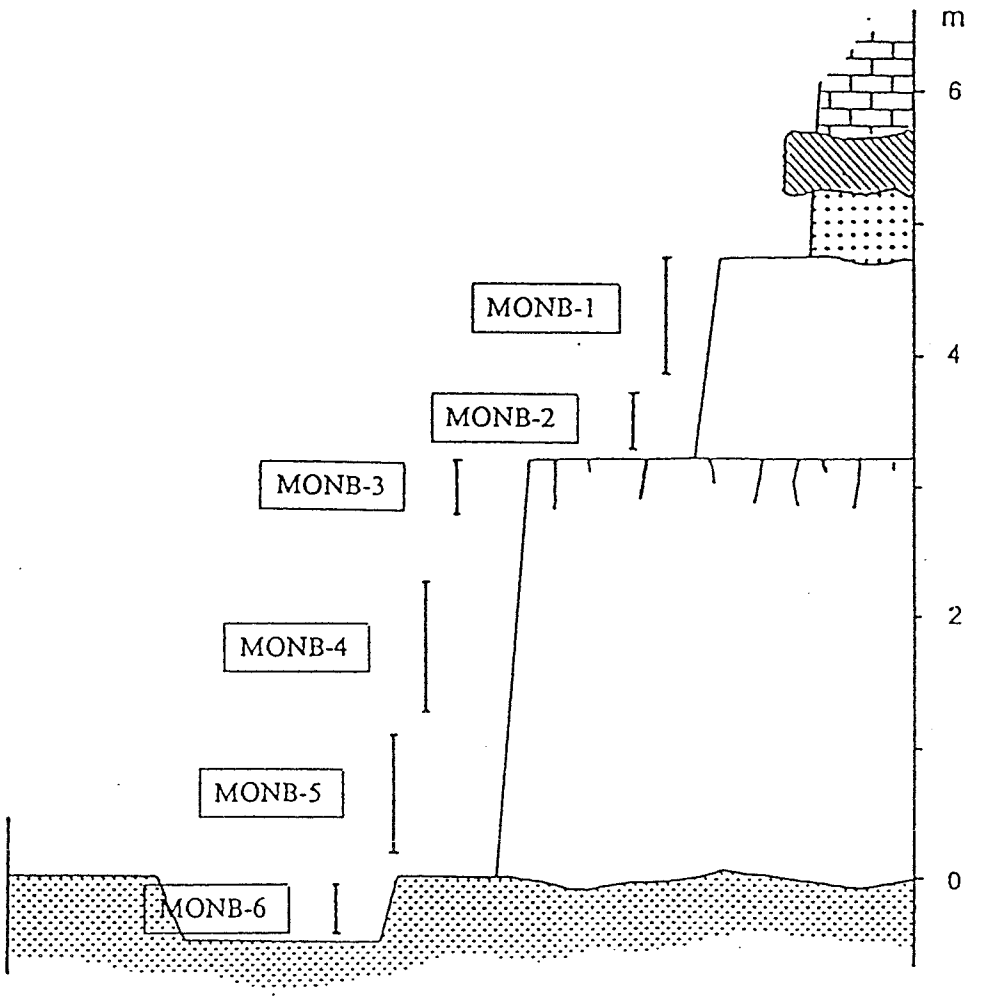


- Coupe de la carrière et situation des échantillons prélevés.

GENE-2 Argile brun-jaune de transition. Echantillon sur 0,40 m. Argile brun-jaune grasse mise en remblais. Passage graduel à l'argile sombre sous-jacente par une argile brun clair (0,20 m). Pas de grain perceptible. Fentes avec radicelles relativement nombreuses. Textures pseudo-bréchique et glomérulaire à proximité des fentes.

Echantillon MOMB

Couche exploitée épaisse, 4,5 m . A la partie supérieure de la couche, est exploité une argile claire, plus maigre, sur environ 1 m. L'essentiel du gisement (plus de 3 m) est constitué d'une argile plus grasse et brune. cette argile montre à son sommet un réseau croisé de fentes, espacées de 0,20 à 0,30 m, à remplissage sombre de matière organique. De la pyrite est également présente, mais en taches diffuses au sein des blocs.



. - Coupe de la carrière et situation des échantillons prélevés.

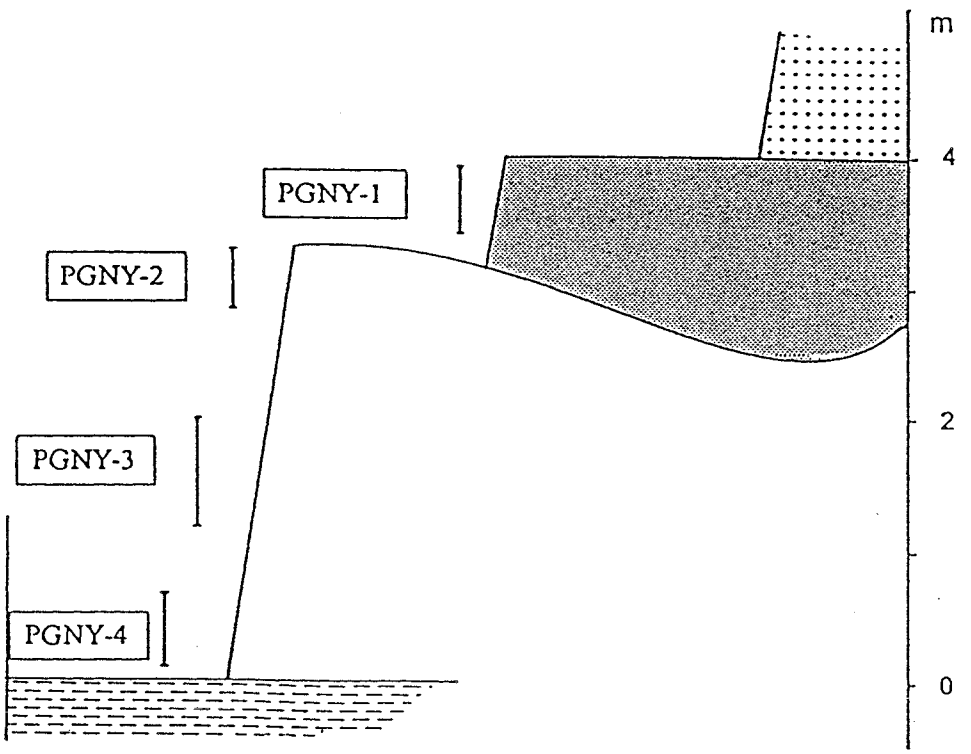
MOMB-1 Sommet de la couche claire, MB blanche. Echantillon sur 0,90 m. Argile gris beige clair avec quelques marbrures noires le long de fentes de glissement.

MOMB-3 Sommet de la couche sombre, MB30. Echantillon sur 0,50 m. Argile grasse, brun chocolat, d'assez nombreuses fentes avec stries de glissement délimitent des blocs de 0,40 X 0,50 X 0,30 m. Les fentes renferment du matériel noir (organique ou pyrite?). La texture de l'argile est tout à fait hétérogène, faite de petits éléments irréguliers d'argile, de taille mm à infra mm, agglomérés. Une certaine porosité semble exister (??), mais peut correspondre à des figures d'arrachement lors de la rupture des blocs.

MOMB-4 Partie médiane de la couche sombre, <mb30. Echantillon sur 1,00 m. Texture hétérogène, glomérulaire, avec traces de racines le long de certaines fentes. Egalement présence de tubules (?). Taches et amas diffus pyriteux.

Echantillon PGNY

Le sable beige-gris de la partie supérieure de la formation montre de belles structures chenalisantes d'environ 10 m de largeur et 1 m de profondeur Par endroit des "remontés" de la couche d'argile apparaissent comme des buttes résiduelles qui indiqueraient jusqu'à 2 m de creusement et avec des bordures aux pentes fortes. L'argile grise sous les sables est mise en décharge. La couche exploitée est constituée d'une argile sombre, brune à brun-noir.

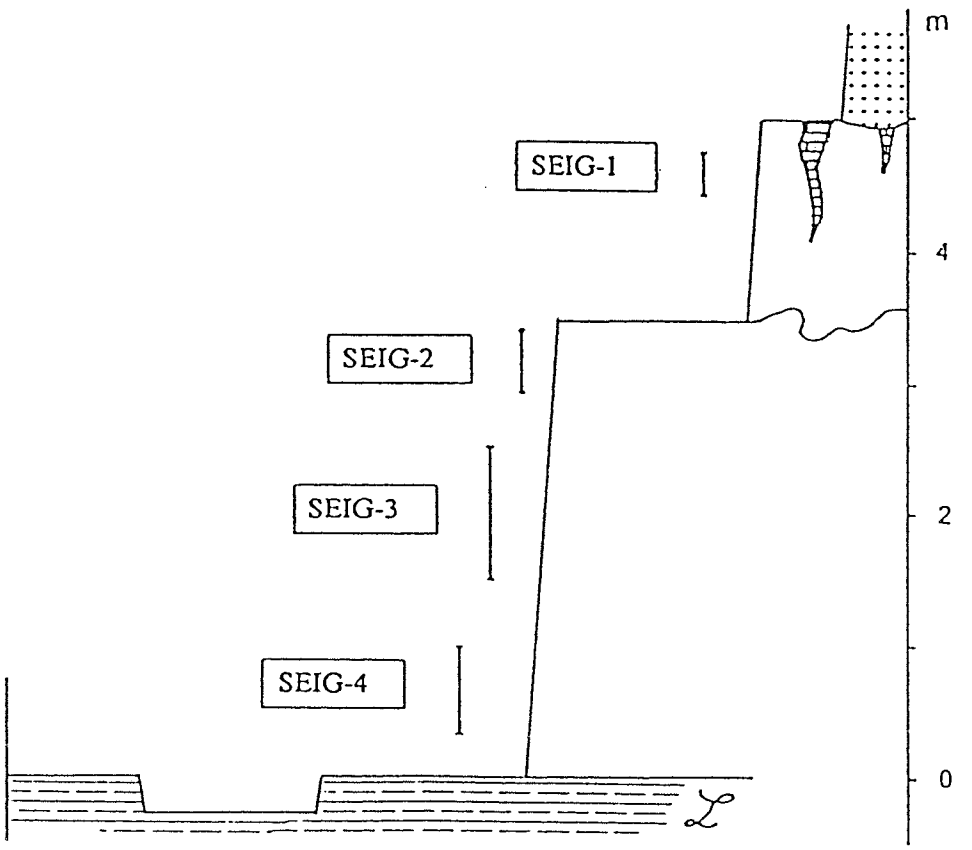


- Coupe de la carrière et situation des échantillons prélevés.

PGNY-3 Partie médiane de la couche exploitée, P32-34. Echantillon sur 0,80 m. Argile grasse, sans grain perceptible, couleur brune assez sombre. Quelques taches noirâtres. Nombreuses fentes avec réseaux de radicelles relativement serrés. Les fentes se répètent quelquefois tous les 2 cm. Texture glomérulaire (le long des fentes?).

Echantillon SEIG

A la partie supérieure de l'exploitation, une couche d'argile gris clair d'environ 1,50 m d'épaisseur est par place pénétrée par de larges fentes remplies de marne et nodules calcaires . La limite avec la couche inférieure est onduleuse et le passage graduel. La couche inférieure, exploitée sur près de 3,50 m, est constituée d'une argile grasse, brun sombre. le pied de couche est constitué d'une argile ligniteuse brune contenant des bois de 3 à 5 cm de diamètre, partiellement pyritisés.



- Coupe de la carrière et situation des échantillons prélevés.

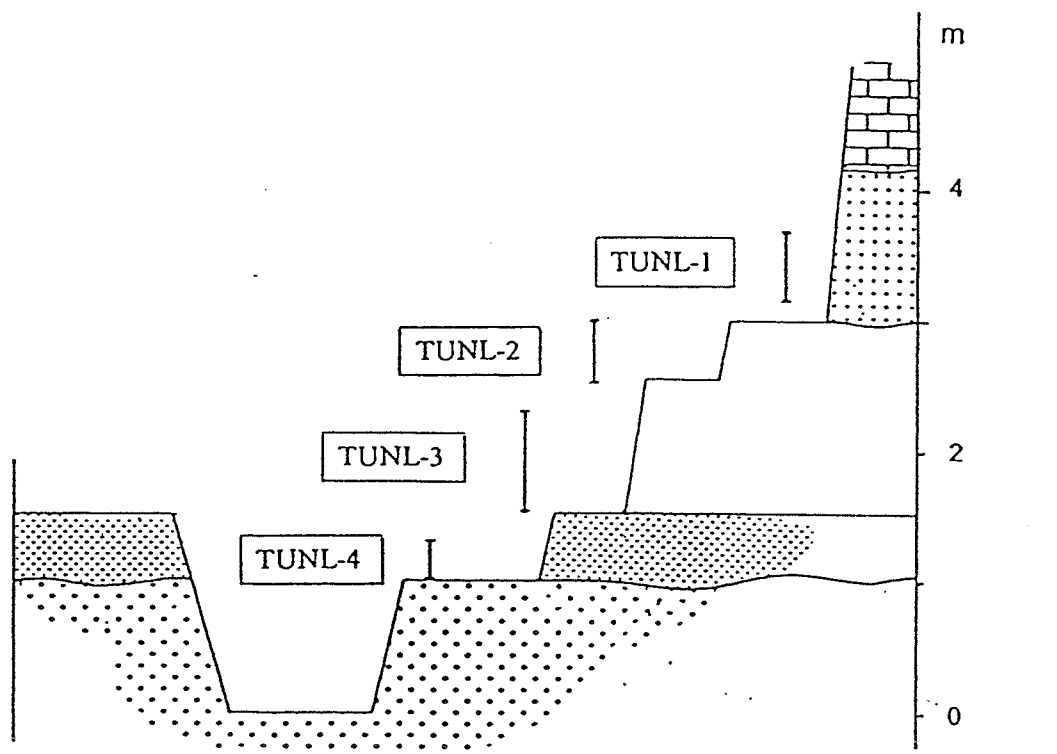
SEIG-1 Couche supérieure d'argile grise, 38-39. Echantillon sur 0,30 m. Argile gris clair, grasse, pas de grain perceptible au toucher. Débit en petits blocs irréguliers. Texture glomérulaire et très nets striotubules de 2-3 mm de diamètre. Quelques mouches de pyrite.

SEIG-2 Sommet de la couche principale, SE38-40. Echantillon sur 0,50 m. argile brun sombre. Pas de grain perceptible. Traces de radicelles sur les joints des fentes. Texture grumeleuse et pseudo-bréchique. Quelques petits bouts de bois ligniteux et petites taches pyriteuses peu importantes. Grandes fentes de glissement. Certaines fentes sont à remplissage plus ou moins sableux, ocre ou noir. En fait il s'agit de carbonate qui pénètrent la couche jusqu'à 1 mm de profondeur.

SEIG-4 Partie inférieure de la couche, SE38-40. Echantillon sur 0,70 m. Argile brun-gris assez sombre, grasse, sans grain. Texture glomérulaire formée de petites cupules d'argile qui sont en fait des striotubules. En fait les terriers sont liés aux bordures des fentes, sur 2 à 3 cm d'épaisseur, vers l'intérieur des blocs la texture est pseudo-bréchique. Radicelles également présentes.

Echantillon TUNL

Couche en exploitation peu épaisse, 1,5 m, d'argile claire (TU24) avec grain assez grossier, mais bonne coulabilité. Toute la partie inférieure du sparnacien est constituée d'un sable brun-noir grossier, sur plus de 3 m d'épaisseur . C'est là une configuration totalement différente de celle connue il y a quelques années, où la couche d'argile était épaisse et brune, recoupée par une transition sableuse. Les faciès clairs actuels sont vraisemblablement dus à la proximité d'un chenal sableux.



. - Coupe de la carrière , et situation des échantillons prélevés.

TUNL-2 Sommet couche exploitée (TU24). Echantillon sur 0,50 m. Argile maigre, beige claire avec infiltrations ocre tous les 0,30-0,70 m. Grain de silice perceptible.

TUNL-4 Pied de couche, non exploité. Echantillon sur 0,30 m. Argile sableuse gris brunâtre ocre. Grain moyen. Vers la partie supérieure de la couche fentes avec réseau dense de radicelles parfaitement conservées.

ANNEXE 2

Analyses minéralogiques des échantillons

	Analyse RX Roche Totale										Argiles					
	ARG	QRT	AN	RUT	PYR	SID	GO	DO	CAL	TOT	KAO	K/S	SM	ILL	ATT	TOT
BROY 2	70	30								100	95			5		100
BROY 4	60	40		1						101	95			5		100
BROY 6	75	25								100	90	10				100
CHAL 3	70	30	1							101	95			5		100
CHAL 4	65	35	1							101	95			5		100
GENE 2	75	25		1						101	95	5				100
LACH2	65	35								100	95	5				100
LACH 3	70	30								100	95	5				100
LACH 4	70	30								100	100					100
MOMB 1	75	25								100	95			5		100
MOMB 3	70	30								100	95			5		100
MOMB 4	70	30								100	85	5		10		100
PGNY 3	65	35	1							101	95	5				100
SEIG 1	100			1						101	95	5				100
SEIG 2	100			1						101	95	5				100
SEIG 4	100									100	90	10				100
TUNL 2	60	40								100	95			5		100
TUNL 4	55	45								100	95	5				100

ANNEXE 3

Analyses chimiques des échantillons

	SiO_2	Al_2O_3	TiO_2	Fe_2O_3	CaO	MgO	K_2O	Na_2O	P_2O_5	PF	Total
BROY 2	61,1	25,9	1,2	1,5	0,3	0,2	0,5	0,0	0,0	9,1	99,8
BROY 4	65,6	22,1	1,7	1,0	0,3	0,2	0,5	0,0	0,0	8,0	99,4
BROY 6	57,3	27,6	2,1	1,4	0,3	0,1	0,1	0,0	0,1	10,3	99,3
CHAL 3	61,1	26,1	1,5	0,9	0,3	0,2	0,4	0,0	0,0	9,2	99,7
CHAL 4	65,5	22,3	2,0	1,0	0,3	0,2	0,2	0,0	0,0	8,2	99,7
GENE 2	55,4	29,1	2,5	1,8	0,4	0,1	0,0	0,0	0,0	10,6	99,9
LACH 2	64,0	23,6	1,4	1,4	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0	9,3	100,4
LACH 3	64,0	24,1	1,3	1,2	0,3	0,3	0,1	0,0	0,0	9,0	100,3
LACH 4	60,9	26,7	1,2	1,2	0,4	0,3	0,1	0,0	0,0	9,9	100,7
MOMB 1	60,0	26,7	1,2	1,1	0,3	0,2	0,6	0,0	0,0	9,6	99,7
MOMB 3	57,0	28,3	1,2	1,2	0,4	0,3	0,7	0,0	0,0	10,6	99,7
MOMB 4	59,4	25,8	1,3	1,2	0,4	0,3	0,8	0,0	0,0	10,2	99,4
PGNY 3	55,0	28,6	2,0	1,8	0,6	0,2	0,0	0,0	0,1	11,2	99,5
SEIG 1	45,8	37,0	1,6	1,1	0,5	0,3	0,0	0,0	0,2	13,2	99,7
SEIG 2	45,1	36,2	2,0	1,6	0,5	0,4	0,0	0,0	0,1	13,7	99,6
SEIG 4	46,3	36,0	1,6	1,6	0,5	0,4	0,1	0,0	0,1	13,2	99,8
TUNL 2	69,6	20,4	1,4	1,0	0,3	0,2	0,2	0,0	0,0	7,5	100,6
TUNL 4	78,3	14,4	1,1	0,8	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	5,1	100,0

ANNEXE 4

Colorimétrie au phénol (Dubois et *al.*, 1956)

Matériel :

- tubes à essai
- bain-marie
- photocolorimètre

Réactifs :

- phénol (C_6H_5OH), solution à 5% dans H_2O
- acide sulfurique (H_2SO_4), 36 N
- glucose ($C_6H_{12}O_6$), solution à 100 mg/l dans H_2O

Protocole :

1 ml de solution de phénol est ajouté à 2 ml de solution à doser, ainsi que de solution étalon de glucose convenablement diluée (réalisation d'une gamme étalon), les tubes sont agités.

5 ml de H_2SO_4 sont rapidement additionnés, ce qui permet un mélange efficace et une distribution uniforme de la température.

Après 10 min les tubes sont agités puis placés 20 min à 30°C. Les D.O sont lues à 485 nm. Les concentrations sont calculées par référence à la courbe étalon obtenue avec le glucose.

ANNEXE 5

Dosage du CO_2 par infra-rouge

Le mode opératoire de l'analyseur LCA-2 est fondé sur l'absorption du CO_2 dans l'infra-rouge, la cellule d'analyse fonctionnant à une longueur d'onde de 2325,6 cm^{-1}, ce qui correspond au maximum d'absorption pour cette molécule.

L'appareil IRGA (Infra Red Gas Analyser) se compose d'une source infra-rouge, d'une cellule dans laquelle passe le gaz à analyser, d'un détecteur et d'une pompe qui permet de faire passer le gaz à analyser dans la cellule, ce dernier étant injecté dans un flux d'air débarassé de CO_2 et d'humidité. Le dispositif qui a été utilisé comprend une pompe supplémentaire qui permet d'augmenter le débit et d'obtenir des pics très étroits au niveau du détecteur.

Les réponses obtenues sont données en unités arbitraires (hauteur de pic). Elles sont ensuite transformées en vpm (volume par million) en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue préalablement à chaque série de mesure. Puis les quantités de CO_2 dégagé exprimées en vpm sont transcrites en mg de carbone selon l'équation :

$$C\ (\text{en mg}) = CO_2 \text{ dégagé (en vpm)} \times \frac{\text{Volume du flacon (en ml)}}{10^6} \times \frac{12}{22,4}$$

Préparation de la gamme étalon.

La gamme étalon est constituée de flacons sérum de 250 ml remplis d'hélium et présentant une surpression totale de 50 ml par flacon correspondant à x ml de CO_2 pur et (50 - x) ml d'hélium.

L'expression des résultats sous forme : (concentration de CO_2 (en vpm)) = f (valeur lue) donne une droite d'équation $y = ax + b$. Cette formule permettant par la suite de calculer directement la concentration en CO_2 des échantillons.

ANNEXE 6

Généralités sur la kaolinite (d'après Caillère *et al.*, 1982)

La kaolinite est un phyllosilicate dioctaédrique du groupe 1:1 (ou T/O) constituée de feuillets alumineux octaédriques et de feuillets tétraédriques siliceux. Elle a pour formule structurale théorique $2(Si_2Al_2O_5\ (OH)_4)$ et sa composition théorique est la suivante : SiO_2 (46,5 %), Al_2O_3 (39,5 %) et H_2O (14 %).

La structure de la maille cristalline est représentée par la figure A-1. La répartition des ions dans la maille est la suivante par plan d'atomes :

$6\ O^{2-}$	soit 12 charges -
$4\ Si^{4+}$	soit 16 charges +
$4\ O^{2-}\ 2(OH)^-$	soit 10 charges -
$4\ Al^{3+}$	soit 12 charges +
$6\ (OH)^-$	soit 6 charges -

L'ensemble est électriquement neutre et constitué par un feuillet d'une épaisseur de 0,715 nm en moyenne. Dans les particules de kaolinite les feuillets successifs sont empilés de telle sorte que le plan d'oxygène d'un feuillet se trouve en face d'hydroxyles du feuillet voisin. Il en résulte l'apparition de liaisons hydrogènes entre les feuillets ce qui donne une certaine rigidité aux particules de kaolinite. La capacité d'échange de la kaolinite est donc limitée aux charges des zones de rupture latérale des feuillets, elle est relativement faible.

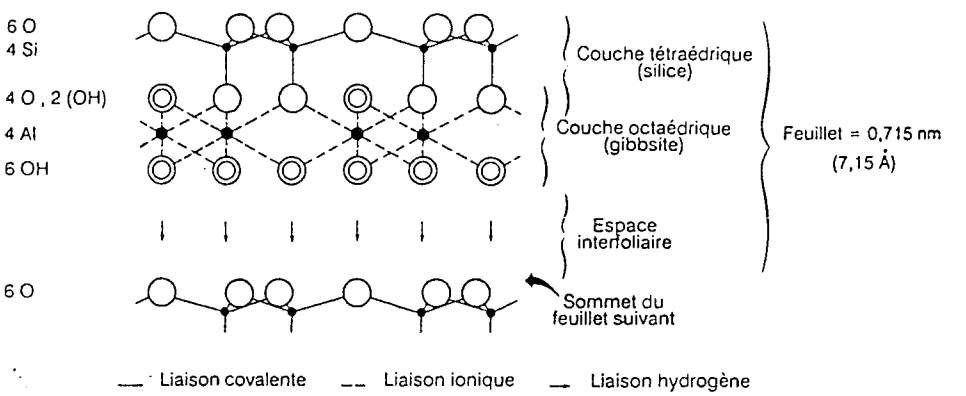


Figure A-1 : Représentation d'un feuillet de kaolinite.

ANNEXE 7

Estimation des encombrements moléculaires par chromatographie sur gel.

Matériel :

- Colonne de verre (diamètre 150 mm)
- Appareillage GILSON comprenant une microcellule de détection par absorption UV à 280 nm, un enregistreur et un collecteur de fractions

Réactifs :

- Gel de dextrane SEPHADEX G75 (Pharmacia Fine Chemistry)
- Tampon d'élution TRIS à pH=7,5 :
  * 250 ml de TRIS 0,2 M
  * 400 ml d'HCl 0,1 N
  * eau distillée qsp 1000 ml
- Solution de Bleu Dextran (Pharmacia Fine Chemicals) à 2 % dans le tampon d'élution

Protocole :

Le gel, préalablement gonflé dans l'eau et sous vide pendant 24 heures, est introduit dans la colonne de verre sur une hauteur n'excédant pas huit fois le diamètre de celle ci. Le tampon TRIS à pH=7,5 est utilisé comme éluant.et également pour la mise en solution des acides humiques (2 mg dans 10 ml de tampon).

0,5 ml de la solution d'acides humiques sont déposés à la surface de la colonne et élués. Le suivi de l'élution se fait par la détermination de la densité optique de chaque fraction.

L'ensemble des données correspondant à l'élution d'un composé permet de calculer le coefficient de partage (Kav) de celui ci en appliquant la formule suivante :

$$K_{av} = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$

Vt : volume total de gel
Vo : volume mort de la colonne ce qui correspond au volume d'élution d'une molécule exclue, c'est-à-dire le Bleu Dextran
Ve : volume d'élution du composé étudié

Les courbes d'étalonnage des gels, établies par Andrews (1964), permettent, dans un dernier temps, d'estimer les poids moléculaires des composés en les reliant aux coefficients de partage déterminés.

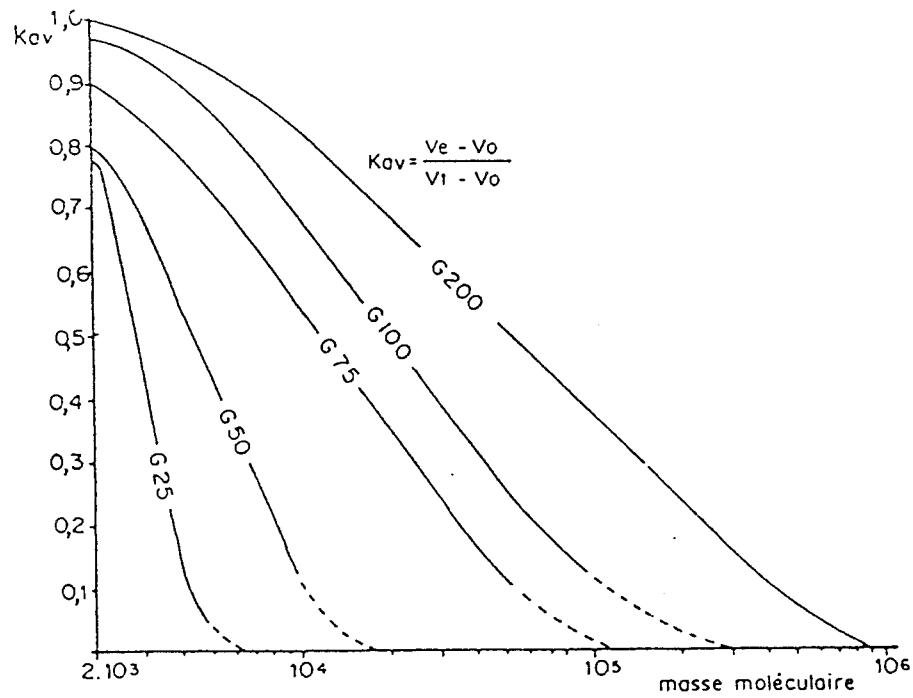


Figure A-2 : Courbes d'étalonnage des gels : évolution des Kav en fonction de la masse moléculaire de protéines globulaires (d'après Andrews, 1964).

ANNEXE 8

Le viscosimètre à torsion de Gallencamp

Appareillage :

- Viscosimètre de Gallencamp
- Bécher (360 cm^3 environ)

Principe :

Le viscosimètre pendulaire à torsion de Gallencamp, présenté figure A-3, se compose d'un cylindre plein suspendu au bout d'un fil de torsion d'environ 30 cm de longueur et d'un disque gradué en degrés situé à l'extrémité inférieure du fil dont il est solidaire. Le cylindre est immergé dans la barbotine et tourne sous l'action du fil qui, préalablement à chaque mesure, est vrillé de 360°. La libération du disque provoque la mise en mouvement du cylindre central dans la suspension. Si il n'y a aucune perte d'énergie, le cylindre tourne de 360 ° au delà de sa position d'équilibre. Si, au contraire, il y a une perte d'énergie, une différence peut être notée entre l'angle atteint et 360°. Cette différence, appelée "angle d'amortissement", donne une mesure de la viscosité de la pulpe.

Mode opératoire :

Prélever une quantité suffisante de suspension argileuse homogène pour remplir le bécher, le niveau devant être à 5 mm du bord.

Mettre le bécher en place sur le pied, le corps de mesure baignant dans la barbotine.

Libérer le porte index préalablement vrillé d'un tour sur la droite.

Noter la graduation atteinte sur le cadran.

Les mesures doivent être effectuées le plus rapidement possible, pour que la pulpe reste homogène, et à des températures voisines.

Résultats :

La valeur de l'angle d'amortissement caractérise la viscosité du produit testé.

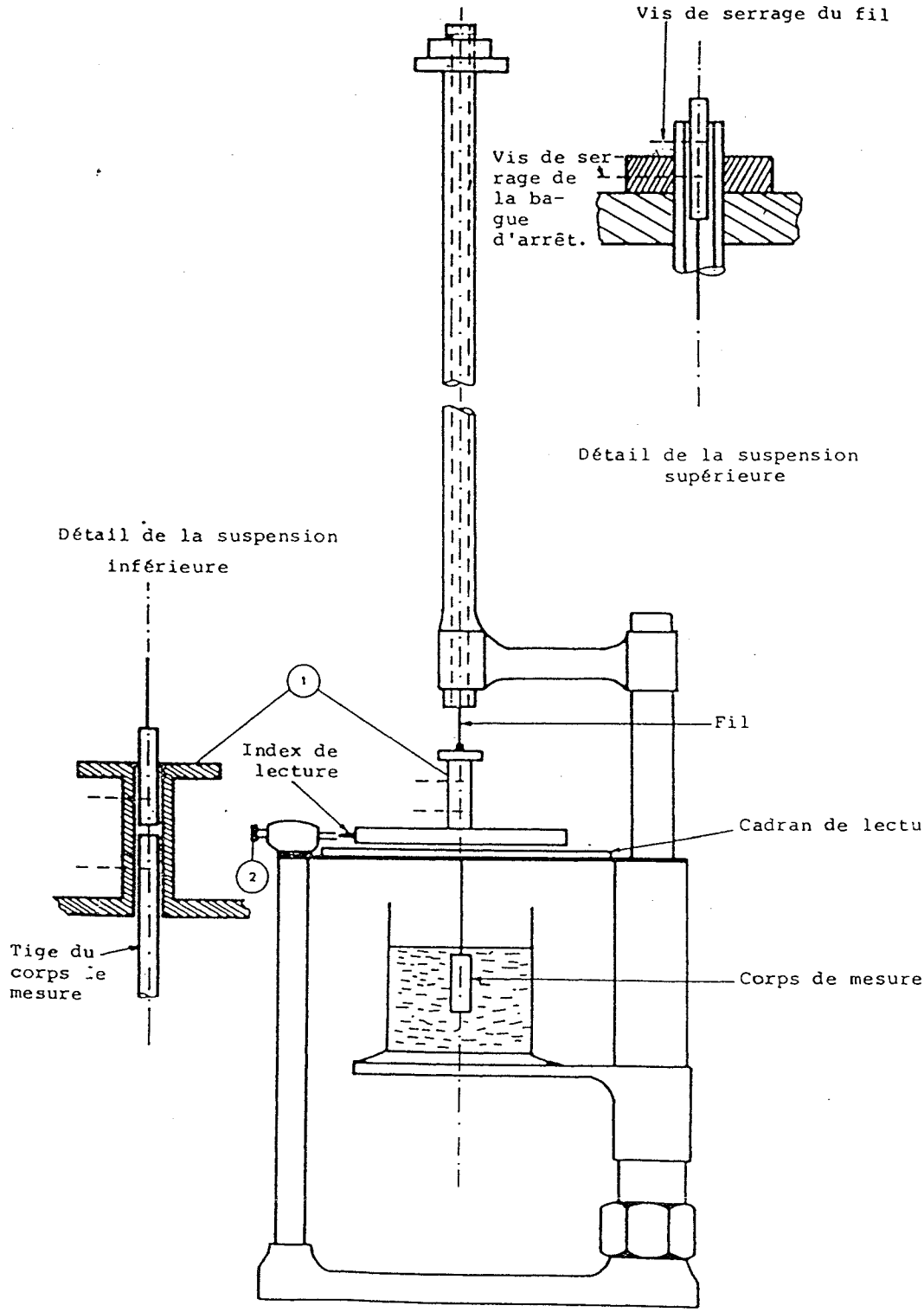


Figure A-3 : Schéma du viscosimètre à torsion de Gallencamp

Université HENRI POINCARÉ NANCY 1

Nom : **GERMAIN**

Prénom : **Corinne**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

en GÉOMICROBIOLOGIE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 17 JUIL. 1995 - n° 309

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1 ★ LE PRESIDENT

I.P. FINANCE

3C-F9

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1
24-30, rue Lionnois B.P.3069 54013 Nancy cedex
Tél : 83 32 81 81 Fax : 83 32 95 90
Adresse électronique : @presn1.u-nancy.fr

Résumé

Les matières organiques associées aux argiles (kaolins) de vingt échantillons représentatifs d'un bassin sédimentaire se révèlent être de nature humique puisqu'elles renferment de 4 à 32 % d'acides fulviques et de 2 à 58 % d'acides humiques. L'ensemble des résultats conduit à la proposition d'une typologie des kaolins de ce bassin en distinguant trois groupes d'argiles en fonction des teneurs en matières organiques, acides fulviques et humiques. Les acides humiques, étudiés plus en détails, présentent des structures condensées et polyaromatiques. Ils sont relativement pauvres en azote mais portent de nombreux groupements fonctionnels oxygénés (notamment carboxyliques et phénoliques), ils sont également facilement oxydables à moyenne température (250°C à 350°C).

Placées en conditions favorables (humidité, température, aération, apports de nutriments minéraux), les communautés microbiennes autochtones, dont certaines apparaissent comme oligotrophes, se développent rapidement en utilisant les matières organiques associées aux argiles comme source de carbone et d'énergie. Elles assurent selon la nature des matières organiques (donc selon le type de kaolin), sur des durées relativement courtes, la minéralisation en CO_2 de 12 à 25 % des matières organiques, leur transformation en biomasse microbienne, la production de composés hydrosolubles de type polysaccharidique ainsi que la transformation des acides humiques qui sont essentiellement oxydés au niveau des structures polyaromatiques.

La stimulation des peuplements microbiens hétérotrophes conduit donc à la biodégradation ainsi qu'à la biotransformation de matières organiques réputées stabilisées.

Suite à la biodégradation des matières organiques, le comportement thermique des argiles n'est pas modifié, la viscosité des suspensions semble varier légèrement et la blancheur, qualité importante des kaolins, s'améliore.

Mots cles : Matières organiques, composés humiques, kaolin, communautés micobienne, biodégradation

Summary

The organic matter of 20 clay samples representative of a sedimentary basin was studied. It appears to be humic substances constituted by fulvic acids (4 to 32 %) and humic acids (2 to 58 %). The results lead to propose a typology of these kaolins. In that way three groups are distinguished relatively to the organic carbon, fulvic and humic acids contents. The humic acids, particularly studied, present condensed and polyaromatic structures. Their total N contents are relatively low. They are rich in oxygen-containing functional groups (especially carboxylic and phenolic). Moreover, they are easily oxydable during pyrolysis at medium temperature (250°C to 350°C).

Under favourable conditions (moisture, temperature, mineral nutrient inputs), the autochtonous microbial communities grow rapidly by using organic matter associated to the clay as carbon an energy source. Some of the micro-organisms involved appear to be oligotrophic. Depending on the organic matter constituents and for relatively short-time incubations, heterotrophic bacteria are able to mineralize in CO_2 12 to 25 % of the organic matter. This activity promotes the production of microbial biomass and polysacharidic hydrosoluble compounds. It also leads to the transformation of humic acids essentially by oxidation of polyaromatic structures.

The stimulation of heterotrophic micro-organisms promotes the biodegradation and biotransformation of highly recalcitrant organic matter.

After the biodegradation of organic matter, the clay thermic properties are still the same but the suspension viscosity seems to be slightly modified and the whiteness, a main quality of the kaolins, is improved.

Key words : Organic matter, humic compounds, clay, microbial communities, biodegradation