



**HAL**  
open science

# Dissolution du phénanthrène dans des milieux aqueux en présence de tensioactifs et biodégradation par *Pseudomonas putida* dans un milieu de fermentation modèle

Tatiana Pantsyrnaya

► **To cite this version:**

Tatiana Pantsyrnaya. Dissolution du phénanthrène dans des milieux aqueux en présence de tensioactifs et biodégradation par *Pseudomonas putida* dans un milieu de fermentation modèle. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL077N . tel-01749528

**HAL Id: tel-01749528**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749528>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Institut National Polytechnique de Lorraine**

**Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires**

**Ecole Doctorale Ressources, Procédés, Produits et Environnement**

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés UPR CNRS 3349

**THESE en co-tutelle avec**

**L'Université Mendeleiev de Chimie Technologique de Moscou**

Présentée en vue de l'obtention du grade de

**Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine**

**Spécialité :**

**Procédés Biotechnologiques et Alimentaires**

Par Tatiana PANTSURNAYA

**Dissolution du phénanthrène dans des milieux aqueux en présence de tensioactifs et  
biodégradation par *Pseudomonas putida* dans un milieu de fermentation modèle**

Soutenue publiquement le 9 novembre 2011 devant le jury constitué de :

**Mme Nelly Cochet**, Professeur, UTC de Compiègne

**Rapporteur**

**Mme Svetlana Butova**, Professeur, MSUFP

**Rapporteur**

**M. Evgeny Borisenko**, Professeur, MSUFP

**Examinateur**

**M. Joseph Boudrant**, Directeur de Recherche CNRS, ENSAIA-INPL

**Examinateur**

**Mme Elena Guseva**, Maître de Conférences, UMCTR

**Examinateur**

**M. Pascal Poupin**, Maître de Conférences, Université de Metz

**Examinateur**

## Remerciements

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au sein du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés. Je tiens tout d'abord à remercier M. Gabriel Wild, le directeur du LRGP, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie également M. Joseph Boudrant et Mme Elena Guseva, qui ont dirigé ma thèse pendant ces années, mais aussi M. Stéphane Delaunay, M. Emmanuel Guédon et Mme Natalia Menshutina qui suivaient le déroulement du travail. Je leur suis très reconnaissante pour leur encouragement, leurs conseils scientifiques et leur aide dans les moments cruciaux. Je tiens à remercier M. Jean-Louis Goergen pour le temps consacré à ma thèse. Il n'est, malheureusement, plus parmi nous, mais il restera toujours dans nos coeurs.

Je remercie également M. Fabrice Blanchard pour sa disponibilité et pour le partage de ses connaissances. Un merci spécial à M. Christian Sanchez pour ses conseils précieux dans la partie physico-chimique de ce travail. Merci à M. Pascal Poupin pour le partage de l'ensemble des informations relative au consortium. Je remercie M. Cédric Paris pour son aide considérable avec la LC-MS, M. Mohamed Ghoul qui m'a permis l'accès au tensiomètre, Mme Marie-Antoinette Dziurla pour des questions techniques sur la HPLC, M. Jean-François Rémy pour la microscopie électronique, M. Xavier Franboisier pour les conseils sur les dosages.

Je tiens par la suite à remercier tous mes collègues et amis du laboratoire qui ont toujours su créer une ambiance agréable du travail. Je remercie particulièrement Layal d'avoir passé des longues heures des fermentations avec moi. Je remercie également mes amies du club de tennis : Danièle, Virginie, Ariane et Anne-Marie, pour les matchs qui m'ont permis de rester en forme. Merci à Anna, Alex et Alla pour leur soutien moral, l'humour et le bon humeur qu'ils partageaient avec moi. Merci à Guillaume d'avoir été là pour moi. Finalement, je remercie ma famille pour son soutien et ses encouragements.

## Résumé

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants persistants très répandus dans les écosystèmes du monde entier. La plupart d'entre eux sont considérés comme toxiques, mutagènes et cancérigènes. C'est pourquoi leur élimination de l'environnement est primordiale. L'utilisation des microorganismes pour la dégradation des HAP est une méthode économique et ayant un grand potentiel. Puisque la plupart des HAP sont peu solubles dans les milieux aqueux, ce qui limite leur dégradation microbienne, l'ajout des tensioactifs peut être bénéfique pour leur biodégradation par une augmentation de leur biodisponibilité. Ce travail avait pour objectif d'étudier la dissolution et la biodégradation du phénanthrène (HAP modèle) en présence de tensioactifs. Les microorganismes choisis dans ce travail sont *Pseudomonas putida* DSMZ 8368 connue pour sa capacité de dégradation des HAP et un consortium microbien Pyr01 issu des rives d'une rivière polluée (la Fensch).

Tout d'abord, l'étude de la toxicité des différents tensioactifs pour *P. putida* DSMZ 8368 a été effectuée. Trois tensioactifs, le Tween 80, le Brij 30 et les rhamnolipides, ont été retenus. Ensuite l'efficacité de la solubilisation du phénanthrène en présence de différentes concentrations en tensioactif a été déterminée. Le Brij 30 s'est avéré être non toxique et le plus efficace. Il a été choisi pour des expériences ultérieures. Les effets de la dispersion, de la solubilisation et du traitement thermique sur la solubilité et la biodégradation du phénanthrène par *P. putida* DSMZ 8368 ont été également étudiés. Les meilleurs résultats ont été obtenus en combinant l'utilisation du Brij 30 ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) avec un traitement thermique préliminaire.

La deuxième partie présente les résultats sur la dégradation du phénanthrène par le consortium Pyr01. La comparaison entre la biodégradation du phénanthrène par *P. putida* DSMZ 8368 et le consortium Pyr01 a été réalisée. Contrairement à ce qui a été observé dans le cas de la biodégradation par *P. putida* DSMZ 8368, la présence du Brij 30 ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) a eu un effet négatif sur la biodégradation du phénanthrène par le consortium Pyr01. Le tensioactif semblait être consommé préférentiellement au phénanthrène. Ainsi, l'effet d'un tensioactif sur les cultures pures et mixtes peut être très différent. L'étude de cet effet sur les microorganismes en question est primordial afin d'optimiser la biodégradation des HAP appliquant des tensioactifs.

La troisième partie de ce travail a consisté en l'étude de la solubilisation du phénanthrène au point de trouble du Brij 30. L'effet de l'abaissement de la température jusqu'à la valeur de la température de culture de *P. putida* DSMZ 8368 sur la solubilisation du phénanthrène a été également étudié.

Mots clés: Hydrocarbures aromatiques polycycliques, phénanthrène, tensioactifs, dispersion, traitement thermique, biodégradation.

## Sommaire

Production scientifique.....	8
Liste des abréviations.....	11
Liste des tableaux.....	12
Liste des figures.....	13
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>16</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>19</b>
<b>I. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).....</b>	<b>20</b>
1.1. Généralités.....	20
1.2. Définition des HAP.....	20
1.3. Propriétés physico-chimiques des HAP.....	20
1.4. Toxicité, mutagénicité et cancérogénicité.....	20
2. Contamination de l'environnement par les HAP.....	23
2.1. Sources d'émission des HAP.....	23
2.2. Niveaux de contamination en HAP.....	23
2.2.1. Air.....	23
2.2.2. Eaux et précipitations.....	24
2.2.3. Sédiments.....	25
2.2.4. Sol.....	25
2.2.5. Aliments.....	27
2.2.6. Organismes vivants.....	28
3. Dégradation des HAP.....	30
3.1. Dégradation abiotique des HAP.....	30
3.1.1. Oxydation.....	30
3.1.2. Dégradation photochimique.....	31
3.2. Biodégradation des HAP.....	31
3.2.1. Dégradation par les bactéries.....	33
3.2.2. Dégradation par les champignons.....	33
3.2.3. Dégradation par les algues.....	34
3.2.4. Dégradation en conditions anaérobies.....	34
3.3. Dégradation des HAP en présence de tensioactifs.....	35
3.3.1. Les tensioactifs.....	36
3.3.2. Utilisation des tensioactifs dans la dégradation des HAP.....	40
3.3.3. Utilisation du phénomène du point de trouble pour la solubilisation des HAP..	41
<b>II. Le phénanthrène.....</b>	<b>43</b>
1. Généralités.....	43
2. Biodisponibilité du phénanthrène.....	44

3. Biodégradation du phénanthrène.....	46
3.1. Biodégradation du phénanthrène par <i>Pseudomonas putida</i> .....	46
3.2. Biodégradation du phénanthrène par des cultures mixtes.....	49
<b>III. Conclusion de la synthèse bibliographique.....</b>	<b>52</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>54</b>
1. Microorganismes.....	55
2. Composition des milieux de culture.....	56
3. Conservation des souches.....	57
4. Conditions de culture de <i>P. putida</i> DSMZ 8368.....	58
5. Conditions de culture du consortium Pyr01.....	58
6. Détermination du poids sec de <i>P. putida</i> DSMZ 8368.....	58
7. Extraction du phénanthrène et de ses catabolites.....	59
8. Identification du phénanthrène et de ses catabolites par LC-MS.....	59
9. Dosage du phénanthrène et de ses catabolites par CLHP.....	60
10. Nettoyage de la colonne et du circuit analytique.....	60
11. Toxicité des tensioactifs.....	61
12. Détermination de la CMC des tensioactifs.....	62
13. WSR des tensioactifs.....	63
14. Dispersion mécanique du phénanthrène.....	64
15. Microscopie.....	64
16. Analyse d'images.....	64
17. Calcul des paramètres cinétiques.....	64
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>66</b>
<b>CHAPITRE 1 : Etude de la dispersion, de la solubilisation et du traitement thermique du phénanthrène. Choix des conditions optimales pour la biodégradation du phénanthrène par <i>Pseudomonas putida</i> DSMZ 8368.....</b>	<b>67</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>68</b>
1. Adsorption du phénanthrène sur les surfaces des matériaux.....	69
2. Dispersion mécanique du phénanthrène : microscopie.....	71
3. Effet de l'ajout de sulfate d'ammonium sur la croissance de <i>P. putida</i> DSMZ 8368.....	79
4. Article publié :	
"Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media".....	80
4.1. Toxicité des tensioactifs vis-à-vis de <i>P. putida</i> DSMZ 8368.....	86
4.2. Détermination de la CMC.....	87
4.3. Effet du Brij 30 (0,5 g/L) sur la solubilité du phénanthrène.....	88
4.4. Effet de la dispersion mécanique du phénanthrène sur sa biodégradation.....	89
Contribution de l'article.....	90
<b>Conclusion.....</b>	<b>90</b>

<b>CHAPITRE 2. Etude de la biodégradation du phénanthrène par le consortium Pyr01, comparaison avec celle réalisée par <i>P. putida</i> DSMZ 8368.....</b>	92
<b>Introduction.....</b>	93
1. Effet de l'ajout du sulfate d'ammonium la croissance du consortium Pyr01.....	93
2. Effet de la concentration en glucose dans le milieu de préculture sur la croissance de <i>P. putida</i> DSMZ 8368 et sa capacité à dégrader le phénanthrène.....	94
3. Manuscrit en préparation : “Biodegradation of phenanthrene in aqueous media by <i>Pseudomonas putida</i> and a bacterial consortium in the presence and in the absence of a surfactant”.....	95
<b>Conclusion.....</b>	111
<b>CHAPITRE 3. Solubilisation et biodégradation du phénanthrène au point de trouble...</b>	112
<b>Introduction.....</b>	113
Manuscrit en préparation : “Solubilization of phenanthrene above cloud point of Brij 30: a new application in biodegradation”.....	114
<b>Conclusion.....</b>	126
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	127
1. Augmentation de la biodisponibilité du phénanthrène.....	128
2. Biodégradation du phénanthrène par voie microbienne.....	130
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	133
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	136

## Production scientifique

### **Publication internationale :**

1. Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J.L., Guédon, E., Guseva, E., Boudrant, J., 2011. Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media. *Chemosphere*, 83, 29-33.

### **Actes de congrès avec comité de lecture :**

2. Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J.L., Guédon, E., Sanchez, C., Guseva, E., Boudrant, J., 2009. Dispersion et dissolution du phénanthrène dans des milieux hydrophiles en présence de tensioactifs et étude préliminaire de la biodégradation par *Pseudomonas putida*. Récents Progrès en Génie des Procédés – Numéro 98 – 2009, ISBN 2-910239-72-1, Ed. SFGP, Paris, France, pp. 3231-3236.
3. Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J.L., Guédon, E., Guseva, E., Boudrant, J., 2010. Biodégradation du phénanthrène par *Pseudomonas putida* DSMZ 8368 : étude préliminaire de l'influence d'un surfactant et du sulfate d'ammonium. Actes du séminaire 2010 de l'école doctorale RP2E. ISBN 2-9518564-8-2.
4. Pantsyrnaya, T., Delaunay, S., Goergen, J.L., Guédon, E., Guseva, E., Boudrant, J., 2010. Bacterial biodegradation of heat-treated phenanthrene in the presence of a non-ionic surfactant. *Journal of Biotechnology*, 150 (1), p. 282.

### **Articles dans des journaux sans comité de lecture :**

5. Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J.L., Guédon, E., Sanchez, C., Guseva, E., Boudrant, J., 2008. Dissolution of phenanthrene in aqueous media in the presence of surfactants and biodegradation by *Pseudomonas putida* in a model culture medium. 1<sup>st</sup> Congress of the Federation for Environmental Research, Blaise Pascal University of Clermont Ferrand, Clermont Ferrand, 22-24 october 2008, Programme and Abstracts, p. 107.

6. Pansyrnaya, T.V., Guédon, E., Goergen, J.-L., Delaunay, S., Boudrant, J., Guseva, E.V., 2010. L'influence de différents agents tensioactifs et de la dispersion sur le taux de la solubilité du phénanthrène. Matériaux et technologies innovants dans les branches chimique et pharmaceutique de l'industrie : livre de communications de la conférence internationale avec des éléments de l'école scientifique pour les jeunes chercheurs, Moscou, 2010, pp. 82-83.
7. Pansyrnaya, T.V., Guédon, E., Goergen, J.-L., Delaunay, S., Boudrant, J., Guseva, E.V., 2010. L'influence de différents agents tensioactifs et de la dispersion sur le taux de la solubilité du phénanthrène. Innovations et investissements pour la modernisation et le changement technologique de l'économie de la Russie. Livre de matières – FGU NII RINKCE, NP « Innovatika », 2010, pp. 203-204.
8. Pansyrnaya, T.V., Guédon, E., Goergen, J.-L., Delaunay, S., Boudrant, J., Guseva, E.V., 2010. Etude de l'effet des agents tensioactifs et de la dispersion sur la solubilité du phénanthrène pour les procédés de dépollution des effluents. Succès en chimie et en industrie chimique : livre des travaux scientifiques, volume XXIV, № 1 (106). – Moscou : L'Université Mendeleiev de Chimie Technologique de Russie, 2010, pp. 46-47.

#### **Participation à des congrès et séminaires :**

- Posters :

Congrès interdisciplinaire «Interactions entre les processus physico-chimiques et microbiologiques dans l'environnement », 22-24 octobre 2008, Clermont-Ferrand, France (comm. n° 5).

Séminaire RP2E, 15 janvier 2009, Vandoeuvre-lès-Nancy, France : « Dispersion et dissolution du phénanthrène dans des milieux hydrophiles en présence de tensioactifs et essais préliminaires de biodégradation par *Pseudomonas putida* ».

X Moscow International Salon of Innovation and Investments, 8-10 septembre 2010, Moscou, Russie (comm. n° 6 et 7)

14<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium and Exhibition, 15-16 septembre 2010, Rimini, Italie (comm. n° 4).

Séminaire RP2E, 28 janvier 2010, Vandoeuvre-lès-Nancy, France (comm. n° 3).

- Présentations orales :

12<sup>th</sup> congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 14-16 octobre 2009, Marseille, France (comm. n° 2).

Réunion plénière du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GISFI), 25 janvier 2010, Vandoeuvre-lès-Nancy, France : « Dispersion, dissolution et dégradation par voie microbienne du phénanthrène en présence de tensioactifs en procédé discontinu ».

## Liste des abréviations

1H2Na	Acide 1-Hydroxy-2-Naphtoiique
AC	Activité Cancérogène
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CEDRE	CEntre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux
CLHP	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance
CMC	Concentration Micellaire Critique
CPE	Extraction au Point de Trouble
CTAB	Bromure de CétylTriméthylAmmonium
EFSA	Agence Européenne de Sécurité des Aliments
EPA US	Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis
ESI	Ionization par ElectroSpray
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HOC	Composés Organiques Hydrophobes
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
IPCS	Programme International sur la Sécurité Chimique
ITOPF	Fédération Internationale de Pollution des Propriétaires de Pétroliers
JOCE	Journal Officiel des Communautés Européennes
LAS	Dodécyl benzène sulfonate de sodium
LDAO	Oxyde de LaurylDiméthylAmine
LC-MS	Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
MEB	Microscope Electronique à Balayage
NAPL	Phase Liquide Non Aqueuse
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PS	Poids Sec
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SIM	Suivi d'Ion Sélectionné
SRM	Suivi d'une Réaction Sélectionnée
UV	Ultraviolet
WSR	Rapport Massique de Solubilisation

## Liste des tableaux

Tableau 1. Exemple du niveau de contamination en surface des sols par les HAP (d'après Johnsen et Karlson, 2007).

Tableau 2. Exemples de molécules appartenant aux quatre groupes de tensioactifs.

Tableau 3. Classification, espèces productrices et utilisation en biotechnologie environnementale des tensioactifs d'origine naturelle (d'après Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011).

Tableau 4. Caractéristiques des tensioactifs.

Tableau 5. Concentration en phénanthrène dans l'acétonitrile d'un échantillon standard avant après filtration sur les filtres Millipore® (0,20 µm) en cellulose régénérée.

Tableau 6. Effet de la dispersion mécanique sur la solubilité du phénanthrène.

Tableau 7. Vitesses spécifiques de croissance  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) de *P. putida* DSMZ 8368 en fonction de différentes concentrations en tensioactifs.

Tableau 8. Intermédiaires de la voie de biodégradation du phénanthrène observés dans la littérature.

## Liste des figures

Figure 1. Représentation des structures chimiques des 16 HAP classés prioritaires par l'EPA US.

Figure 2. Les régions K, L, M et « Bay » d'un HAP benz[*a*]anthracène (d'après Vijayalakshmi et Suresh, 2008).

Figure 3. Origines de la pollution par les hydrocarbures dans les eaux en 2000 (d'après Clark, 2001).

Figure 4. Limites inférieure (LI) et supérieure (LS) des concentrations moyennes en huit HAP (benzo[*a*]pyrène, chrysène, benz[*a*]anthracène, benzo[*b*]fluoranthène, benzo[*k*]fluoranthène, benzo[*ghi*]perylène, dibenz[*a,h*]anthracène, indéno[*1,2,3-cd*]pyrène) dans 4065 échantillons d'aliments répartis dans 33 catégories/sous-catégories (d'après EFSA, 2008).

Figure 5. Caractéristiques chimiques agissant sur la bioaccumulation (d'après Abarnou, 2000).

Figure 6. Teneurs en HAP dans les moules prélevées à proximité des estuaires européens (d'après Bergman, 1993).

Figure 7. Les différentes voies de dégradation microbienne des HAP (d'après Cerniglia, 1992).

Figure 8. Dégradation anaérobie du naphthalène (d'après Zhang *et al.*, 2000).

Figure 9. Représentation schématique d'un monomère et d'une micelle de tensioactif.

Figure 10. Etapes de la séparation des phases d'un tensioactif non ionique (**A**) et de la CPE du naphthalène (**B**) (d'après Quina et Hinze, 1999).

Figure 11. Structure du phénanthrène.

Figure 12. Modèles proposés pour l'incorporation du phénanthrène à l'intérieur des cellules bactériennes par l'intermédiaire de tensioactif (d'après Schippers *et al.*, 2000).

Figure 13. Voie de biodégradation du phénanthrène par le genre *Pseudomonas* (d'après Ouyang, 2006).

Figure 14. Voie de biodégradation du naphthalène chez *Pseudomonas* (d'après Mrozik *et al.*, 2003 ; Ouyang, 2006).

Figure 15. Voie de dégradation du phénanthrène par un consortium proposée par Zhang *et al.* (2010).

Figure 16. Exemple de la composition du consortium Pyr01 au cours de la biodégradation du pyrène.

Figure 17. Détermination de la concentration micellaire critique par la méthode de la lame de Wilhelmy.

Figure 18. Dispositif et variables utilisés afin d'établir le bilan de phénanthrène au cours de la solubilisation et de la dispersion mécanique du phénanthrène par l'Ultra-Turrax dans l'eau distillée à 28 °C en présence de Brij 30.

Figure 19. Electronographie (MEB) des cristaux du phénanthrène (15 mg/L) après la dispersion par l'Ultra-Turrax à 9500 rpm en présence (A, B) et en absence (C, D) de Brij 30 (30 mg/L).

Figure 20. Electronographie (MEB) des cristaux du phénanthrène (15 mg/L) après la dispersion par la presse de French à 1500 bar en présence (A, B) et en absence (C, D) de Brij 30 (30 mg/L).

Figure 21. Micrographie obtenue par microscopie optique (X1000) des cristaux du phénanthrène (50 mg/L) solubilisés par le Brij 30 (30 mg/L) en solution aqueuse avant (A) et après (B) la dispersion par l'Ultra-Turrax à 9500 rpm ; micrographie des micelles du Brij 30 (200 mg/L) dans l'eau distillée (C, D).

Figure 22. Répartition des tailles de particules de phénanthène : A. Après dispersion par l'Ultra-Turrax (8000, 9500 et 11000 rpm) ; B. Après dispersion par la presse de French (1000, 1250, 1500, 1750 et 2000 bar).

Figure 23. Variation du nombre de particules (%) en fonction de leur circularité après la dispersion : A. par l'Ultra-Turrax ; B. par la presse de French.

Figure 24. Evolution de la concentration en biomasse de *P. putida* DSMZ 8368 au cours du temps dans le milieu MMB contenant 0,5 ; 5 ; 10 et 15 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  avec le glucose (50 g/L) comme seule source de carbone.

Figure 25. Détermination de la CMC des tensioactifs.

Figure 26. Concentrations en phénanthrène soluble dans l'eau distillée en fonction du temps.

Figure 27. Cinétique de la biodegradation du phénanthrène (50 mg/L) par *P. putida* DSMZ 8368 en présence du Brij 30 (0,5 g/L) avec et sans dispersion préliminaire par l'Ultra-Turrax.

Figure 28. Evolution de la concentration en biomasse du consortium microbien Pyr01 au cours du temps dans le milieu MMB contenant 0,5 et 5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  avec le phénanthrène (50 mg/L) comme source de carbone.

Figure 29. Evolution de la concentration en biomasse de *P. putida* DSMZ 8368 au cours de la biodégradation du phénanthrène (50 mg/L) en présence de Brij 30 (0,5 g/L) issue des précultures contenant 0, 5, 10 et 50 g L<sup>-1</sup> du glucose.

## **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants persistants ubiquistes issus de la combustion incomplète de matières organiques. L'utilisation du bois, du charbon et du pétrole par l'homme en tant que combustible a fortement influencé l'accumulation des HAP partout dans le monde. L'importance de leur élimination de l'environnement vient du fait qu'une grande partie d'entre eux est considérée comme toxique, mutagène et cancérogène. L'élaboration de méthodes efficaces de dégradation des HAP comprend une approche scientifique pluridisciplinaire, mais aussi la prise en compte de l'aspect économique du procédé et de la possibilité d'envisager une application pratique de ces méthodes.

L'utilisation des microorganismes pour la dégradation des HAP est une méthode économique qui suscite un grand intérêt actuellement. D'une part, les microorganismes isolés des sites contaminés ont démontré des activités de dégradation élevées. D'autre part, les microorganismes ont une croissance rapide et sont capables de s'adapter aux différentes conditions environnementales. En fait il existe plus de 75 genres de bactéries capables d'utiliser les HAP comme seule source de carbone et d'énergie. Finalement, la biodégradation est une méthode très appropriée pour la dépollution des grands volumes d'eaux faiblement chargées en HAP, notamment des effluents et des eaux naturelles.

La connaissance des voies métaboliques participant à la biodégradation des HAP et l'optimisation de leur utilisation sont nécessaires afin d'améliorer l'efficacité des procédés correspondants. Puisque la plupart des HAP sont peu solubles dans les milieux aqueux, ce qui limite leur dégradation microbienne, l'ajout des tensioactifs peut être bénéfique pour la biodégradation des HAP par une augmentation de leur biodisponibilité.

Cette thèse a pour objectif d'étudier la dissolution et la biodégradation d'un HAP modèle (le phénanthrène) dans les milieux aqueux en présence de tensioactifs par une souche pure, à améliorer l'efficacité des procédés correspondants et à appliquer le procédé amélioré à la dégradation de cet HAP par un consortium microbien. Le phénanthrène a été pris en tant que modèle de HAP car il a été montré qu'après avoir été cultivée sur le phénanthrène une grande partie des bactéries issues d'un site pollué sont capables de dégrader d'autres HAP, y compris ceux de haut poids moléculaire (Aitken *et al.*, 1996). Les microorganismes choisis dans ce travail sont la souche de collection *Pseudomonas putida* DSMZ 8368 connue pour sa capacité de dégradation des HAP et un consortium de microorganismes

Pyr01 issu des rives d'une rivière de la Moselle polluée par la sidérurgie, la Fensch. Une approche multidisciplinaire de la biodégradation du phénanthrène a été élaborée. Une étude physico-chimique ayant pour objectif d'augmenter la biodisponibilité de cet HAP a été mise en œuvre. L'aspect microbiologique a également été pris en compte : la toxicité et la possible consommation des tensioactifs par les microorganismes ont été déterminées ; plusieurs compositions du milieu de culture ont été testées ; les paramètres cinétiques de croissance et de biodégradation ont été comparés.

Ce mémoire est structuré en six parties.

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique et décrit notamment les HAP, leur propriétés majeures, les niveaux d'émission dans l'environnement et les méthodes de dégradation. Un accent particulier est porté sur les données relatives à la biodégradation des HAP et sur l'utilisation de tensioactifs dans ces processus. Une description détaillée du phénanthrène et de sa dégradation est également présentée.

La seconde partie décrit les méthodologies expérimentales et les techniques analytiques utilisées au cours des travaux de cette thèse.

Dans la troisième partie, l'étude de la toxicité des différents tensioactifs pour *P. putida* DSMZ 8368 a été effectuée. Ensuite l'efficacité de la solubilisation du phénanthrène en présence de différentes concentrations en tensioactif a été déterminée. Les effets de la dispersion, de la solubilisation et du traitement thermique sur la solubilité et la biodégradation du phénanthrène par *P. putida* DSMZ 8368 sont également étudiés dans cette partie.

La quatrième partie concerne la dégradation du phénanthrène par le consortium Pyr01. La comparaison entre la souche pure (*P. putida* DSMZ 8368) et la culture mixte (consortium Pyr01) est réalisée.

La cinquième partie se concentre sur la solubilisation du phénanthrène au point de trouble du Brij 30. Une nouvelle application du phénomène du point de trouble dans la biodégradation des HAP est mis en œuvre.

La dernière partie de ce mémoire est consacrée aux conclusions et aux perspectives découlant de ce travail.

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

#### 1. Généralités

##### 1.1. Définition

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques constitués d'au moins deux cycles aromatiques. Ces substances peuvent être acylées. Selon le nombre de cycles aromatiques, ils sont classés en HAP légers (ayant deux ou trois cycles) ou lourds (au-delà de trois cycles). Les HAP les plus étudiés (dont le phénanthrène) et posant des problèmes environnementaux majeurs mentionnés par l'Agence pour la Protection Environnementale des Etats-Unis (EPA US) sont indiqués sur la figure 1. Les raisons principales ayant conduit au classement des HAP dans la liste des polluants prioritaires de l'EPA US est leur abondance et le caractère toxique, mutagène et cancérigène de certains d'entre eux (Keith et Telliard, 1979). En raison des risques réels ou potentiels pour la santé humaine ces HAP font également partie des listes établies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2004) et de la Communauté Européenne (JOCE, 2004) relatives à la qualité des eaux.

##### 1.2. Propriétés physico-chimiques

Les HAP présentent une faible réactivité chimique à température ambiante. A l'exception du naphthalène, les HAP sont peu volatils et très hydrophobes. Généralement, leur volatilité et leur solubilité dans l'eau diminuent avec l'augmentation du poids moléculaire. Les coefficients de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ) des HAP sont relativement élevés (le coefficient de partage octanol/eau est utilisé pour décrire la capacité de la molécule à se répartir dans une phase lipophile, l'octanol). Ceci témoigne d'un important potentiel d'adsorption sur les matières organiques particulaires dans l'air, l'eau ou le sol, ainsi que d'un fort potentiel de bioconcentration dans les organismes, surtout dans les tissus riches en lipides (Meador *et al.*, 1995 ; Samanta *et al.*, 2002).

##### 1.3. Toxicité, mutagénicité et cancérigénicité

La toxicité des HAP a été observée par un grand nombre d'auteurs qui ont travaillé dans ce domaine (Phillips, 1983; Lijinsky, 1991 ; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992 ; Nylund *et al.*, 1992 ; Sikkema *et al.*, 1995). L'information disponible à ce jour montre que la toxicité des HAP est, pour partie, due à leur caractère lipophile qui provoque les interactions entre ces molécules et les parties hydrophobes des

cellules (Sikkema *et al.*, 1995). Dans le cas des microorganismes, de telles interactions peuvent altérer le fonctionnement des membranes cellulaires et provoquer leur rupture. De plus, les HAP, une fois absorbés par les organismes, peuvent être transformés en époxydes et/ou en dérivés hydroxylés. Certaines de ces substances peuvent avoir un effet toxique en se liant à des molécules biologiques fondamentales telles que les protéines, l'ARN, l'ADN et provoquer des dysfonctionnements cellulaires. La modification de l'ADN induit ainsi les effets mutagène et cancérigène (Baird *et al.*, 2002).

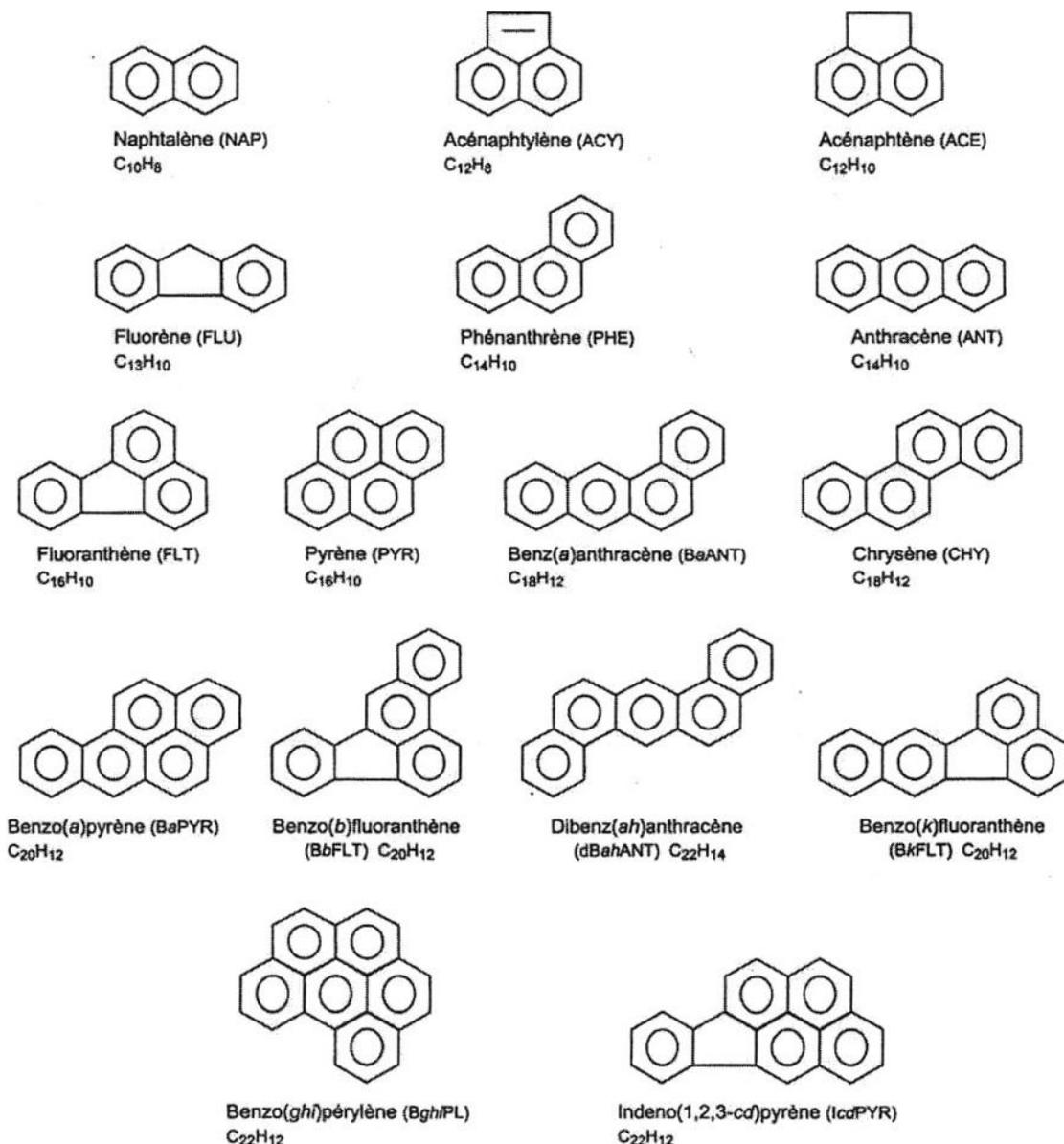
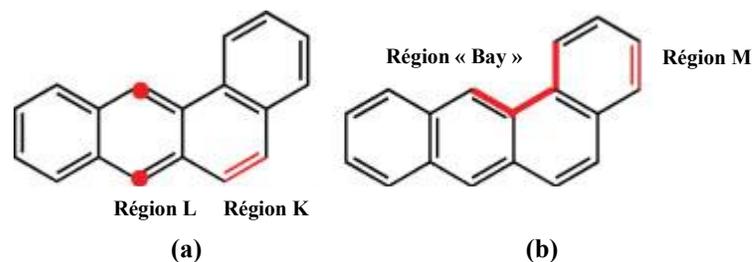


Figure 1. Représentation des structures chimiques des 16 HAP classés prioritaires par l'EPA US.

Malgré le fait que les HAP ont des structures homogènes, leur activité cancérigène (AC) n'est pas toujours la même. Il existe donc des HAP ayant une AC très haute et d'autres qui ne sont pas cancérigènes. De nombreuses études ont été menées afin d'établir une corrélation entre la structure des HAP cancérigènes et leur potentiel cancérigène, les premiers travaux remontent aux années 1930 (Cook *et al.*, 1932). A ce jour il existe deux théories principales établissant les corrélations entre l'AC et la structure des HAP : la théorie des régions K, L de A. et B. Pullman (1955) et celle de la région « Bay » (B) proposée par Jerina et Daly (1974). La représentation graphique de ces régions est donnée sur la figure 2.



**Figure 2.** Les régions K, L, M et « Bay » d'un HAP benz[a]anthracène (d'après Vijayalakshmi et Suresh, 2008).

D'après la théorie des régions K, L, la cancérigénicité des HAP est provoquée par l'activation métabolique de la région K, tandis que la région L est supposée empêcher la cancérigénicité issue de cette activation (Fig. 2a). Cette théorie a permis de prédire la cancérigénicité des nombreux HAP et même de certains composés hétérocycliques (Pullman et Pullman, 1955). Néanmoins, les études ultérieures ont montré que l'activation métabolique de la région K est généralement suivie par l'apparition des composés non-toxiques et non-cancérigènes, c'est pourquoi la théorie de la région « Bay » a été suggérée. D'après cette théorie, la cancérigénicité des HAP ne dépend pas de la région K ou L, mais elle est liée uniquement à l'époxidation métabolique de la région M (Fig. 2b). L'époxidation est suivie par l'addition de l'eau à l'époxide qui résulte à la formation de trans 3,4-dihydrodiol. Ce produit cancérigène proximal (intermédiaire qui précède immédiatement le cancérigène ultime, l'initiateur du cancer) est converti en époxide dihydrodiol par époxidation de la liaison 1,2. Etant donné que la formation des époxides diol et de leurs adduits à l'ADN a été prouvée expérimentalement par plusieurs auteurs, la théorie de la région « Bay » bénéficie d'un large consensus (Vijayalakshmi et Suresh, 2008). Néanmoins, toutes les théories actuelles qui décrivent la corrélation entre la structure

des HAP et leur AC ont au moins une exception et donc aucune d'entre elles ne décrivent parfaitement la situation.

## **2. Contamination de l'environnement par les HAP**

Les HAP sont présents dans les écosystèmes du monde entier. Ils sont généralement retrouvés sous forme de mélanges plus ou moins complexes. Les HAP sont émis dans l'atmosphère sous forme de gaz ou de particules. Les HAP de l'air sont souvent adsorbés sur les particules solides. Ils sont ensuite transférés dans le sol et dans l'eau par déposition ou avec les précipitations.

La stabilité des HAP dans l'environnement, ainsi que leur distribution dans la nature, dépendent de l'arrangement de leurs anneaux aromatiques (Blumer, 1976). Par exemple, les HAP chez lesquels les anneaux de benzène sont arrangés linéairement, tels que l'antracène ou le tétracène, ont une très faible stabilité et ne sont généralement pas retrouvés dans la nature à moins d'être incorporés dans certaines matrices organiques ou inorganiques. Les arrangements les plus stables sont ceux de type annulaire, tels que dans le phénanthrène, le chrysène et le picène (Blumer, 1976).

### 2.1. Sources d'émission des HAP

Les HAP sont générés pendant la pyrolyse ou la combustion incomplète de matières organiques. Les sources des HAP peuvent être d'origine naturelle, telles que les éruptions volcaniques et les feux des bois, ou anthropique, telles que l'incinération des déchets, les gaz d'échappement des moteurs à essence ou des moteurs diesels, la fumée de cigarettes, la suie ou la fumée industrielle. La combustion du bois, du charbon et du pétrole par l'homme au cours de l'histoire a fortement influencé l'accumulation des HAP partout dans le monde. Les HAP sont naturellement présents dans la tourbe, le charbon, la lignite et le pétrole. Il est généralement admis que si dans un mélange de HAP la fraction des HAP substitués, y compris leur dérivés acylés, est majoritaire, ils sont d'origine pétrolière. Si la fraction des HAP non-substitués est plus importante, surtout si ce sont des HAP de masse moléculaire élevée, il est plus probable qu'ils soient issus des procédés de combustion (Meador *et al.*, 1995).

### 2.2. Niveaux de contamination en HAP

#### *2.2.1. Air*

Le niveau des HAP de l'air est généralement au minimum dix fois plus élevé en hiver qu'en été. En hiver la source principale des HAP est le chauffage résidentiel, tandis qu'en été les moyens de transport

urbains représentent la source majoritaire de leurs émissions atmosphériques. Les concentrations moyennes en HAP individuels dans l'air ambiant des zones urbaines sont d'environ 1-30 ng/m<sup>3</sup>. Ces concentrations sont 2 à 10 fois moins élevées dans les zones rurales et elles montent considérablement à proximité des autoroutes. De 1 à 50 ng/m<sup>3</sup> en HAP ont été détectés dans des tunnels routiers. Dans les grandes villes, les concentrations en HAP dans l'air atteignent la valeur de 200 ng/m<sup>3</sup>. Aux alentours des zones industrielles, les concentrations moyennes en HAP varient de 1 à 10 ng/m<sup>3</sup>. Jusqu'à 310 ng/m<sup>3</sup> de phénanthrène y ait été détectés (IPCS, 1998). Les concentrations en HAP cancérigène avéré, le benzo[a]pyrène, varient généralement de 1 à 20 ng/m<sup>3</sup> en Europe et sont de l'ordre de 1 ng/m<sup>3</sup> aux Etats-Unis d'Amérique. Pour les autres HAP, leurs concentrations individuelles varient de 1 à 50 ng/m<sup>3</sup> en Europe, 0,1-1 ng/m<sup>3</sup> en Amérique du Nord et du Sud, 1-10 ng/m<sup>3</sup> au Japon et 10-100 ng/m<sup>3</sup> dans deux villes d'Inde et de Nouvelle-Zélande (Menichini, 1992).

### 2.2.2. Eaux et précipitations

Dans le domaine de l'eau, les HAP sont généralement présents en faibles concentrations en raison de leur hydrophobicité. La plupart des HAP de l'eau sont issus du ruissellement urbain, des retombées atmosphériques (petites particules), de l'abrasion de l'asphalte (plus grosses particules), des effluents industriels et du déversement ou fuite de pétrole (Manoli et Samara, 1999). Néanmoins, la source principale des HAP n'est pas la même en fonction de l'environnement ou de l'utilisation des eaux. La répartition du déversement d'hydrocarbures dans l'eau par source est présentée sur la figure 3. Cette figure rassemble les données références de l'Organisation Maritime Internationale (CEDRE, 2006).

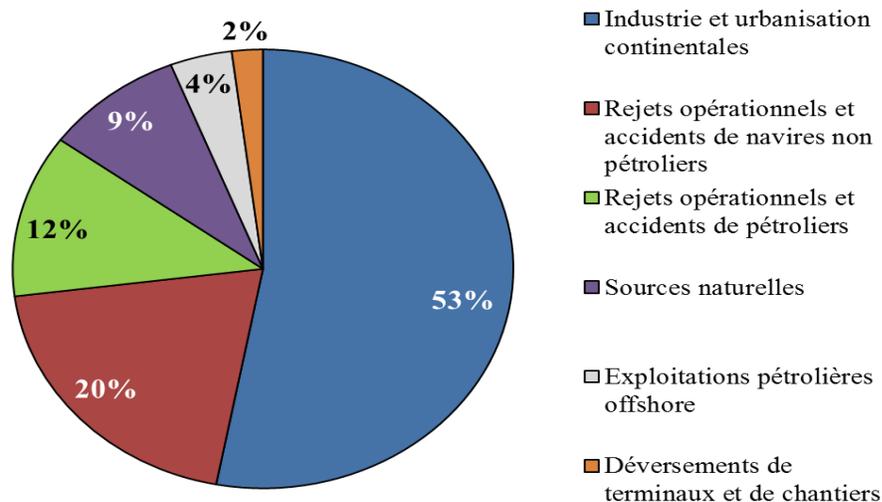


Figure 3. Origines de la pollution par les hydrocarbures dans les eaux en 2000 (d'après Clark, 2001).

Cependant, il est important de préciser qu'en ce qui concerne les rejets des HAP dans l'eau issues des fuites ou des déversements accidentels de pétrole, il existe des variations annuelles considérables dans leur fréquence et la quantité de pétrole émise. Ainsi, le nombre de déversements majeurs de pétrole (plus de 700 t) suite aux accidents de pétroliers a fortement diminué depuis 40 ans. Le nombre moyen des telles fuites au cours de la décennie précédente (2000-2009) a été légèrement supérieur à 3, ce qui est environ huit fois moins que dans les années 1970 (ITOPF, 2010). Néanmoins, il faut rappeler que c'est le naufrage de la plate-forme pétrolière *Deepwater Horizon* au golfe du Mexique en avril 2010 qui a occasionné une fuite de pétrole, dont la quantité est estimée à 800 000 t, une des plus importantes marées noires de tous les temps (CEDRE, 2010).

Généralement, la plupart des eaux de surface contient en moyenne 50 ng/L de HAP individuels, tandis que pour les rivières fortement polluées les concentrations peuvent aller jusqu'à 6000 ng/L. Le niveau de HAP dans les eaux souterraines varie entre 0,02 et 1,8 ng/L et les échantillons d'eau potable contiennent des concentrations en HAP du même ordre de grandeur. Les niveaux de HAP individuels dans l'eau de pluie sont de 10 à 200 ng/L. Dans la neige et le brouillard, ils peuvent aller jusqu'à 1000 ng/L (IPCS, 1998).

### 2.2.3. *Sédiments*

Les HAP ont tendance à s'adsorber sur les particules des sédiments. Ainsi la concentration de HAP dans les sédiments est généralement dix fois plus importante que celle des précipitations (IPCS, 1998). Cependant, le niveau de la pollution des sédiments dépend fortement de leur taux de matière organique et de l'industrialisation des zones environnantes (Srogi, 2007). Par exemple, selon Viguri *et al.* (2002), les concentrations de la totalité des 16 HAP présents dans les sédiments de la Baie de Santander (Espagne) avec un taux de matière organique inférieur à 2 % étaient toujours inférieures à 10 µg/g PS (poids sec) en moyenne. Cependant, là où les activités industrielles et urbaines sont concentrées, les sédiments contenaient jusqu'à 355 µg/g PS de l'ensemble de ces 16 HAP. Des concentrations totales en HAP allant jusqu'à 2,83 mg/g PS ont aussi été rapportées par Sirota *et al.* (1983) pour des échantillons de sédiments prélevés à proximité d'une cokerie à Nova Scotia au Canada.

### 2.2.4. *Sol*

Les principales sources en HAP dans le sol sont les dépôts atmosphériques, les eaux usées et la carbonisation des plantes. Le taux de pollution du sol dépend de plusieurs facteurs, tels que sa porosité, le taux de substances humiques dans le sol et la présence (ou l'absence) de végétation sur sa surface.

Selon les concentrations en HAP dans les sols, ceux-ci sont placés dans l'ordre croissant suivant : sol agricole, forêt, prairie permanente, sol urbain et finalement sol d'un site d'émission ponctuel (Wilcke, 2000). Dans les zones non polluées, les niveaux de HAP varient généralement entre 5 et 100 µg/kg de sol. Les concentrations moyennes en HAP retrouvées aux alentours des autoroutes sont de 2 à 5 mg/kg de sol. Près des zones industrielles, jusqu'à 1 g/kg de sol a été détecté (IPCS, 1998). L'exemple du niveau de contamination des sols en surface par les HAP dans les zones différentes est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1. Exemple du niveau de contamination en surface des sols par les HAP (d'après Johnsen et Karlson, 2007).

	Concentration en HAP, mg/kg							
	Forêt boréale <sup>a</sup>	Prairies côtières <sup>b</sup>	Commune rurale <sup>c</sup>	Forêt urbaine, Oslo <sup>d</sup>	Ville, Tallinn <sup>e</sup>	Autoroute <sup>f</sup>	Poussière des rues, < 2 µm <sup>g</sup>	Sol d'une usine à gaz <sup>h</sup>
Phénanthrène	< 0,01	0,11	0,05	0,12	0,68	0,63	3,9	90
Pyrène	< 0,01	0,05	0,14	0,24	0,76	1,17	9,4	103
Fluoranthène	< 0,01	0,06	0,07	0,36	2,15	1,33	6,9	130
Benz[a]anthracène	< 0,01	0,01	0,02	0,16	0,54	0,56	1,2	94
Benzo[a]pyrène	< 0,01	0,02	0,02	0,16	0,40	0,67	2,3	77
Σ 5 HAP	< 0,01	0,25	0,30	1,04	4,53	4,36	23,7	493

<sup>a</sup> 40-50 km au nord d'Oslo, Norvège (Jensen *et al.*, 2007)

<sup>b</sup> Hostrup, NW Jutland, Danemark (Johnsen et Karlson, 2005)

<sup>c</sup> 35000 habitants, Pärnumaa, Estonie (Trapido, 1999)

<sup>d</sup> Forêt urbain, Norvège (Jensen *et al.*, 2007)

<sup>e</sup> Estonie (Trapido, 1999)

<sup>f</sup> Sol prélevé à 1 m du revêtement asphalté, Danemark (Johnsen *et al.*, 2006)

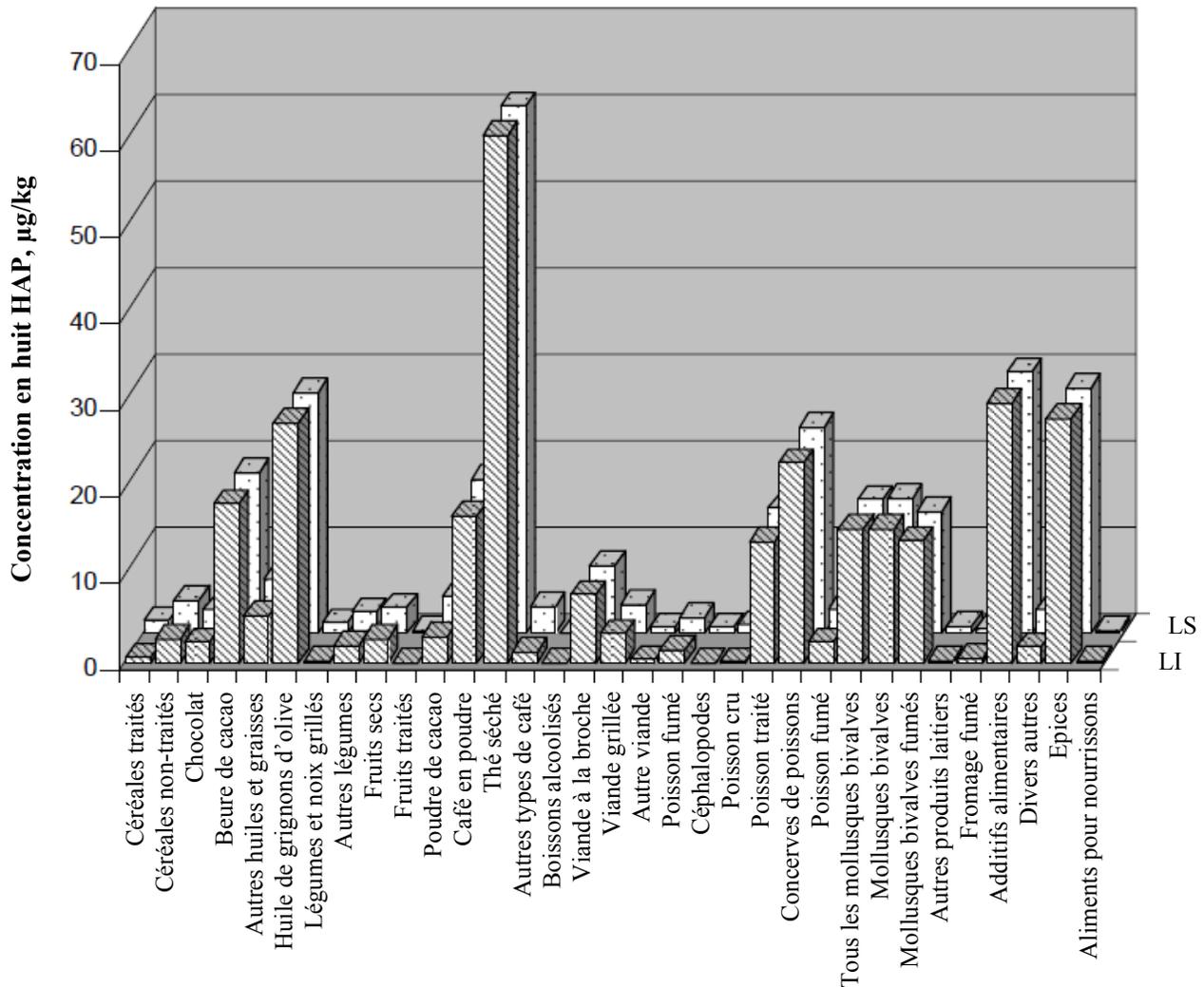
<sup>g</sup> Pasadena, Califorie (Rogge *et al.*, 1993)

<sup>h</sup> Frederiksberg Gasvaerk, Danemark (Lindhart *et al.*, 1994)

Ces données montrent que le niveau des HAP dans les sols dépend clairement de la distance entre la zone de prélèvement et les sources d'émission locales.

### 1.2.5. Aliment

Les concentrations en HAP individuels dans les aliments crus sont généralement peu élevées : en moyenne entre 0,01 et 10 µg/kg. Néanmoins, les HAP peuvent se former dans les aliments au cours de leurs préparations, notamment au cours du séchage, de la cuisson, du grillage ou du fumage (EFSA, 2008). Les concentrations moyennes en huit HAP (benzo[*a*]pyrène, chrysène, benz[*a*]anthracène, benzo[*b*]fluoranthène, benzo[*k*]fluoranthène, benzo[*ghi*]perylène, dibenz[*a,h*]antracène, indéno[*1,2,3-cd*]pyrène) dans les aliments répartis dans 33 catégories/sous-catégories sont présentées sur la figure 4.



**Figure 4.** Limites inférieure (LI) et supérieure (LS) des concentrations moyennes en huit HAP (benzo[*a*]pyrène, benz[*a*]anthracène, benzo[*b*]fluoranthène, benzo[*k*]fluoranthène, benzo[*ghi*]perylène, chrysène, dibenz[*a,h*]antracène, indéno[*1,2,3-cd*]pyrène) dans 4065 échantillons d'aliments répartis dans 33 catégories/sous-catégories (d'après EFSA, 2008). Le poisson et les mollusques bivalves sont regroupés.

Ainsi, onze catégories d'aliments présentent des limites supérieures de concentrations moyennes en huit HAP supérieures à 10 µg/kg. Il faut préciser que bien que le thé séché présente la teneur en HAP la plus élevée, la préparation de boissons à partir de ces feuilles va diluer considérablement les concentrations en HAP dans les boissons finales. Il faut aussi noter que la teneur en HAP dans les céréales peut être plus élevée que la moyenne s'ils ont été cultivés sur un sol pollué. La viande et/ou le lait des ruminants peuvent être contaminés par les HAP dans le cas d'ingestion de fourrage pollué.

### 2.2.6. Les organismes vivants

La bioaccumulation des HAP dépend de leurs caractéristiques chimiques (Fig. 5), des facteurs physiologiques des organismes (taux de lipides, capacités de biotransformation), du taux en HAP dans leur nourriture et du temps d'exposition (Barron, 1990 ; Meador *et al.*, 1995 ; Baumard *et al.*, 1998 ; Abarnou, 2000). On désigne par bioaccumulation l'accumulation des substances par les organismes à partir de l'eau par les voies non-alimentaires (bioconcentration) et à partir de la nourriture (Abarnou, 2000). Chez les vertébrés, la majeure partie des HAP et de leurs métabolites est accumulée dans le foie. Chez les invertébrés les concentrations les plus élevées sont retrouvées dans les organes internes, tels que l'hépatopancréas.

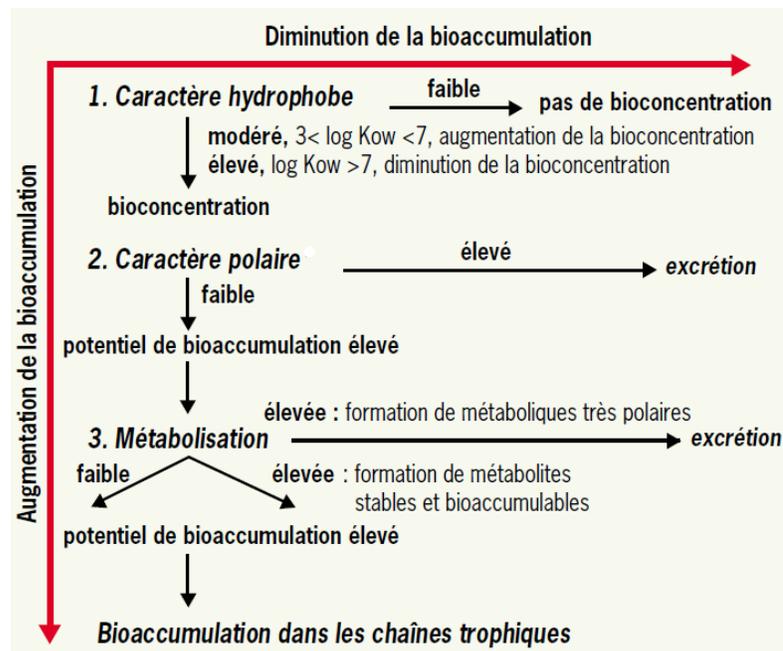


Figure 5. Caractéristiques chimiques agissant sur la bioaccumulation (d'après Abarnou, 2000).

Après une exposition courte, les organismes peuvent éliminer la quasi-totalité des HAP incorporés, tandis que suite à une exposition chronique, une partie significative des HAP peut être incorporée dans les tissus riches en lipides, en devenant ainsi moins disponible pour le métabolisme ou pour l'élimination par diffusion (Meador *et al.*, 1995).

Chez les vertébrés les HAP, bien qu'hydrophobes, s'accumulent généralement peu parce que la plupart des HAP absorbés est transformée par leurs enzymes, ce qui augmente leur solubilité dans l'eau et facilite leur excrétion. La capacité de métabolisation des HAP chez les organismes invertébrés est plus faible (Livingstone, 1994 ; Perugini *et al.*, 2007). Une bioconcentration significative des HAP peut être mesurée chez certains organismes aquatiques qui absorbent et accumulent ces substances de l'eau. Parmi ceux-ci figurent principalement les huîtres et les moules, dont les teneurs en HAP illustrent souvent le niveau de contamination des eaux littorales. Leur niveau de contamination dépend de la navigation et du développement industriel et urbain. Ainsi, la teneur moyenne en HAP dans les organismes aquatiques varie de 1 à 100 µg/kg dans les zones éloignées des sources des HAP, tandis que dans les sites contaminés leur niveau moyen est de 10 – 500 µg/kg. Les concentrations en HAP allant jusqu'à 7 mg/kg ont été détectés dans des organismes aquatiques localisés près d'une zone de décharge d'effluents industriels (IPCS, 1998). Les teneurs en HAP dans les moules prélevées à proximité des estuaires européens sont présentés sur la figure 6. On constate que les empreintes des HAP dans les moules varient d'un endroit à l'autre, indiquant leur différence selon les sources de contamination.

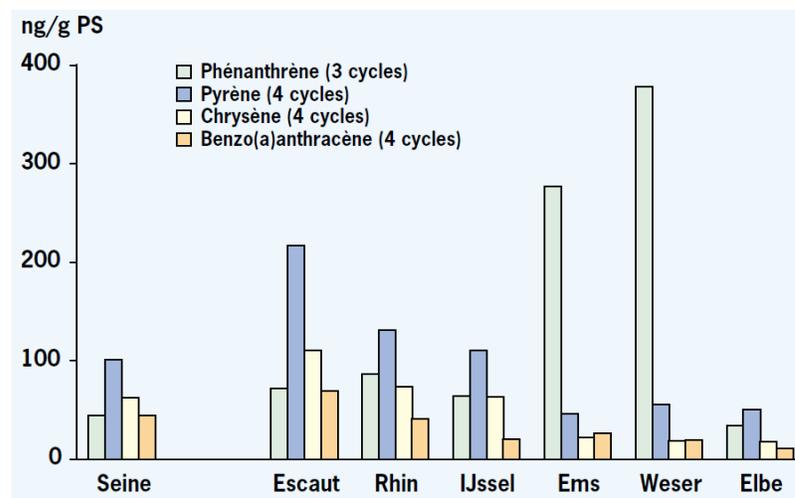


Figure 6. Teneurs en HAP dans les moules prélevées à proximité d'estuaires européens (d'après Bergman, 1993).

Les demi-vies des HAP (durée au bout de laquelle leur concentration est diminuée de moitié) chez les poissons sont généralement courtes. Les HAP de faible masse moléculaire peuvent être facilement éliminés par diffusion à travers les branchies de poissons, tandis que cela n'est pas le cas pour ceux de masse moléculaire élevée (Thomas et Rice, 1982). Chez la truite arc-en-ciel des demi-vies de 1 à 4 jours ont été rapportées pour l'acénaphthylène, le méthylantracène, triphénylène et le pérylène (Nimmi et Dookhran, 1989), et de 6 à 9 pour le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène et le fluoranthène (Nimmi et Palazzo, 1986). Un HAP plus récalcitrant, le phénylnaphtalène, a lui une demi-vie plus longue : 25 jours (Nimmi et Dookhran, 1989).

### **3. Dégradation des HAP**

Les HAP peuvent subir différentes transformations dans l'environnement : la volatilisation, la dégradation photochimique, l'oxydation chimique et la biodégradation (Wild et Jones, 1995 ; Haritash et Kaushik, 2009). En parlant de ces transformations, il faut noter que la volatilisation est associée au changement d'état des HAP, tandis que les autres transformations entraînent la modification de leur structure. Dans un contexte d'élimination des HAP, les procédés intervenant peuvent être classés en deux groupes principaux : les procédés abiotiques de dégradation et la biodégradation.

#### 3.1. Dégradation abiotique des HAP

Les transformations abiotiques n'impliquent pas les organismes vivants. Pour les HAP, les principaux procédés de dégradation abiotique dans l'environnement sont l'oxydation chimique et la dégradation photochimique (Kochany et Maguire, 1994 ; Lundstedt, 2003).

##### *3.1.1. Oxydation*

L'oxydation est un processus chimique dans lequel une molécule déficiente en électron (oxydant) accepte des électrons d'un composé qui sera ainsi oxydé. Divers oxydants se retrouvent dans l'environnement en quantité suffisante pour réagir avec les molécules organiques. Ce sont les radicaux oxygénés, notamment hydroxyles (HO•), l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) et l'ozone (O<sub>3</sub>). La plupart d'entre eux peut être générée lors de transformations photochimiques naturelles ou par leur ajout en excès au cours des procédés de traitements des sols contaminées (Sijm *et al.*, 2007).

L'ozonation des HAP en solution (aqueuse ou mélanges eau/solvants) a été largement étudiée. Selon les conditions utilisées, les mécanismes d'ozonation directe (très sélectifs, notamment par rapport aux

cycles aromatiques) ou indirecte par les radicaux hydroxyles (très réactifs mais non sélectifs) peuvent intervenir. Toutefois, les différentes réactivités de l'ozone pour les différentes molécules d'HAP n'ont pas été élucidées. Les travaux concernant l'ozonation des HAP en milieux solides (sédiments, sols) sont moins nombreux. Ils mettent en avant l'effet négatif de la présence de substances carbonées sur l'efficacité de l'ozonation des HAP et la nécessité d'appliquer des doses plus importantes qu'en solution. De plus, l'étape de désorption ou le transfert des HAP de la phase solide vers la phase aqueuse semble être le phénomène limitant.

### 3.1.2. Dégradation photochimique

La dégradation photochimique est une transformation chimique due aux interactions avec les rayons solaires. C'est un procédé de surface non négligeable (Lundstedt, 2003). Les HAP absorbent fortement le rayonnement ultraviolet (UV) et peuvent subir les réactions photochimiques telles que la photodimérisation et la photo-oxydation (Clark *et al.*, 2007). Il a été montré qu'une grande partie des HAP à poids moléculaire élevé est transformée dans l'eau sous l'action des rayons solaires, sachant que la vitesse de transformation augmente avec le poids moléculaire (Zepp et Schlotzhauer, 1979). Généralement le taux de photodégradation augmente avec l'augmentation de température, la concentration en oxygène, l'illumination et le temps d'exposition (Zepp et Schlotzhauer, 1979 ; Mill *et al.*, 1981 ; Sigman *et al.*, 1998).

Le mécanisme de la photo-oxydation des HAP n'est pas complètement élucidé. Il a été suggéré que dans l'eau la photolyse (la réaction dans laquelle un composé chimique est décomposé par la lumière) était le procédé photochimique primaire, et donc ne nécessitant pas d'oxygène (Zepp et Schlotzhauer, 1979). Cependant, plus récemment Sigman *et al.* (1998) ont trouvé que la présence de l'oxygène était importante.

### 3.2. Biodégradation des HAP

Actuellement la biodégradation des HAP par les microorganismes est considérée comme la méthode principale d'élimination de ces polluants (Haritash et Kaushik, 2009). L'objectif de la biodégradation des HAP est de les dégrader complètement et/ou de les transformer en produits moins nocifs. De telles biodégradations sont influencées par des facteurs liés aux microorganismes (nombre, capacités métaboliques, etc.), aux substrats (caractéristiques physico-chimiques, concentration, biodisponibilité) et à l'environnement (température, pH, etc.) (Boopathy, 2000).

Un grand nombre de bactéries, champignons et algues ont la capacité de dégrader les HAP. Ces biodégradations peuvent être faites soit par des souches pures, soit par des consortia de microorganismes (Cerniglia, 1992). Les champignons hydroxylient les HAP en vue de leur détoxification, tandis que les bactéries oxydent les HAP pour assimiler leur carbone. La dégradation des HAP peut être anaérobie ou aérobie, le dernier cas étant plus courant chez les bactéries (Yuan *et al.*, 2000). Les genres suivants sont fréquemment utilisés dans le domaine de la biodégradation des HAP : *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*. Les différentes voies de dégradation microbienne des HAP sont présentées sur la figure 7.

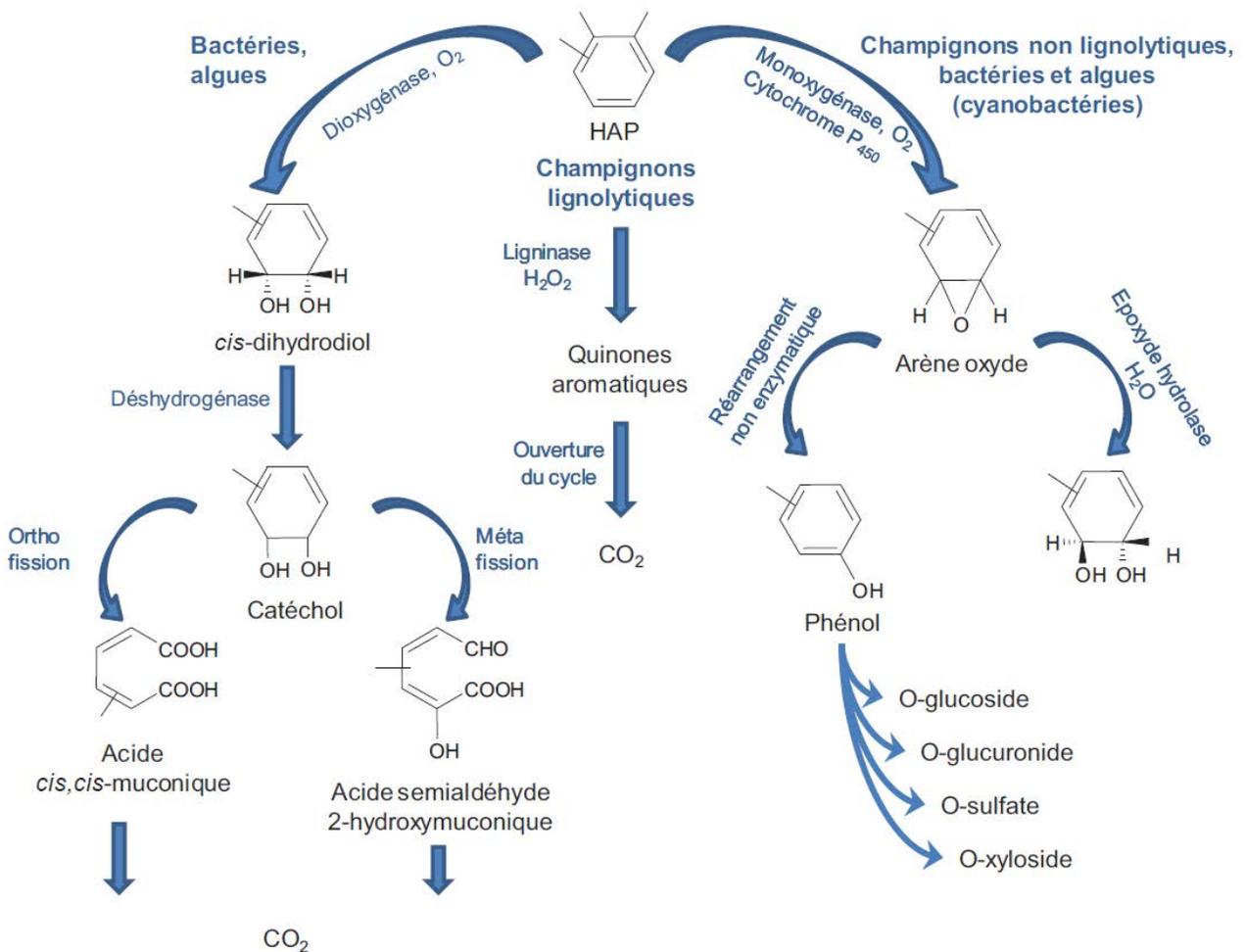


Figure 7. Les différentes voies de dégradation microbienne des HAP (d'après Cerniglia, 1992).

### 3.2.1. Dégradation par les bactéries

Plus de 75 genres de bactéries sont capables d'utiliser les HAP comme seule source de carbone et d'énergie (Olliver et Magot, 2005). La biodégradation bactérienne aérobie des HAP commence généralement par l'action d'une dioxygénase (addition de deux atomes d'oxygène) qui « attaque » un des noyaux aromatiques pour former un *cis*-dihydrodiol. Celui-ci est ensuite déshydraté en catéchol (Fig. 7). Le catéchol est un produit intermédiaire à partir duquel peut avoir lieu l'ouverture du noyau aromatique. Cette ouverture se passe entre les deux groupements hydroxyles (ortho-fission) ou adjacente (méta-fission) et va conduire à la formation de composés simples (pyruvate, succinate) pouvant entrer dans le métabolisme centrale des bactéries. Cette biodégradation directe a lieu pour les HAP de faible poids moléculaire. En revanche, peu de bactéries sont capables d'utiliser les HAP de haut poids moléculaire comme unique source de carbone et d'énergie. Ainsi, la biodégradation des HAP de haut poids moléculaire se fait généralement par co-métabolisme. Dans ce cas, les bactéries utilisent un substrat structurellement proche aux HAP de haut poids moléculaire (par exemple, un HAP de bas poids moléculaire) pour leur croissance. Les enzymes non spécifiques produits sont alors impliquées dans la biodégradation des HAP de haut poids moléculaire (Johnsen *et al.*, 2005). Les métabolites ainsi formés peuvent être les produits finaux de dégradation, en particulier dans le cas de culture pure. Dans le cas des cultures mixtes, ces produits peuvent être dégradés par d'autres souches présentes. Enfin, quelques bactéries, comme *Mycobacterium* sp. (Kelley *et al.*, 1990), sont aussi capables de dégrader les HAP par l'action de monooxygénases à cytochrome P450 pour former des *trans*-dihydrodiols (Fig. 7) de façon similaire aux champignons non lignolytiques.

### 3.2.2. Dégradation par les champignons

Généralement les champignons ont des vitesses de croissance et de dégradation moins importantes que celles des bactéries. Les voies de dégradation des HAP chez les champignons non lignolytiques, qui sont généralement majoritaires, et les champignons lignolytiques, également connus sous le terme de pourriture blanche, sont différentes. Au moins deux mécanismes sont appliqués dans la biodégradation des HAP par les champignons : l'un passe par l'utilisation du système enzymatique du cytochrome P450 et l'autre utilise les enzymes solubles extracellulaires du catabolisme de la lignine (la lignine peroxydase, la manganèse peroxydase et les laccases) (Tortella et Diez, 2005).

Chez les champignons non-lignolytiques la première étape de dégradation consiste en une oxydation du HAP par le système enzymatique du cytochrome P450 pour produire un oxyde d'arène. La monooxygénase incorpore un seul atome d'oxygène. L'oxyde d'arène subit ensuite une réaction

d'hydratation catalysée par des époxydes hydrolases, conduisant à la formation de *trans*-dihydrodiols. L'oxyde d'arène peut également être transformé en dérivé phénolique par un réarrangement non enzymatique. Ce dérivé phénolique peut ensuite servir de substrat pour des réactions de sulfatation, de méthylation ou de conjugaison avec un glucose, un xylose ou un acide glucuronique (Cerniglia, 1992).

Les champignons lignolytiques sont capables de synthétiser et sécréter par voie extracellulaire des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose et de la lignine : les peroxydases et les laccases. Ces enzymes ont une spécificité relativement faible et sont également responsables de la capacité des champignons à dégrader des composés toxiques complexes ayant des masses moléculaires élevées, y compris des composés aromatiques (Colombo, 1996). Ainsi les champignons lignolytiques peuvent oxyder les HAP avec formation de quinones et d'acides aromatiques.

### 3.2.3. Dégradation par les algues

Les algues photo-autotrophes oxydent les HAP pour former des intermédiaires hydroxylés (Labana *et al.*, 2007). Il existe très peu d'information sur la biodégradation des HAP par les algues et sur les enzymes impliquées. Warshawsky *et al.* (1988) ont montré que *Selenastrum capricornutum* métabolise le benzo(a)pyrène en *cis*-dihydrodiol par le système enzymatique dioxygénase. La biotransformation du benzo(a)pyrène par les algues brunes (*Fucus vesiculosus* et *Chorda filum*), rouges (*Furcellaria lumbricalis*), vertes (*Enteromorpha intestinalis* et *Cladophora glomerata*) et les algues Chara (*Chara aspera*) a été également étudiée (Kirso et Irha, 1998). Il a été déterminé que leurs systèmes enzymatiques les plus importants impliqués dans la détoxification du benzo(a)pyrène étaient l'*o*-diphénoloxidase, le cytochrome P450 et une peroxydase. Un travail récent a montré la capacité de quatre espèces de microalgues, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* et *Selenastrum capricornutum*, à dégrader le fluoranthène (1,0 mg/L), le pyrène (1,0 mg/L) et leur mélange (chacun à 0,5 mg/L) (Lei *et al.*, 2007). Cependant, ni la mesure des activités enzymatiques, ni l'identification de métabolites n'a été effectuée dans cette étude.

### 3.2.4. Dégradation en conditions anaérobies

Les différentes voies de dégradation présentées jusqu'à présent faisaient intervenir des bactéries, des champignons et des algues en conditions aérobies. Ce n'est qu'à la fin des années 1990 que la capacité des microorganismes à dégrader les HAP en conditions anaérobies a été étudiée. En l'absence d'oxygène moléculaire, d'autres accepteurs d'électrons tels que les nitrates, le fer ferreux et les sulfates, sont nécessaires pour oxyder les HAP. Des études relativement récentes ont montré que la

dégradation des HAP pouvait avoir lieu dans des conditions anaérobies dénitrifiantes et sulfatoréductrices. L'oxydation de différents HAP dans des sédiments en conditions anaérobies sulfato-réductrices (Coates *et al.*, 1996; Coates *et al.*, 1997; Meckenstock *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000) et nitratoréductrices (Rockne and Strand, 1998; Rockne *et al.*, 2000) a ainsi été mise en évidence. A titre d'exemple, un mécanisme de la dégradation anaérobie du naphthalène a été proposé par Zhang *et al.* (2000). Il commence par une étape de carboxylation suivie d'hydrogénations successives où l'eau serait la source de protons (Fig. 8). Toutes ces études en milieu anaérobie suggèrent que le potentiel de dégradation anaérobie des HAP par les microorganismes pourrait être plus important que ce qui est admis jusqu'à présent et suggère une alternative intéressante aux traitements actuels de biorémédiation qui sont aérobie.

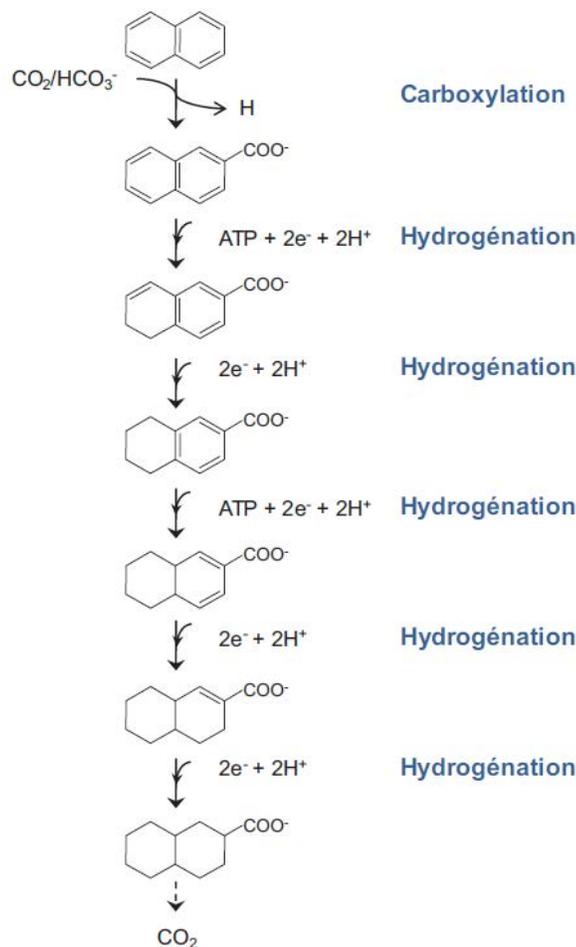


Figure 8. Dégradation anaérobie du naphthalène (d'après Zhang *et al.*, 2000).

### 3.3. Dégradation des HAP en présence de tensioactifs

La faible solubilité aqueuse de la plupart des HAP est considérée comme un des principaux facteurs limitant leur dégradation. En effet, dans le cas des sols pollués, les HAP sont fortement adsorbés sur la

matière organique et sont faiblement mobiles, ce qui diminue l'efficacité de certaines méthodes abiotiques de dégradation (Hatzinger et Alexander, 1995). Cependant, c'est surtout la biodégradation des HAP qui est restreinte par leur faible solubilité (Wodzinski et Coyle, 1974 ; Guha et Jaffé, 1996 ; Bamforth et Singleton, 2005). De nombreuses études ont été menées afin de résoudre ce problème. Il a été ainsi déterminé que l'utilisation des tensioactifs en concentrations supérieures à un certain seuil, la concentration micellaire critique (CMC), permettait d'augmenter considérablement la solubilité des HAP. La CMC est une concentration à partir de laquelle les molécules des tensioactifs commencent à former des micelles (agrégats sphériques de 20 à 200 molécules d'environ 3-4 nm de diamètre) (Rosen, 1989; West et Harwell, 1992). L'application des tensioactifs est également prometteuse du point de vue écologique et économique, car certains tensioactifs sont biodégradables, ou bien encore, il est envisageable de récupérer et réutiliser certains tensioactifs (Mulligan *et al.*, 2001).

### 3.3.1. Les tensioactifs

Les tensioactifs sont des composés amphiphiles, c'est-à-dire constitués d'une partie hydrophobe (queue) et d'une partie hydrophile (tête), qui modifient la tension superficielle à l'interface (Mulligan *et al.*, 2001 ; Gelfman *et al.*, 2003). L'activité superficielle des tensioactifs est due à leur structure amphiphile qui leur confère une affinité particulière pour les interfaces : air/eau, eau/huile ou solide/liquide, par exemple (West et Harwell, 1992). La représentation schématique d'un monomère et d'une micelle de tensioactif est donnée sur la Fig. 9.

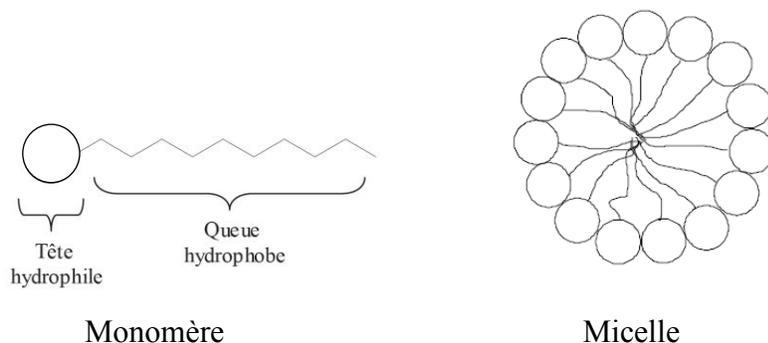


Figure 9. Représentation schématique d'un monomère et d'une micelle de tensioactif.

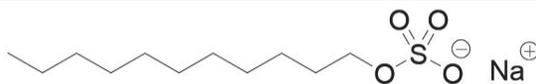
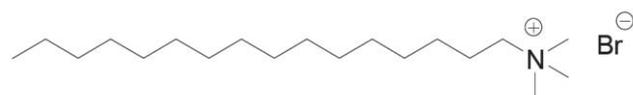
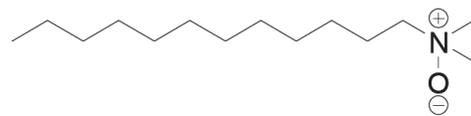
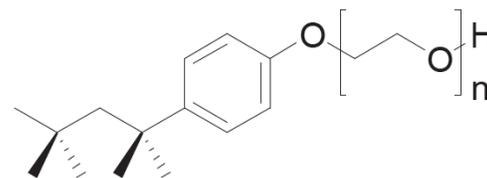
La tête hydrophile de tensioactif représente un groupement ionique ou très polaire. La partie hydrophobe est constituée d'une ou plusieurs chaînes carbonées aliphatiques, linéaires ou ramifiées, comportant généralement entre 8 et 18 atomes de carbone (Rosen, 1989). Les différences chimiques

des tensioactifs liées à la nature des queues hydrophobes (nombre d'atomes de carbone, taux de branchement, etc.) sont généralement moins prononcées que celles liées à la tête hydrophile (West et Harwell, 1992). Une classification des tensioactifs selon la nature de leur partie hydrophile a donc été élaborée. D'après cette classification très largement utilisée, les tensioactifs sont classés en quatre groupes :

- les anioniques : la partie hydrophile est chargée négativement ;
- les cationiques : la partie hydrophile est chargée positivement ;
- les zwitterioniques ou amphotères : la partie hydrophile comporte une charge positive et une charge négative, la charge globale étant nulle ;
- les non ioniques : la molécule ne comporte aucune charge nette (West et Harwell, 1992).

Les exemples des tensioactifs appartenant à chacun de ces groupes sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Exemples de molécules appartenant aux quatre groupes de tensioactifs.

Tensioactif	Type	Structure moléculaire
Sodium dodécyl sulfate (SDS)	Anionique	
Bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB)	Cationique	
Oxyde de lauryldiméthylamine (LDAO)	Amphotère	
Triton X-100	Non ionique	

Les tensioactifs anioniques libèrent une charge négative (anion) en solution aqueuse. Ils ont une tendance hydrophile plus marquée. Ils ne sont pas compatibles avec les tensioactifs cationiques.

Les tensioactifs cationiques libèrent une charge positive (cation) en solution aqueuse. Ils ont des propriétés bactériostatiques et émulsionnantes. Ils ne sont pas compatibles avec les tensioactifs anioniques.

Les tensioactifs zwitterioniques ou amphotères libèrent un ion positif ou un ion négatif selon le pH du milieu où ils se trouvent. En pH alcalin, ils se comportent comme les tensioactifs anioniques, en pH acide, ils se comportent comme les cationiques. Les tensioactifs amphotères sont utilisés comme détergents. Ils sont compatibles avec les autres tensioactifs.

Les tensioactifs non ioniques ne comportent aucune charge nette. On dit que ce sont souvent les meilleurs détergents, car généralement, leur activité superficielle et la capacité de solubilisation sont plus élevées. De plus, ils ont des très faibles valeurs de CMC (Rosen, 1989 ; Gelfman *et al.*, 2003).

Dans les tensioactifs synthétiques, les parties hydrophobes les plus communes sont les paraffines, les oléfines, les alkylbenzènes, les alkylphénols et les alcools. La tête hydrophile est généralement composé de groupements sulfate, sulfonate ou carboxylate pour les tensioactifs anioniques ; d'ammonium quaternaire pour les tensioactifs cationiques ; de polyoxyéthylène, de saccharose ou de polypeptide pour les tensioactifs non ioniques. Les tensioactifs zwitterioniques sont pour la plupart soit des oxydes d'amine, soit des structures bipolaires (amphiphiles) proches de celles des phospholipides naturels (Paria, 2008).

Les tensioactifs d'origine naturelle ont des structures chimiques très variées. La plupart de ces tensioactifs possèdent les parties hydrophiles et hydrophobes distinctes. La partie hydrophile peut être ionique ou non ionique et consister de mono-, di- ou polysaccharides, d'acides carboxyliques ou de peptides. Les parties hydrophobes consistent généralement en des acides gras saturés, insaturés ou hydroxylés. Dans certaines molécules de tensioactifs à poids moléculaire élevé, telles que les complexes protéine-polysaccharide, les parties hydrophiles et hydrophobes sont constituées de molécules différentes (Lin, 1999). La majorité des biotensioactifs sont de type anionique ou non ionique. Seulement quelques-uns sont cationiques (par exemple, ceux qui contiennent les groupements amines) (Mulligan *et al.*, 2001).

La plupart des tensioactifs d'origine naturelle sont produites par des microorganismes, principalement par des bactéries et des levures (Paria, 2008). La biodégradabilité et la multitude des structures chimiques, et donc leur propriétés diverses, ont permis de trouver de nombreuses applications aux biotensioactifs dans des procédés de biotechnologie environnementale (Tableau 3).

**Tableau 3.** Classification, espèces productrices et utilisation en biotechnologie environnementale des tensioactifs d'origine naturelle (d'après Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011).

Biotensioactif		Microorganisme	Utilisation en biotechnologie environnementale
Groupe	Classe		
<b>Glycolipides</b>	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	Amélioration de la dispersion et de la dégradation des hydrocarbures, émulsification des hydrocarbures et des huiles végétales, élimination des métaux du sol
	Lipides de tréhalose	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i>	Amélioration de la biodisponibilité des hydrocarbures
	Sophorolipides	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulopsis apicola</i>	Élimination des HAP présents dans les boues, élimination des métaux lourds des sédiments, amélioration de la dégradation du pétrole
<b>Acides gras, phospholipides et lipides neutres</b>	Acide corynomycologique	<i>Corynebacterium lepus</i>	Amélioration de la régénération du bitume
	Acide spiculisporique	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Élimination des métaux lourds, préparation de nouveaux gels organiques et de microcapsules super fines
	Phosphatidyléthanolamine	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Amélioration de la tolérance des bactéries vis-à-vis des métaux lourds
<b>Lipopeptides</b>	Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>	Amélioration de la biodégradation des HAP et des pesticides, élimination des métaux lourds, amélioration de la phytoextraction
	Lichénysine	<i>Bacillus licheniformis</i>	Amélioration de la dégradation du pétrole
<b>Tensioactifs polymériques</b>	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Stabilisation des émulsions d'hydrocarbures dans l'eau
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53	
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	Dispersion du calcaire dans l'eau
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	Stabilisation des émulsions d'hydrocarbures dans l'eau
	Mannoprotéine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

### 3.3.2. Utilisation des tensioactifs dans la dégradation des HAP

De nombreux travaux ont été réalisés afin d'étudier l'effet des tensioactifs sur la solubilisation et la biodégradation des HAP. La solubilisation est définie comme la préparation d'une solution isotropique thermodynamiquement stable d'une substance qui est normalement insoluble ou très peu soluble dans un solvant donné par l'ajout d'un ou de plusieurs composés amphiphiles (Mackay, 1987). Il a été trouvé que la solubilité des HAP augmente linéairement avec la concentration de tensioactifs au-dessus de la CMC (Edwards *et al.*, 1991). Dans ces conditions la solubilisation micellaire a lieu, c'est-à-dire que la solubilité aqueuse des HAP augmente grâce à la diminution de la tension interfaciale et l'incorporation des HAP dans des micelles (Volkering *et al.*, 1995 ; Li et Chen, 2002). Le taux de la solubilisation micellaire dépend des plusieurs facteurs, tels que la structure du tensioactif, leur nombre d'aggrégation (le nombre des molécules du tensioactif qui constituent la micelle), la géométrie de la micelle, la température, la taille de l'HAP solubilisé (Volkering *et al.*, 1995).

Néanmoins, les essais conçus pour améliorer la biodégradation des HAP grâce à l'utilisation des tensioactifs ont donné des résultats contradictoires. Deschênes *et al.* (1995) ont montré que malgré le fait que le SDS augmentait la mobilisation des HAP dans le sol, 100 et 500 mg/kg de SDS ralentissaient considérablement la biodégradation du fluorène, du phénanthrène et des HAP ayant quatre cycles aromatiques dans leur structure. Ces auteurs ont trouvé que le SDS était dégradé par les bactéries et que la consommation préférentielle du tensioactif était probablement la raison de ce ralentissement. Bramwell et Laha (2000) ont étudié l'effet de quatre tensioactifs (le Tween 20, le SDS, le bromure de tétradécyl triméthyl ammonium et l'émulsifiant commercial Citrikleen) sur la minéralisation du phénanthrène par *Pseudomonas aeruginosa*. Ils ont mis en évidence que tous ces tensioactifs en concentrations égales ou supérieures de la CMC inhibaient la minéralisation du phénanthrène. Les essais de toxicité ont indiqué que la présence du phénanthrène solubilisé augmentait la toxicité des tensioactifs de 100 fois, suggérant que la toxicité des HAP solubilisés doit être prise en compte dans les procédés de la biorémediation.

Providenti *et al.* (1995) ont étudié l'effet d'un tensioactif d'origine naturelle, le rhamnolipide UG2, sur la biodégradation du phénanthrène. Ils ont montré qu'en présence de ce tensioactif, la phase de latence était plus courte et que la biodégradation était meilleure. L'augmentation de la solubilité et de la vitesse de biodégradation du phénanthène en présence de rhamnolipides a également été rapportée par Zhang *et al.* (1997). Arino *et al.* (1998) ont isolé une souche productrice d'un rhamnolipide du consortium issu d'un sol contaminé par les HAP. Ces auteurs ont trouvé que la co-culture de cette souche avec une

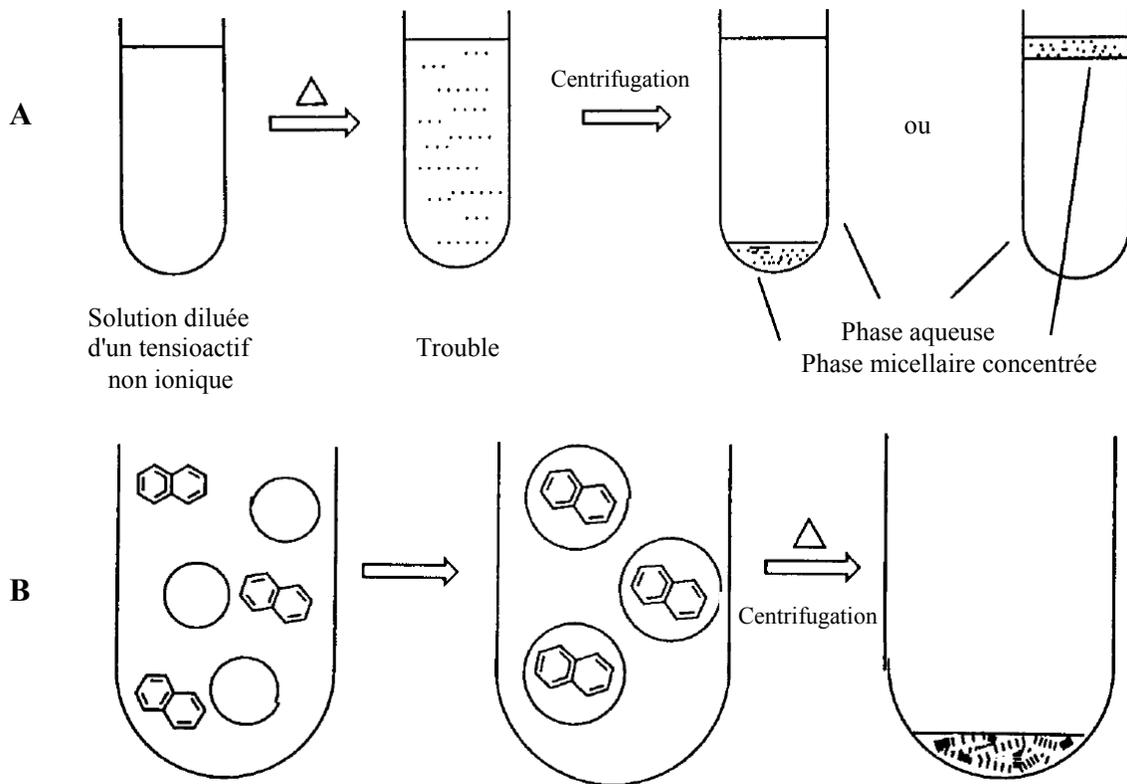
autre souche sur le phénanthrène comme seule source de carbone améliorait la biodégradation de ce HAP. Dean *et al.* (2001) ont également comparé la biodégradation du phénanthrène dans le sol par deux souches (*Pseudomonas* souche R et une souche isolée, P5-2) en rajoutant soit un rhamnolipide, soit une souche productrice d'un tensioactif. La présence du rhamnolipide ou la co-culture améliorait la biodégradation du phénanthrène par la souche R, tandis que cela n'était pas le cas pour la souche P5-2. Une étude complémentaire a décrit l'effet combiné du pH et de l'ajout des rhamnolipides au cours de la dégradation du phénanthrène par *Pseudomonas putida* CRE 7 (Shin *et al.*, 2004). Il a été trouvé qu'en présence de rhamnolipides, des meilleures solubilité et vitesse de dégradation du phénanthrène ont été atteintes à pH = 5 tandis qu'en leur absence elles étaient maximales à pH = 6.

Plusieurs autres tensioactifs ou leurs mélanges ont été testés, parmi lesquels on peut citer le Tween (le Tween 20, 80), le Triton (le Triton X-100, X-102, X-305, N101), le Brij (le Brij 30, 35), le Tergitol (le Tergitol NPX, 15-S-7, 15-S-9, 15-S-12), l'Igepal CA-720, les sophorolipides, le dodecyl benzène sulfonate de sodium (LAS) (Tiehm, 1994 ; Volkering *et al.*, 1995 ; Guha et Jaffé, 1996 ; Schippers *et al.*, 2000 ; Doong et Lei, 2003 ; Zhu et Feng, 2003 ; Jin *et al.*, 2007 ; Li et Chen, 2009 ; Zhu *et al.*, 2010). Cependant, malgré cette multitude de travaux réalisés on ne peut toujours pas prédire avec certitude si l'ajout d'un tensioactif est bénéfique pour la biodégradation ou non. L'analyse des données disponibles à ce jour montre qu'un tensioactif peut améliorer la biodégradation des HAP dans un cas et ne pas avoir d'effet ou avoir un effet négatif dans d'autres cas. Ceci suggère qu'il existe une différence de comportement de chaque souche en présence de tensioactifs et que les conditions de la biodégradation peuvent aussi jouer un rôle important sur le résultat final.

### 3.3.3. Utilisation du phénomène du point de trouble pour la solubilisation des HAP

Quand une solution de tensioactifs faiblement polaires, tels que les tensioactifs non ioniques ou zwitterioniques, est chauffée au delà d'une certaine température qui est appelé le *point de trouble*, cette solution devient opaque. Elle se sépare en deux phases : une phase aqueuse dont la concentration en tensioactifs est faible et égale à la CMC à cette température, et une phase riche en tensioactif (Carlsson *et al.*, 1990). Ceci correspond à une agrégation des micelles en « super micelles » et s'explique par une diminution du degré d'hydratation de la partie hydrophile du tensioactif. Par abaissement de la température ce processus est réversible. Lorsque le mélange est refroidi à la température en dessous du point de trouble, les deux phases fusionnent pour former à nouveau une phase limpide (Bai *et al.*, 2001).

Récemment l'utilisation de la méthode d'extraction appelée « extraction au point de trouble » (en anglais « cloud point extraction » ou CPE) dans le domaine de la préconcentration et de l'extraction des HAP a commencé à susciter l'intérêt (Bai *et al.*, 2001). Cette méthode est basée sur le phénomène d'apparition d'une phase concentrée des solutés hydrophobes dans les solutions de tensioactifs à partir du point de trouble. La représentation des étapes de la séparation des phases au point de trouble et de la CPE d'un HAP est montré sur la figure 10.



**Figure 10.** Etapes de la séparation des phases d'un tensioactif non ionique (A) et de la CPE du naphthalène (B) (d'après Quina et Hinze, 1999). (A) En chauffant la solution micellaire d'un tensioactif au dessus de son point de trouble, la solution devient opaque et après un certain temps (qui peut être accéléré par centrifugation) elle se sépare en deux phases : une phase compacte riche en tensioactif (qui peut se trouver au dessus ou en dessous en fonction de sa densité) et une phase aqueuse. (B) L'ajout d'un tensioactif en concentration supérieure à la CMC va former des micelles (représentées par les grands cercles) qui peuvent incorporer le naphthalène. Après un changement de la température et centrifugation, le naphthalène micellisé va se séparer de la phase aqueuse et se concentrer dans la phase riche en tensioactif. Celle-ci pourra être analysée ou traitée ultérieurement en fonction des besoins.

Watanabe et Tanaka (1978) étaient les premiers à utiliser le phénomène du point de trouble en tant que technique d'extraction afin d'extraire les ions de métaux de solutions aqueuses. Par la suite la CPE a été utilisée avec grand succès pour la préconcentration des systèmes contenant de faibles concentrations en ions métalliques, en HAP et en autres composés organiques hydrophobes (Bai *et al.*, 2001).

Récemment, le phénomène du point de trouble a été appliqué pour la première fois aux transformations microbiennes par Wang *et al.* (2004). Ces auteurs ont étudié la biotransformation du cholestérol par *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 en utilisant des tensioactifs non ioniques, le Triton X-100 et le Triton X-114, au point de trouble. Ils ont trouvé que par rapport aux résultats rapportés précédemment, le rendement de conversion et la concentration en produit final (androst-1,4-diène-3,17-dione) ont été nettement améliorés. Depuis, deux autres applications de la technique des biotransformations au point de trouble ont été élaborées : dans la production de *L*-phénylacétylcarbinol par *Saccharomyces cerevisiae* (Zhang *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010) et dans la fermentation extractive de la lipase (Pan *et al.*, 2010). Actuellement aucune autre application des biotransformations au point de trouble n'a été rapportée. Sachant que l'utilisation de la CPE pour la concentration et extraction des HAP est très efficace (Ferrer *et al.*, 1996 ; Casero *et al.*, 1999 ; Sicilia *et al.*, 1999 ; Vallejo-Pecharrom *et al.*, 2001), il semble envisageable d'améliorer la biodegradation des HAP en utilisant le phénomène du point de trouble.

## **II. Le phénanthrène**

### **1. Généralités**

Le phénanthrène (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>) est un HAP de bas poids moléculaire pris dans ce travail en tant que modèle de HAP. Le phénanthrène possède dans sa structure trois cycles aromatiques. A température ambiante il est sous forme des cristaux incolores et brillants. Il est présent dans l'huile d'anthracène obtenue par distillation du goudron de houille. Il est essentiellement produit lors de la combustion incomplète des hydrocarbures, du bois ou du charbon. On en trouve également dans la fumée de tabac, les échappements de moteur Diesel ou à essence, dans les viandes grillées au charbon de bois (INERIS, 2010). La structure chimique du phénanthène est présentée sur la figure 11.

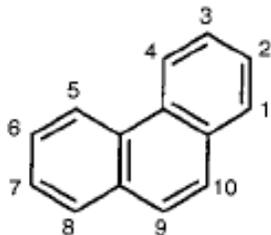


Figure 11. Structure du phénanthrène.

Le phénanthrène est utilisé dans la production de colorants, dans les explosifs, dans les produits pharmaceutiques. Il sert de base pour la production d'autres substances chimiques comme l'acide 2,2 diphénique, 9,10-phénanthrénequinone. Il entre également dans la composition de substances conductrices d'électricité utilisées dans les batteries et les cellules photovoltaïques (INERIS, 2010).

Les principales propriétés du phénanthrène sont les suivantes :

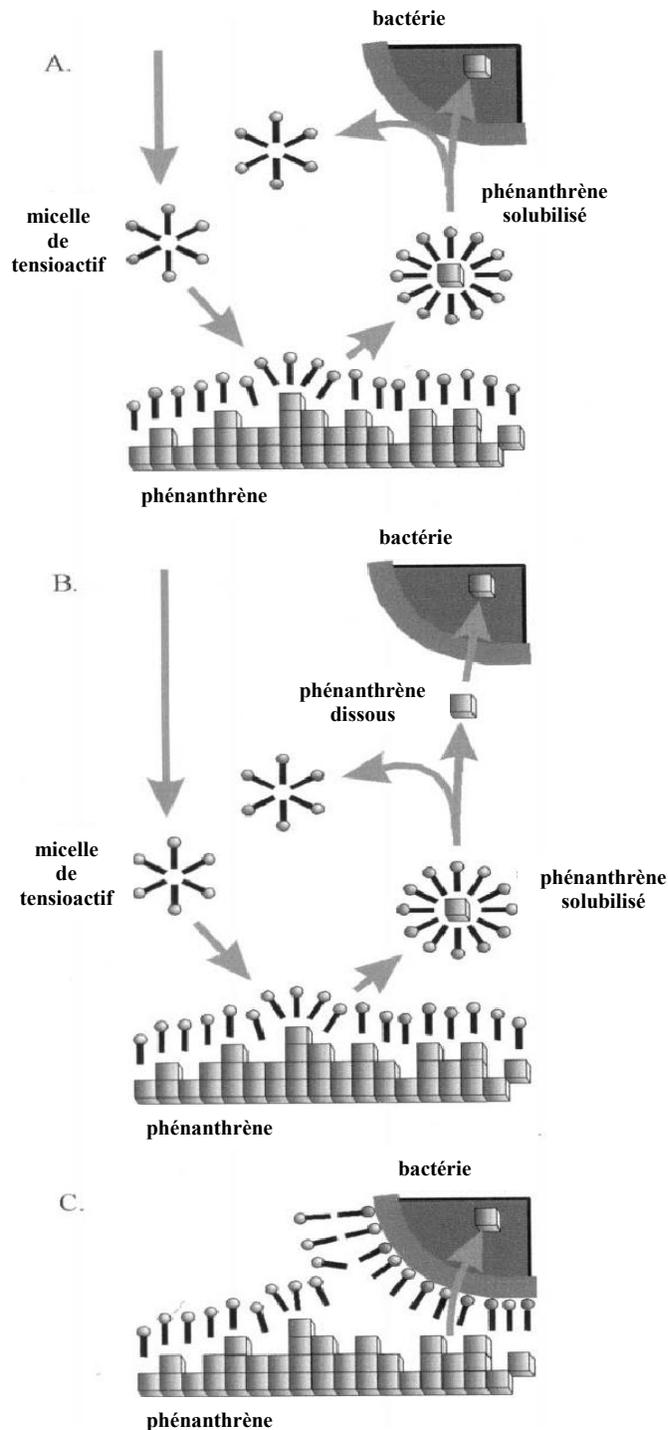
- hydrophobe,
- peu soluble dans l'eau (1,2 mg/L à 25 °C),
- persistant (demi-vie dans l'eau est de 150 jours en moyenne),
- non cancérigène chez l'homme,
- allergène modéré.

Aitken *et al.* (1996) ont montré qu'après avoir été cultivée sur le phénanthrène une grande partie des bactéries issues d'un site pollué est capable de dégrader les HAP de haut poids moléculaire. Ces auteurs ont également mis en évidence que, pour une bactérie donnée, ces HAP étaient très probablement dégradés à l'aide des mêmes enzymes. Ceci suggère que les HAP de faible poids moléculaire, tels que le phénanthrène, peuvent être utilisés comme modèle pour l'étude de biodégradations plus complexes.

## 2. Biodisponibilité du phénanthrène

Puisque le phénanthrène est hydrophobe et peu soluble dans les milieux aqueux, sa dégradation microbienne est limitée (Zhang *et al.*, 1997). Pour augmenter la solubilité et la biodisponibilité du phénanthrène des tensioactifs peuvent être utilisés. La figure 12 (Schippers *et al.*, 2000) explique comment, dans le cas d'utilisation d'un tensioactif, le phénanthrène peut pénétrer à l'intérieur d'une cellule pour être dégradé.

Cependant, comme pour les autres HAP, les auteurs ont observé la présence (positive ou négative) ou l'absence de l'effet de l'ajout des tensioactifs dans le milieu de culture sur la biodégradation du phénanthrène (Tiehm, 1994 ; Jin *et al.*, 2007). Ces résultats sont expliqués par la différence de comportement de chaque microorganisme en présence de tensioactifs.



A : Le phénanthrène pénètre dans la bactérie par fusion partielle des membranes bactérienne et micellaire.

B : Le tensioactif augmente le transfert de matière. La bactérie n'utilise que le phénanthrène dissous.

C : L'ajout de tensioactif change l'hydrophobicité de la membrane et facilite le contact entre les cellules et le polluant.

**Figure 12.** Modèles proposés pour l'incorporation du phénanthrène à l'intérieur des cellules bactériennes par l'intermédiaire de tensioactif (d'après Schippers *et al.*, 2000).

### 3. Biodégradation du phénanthrène

#### 3.1. Biodégradation du phénanthrène par *Pseudomonas putida*

La biodégradation du phénanthrène par les bactéries du genre *Pseudomonas* a été étudiée par plusieurs auteurs. Généralement, ces bactéries oxydent le phénanthrène en *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrophénanthrène ou *cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophénanthrène (Fig. 13). L'isomère prédominant, le phénanthrène-*cis*-3,4-dihydrodiol, est transformé en 3,4-dihydroxyphénanthrène. Le produit du clivage est ensuite métabolisé en acide 1-hydroxy-2-napthoïque (1H2Na) (Ouyang, 2006).

Dans le cas de *Pseudomonas putida* AC10, le *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrophénanthrène est métabolisé en acide 2-hydroxy-1-napthoïque (2H1Na) par le même groupe d'enzymes qui transforme le *cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophénanthrène en 1H2Na (Kiyohara *et al.*, 1994). Le 1H2Na est décarboxylé en *cis*-1,2-dihydroxynaphtalène, puis subit un méta-clivage pour former l'acide salicylique. L'acide salicylique peut être dégradé en catéchol dans le cas de *Pseudomonas putida* ou en acide gentisique dans le cas de *Pseudomonas testosteroni* (Mrozik *et al.*, 2003) (Fig. 14). D'après Chakrabarty (1972), parmi les espèces de *Pseudomonas* qui métabolisent le salicylate via le catéchol, il existe deux voies métaboliques possibles. L'une est un ortho-clivage de catéchol par la catéchol 1,2-oxygénase donnant l'acide *cis*-*cis*-muconique. L'autre est un méta-clivage par la catéchol 2,3-oxygénase donnant un semi aldéhyde 2-hydroxymuconique.

Les voies de dégradation du phénanthrène et du naphtalène sont indépendantes. Toutefois, les bactéries ayant les enzymes de conversion du naphtalène en acide salicylique sont souvent capables de dégrader le phénanthrène également (Peng *et al.*, 2008). En outre, les voies de dégradation microbienne du phénanthrène et du naphtalène chez les bactéries du genre *Pseudomonas* développées par Ouyang (2006) (Fig. 13 et Fig. 14) montrent que dans le cas où le 1H2Na se transforme en acide salicylique les deux voies se lient et partagent un même métabolite, le *cis*-1,2-dihydroxy naphtalène.

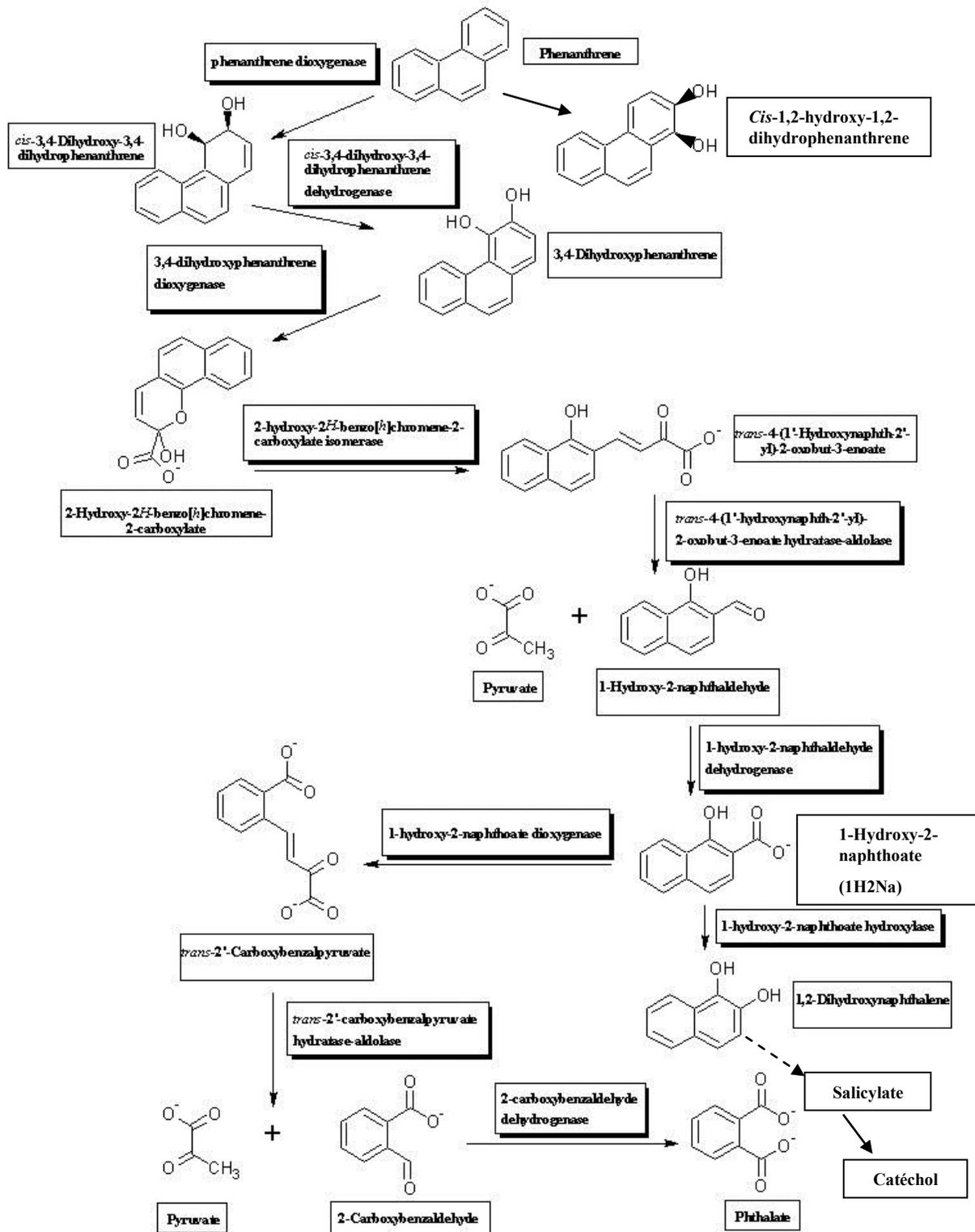


Figure 13. Voie de biodégradation du phénanthrène par le genre *Pseudomonas* (Ouyang, 2006).

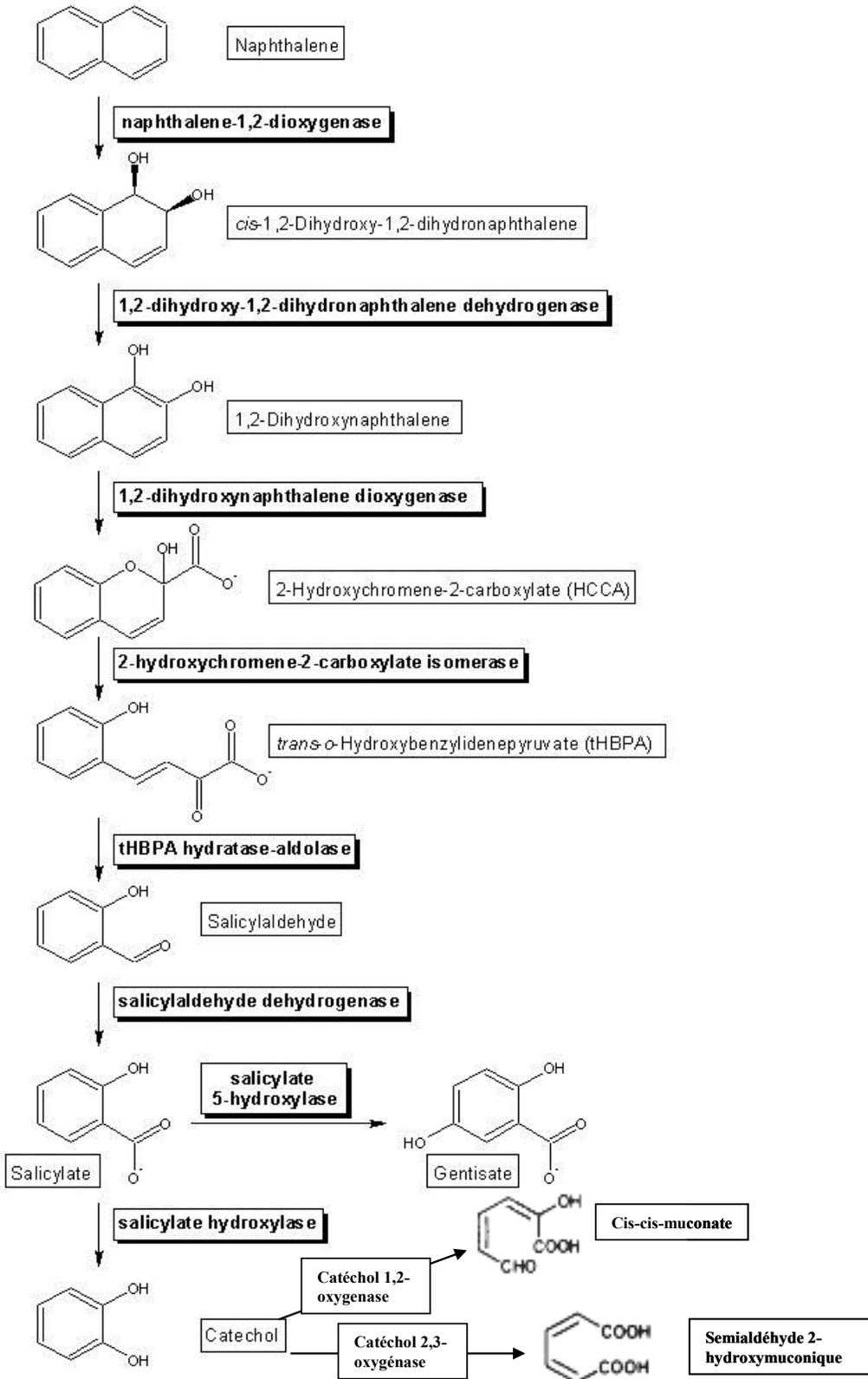


Figure 14. Voie de biodégradation du naphthalène chez *Pseudomonas* (d'après Mroziak *et al.*, 2003 ; Ouyang, 2006).

Grâce à la similitude structurale de plusieurs HAP et leurs métabolites intermédiaires, il est probable qu'il existe des oxygénases qui sont fonctionnellement similaires chez plusieurs microorganismes et que chaque microorganisme est capable de dégrader plusieurs types de HAP (Aitken *et al.*, 1996). Les enzymes de clivage présentes chez les bactéries du genre *Pseudomonas* issues du sol s'étant développées sur benzoate, naphthalène, anthracène ou phénanthrène, peuvent également oxyder des dérivés di-hydroxylés de ces composés (Davies et Evans, 1964).

Les études de Balashova *et al.* (2001) et Cho *et al.* (2005) montrent que la monooxygénase qui peut catalyser l'oxydation du 1H2Na en 1,2 dihydroxynaphtalène est identique à celle réalisant l'oxydation du salicylate en catéchol. Selon Balashova *et al.* (2001), la salicylate 1-monooxygénase purifiée de la souche *P. putida* B202-P1 peut transformer le 1H2Na en 1,2 dihydroxynaphtalène. Ainsi, l'accumulation du 1H2Na observée chez *Spingomonas yanoikuyae* B1 EK504 serait une conséquence de l'absence de cette enzyme (Cho *et al.*, 2005).

Les enzymes impliquées dans la dégradation du naphthalène en salicylate sont inductibles. Colbert *et al.* (1993) ont démontré que la croissance et le métabolisme de *Pseudomonas putida* PpG7 dans un sol pollué s'accroît de manière importante après l'ajout du salicylate.

### 3.2. Biodégradation du phénanthrène par des cultures mixtes

Une nouvelle voie de dégradation du phénanthrène par un consortium contenant des bactéries appartenant aux genres *Mycobacterium* et *Rhodococcus* comme espèces dominantes a été proposé par Zhang *et al.* (2010). Ce consortium transforme le phénanthrène en 9-phénanthrol et 3,4-dihydroxyphénanthrène sous l'action d'une monooxygénase et d'une dioxygénase, respectivement. Ces intermédiaires sont transformés en 1-hydroxy-2-naphtaldéhyde, qui est ensuite dégradé en 2-carboxybenzaldéhyde. La détection du phthalate dans le milieu de culture suggère que la voie de phthalate est utilisée dans la dégradation du phénanthrène (Fig. 15).

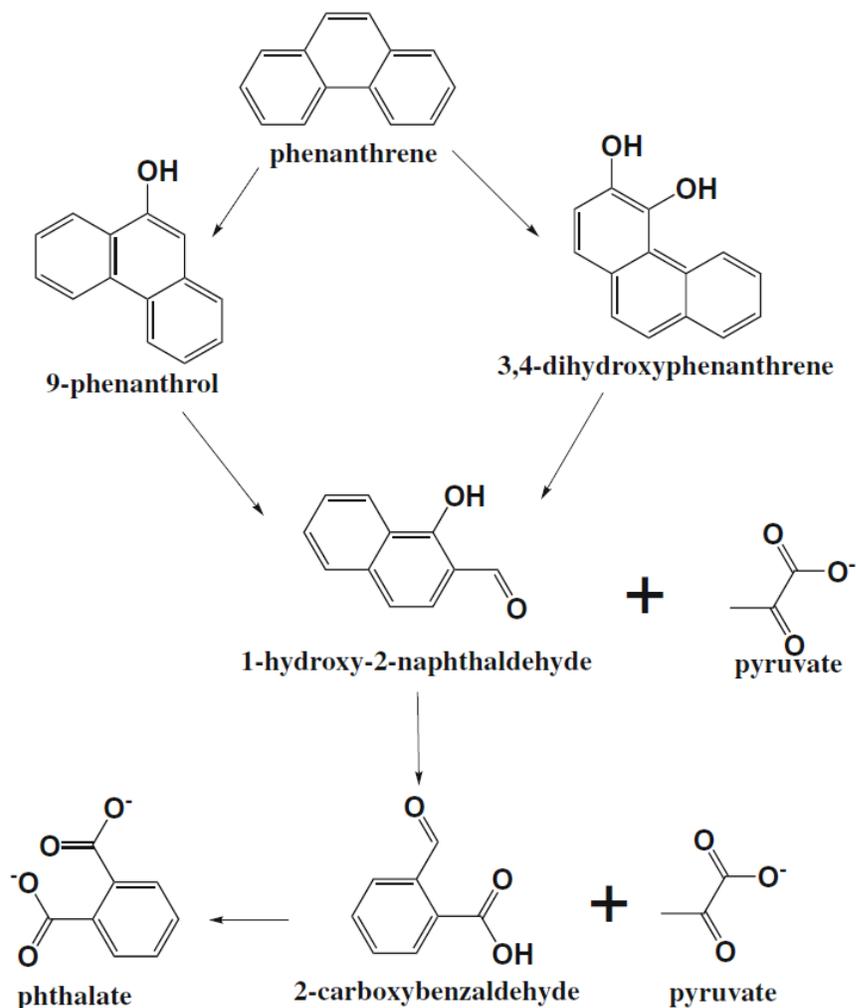


Figure 15. Voie de dégradation du phénanthrène par un consortium proposée par Zhang *et al.* (2010).

Il a été observé que les cultures mixtes de microorganismes pouvaient dégrader les polluants organiques de manière plus efficace qu'une souche pure (Trzesicka-Mlynarz et Ward, 1995 ; Fairlee *et al.*, 1997 ; Richard et Vogel, 1999). Ainsi, une meilleure biodégradation du pétrole a été obtenue en utilisant un consortium mixte de *Pseudomonas* sp. et de *Bacillus* sp. (Kaczorek et Olszanowski, 2011). Pour un consortium de microorganismes, sa capacité totale de dégradation des polluants n'est pas simplement définie comme la somme des capacités des souches individuelles qui le composent (Ghazali *et al.*, 2004). La meilleure performance de dégradation du consortium est souvent attribuée aux effets des interactions synergiques entre les microorganismes le constituant. Les mécanismes de ces interactions bénéfiques peuvent être très complexes et ne sont pas toujours bien compris. Par exemple, les interactions commensales entre deux espèces de *Pseudomonas*, dont une capable de dégrader le phénanthrène et l'autre productrice d'un tensioactif, ont été mises en évidence (Dean *et al.*,

2001). Ces interactions ont abouti en une dégradation du phénanthrène plus efficace. Cependant, leur nature n'a pas été élucidée.

Néanmoins, l'absence d'effet de la co-culture de différentes souches sur la dégradation du phénanthrène a été rapporté par Samanta *et al.* (1999). Il a été démontré que l'utilisation simultanée de quatre espèces capables de dégrader le phénanthrène (*Arthrobacter sulphureus* RKJ4, *Acidovorax delafieldii* P4-1, *Brevibacterium* sp. HL4 et *Pseudomonas* sp. DLC-P11) n'a pas induit l'augmentation de la minéralisation de ce HAP.

Une culture mixte de *P. putida* BS3701 et de *Burkholderia* sp. BS3702 dans le sol a également été étudiée (Puntus *et al.*, 2008). Les auteurs ont observé une variation considérable du ratio de chaque espèce au cours de la culture, qui était probablement due aux différentes vitesses de consommation du phénanthrène et de ses intermédiaires. Il a été déterminé que *Burkholderia* sp. BS3702 dégradait rapidement le phénanthrène en accumulant le 1H2Na. Sachant que *P. putida* BS3701 était capable d'utiliser rapidement cet intermédiaire, Puntus *et al.* (2008) ont supposé que l'efficacité de dégradation du phénanthrène dans le sol pouvait être améliorée lors d'une co-culture de ces espèces. Néanmoins, une étude ultérieure (Ovchinnikova *et al.*, 2009) a montré que la biodégradation a été moins importante (17 % du phénanthrène dégradé) dans le cas d'une co-culture de BS3701 et de BS3702 que dans le cas des cultures de souches pures (37 %).

La possibilité de réduire le coût du procédé de dégradation du phénanthrène grâce à l'utilisation d'une culture mixte composée de la bactérie *Pseudomonas migulae* et de la microalgue *Chlorella sorokiniana* a été proposée par Muñoz *et al.* (2003). Leur stratégie consistait en l'élimination du coût de l'aération mécanique en utilisant la photosynthèse des algues. Les algues exposées à la lumière allaient donc produire de l'oxygène nécessaire aux bactéries aérobies et consommer le dioxyde de carbone produit par ces bactéries au cours de la dégradation du phénanthrène. Il a été également déterminé que les microalgues produisaient un tensioactif au cours de la culture, ce qui pouvait améliorer l'efficacité de la dégradation du phénanthrène. Néanmoins, à cause de la toxicité du phénanthrène vis-à-vis des microalgues, un système biphasique à base de solvants devait être élaboré afin de rendre ce procédé possible.

Par ailleurs il existe aussi des travaux sur la dégradation du phénanthrène en mélange avec d'autres HAP par des cultures mixtes. Bouchez *et al.* (1999) ont étudié la différence entre la dégradation du

mélange de cinq HAP (le phénanthrène, le fluorène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène) par de cultures mixtes de deux à trois souches définies et par un consortium naturel issu d'un sol pollué. Les souches composant les cultures mixtes ont été choisies de telle sorte qu'elles utilisaient différents HAP comme substrat : les souches *Pseudomonas S Phe Na1* et *Pseudomonas S Flu Au1* consommaient exclusivement un HAP, le phénanthrène et le fluorène respectivement, tandis que la souche *S Ant Mu5* avait un large spectre de HAP comme substrats, mais était incapable de dégrader le fluorène. Le consortium naturel pouvait dégrader les cinq HAP de cette étude. Il a été observé que la quantité des HAP dégradés par les cultures mixtes des souches définies était inférieure à celle du consortium naturel, qui, à son tour, a dégradé la quasi-totalité du mélange des HAP. Ces auteurs ont suggéré que le consortium issu du sol pollué comportait une variété de souches assez grande pour compenser l'inhibition compétitive entre les HAP qui peut avoir lieu dans le cas de culture de souches pures. De plus, la présence des souches capables de dégrader les métabolites inhibiteurs est aussi probable dans le consortium.

Un autre travail de recherche a comparé l'efficacité de dégradation du phénanthrène en mélange avec quatre HAP (le naphthalène, le pyrène, le fluoranthène et le benzo[a]pyrène) par les souches individuelles et une culture mixte de *Sphingomonas aromaticivorans* B0695 et *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 (Vandermeer et Daugulis, 2007). Le phénanthrène a été dégradé de manière aussi efficace par les souches pures que par le consortium. Par contre, un meilleur taux de dégradation des HAP à masse moléculaire élevée par le consortium a été constaté. En effet, les HAP lourds sont moins faciles à dégrader par les microorganismes (Cerniglia, 1992). Les interactions synergiques dans une culture mixte pouvaient donc améliorer leur dégradation.

### **III. Conclusion de la synthèse bibliographique**

Dans le monde industriel la contamination par les HAP est un problème majeur. Ces polluants persistants, souvent toxiques, mutagènes et cancérigènes, sont très répandus dans l'environnement. En ce qui concerne les milieux aquatiques, en moyenne plusieurs centaines de tonnes de HAP sont relargués annuellement dans l'eau. L'apparition d'une des plus importantes marées noires de l'histoire suite au naufrage de la plate-forme pétrolière au Golfe du Mexique en printemps 2010 a encore une fois souligné l'importance d'élaboration des méthodes efficaces d'élimination d'hydrocarbures en milieux aqueux.

Actuellement, la biodégradation des HAP suscite un grand intérêt, car son application dans les procédés de réhabilitation des sites pollués est souvent avantageuse du point de vue économique et écologique par rapport aux autres techniques. Néanmoins, le succès de l'utilisation de la biodégradation nécessite une meilleure connaissance des mécanismes appliqués.

Qu'il s'agisse de la biodégradation des HAP par des cultures pures ou par des consortia de microorganismes, le facteur principal limitant les procédés correspondants reste leur faible biodisponibilité. Il a été démontré que l'ajout de tensioactifs peut augmenter la biodisponibilité des HAP et dans certains cas favoriser ainsi leur biodégradation. Bien qu'un nombre important des travaux réalisés ait été effectué en utilisant des polluants et des tensioactifs différents, aucune tendance générale vis-à-vis de l'effet des tensioactifs sur la biodégradation des HAP a été trouvée à partir de ces résultats. De plus, les connaissances actuelles sur les interactions entre les microorganismes et les tensioactifs au cours de ces dégradations ne sont pas complètes.

A la suite de cette synthèse bibliographique, une étude approfondie des différentes techniques d'amélioration de la biodégradabilité des HAP, y compris par ajout de tensioactifs, s'impose. Un modèle réalisé en laboratoire pourrait être utilisé par la suite sur le terrain.

La problématique actuelle nous amène donc à nous intéresser d'abord à la dissolution et ensuite à la biodégradation du phénanthrène (HAP modèle) en présence de tensioactifs. Dans ce travail nous avons jugé utile de focaliser notre attention en particulier sur :

- l'étude de la toxicité des différents tensioactifs vis-à-vis de *Pseudomonas putida* DSMZ 8368,
- l'efficacité de la solubilisation du phénanthrène,
- l'effet de la dispersion, de la solubilisation et du traitement thermique sur la solubilité et la biodégradation du phénanthrène par *P. putida*,
- la dégradation du phénanthrène par le consortium Pyr01.

Les études de l'effet de la modification du milieu de culture et/ou du changement des techniques de traitement de ce dernier sur la biodégradation du phénanthrène pourront aboutir à l'amélioration de certains paramètres mis en jeu et apporter des nouveaux éléments à la compréhension des procédés de biodégradation des HAP.

## **MATERIEL ET METHODES**

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Microorganismes

Les microorganismes choisis dans ce travail sont une souche pure *Pseudomonas putida* DSMZ 8368 et un consortium de microorganismes Pyr01 issu des rives d'une rivière de la Moselle polluée par la sidérurgie, la Fensch.

*Pseudomonas putida* DSMZ 8368 est un bacille à Gram négatif en forme de bâtonnet, aérobic strict, asporulé, mobile, connu pour sa capacité de dégradation des HAP.

L'évolution des espèces constituant le consortium Pyr01 au cours de la biodégradation du phénanthrène n'a pas été caractérisée. Cependant, les genres du consortium Pyr01 (hormis les genres *Pseudomonas* et *Stenotrophomas* non ciblés) ont été caractérisés par l'équipe du Dr. P. Peyret (Université de Clermont-Ferrand I) par clonage-séquençage pour les divers temps de la cinétique de dégradation du pyrène réalisée par le Dr. P. Poupin (Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes – CNRS UMR 7146, Université Paul Verlaine, Metz). L'exemple de résultats de cette caractérisation obtenus pour le début de la dégradation (t = 0 h) du pyrène est présenté sur la figure 16.

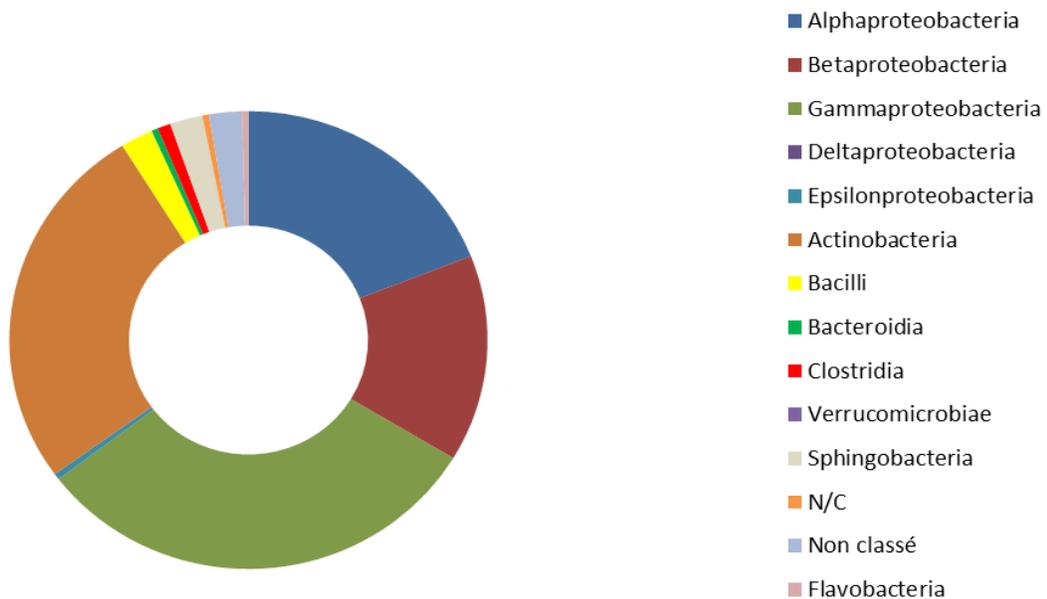


Figure 16. Exemple de la composition du consortium Pyr01 au cours de la biodégradation du pyrène.

## 2. Composition des milieux de culture

### Milieu LB (Luria Bertani)-agar + solution du glucose

LB broth	16 g/L
Agar	12 g/L
eau distillée	1 L

Stérilisation à l'autoclave, 20 mn, 121 °C

Le milieu LB-agar stérile est mélangé avec une solution de glucose 200 g/L stérile avant d'être versé dans les boîtes de Pétri. Le volume de solution de glucose est ajouté afin d'obtenir la concentration finale en glucose dans le milieu de 1 % (poids/volume).

### Milieu Minéral de Brunner (MMB) n°457

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,44 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,52 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,2 g/L
CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,05 g/L
Solution minérale SI-4	10 mL
NaOH 30 %	pH = 7,1
Eau distillée	1 L

Stérilisation à l'autoclave, 20 mn, 121 °C

#### *Composition de la solution minérale SI-4*

EDTA	0,5 g/L
FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
Solution minérale SI-6	100 mL

#### *Composition de la solution minérale SI-6*

ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	100 mg/L
MnCl <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	30 mg/L

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300 mg/L
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200 mg/L
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mg/L
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	20 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30 mg/L
Eau distillée	1 L

### Milieu HAP

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	40 mg/L
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4 g/L

Solution des HAP (100 mg/mL) dans de la N,N-diméthylformamide (à préparer séparément)

### **3. Conservation des souches**

A partir d'une pré-culture de *P. putida* DSMZ 8368, provenant d'un prélèvement sur une tube cryogénisée, une culture de D.O.<sub>600nm</sub> initiale de 0,1 est préparée. Cette culture est arrêtée lorsque la D.O.<sub>600nm</sub> est environ 1 (en phase exponentielle) pour être cryogénisée : un volume de glycérol stérile égal à celui de la culture (60 mL) est ajouté dans la fiole. La suspension cellulaire est distribuée par fraction à 1 mL dans des micro-tubes stériles. Les micro-tubes contenant les suspensions cellulaires de *P. putida* DSMZ 8368 dans du glycérol sont stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

Le stock du consortium Pyr01 est préparé à partir d'une culture arrêtée en phase exponentielle de croissance fournie par le Dr. P. Poupin (LIEBE). Un volume de la solution stérile « glycerol freezing » égal à celui de la culture est ajouté dans des fioles. La composition de la solution « glycerol freezing » est la suivante (pour 50 mL) :

Glycérol 100%	32,5 mL
MgSO <sub>4</sub>	0,1 M
Tris	25 mM
pH = 8	

Les suspensions cellulaires du consortium Pyr01 dans la solution de stockage sont distribuées par quantités de 1 mL dans des micro-tubes stériles, qui sont ensuite stockées à -80 °C.

#### **4. Conditions de culture de *P. putida* DSMZ 8368**

Les cultures de *P. putida* DSMZ 8368 ont été réalisées dans des fioles d'Erlenmeyer chicanées de 250 mL, contenant 60 mL de milieu MMB №457 (Yamamoto *et al.*, 1998) stérilisé préalablement à l'autoclave pendant 20 mn à 121 °C. Le glucose (50 g/L) ou le phénanthrène (50 mg/L) est utilisé comme source de carbone pour la pré-culture et la culture, respectivement. Les cultures sontensemencées de telle sorte que la D.O.<sub>600nm</sub> initiale soit égale à environ 0,1, puis installées sur une table d'agitation (200 rpm) thermostatée (28 °C). La croissance a été suivie par mesure de la D.O.<sub>600nm</sub> à l'aide d'un spectrophotomètre (Hitachi U-2000).

Pour les études sur la dégradation du phénanthrène en présence des tensioactifs, le phénanthrène et les tensioactifs sont ajoutés stérilement dans le milieu de culture avant l'ensemencement. Les fioles sans les bactéries sont placées sur la table d'agitation à 28 °C, à 200 rpm pendant 24 h afin de mieux solubiliser le phénanthrène. Ensuite les fioles sontensemencées comme expliqué ci-dessus.

#### **5. Conditions de culture du consortium Pyr01**

Les cultures du consortium Pyr01 ont été réalisées dans des fioles d'Erlenmeyer chicanées de 250 mL, contenant 60 mL de milieu HAP ou MMB №457 stérilisées préalablement à l'autoclave pendant 20 mn à 121°C. Le phénanthrène (50 mg/L) est utilisé comme source de carbone. Les fioles sont installées sur une table d'agitation (200 rpm) thermostatée (28 °C). La D.O.<sub>600nm</sub> initiale est égale à environ 0,02. La croissance a été suivie par mesure de la D.O.<sub>600nm</sub> à l'aide d'un spectrophotomètre (Hitachi U-2000).

#### **6. Détermination du poids sec de *P. putida* DSMZ 8368**

Les cultures de *P. putida* DSMZ 8368 ont été réalisées dans des fioles d'Erlenmeyer, contenant 60 mL de milieu MMB №457 avec le phénanthrène (50 mg/L) comme source de carbone. Un volume de 10 mL a prélevé plusieurs fois au cours des cultures, la valeur de la D.O.<sub>600nm</sub> de ces échantillons a été mesurée. Les prélèvements ont été filtrés (filtre Millipore, Ø=0,22 µm, séchés à 105 °C et dont le poids a été mesuré avant la filtration) et séchés sur les filtres à 105 °C pendant 24 h. La différence entre le

poids des filtres séchés après et avant la filtration des échantillons correspond au poids sec des bactéries. Ainsi, la corrélation entre la D.O.<sub>600nm</sub> et le poids sec permet de calculer le coefficient du rapport poids sec/ D.O.<sub>600nm</sub> pour *P. putida* DSMZ 8368.

## 7. Extraction du phénanthrène et de ses catabolites

Pour extraire le phénanthrène et ses catabolites du milieu de culture, les échantillons correspondants ont été mélangés avec de l'acétonitrile pur (qualité HPLC) dans des tubes en verre. Ils ont été agités vigoureusement en vortexant afin de bien les homogénéiser et de permettre la solubilisation des HAP. La solution obtenue a été filtrée (filtre Millipore, Ø=0,22 µm) afin d'éliminer les bactéries de l'extrait et ensuite analysée sur l'HPLC ou stockée à -20 °C avant d'être analysée.

## 8. Identification du phénanthrène et de ses catabolites par LC-MS

L'identification du phénanthrène et de ses catabolites a été faite par LC-MS (Thermo scientific LTQ Orbitrap XL, San Jose, CA, USA) en mode « electrospray ionization » (ESI) négative. Les données ont été traitées en utilisant le logiciel Xcalibur 2.1. Les paramètres opérationnels ont été les suivants :

Tension de pulvérisation	5 kV
Température du capillaire chauffé	300 °C
Débit de gaz de gainage	40 unités arbitraires min <sup>-1</sup>
Débit de gaz auxiliaire	10 unités arbitraires min <sup>-1</sup>
Débit de gaz de balaillage	10 unités arbitraires min <sup>-1</sup>
Tension capillaire	22 V
Lentille de tube	-52 V

Tous les paramètres ont été optimisés en utilisant le standard de 1H2Na dans une phase mobile eau MilliQ avec HCOOH (0,1 %) / acétonitrile pur (50/50) avec le débit de 0,2 mL min<sup>-1</sup>. L'optimisation des paramètres a été faite en utilisant le 1H2Na car les autres HAP étudiés répondaient de manière similaire. Les standards de phénanthrène et de ces métabolites ont été préparés dans de l'acétonitrile pur (qualité HPLC, Carlo Erba, France). La colonne utilisée a été une colonne Vydac 201TP5215, 0.21 cm x 15 cm (Grace, Etats-Unis). Le volume d'injection a été de 1 à 10 µL. Le choix des phases mobiles a été fait de telle sorte que les molécules analysées donnent la meilleure réponse en mode ESI négative. Généralement les ions sont vus en forme déprotonée [M-H]<sup>-</sup>. Un détecteur UV (Shimadzu) a été utilisé.

Les molécules inconnues ont été déterminées en utilisant l'analyse « full scan » (50 → 500  $m/z$ ). Les molécules standards des PAH ont été analysées en SIM (Single Ion Monitoring) pour le catéchol et le 2-naphtol et en SRM (Single Reaction monitoring) pour l'acide phtalique, le protocatéchol, l'acide salicylique et le 1H2Na. Le phénanthrène ne donnait pas de réponse en analyse de masse et a été analysé en utilisant le détecteur UV.

## 9. Dosage du phénanthrène et de ses catabolites par HPLC

L'analyse quantitative du phénanthrène et de ses catabolites a été faite par HPLC (Shimadzu LC-20 AD). La colonne utilisée a été une colonne Vydac 201TP5215, 0.21 cm x 15 cm. Le volume d'injection est de 1  $\mu$ L. Le débit a été de 0,2 mL/min avec deux phases mobiles : la phase A est de l'eau acidifiée à pH 2 par H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (38 % v/v, Carlo Erba) ; la phase B est de l'acétonitrile pur. La pression de travail a été d'environ 750 psi. Le gradient a été le suivant :

0 min – 1 min – 70 % de la phase A et 30 % de la phase B ;

1 min – 11 min – 30 à 95 % de la phase B et 70 à 5 % de la phase A ;

11 min – 26 min – 95 % de la phase B and 5 % de la phase A ;

26 min – 27 min – 95 % à 30 % de la phase B et 5 à 70 % de la phase A ;

27 min – 42 min – 70 % de la phase A et 30 % de la phase B.

Les longueurs d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) et d'émission ( $\lambda_{em}$ ) du phénanthrène, du 1H2Na et de l'acide salicylique sont : phénanthrène -  $\lambda_{ex}$  248 nm,  $\lambda_{em}$  365 nm ; 1H2Na -  $\lambda_{ex}$  310 nm,  $\lambda_{em}$  410 nm ; acide salicylique -  $\lambda_{ex}$  297 nm,  $\lambda_{em}$  407 nm. Deux détecteurs ont été utilisés : le détecteur à fluorescence (Varian) et le détecteur UV (Shimadzu).

## 10. Nettoyage de la colonne et du circuit analytique

En absence de résolution des pics ou en cas de forte augmentation de pression il est nécessaire de régénérer la colonne analytique afin d'éliminer des molécules organiques fortement adsorbées à la phase stationnaire ou accumulées en tête de colonne. Le principe de la régénération consiste à inverser la colonne, remplacer la pré-colonne et laver la colonne à l'aide d'un solvant très apolaire, le chloroforme. La procédure de régénération d'une colonne Vydac 201TP5215 est la suivante :

1. Remplacer la pré-colonne et inverser la colonne pour faire circuler la phase mobile de la sortie vers l'entrée de la colonne et ainsi éliminer des molécules adsorbées en tête de colonne. La pré-colonne est placée avant la colonne afin de protéger celle-ci au cours du lavage.

2. Purger les voies de l'acétonitrile, de l'eau ultrapure et du chloroforme pendant 30 min à 10 mL/min, en veillant de ne pas mélanger le chloroforme et l'eau, car ils ne sont pas miscibles.
3. Appliquer le programme de régénération suivant :

Temps, min	Débit, mL/min	Acétonitrile	Eau	Chloroforme
0	0,1	50	50	0
15	0,1	50	50	0
16	0,2	100	0	0
76	0,2	100	0	0
86	0,2	20	0	80
146	0,2	20	0	80
156	0,2	100	0	0
216	0,2	100	0	0
217	0,2	50	50	0
247	0,2	50	50	0
248	0	50	50	0

4. Replacer la colonne à l'endroit et appliquer le programme suivant :

Temps, min	Débit, mL/min	Acétonitrile	Eau	Chloroforme
0	0,1	50	50	0
15	0,1	50	50	0
16	0,2	50	50	0
46	0,2	50	50	0
47	0	50	50	0

## 11. Toxicité des tensioactifs

Pour évaluer la toxicité des tensioactifs sur *P. putida* DSMZ 8368, plusieurs cultures de cette souche, provenant de la même pré-culture, ont été effectuées en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml, en présence et en absence de tensioactifs. La croissance des bactéries a été suivie par mesure de D.O.<sub>600nm</sub> et les vitesses spécifiques de croissance ont été comparées. A partir de la différence entre la vitesse

spécifique de croissance de *P. putida* DSMZ 8368 dans une fiole contenant une concentration donnée du tensioactif et celle dans une fiole sans tensioactif, l'effet toxique sur les bactéries a été estimé. Il a été considéré que les tensioactifs étaient toxiques pour *P. putida* DSMZ 8368 si la différence entre les vitesses spécifiques de croissance était supérieure à  $0,1 \text{ h}^{-1}$ .

Les caractéristiques des tensioactifs choisis (le Tween 80, le Brij 30, l' SDS et les rhamnolipides), telles que le poids moléculaire, la formule chimique et la structure sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Caractéristiques des tensioactifs

Tensioactif	Formule moléculaire	Structure moléculaire	MW
Tween 80	Poly(oxyéthylène)20 sorbitan monooléate	$C_{64}H_{125}O_{26}$	1309
Brij 30	Poly(oxyéthylène)4 lauryl ester	$(C_2H_4O)_4C_{12}H_{26}O$	363
SDS	Sodium dodécyl sulfate	$C_{12}H_{25}OSO_3Na$	288
Rhamnolipides JBR 204	Monorhamnolipide ( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxydécanoyl- $\beta$ -hydroxydécanoate) Dirhamnolipide (2-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxydécanoyl- $\beta$ -hydroxydécanoate)	$C_{26}H_{48}O_9$          $C_{32}H_{58}O_{13}$	504          650

## 12. CMC des tensioactifs

La CMC des tensioactifs a été déterminée à l'aide du tensiomètre Krüss K12 (méthode de la lame Wilhelmy) à  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=7$ . La méthode utilisée est décrite par Rodriguez Nino et Rodriguez Patino (1998). Une lame en platine est plongée dans le cristalliseur du tensiomètre contenant la solution du tensioactif jusqu'au moment où elle touche la surface de celle-ci. La force nécessaire pour retirer la lame de la solution de tensioactif représente la tension superficielle exprimée en mN/m. Dix mesures indépendantes ont été obtenues pour chaque point. Les mesures de la tension superficielle effectuées

permettent ainsi de tracer l'évolution de la tension superficielle en fonction du logarithme décimal de la concentration du tensioactif. La rupture de pente de la courbe donne la valeur de la CMC (Fig. 17).

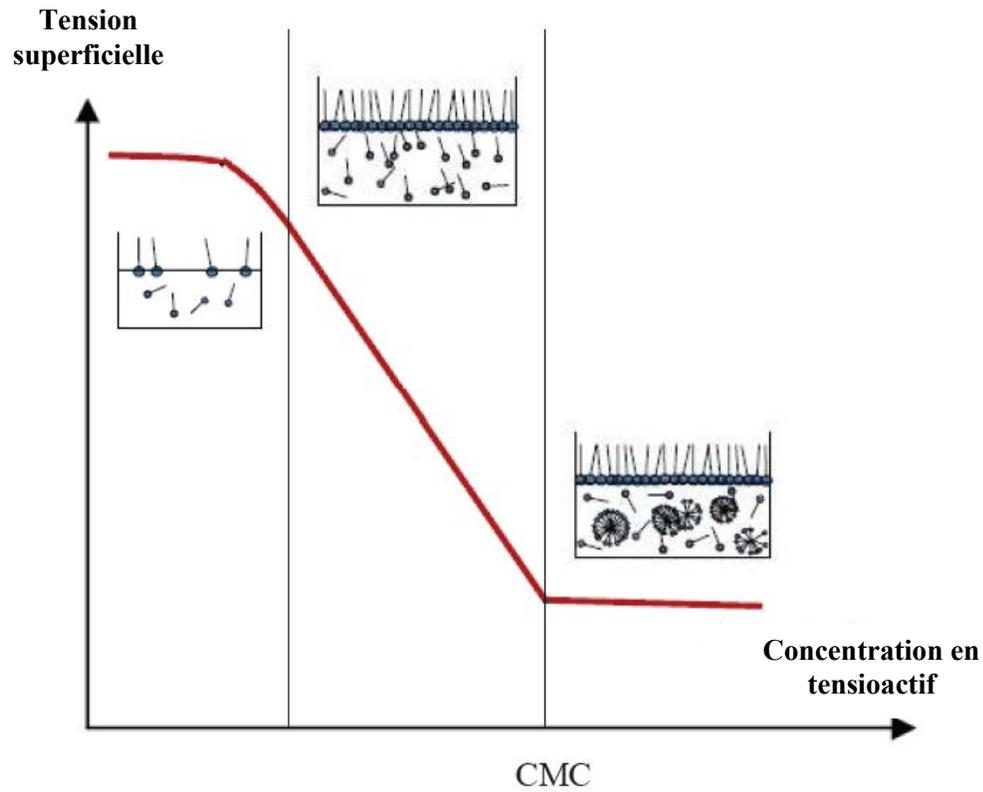


Figure 17. Détermination de la concentration micellaire critique par la méthode de la lame de Wilhelmy.

### 13. WSR des tensioactifs

Afin de déterminer le « Weight Solubilization Ratio » (WSR) ou le Rapport Massique de Solubilisation des agents tensioactifs, qui représente la mesure d'efficacité d'un tensioactif à solubiliser un composé donné (Swe *et al.*, 2006), 100 mL des suspensions de phénanthrène ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) dans de l'eau distillée ont été préparés. Les tensioactifs ont été rajoutés dans ces suspensions de telle sorte que leurs concentrations s'accroissent de  $0,05$  à  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Les suspensions obtenues ont été placées sur une table d'agitation à  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , à  $200 \text{ rpm}$  pendant  $24 \text{ h}$ . Trois échantillons ont été réalisés pour chaque concentration de chaque tensioactif toutes les  $2 \text{ h}$  au cours de  $24 \text{ h}$  et analysés ensuite par HPLC. La détermination des concentrations finales en phénanthrène soluble en fonction des concentrations en tensioactifs permet de calculer le WSR.

#### **14. Dispersion mécanique du phénanthrène**

Afin d'améliorer la dissolution du phénanthrène et de diminuer la taille de ses particules solides pour obtenir une surface de contact plus importante entre les bactéries et le phénanthrène, la dispersion mécanique a été effectuée. La dispersion a été réalisée à l'aide de l'homogénéiseur Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Allemagne) à 8000, 9500 et 11000 rpm pendant 5 min et à l'aide de la presse de French (Conctant Systems Ltd, Royaume-Uni) à 1000, 1250, 1500, 1750 and 2000 bar.

#### **15. Microscopie**

L'analyse des particules en suspension a été réalisée par analyse optique en utilisant le microscope à fluorescence Leica (Leitz DMRB). Des analyses complémentaires ont été effectuées en utilisant le microscope électronique à balayage (MEB) Jeol T 330A. Avant l'analyse par le MEB, les échantillons sont métallisés sous vide : ils sont recouverts d'un mince film d'or et de titane de 30 à 40 nm d'épaisseur afin de permettre l'observation sur le MEB, qui analyse l'émission des électrons secondaires après excitation de l'échantillon.

#### **16. Analyse d'images**

La taille des particules du phénanthrène est mesurée à l'aide d'une cellule de Thoma et du logiciel d'analyse d'images ImageJ élaboré par les Instituts Nationaux de Santé (Etats-Unis). Les particules ayant la taille d'un pixel sont considérées comme bruit de fond et ne sont pas prises en compte dans les calculs ultérieurs. Le facteur de circularité des particules du phénanthrène a été calculé automatiquement par le logiciel ImageJ au cours de l'analyse d'images.

#### **17. Calcul des paramètres cinétiques**

Les valeurs des dosages expérimentaux sont lissées et interpolées à l'aide du logiciel Kypplot (KyensLa Inc., Japon). Les vitesses spécifiques instantanées sont calculées à partir des valeurs lissées en utilisant un pas de 1 h. Le détail des calculs de paramètres cinétiques défini ci-après s'applique pour des cultures de cellules réalisées en mode discontinu.

La vitesse spécifique de croissance ( $\mu$ ) de la biomasse X au cours du temps t est définie par :

$$\mu = dX/dt$$

Les vitesses spécifiques de consommation ( $v$ ) et de production ( $\pi$ ) sont définies par :

$$v = - (1/X_v)(dS/dt)$$

et

$$\pi = (1/X_p)(dP/dt).$$

Les rendements de produit généré par rapport au substrat,  $Y_{P/S}$  sont calculés selon la formule suivante :

$$Y_{P/S} = (P_i - P_{i-1})/(S_{i-1} - S_i).$$

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **CHAPITRE 1 :**

**Étude de la dispersion, de la solubilisation et du traitement thermique  
du phénanthrène. Biodégradation du phénanthrène  
par *Pseudomonas putida* DSMZ 8368**

## Introduction

i). Dans la première partie de ce chapitre l'adsorption du phénanthrène dans les conditions de culture et de préparation des échantillons avant analyse a été déterminée. En effet, les HAP sont généralement peu solubles dans l'eau et ont tendance à s'adsorber sur les surfaces solides.

ii). Par la suite on s'est intéressé à l'augmentation de la solubilité du phénanthrène. En effet, la solubilité aqueuse des HAP est un facteur limitant leur biodisponibilité. Afin d'augmenter la solubilité des HAP, des solvants peuvent être utilisés. Cependant, pour des raisons économiques cette approche n'est pas applicable à des eaux faiblement chargées en HAP (cas du travail présent). Ainsi des techniques alternatives ont été choisies afin d'augmenter la biodisponibilité du phénanthrène : la dispersion mécanique, l'utilisation d'agents tensioactifs et le traitement thermique. La seconde partie concerne donc la dispersion mécanique des particules du phénanthrène. Dans cette partie une attention spéciale est consacrée à l'effet de la dispersion sur la solubilité du phénanthrène, ainsi que sur la morphologie de ses particules.

iii). Les résultats de l'étude de l'ajout de sulfate d'ammonium sur la croissance de *P. putida* DSMZ 8368 sont présentés dans la troisième partie de ce chapitre. Cette étude avait pour objectif d'améliorer la croissance cellulaire afin d'obtenir davantage d'agent biologique pour la biodégradation ultérieure plus intense du phénanthrène.

iv). La quatrième partie de ce chapitre est présentée sous forme d'une publication parue dans « Chemosphere ». Dans cette étude quatre tensioactifs (Tween 80, Brij 30, SDS et rhamnolipides) ont été choisis en fonction de leurs caractéristiques décrites dans la littérature, telles que leur efficacité envers certains HAP et leur biocompatibilité (Deschenes *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 1997 ; Christophi et Ivshina, 2002 ; Jin *et al.*, 2007). Pour rendre la biodégradation possible, ces tensioactifs ne doivent pas être toxiques pour le microorganisme utilisé. C'est pourquoi leur toxicité vis-à-vis de *P. putida* DSMZ 8368 a été d'abord vérifiée. La CMC peut être influencée par la présence des électrolytes dans le milieu (Gunnarsson *et al.*, 1980). Pour cette raison les CMC de ces tensioactifs ont été déterminées dans l'eau et dans le milieu de culture. Les essais sur la dissolution du phénanthrène en présence de tensioactifs ont été réalisés par la suite afin de choisir le tensioactif le plus approprié aux futures biodégradations.

En ce que concerne la dispersion mécanique des particules du phénanthrène, la répartition des tailles de ces particules a été également étudiée dans cet article. L'effet du traitement thermique sur la solubilité du phénanthrène y est aussi décrit. Finalement, l'effet de la solubilisation, de la dispersion et du traitement thermique du phénanthrène sur sa biodégradation par *P. putida* DSMZ 8368 y est présenté.

### **1. Adsorption du phénanthrène sur les surfaces des matériaux**

Sachant que les HAP sont hydrophobes et peuvent s'adsorber sur les surfaces solides, un bilan de matière a été calculé afin d'estimer les pertes du phénanthrène dans les conditions de culture et de préparation des échantillons avant analyse. Ainsi, au cours des expériences sur la détermination de la solubilité du phénanthrène et aux cours des cultures, les parois des récipients en verre (flacons ou fioles) ont été en contact avec le phénanthrène. Le phénanthrène a également été en contact avec les surfaces en métal aux cours des essais sur la dispersion mécanique par l'Ultra-Turrax et par la presse de French. Finalement, le phénanthrène pouvait aussi être retenu sur les filtres Millipore<sup>®</sup> en cellulose régénérée (0,20 µm) utilisés pour éliminer les bactéries du milieu de culture avant l'analyse des échantillons par la CLHP. Il a été donc décidé de déterminer l'adsorption du phénanthrène sur le verre (fioles en présence et en absence d'un tensioactif, sur l'exemple du Brij 30), sur le métal (Ultra-Turrax) et sur la cellulose régénérée (filtres Millipore<sup>®</sup>).

Le schéma du dispositif utilisé afin d'établir le bilan de matière au cours de la solubilisation et de la dispersion mécanique du phénanthrène par l'Ultra-Turrax dans l'eau distillée à 28 °C en présence de Brij 30 (0,65 g/L) est présenté sur la figure 18. Une analyse de la concentration en phénanthrène a été effectuée après extraction à l'acétonitrile sur chaque compartiment considéré.

### Phénanthrène dans le milieu :

Initialement ajouté en solution :  $Q_{\text{initial}} = 10 \text{ mg}$

Sur les parois de l'Ultra-Turrax  $Q_{\text{UT}} = c_{\text{UT}} \cdot V_{\text{UT}}$

Soluble : dissous dans l'eau  $Q_{\text{sol}} = c_{\text{sol}} \cdot V_{\text{sol}}$

Insoluble  $Q_{\text{insol}} = c_{\text{insol}} \cdot V_{\text{insol}}$

Pertes  $Q_{\text{pertes}}$

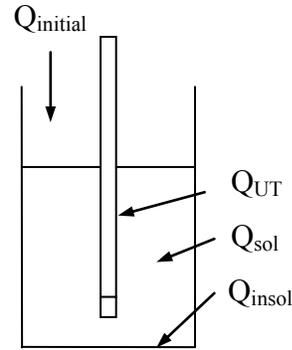


Figure 18. Dispositif et variables utilisés afin d'établir le bilan de phénanthrène au cours de la solubilisation et de la dispersion mécanique du phénanthrène par l'Ultra-Turrax dans l'eau distillée à 28 °C en présence de Brij 30. Q – quantité du phénanthrène, c – concentration en phénanthrène, V – volume d'acétonitrile utilisé pour l'extraction.

Le bilan de matière a ensuite été établi :

$$Q_{\text{initial}} = Q_{\text{insol}} + Q_{\text{UT}} + Q_{\text{sol}} + Q_{\text{pertes}}$$

Les pertes du phénanthrène sont déterminées de façon suivante :

$$Q_{\text{pertes}} = Q_{\text{initial}} - Q_{\text{insol}} - Q_{\text{UT}} - Q_{\text{sol}}$$

$$Q_{\text{pertes}} = 10 \text{ mg} - 60,2 \text{ mg/L} \cdot 0,10 \text{ L} - 16,1 \text{ mg/L} \cdot 0,02 \text{ L} - 34,7 \text{ mg/L} \cdot 0,10 \text{ L}$$

$$Q_{\text{pertes}} = 0,19 \text{ mg}$$

Ainsi :

$$Q_{\text{insol}} = 60,2 \% \quad Q_{\text{sol}} = 34,7 \%$$

$$Q_{\text{UT}} = 3,2 \% \quad Q_{\text{pertes}} = 1,9 \%$$

Ces chiffres montrent donc que les pertes dans le système utilisé pour la solubilisation et la dispersion mécanique du phénanthrène par l'Ultra-Turrax en présence de Brij 30 étaient négligeables. En ce qui concerne l'adsorption du phénanthrène sur l'Ultra-Turrax, environ 3 % du phénanthrène initialement ajouté en solution a été observé sur la partie immergée de l'appareil. Les expériences complémentaires ont montré qu'en présence de Brij 30 (0,5 g/L) l'adsorption du phénanthrène sur le verre était moins importante qu'en son absence : 0,002 mg (valeur proche de la limite de détection) contre 0,03 mg du phénanthrène adsorbé, respectivement, sur 3 mg initialement ajouté, soit 0,07 % contre 1 %.

Afin de déterminer l'adsorption du phénanthrène sur les filtres Millipore® (0,20 µm), un échantillon standard du phénanthrène dont la concentration a été déterminée antérieurement a été filtré sur trois filtres différents. La concentration du phénanthrène dans les filtrats a été comparée à celle de l'échantillon standard avant la filtration. Les résultats correspondants sont présentés dans le tableau 5. Il a été ainsi déterminé que l'adsorption du phénanthrène sur les filtres était négligeable.

Tableau 5. Concentration en phénanthrène dans l'acétonitrile d'un échantillon standard avant après filtration sur les filtres Millipore® (0,20 µm) en cellulose régénérée.

<b>Echantillon du phénanthrène dans l'acétonitrile</b>	<b>Concentration en phénanthrène mesurée, mg/L</b>
Echantillon standard	25,0
Filtrat 1	24,9
Filtrat 2	25,0
Filtrat 3	24,9

Suite à ces résultats, l'adsorption du phénanthrène dans les conditions de culture et de préparation des échantillons avant analyse (sur le verre, le métal et les filtres Millipore®) a été considérée comme négligeables.

## **2. Dispersion mécanique du phénanthrène : microscopie**

Une des techniques utilisées dans ce travail pour améliorer la dissolution et la biodégradation du phénanthrène est la dispersion mécanique. En effet, la vitesse de la dissolution d'un cristal de HAP dépend de sa surface : en augmentant la surface d'échange on peut améliorer le transfert de matière. Ainsi, Volkering *et al.* (1992) ont réussi à augmenter la vitesse du transfert de matière en utilisant les particules du naphthalène de plus petite taille. En ce que concerne le phénanthrène, il a été montré que les bactéries consommaient exclusivement le phénanthrène soluble (Wodzinski et Coyle, 1974) et que leur vitesse de croissance dépendait de la dissolution de ce HAP (Wodzinski et Johnson, 1968). D'autres auteurs affirment que les microorganismes sont capables de s'attacher aux particules solides du phénanthrène (Kiyohara *et al.*, 1982 ; Guerin et Jones, 1988). L'obtention d'un plus grand nombre de petites particules du phénanthrène suite à la dispersion mécanique pourrait donc fournir une surface de contact plus importante et probablement favoriser la biodégradation.

Des essais de dispersion des cristaux de phénanthrène (15 mg/L) dans de l'eau distillée en présence et en absence de Brij 30 ont été faits à l'aide d'un Ultra-Turrax et de la presse de French. Tout d'abord, l'effet de la dispersion sur la solubilité du phénanthrène a été déterminé (tableau 6). Ainsi, la dispersion mécanique par l'Ultra-Turrax n'avait pas d'influence significative sur la solubilité du phénanthrène en présence et en absence de Brij 30. Dans le cas de la presse de French, on a obtenu une augmentation de la solubilité du phénanthrène d'environ 67 % après la dispersion en absence de tensioactif :  $2,5 \pm 0,3$  contre  $1,5 \pm 0,1$  mg/L sans dispersion. Cependant, cette solubilité reste peu importante. La dispersion mécanique par la presse de French en présence de Brij 30 a augmenté la solubilité du phénanthrène de  $18 \pm 2$  à  $21 \pm 2$  mg/L. Néanmoins, en général la dispersion mécanique par l'Ultra-Turrax et la presse de French avait une influence relativement faible sur la solubilité du phénanthrène en présence et en absence de Brij 30.

Tableau 6. Effet de la dispersion mécanique sur la solubilité du phénanthrène.

	<b>Sans dispersion</b>	<b>Ultra-Turrax</b>	<b>Presse de French</b>
Sans Brij 30	$1,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,3$
Avec Brij 30 (0,5 g/L)	$18 \pm 2$	$20 \pm 1$	$21 \pm 2$

Les valeurs présentées sont celles des concentrations en phénanthrène soluble (mg/L).

La morphologie des cristaux du phénanthrène a été ensuite observée en MEB et en microscopie optique. Quelques exemples d'électronographie (MEB) des cristaux du phénanthrène (15 mg/L) en présence et en absence de Brij 30 sont présentés sur les figures 19 et 20 pour la dispersion par l'Ultra-Turrax et par la presse de French, respectivement. Il faut noter que suite à la métallisation sous vide des échantillons nécessaire pour l'analyse par la MEB, il est impossible de distinguer les échantillons prélevés en présence de Brij 30 (30 mg/L) des ceux prélevés en absence de ce tensioactif.

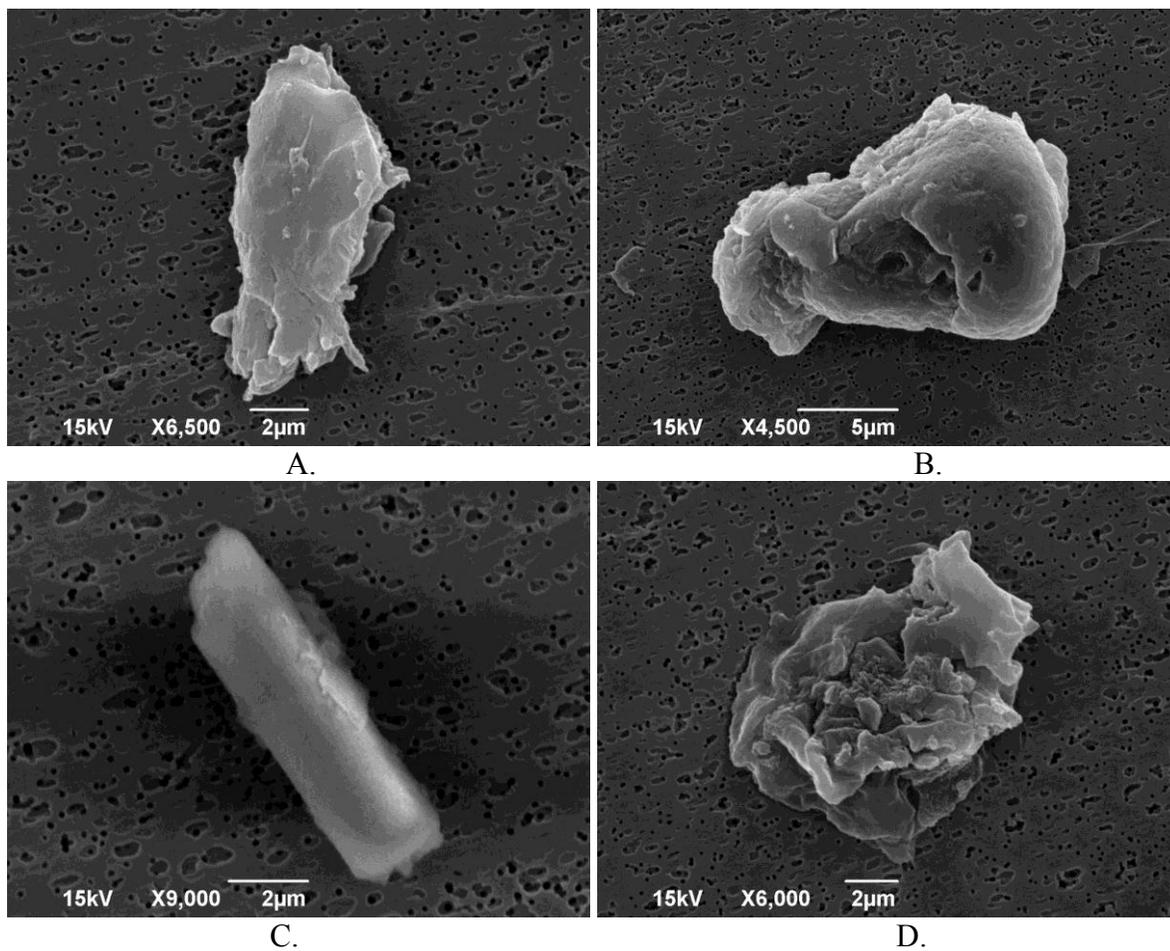


Figure 19. Electronographie (MEB) des cristaux du phénanthrène (15 mg/L) après la dispersion par l'Ultra-Turrax à 9500 rpm en présence (A, B) et en absence (C, D) de Brij 30 (30 mg/L).

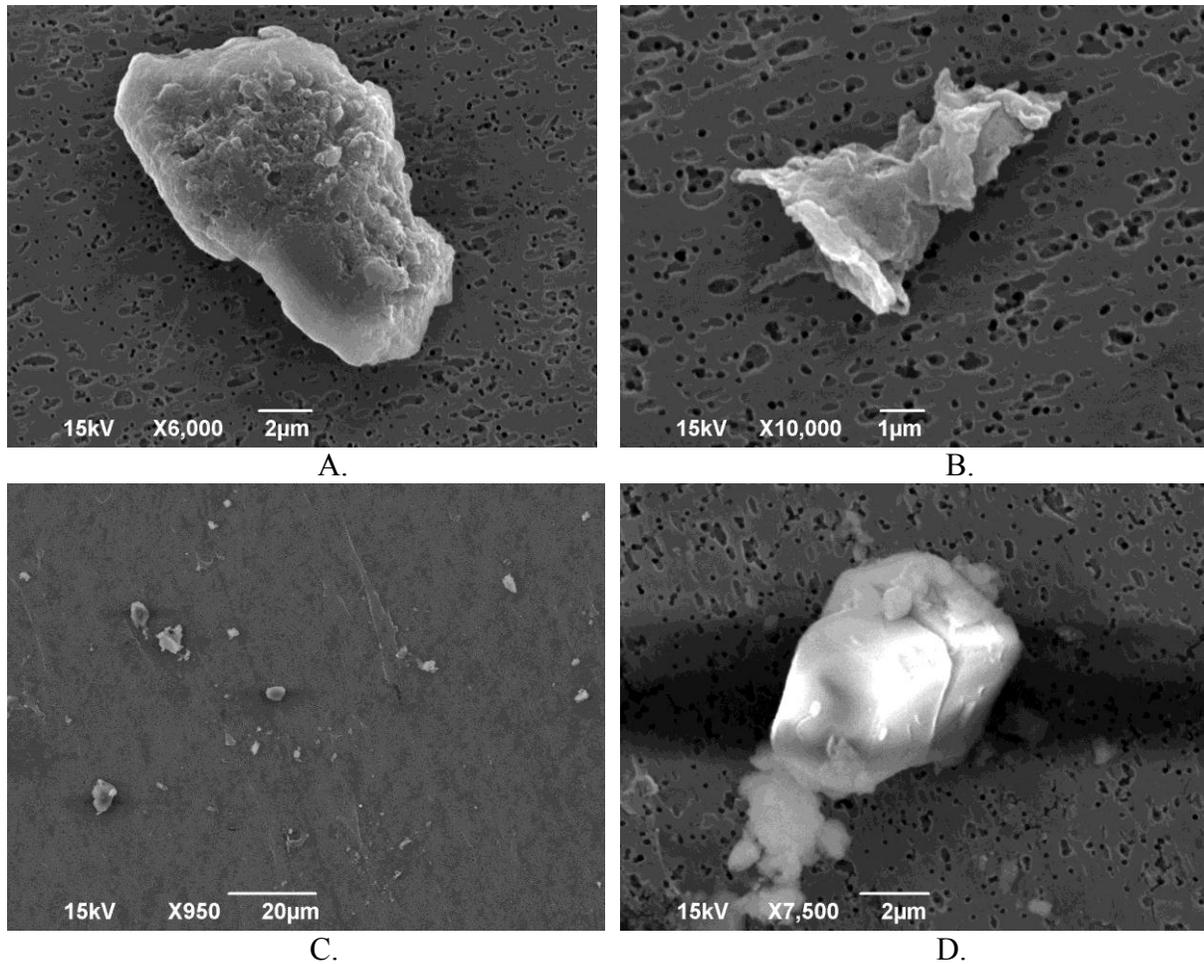


Figure 20. Electronographie (MEB) des cristaux du phénanthrène (15 mg/L) après la dispersion par la presse de French à 1500 bar en présence (A, B) et en absence (C, D) de Brij 30 (30 mg/L).

La microscopie optique nous a permis d'étudier les micelles du Brij 30, ainsi que les cristaux du phénanthrène en présence et en absence de Brij 30 avec ou sans dispersion mécanique. Les exemples de micrographie obtenue par microscopie optique sont présentés sur la figure 21.

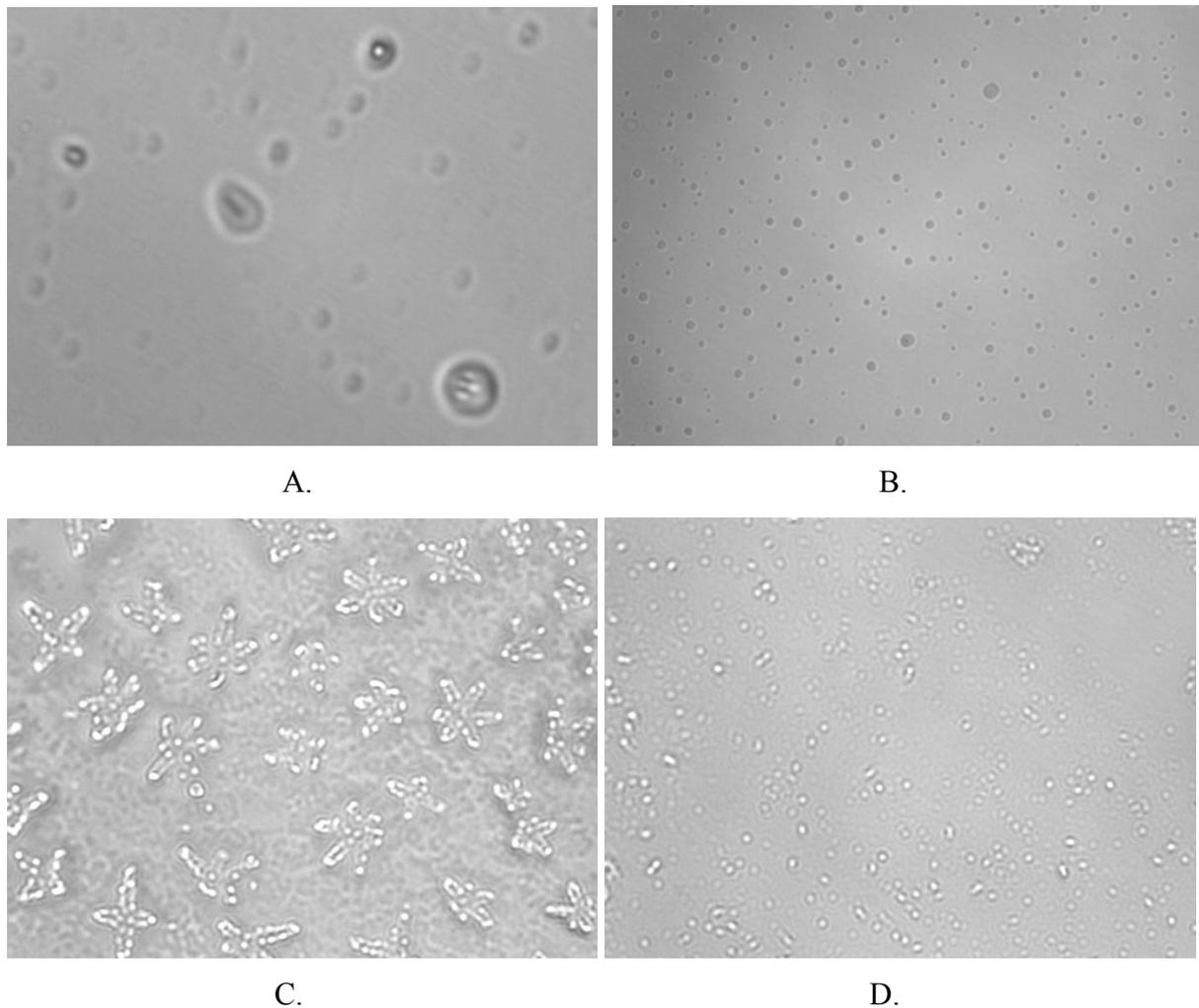
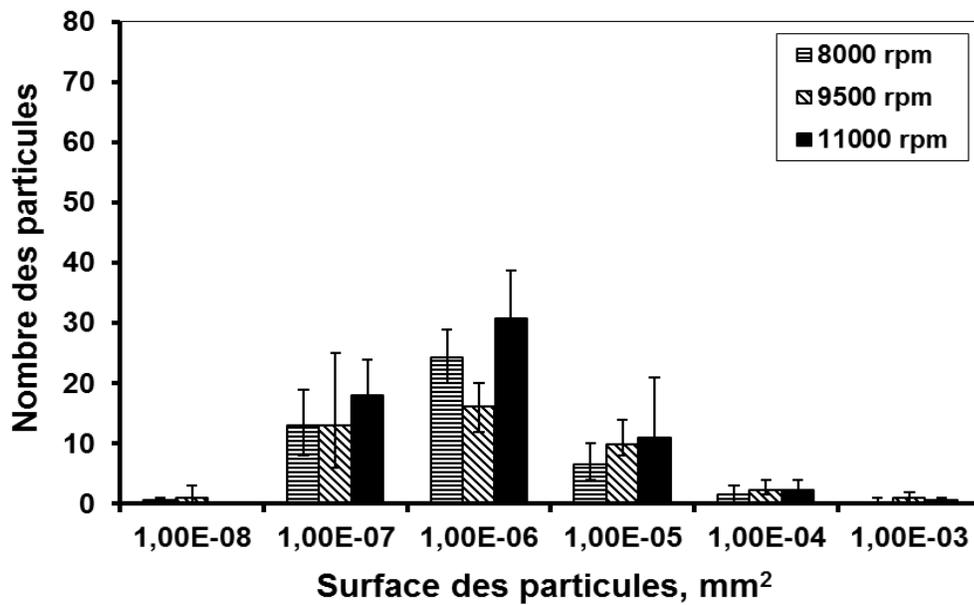


Figure 21. Micrographie obtenue par microscopie optique (X1000) des cristaux du phénanthrène (50 mg/L) solubilisés par le Brij 30 (30 mg/L) en solution aqueuse avant (A) et après (B) la dispersion par l'Ultra-Turrax à 9500 rpm ; micrographie des micelles du Brij 30 (200 mg/L) dans l'eau distillée (C, D).

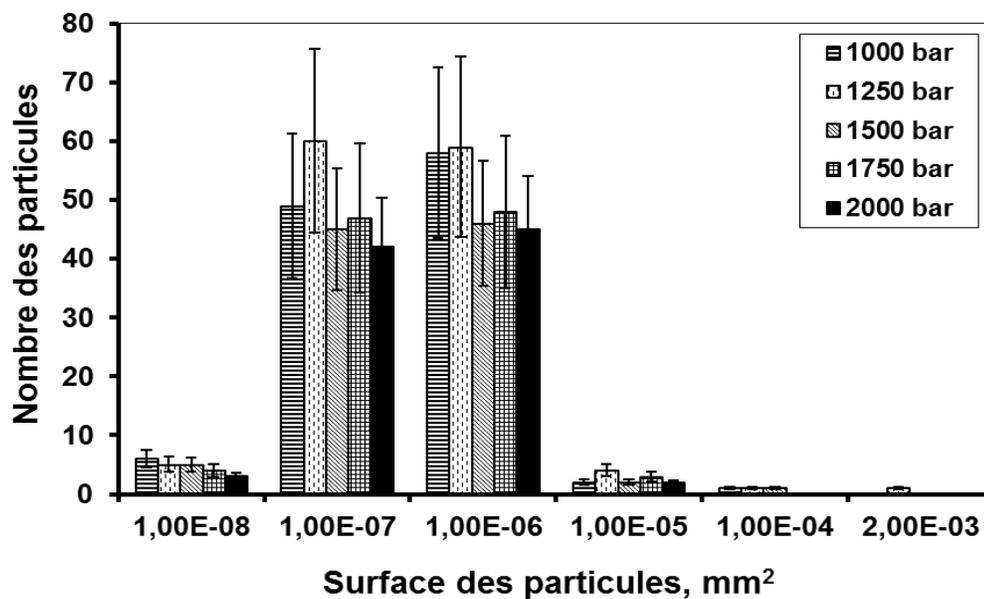
Il a été observé que le Brij 30 (200 mg/L) homogénéisé dans l'eau distillée forme deux types de structure : des structures ramifiées (Figure 21C) et des micelles libres (Figure 21D). Quand ce tensioactif est utilisé pour augmenter la solubilité du phénanthrène dans l'eau sans appliquer une dispersion (Figure 21A), la présence des cristaux du phénanthrène de tailles très différentes est observée. Après la dispersion par l'Ultra-Turrax (Figure 21B) une meilleure homogénéité de l'échantillon est obtenue.

La répartition des particules de phénanthrène (15 mg/L) par taille dans un échantillon homogénéisé à l'aide de l'Ultra-Turrax et de la presse de French en présence du Brij 30 (30 mg/L) est présentée sur la figure 22.

L'homogénéisation par la presse de French permet d'obtenir le doublement du nombre de particules ainsi qu'une diminution de leur taille par rapport à utilisation de l'Ultra-Turrax. La description détaillée de l'effet de la dispersion mécanique sur la répartition des particules de phénanthrène (15 mg/L) par taille sera abordée dans le paragraphe 4 de ce chapitre.



A.

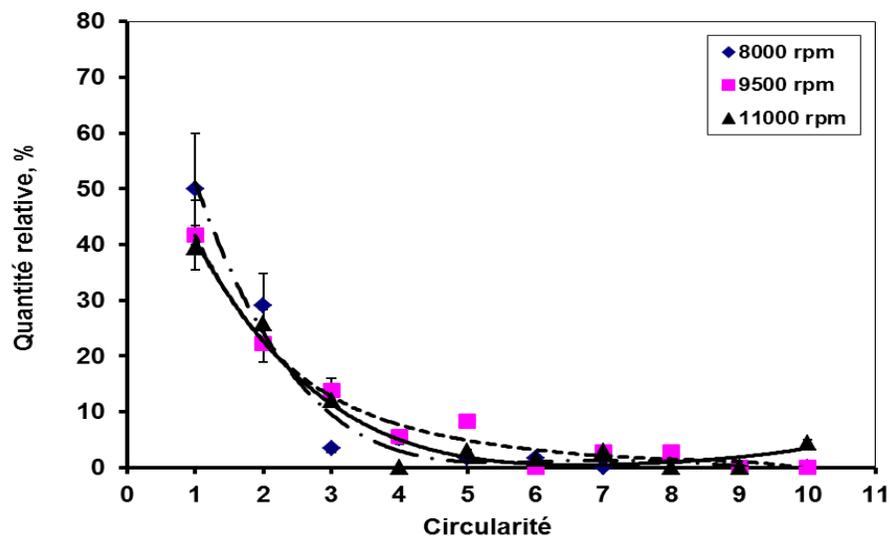


B.

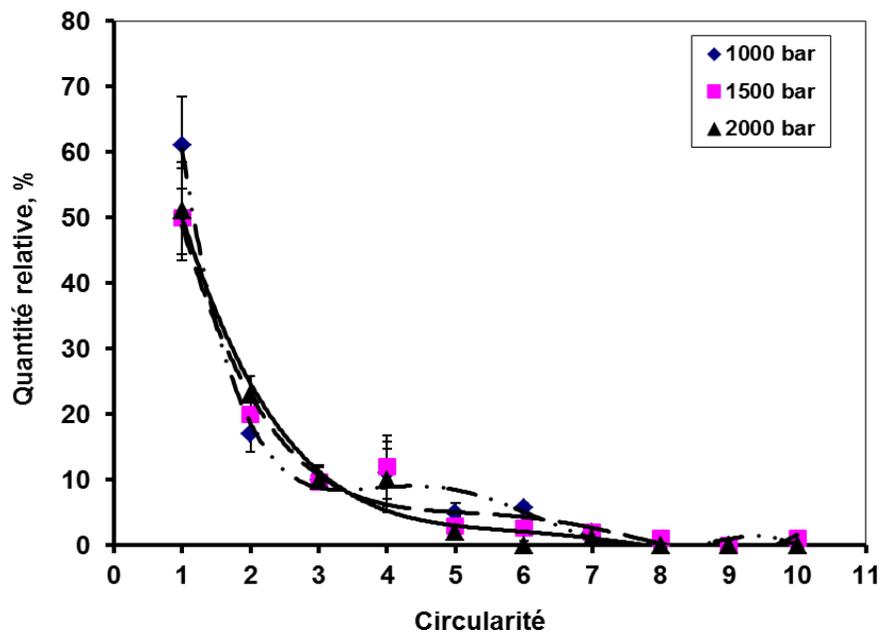
Figure 22. Répartition des tailles de particules de phénanthrène : A. Après dispersion par l'Ultra-Turrax (8000, 9500 et 11000 rpm) ; B. Après dispersion par la presse de French (1000, 1250, 1500, 1750 et 2000 bar).

On peut supposer que les particules sphériques (facteur de circularité égal à 1) observées en microscopie optique dans les échantillons du phénanthrène en présence du Brij 30 (30 mg/L) sont des micelles contenant le phénanthrène solubilisé par ce tensioactif. L'influence de la vitesse et de la

pression de la dispersion sur la circularité des particules (déterminée par le logiciel d'analyse d'images ImageJ) a été donc étudiée (Fig. 23).



A.



B.

Figure 23. Variation du nombre de particules (%) en fonction de leur circularité après la dispersion : A. par l'Ultra-Turrax ; B. par la presse de French.

Le nombre de particules sphériques varie peu avec le changement de la vitesse et de la pression de dispersion. La dispersion par l'Ultra-Turrax permet d'obtenir de 40 à 50 % de particules sphériques en moyenne ( $\pm 10\%$ ) ; la presse de French : de 50 à 60 % de particules sphériques en moyenne ( $\pm 10\%$ ). Ainsi en supposant que les particules sphériques observées sont des micelles contenant le phénanthrène solubilisé par le Brij 30, en moyenne 50 % du phénanthrène solide du milieu est présent sous forme de micelles.

### 3. Effet de l'ajout de sulfate d'ammonium sur la croissance de *P. putida* DSMZ 8368

La concentration en sources d'azote et de carbone dans le milieu de culture affecte la croissance cellulaire ce qui peut modifier l'allure de la biodégradation des substrats. Dans le milieu MMB utilisé pour la culture de *P. putida* DSMZ 8368, l'azote est présent sous forme de sulfate d'ammonium et sa concentration initiale est de 0,5 g/L. Afin de vérifier si l'augmentation de cette concentration favorisait la croissance de *P. putida* DSMZ 8368, des cultures ont été réalisées sur milieu MMB contenant 0,5, 5, 10 et 15 g/L de sulfate d'ammonium. Les cinétiques de croissance correspondantes sont présentées sur la figure 24.

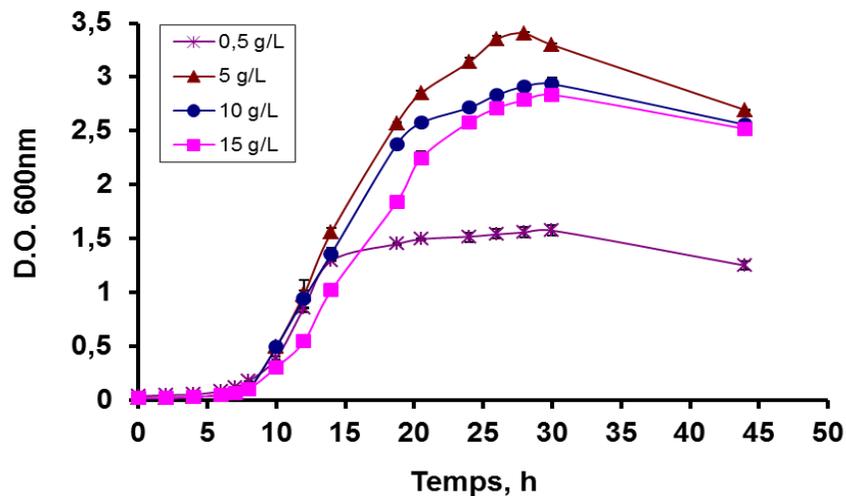


Figure 24. Evolution de la concentration en biomasse de *P. putida* DSMZ 8368 au cours du temps dans le milieu MMB contenant 0,5 ; 5 ; 10 et 15 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  avec le glucose (50 g/L) comme seule source de carbone.

Une phase de latence d'environ 10 h est présente en début de chacune des cultures effectuées. Puis, la concentration en biomasse de *P. putida* DSMZ 8368 augmente de façon très significative lorsque la concentration en sulfate d'ammonium est égale à 5 g/L par rapport à ce qu'elle est à 0,5 g/L. En

revanche, lorsque des concentrations en sulfate d'ammonium plus élevées (10 et 15 g/L) sont utilisées, aucune amélioration supplémentaire de la densité cellulaire finale n'a pu être mesurée. C'est la raison pour laquelle la concentration de 5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans le milieu de culture a été retenue pour les essais de biodégradation du phénanthrène. Ce milieu de culture était désigné comme milieu MMB supplémenté.

#### **4. Article publié :**

**“Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media”.**



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)

## Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media

T. Pantsyrnaya<sup>a,b</sup>, F. Blanchard<sup>a</sup>, S. Delaunay<sup>a</sup>, J.L. Goergen<sup>a</sup>, E. Guédon<sup>a</sup>, E. Guseva<sup>b</sup>, J. Boudrant<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Laboratoire Réactions et Génie des Procédés UPR CNRS 3349, Nancy-Université, ENSAIA, 2, avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France<sup>b</sup>Faculty of High Resource-Saving and Information Technologies, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, ul. Geroev Panfilovcev, 20, Moscow 123480, Russia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2010

Received in revised form 11 January 2011

Accepted 11 January 2011

#### Keywords:

Phenanthrene

Biodegradation

Surfactants

Dispersion

Heat treatment

### ABSTRACT

In the present study surfactant addition with the help of either a mechanical dispersion or a thermal treatment was applied in order to increase the solubility and the bioavailability of phenanthrene in aqueous media, and therefore to promote its biodegradation. Among four tested surfactants (Tween 80, Brij 30, sodium dodecyl sulphate and rhamnolipids), Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) showed the best results allowing us to attain about 20 mg L<sup>-1</sup> of soluble phenanthrene. An additional thermal treatment at 60 °C for 24 h, 200 rpm permitted to increase the solubility of phenanthrene in the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) to about 30 mg L<sup>-1</sup>. Higher dispersions of phenanthrene particles as well as the reduction of their size were obtained using Ultra-Turrax and French press. The biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas putida* was then investigated. The reduction of size of phenanthrene particles by mechanical dispersion did not influence its biodegradation, suggesting that *P. putida* consumed only soluble phenanthrene. The addition of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) permitted to obtain more phenanthrene metabolized. The use of Brij 30 coupled with a transitory heating of phenanthrene-containing medium at 60 °C led to an even more complete biodegradation. This might be a promising way to enhance biodegradation of PAHs.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

PAHs are organic molecules with two or more fused benzene rings. They are emitted as by-products of the combustion of organic materials that can be of natural origin such as forest fires and volcanic activity, or associated with human activities such as industrial gas, exhaust gas and waste incineration (Bamforth and Singleton, 2005). Many PAHs are toxic, mutagenic and carcinogenic. Therefore their elimination from the environment is of major importance. Their fate in the environment includes volatilization, photo-oxidation, chemical oxidation, adsorption on soil particles, leaching and microbial degradation (Wild and Jones, 1995). The use of microorganisms for the degradation of PAHs has a great potential. Indeed, high rates of degradation were demonstrated during the bioremediation via microorganisms extracted from sites polluted by PAH (Zahed et al., 2010). Rapid growth and metabolism and the capacity to adapt to different environments are the major factors that justify the utilization of microorganisms for biodegradation (Means et al., 1980; Chauhan et al., 2008). The bioremediation and its rate depend on the environmental conditions, the number and types of microorganisms, the nature and the chemical structure of the compound being degraded (Haritash

and Kaushik, 2009). Among bacteria capable to degrade PAHs, those belonging to *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* and *Rhodococcus* genera are usually cited (Chauhan et al., 2008; Haritash and Kaushik, 2009).

Since the solubility of most PAHs in aqueous media is generally low, which limits their microbial degradation, different methods can be used in order to increase PAH bioavailability. Organic solvents are frequently used to improve their solubility, but they are themselves toxic and not environmentally friendly. An alternative way to increase the bioavailability of PAHs is the addition of surfactants in concentrations superior to their critical micelle concentration (CMC). The CMC of a surfactant is the concentration at which its monomers begin to assemble to ordered colloidal aggregates or micelles. Under such conditions, the hydrophobic substances are incorporated in the surfactant micelles and this process is called solubilization. Many surfactants have been investigated for their possible use in facilitating the biodegradation of PAH. However, both enhanced and reduced effects of these compounds on biodegradation have been reported (Laha and Luthy, 1991; Avramova et al., 2008; Li and Chen, 2009; Zhao et al., 2009). Elevated temperatures are also known to increase the solubility and mass transfer rates of PAHs in aqueous solutions (Viamajala et al., 2007). For example, Feitkenhauer and Markl (2003) showed that a temperature increase from 20 to 75 °C resulted in a higher solubility of naphthalene. Finally, dispersion may represent another way to decrease mass transfer limitation

\* Corresponding author. Tel.: +33 383595860; fax: +33 383595804.  
E-mail address: [Joseph.Boudrant@ensaia.inpl-nancy.fr](mailto:Joseph.Boudrant@ensaia.inpl-nancy.fr) (J. Boudrant).

(Sikkema et al., 1995). Indeed, for compounds that are solid under normal cultivation conditions, the limiting step in the transfer is influenced by the size of the particles.

In this study phenanthrene was chosen as a model PAH. It is a three-ring low molecular weight PAH, listed as one of priority pollutants by US EPA (1997). We investigated the effect of surfactant addition, mechanical dispersion and thermal treatment on the solubility of phenanthrene in aqueous media and on its degradation by *Pseudomonas putida*, a bacterial species reported for its capability to metabolize PAHs (Balashova et al., 1999). To our knowledge this is the first report on mechanical dispersion and thermal treatment of phenanthrene in aqueous media in the presence of a surfactant and their influence on biodegradation.

## 2. Material and methods

The culture of *P. putida* DSMZ 8368 was performed in Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 60 mL of mineral medium (Brunner) MMB No. 457 (Yamamoto and Harayama, 1998) supplemented with 5 g L<sup>-1</sup> of ammonium sulfate to promote the growth of biomass and autoclaved during 20 min at 121 °C. All chemicals were purchased from Sigma (France). Glucose (50 g L<sup>-1</sup>) or phenanthrene (50 mg L<sup>-1</sup>) added after autoclaving was used as carbon source. The culture was carried out on an agitation table at 28 °C, at 200 rpm.

To evaluate the toxicity of surfactants (Tween 80, Brij 30, sodium dodecyl sulphate (SDS) and JBR 204 rhamnolipids) for *P. putida* DSMZ 8368, this strain was grown in the presence and in the absence of these molecules. The cell growth was determined by OD<sub>600</sub> measurements (spectrophotometer) and specific growth rates in each flask were compared. The toxic effect of surfactants on bacteria was estimated using the difference between the growth rates of *P. putida* DSMZ 8368 in the presence and in the absence of surfactant. It was considered that a surfactant was toxic for *P. putida* DSMZ 8368 if the difference between growth rates was more than 0.1 h<sup>-1</sup>.

The CMC of surfactants in distilled water and in MMB No. 457 medium was determined using a Krüss K12 tensiometer (Wilhelmy plate method) at 28 °C, pH = 7. The surface tension values thus obtained allowed us to plot the evolution of surface tension as a function of logarithm of surfactant concentration. The slope change point corresponds to the CMC value.

Quantitative analysis of phenanthrene and of its catabolites was performed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan). Standard solutions of phenanthrene and of its metabolites were prepared in pure acetonitrile (HPLC quality, Carlo Erba, France). The column used was Vydac 201TP 5215, 0.21 cm × 15 cm. The injection volume was 1 µL, the elution rate was 0.2 mL min<sup>-1</sup> with two mobile phases: phase A was MilliQ water acidified to pH = 2 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; phase B was pure acetonitrile. Two detectors (fluorescence and UV) were used. For phenanthrene and 1-hydroxy-2-naphthoic acid (1H2Na), the excitation and emission wave lengths were 248 and 365 nm, and 310 and 410 nm, respectively. Phenanthrene and 1H2Na were extracted from the culture medium using acetonitrile. The samples were diluted in acetonitrile about 2–10 times.

To determine the dissolution of phenanthrene in the presence of surfactants, 100 mL of phenanthrene (100 mg L<sup>-1</sup>) suspensions in distilled water were prepared, where surfactants were added in concentrations of 0.1 and 0.5 g L<sup>-1</sup>. The suspensions were put on the agitation table at 28 °C, 200 rpm. Samples were taken periodically and analyzed by HPLC.

The dispersion was performed using an Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik) at 8000, 9500 and 11000 rpm for 5 min and using a French press (Constant Systems Ltd.) at 100–200 MPa.

The analysis of particles in suspension was performed by optical means using Leica fluorescence microscope (Leitz DMRB, Germany) to study their morphology and using a Thoma counting chamber and ImageJ image analysis program created at the National Institutes of Health (USA) to determine their size. The particles corresponding to a surface of 1 pixel were considered as noise and not taken into consideration.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Toxicity of surfactants for *P. putida* DSMZ 8368

The surfactants used to increase the bioavailability of phenanthrene must not be toxic in order to make the biodegradation possible. Therefore, several surfactants such as Tween 80, Brij 30, SDS and rhamnolipids (JBR 204) were first checked for their toxicity for *P. putida* DSMZ 8368. These surfactants were selected on the basis of their biocompatibility and their solubilization ability (Deschenes et al., 1995; Zhang et al., 1997; Christofi and Ivshina, 2002; Jin et al., 2007). Some of their characteristics are presented in Supplementary material (SM), Table SM-1. Growth kinetics of *P. putida* DSMZ 8368 was carried out in the medium either containing surfactants or not. The corresponding specific growth rates are presented in Table SM-2. Thus Tween 80 was found not to be toxic for *P. putida* DSMZ 8368 in the range of tested concentrations. However, Brij 30 and rhamnolipids JBR 204 at concentrations above 1 g L<sup>-1</sup> slightly inhibited the growth of *P. putida* DSMZ 8368, while SDS was highly toxic for this strain at the same concentrations. The higher toxicity of SDS may be explained by its anionic characteristics. The fact that SDS is more toxic than Tween 80 and Brij 30 (which are non-ionic chemical surfactants) is in agreement with the surfactants toxicity ranking observed by Jin et al. (2007): non-ionic surfactants are less toxic than anionic surfactants, which are less toxic than the cationic ones. It should be noted that, though rhamnolipids are anionic surfactants, they appear to be less toxic than SDS, because they are of microbial origin and are, therefore, more biocompatible.

### 3.2. CMC determination

Based on the observation that the solubility of PAH increases linearly with concentration of surfactants when it exceeds the CMC (Edwards et al., 1991), the determination of CMC values of surfactants in the culture medium and in distilled water was important. It has to be noted that the values of CMC in MMB medium and in water may differ because CMC can be influenced by the presence of electrolytes in the medium (Gunnarsson et al., 1980). As mentioned above, SDS is toxic for *P. putida* DSMZ 8368 at concentrations above 1 g L<sup>-1</sup>. Since SDS CMC is higher than this concentration (about 2.4 g L<sup>-1</sup> from 25 to 40 °C, Benrraou et al., 2003), SDS was not used in experiments on PAH biodegradation with *P. putida* DSMZ 8368. The CMC values of Tween 80 (20 mg L<sup>-1</sup>), Brij 30 (25 mg L<sup>-1</sup>) and rhamnolipids JBR 204 (20 mg L<sup>-1</sup>) in distilled water were shown to be similar to that in MMB medium (Fig. SM-1). The obtained values are in agreement with those reported in literature for water (Guha and Jaffé, 1996; Kim et al., 2001). It can be therefore concluded that electrolytes present in MMB medium had a negligible effect on the CMC of surfactants.

### 3.3. Solubilization and dispersion of phenanthrene in aqueous media

#### 3.3.1. Solubilization of phenanthrene by surfactants

In order to identify the surfactant providing the highest solubility of phenanthrene, the concentrations of soluble phenanthrene in water were measured after 24 h of incubation at 28 °C, 200 rpm in

**Table 1**  
Concentrations of soluble phenanthrene in water as a function of surfactant concentrations.

	Tween 80		Brij 30		Rhamnolipids JBR 204	
Surfactant concentration (g L <sup>-1</sup> )	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5
Concentration of soluble phenanthrene (mg L <sup>-1</sup> )	3	12	5	18	2	10

the presence of surfactants (Tween 80, Brij 30 and rhamnolipids JBR 204). The corresponding results are indicated in Table 1. It was shown that Brij 30 dissolved phenanthrene in water better than the other surfactants. Therefore, Brij 30 was used in further biodegradation experiments at a concentration of 0.5 g L<sup>-1</sup> since a slight negative effect on the growth of *P. putida* DSMZ 8368 is noted at higher Brij 30 concentrations.

The influence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) on the aqueous solubility of phenanthrene was further investigated (Fig. SM-2). It is about 1.5 ± 0.1 mg L<sup>-1</sup> at 28 °C without surfactant, and in the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) it reaches the value of about 18 mg L<sup>-1</sup> after 24 h and remains stable afterwards, indicating the importance of equilibrating phenanthrene samples for 24 h in the presence of Brij 30 in order to achieve a stable solubility value.

### 3.3.2. Size reduction and dispersion of phenanthrene particles in an aqueous medium

It could be hypothesized that homogenization applied to the phenanthrene-containing medium in the presence of Brij 30 may result in a better biodegradation. This could be due to the improved mass transfer due to the increased contact surface between phenanthrene and bacteria or higher solubility of phenanthrene. To our knowledge, no information has been published on the influence of surfactant-assisted mechanical dispersion of phenanthrene in aqueous media on its biodegradation and only a few studies were carried out on mass transfer of PAHs from a non-aqueous phase liquid into surfactant solutions using dispersion (Ramaswami et al., 1997; Bernardez, 2008).

So, suspensions of phenanthrene were mechanically dispersed in the presence of Brij 30 using an Ultra-Turrax and a French press. No significant difference in the size distribution of phenanthrene particles between different rotation speeds (8000–11000 rpm) for Ultra-Turrax and pressure values (100–200 MPa) for French press was observed. However, it was shown that the dispersion by the French press allowed to double the number of particles and to reduce their size as compared to the utilization of Ultra-Turrax (Fig. SM-3). Using Ultra-Turrax most particles had a surface of 10<sup>-6</sup> mm<sup>2</sup>, whereas with the French press the mean surface of particles varied from 10<sup>-7</sup> to 10<sup>-6</sup> mm<sup>2</sup>. Phenanthrene suspensions obtained in the presence of Brij 30 without additional treatment resulted in a much higher number of particles larger than 10<sup>-4</sup> mm<sup>2</sup> and these suspensions were more heterogeneous.

The measurement of the solubility of phenanthrene in the medium treated by Ultra-Turrax and French press in the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) indicated that mechanical treatments had a low influence on the solubility: 20 ± 1 and 22 ± 2 mg L<sup>-1</sup> for the treatment by Ultra-Turrax and French press, respectively, against 18 ± 2 mg L<sup>-1</sup> without homogenization. Therefore, mechanical dispersion of the phenanthrene-containing medium in the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) seems to improve exclusively the potential contact surface between phenanthrene and bacterial cells.

### 3.3.3. Solubilization of phenanthrene with incubation at 60 °C

A temperature increase was reported to improve the solubility of phenanthrene in aqueous media (Viamajala et al., 2007). When the temperature was increased from 20 to 60 °C, a higher rate of dissolution and a higher solubility of several PAHs (including phen-

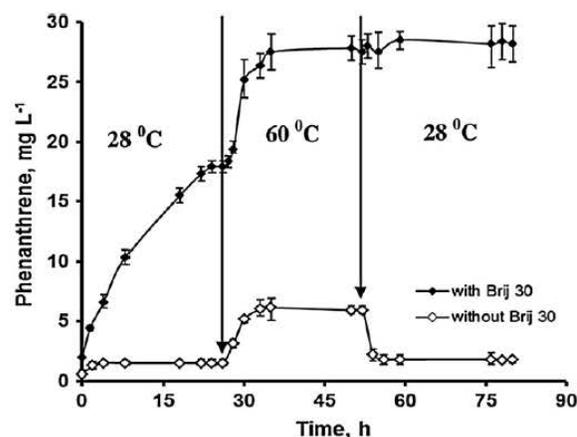
anthrene) were observed, the maximal values being reached at 60 °C. Feitkenhauer et al. (2003) reported that industrial effluents were often discharged at temperatures ranging from 50 to 130 °C. Taking into account that the optimal growth temperature for *P. putida* DSMZ 8368 is 28 °C, the thermal treatment of the phenanthrene-containing medium at 60 °C (chosen as high temperature value) was followed by a decrease in temperature down to 28 °C. Results of these experiments are presented on Fig. 1. They indicate that the solubility of phenanthrene in distilled water without Brij 30 reaches 6.0 ± 0.5 mg L<sup>-1</sup> at 60 °C, 200 rpm. These results are in agreement with data obtained by Viamajala et al. (2007). Lowering the temperature to 28 °C provokes a sharp decrease in phenanthrene solubility to the value of 1.8 ± 0.5 mg L<sup>-1</sup>. Thus it can be concluded that a temporary heat treatment of phenanthrene at 60 °C without Brij 30 did not improve its solubility. In the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) the solubility of phenanthrene at 60 °C was as high as 30 mg L<sup>-1</sup> and remained stable when temperature was decreased to 28 °C. Therefore, in the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) it may be interesting to perform a preliminary incubation of phenanthrene-containing medium at 60 °C in order to get a better solubility: around 30, instead of 18 mg L<sup>-1</sup>.

### 3.4. Phenanthrene degradation by *P. putida* DSMZ 8368

Based on these results, the effect of such conditions as the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>), the use of a preliminary mechanical dispersion (Ultra-Turrax) and the application of a temporary heating step at 60 °C on the biodegradation of phenanthrene (50 mg L<sup>-1</sup> or 280 μM) by *P. putida* DSMZ 8368 was studied. Abiotic controls were set up for all degradation experiments. It was shown that abiotic loss of phenanthrene was negligible for experiments carried out at 28 °C with or without mechanical dispersion (less than 2%). However, considerable volatilization occurred at 60 °C, going up to 24%. Nevertheless, the concentration of phenanthrene solubilized by Brij 30 remained stable for all abiotic experiments carried out at 28 and 60 °C.

#### 3.4.1. Effect of the addition of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) on phenanthrene biodegradation

The biodegradation of phenanthrene by *P. putida* DSMZ 8368 was performed in the medium with or without Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>). When Brij 30 was added, flasks were inoculated with *P. putida*



**Fig. 1.** Influence of thermal treatment on the soluble phenanthrene concentration as a function of time with and without surfactant. The experiments were carried out in water at 28 °C for 24 h with (◆) and without (◇) Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>). The temperature was then risen to 60 °C for 24 h and lowered to 28 °C for the next 32 h (agitation 200 rpm). Initial phenanthrene concentration was 100 mg L<sup>-1</sup>.

DSMZ 8368 after a preliminary 24 h solubilization of phenanthrene at 28 °C and 200 rpm. In this case there was no heating at 60 °C. Kinetics of *P. putida* DSMZ 8368 growth, of concentrations of phenanthrene and 1H2Na are shown in Fig. 2.

As indicated in Fig. 2a, the growth of *P. putida* DSMZ 8368 was similar whether the medium contained Brij 30 or not. Nevertheless, once the maximal biomass concentration was reached, the decrease in OD<sub>600</sub> was much more pronounced in the presence of Brij 30. This more rapid decrease in OD<sub>600</sub> (probably due to the cell lysis) in the presence of Brij 30 might be explained by the presence of higher concentrations of bioavailable phenanthrene or of its catabolites. Indeed, the toxicity of some of the phenanthrene intermediates has already been reported. For example 2-naphthol is toxic for several *Pseudomonas* strains (Balashova et al., 1999). It is also known that significant concentrations of PAH as well as their increased bioavailability may promote the PAH transfer through cells membranes (Means et al., 1980) and that their accumulation in cells can provoke their death (Sikkema et al., 1995).

In the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) a significantly higher initial concentration of soluble phenanthrene in the medium was obtained (Fig. 2b): i.e. 120 μM (20 mg L<sup>-1</sup>) vs. 9 μM (1.5 mg L<sup>-1</sup>). This soluble phenanthrene was completely degraded when the maximum growth of *P. putida* DSMZ 8368 was reached. Therefore, phenanthrene is not likely to be the cause of brutal biomass decay

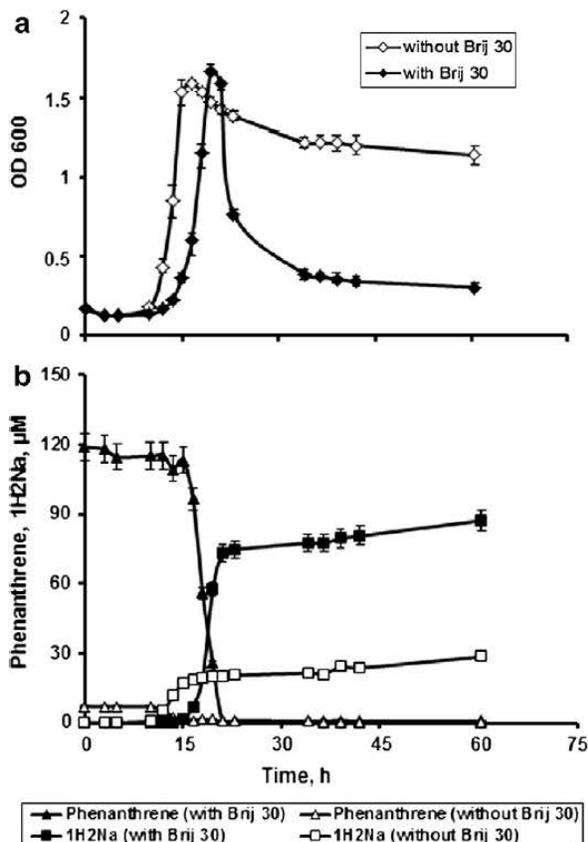


Fig. 2. Kinetics of phenanthrene (50 mg L<sup>-1</sup>) degradation by *P. putida* DSMZ 8368 in the presence or absence of Brij 30. (a) Kinetics of biomass of *P. putida* DSMZ 8368 on phenanthrene (50 mg L<sup>-1</sup>) solubilized by Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) (◆) and on phenanthrene without Brij 30 (◇). (b) Kinetics of phenanthrene (▲, △) and 1-hydroxy-2-naphthoic acid (1H2Na) (■, □) concentrations during batch cultures of *P. putida* DSMZ 8368. Full symbols represent biodegradation of phenanthrene solubilized by Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>). Empty symbols represent biodegradation of phenanthrene without Brij 30.

in the presence of Brij 30. Similarly to phenanthrene, the final concentration of 1H2Na was much higher when Brij 30 was present (about 85 against 25 μM). Incidentally other unidentified aromatic compounds were detected in the medium in the presence of Brij 30 at the end of fermentation (data not shown). Higher final concentrations of phenanthrene catabolites may be explained by its higher bioavailability and its more efficient biodegradation when Brij 30 is added. The apparent higher quantity of 1H2Na produced than phenanthrene consumed in the absence of Brij 30 is due to the fact that when soluble phenanthrene started to be consumed, some of its solid particles were dissolved. Therefore, they became bioavailable and were converted to 1H2Na. This was confirmed by scarifying flasks during culture and extraction of total residual phenanthrene.

### 3.4.2. Effect of mechanical dispersion on phenanthrene biodegradation

Since the addition of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) allowed obtaining higher concentrations of soluble phenanthrene in the medium, further biodegradation experiments were carried out in the presence of this surfactant. Several authors state that microorganisms are capable of growing on the surface of solid particles of phenanthrene (Kiyohara et al., 1982; Guerin and Jones, 1988). As demonstrated previously, a mechanical dispersion using both Ultra-Turrax and French press reduces considerably the size of phenanthrene particles that could influence the biodegradation. Ultra-Turrax was selected rather French press taking into consideration the possible further practical application of such a treatment. A French press is not well suited to large volume processing, requires high energy and sample cooling, whereas the scaling up of an Ultra-Turrax for water treatment purposes is quite possible. Therefore, the effect of a mechanical dispersion by Ultra-Turrax on the biodegradation of phenanthrene by *P. putida* DSMZ 8368 was then studied. The initial concentration of soluble phenan-

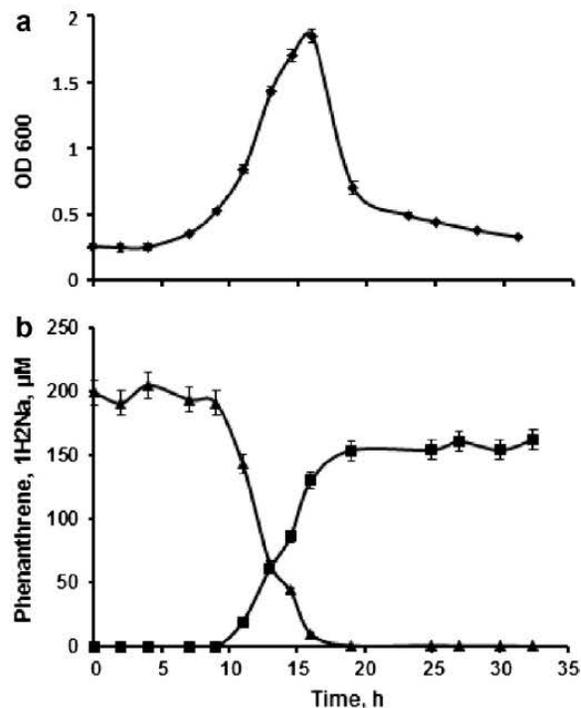


Fig. 3. Kinetics of *P. putida* DSMZ 8368 degradation of phenanthrene (50 mg L<sup>-1</sup>) solubilized by Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) after a temporary heating step at 60 °C for 24 h. Kinetics of biomass (◆) (a), phenanthrene (▲) and 1-hydroxy-2-naphthoic acid (1H2Na) (■) concentrations (b) during batch cultures of *P. putida* DSMZ 8368.

threne was about 120  $\mu\text{M}$  (20  $\text{mg L}^{-1}$ ) with or without dispersion. Kinetics of growth and biodegradation were also similar in both cases (Fig. SM-4). It was concluded that the mechanical dispersion did not affect the biodegradation of phenanthrene by *P. putida* DSMZ 8368 in the presence of Brij 30 (0.5  $\text{g L}^{-1}$ ). This suggested that *P. putida* DSMZ 8368 was likely to consume only soluble phenanthrene, which is in agreement with the theory of Wodzinski and Coyle (1974) on the physical state of phenanthrene utilized by microorganisms. Indeed, no matter the size of solid phenanthrene particles in the medium, its biodegradation by *P. putida* DSMZ 8368 was the same.

#### 3.4.3. Effect of a temporary heating at 60 °C on phenanthrene biodegradation

As shown above, a preliminary temporary heating of phenanthrene-containing medium at 60 °C in the presence of Brij 30 could result a better phenanthrene biodegradation compared to conditions when the solubilization was carried out only at 28 °C. To verify this hypothesis a kinetic of phenanthrene degradation by *P. putida* DSMZ 8368 was performed using a preliminary temporary heating step at 60 °C for 24 h done before inoculation with bacteria and followed by a decrease in temperature to 28 °C. Results indicated that a higher initial concentration of soluble phenanthrene (200 against 120  $\mu\text{M}$ ) and a higher final concentration of 1H2Na (160 against 85  $\mu\text{M}$ ) were measured in the culture medium after a thermal treatment (Fig. 3). These results suggested that a temporary heating of phenanthrene-containing medium at 60 °C led to an even more complete biodegradation of phenanthrene.

#### 4. Conclusions

The biodegradation of PAHs in aqueous environments may represent one of the aspects of oil spills bioremediation. In the present study the increase of the solubility of phenanthrene (PAH model) in aqueous media was obtained by applying surfactants and temperature increase (60 °C). The results show that Brij 30 is able to solubilize phenanthrene better than the other surfactants such as Tween 80 and rhamnolipids JBR 204. In the presence of Brij 30 (0.5  $\text{g L}^{-1}$ ) the efficiency of biodegradation of phenanthrene by *P. putida* DSMZ 8368 was improved. It was shown that an additional mechanical dispersion in the presence of a surfactant did not influence the biodegradation of phenanthrene by *P. putida* DSMZ 8368. A temporary increase of temperature to 60 °C (24 h) of the phenanthrene-containing medium in the presence of Brij 30 (0.5  $\text{g L}^{-1}$ ) allowed to attain even higher solubility of phenanthrene (around 30  $\text{mg L}^{-1}$  instead of  $18 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$  at 28 °C) and resulted in a more complete biodegradation. The present study proposes a promising way to optimize conditions of biodegradation of phenanthrene or other PAHs in aqueous media by microorganisms.

#### Acknowledgements

This research was supported by the French Embassy in Russia, Institut Carnot ICEEL and GISFI. We also thank Pr Christian Sanchez, University of Montpellier, France, for his comments.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.024.

#### References

Avramova, T., Sotirova, A., Galabova, D., Karpenko, E., 2008. Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. *Int. Biodeter. Biodegr.* 62, 415–420.

- Balashova, N.V., Kosheleva, I.A., Golovchenko, N.P., Boronin, A.M., 1999. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. *Process Biochem.* 35, 291–296.
- Bamforth, S.M., Singleton, I., 2005. Review bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 723–736.
- Benraou, M., Bales, B.L., Zana, R., 2003. Effect of the nature of the counterion on the properties of anionic surfactants. 1. cmc, ionization degree at the cmc and aggregation number of micelles of sodium, cesium, tetramethylammonium, tetraethylammonium, tetrapropylammonium, and tetrabutylammonium dodecyl sulfates. *J. Phys. Chem. B* 107, 13432–13440.
- Bernardez, L.A., 2008. Dissolution of polycyclic aromatic hydrocarbons from a non-aqueous phase liquid into a surfactant solution using a rotating disk apparatus. *Colloids Surf., A* 320, 175–182.
- Chauhan, A., Fazlurrahman, J.G., Oakeshott, J., Jain, R.K., 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48, 95–113.
- Christofi, N., Ivshina, I.B., 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* 93, 915–929.
- Deschenes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J.P., Samson, R., 1995. The effect of an anionic surfactant on the mobilization and biodegradation of PAHs in a creosote-contaminated soil. *Hydrolog. Sci. J.* 40, 471–484.
- Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu, Z., 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar non-ionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* 25, 127–133.
- Feitkenhauer, H., Markl, H., 2003. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons at high temperatures. *Water Sci. Technol.* 47 (10), 123–130.
- Feitkenhauer, H., Muller, R., Markl, H., 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60–70 °C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation* 14, 367–372.
- Guerin, W.F., Jones, G.E., 1988. Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 929–936.
- Guha, S., Jaffé, P., 1996. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 30, 605–611.
- Gunnarsson, G., Jonsson, B., Wennerstrom, H., 1980. Surfactant association into micelles. An electrostatic approach. *J. Phys. Chem.* 84, 3114–3121.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15.
- Jin, D., Jiang, X., Jing, X., Ou, Z., 2007. Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. *J. Hazard. Mater.* 144, 215–221.
- Kim, I.S., Park, J.-S., Kim, K.-W., 2001. Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. *Appl. Geochem.* 16, 1419–1428.
- Kiyohara, H., Nagao, K., Yana, K., 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 454–457.
- Laha, S., Luthy, R.G., 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by non-ionic surfactants in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1920–1930.
- Li, J.-L., Chen, B.-H., 2009. Effects of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene by a marine bacteria of *Neptunomonas naphthovorans*. *J. Hazard. Mater.* 162, 66–73.
- Means, J.S., Wood, S.G., Hassett, J.J., Banwart, W.L., 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 14, 1524–1528.
- Ramaswami, A., Ghoshal, S., Luthy, R., 1997. Mass transfer and bioavailability of PAH compounds in coal tar NAPL-slurry systems. 2. Experimental evaluations. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2268–2276.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201–222.
- US EPA, 1997. Code of Federal Regulation, Title 40, Part 60, Subparts D, Da, Db, Dc Environmental Protection Agency, Washington, DC, p. 44.
- Viamajala, S., Peyton, B.M., Richards, L.A., Petersen, J.N., 2007. Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions. *Chemosphere* 66, 1094–1106.
- Wild, S.R., Jones, K.C., 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* 88, 91–108.
- Wodzinski, R.S., Coyle, J.E., 1974. Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. *Appl. Microbiol.* 27, 1081–1084.
- Yamamoto, S., Harayama, S., 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 813–819.
- Zahed, M.A., Aziz, H.A., Isa, M.H., Mohajeri, L., Mohajeri, S., 2010. Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. *Bioresour. Technol.* 101, 9455–9460.
- Zhang, Y., Maier, W., Miller, R., 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2211–2217.
- Zhao, H.-P., Wu, Q.-S., Zhao, X.-T., Gao, H.-W., 2009. Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China. *J. Hazard. Mater.* 164, 863–869.

**Données complémentaires de l'article « Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media ». Chemosphere (2011) 83, 29-33.**

4.1. Toxicité des tensioactifs vis-à-vis de *P. putida* DSMZ 8368

Les tensioactifs, dont l'ajout est susceptible d'améliorer la biodégradation du phénanthrène, ne doivent pas être toxiques pour les micro-organismes utilisés dans le cadre du procédé. C'est pourquoi la toxicité de plusieurs tensioactifs vis-à-vis de la souche *P. putida* DSMZ 8368 a été vérifiée. Quatre tensioactifs ont été utilisés dans ce travail : le Tween 80, le Brij 30, le SDS et les rhamnolipides JBR 204. Les vitesses spécifiques de croissance de *P. putida* DSMZ 8368 en présence et en absence des tensioactifs sélectionnés ont été calculées (tableau 7). Il a été montré que le Tween 80 n'était pas toxique vis-à-vis de *P. putida* DSMZ 8368 dans la gamme de concentrations testées. En revanche, le Brij 30 et les rhamnolipides en concentrations supérieures à 1 g/L inhibaient légèrement la croissance de *P. putida* DSMZ 8368, tandis que le SDS avait une toxicité marquée pour les mêmes concentrations.

Tableau 7. Vitesses spécifiques de croissance  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) de *P. putida* DSMZ 8368 en fonction de différentes concentrations en tensioactifs.

Conc., g L <sup>-1</sup> \ Tensioactif	0	0,1	0,25	0,5	1	2
Tween 80	0,39	0,38	0,34	0,35	0,38	0,39
Brij 30	0,35	0,33	0,33	0,33	0,29	0,28
SDS	0,31	0,34	0,36	0,36	0,21	0,19
Rhamnolipides	0,35	0,38	0,40	0,35	0,32	0,30

#### 4.2. Détermination de la CMC

Sachant que la solubilité des HAP augmente linéairement avec la concentration en tensioactifs lorsqu'elle est supérieure à la CMC (Edwards, 1991), il était important de déterminer la valeur de la CMC dans le milieu préconisé. Ces valeurs ont été comparées avec celles obtenues dans l'eau distillée. Il a été montré que les valeurs de la CMC du Tween 80 (20 mg/L), du Brij 30 (25 mg/L) et des rhamnolipides JBR 204 (20 mg/L) dans l'eau distillée étaient comparables à celles obtenues dans le milieu MMB (Fig. 25). Ainsi les électrolytes présents dans le milieu MMB n'ont pas d'effet significatif sur la CMC de tensioactifs.

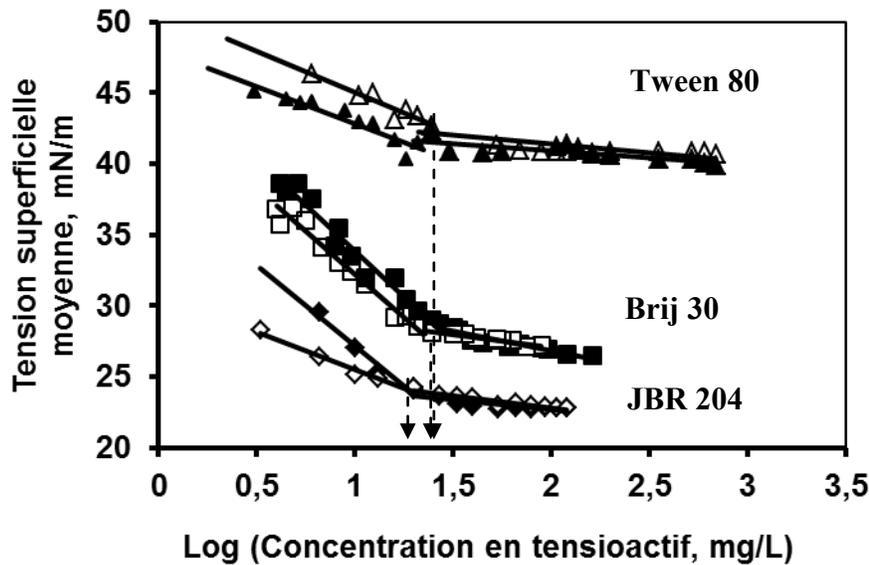


Figure 25. Détermination de la CMC des tensioactifs.

La CMC a été déterminée pour le Tween 80 ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ), le Brij 30 ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ) et les rhamnolipides JBR 204 ( $\blacklozenge$ ,  $\lozenge$ ) à  $t = 28^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7$ . Les symboles pleins correspondent aux expériences dans le milieu MMB. Les symboles vides correspondent à ceux dans l'eau distillée. Les points du graphique correspondent à la valeur moyenne de 10 mesures indépendantes.

#### 4.3. L'effet du Brij 30 (0,5 g/L) sur la solubilité du phénanthrène

On a déterminé que la solubilité du phénanthrène dans l'eau est de 1,5 g/L à 28 °C. Il a été décidé de suivre l'évolution de la concentration en phénanthrène soluble dans l'eau en présence de Brij 30 (0,5 g/L) au cours du temps. Ainsi, la solubilité du phénanthrène en présence de Brij 30 (0,5 g/L) atteint la valeur d'environ 18 mg/L au bout de 24 h et reste stable par la suite (Fig. 26). Ceci indique l'importance de l'équilibrage des solutions du phénanthrène en présence de Brij 30 (0,5 g/L) pendant 24 h afin d'obtenir une solubilité stable.

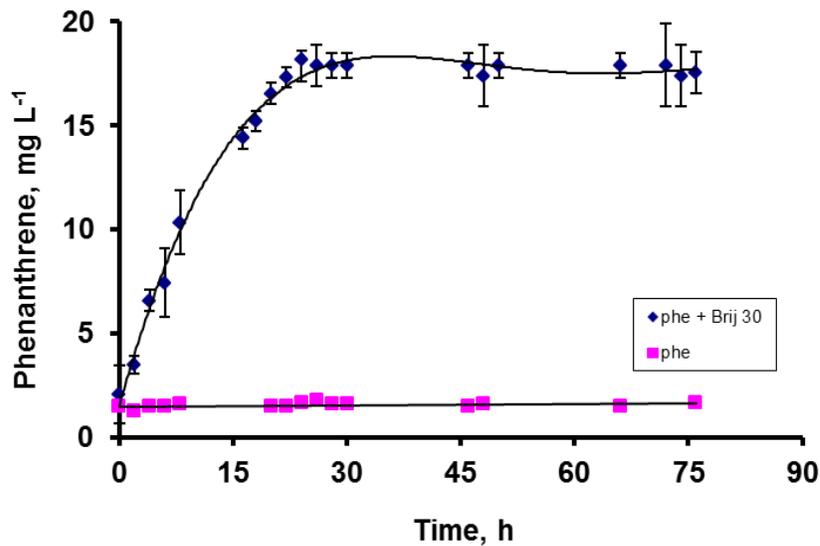


Figure 26. Concentrations en phénanthrène soluble dans l'eau distillée en fonction du temps.

Les expériences ont été réalisées à  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm en présence du Brij 30 ( $0,5\text{ g L}^{-1}$ ) (◆) et en absence du Brij 30 (■).

#### 4.4. Effet de la dispersion mécanique du phénanthrène sur sa biodégradation

La concentration initiale en phénanthrène soluble a été d'environ 120  $\mu\text{M}$  (20 mg/L) avec ou sans dispersion. Les cinétiques de croissance et de biodégradation sont également similaires dans les deux cas (Fig. 27). Les résultats suggèrent que la dispersion n'a pas d'effet sur la biodégradation du phénanthrène par *P. putida* DSMZ 8368 en présence du Brij 30 (0,5 g/L). Cela est très probablement dû au fait que *P. putida* DSMZ 8368 consomme exclusivement le phénanthrène sous sa forme soluble.

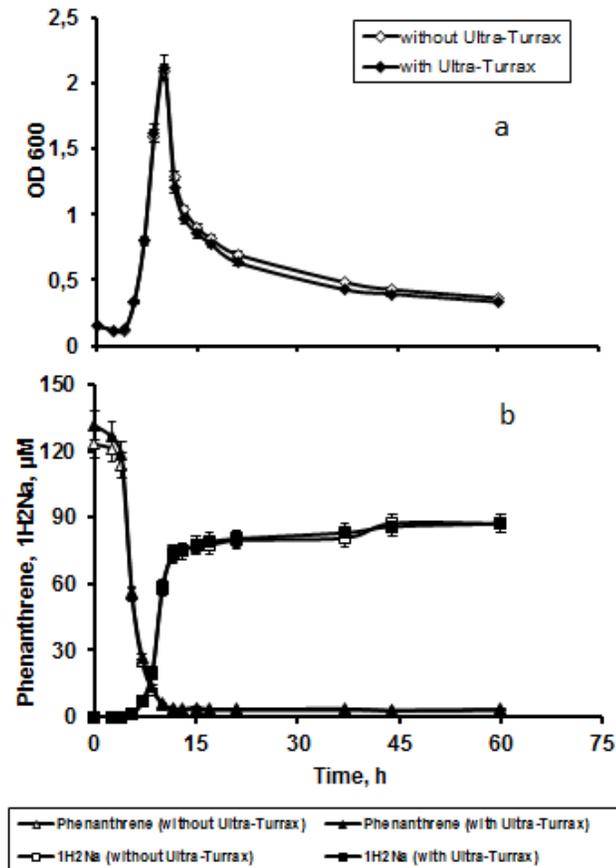


Figure 27. Cinétique de la biodegradation du phénanthrène (50 mg/L) par *P. putida* DSMZ 8368 en présence du Brij 30 (0,5 g/L) avec et sans dispersion préliminaire par l'Ultra-Turrax.

a. Evolution de la concentration en biomasse de *P. putida* DSMZ 8368 lors de la biodegradation du phénanthrène avec ( $\blacklozenge$ ) et sans ( $\diamond$ ) dispersion préliminaire par l'Ultra-Turrax. b. Evolution de la concentration en phénanthrène ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ) et 1H2Na ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ) lors des cultures de *P. putida* DSMZ 8368. Les symboles pleins correspondent aux expériences avec la dispersion préliminaire par l'Ultra-Turrax. Les symboles vides correspondent à ceux sans dispersion.

## Contribution de l'article

Les travaux présentés dans cet article ont permis de mettre en évidence que le Brij 30 solubilise le phénanthrène mieux que les autres tensioactifs tels que le Tween 80 et les rhamnolipides. Il peut être utilisé de manière efficace afin d'augmenter la solubilité du phénanthrène, car jusqu'à 0,5 g/L il ne provoque pas de ralentissement de croissance de *P. putida* DSMZ 8368. En outre, l'ajout de ce tensioactif à une concentration de 0,5 g/L couplé avec le traitement thermique du milieu (60 °C pendant 24 h) permet d'obtenir davantage de phénanthrène dégradé. A notre connaissance, l'étude de la dispersion mécanique du phénanthrène en milieu aqueux en présence d'un tensioactif (le Brij 30) est présentée pour la première fois dans cet article. La dispersion mécanique permet d'augmenter le nombre de particules de phénanthrène de plus petite taille dans le milieu. Néanmoins, l'absence de l'effet de la dispersion mécanique sur la biodégradation de phénanthrène par *P. putida* DSMZ 8368 a été constatée, probablement due au fait que c'est la solubilité du phénanthrène et pas la taille de ses particules qui affecte la biodégradation.

## Conclusion

- i). Dans un premier temps, l'objectif de ce chapitre était d'évaluer les pertes du phénanthrène par adsorption dans les conditions de culture et de préparation des échantillons avant analyse. Il a été mis en évidence que l'adsorption du phénanthrène sur les surfaces solides correspondantes (le verre, le métal et les filtres Millipore®) est négligeable, surtout en présence d'un tensioactif dans le milieu.
- ii). Dans un second temps, on a voulu étudier l'effet de la dispersion mécanique du phénanthrène sur sa solubilité et sur la morphologie de ses particules. Il a été montré que la dispersion mécanique n'avait pas d'influence significative sur la solubilité du phénanthrène. Néanmoins, elle permet d'obtenir des échantillons plus homogènes ayant le plus grand nombre de petites particules du phénanthrène.
- iii). Dans un troisième temps, une amélioration du milieu de culture de *P. putida* DSMZ 8368 a été prévue afin de promouvoir la croissance des bactéries. Celle-ci a été obtenue grâce à l'ajout d'une concentration plus importante du sulfate d'ammonium (5 g/L).
- iv). Finalement, l'étude approfondie de plusieurs méthodes utilisées afin d'augmenter la solubilité et la biodégradation du phénanthrène a été effectuée. Il a été montré que le Tween 80, le Brij 30 et les

rhamnolipides JBR 204 pouvaient être utilisés afin d'améliorer la solubilité du phénanthrène au cours de cultures de *P. putida* DSMZ 8368. Le Brij 30 est le tensioactif le plus efficace en termes de solubilisation du phénanthrène parmi les tensioactifs testés. Le traitement thermique temporaire en présence du Brij 30 (0,5 g/L) augmente également la solubilité du phénanthrène. Au regard de l'ensemble des résultats sur l'effet de la dispersion mécanique, de la solubilisation et du traitement thermique du phénanthrène sur sa biodégradation par *P. putida* DSMZ 8368, il ressort que l'ajout du Brij 30 à 0,5 g/L couplé avec le traitement thermique du milieu (60 °C pendant 24 h) apparaît comme étant le moyen le plus efficace d'augmenter la biodégradation.

## **CHAPITRE 2 :**

**Etude de la biodégradation du phénanthrène par un consortium**

**Pyr01, comparaison avec celle réalisée par *P. putida* DSMZ 8368**

## Introduction

La biodégradation des HAP par une culture pure est généralement différente de celle réalisée par un consortium de microorganismes. En effet, les voies de dégradation, ainsi que les vitesses de croissance et de dégradation peuvent varier considérablement. Dans un consortium bactérien certaines souches peuvent être responsables de la dégradation de l'HAP initial, tandis que d'autres souches peuvent ne dégrader que les métabolites produits. Les interactions synergiques entre les souches du consortium peuvent également augmenter l'efficacité de la biodégradation des polluants.

Afin de comparer les performances de la souche pure *P. putida* DSMZ 8368 et d'un consortium Pyr01 (provenant des rives de la Fensch) les processus de dégradation du phénanthrène, les cultures du consortium ont été réalisées. Les cinétiques de croissance et de dégradation du phénanthrène ont été suivies.

### 1. Effet de l'ajout du sulfate d'ammonium la croissance du consortium Pyr01

Afin de vérifier si l'ajout de 5 g/L de sulfate d'ammonium améliore la croissance du consortium microbien Pyr01, ce qui a été le cas pour *P. putida* DSMZ 8368, les essais correspondant ont été effectués (Fig. 28).

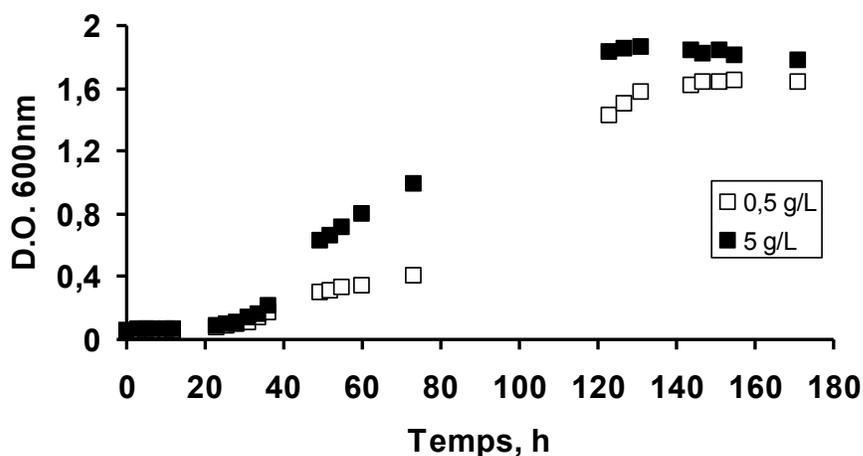


Figure 28. Evolution de la concentration en biomasse du consortium microbien Pyr01 au cours du temps dans le milieu MMB contenant 0,5 et 5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  avec le phénanthrène (50 mg/L) comme source de carbone.

Une croissance plus rapide du consortium Pyr01 a été observée lorsque 5 g/L de sulfate d'ammonium sont ajoutés dans le milieu de culture. Cette concentration en sulfate d'ammonium, ainsi que les autres améliorations du milieu de culture obtenus pour *P. putida* DSMZ 8368 dans les chapitres précédents ont été retenues pour les expériences ultérieures avec le consortium Pyr01.

## 2. Effet de la concentration en glucose dans le milieu de préculture sur la croissance de *P. putida* DSMZ 8368 et sa capacité à dégrader le phénanthrène

L'ajout de différentes concentrations en glucose (0, 5, 10 et 50 g/L) dans le milieu de préculture a été testé. Il a été montré que la croissance de la biomasse de *P. putida* DSMZ 8368 au cours des cultures en présence de phénanthrène (50 mg/L) et de Brij 30 (0,5 g/L) issues des précultures contenant 50 g/L de glucose était beaucoup plus importante que dans les autres cas (Fig. 29). Ceci concerne également la vitesse spécifique de croissance. Compte tenu d'une faible accumulation de biomasse et des vitesses spécifiques de croissance moins importantes observées dans les cultures issues des précultures contenant de 0 à 10 g/L de glucose, il a été supposé que la biodégradation du phénanthrène était moins efficace. En effet, deux fois moins de phénanthrène a été dégradé par *P. putida* DSMZ 8368 issue de la préculture contenant 10 g/L de glucose que de la préculture contenant 50 g/L de glucose. Il a été ainsi décidé d'utiliser uniquement les précultures contenant 50 g/L de glucose.

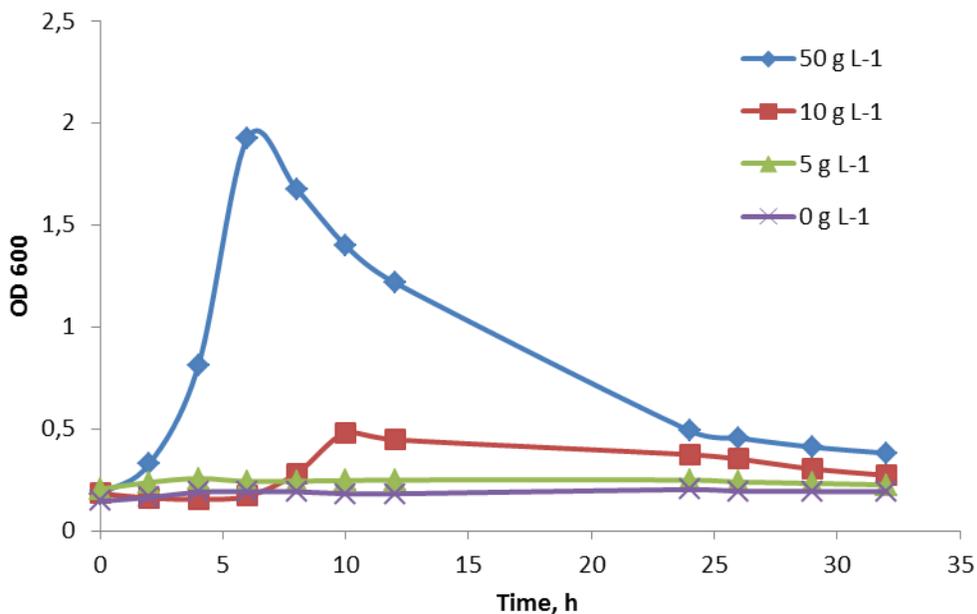


Figure 29. Evolution de la concentration en biomasse de *P. putida* DSMZ 8368 au cours de la biodégradation du phénanthrène (50 mg/L) en présence de Brij 30 (0,5 g/L) issue des précultures contenant 0, 5, 10 et 50 g L<sup>-1</sup> du glucose.

### **3. Manuscrit en préparation :**

**“Biodegradation of phenanthrene in aqueous media by *Pseudomonas putida* and a bacterial consortium in the presence and in the absence of a surfactant”.**

# Biodegradation of phenanthrene in aqueous media by *Pseudomonas putida* and a bacterial consortium in the presence and in the absence of a surfactant.

Pantsyrnaya Tatiana<sup>a,b</sup>, Delaunay Stéphane<sup>a</sup>, Goergen Jean-Louis<sup>a</sup>, Guédon Emmanuel<sup>a</sup>, Paris Cédric<sup>c</sup>, Poupin Pascal<sup>d</sup>, Guseva Elena<sup>b</sup>, Boudrant Joseph<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Réactions et Génie des Procédés – UPR CNRS 3349, Nancy-Université, ENSAIA - 2, avenue de la Forêt de Haye, 54505, Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

<sup>b</sup> Faculty of High Resource-Saving and Information Technologies, D. Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, ul. Geroev Panfilovcev, 20, Moscow, 123480, Russia.

<sup>c</sup> Laboratoire d'ingénierie de Biomolécules – EA 3996 EA3997, Nancy-Université, ENSAIA - 2, avenue de la Forêt de Haye, 54505, Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

<sup>d</sup> Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes – CNRS UMR 7146, Université Paul Verlaine Metz, 8, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France.

## Abstract

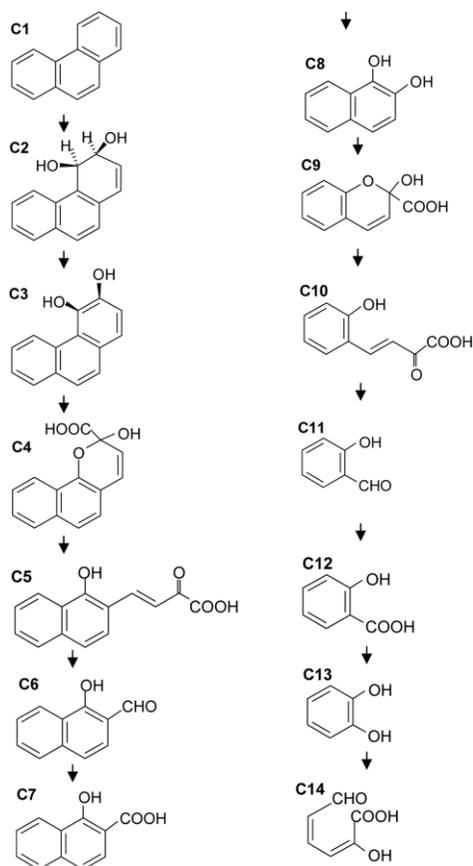
This study describes the biodegradation of phenanthrene in the presence and in the absence of a surfactant, Brij 30. Biodegradations were performed using either *Pseudomonas putida* DSMZ 8368 or a bacterial consortium Pyr01 isolated from one PAHs-polluted site. The efficiency of Brij 30 in increasing the solubility of phenanthrene was demonstrated. *P. putida* degraded phenanthrene to form 1-hydroxy-2-naphthoic acid (1H2Na) as the major metabolite. LC-MS analysis revealed the production of complementary intermediates in the presence of Brij 30, showing intense ions at mass-to-charge ratios ( $m/z$ ) 97 and 195. Higher phenanthrene biodegradation rate was obtained in the presence of Brij 30. Conversely, in the case of Pyr01 consortium, the addition of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) had a negative effect on biodegradation: no phenanthrene biodegradation products were detected in the medium, whereas a production of several intermediates ( $m/z$  97, 195 and 293) was obtained without surfactant. Therefore, the knowledge of the effect of surfactants on bacterial cultures is crucial for the optimization of surfactant-enhanced PAHs biodegradation.

**Keywords:** phenanthrene, surfactant, biodegradation, *P. putida*, consortium

## Introduction

PAHs are among the most common organic pollutants. As invasive clean-up techniques are often expensive and damaging to the environment, bioremediation, which exploits the ability of microorganisms to degrade recalcitrant xenobiotic compounds, has attracted particular attention as safe

and cost-effective [1]. The biodegradation pathway of low molecular weight PAHs (having two or three rings) has been demonstrated by a number of researchers [2,3]. Phenanthrene, a three-ring PAH, taken as a model in the present study, is degraded by some bacteria through one of two different pathways. The majority of initial steps of phenanthrene biodegradation lead to the formation of 1-hydroxy-2-naphthoic acid (1H2Na), which is further metabolized either via the naphthalene pathway to salicylic acid, which can be later transformed to catechol, or via the phthalate pathway [4]. For example *P. putida* degrades phenanthrene via naphthalene pathway presented in figure 1.



**Figure 1. Biodegradation pathway of phenanthrene via the naphthalene pathway [5].** C1: Phenanthrene, C2: cis-3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophenanthrene, C3: 3,4-dihydroxyphenanthrene, C4: 2-hydroxy-2Hbenzo[h]chromene-2-carboxylic acid, C5: cis-4-(1'-hydroxynaphth-2'-yl)-2-oxo-but-3-enoic acid, C6: 1-hydroxy-2-naphthaldehyde, C7: 1-hydroxy-2-naphthoic acid, C8: 1,2-dihydroxynaphthalene, C9: 2-hydroxychromene-2-carboxylic acid, C10: trans-o-hydroxybenzylidene-pyruvic acid, C11: salicylaldehyde, C12: salicylic acid, C13: catechol, C14: 2-hydroxymuconic semialdehyde.

However, in most of studies the accumulation of only or mainly 1H2Na in culture liquids was observed during phenanthrene biodegradation by pure or mixed bacterial cultures [4,6-9]. Indeed, the rapid transformation of PAHs to polar intermediates may have adaptive significance. In an uncontrolled open system this kind of metabolism is advantageous because the formed hydrophobic aromatic compounds which could potentially disrupt membrane functions [10] are converted to water-soluble products which can be easily evacuated from bacterial cells. Thus, PAHs may be rendered innocuous without being completely degraded [11], and their incomplete mineralization may therefore represent a detoxification strategy.

Low water solubility of PAHs is one of the major problems affecting their biodegradation efficiency. That is why intensive studies of the application of surfactants in PAHs degradation processes have been carried out. Nevertheless, adverse effects of surfactants addition on biodegradation have been reported [12-15]. On the one hand, surfactants may increase the solubility and the bioavailability of PAHs. On the other hand, they may be consumed preferentially to PAHs or form a layer preventing the direct contact between microorganisms and PAHs. Thus it is important to have a better understanding of the interaction of surfactants with microorganisms during degradation processes. The present study extends earlier studies on bacterial metabolism of PAHs and proposes a closer insight on the effect of a surfactant on pure and mixed bacterial cultures during phenanthrene biodegradation.

## **Experimental**

### Strains.

In the present study *P. putida* DSMZ 8368 pure strain known to degrade PAHs or a consortium of microorganisms Pyr01 isolated from a natural site polluted with PAHs (Fensch river sediment, Moselle, France) were used. The consortium Pyr01 contained mostly *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Alphaproteobacteria*.

### Surfactants.

The surfactants utilized in this study were Tween 80, Brij 30 (Sigma, France) and rhamnolipids JBR 204 (Jeneil Biosurfactant Company, USA) chosen on the basis of their biocompatibility [13,16-18].

### Strain's cultures.

The culture of *P. putida* DSMZ 8368 was performed in Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 60 mL of mineral medium (Brunner) MMB No. 457 [19] supplemented with 5 g L<sup>-1</sup> of ammonium sulfate to promote the growth of biomass and autoclaved during 20 min at 121 °C. All chemicals were purchased from Sigma (France). Glucose (50 g L<sup>-1</sup>) added after autoclaving was used as carbon source in pre-

culture flasks (see details in Supplementary material) and phenanthrene ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) was used as carbon source in culture flasks. The culture of *P. putida* DSMZ 8368 was carried out on an agitation table at  $28^\circ\text{C}$ , at 200 rpm. The cell growth was determined by  $\text{OD}_{600}$  measurements with the help of a Hitachi U-2000 spectrophotometer (Science Tec).

The culture of Pyr01 consortium was carried out in the same conditions, but without pre-culture on glucose.

#### Identification of phenanthrene and of its catabolites.

The identification of phenanthrene and of its catabolites was done by means of liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS). LC-MS (Thermo scientific LTQ Orbitrap XL, San Jose, CA, USA) was performed in electrospray ionization (negative) mode. Data were processed using Xcalibur 2.1 software. The operational parameters of the mass spectrometer were as shown below. The spray voltage was  $-5 \text{ kV}$  and the temperature of the heated capillary was set at  $300^\circ\text{C}$ . The flow rates of sheath gas, auxiliary gas and sweep gas were set (in arbitrary units  $\text{min}^{-1}$ ) to 40, 10 and 10, respectively. Capillary voltage was  $-22 \text{ V}$ , tube lens was  $-52 \text{ V}$ . All parameters were optimized using 1H2Na in mobile phase MilliQ water with HCOOH (0.1 %) / pure acetonitrile (50 / 50) at flow rate of  $0.2 \text{ mL min}^{-1}$ . The optimization was done using 1H2Na because other studied PAHs responded in a similar way. Standard solutions of phenanthrene and of its catabolites were prepared in pure acetonitrile (HPLC quality, Carlo Erba, France). The column used was Vydac 201TP5215,  $0.21 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ . The injection volume was 1 to  $10 \mu\text{L}$ . These mobile phases were chosen in order to have a good response of the analyzed molecules in ESI negative mode. Generally, ions are seen in  $[\text{M-H}]^-$  i.e. deprotonated form. UV detector was used. Phenanthrene and its catabolites were extracted from the medium with acetonitrile. The unknown molecules were determined using full scan analysis ( $50 \rightarrow 500 \text{ m/z}$ ). The single-stage MS scan (MS1) is a full scan ( $50 \rightarrow 500 \text{ m/z}$ ) that permits to observe parent ions. MS<sub>n</sub> (in the present study MS2 and MS3) is the fragmentation of ions that permits to carry out a filiation study: MS2 results in derivative ions of the first generation and MS3 gives derivative ions of the second generation. Standard molecules of PAHs were analyzed via SIM (Single Ion Monitoring) for catechol and 2-naphtol and SRM (Single Reaction monitoring) for phtalic acid, protocatechol, salicylic acid and 1H2Na. Phenanthrene did not give a response in mass analysis and was analyzed using the UV detector.

#### Quantitative analysis of phenanthrene and of its catabolites.

Quantitative determination of phenanthrene and of its catabolites was performed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan), using the same column and conditions as for their identification by LC-MS described above. Phase A was MilliQ water acidified to  $\text{pH} = 2$  with  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ;

phase B was pure acetonitrile. The injection volume was 1  $\mu\text{L}$ . Two detectors (fluorescence and UV) were used.

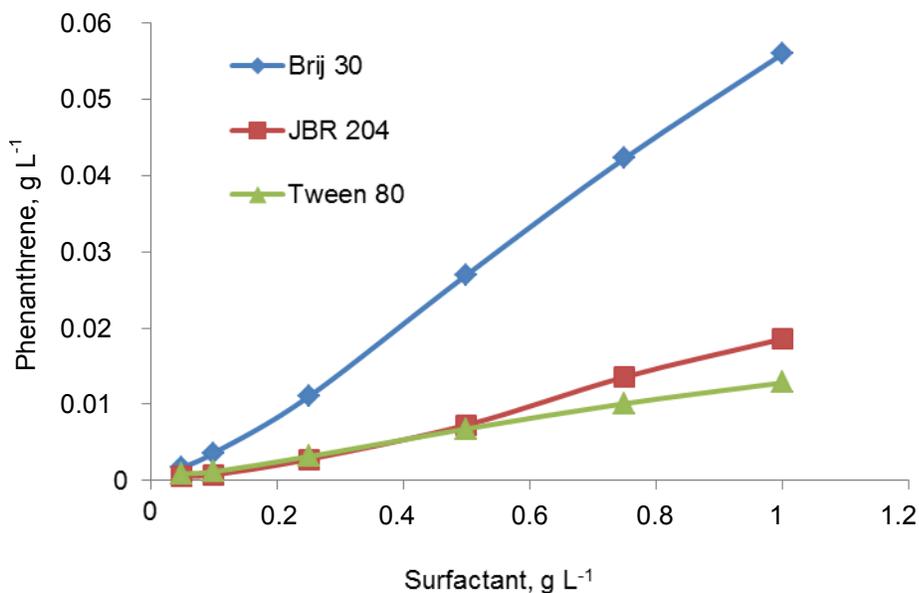
#### Weight solubilization ratio (WSR) determination.

To determine the WSR of surfactants, which is a measure of the effectiveness of a surfactant in solubilizing a given compound [10], 100 mL of phenanthrene ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) suspensions in distilled water were prepared, where surfactants were added in concentrations from 0.05 to  $1 \text{ g L}^{-1}$ . The suspensions were agitated at  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm for 24 h. Triplicate samples were taken at the end of experiments and analyzed by HPLC.

## **Results and Discussion**

### *Solubilization of phenanthrene in the presence of surfactants*

The effective solubilization of phenanthrene is one of the key steps to improve its biodegradation. Indeed, only bioavailable substrate can be degraded by microorganisms. In the case of PAHs, their bioavailability increases with the enhancement of their solubility [20]. So, in order to obtain the highest solubility of phenanthrene, three surfactants (Tween 80, Brij 30 and rhamnolipids JBR 204) were added to the culture medium and their action on phenanthrene was compared in order to define the most effective one. In our previous study [15] the efficiency of Tween 80, Brij 30 and rhamnolipids JBR 204 was estimated by comparison of concentrations of soluble phenanthrene measured after 24 h of incubation at  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in the presence of two concentrations of surfactants. It was then found that Brij 30 showed the best results. In the present study in order to get a mathematical expression of the solubilization efficiency of surfactants, the weight (or mass) solubilization ratio (WSR) was determined. WSR is defined as the weight of organic compound solubilized per unit mass of surfactant added to the solution [10]. Figure 2 shows the correlation of soluble phenanthrene concentrations with surfactant concentrations. The results indicated on this figure permit, therefore, to calculate the WSR values of Brij 30, rhamnolipids and Tween 80, expressed as g of phenanthrene/g of surfactant: the WSR values were found equal to 0.0466 g/g, 0.0135 g/g and 0.0137 g/g, respectively.



**Figure 2. Determination of weight solubilization ratio (WSR) of surfactants.** Soluble phenanthrene concentrations as the function of Brij 30 (◆), rhamnolipids JBR 204 (■) and Tween 80 (▲) concentrations.

Thus Brij 30 had the highest WSR value and it was shown that, on a mass basis, it dissolves phenanthrene in water better than the two other surfactants. The particular efficiency of Brij 30 in increasing the solubility of phenanthrene has been also reported by Aitken *et al.* [21]. Thus Brij 30 was used in further biodegradation experiments. A concentration of 0.5 g L<sup>-1</sup> was chosen since at higher Brij 30 concentrations a slight negative effect on the growth of *P. putida* DSMZ 8368 is noted [15].

### ***Biodegradation of phenanthrene by P. putida DSMZ 8368***

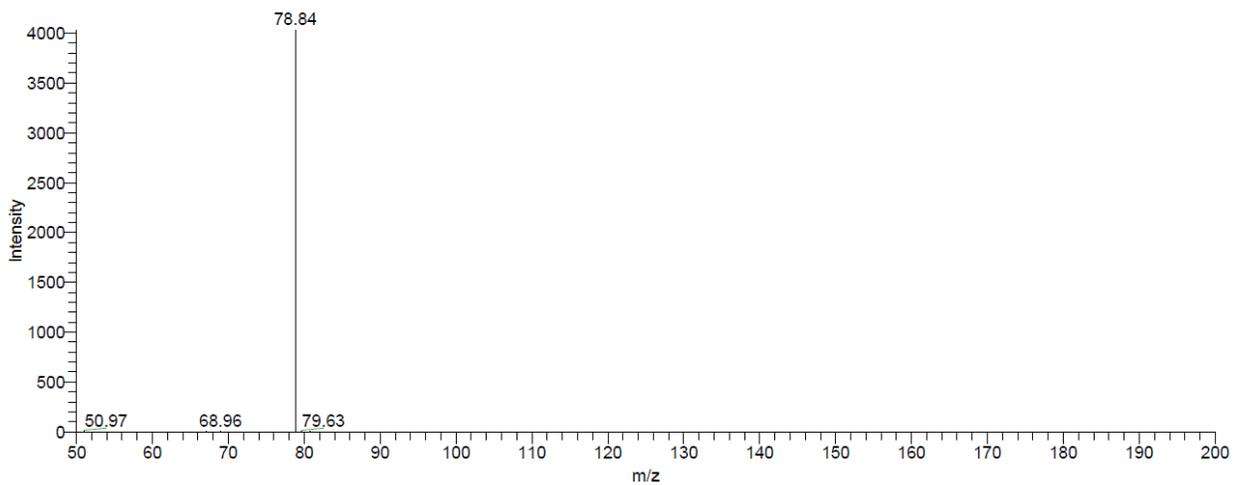
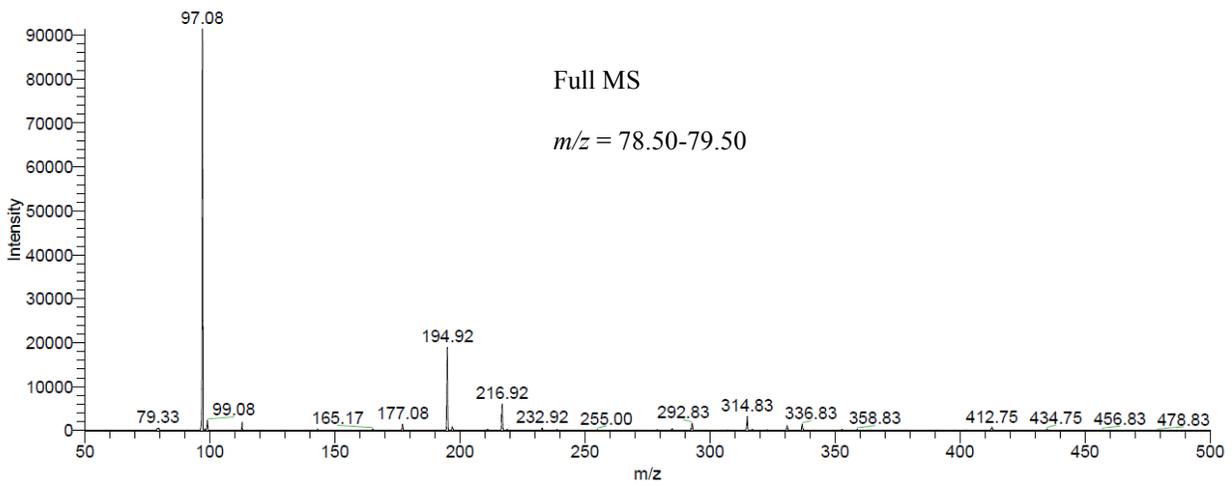
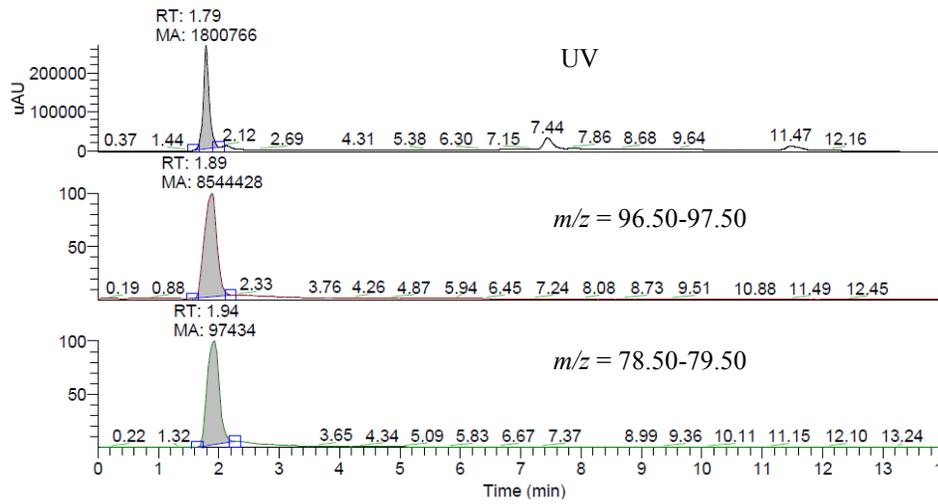
In order to study the effect of Brij 30 on biodegradation of phenanthrene by *P. putida* DSMZ 8368, cultures were carried out at 28 °C, 200 rpm with and without Brij 30. When Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) was used, a preliminary solubilization of phenanthrene at 28 °C during 24 h was carried out before inoculation. Kinetics of biomass growth, phenanthrene degradation and catabolites production were compared. The obtained values for the main parameters of these cultures concerning *P. putida* DSMZ 8368 biomass growth and phenanthrene degradation are shown in table 1.

**Table 1.** Values of principal parameters of phenanthrene biodegradation by *P. putida* DSMZ 8368 in the presence and in the absence of Brij 30.

	OD <sub>600 max</sub> (17 h)	OD <sub>600 final</sub> (60 h)	$\mu_{max}$ , h <sup>-1</sup>	q <sub>phe</sub> , $\mu\text{M h}^{-1}$
With Brij 30 (0.5 g L <sup>-1</sup> )	1.67	0.31	0.35	- 5.7
Without Brij 30	1.59	1.14	0.35	- 0.7

These results show that the growth of *P. putida* DSMZ 8368 (OD<sub>600 max</sub> and  $\mu_{max}$ ) was similar with or without Brij 30, although a toxic effect was observed OD<sub>600 max</sub> being attained. At this moment all soluble phenanthrene was degraded in both cases. The phenanthrene degradation rate was much higher when Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) was used, proving the efficiency of this surfactant in phenanthrene biodegradation by *P. putida* DSMZ 8368. This may be explained by the fact that phenanthrene partitioned into micelles of Brij 30 is directly bioavailable [22]. Similar results were reported by Liu *et al.* [23] for the biodegradation of naphthalene in the presence of Brij 30.

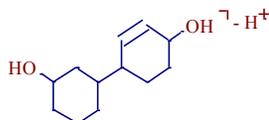
The study of the production of phenanthrene catabolites was deepened using LC-MS and HPLC. The LC-MS screening of 7 standards of PAHs, able to be either the substrate or its classical catabolites (phenanthrene, 1H2Na, salicylic acid, catechol, protocatechol, phthalic acid, 2-naphtol) showed the presence of an important quantity of 1H2Na and a trace quantity of residual phenanthrene in samples taken at 24 h of culture performed with *P. putida* DSMZ 8368 in the presence of Brij 30. HPLC measurements allowed to determine that their concentrations were about 90  $\mu\text{M}$  and less than 6  $\mu\text{M}$ , respectively. Other standard compounds were not detected in the medium. Note however that LC-MS analysis revealed the presence of some unidentified ions, most intense of them at  $m/z$  97 and 195. In order to elucidate the structure of the two ions mentioned above, the MS1 scan was followed by MS2 and MS3 scans. It should be noted that the ions at  $m/z$  97 and 195 came out just after the column dead time, that is to say, they were almost not retained. Therefore, their separation on the basis of retention time was not possible. So it was decided to establish the correlation between these ions referring to the results on full scan MS and fragmentations MS<sub>n</sub>. An example of the obtained UV and MS spectra is shown on figure 3.



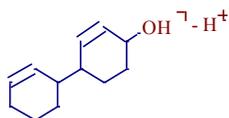
**Figure 3. UV and MS spectra of samples of culture medium taken at 24 h of phenanthrene biodegradation by *P. putida* DSMZ 8368 in the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>). Focus on the ion detected at the retention time RT = 1.9 min (ion at  $m/z$  97).**

Therefore, it was suggested that the ion at  $m/z$  97 was most probably a cyclic compound having one –OH group in its structure. The ion with  $m/z$  195 is supposed to have two C6 cycles in its structure, one of which being mono-unsaturated, and two –OH groups. The proposed hypothetic structures of the corresponding ions and their fragmentation pathway are presented on figure 4. Note however that the proposed structure of the core of the ions is hypothetic, but the fragmentation pathway of the ions (for example, dehydration of parent ions) is most probably as it is shown on figure 4.

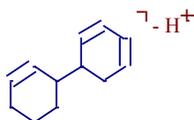
Ion 195:



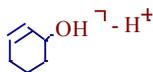
Ion 177: obtained by MS2 of ion 195 = dehydration of 195 (-18)



Ion 159: obtained by MS3 (195, 177) = dehydration of 177(-18)



Ion 97: obtained by MS3 (195, 177)



Ion 79: obtained by MS2 of ion 97 [and by MS3 (195, 177)] = dehydration of 97(-18)



**Figure 4. Proposed structures and fragmentation pathway of ions detected in samples taken at 24 h of phenanthrene biodegradation by *P. putida* DSMZ 8368 in the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>).**

It should be also noted that though some of the proposed structures are similar to the products observed during photodegradation of PAHs, abiotic controls set up for all degradation experiments showed that abiotic loss of phenanthrene was negligible (less than 2%) and no new molecules appeared in the medium during such controls. This suggests that the abovementioned ions giving intense response in LC-MS were not the products of photodegradation, but metabolites produced by *P. putida* DSMZ 8368.

It should be underlined that though the MS3 fragmentation of the parent ion at  $m/z$  195 gives the ion at  $m/z$  97, it was still supposed that the ion at  $m/z$  97 seen on the full scan was really present in the medium as a product and not as a derivative of fragmentation in the apparatus. Indeed, this ion is largely the most intense ion on the full scan. Besides, it is not the major derivative ion obtained after MS2 of the ion at  $m/z$  195. So, the fragmentation of the ion at  $m/z$  195 in the apparatus is not likely to be the only reason of such an important quantity of the ion at  $m/z$  97. These results extend earlier studies on *P. putida* DSMZ 8368 metabolism of PAHs.

In the absence of Brij 30, only 1H2Na, present in much smaller concentration than that obtained in the presence of Brij 30 (about 30 against 90  $\mu$ M), and residual phenanthrene were detected in the medium at the end of culture. It should be noted that the amount of intermediates released into liquid media depends on their diffusivity, on the concentration gradient between cell membranes and on the thickness of cell membranes [24]. In fact, it was shown by Ahn *et al.* [24] that, comparing to other phenanthrene catabolites, 1H2Na has a higher diffusivity and is therefore more easily released from bacterial cells into the culture medium. This probably explains that with or without Brij 30, 1H2Na is the major phenanthrene catabolite detected in the medium. Besides, a rapid transformation of phenanthrene to 1H2Na has an adaptive significance to bacteria [11].

### ***Biodegradation of phenanthrene by Pyr01 consortium***

The biodegradation of phenanthrene by Pyr01 consortium in the presence of Brij 30 was then studied. HPLC and LC-MS analysis performed on samples of the culture medium showed that in the presence of Brij 30 no phenanthrene catabolites, including 1H2Na, were detected in the medium during and at the end of culture (180 h). It was therefore supposed that Brij 30 was consumed preferentially to phenanthrene by Pyr01 consortium. Indeed, preferential consumption of surfactants by certain bacteria has already been reported [25]. This suggestion was also supported by the fact that though no phenanthrene catabolites were produced, soluble phenanthrene concentration reduced in time (Fig. 5),

that can be due to the decreasing surfactant concentration in the medium. A complementary experiment demonstrated that in the presence of Brij 30 as a sole carbon source a growth of Pyr01 consortium was observed, thus showing that Brij 30 can be utilized by bacteria as a carbon source. Therefore, as Brij 30 ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ) and phenanthrene were the only carbon sources of the medium and the latter was not biodegraded, the growth of Pyr01 consortium was most probably the result of the consumption of Brij 30 that confirms the suggestion its preferential utilization.

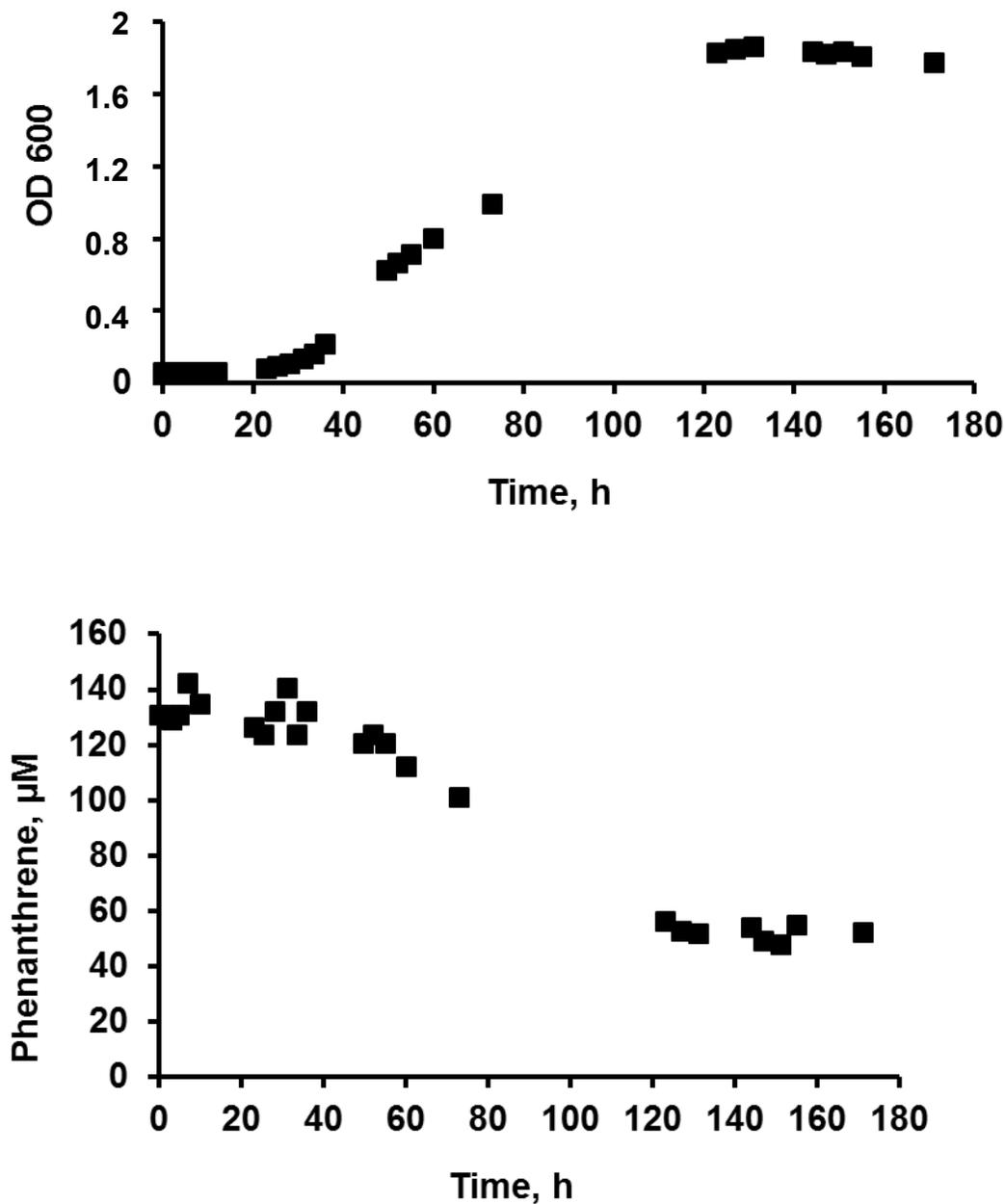


Figure 5. OD<sub>600</sub> and phenanthrene concentration curves during culture of Pyr01 consortium in the presence of Brij 30 ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ).

In the absence of Brij 30 the screening of standards of 7 PAHs mentioned above revealed the presence of small quantities of phenanthrene in samples taken at the end of culture (180 h) and the absence of other standard PAHs molecules. The presence of intense ions at  $m/z$  97, 195 and 293 was detected in the medium. Therefore, phenanthrene degradation pathway of Pyr01 consortium has several common catabolites with that of *P. putida* DSMZ 8368. It should be, however, noted that, contrary to *P. putida* DSMZ 8368 biodegradation of phenanthrene, the abovementioned common ions were already detectable in the culture medium of the Pyr01 consortium in the absence of Brij 30. This may be due to the fact that the consortium produces its proper surface-active molecules that render phenanthrene catabolites more soluble. Indeed, the release of biosurfactants and extracellular polymeric substances by microbial consortia during biodegradation of PAHs has already been mentioned [26,27]. Nevertheless, concentrations of phenanthrene intermediates, estimated by the area of the corresponding peaks, produced by the Pyr01 consortium and common with those of *P. putida* DSMZ 8368 were much lower than in the case of phenanthrene biodegradation by *P. putida* DSMZ 8368 in the presence of Brij 30 ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ). It can be, therefore, concluded that even if there are some similarities in phenanthrene biodegradation of *P. putida* DSMZ 8368 and the Pyr01 consortium, the effect of Brij 30 on them is quite different.

## Conclusion

It was demonstrated that Brij 30 could be efficiently used in order to increase the solubility of phenanthrene. However, the interaction of this surfactant with *P. putida* DSMZ 8368 and mixed consortium of microorganisms is not the same and may either enhance or retard phenanthrene biodegradation. In the case of *P. putida* DSMZ 8368, the biodegradation of phenanthrene was enhanced, though a toxic effect on biomass occurred. As for the mixed Pyr01 bacterial consortium, Brij 30 was preferentially consumed rather than phenanthrene. These results extend earlier studies on bacterial metabolism of PAHs in the presence and in the absence of a surfactant. They suggest that a close study of the interaction of surfactants with pure or mixed bacterial cultures is crucial for the optimization of PAHs biodegradation processes.

## Acknowledgements

This research was supported by the French Embassy in Russia, Institut Carnot ICEEL and GISFI. We thank Pierre Peyret for information about strains in the Pyr01 consortium.

## References

- [1] Chauhan A, Fazlurrahman, Oakeshott JG and Jain RK, Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian J Microbiol* **48**:95-113 (2008).
- [2] Cerniglia CE, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**:351-368 (1992).
- [3] Haritash AK and Kaushik CP, Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater* **169**:1-15 (2009).
- [4] Balashova NV, Kosheleva IA, Golovchenko NP and Boronin AM, Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. *Process Biochem* **35**:291-296 (1999).
- [5] Woo SH and Rittmann BE, Microbial energetics and stoichiometry for biodegradation of aromatic compounds involving oxygenation reactions. *Biodegradation* **11**:213-227 (2000).
- [6] Evans WC, Fernley HN and Griffiths E, Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads: the ring fission mechanism. *Biochem J* **95**:819-831 (1965).
- [7] Barnsley EA, Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-carboxybenzalpyruvate. *J Bacteriol* **154**:113-117 (1983).
- [8] Adachi K, Iwabuchi T, Sano H and Harayama S, Structure of the ring cleavage product of 1-hydroxy-2-naphthoate, an intermediate of the phenanthrene-degradative pathway of *Nocardioides* sp. Strain KP7. *J Bacteriol* **181**:757-763 (1999).
- [9] Samanta SK, Chakraborti AK and Jain RK, Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**:98-107 (1999).
- [10] Swe MM, Yu LE, Hung KC and Chen BH, Solubilization of selected polycyclic aromatic compounds by nonionic surfactants. *J Surfact Deterg* **9**:237-244 (2006).

- [11] Guerin WF and Jones GE, Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* **54**:929-936 (1988).
- [12] Laha S and Luthy RG, Inhibition of phenanthrene mineralization by non-ionic surfactants in soil-water systems. *Environ Sci Technol* **25**:1920-1930 (1991).
- [13] Zhang Y, Maier W and Miller R, Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. *Environ Sci Technol* **31**:2211-2217 (1997).
- [14] Avramova T, Sotirova A, Galabova D and Karpenko E, Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. *Int Biodeter Biodegr* **62**:415-420 (2008).
- [15] Pantsyrnaya T, Blanchard F, Delaunay S, Goergen JL, Guédon E, Guseva E and Boudrant J, Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media. *Chemosphere* **83**:29-33 (2011).
- [16] Deschenes L, Lafrance P, Villeneuve JP and Samson R, The effect of an anionic surfactant on the mobilization and biodegradation of PAHs in a creosote-contaminated soil. *Hydrolog Sci J* **40**: 471-484 (1995).
- [17] Christofi N and Ivshina IB, Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J Appl Microbiol* **93**:915-929 (2002).
- [18] Jin D, Jiang X, Jing X and Ou Z, Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. *J Hazard Mater* **144**:215-221 (2007).
- [19] Yamamoto S and Harayama S, Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int J Syst Bacteriol* **48**:813-819 (1998).

- [20] Bamforth SM and Singleton I, Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol* **80**:723-736 (2005).
- [21] Aitken MD, Grimberg SJ, Nagel J, Nagel RD and Stringfellow WT, Bacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and potential effects of surfactants on PAH bioavailability. Water Resources Research Institute of the University of North Carolina, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, p. 82 (1996).
- [22] Guha S and Jaffé PR, Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ Sci Technol* **30**:605-611(1996).
- [23] Liu Z, Jacobson AM and Luthy RG, Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. *Appl Environ Microbiol* **61**:145-151 (1995).
- [24] Ahn CK, Woo SH, Lee DS and Park JM, Mathematical evaluation of intermediates accumulation during microbial phenanthrene degradation. *Korean J Chem Eng* **23**:415-418 (2006).
- [25] Kim HS and Weber WJ Jr, Preferential surfactant utilization by a PAH-degrading strain: effects on micellar solubilization phenomena. *Environ Sci Technol* **37**:3574-3580 (2003).
- [26] Johnsen AR, Wick LY and Harms H, Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* **133**:71-84 (2005).
- [27] Li X, Li P, Lin X, Zhang C, Li Q and Gong Z, Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *J Hazard Mater* **150**:21-26 (2008).

## **Conclusion**

Bien qu'il ait été montré que l'utilisation du Brij 30 (0,5 g/L) permet d'augmenter la solubilité du phénanthrène et d'améliorer sa biodégradation par *P. putida* DSMZ 8368, son effet sur le consortium microbien mixte Pyr01 n'est pas le même. Une consommation préférentielle de ce tensioactif au détriment du phénanthrène a été observé. L'étude comparative des métabolites produits par *P. putida* DSMZ 8368 et le consortium Pyr01 au cours des cultures en présence du phénanthrène comme source de carbone a été effectuée. Ainsi, les résultats obtenus dans ce chapitre montrent que l'étude préliminaire de l'effet des tensioactifs sur les souches pures ou mixtes est nécessaire afin de pouvoir appliquer ou non ces tensioactifs dans la biodégradation des HAP de manière efficace.

## **CHAPITRE 3 :**

### **Solubilisation et biodégradation du phénanthrène au point de trouble**

## Introduction

La plupart des surfaces de bactéries sont chargées négativement et les tensioactifs cationiques, tels que les composés d'ammonium quaternaire par exemple, ont généralement une activité bactéricide. Les tensioactifs non ioniques, tels que les éthoxylates d'alcool linéaires, sont biodégradables et montrent une faible toxicité en milieux aqueux vis-à-vis de bactéries (Dorn *et al.*, 1993). Cependant, les tensioactifs non ioniques peuvent avoir un effet toxique dû à l'extraction des lipides de la membrane cellulaire par ces molécules (Miozzari *et al.*, 1978). Ils restent tout de même plus biocompatibles que les tensioactifs ioniques. Il a été montré que la séparation des phases au point de trouble des tensioactifs non ioniques améliorerait leur biocompatibilité (Wang et Dai, 2010). De plus, le phénomène d'agrégation des micelles des tensioactifs non ioniques en « super micelles » au point de trouble représente une perspective intéressante en vue de l'amélioration de la solubilité et probablement aussi de la biodégradation des HAP.

L'utilisation de la CPE dans le domaine de la préconcentration et de l'extraction des HAP possède un grand potentiel (Bai *et al.*, 2001). Trois applications des systèmes au point de trouble aux procédés des transformations microbiennes ont été récemment rapportées (Zhang *et al.*, 2008 ; Pan *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010). Pourtant, l'utilisation de ce type de procédés en biotechnologie commence juste à être étudiée. A notre connaissance, actuellement, il n'existe aucune donnée publiée sur son application dans la biodégradation des HAP.

Contrairement à Zhang *et al.* (2008), Pan *et al.* (2010) et Wang *et al.* (2010) qui ont élaboré leur procédés des biotransformations dans des systèmes au point de trouble, nous avons choisi une approche différente. En effet, malgré les avantages qu'offrent ce type de système, un problème se pose si on les applique aux milieux de fermentation. Sachant que le point de trouble des tensioactifs est influencé par les additifs présents dans le milieu (Wang et Dai, 2010), les changements des concentrations en sels, en substrat carboné et en catabolites au cours de la croissance cellulaire peuvent provoquer la rupture du système (Wang, 2007). Il est donc primordial d'assurer le contrôle permanent de la composition des phases au point de trouble. En outre, l'analyse conventionnelle de la concentration en biomasse par spectrophotométrie est impossible à cause du trouble lié aux tensioactifs dans ces systèmes.

Pour éviter ce genre de complications et garder les avantages des systèmes au point de trouble, nous avons décidé d'étudier l'effet du « passage » temporaire par le point de trouble du Brij 30 sur la

solubilité et la biodégradation du phénanthrène. Il faut préciser que le processus de séparation des solutions micellaires de tensioactifs non ioniques en deux phases au point de trouble est réversible avec l'abaissement de la température.

Le comportement des micelles dans des solutions aqueuses de certains tensioactifs non ioniques en fonction de la température a été étudié (Olsson *et al.*, 1986). Par contre à notre connaissance, les changements de la solubilité des substances incorporées dans les micelles, des HAP en particulier, au cours de ces changements de température n'ont pas été documentés.

Les résultats de notre étude sont présentés en forme d'un projet de manuscrit.

**Manuscrit en préparation :**

**“Solubilization of phenanthrene above cloud point of Brij 30: a new application in biodegradation”.**

# Solubilization of phenanthrene above cloud point of Brij 30: a new application in biodegradation.

T. Pantsyrnaya<sup>\*(1,2)</sup>, S. Delaunay<sup>(1)</sup>, J.L. Goergen<sup>(1)</sup>, E. Guédon<sup>(1)</sup>, E. Guseva<sup>(2)</sup>, J. Boudrant<sup>(1)</sup>.

(1) Laboratoire Réactions et Génie des Procédés UPR CNRS 3349, Nancy-Université, ENSAIA – 2, avenue de la Forêt de Haye, 54505, Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

(2) Faculty of High Resource-Saving and Information Technologies, D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, ul. Geroev Panfilovcev, 20, Moscow, 123480, Russia.

## Abstract

In the present study a new application of solubilization of phenanthrene above cloud point of Brij 30 in biodegradation was developed. It was shown that a temporal solubilization of phenanthrene above cloud point of Brij 30 (5 % wt) permitted to obtain a stable increase of the solubility of phenanthrene even when the temperature was decreased to culture conditions of used microorganism *Pseudomonas putida* (28 °C). A higher concentration of bioavailable phenanthrene was thus obtained in the fermentation medium which resulted in a more complete mineralization. A temporal solubilization at cloud point might have a perspective application in the enhancement of PAHs biodegradation.

Keywords: cloud point, surfactant, phenanthrene, biodegradation.

## 1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are emitted as by-products of combustion processes that can be of natural origin or associated with human activities (Bamforth and Singleton, 2005). They have earned considerable attention because of their widespread distribution in the environment and toxic, mutagenic and carcinogenic properties of a great number of them. Much information is available on the biological degradation of PAHs and some extensive reviews exist (Cerniglia, 1992; Chauhan *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2008; Haritash and Kaushik, 2009). Biodegradation is considered to be the major process of their elimination (Chauhan *et al.*, 2008). However, bioremediation of PAHs is often limited by their low water solubility and tendency to adsorb to solids. Many techniques were therefore developed in order to increase the bioavailability and the biodegradation of PAHs. One of efficient and in most cases environmentally friendly methods is the use of surfactants.

Great success has been achieved with a relatively recent surfactant-based method used to preconcentrate and to extract low concentrations of PAHs from aqueous media (Bai *et al.*, 2001). This method is cloud-point extraction (CPE) based on the clouding phenomenon of surfactants and usually bringing in a preconcentration factor about a few tens. The cloud-point temperature (CPT) is a specific temperature at which micellar solution of a weakly polar surfactant, such as nonionic or zwitterionic surfactant, becomes turbid (Hinze and Pramauro, 1993). It undergoes phase separation into a surfactant-rich liquid phase and an almost micelle-free aqueous solution where surfactant concentration is equal to critical micelle concentration (CMC or the concentration at which surfactant monomers begin to assemble to ordered colloidal aggregates or micelles) at this temperature. This two-phase system is called a cloud point system (CPS) (Hinze and Pramauro, 1993). Above the CPT the hydrophobic components, such as PAHs, initially present in the solution and bound to micelles will be favorably extracted to the surfactant-rich phase, leaving only a very small portion in the diluted phase. The phase separation is reversible. When the mixture is cooled to the temperature below the CPT, these two phases merge to form a clear phase again (Bai *et al.*, 2001). More and more attention has been paid to this technique as water is generally utilized as the main solvent in it, in contrast to the massive use of volatile and flammable organic solvents in conventional liquid-liquid extraction.

CPS recently showed its potential for utilization as a novel two-phase partitioning system for biotransformation (Wang *et al.*, 2005, Wang, 2007). It was used for the first time by Wang *et al.* (2004) in biotransformation of cholesterol. Another application of CPS in the production of L-phenylacetylcarbinol was described by Zhang *et al.* (2008). The first report about extractive fermentation of lipase in CPS was done by Pan *et al.* (2010). To our knowledge CPS has never been used in the biodegradation of PAHs.

For biotransformation purposes the CPS is in its infancy and needs further study. As the cloud point of aqueous surfactant micelle solution is sensitive to additives (Wang and Dai, 2010), with the change of concentrations of substrate, nutrients and catabolites in the culture medium the breakdown of this system may occur (Wang, 2007). It is therefore of major importance to control the phase composition in CPS. Moreover, the turbidity in CPS makes the conventional biomass concentration analysis with a spectrophotometer impossible. We decided therefore to study a different application of the CPS than those proposed by Wang *et al.* (2004) and Zhang *et al.* (2008) in order to keep their advantages and to eliminate the drawbacks mentioned above. The aim of the present work is to study the effect of a temporal cloud-point solubilization of phenanthrene on its biodegradation by *Pseudomonas putida*

DSMZ 8368. Phenanthrene was chosen as a model PAH as it is commonly present in PAHs pollutions and is listed as one of priority pollutants by US EPA (1997). To our knowledge this is the first report on the application of CPS for phenanthrene biodegradation.

## 2. Material and methods

All the chemicals were purchased at Sigma, France, except acetonitrile that was purchased at Carlo Erba, France.

The microorganism used in phenanthrene biodegradation experiments was *P. putida* DSMZ 8368 pure strain known to degrade PAHs. The culture of *P. putida* DSMZ 8368 was performed in Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 60 mL of mineral medium (Brunner) MMB No. 457 (Yamamoto and Harayama, 1998) supplemented with 5 g L<sup>-1</sup> of ammonium sulfate to promote the biomass growth and autoclaved during 20 min at 121 °C. Glucose (50 g L<sup>-1</sup>) added after autoclaving was used as carbon source in pre-culture flasks and phenanthrene (50 mg L<sup>-1</sup>) was used as carbon source in culture flasks. The culture was carried out on an agitation table at 28 °C, at 200 rpm. The cell growth was determined by OD<sub>600</sub> measurements with the help of a Hitachi U-2000 spectrophotometer (Science Tec).

Quantitative analysis of phenanthrene and of its catabolites was performed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan). Standard solutions of phenanthrene and of its catabolites were prepared in pure acetonitrile (HPLC quality). The column used was Vydac 201TP 5215, 0.21 cm x 15 cm. The injection volume was 1 µL, the elution rate was 0.2 mL min<sup>-1</sup> with two mobile phases: phase A was MilliQ water acidified to pH = 2 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; phase B was pure acetonitrile. Two detectors (fluorescence and UV) were used. For phenanthrene and 1-hydroxy-2-naphthoic acid (1H2Na), the excitation and emission wave lengths were 248 and 365 nm, and 310 and 410 nm, respectively. Phenanthrene and 1H2Na were extracted from the culture medium using acetonitrile. The samples were diluted in acetonitrile about 2 to 10 times.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Solubilization of phenanthrene above cloud point of Brij 30

#### 3.3.1. Solubilization of phenanthrene by Brij 30 (5 % wt) at 60 °C

Most of the bacteria surfaces are negatively charged and thus cationic surfactants, such as quaternary ammonium compounds, are usually bactericides. Nonionic surfactants, such as linear alcohol ethoxylates, are generally biodegradable and show low toxicity to microorganisms. However, nonionic

surfactants can be toxic because of the extraction of lipids from cell membranes (Dorn *et al.*, 1993). They still are more appropriate to be used in fermentation media than the ionic surfactant. Moreover, nonionic surfactants provide the best general solubilization medium for the widest variety of solutes (Quina and Hinze, 1999). A non-ionic surfactant, Brij 30, was therefore chosen. This surfactant has been reported to be efficient in solubilization of phenanthrene due to its relatively important micelle core diameter if compared to other conventional surfactants used in surfactant-enhanced biodegradation of PAHs (Aitken *et al.*, 1996). Solubilization is defined as a preparation of a thermodynamically stable isotropic solution of a substance normally insoluble or very slightly soluble in a given solvent by an introduction of an additional amphiphilic compound or components (Mackay, 1987).

Solubilization of phenanthrene in the presence and in the absence of Brij 30 at 60 °C was studied. Brij 30 was used at 5 % wt since a slight negative effect on the growth of *P. putida* DSMZ 8368 is noted at higher Brij 30 concentrations (Pantsyrnaya *et al.*, 2011). The temperature of 60 °C was chosen because clouding phenomenon was observed in the culture medium at this temperature in the presence of Brij 30 5 % wt. Moreover, without surfactants a temperature increase was reported to improve the solubility of phenanthrene in aqueous media (Viamajala *et al.*, 2007). When the temperature was increased from 20 to 60 °C, a higher rate of dissolution and a higher solubility of several PAHs (including phenanthrene) were observed, the maximal values being reached at 60 °C (Viamajala *et al.*, 2007). Taking into account that the optimal growth temperature for *P. putida* DSMZ 8368 is 28 °C, the thermal treatment of the phenanthrene-containing medium at 60 °C (chosen as high temperature value) was followed by a decrease in temperature down to 28 °C. Results of these experiments are presented in table 1.

Table 1. Solubility of phenanthrene as the function of temperature in the presence and in the absence of Brij 30.

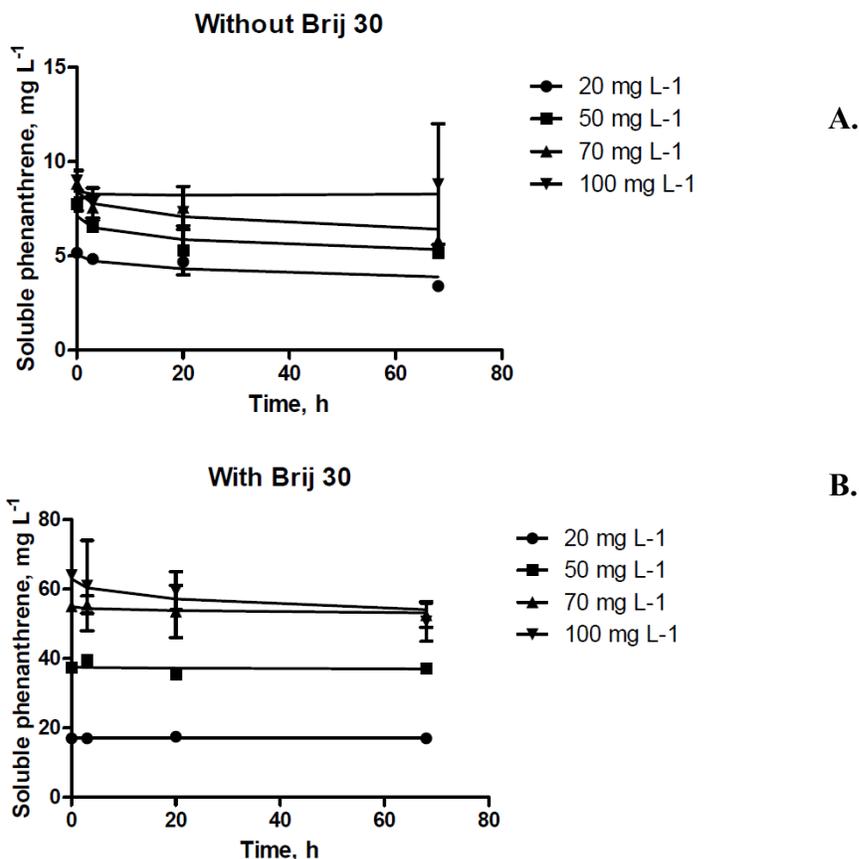
	28 °C (24 h)	60 °C (24 h)	28 °C (24 h) after solubilization at 60 °C for 24 h
Without Brij 30	1.5 ± 0.1 mg L <sup>-1</sup>	6.0 ± 0.5 mg L <sup>-1</sup>	1.8 ± 0.5 mg L <sup>-1</sup> .
With Brij 30 (5 % wt)	18 ± 2 mg L <sup>-1</sup>	30 ± 2 mg L <sup>-1</sup>	30 ± 2 mg L <sup>-1</sup>

The results indicate that the solubility of phenanthrene in distilled water without Brij 30 reaches 6.0 ± 0.5 mg L<sup>-1</sup> at 60 °C, 200 rpm. These results are in agreement with data obtained by Viamajala *et al.* (2007). Lowering the temperature to 28 °C provokes a sharp decrease in phenanthrene solubility to the

value of  $1.8 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ . Thus it can be concluded that a temporary heat treatment of phenanthrene at  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  without Brij 30 did not improve its solubility. On the contrary, in the presence of Brij 30 (5 % wt) the solubility of phenanthrene at  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  was as high as  $30 \text{ mg L}^{-1}$  and remained stable when temperature was decreased to  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . The higher solubility of phenanthrene in the presence of Brij 30 (5 % wt) at  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  may occur be due to temperature anomalies of this surfactant above cloud point. Indeed, for nonionic oxyethylene surfactants greater micelles were observed when temperature was risen (Lindman and Karlström, 2009). If similarly greater micelles of Brij 30 (5 % wt) were obtained at  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , more phenanthrene could be therefore solubilized. So it may be interesting to perform a preliminary incubation of phenanthrene-containing medium at  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in the presence of a surfactant, e.g. Brij 30 (5 % wt), in order to get a better solubility: here around 30, instead of  $18 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 3.3.2. Solubilization of phenanthrene by Brij 30 (5 % wt) after autoclaving

A stable solubilization of phenanthrene by Brij 30 (5 % wt) was also obtained after autoclaving, solutions being cooled to  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Fig. 1). These results confirm the stable solubilization of phenanthrene by Brij 30 (5 % wt) after lowering the temperature once treated during a certain period above CPT (autoclaving at  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 min). They also indicate that there is most probably a limit of phenanthrene being able to be incorporated in larger micelles of Brij 30 formed above CPT, which is likely to be correlated with the diameter of formed micelles. Indeed, it can be observed that when  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of phenanthrene is added to the medium in the presence of Brij 30 (5 % wt) its solubility after lowering the temperature is not stable as in the case of other phenanthrene concentrations (Fig. 1B). It should be noted that there is a number of studies on the solubility of poorly soluble compounds at CTP. For example, the increase of the solubilization of phenol from 2.9 moles per mole of surfactant in the dilute phase to 7.5 moles per mole of surfactant in the coacervate phase (surfactant-rich phase) was reported (Wang *et al.*, 2003), this being explained by the differences in structure of supramolecular assemblies of the surfactant. Other studies are relevant to the changes of surfactant micelles structures below and above CPT (Toerne *et al.*, 2001). However to our knowledge, the studies on changes of the solute solubility after lowering the temperature after a temporal solubilization at CPT were not reported.



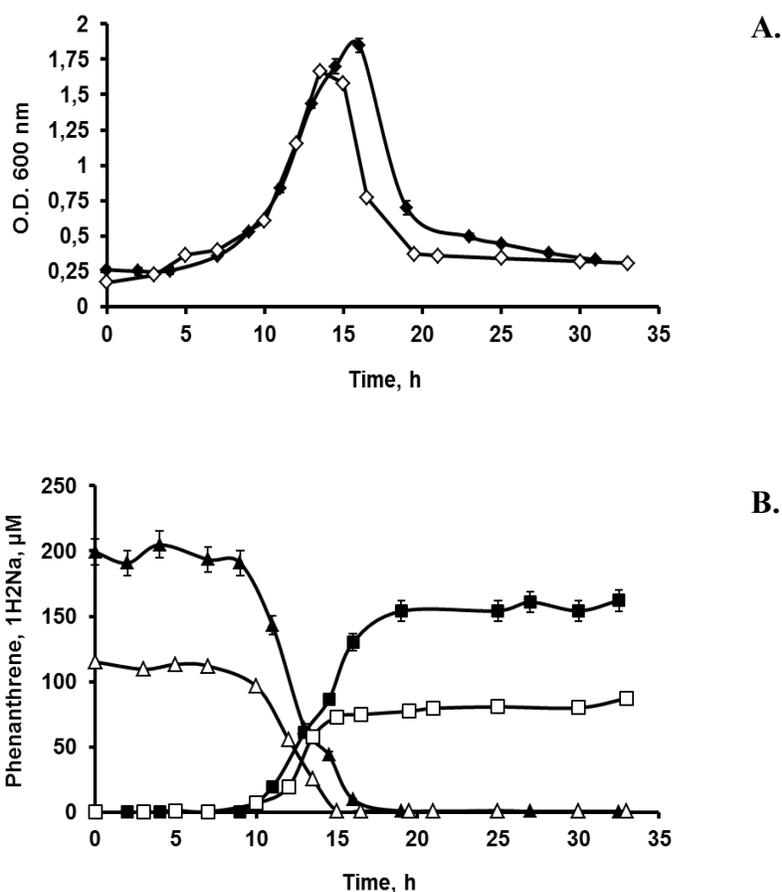
**Figure 1.** Soluble phenanthrene concentration in the absence (A) and in the presence (B) of Brij 30 after autoclaving (121 °C, 20 min), solutions being cooled to 28 °C. Initial concentrations of solid phenanthrene added to the medium were 20, 50, 70 and 100 mg L<sup>-1</sup>.

Temporal solubilization of phenanthrene above cloud point of Brij 30 during autoclaving may therefore have a potential application for biodegradation experiments in sterile conditions (for example, in flasks and bioreactors). However it should be noted that rather important volatilization of phenanthrene occurred during autoclaving (in some cases up to 20 %), so abiotic loss should be taken in consideration.

### 3.2. Phenanthrene degradation by *P. putida* DSMZ 8368

As suggested above, a preliminary temporary heating of phenanthrene-containing medium in the presence of Brij 30 (5 % wt) above its cloud point could result in a better phenanthrene biodegradation. Both heating at 60 °C for 24 h and autoclaving result in a significant increase of phenanthrene solubility. Taking into consideration the possible further practical application of such a treatment in depollution of effluents or PAHs-contaminated water, it was decided to investigate the effect of a

preliminary temporary heating step at 60 °C for 24 h on phenanthrene biodegradation. Indeed, autoclaving is not well suited to large water volume processing, whereas high temperature treatment seems quite possible, especially taking into account that industrial effluents are often discharged at temperatures ranging from 50 to 130 °C (Feitkenhauer *et al.*, 2003). So to verify this hypothesis a kinetic of phenanthrene degradation by *P. putida* DSMZ 8368 was performed using a preliminary temporary heating step at 60 °C for 24 h done before inoculation with bacteria and followed by a decrease in temperature to 28 °C and compared to that without CPT treatment (Fig. 2).



**Figure 2. Kinetics of phenanthrene (50 mg L<sup>-1</sup>) degradation by *P. putida* DSMZ 8368 in the presence of Brij 30 (5 % wt) with and without CPT treatment. A. Kinetics of biomass of *P. putida* DSMZ 8368 on phenanthrene (50 mg L<sup>-1</sup>) solubilized by Brij 30 (5 % wt) with (◆) and without CPT treatment (◇). B. Kinetics of phenanthrene (▲, △) and 1-hydroxy-2-naphthoic acid (1H2Na) (■, □) concentrations during batch cultures of *P. putida* DSMZ 8368. Full symbols represent biodegradation of phenanthrene solubilized by Brij 30 (5 % wt) with CPT treatment. Empty symbols represent biodegradation of phenanthrene without CPT treatment.**

Results indicated that while biomass growth was similar with and without treatment above cloud point of Brij 30, a higher initial concentration of soluble phenanthrene (200 against 120  $\mu\text{M}$ ) and a higher final concentration of 1H2Na (160 against 85  $\mu\text{M}$ ) were measured in the culture medium after a thermal treatment above CPT (Fig. 2). More phenanthrene was therefore metabolized by *P. putida* DSMZ 8368. It can be also seen that the rates of phenanthrene degradation and 1H2Na production are higher in the case of the CPT treated medium. The application of cloud point systems has been reported to enhance the utilization of water insoluble substrates such as steroids and to result in higher final product concentrations (Wang *et al.*, 2005). In a similar way the present study shows that a temporal treatment of the medium above CPT enhanced phenanthrene biodegradation. As the low water solubility of PAHs limits their bioremediation (Chauhan *et al.*, 2008), a temporal solubilization at cloud point, which increases substrate solubility, might have a perspective new application in the enhancement of PAHs biodegradation.

#### **4. Conclusions**

In the present study a stable increase of the solubility of phenanthrene (PAH model) in aqueous media was obtained by applying a temporal cloud-point solubilization in the presence of Brij 30 (5 % wt). It allowed to attain more phenanthrene metabolized by *P. putida* DSMZ 8368 as well as a higher rate of its biodegradation. This study proposes a new promising way to enhance the biodegradation of PAHs in aqueous media.

#### **5. Acknowledgements**

This research was supported by the French Embassy in Russia, Institut Carnot ICEEL and GISFI.

#### **6. References**

Aitken, M.D., Grimberg, S.J., Nagel, J., Nagel, R.D., Stringfellow, W.T. Bacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and potential effects of surfactants on PAH bioavailability. Water Resources Research Institute of the University of North Carolina, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, 1996, p. 82.

Bai, D., Li, J., Chen, S.B., Chen, B.-H., 2001. A novel cloud-point extraction process for preconcentrating selected polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution. *Env. Sci. Technol.* 35, 3936-3940.

- Bamforth, S.M., Singleton, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 723–736.
- Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J.G., Jain, R.K., 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48, 95-113.
- Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351-368.
- Dorn, P., Salanitro, J.O., Evans, A., Kravetz, L., 1993. Assessing the aquatic hazard of some branched and linear nonionic surfactants by biodegradation and toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1751-1762.
- Feitkenhauer, H., Muller, R., Markl, H., 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60 - 70 °C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation* 14, 367–372.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1-15.
- Hinze, W.L., Pramauro, E., 1993. A critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud-point extraction): theory and applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24, 133–77.
- Lindman, B., Karlström, G., 2009. Nonionic polymers and surfactants: Temperature anomalies revisited. *Comptes Rendus Chimie* 12, 121-128.
- Mackay, R.A., 1987. Solubilization. In: Schick, M.J. (ed.) *Nonionic surfactants physical chemistry*. Marcel Dekker, New York, p. 297.
- Pan, T., Wang, Z., Xu, J.-H., Wu, Z., Qi, H., 2010. Extractive fermentation in cloud point system for lipase production by *Serratia marcescens* ECU1010. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1789–1796.

Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J.L., Guédon, E., Guseva, E., Boudrant, J., 2011. Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media. *Chemosphere* 83, 29-33.

Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S., Yao, Q.-H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 927–955.

Quina, F.H., Hinze, W.L., 1999. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 4150-4168.

Toerne, K., Rogers, R., von Wandruszka, R., 2001. Thermal stability of nonionic surfactant aggregates. *Langmuir* 17, 6119-6121.

US EPA, Code of Federal Regulation, Title 40, Part 60, Subparts D, Da, Db, Dc, Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1997, 44.

Viamajala, S., Peyton, B.M., Richards, L.A., Petersen, J.N., 2007. Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions. *Chemosphere* 66, 1094–1106.

Wang, Z., 2007. The potential of cloud point system as a novel two-phase partitioning system for biotransformation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1–10.

Wang, Z., Dai, Z., 2010. Extractive microbial fermentation in cloud point system. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 407–418.

Wang, Z., Zhao, F., Chen, D., Li, D., 2005. Cloud point system as a tool to improve the efficiency of biotransformation. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 589-594.

Wang, Z., Zhao, F., Hao, X., Chen, D., Li, D., 2004. Microbial transformation of hydrophobic compound in cloud point system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 27, 147–153.

Wang, Z., Zhao, F., Li, D., 2003. Determination of solubilization of phenol of coacervate phase in cloud point extraction. *Colloid. Surf. A* 216, 207–214.

Yamamoto, S., Harayama, S., 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 813-819.

Zhang, W., Wang, Z., Li, W., Zhuang, B., Qi, H., 2008. Production of L-phenylacetylcarbinol by microbial transformation in polyethylene glycol-induced cloud point system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 233–239.

## **Conclusion**

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que l'utilisation du phénomène du point de trouble en tant qu'une nouvelle technique possède un potentiel pour améliorer la biodégradation des HAP. En effet, elle permet d'augmenter la solubilité du phénanthrène de façon stable même après le refroidissement du milieu (ceci jusqu'à 28 °C dans le cas de cette étude). En outre, les résultats présentés montrent que davantage de phénanthrène a été dégradé par *P. putida* DSMZ 8368 grâce au traitement temporaire (24 h) du milieu de culture au dessus du point de trouble du Brij 30.

## **DISCUSSION GENERALE**

## **DISCUSSION GENERALE**

Ce projet s'inscrit dans la domaine d'application visant à apporter les solutions à la contamination de l'environnement par les HAP. En effet, les HAP sont des polluants très répandus. De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre la dégradation des HAP, mais la plupart d'entre elles concerne la remédiation des sols pollués par les HAP et peu de travaux parle de la biodégradation des HAP dans les milieux aqueux. En outre, la majorité des études se limite à l'influence de certains paramètres sur la biodégradation, tels que le pH, la température, les nutriments et l'ajout des tensioactifs. A ce jour aucune tendance générale n'a été établie à partir des résultats correspondants.

Cette thèse visait à mieux comprendre la dissolution et la biodégradation d'un HAP modèle (le phénanthrène) dans les milieux aqueux par une souche pure, à améliorer l'efficacité des procédés correspondants et enfin, à appliquer le procédé amélioré à la dégradation de cet HAP par un consortium microbien. Afin de mieux répondre à l'aspect environnemental de ce sujet, la technologie « verte » de dégradation des HAP, la biodégradation, a été choisie, l'utilisation des solvants organiques a été minimisé et les tensioactifs retenus sont biodégradables. L'originalité de ce travail réside dans l'approche multidisciplinaire du problème. En effet, une étude physico-chimique ayant pour objectif de minimiser la limitation de biodégradation du phénanthrène due à la faible solubilité de ce dernier a été mise en œuvre. L'aspect microbiologique a ensuite été pris en considération : la toxicité et la possible consommation des tensioactifs par les microorganismes ont été déterminées ; plusieurs compositions du milieu de culture ont été testées ; les paramètres cinétiques de croissance et de biodégradation ont été comparés.

### **1. Augmentation de la solubilité et de la biodisponibilité des HAP**

La dégradation des HAP par des microorganismes est le processus majeur de leur élimination (Haritash et Kaushik, 2009). Cependant, la faible solubilité de ces polluants est un facteur limitant leur biodégradation. La persistance des polluants dans l'environnement est également lié à leur biodisponibilité (Bamforth et Singleton, 2005). De ce fait, plusieurs approches ont été étudiées afin d'améliorer la solubilité et la biodisponibilité des HAP.

La biodisponibilité peut être définie comme l'effet de facteurs physico-chimiques et microbiologiques sur le taux et la vitesse de biodégradation (Mueller *et al.*, 1996). On dit qu'un composé est biodisponible quand il est accessible directement ou indirectement pour le métabolisme cellulaire.

Généralement, on retrouve dans la littérature les travaux qui portent sur l'utilisation de tensioactifs afin d'augmenter la solubilité et la biodisponibilité des HAP. En effet, la solubilité des HAP augmente linéairement avec la concentration de tensioactifs au-dessus de la CMC (Edwards *et al.*, 1991). Néanmoins, les résultats sur l'effet de tensioactifs sur la biodisponibilité des HAP obtenus jusqu'à présent ont été contradictoires. Ceci s'explique en partie par l'absence de méthodes appropriées de détermination de répartition des HAP entre la phase liquide, les micelles et les microorganismes (Wang, 2011). Ainsi certains auteurs affirment que les HAP sont biodisponibles dans les micelles de tensioactifs (Guha et Jaffé, 1996), tandis que d'autres suggèrent que les HAP micellisés ne sont pas biodisponibles directement et que l'efficacité de la biodégradation en présence de tensioactifs augmente uniquement grâce à l'amélioration de la dissolution des HAP (Wang, 2011). La recherche bibliographique a également montré que l'effet de tensioactifs sur les microorganismes appartenant aux espèces différentes n'est pas le même. D'après nos résultats, le Brij 30 permet d'augmenter considérablement la solubilité du phénanthrène et d'améliorer sa biodégradation par *P. putida* DSMZ 8368.

Une autre approche possible ayant pour but d'améliorer la solubilité et la biodisponibilité des HAP est la dispersion mécanique. Cette technique a surtout été utilisée dans le traitement des sols pollués par les HAP. Il a été montré que la dispersion peut diminuer la limitation de transfert de matière et d'augmenter la vitesse de dissolution (Sikkema *et al.*, 1995). Dans le cas de cette thèse, la dispersion mécanique a été étudiée en présence et en absence du Brij 30. A notre connaissance, l'utilisation de cette technique afin d'augmenter la biodisponibilité des HAP dans des milieux aqueux n'a jamais été rapportée. Une augmentation importante du nombre des particules du phénanthrène dans le milieu grâce à la dispersion a été constatée. En même temps, il a été montré que la dispersion mécanique n'avait pas d'influence significative sur la solubilité du phénanthrène.

L'augmentation de la température afin d'améliorer la solubilité des HAP est aussi connue. Par exemple, Feitkenhauer et Markl (2003) ont montré que la solubilité du naphthalène a été améliorée avec l'augmentation de la température de 20 à 75 °C. Dans le travail présent, un traitement thermique du milieu à 60 °C a été réalisé. Il a été démontré que l'augmentation de la solubilité du phénanthrène en

présence du Brij 30 (0,5 g/L) après le traitement thermique à 60 °C pendant 24 h a été encore plus importante que celle obtenue sans traitement : 30 mg/L au lieu de 18 ± 2 mg/L. On a constaté qu'un système au point de trouble de Brij 30 a été obtenu dans ces conditions. Ceci nous a permis de mettre en œuvre une nouvelle application du point de trouble pour la biodégradation du phénanthrène, qui pourrait être utilisée par la suite pour d'autres HAP.

## 2. Biodégradation du phénanthrène par voie microbienne

Un grand nombre de travaux est consacré à la biodégradation des HAP, y compris celle du phénanthrène. En effet, ce thème de recherche reste d'actualité et suscite de plus en plus d'intérêt car la protection de l'environnement est actuellement l'objet de beaucoup d'attention. Ainsi il a été démontré qu'un certain nombre de bactéries, champignons et algues est capable de dégrader les HAP. Ces biodégradations peuvent être faites soit par des souches pures, soit par des consortia de microorganismes (Cerniglia, 1992). Le co-métabolisme des HAP est surtout approprié pour la biodégradation de mélanges des HAP.

Beaucoup d'information a été publiée sur les voies de biodégradation des HAP, ainsi que sur les enzymes impliquées et la régulation génétique (Cerniglia, 1993 ; Samanta *et al.*, 2002). Néanmoins, les succès obtenus à ce jour dans la biodégradation des HAP restent relativement limités (Kastner et Mahro, 1996 ; Bamforth et Singleton, 2005 ; Chauhan *et al.*, 2008). Les raisons de cela ne sont pas très bien comprises, mais elles peuvent probablement être liées aux limitations ou échecs au cours d'une des étapes des procédés correspondants, notamment : i) la dissolution des HAP, ii) le transport des HAP à travers les membranes de microorganismes, iii) l'expression de gènes de dégradation et iv) la dégradation enzymatique des HAP (Chauhan *et al.*, 2008).

Dans le cas du phénanthrène, sa biodégradation complète nécessite un nombre important de réactions enzymatiques (au moins 14 dans la voie du naphthalène), produisant ainsi de nombreux intermédiaires (Ahn *et al.*, 2006). Cependant, les études publiées décrivent peu de catabolites communs accumulés dans le milieu de culture au cours de la biodégradation, le 1H2Na étant le catabolite observé le plus souvent (tableau 6). En effet, dans le travail présent le catabolite majoritaire accumulé au cours de la biodégradation du phénanthrène par *P. putida* DSMZ 8368 est également le 1H2Na. Ahn *et al.* (2006) ont suggéré que les propriétés chimiques des intermédiaires du phénanthrène (par exemple, l'hydrophobicité et la diffusivité) pourraient en partie expliquer le fait qu'on observe tel ou tel

catabolite dans le milieu extracellulaire. Ainsi ils ont évalué la perméabilité des membranes de microorganismes vis-à-vis des intermédiaires de la voie de biodégradation du phénanthrène et ont conclu que la perméabilité des membranes cellulaires vis-à-vis du 1H2Na était la plus importante. Ceci concorde avec les résultats obtenus par d'autres auteurs qui ont constaté l'accumulation du 1H2Na dans le milieu extracellulaire lors de la biodégradation du phénanthrène.

**Tableau 6.** Intermédiaires de la voie de biodégradation du phénanthrène observés dans la littérature.

Référence	<i>cis</i> -3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophénanthrène	1H2Na	1,2-dihydroxy-naphthalène	Acide salicylique
Evans <i>et al.</i> (1965)		+	+	
Barnsley (1983)		+		
Cerniglia et Yang (1984)	+			
Adachi <i>et al.</i> (1999)		+		
Samanta <i>et al.</i> (1999)		+		+
Doddamani et Ninnekar (2000)		+		
Balashova <i>et al.</i> (2001)		+	+	+
Moody <i>et al.</i> (2001)	+	+		
Prabhu et Phale (2003)		+	+	+
Zhang <i>et al.</i> (2010)		+		
Pantsyrnaya <i>et al.</i> (2011)		+		

La biodégradation du phénanthrène par des cultures mixtes de microorganismes a de fortes chances d'être différente de celle réalisée par une culture pure. Par exemple, des effets positifs (Dean *et al.*, 2001), négatifs (Ovchinnikova *et al.*, 2009) ou l'absence d'effet (Samanta *et al.*, 1999) de la co-culture de microorganismes sur la biodégradation du phénanthrène ont été rapportés.

Dans ce travail le consortium Pyr01 a également montré une croissance et une biodégradation différente de celle de *P. putida* DSMZ 8368. D'autres catabolites ont été accumulés dans le milieu de culture. En outre, la consommation préférentielle du Brij 30 a été constaté. En effet, la consommation préférentielle de tensioactifs par certaines bactéries a déjà été rapportée (Kim et Weber, 2003). Cependant, afin de mieux comprendre le comportement consortium Pyr01 au cours de la

biodégradation du phénanthrène il est indispensable d'étudier l'évolution des espèces le constituant en fonction du temps, ainsi que d'élucider ces voies de biodégradation.

Ainsi, le succès de l'utilisation de la biodégradation pour l'élimination des HAP de l'environnement nécessite une meilleure connaissance des mécanismes appliqués. L'efficacité des procédés correspondants pourra alors être améliorée. L'approche multidisciplinaire appliquée dans ce travail a démontré son efficacité. Les conclusions et les perspectives découlant de ce travail sont présentées ci-après.

## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la dissolution et la biodégradation du phénanthrène (modèle d'HAP) dans les milieux aqueux en présence de tensioactifs. Sachant que la faible solubilité des HAP limite leur biodégradation, il a été tout d'abord décidé de diminuer l'importance de cette limitation. Le Brij 30 a été identifié comme étant le tensioactif le plus efficace parmi ceux retenus suite aux essais de toxicité vis-à-vis de *P. putida* DSMZ 8368. Les résultats d'application des trois techniques (ajout d'un tensioactif, dispersion mécanique et traitement thermique), séparément ou en combinaison, ont montré que l'utilisation du Brij 30 couplé au traitement thermique (60 °C pendant 24 h) permettait d'obtenir la meilleure solubilité du phénanthrène : 30 mg/L contre environ 1,5 mg/L sans aucun traitement.

L'étape suivante de ce travail a consisté à vérifier si l'application de ces techniques améliorait la biodégradation du phénanthrène. Il a été trouvé que, comme pour la solubilité du phénanthrène, l'ajout du Brij 30 couplé à un traitement thermique préliminaire aboutit à une meilleure biodégradation du phénanthrène par *P. putida* DSMZ 8368. Néanmoins, quand cette technique est appliquée au consortium de microorganismes Pyr01, un effet négatif sur la biodégradation a été observé. Ceci s'explique très probablement par la consommation préférentielle du Brij 30.

Les résultats présentés dans ce travail proposent également une nouvelle technique d'amélioration de la biodégradation des HAP. Cependant, le tensioactif approprié pour une souche s'est avéré être consommé préférentiellement par d'autres souches. Il est donc indispensable de déterminer préalablement l'effet du tensioactif choisi sur les microorganismes impliqués dans la biodégradation.

Les résultats obtenus dans cette étude doivent maintenant être approfondis. Les perspectives qui en découlent sont les suivantes :

- 1). Une amélioration de la technique d'obtention des « super micelles » au point du trouble est souhaitée. L'application de cette technique pour améliorer la biodégradation des HAP semble très prometteuse, mais elle doit être encore largement améliorée. En effet, l'ajout d'électrolytes dans le milieu ou le changement de la concentration en tensioactif peuvent influencer sur la valeur de la température du point du trouble. Il est donc envisageable d'optimiser ainsi la technique en minimisant cette température afin d'économiser le coût du procédé final.

2). Dans ce travail le phénanthrène a été choisi comme modèle d'HAP. Sachant que les HAP à poids moléculaire élevé sont souvent plus résistant à la biodégradation, l'extrapolation des résultats obtenus avec le phénanthrène aux autres HAP est indispensable.

3). La caractérisation du consortium Pyr01, de ces voies métaboliques, ainsi que le suivi de son évolution et les dosages enzymatiques pourront être utiles afin de mieux comprendre l'implication de ces souches dans la dégradation des HAP.

4). Enfin, le transfert des connaissances acquises en laboratoire au milieu naturel est indispensable.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abarnou, A. (coord.), 2000. Les contaminants organiques : quels risques pour le monde vivant ? Brest, IFREMER, p. 35.

Adachi, K., Iwabuchi, T., Sano, H., Harayama, S., 1999. Structure of the ring cleavage product of 1-hydroxy-2-naphthoate, an intermediate of the phenanthrene-degradative pathway of *Nocardioides* sp. Strain KP7. J. Bacteriol. 181, 757-763.

Ahn, C.K., Woo, S.H., Lee, D.S., Park, J.M., 2006. Mathematical evaluation of intermediates accumulation during microbial phenanthrene degradation. Korean J. Chem. Eng. 23, 415-418.

Aitken, M. D., Grimberg, S. J., Nagel, J., Nagel, R. D., Stringfellow, W. T., 1996. Bacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and potential effects of surfactants on PAH bioavailability. Water Resources Research Institute of the University of North Carolina, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA, p.82.

Arino, S., Marchal, R., Vandecasteele, J.-P., 1998. Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. J. Appl. Microbiol. 84, 769-776.

Avramova, T., Sotirova, A., Galabova, D., Karpenko, E., 2008. Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. Int. Biodeter. Biodegr. 62, 415-420.

Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., Luch, A., Seidel, A., Iversen, P. 2002. Response of human cells to PAH-induced DNA damage. Polycyclic Arom. Comp. 22, 771-780.

Balashova, N.V., Kosheleva, I.A., Golovchenko, N.P., Boronin, A.M., 1999. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. Process Biochem. 35, 291-296.

Balashova, N.V., Stolz, A., Knackmuss, H-J., Kosheleva, I.A., Naumov, A.V., Boronin, A.M., 2001. Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid

- hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1. *Biodegradation* 12, 179-188.
- Bamforth, S.M., Singleton, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 723-736.
- Barnsley, E.A., 1983. Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-carboxybenzalpyruvate. *J. Bacteriol.* 154, 113-117.
- Barron, M.G., 1990. Bioconcentration : will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals? *Environ. Sci. Technol.* 24, 1612-1618.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J., 1998. Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 951-960.
- Bergman, A., 1993. Concentrations of PAHs, PCBs and heavy metals in the blue mussel, *Mytilus edulis*. Ministry of Transport, Public Works and Water Management of Netherlands. DGW-93.001. p. 40.
- Blumer, M., 1976. Polycyclic aromatic hydrocarbons in nature. *Sci. Am.* 234, 35-45.
- Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Biores. Technol.* 74, 63-67.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V., Haeseler, F., Vandecasteele, J.-P., 1999. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation* 10, 429-435.
- Bramwell, D.A.P., Laha, S., 2000. Effects of surfactant addition on the biomineralization and microbial toxicity of phenanthrene. *Biodegradation* 11, 263-277.
- Carlsson, A., Karlström, G., Lindman, B. 1990. Thermal gelation of nonionic cellulose ethers and ionic surfactants in water. *Colloids Surf.* 47, 147-165.

Casero, I., Sicilia, D., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., 1999. An acid-induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and preconcentration of organic compounds. *Anal. Chem.* 71, 4519-4526.

CEDRE, 2006. Mieux comprendre les marées noires. Dossier pédagogique. Cedre, Brest, p. 118.

CEDRE, 2010. Rapport d'activité 2010. <http://www.cedre.fr>

Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351-368.

Cerniglia, C.E., Yang, S.K., 1984. Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 119–124.

Chakrabarty, A.M., 1972. Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 112, 815-823.

Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J.G., Jain, R.K., 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48, 95-113.

Cho, O., Choi, K.Y., Zylstra, G.J., Kim, Y-S., Kim, S-K., Lee, J.H., Sohn, H-Y., Kwon, G-S., Kim, Y.M., Kim E., 2005. Catabolic role of a three-component salicylate oxygenase from *Sphingomonas yanoikuyae* B1 in polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 327, 656-662.

Christofi, N., Ivshina, I.B., 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.* 93, 915-929.

Clark, C.D., de Bruyn, W.J., Ting, J., Scholle, W., 2007. Solution medium effects on the photochemical degradation of pyrene in water. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 186, 342–348.

- Clark, R.B., 2001. Marine pollution. 5th ed., reprinted in 2002. Oxford University Press, Oxford, p. 236.
- Colbert, S.F., Isakeit, T., Ferri, M., Weinhold, A.R., Hendson, M., Schroth, M.N., 1993. Use of an exotic carbon source to selectively increase metabolic activity and growth of *Pseudomonas putida* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2056-2063.
- Colombo, J.C., Cabello, M., Arambarri, A.M., 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. *Environ. Pollution* 94, 355-362.
- Cook, J.W., Hewett C.L., Hieger I., 1932. Coal tar constituents and cancer. *Nature* 130, 926-928.
- Davies, J.I., Evans, W.C., 1964. Oxidative mechanism of naphthalene by soil *Pseudomonads*. *Biochem. J.* 91, 251-261.
- Dean, S.M., Jin, Y., Cha, D.K., Wilson, S.V., Radosevich, M., 2001. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene degrading and biosurfactant-producing bacteria. *J. Environ. Qual.* 30, 1126- 1133.
- Deschênes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J.P., Samson, R., 1995. The effect of an anionic surfactant on the mobilization and biodegradation of PAHs in a creosote-contaminated soil. *Hydrolog. Sci. J.* 40, 471-484.
- Doddamani, H. P., Ninnekar, H.Z., 2000. Biodegradation of phenanthrene by a *Bacillus species*. *Curr. Microbiol.* 41, 11-14.
- Doong, R.-a., Lei, W.-g., 2003. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. *J. Hazard. Mater. B* 96, 15-27.
- Dorn, P., Salanitro, J.O., Evans, A., Kravetz, L., 1993. Assessing the aquatic hazard of some branched and linear nonionic surfactants by biodegradation and toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1751-1762.

- Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu, Z., 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar non-ionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* 25, 127-133.
- EFSA, 2008. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *The EFSA Journal* 724, 1-114.
- Evans, W.C., Fernley, H.N., Griffiths, E., 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads: the ring fission mechanism. *Biochem. J.* 95, 819-831.
- Fairlee, J.R., Burbach, B.L., Perry, J.J., 1997. Biodegradation of groundwater pollutants by a combined culture of *Mycobacterium vaccae* and a *Rhodococcus* sp. *Can. J. Microbiol.* 43, 841-846.
- Feitkenhauer, H., Markl, H., 2003. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons at high temperatures. *Water Sci. Technol.* 47, 123–130.
- Ferrer, R., Beltrán, J.L., Guiteras, J., 1996. Use of cloud point extraction methodology for the determination of PAHs priority pollutants in water samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and wavelength programming. *Anal. Chim. Acta* 330, 199-206.
- Gelfman, M.I., Kovalevitch, O.V., Yustratov, V.P., 2003. *Chimie colloïdale (en russe)*. Saint-Pétersbourg, Lan', p. 336.
- Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., Basri, M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 61–67.
- Guerin, W.F., Jones, G.E., 1988. Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 929-936.
- Guha, S., Jaffé, P., 1996. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 30, 605-611.

Gunnarsson, G., Jonsson, B., Wennerstrom, H., 1980. Surfactant association into micelles. An electrostatic approach. *J. Phys. Chem.* 84, 3114-3121.

Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1-15.

Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1995. Effect of aging on chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29, 537-545.

INERIS, 2010. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Phénanthrène. INERIS-DRC-10-109974-07011A, version № 4 – juin 2010, p. 48.

IPCS, 1998. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons (Environmental health criteria 202), Geneva, International Programme on Chemical Safety, WHO, p. 883.

ITOPF, 2010. Oil tanker spill statistics 2010. <http://www.itopf.com>

Jensen, H., Reimann, C., Finne, T.E., Ottesen, R.T., Arnoldussen, A., 2007. PAH-concentrations and composition in the top 2 cm of forest soil along a 120 km long transect through agricultural areas, forests and the city of Oslo, Norway. *Environ. Pollut.* 145, 829-838.

Jerina, D.M., Daly, M.W., 1974. Arene oxides: a new aspect of drug metabolism. *Science* 185, 573-582.

Jin, D., Jiang, X., Jing, X., Ou, Z., 2007. Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. *J. Haz. Mat.* 144, 215-221.

JOCE, 2004. Commission directive 2004/73/EC of 29 April 2004 adapting to technical progress for the 29th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labeling of dangerous substances. *Official Journal of the European Communities*, L216, p. 308.

Johnsen, A.R., de Liphay, J.R., Reichenberg, F., Sørensen, S.J., Andersen, O., Christensen, P., Binderup, M.L., Jacobsen, C.S., 2006. Biodegradation, bioaccessibility and genotoxicity of diffuse polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollution at a motorway site. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3293–3298.

Johnsen, A.R., Karlson, U., 2005. PAH degradation capacity of soil microbial communities – does it depend on exposure? *Microb. Ecol.* 50, 488–494.

Johnsen, A.R., Karlson, U., 2007. Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 533–543.

Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133, 71-84.

Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2011. Uptake of hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) strains in the presence of surfactants: a cell surface modification. *Water Air Soil Pollut.* 214, 451-459.

Kastner, M., Mahro, B., 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 668–675.

Keith, L.H., Telliard, W.A., 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.* 13, 416-423.

Kelley, I., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E., 1990. Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. *Biodegradation* 1, 283-290.

Kim, H.S., Weber, W.J. Jr., 2003. Preferential surfactant utilization by a PAH-degrading strain: effects on micellar solubilization phenomena. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3574-3580.

Kirso, U., Irha, N., 1998. Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 83-89.

- Kiyohara, H., Nagao, K., 1978. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 105, 69-75.
- Kiyohara, H., Nagao, K., Yana, K., 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 454-457.
- Kochany, J., Maguire, R.J., 1994. Abiotic transformations of polynuclear aromatic hydrocarbons and polynuclear aromatic nitrogen heterocycles in aquatic environments. *Sci. Total Environ.* 144, 17-31.
- Labana, S., Kapur, M., Malik, D.K., Prakash, D., Jain, R.K., 2007. Diversity, biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Singh, S.N., Tripathi, R.D. (eds.). *Environmental bioremediation technologies*. Springer, Berlin, pp. 409-443.
- Laha, S., Luthy, R.G., 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by non-ionic surfactants in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1920-1930.
- Lei, A.-P., Hu, Z.-L., Wong, Y.-S., Tam, N.F.-Y., 2007. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Biores. Technol.* 98, 273-280.
- Li, J.-L., Chen, B.-H., 2002. Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. *Chem. Eng. Sci.* 57, 2825-2835.
- Li, J.-L., Chen, B.-H., 2009. Effect of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene by a marine bacteria of *Neptunomonas naphthovorans*. *J. Hazard. Mater.* 162, 66-73.
- Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., Gong, Z., 2008. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *J. Hazard. Mater.* 150, 21-26.
- Lijinsky, W., 1991. The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutat. Res.* 259, 251-262.
- Lin, S.-C., 1999. Biosurfactants: recent advances. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 66, 109-120.

- Lindhart, B., Holst, H., Christensen, T.H., 1994. Comparison of soxhlet and shake extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal tar polluted soils sampled in the field. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 57, 9–19.
- Lindman, B., Karlström, G., 2009. Nonionic polymers and surfactants: Temperature anomalies revisited. *Comptes Rendus Chimie* 12, 121-128.
- Liu, Z., Jacobson, A.M., Luthy, R.G., 1995. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 145-151.
- Livingstone, D.R., 1994. Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1, 88-95.
- Lundstedt, S., 2003. Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. Department of Chemistry Environmental Chemistry. Umea (Suède), Umea University, p. 56.
- Mackay, R.A., 1987. Solubilization. In: Schick, M.J. (ed.) *Nonionic surfactants physical chemistry*. Marcel Dekker, New York, p. 297.
- Manoli, E., Samara, C., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *Trends Analyt. Chem.* 18, 417-428.
- Meador, J.P., Stein, J.S., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 143, 79-165.
- Menichini, E., 1992. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. *Sci. Total Environ.* 116, 109-135.
- Mersch-Sundermann, V., Mochayedi, S., Kevekordes, S., 1992. Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutat. Res.* 278, 1-9.

- Mill, T., Mabey, W.R., Lan, B.Y., Baraze, A., 1981. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Chemosphere* 10, 1281–1290.
- Miozzari, G.F., Niderberger, P., Hulter, R., 1978. Permeabilization of microorganisms by Triton X-100. *Anal. Biochem.* 90, 220-233.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Doerge, D. R., Cerniglia, C. E., 2001. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspension of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1,” *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1476-1483.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., Labuzek, S., 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Pol. J. Environ. Stud.* 12, 15-25.
- Mueller, J.G., Cerniglia, C.E., Pritchard, P.H., 1996. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Crawford, R.L., Crawford, D.L. (ed.) *Bioremediation: principles and applications*. Cambridge University Press, Idaho, pp. 125–194.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng. Geol.* 60, 371-380.
- Muñoz, R., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2003. Phenanthrene biodegradation by an algal-bacterial consortium in two-phase partitioning bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 261–267.
- Nimmi, A.J., Dookhran, G.P., 1989. Dietary absorption efficiencies and elimination rates of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 719-722.
- Nimmi, A.J., Palazzo, V., 1986. Biological half-lives of eight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.* 20, 503-507.
- Nylund, L., Heikkila, P., Hameila, M., Pyy, L., Linnainmaa, K., Sorsa, M., 1992. Genotoxic effects and chemical composition of four creosotes. *Mutat. Res.* 265, 223-236.

- Olliver, B., Magot, M. (eds), 2005. Petroleum microbiology. ASM Press, Washington, DC, 318-320.
- Olsson, U., Shinoda, K., Lindman, B., 1986. Change of the structure of microemulsions with the hydrophile-lipophile balance of nonionic surfactant as revealed by NMR self-diffusion studies. *J. Phys. Chem.* 90, 4083-4088.
- OMS, 2004. Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva, p. 366.
- Ouyang, J., 2006. Phenanthrene pathway map University of Minnesota.  
[http://umbbd.msi.umn.edu/pha/pha\\_map.html](http://umbbd.msi.umn.edu/pha/pha_map.html)
- Ovchinnikova, A.A., Vetrova, A.A., Filonov, A.E., Boronin, A.M., 2009. Phenanthrene biodegradation and the interaction of *Pseudomonas putida* BS3701 and *Burkholderia* sp. BS3702 in plant rhizosphere. *Microbiology* 78, 433–439.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633-654.
- Pan, T., Wang, Z., Xu, J.-H., Wu, Z., Qi, H., 2010. Extractive fermentation in cloud point system for lipase production by *Serratia marcescens* ECU1010. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1789–1796.
- Pantsyrnaya, T., Blanchard, F., Delaunay, S., Goergen, J.L., Guédon, E., Guseva, E., Boudrant, J., 2011. Effect of surfactants, dispersion and temperature on solubility and biodegradation of phenanthrene in aqueous media. *Chemosphere* 83, 29-33.
- Paria, S., 2008. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Adv. Colloid Interface Sci.* 138, 24–58.
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S., Yao, Q.-H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 927–955.
- Perugini, M., Visciano, P., Giammarino, A., Manera, M., Di Nardo, W., Amorena, M., 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy. *Chemosphere* 66, 1904–1910.

Phillips, D.H., 1983. Fifty years of benzo[a]pyrene. *Nature* 303, 472-486.

Prabhu, Y., Phale, P. S., 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. Strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 342-351.

Providenti, M.A., Fleming, C.A., Lee, H., Trevors, J.T., 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17, 15-26.

Pullman, A., Pullman B., 1955. Electronic structure and carcinogenic activity of aromatic molecules; new developments. *Adv. Cancer Res.* 3, 117-169.

Puntus, I.F., Filonov, A.E., Akhmetov, L.I., Karpov, A.V., Boronin, A.M., 2008. Phenanthrene degradation by bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in model soil systems. *Microbiology* 77, 7–15.

Quina, F.H., Hinze, W.L., 1999. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 4150-4168.

Richard, J.Y., Vogel, T.M., 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 44, 93–100.

Rodriguez Nino, M.R., Rodriguez Patino, J.M.R., 1998. Surface tension of protein and insoluble lipids at the air-aqueous phase interphase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1233-1239.

Rogge, W.F., Hildemann, L.M., Mazurek, M.A., Cass G.R., 1993. Sources of fine organic aerosol 3. Road dust, tire debris, and organometallic brake lining dust: roads as sources and sinks. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1892–1904.

Rosen, M.J., 1989. *Surfactants and interfacial phenomena*. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, New York, p. 431.

Samanta, S.K., Chakraborti, A.K., Jain, R.K., 1999. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 98-107.

Samanta, S.K., Singh, O.V., Jain, R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243-248.

Schippers, C., Geßner, K., Müller, T., Scheper, T., 2000. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *J. Biotechnol.* 83, 189–198.

Shin, K.-H., Kim, K.-W., Seagren, E.A., 2004. Combined effects of pH and biosurfactant addition on solubilization and biodegradation of phenanthrene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 336-343.

Sicilia, D., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., Maniasso, N., Zagatto, E.A.G., 1999. Anionic surfactants in acid media: a new cloud point extraction approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* 392, 29-38.

Sigman, M.E., Schuler, P.F., Ghosh, M.M., Dabestani, R.T., 1998. Mechanism of pyrene photochemical oxidation in aqueous and surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3980-3985.

Sijm, D.T.H.M., Rikken, M.G.J., Rorije, E., Traas, T.P., McLachlan, M.S., Peijnenburg, W.J.G.M., 2007. Transport, accumulation and transformation processes. In: van Leeuwen, C.J., T.G. Vermeire (eds.). *Risk assessment of chemicals: an introduction*. Dordrecht, Springer, pp. 73-158.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201-222.

Sirota, G.R., Uthe, J.F., Sreedharan, A., Matheson, R., Musial, C.J., Hamilton, K., 1983. Polynuclear aromatic hydrocarbons in lobster (*Homarus americanus*) and sediments in the vicinity of a coking facility. In: Cooke, M., Dennis, A.J. (eds.) *Polynuclear aromatic hydrocarbons: formation, metabolism and measurement*. Battelle Press, Columbus, OH, p. 1123-1136.

- Srogi, K., 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environ. Chem. Lett.* 5, 169–195.
- Swe, M.M., Yu, L.E., Hung, K.-C., Chen, B.-H., 2006. Solubilization of selected polycyclic aromatic compounds by nonionic surfactants. *J. Surfact. Deterg.* 9, 237-244.
- Thomas, R.E., Rice, S.D., 1982. Metabolism and clearance of phenolic and mono-, di-, and polynuclear aromatic hydrocarbons by Dolly Varden char. In: Vernberg, J., Calabrese A., Thurberg, T.P., Thurberg, W.B. (eds.) *Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity*. Academic Press, New York, pp. 161-176.
- Tiehm A., 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 258-263.
- Toerne, K., Rogers, R., von Wandruszka, R., 2001. Thermal stability of nonionic surfactant aggregates. *Langmuir* 17, 6119-6121.
- Tortella, G.R., Diez, M.C., 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 197–212.
- Trapido, M., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and profiles. *Environ. Pollut.* 105, 67–74.
- Trzesicka-Mlynarz, D., Ward, O.P., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures obtained from PAH-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 41, 470-476.
- Vallejo-Pecharrom n, B., Garcia Ayuso, L.E., Luque de Castro, M.D., 2001. Efficient extraction of PAHs in aqueous organised media assisted by focused microwaves. *Chromatographia* 53, 5-10.
- Vandermeer, K.D., Daugulis, A.J., 2007. Enhanced degradation of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons by a defined microbial consortium in a two-phase partitioning bioreactor. *Biodegradation* 18, 211–221.

Viamajala, S., Peyton, B.M., Richards, L.A., Petersen, J.N., 2007. Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions. *Chemosphere* 66, 1094–1106.

Vidali, M., 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73, 1163–1172.

Viguri, J., Verde, J., Irabien, A., 2002. Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain. *Chemosphere* 48, 157–165.

Vijayalakshmi, K.P., Suresh, C.H., 2008. Theoretical studies on the carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Comput. Chem.* 29, 1808-1817.

Volkering, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H., 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8, 401–417.

Volkering, F., Breure, A.M., Sterkenburg, A., Van Andel, J.G., 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 548-552.

Volkering, F., Breure, A.M., Van Andel, J.G., 1995. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *App. Environ. Microbiol.* 61, 1699–1705.

Wang, Z., 2007. The potential of cloud point system as a novel two-phase partitioning system for biotransformation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1–10.

Wang, Z., 2011. Bioavailability of organic compounds solubilized in nonionic surfactant micelles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 523–534.

Wang, Z., Dai, Z., 2010. Extractive microbial fermentation in cloud point system. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 407–418.

- Wang, Z., Liang, R., Xu, J.-H., Liu, Y., Qi, H., 2010. A closed concept of extractive whole cell microbial transformation of benzaldehyde into L-phenylacetylcarbinol by *Saccharomyces cerevisiae* in novel polyethylene-glycol-induced cloud-point system. *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 160:1865–1877.
- Wang, Z., Zhao, F., Chen, D., Li, D., 2005. Cloud point system as a tool to improve the efficiency of biotransformation. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 589-594.
- Wang, Z., Zhao, F., Hao, X., Chen, D., Li, D., 2004. Microbial transformation of hydrophobic compound in cloud point system. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 27, 147–153.
- Wang, Z., Zhao, F., Li, D., 2003. Determination of solubilization of phenol of coacervate phase in cloud point extraction. *Colloid. Surf. A* 216, 207–214.
- Watanabe, H., Tanaka, H., 1978. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta* 25, 585-589.
- Warshawsky, D., Keenan, T.H., Reilman, R., Cody, T.E., Radike, M.J., 1990. Conjugation of benzo[a]pyrene metabolites by freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Chem. Biol. Interact.* 74, 93-105.
- West, C.C., Harwell, J.H., 1992. Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2324-2330.
- Wilcke, 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil, a review. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 163, 229-248.
- Wild, S.R., Jones, K.C., 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* 88, 91–108.
- Wodzinski, R.S., Coyle, J. E., 1974. Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. *Applied Microbiol.* 27, 1081-1084.

- Wodzinski, R.S., Johnson, M.J., 1968. Yields of bacterial cells from hydrocarbons. *Appl. Microbiol.* 16, 1886-1891.
- Wong, J.W.C., Fang, M., Zhao Z., Xing B., 2004. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *J. Environ. Qual.* 33, 2015–2025.
- Woo, S.H., Rittmann, B.E., 2000. Microbial energetics and stoichiometry for biodegradation of aromatic compounds involving oxygenation reactions. *Biodegradation* 11, 213-227.
- Yamamoto, S., Harayama, S., 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 813-819.
- Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B.V., 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* 41, 1463-1468.
- Zepp, R.G., Schlotzhauer, P.F., 1979. Photoreactivity of selected aromatic hydrocarbons in water. In: Jones, P.W., Leber, P. (eds.) *Polynuclear aromatic hydrocarbons*. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI, pp. 141–158.
- Zhang, W., Wang, Z., Li, W., Zhuang, B., Qi, H., 2008. Production of L-phenylacetylcarbinol by microbial transformation in polyethylene glycol-induced cloud point system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 233–239.
- Zhang, Y., Maier, W., Miller, R., 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2211-2217.
- Zhang, Z., Inoue, C., Li, G., 2010. Coordination in phenanthrene biodegradation: pyruvate as microbial demarcation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85, 581–584.
- Zhao, B., Zhu, L., Li, W., Chen, B., 2005. Solubilization and biodegradation of phenanthrene in mixed anionic–nonionic surfactant solutions. *Chemosphere* 58, 33–40.

Zhu, L., Feng, S., 2003. Synergistic solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed anionic-nonionic surfactants. *Chemosphere* 53, 459-467.

Zhu, H., Singleton, D.R., Aitken, M.D., 2010. Effects of Nonionic Surfactant Addition on Populations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria in a Bioreactor Treating Contaminated Soil. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7266–7271.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Madame Nelly COCHET, Professeur, Université de Technologie de Compiègne**

**Madame Svetlana BUTOVA, Professeur, Moscow State University of Food Production**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame PANTSYRNAYA Tatiana**

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Dissolution du phénanthrène dans des milieux aqueux en présence de tensioactifs et  
biodégradation par *Pseudomonas putida* dans un milieu de fermentation modèle. "**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 20 octobre 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

Pour le Président par délégation  
Le Directeur Général des Services  
de l'INPL.

J.Y. RIVIERE



### **Dissolution du phénanthrène dans des milieux aqueux en présence de tensioactifs et biodégradation par *Pseudomonas putida* dans un milieu de fermentation modèle**

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants persistants très répandus dans les écosystèmes du monde entier. L'utilisation des microorganismes pour la dégradation des HAP est une méthode économique et ayant un grand potentiel. Ce travail avait pour objectif d'étudier la dissolution et la biodégradation du phénanthrène (HAP modèle) en présence de tensioactifs. Les microorganismes choisis dans ce travail sont *Pseudomonas putida* DSMZ 8368 et un consortium microbien Pyr01.

La première partie de la thèse concerne l'étude de l'effet des tensioactifs, de la dispersion et du traitement thermique sur la solubilité et la biodégradation du phénanthrène par *P. putida* DSMZ 8368. Les meilleurs résultats ont été obtenus en combinant l'utilisation d'un tensioactif Brij 30 (0,5 g L<sup>-1</sup>) avec un traitement thermique préliminaire. La deuxième partie présente les résultats sur la dégradation du phénanthrène par le consortium Pyr01. La comparaison entre la biodégradation du phénanthrène par *P. putida* DSMZ 8368 et le consortium Pyr01 a été réalisée. Contrairement à ce qui a été observé dans le cas de la biodégradation par *P. putida* DSMZ 8368, la présence du Brij 30 (0,5 g L<sup>-1</sup>) a eu un effet négatif sur la biodégradation du phénanthrène par le consortium Pyr01. La troisième partie de ce travail a consisté en l'étude de la solubilisation du phénanthrène au point de trouble du Brij 30. L'effet de l'abaissement de la température jusqu'à la valeur de la température de culture de *P. putida* DSMZ 8368 sur la solubilisation du phénanthrène a été également étudié.

Mots clés: Hydrocarbures aromatiques polycycliques, phénanthrène, tensioactifs, dispersion, traitement thermique, biodégradation.

---

### **Dissolution of phenanthrene in aqueous media in the presence of surfactants and biodegradation by *Pseudomonas putida* in a model fermentation medium**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are persistent pollutants widely represented in ecosystems all over the world. The utilization of microorganisms for degradation of PAHs is an economically effective method having a great potential. The aim of the present work was to study the dissolution and the biodegradation of phenanthrene (model PAH) in the presence of surfactants. The chosen microorganisms were *Pseudomonas putida* DSMZ 8368 and a microbial consortium Pyr01.

The first part of the thesis concerns the study of the effect of surfactants, dispersion and a thermal treatment on solubility and biodegradation of phenanthrene by *P. putida* DSMZ 8368. The best results were obtained by combining the use of Brij 30 surfactant with a preliminary thermal treatment. The second part presents results on the degradation of phenanthrene by Pyr01 consortium. The comparison between the biodegradation of phenanthrene by *P. putida* DSMZ 8368 and by Pyr01 consortium was done. Contrary to what has been observed in the case of the biodegradation by *P. putida* DSMZ 8368, the presence of Brij 30 (0.5 g L<sup>-1</sup>) had a negative effect on the biodegradation of phenanthrene by Pyr01 consortium. The third part of this work consisted in the study of phenanthrene solubilisation at cloud point of Brij 30. The effect of lowering the temperature to that of the culture conditions for *P. putida* DSMZ 8368 on the solubilization of phenanthrene was also studied.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons, phenanthrene, surfactants, dispersion, thermal treatment, biodegradation.