



HAL
open science

Contribution à l'étude de la biodégradation des composés organiques dans l'environnement

Philippe Kuenemann

► **To cite this version:**

Philippe Kuenemann. Contribution à l'étude de la biodégradation des composés organiques dans l'environnement. Ecotoxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1991. Français. NNT : 1991METZ021S . tel-01775945

HAL Id: tel-01775945

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775945>

Submitted on 24 Apr 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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITE DE METZ
Centre des Sciences de l'Environnement

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA BIODEGRADATION
DES COMPOSES ORGANIQUES
DANS L'ENVIRONNEMENT

Thèse de Doctorat
Présentée par

Philippe KUENEMANN

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN TOXICOLOGIE
OPTION TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Membres du jury : Professeur Jean-Marie PELT (Président)
Docteur Nigel BATTERSBY (Rapporteur)
Docteur Jean-François FERARD (Rapporteur)
Docteur Paul LEHR (Rapporteur)
Professeur Paule VASSEUR (Directeur)
Monsieur Jean-François GONNET

Soutenance le 19 Décembre 1991

UNIVERSITE DE METZ
Centre des Sciences de l'Environnement

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA BIODEGRADATION
DES COMPOSES ORGANIQUES
DANS L'ENVIRONNEMENT

Thèse de Doctorat
Présentée par

Philippe KUENEMANN

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN TOXICOLOGIE
OPTION TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Membres du jury : Professeur Jean-Marie PELT (Président)
Docteur Nigel BATTERSBY (Rapporteur)
Docteur Jean-François FERARD (Rapporteur)
Docteur Paul LEHR (Rapporteur)
Professeur Paule VASSEUR (Directeur)
Monsieur Jean-François GONNET

Soutenance le 19 Décembre 1991

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19910525
Cote	S/M ₃ 91/21
Loc	Magasin

*Je tiens à remercier tout particulièrement
le Professeur Paule Vasseur pour l'accueil
qu'elle m'a réservé au sein du Centre
des Sciences de l'Environnement et pour
les conseils avisés qu'elle m'a prodigués
tout au long de cette thèse.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude
au Docteur Nigel Battersby pour m'avoir
accueilli dans son équipe au Water Research
Centre et pour avoir accepté d'être rapporteur
de cette thèse.*

*Je tiens aussi à remercier le Docteur
Jean-François Ferard pour avoir accepté
le rôle de rapporteur pour cette thèse.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance
à Messieurs Bernard Tramier et Alain Ladousse
de la société Elf-Aquitaine pour avoir accepté
de faire partie de ce jury et pour avoir participé
au financement de ce travail.*

*Je remercie en particulier le Docteur
André de Morsier pour m'avoir accueilli
dans son laboratoire au sein de la société
Ciba-Geigy.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude
et mon profond respect au Professeur
Jean-Marie Pelt pour avoir accepté
d'être membre de ce jury.*

A ma famille.

A Christine.

<<...Comme le philosophe des sciences Karl POPPER l'a souligné, une bonne théorie se caractérise par le fait qu'elle fait un certain nombre de prédictions qui pourraient en principe être réfutées ou rendues fausses par l'observation. Chaque fois que de nouvelles expériences viendront corroborer les prédictions, la théorie sera confortée, et notre confiance en elle s'accroîtra ; mais si jamais une nouvelle observation ne s'inscrit pas dans son cadre, il nous faudra l'abandonner ou la modifier. Du moins est-ce ce qu'il est supposé advenir, mais vous pourrez toujours mettre en doute la compétence de la personne qui a réalisé l'observation en question....>>.

Stephen W. HAWKING
*"Une brève histoire du temps
Du big bang aux trous noirs"*

ABREVIATIONS

1,6 DHH	1,6-dihydroxyhexane
2,4 D	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
2,4,6 T	2,4,6-trichlorophénol
AFC	Analyse Factorielle des Correspondances
ACP	Analyse en Composantes Principales
COD	Carbone Organique Dissous
DOC	Dissolved Organic Carbon
CPA	Milieu Caséïne-Peptone-Amidon
CPA 1%	Milieu Caséïne-Peptone-Amidon dilué à 1%
dpm	désintégrations par minute
DThO	Demande Théorique en oxygène
MEA	Monoéthanolamine
MOST	Modified OECD Screening Test
MST	Modified Sturm Test
NPP	Nombre le Plus Probable
MPN	Most Probable Number
pass level	Seuil de biodégradation
PE	Pentaérythritol
pNP	para-nitrophénol
PS	Poids Sec
SS	Solides en Suspension
ThCO ₂	Production Théorique de dioxyde de carbone
UFC	Unité Formant Colonie

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODEGRADATION DES COMPOSES ORGANIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	2
BUTS DE L'ETUDE	5
CHAPITRE I :.....	8
<i>Les tests de biodégradation immédiate.</i> <i>Intérêt des bilans carbone</i>	
CHAPITRE II :	50
<i>Détermination de la biomasse active</i> <i>dans les tests "environnementaux".</i>	
CHAPITRE III :	91
<i>Les Q.S.B.R.</i> <i>Alternative ou complément des tests de biodégradabilité</i>	
CONCLUSION	150
BIBLIOGRAPHIE	155
ANNEXES	166

INTRODUCTION

A l'heure actuelle, et devant la mise sur le marché d'un nombre croissant de produits chimiques organiques (pesticides, détergents,...), et devant quelques "incidents" ou "accidents" par lesquels certains de ces produits ont pu être retrouvés dans l'environnement, l'attention de l'opinion publique et des scientifiques se focalise sur le devenir des substances chimiques (pesticides, détergents, hydrocarbures, pour ne citer que celles-ci) dont l'impact sur les environnements n'est pas négligeable, et met un point d'honneur à utiliser des produits plus "propres".

A ce niveau, la biodégradabilité a tout naturellement été mise en avant, d'autant plus qu'elle peut être considérée comme étant une propriété importante régissant l'impact des produits chimiques organiques sur l'environnement, au même titre que la toxicité, la bioaccumulation,...(GERIKE et FISCHER, 1979 ; PARIS et coll., 1982 ; VAISHNAV et coll. , 1987 ;...).

Toutefois, même si la biodégradabilité connaît un regain d'intérêt, au niveau des législateurs, au niveau des systèmes biologiques de réhabilitation de sites pollués (tels que les plages polluées par marée noire), il n'en reste pas moins qu'un grand nombre de problèmes se posent encore et ne sont pas maîtrisés au niveau de la réalisation d'essais de biodégradabilité. De ce fait, depuis quelques années, divers organismes nationaux (AFNOR, EPA,...) ou supra-nationaux (OCDE, CEE,ISO,...) ont essayé d'apporter à ces tests de biodégradabilité certaines améliorations afin, entre autre, de réduire la trop grande variabilité que l'on peut observer sur les résultats de biodégradation.

Ainsi, l'emploi de conditions standardisées (concentration en substance, emploi et composition d'un milieu minéral, concentration et traitement de l'inoculum,...) pour la réalisation de tests de biodégradabilité "facile" améliore la reproductibilité et la répétabilité des essais (KITANO et TAKATSUKI, 1988). De même, l'utilisation de pré-acclimatation (conditionnement) des inocula semble réduire la biodégradabilité (ECETOC, 1985).

Malgré les améliorations constantes apportées à ces tests, il n'en reste pas moins que différents problèmes restent encore à résoudre, et que les besoins en terme de recherche sur la biodégradabilité sont énormes : physiologie et génétique des bactéries (intervenants principaux de la biodégradation), analytique, expressions cinétiques,... (GRADY, 1985).

Ainsi, parmi tous ces problèmes, l'explication des différences observées entre les résultats de tests de biodégradation immédiate (tests référencés OCDE 301 B et 301D), l'influence des étapes de préconditionnement (acclimatation) et d'adaptation n'ont toujours pas été réellement apportées.

De plus, il apparaît que les fortes concentrations en substance observées dans les tests de biodégradation (jusqu'à 200 mg/l) rendent difficile, voire impossible, l'extrapolation des résultats de tests (en laboratoire) à des biodégradabilités in-situ dans l'environnement. En effet différents phénomènes tels que (1) la présence d'effets toxiques au niveau des tests qui ne s'expriment pas ou peu aux concentrations environnementales (BLOCK et coll., 1990), (2) la présence au niveau des tests d'un phénomène d'activation métabolique inexistant ou négligeable dans l'environnement à des concentration 10^3 à 10^6 fois plus faibles en substance, (3) l'existence de "concentrations seuil" (threshold concentrations) en deça desquelles les micro-organismes, non induits, ne dégradent pas la substance, biaisent les résultats de biodégradation et interdisent toute extrapolation. L'utilisation de conditions différentes de celles de l'environnement quant à la composition du milieu minéral, la température, au pH, au tampon,...., et modifiant la réponse des micro-organismes accroissent encore cette difficulté à extrapoler.

L'amélioration de cette étape d'extrapolation des résultats à l'environnement pourrait être envisagée par l'obtention de résultats exprimés en cinétique de biodégradation, et cela d'autant plus que ces cinétiques peuvent être obtenues à l'aide de tests réalisés dans des conditions environnementales (milieu, concentrations en substance et en micro-organismes,...). Les taux de biodégradation ainsi obtenus rendraient compte (1) de l'activité métabolique des micro-organismes apportés par l'inoculum, (2) de l'action de la substance testée dans des conditions qui peuvent être plus facilement rapprochées de l'environnement. Toutefois, l'obtention de résultats exprimés en cinétique nécessite la réalisation d'une étape préliminaire qu'est la numération des bactéries, et qui plus est des bactéries réellement impliquées dans le mécanisme de biodégradation considéré. En effet, la plupart des expressions cinétiques comportent un terme caractéristique de la biomasse active (BATTERSBY, 1990) qui n'est que rarement obtenu dans les tests de biodégradation classique. Il est donc aussi nécessaire d'apporter aux expressions actuelles de la biodégradation des substances chimiques un moyen de quantifier cette biomasse bactérienne active en vue de l'obtention d'expressions cinétiques de la biodégradabilité.

BUTS DE L'ETUDE

Les buts de cette étude n'est pas de résoudre tous les problèmes inhérents à l'étude de la biodégradabilité mais de contribuer à apporter certains éléments de réponse et de trouver un ou des moyens d'améliorer la connaissance de certains mécanismes de la biodégradabilité et de ces moyens d'étude.

Ainsi, trois études ont été menées.

(i) Une étude basée sur l'utilisation de tests de biodégradabilité facile visant, en outre, à déterminer l'action d'une acclimatation des micro-organismes sur la biodégradabilité de différentes substances chimiques organiques et l'intérêt de réaliser des bilans carbone. Cette étude a été menée dans le cadre du Ring Test OCDE sur les tests de biodégradabilité facile (Ring Test OCDE, 1988) dans les laboratoires CIBA-GEIGY à BALE.

(ii) Une seconde étude, développée au Water Research Centre de MEDMENHAM (Angleterre), basée sur l'emploi de substances marquées au carbone 14 cherchait à établir une technique permettant d'obtenir des cinétiques de biodégradation à des concentrations environnementales et tenant compte de la biomasse réellement active. Cette étude a de plus permis de compléter les informations sur l'acclimatation obtenus préalablement, ainsi que d'étudier l'influence d'une adaptation des micro-organismes. Une application de la technique ainsi développée à l'étude des mécanismes d'action de l'INIPOL EAP22 dans l'amélioration de la biodégradation du pétrole a été conduite au sein des laboratoires du GRL de LACQ.

(iii) Parallèlement à ces travaux, une étude des relations structure-biodégradabilité a été entreprise afin de déterminer le type de relations actuellement disponibles, les moyens d'améliorer ces relations et les problèmes liés aux prévisions qu'elles entraînent. De plus, sur l'inspiration des travaux de J. DEVILLERS (CNIS, LYON), nous avons entrepris une recherche en analyse en composantes principales (ACP) à partir de résultats de biodégradabilité (GERIKE et FISCHER, 1979) afin de comparer des tests de biodégradation et de regrouper des substances en classes de biodégradabilité similaire.

Ces trois études sont traitées respectivement dans les chapitres I, II et III. Les applications (ACP) et les explications inhérentes au chapitre III sont développées en annexe.

CHAPITRE I

Les tests de biodégradation immédiate

Intérêt des bilans carbone

CHAPITRE I

Les tests de biodégradation immédiate. Intérêt des bilans carbone.

I. Introduction	11
II. Définitions	12
2.1. Biodégradation	12
2.2. Biodégradabilité	12
2.3. Biodégradation primaire.....	12
2.4. Biodégradation totale.....	12
2.5. Méthodes d'étude de la biodégradation immédiate.....	13
2.6. Méthodes d'étude de la biodégradation intrinsèque.....	13
2.7. Méthodes de simulation.....	13
2.8. Acclimatation de l'inoculum	13
2.9. Adaptation de l'inoculum	14
III. Les tests normalisés ou standardisés	14
3.1. Généralités.....	14
3.2. Les tests de biodégradation immédiate.....	16
3.2.1. Les tests de biodégradation primaire	16
3.2.2. Mesure de la disparition du carbone organique dissous	17
3.2.3. Mesure de la production de dioxyde de carbone.....	19
3.2.4. mesure de la consommation d'oxygène	19
3.3. Les tests de biodégradation intrinsèque.....	21
3.4. Les essais de simulation.....	22

IV. Matériels et méthodes	24
4.1. Prélèvement de l'inoculum - Préparation	25
4.2. Acclimatation de l'inoculum	25
4.3. Test Sturm modifié (MST)	26
4.3.1. Principe.....	26
4.3.2. Méthode	26
4.4. Test Screening OCDE modifié.....	27
4.4.1. Principe.....	27
4.4.2. Méthode	27
4.5. Test en fioles fermées.....	27
4.4.1. Principe.....	28
4.4.2. Méthode	28
4.6. Récapitulatif des conditions des tests réalisés.....	28
4.7 Substances	28
V. Résultats.....	30
5.1. Résultats généraux.....	30
5.1.1 Biodégradation maximale.....	30
5.1.2. Analyse des courbes de biodégradation.....	34
5.2. " <i>Carbon balance in ready biodegradability testing</i> ".....	37
VI. Conclusion	47

I. Introduction

La biodégradabilité joue un rôle prépondérant dans le comportement des substances chimiques dans les environnements (air, sol, eau), et par conséquent influence leur écotoxicité.

En effet, la biodégradabilité des substances chimiques est l'un des principaux mécanismes régulant la persistance des polluants dans les milieux aquatiques (VAISHNAV et coll. , 1987), au même titre que d'autres phénomènes physiques (dégradation abiotique, photolyse, hydrolyse, adsorption,...) ou biologiques (accumulation, absorption, métabolisation,...).

Ceci explique l'importance accordée aux essais de biodégradation des substances chimiques afin de prévoir leur degré de rémanence dans l'environnement, et la nécessité d'évaluer la biodégradabilité pour l'élaboration des dossiers de notification des substances chimiques.

Les résultats de tests de biodégradation normalisés montrent des différences qui peuvent être importantes pour certaines substances chimiques (GERIKE et FISCHER, 1979, 1981). Ces différences peuvent trouver leur source dans les conditions expérimentales différentes utilisées selon les tests. Ainsi, dans le cadre d'un test circulaire sur les tests de biodégradation dite facile, nous avons testé la biodégradabilité de 5 substances (aniline, pentaérythritol, monoéthanolamine, 2,4,6-trichlorophénol et 1,6-dihydroxyhexane) selon 3 techniques normalisées différentes, mais pour lesquelles une homogénéisation des conditions de travail est préconisée par l'OCDE, en accord avec des propositions ultérieures de l'ECETOC (ECETOC, 1985) et de différents auteurs (BLOK et coll., 1979).

Les chapitres suivants présentent successivement (i) les définitions en cours dans le domaine de la biodégradabilité, (ii) une analyse critique des différents tests de biodégradabilité existants, (iii) les protocoles employés pour la réalisation des 3 tests de biodégradabilité développés pour le test circulaire de l'OCDE. Les résultats et la discussion qui s'en suivent correspondent à la publication "Carbon balance in ready biodegradability testing". Les résultats bruts (courbes de biodégradation des différentes substances,...) de ces tests sont donnés en annexe I.I.

II. Définitions

Afin d'éviter toute ambiguïté de terminologie, les définitions selon l'AFNOR (AFNOR, 1990) de termes utilisés dans le domaine de la biodégradabilité sont reprises ci-après.

2.1. Biodégradation

La biodégradation est la dégradation moléculaire d'une matière organique résultant de l'action de micro-organismes.

Le terme "métabolisme" sera donné à la dégradation de matière organique par des organismes supérieurs (animaux, hommes,...).

2.2. Biodégradabilité

La biodégradabilité est l'aptitude d'une substance organique à subir une biodégradation.

2.3. Biodégradation primaire

La biodégradation primaire, ou biodégradation fonctionnelle, est la biodégradation partielle de la structure moléculaire d'une substance organique conduisant à la perte d'une propriété caractéristique, éventuellement liée à une nuisance.

2.4. Biodégradation totale

La biodégradation totale, ou biodégradation ultime, est la biodégradation complète de la structure moléculaire avec formation de dioxyde de carbone, d'eau, de méthane (en anaérobiose), de dérivés minéraux, ou de constituants des micro-organismes.

Le terme anglais correspondant est "ultimate biodegradation".

2.5. Méthodes d'étude de la biodégradabilité immédiate

Les méthodes d'étude de la biodégradation immédiate (ready biodegradability) sont des méthodes qui permettent de distinguer des substances qui seront facilement biodégradées dans la majorité des conditions de l'environnement ou des stations d'épuration.

2.6. Méthodes d'étude de la biodégradabilité intrinsèque

Ce sont des méthodes d'étude de la biodégradation de substances chimiques dans des conditions en principe optimales, contrairement aux précédentes considérées comme étant plus drastiques.

2.7. Méthodes de simulation

Les méthodes de simulation s'efforcent de mieux modéliser la biodégradation dans différentes conditions de l'environnement ou de stations d'épuration.

2.8. Acclimatation de l'inoculum

Préalablement à l'essai de biodégradation, l'acclimatation (appelée aussi conditionnement) correspond au maintien de l'inoculum, pendant une durée déterminée, dans des conditions d'incubation définies (température, aération,...) dans un milieu sans addition de matière organique (hormis celles apportées par l'inoculum lui-même).

Une remarque s'impose au sujet du terme "acclimatation" et de ces correspondances en anglais. En effet, on peut retrouver dans la littérature, pour traduire un processus d'acclimatation comme il est défini précédemment, les termes "acclimation", "acclimatization", "pre-conditionning" et..."adaptation" !

2.9. Adaptation de l'inoculum

Contrairement à l'acclimatation, l'adaptation correspond à la mise en contact de l'inoculum, préalablement à l'essai, pendant une durée déterminée, dans des conditions d'incubation définies (milieu, température, aération,...) avec des concentrations adéquates de la substance dont on veut étudier la biodégradabilité.

Les termes anglais correspondant à l'adaptation, et retrouvés dans la littérature, sont "adaptation" ou "pre-conditionning" !

L'ambiguïté de ces deux derniers termes, qui peuvent signifier soit acclimatation, soit adaptation, selon les cas, ou leur mauvaise utilisation, peut rendre difficile la compréhension de certains articles écrits dans la langue de Shakespeare.

III. Tests normalisés ou standardisés

3.1. Généralités

La plupart des tests de biodégradation actuellement normalisés sont caractéristiques des milieux aquatiques et des conditions aérobies. La liste présentée dans le chapitre suivant est loin d'être exhaustive, mais fait ressortir les caractéristiques générales et les conditions d'utilisation des tests les plus couramment utilisés.

Ces tests peuvent être répartis en 3 classes définies dans les chapitres précédents :

- tests de biodégradation immédiate
- tests de biodégradation intrinsèque
- tests de simulation

Une liste des différentes méthodes d'évaluation de la biodégradabilité des substances chimiques en aérobiose et en milieu aquatique est donnée dans le tableau II., comportant également les références (normes ou lignes directrices) de ces méthodes.

ORGANISMES METHODES	ISO	AFNOR	CEE	OCDE
<u>Biodégradation immédiate</u>				
Analyse du dioxyde de carbone	DIS 9439*	T 90-306 (NF ISO 9439)	C.5	301 B
Analyse du carbone organique dissous	ISO 7827	NF T 90-312	C.3	301 E
Détermination de la demande en oxygène	DIS 9408*	NF T 90-309 (NF ISO 9408)	C.7	301 C
<u>Biodégradation intrinsèque</u>				
Essai Zahn-Wellens	DIS 9888*	Pr T 90-316	- (Pr NF ISO 9888)	302 B
Essai SCAS	DIS 9887*	Pr T 90-314 (Pr NF ISO 9887)	-	-
<u>Essai de simulation</u>	TC 147 SC 5/GT 4 N 128**	-	-	303 A

Tableau I.I. : Méthodes d'évaluation de la biodégradation aérobie en milieu aquatique (d'après DE SAXCE, 1989) - Mise à jour 1991

ISO : instance de normalisation "Qualité de l'eau - Méthodes biologiques"

AFNOR : Agence Française de Normalisation

CEE : Communauté Economique Européenne

OCDE : Organisation de Co-opération et de Développement Economique

* : projet de norme internationale

** : document de travail

L'AFNOR utilise conjointement une dénomination propre et une dénomination ISO,

3.2. Tests de biodégradation immédiate

De loin les plus nombreux et les plus employés, ces tests sont basés sur un principe identique. En effet, ils permettent la détermination de la biodégradabilité immédiate d'un composé chimique représentant la seule source de carbone du milieu minéral en présence d'un inoculum faible (par rapport à la quantité de substance), d'origine variable (eau d'égout, eau de surface, boue activée,...) qui n'a subi ni adaptation, ni acclimatation.

Les teneurs en azote et phosphate des milieux minéraux utilisés pour ces tests sont très variables (de 0,45 mg/l à 86 mg/l pour l'azote et de 11,6 mg/l à 242 mg/l pour le phosphate) mais sont toutefois très inférieures à celles observées dans l'environnement.

Ces tests peuvent être regroupés en 4 classes, liées aux méthodes analytiques utilisées :

- tests déterminant la biodégradabilité primaire de substances organiques (plus particulièrement des agents de surface ou détergents) ;
- tests déterminant la biodégradabilité ultime de substances organiques par mesure de la disparition du Carbone Organique Dissous (COD) ;
- tests déterminant la biodégradabilité ultime de substances organiques par mesure de la production de dioxyde de carbone ;
- tests respirométriques déterminant la biodégradabilité ultime de substances organiques par mesure de la consommation d'oxygène.

3.2.1. Tests de biodégradabilité primaire

Les trois tests représentés dans cette catégorie s'appliquent respectivement aux trois classes de détergents couramment utilisés pour la détermination de la biodégradabilité :

- * d'agents de surface anioniques (NF T 73-260) ;
- * d'agents de surface non-ioniques (NF T 73-270) ;
- * d'agents de surface cationiques (Projet de norme T 73-290).

Le tableau I.II reprend les caractéristiques générales de ces trois tests.

Test	NF T 73-260	NF T 73-270	Pr T 73-290
Substance testée	Agent de surface anionique	Agent de surface non-ionique	Agent de surface cationique
Concentration mg/l	20	20	5
Inoculum (cellules/ml)	Eau d'égout 10 ⁵ -10 ⁷	Eau d'égout 10 ⁵ -10 ⁷	Eau d'égout 10 ⁵ -10 ⁶
Durée (jours)	10	10	10
Température	25 ± 1 C	25 ± 1 C	25 ± 1 C
Dosage	Substance active au bleu de méthylène	Substance active au bismuth	Substance active au bleu de disulfine

Tableau I.II : Caractéristiques générales des tests de biodégradation primaire des agents de surface

A l'heure actuelle, les techniques analytiques employées dans ces tests peuvent être remplacées par des techniques d'analyse spécifique (chromatographie en phase gaz, HPLC,...)

3.2.2. Mesure de la disparition du carbone organique dissous

Les principaux tests de biodégradabilité utilisant cette méthode analytique de détermination de la biodégradabilité sont :

- essai AFNOR modifié (NF T 90-302, OCDE 301A) ;
- essai screening OCDE modifié (OCDE 301E) ;
- essai AFNOR (NF T 90-312) ;
- essai ISO 7827.

Les caractéristiques de ces tests sont reprises dans le tableau I.III.

Test	AFNOR modifié NF T 90-302 OCDE 301A	Screening OCDE OCDE 301E	AFNOR NF T 90-312	ISO 7827
Substances	Comp. organiques non volatils solubles	Comp. organiques solubles	Comp. organiques non volatils solubles	Comp. organiques non volatils solubles
Concentrations	40 mg/l	5-40 mgCOD/l	10-40 mgCOD/l	10-40 mgCOD/l
pH	7,5 ± 0,1	NS	7,2 ± 0,1	7,2
Température	25 ± 1 C	20-25 C	22 ± 2 C	20-25 C
Inoculum	Eau de surface + effluent de station d'épuration urbaine	Terre ou effluent ou boue activée ou mélange des 3	Effluent secondaire ou boue activée ou eau de surface	cf NF T 90-312
Concentration (cellules/ml)	10 ⁵	NS	10 ⁵ -10 ⁷	(1)
Durée (jours)	28	28	28	28

Tableau I.III : Caractéristiques générales des tests de biodégradation immédiate utilisant une analyse du carbone organique dissous.

NS : non spécifié dans les normes

(1) de manière à apporter une concentration en carbone organique dissous inférieure à 10% de celle apportée par la substance testée.

COD : Carbone Organique Dissous

Il faut noter que, suite aux résultats du test circulaire de l'OCDE pour l'étude de la biodégradabilité immédiate, les milieux minéraux, ainsi que quelques conditions expérimentales, ont été homogénéisés afin de diminuer les variations de résultats obtenus par ces tests comme l'ont observé de nombreux auteurs (GERIKE et FISCHER, 1979,...).

Cette remarque s'applique aussi pour les deux catégories suivantes. La composition du milieu minéral actuellement préconisé pour ces tests est reprise dans le chapitre IV.

3.2.3. Mesure de la production de dioxyde de carbone

Les tests déterminant la biodégradabilité des substances chimiques par une mesure de la production de dioxyde de carbone sont :

- essai Sturm modifié (OCDE 301B) ;
- essai AFNOR (NF T 90-306)

Les caractéristiques de ces tests sont reprises dans le tableau I.IV.

Test	Sturm modifié OCDE 301 B	AFNOR NF T 90-306
Substances	Composés organiques non volatils	Composés organiques non volatils solubles
Concentrations	10-20 mg/l	10-20 mgCOD/l
pH	7,2 ± 0,2	7,2
Température	20-25 C	22 ± 2 C
Inoculum	Boue activée	cf NF T 90-312
Concentration (cellules/ml)	10 ⁶ à 20x10 ⁶	cf NF T 90-312
Durée (jours)	28	28

Tableau I.IV : Caractéristiques générales des tests de biodégradation immédiate utilisant une analyse du dioxyde de carbone

COD : Carbone Organique Dissous

3.2.4. Mesure de la consommation d'oxygène

Plusieurs tests utilisent comme technique de détermination de la biodégradabilité une mesure de la consommation de l'oxygène dissous dans le milieu :

- essai en fiole fermée - simple phase (OCDE 301D) ;

- essai en fiole fermée - double phase (Ibid.) ;
- essai MITI I modifié (OCDE 301C) ;
- essai RDA (Repetitive Die-Away test).

Ces différents tests utilisent soit une méthode titrimétrique de dosage de l'oxygène dissous, soit une électrode à oxygène, pour évaluer la consommation d'oxygène.

Les caractéristiques générales de ces tests sont données dans le tableau I.V.

Test	Essai fioles fermées OCDE 301D	MITI I OCDE 301C	Repetitive die-away test
Substances	Comp. organiques (sans restrictions)	Comp. organiques (sans restrictions)	Comp. organiques (sans restrictions)
Concentrations	2-10 mg/l	100 mg/l	100 mgDThO/l
pH	7,2 ± 0,2	7,0 ± 0,1	NS
Température	¼ 20 C	25 ± 2 C	20-25 C
Inoculum	Terre ou effluent ou boue activée ou mélange des 3	Mélange de boues de 10 provenances différentes	Boue activée
Concentration (cellules/ml)	10 ³ à 10 ⁵	30 mgPS/l	30 mg/l
Durée (jours)	28	28 (14)	4 - 8 semaines

Tableau I.V : Caractéristiques générales des tests de biodégradation immédiate utilisant une analyse de l'oxygène dissous.

NS : non spécifié dans les normes.

DThO : Demande Théorique en Oxygène.

PS : Poids Sec de matières en suspension.

3.3. Tests de biodégradation intrinsèque

Les tests de biodégradation intrinsèque (ou inhérente) se font en optimisant, par rapport aux tests de biodégradation immédiate :

- l'exposition de la substance chimique aux micro-organismes ;
- le rapport substance-biomasse ;
- les conditions d'essai (LEPAILLEUR, 1987).

Ainsi, la concentration en substance peut atteindre 200 mg/l, l'inoculum est constitué d'une boue activée lavée (forte concentration bactérienne).

L'ajout dans le test d'une autre source de carbone (facilement biodégradable) peut être réalisé afin d'entretenir la biomasse. L'augmentation possible de la durée de réalisation de ces tests peut permettre l'intervention de phénomènes d'adaptation.

Quatre essais de détermination de la biodégradabilité intrinsèque sont couramment utilisés :

- Test SCAS (302 A) ;
- Test ZAHN-WELLENS (OCDE 302B) ;
- Test MITI II modifié (OCDE 302C) ;
- Test de biodégradabilité intrinsèque dans les sols (OCDE 304A).

Les deux premiers tests cités proposent une mesure de la disparition du carbone organique dissous, alors que les deux suivants mesurent respectivement la consommation d'oxygène dissous (par une technique manométrique) et la production de dioxyde de carbone marqué au ^{14}C (suite à la biodégradation de composés organiques marqués au ^{14}C).

Les conditions de réalisation de ces 4 tests sont données dans le tableau I.VI.

Test	SCAS mod. OCDE 302A	ZAHN-WELLENS Mod. OCDE 302B	MITI II Mod. OCDE 302C	Biodégradation dans les sols OCDE 304A
Substances	Comp. organiques non volatils solubles	Comp. organiques solubles	cf MITI I	Comp. organiques
Concentrations	20 mgCOD/l	50-200 mg/l	30 mg/l	10-20 mgCOD/l
pH	NS	NS	7,0 ± 0,1	NS
Température	NS	22 ± 3 C	25 ± 2 C	22 ± 2 C
Inoculum	Boue activée	Boue lavée	cf MITI I	sol
Concentration	NS	NS	100 mg/l	NS
Durée (jours)	(1)	28	14 à 28	NS
Type de mesure	COD	COD	Oxygène	¹⁴ CO ₂

Tableau I.VI : Caractéristiques générales des tests de biodégradation intrinsèque

(1) : 23 h, renouvelé tous les jours pendant une durée variant de 40 à 120 jours.

NS : non spécifié dans les normes ou lignes directrices.

COD : Carbone Organique Dissous.

3.4. Essais de simulation

Ces essais dynamiques en continu permettent, comme l'indique leur nom, de simuler les procédés de biodégradation que l'on peut obtenir dans une station d'épuration. Deux tests sont principalement utilisés :

- test à unités couplées ou HUSMAN Units (OCDE 303A, NF T 73-265) ;
- test Porous Pot.

Ces 2 tests sont basés sur le même principe, mais sont effectués sur des appareillages différents (Figure I.1.). Une boue activée lavée, placée sous aération, est alimenté par un milieu nutritif contenant la source de carbone. Périodiquement, une décantation des boues intervient suite à la suppression de l'aération.

La mesure de la biodégradation des substances organiques se fait par un suivi du rapport de la quantité de carbone organique dissous (COD) sortant du système sur la quantité de COD apportée par le milieu nutritif (entrant dans le système).

Les caractéristiques générales de ces tests sont reprises ci-dessous :

- substances testées : composés organiques solubles
- concentration testée : 20 mgCOD/l
- température : 20-25 C
- inoculum : effluent + sol + eau de surface, ou boue activée lavée.

IV. Matériel et méthodes

Les protocoles décrits dans les paragraphes suivants sont ceux dérivés des lignes directrices de l'OCDE (OCDE 301B, 301D, 301E) et adaptés pour la réalisation du test circulaire de l'OCDE pour l'étude de la biodégradabilité immédiate (Ring Test OCDE, 1989).

Un certain nombre de considérations générales peuvent être appliquées aux 3 tests qui ont été réalisés :

- l'inoculum utilisé (une boue activée de station d'épuration domestique) n'est pas adaptée préalablement au test aux différents composés chimiques testés ;
- le composé correspond à la seule source de carbone du test ;
- un milieu minéral standardisé est utilisé (sa composition est donnée dans le tableau I.VII) ;
- le milieu minéral est inoculé par 30 mg de solides en suspension par litre de milieu (tests Sturm modifié et test screening OCDE modifié) ou 3 mg de solides en suspension par litre de milieu (test en fioles fermées) ;
- les procédures d'incubation doivent se dérouler dans des conditions stables (température, aération) ;
- tous les tests doivent être réalisés en parallèle avec un test sur une substance de référence (aniline dans notre cas).

4.1. Prélèvement de l'inoculum - Préparation

Dix litres de boue activée sont prélevés à la station d'épuration d'effluents domestiques de REINACH (SUISSE), puis transportée en moins d'une demi-heure au laboratoire où ils sont remis sous aération pour une demi-heure.

Après aération, la boue activée est décantée pendant 15 minutes. A la fin de la période de décantation, la fraction surnageante (liquide transparent) est éliminée par aspiration. Le volume initial est restauré par adjonction d'un volume correspondant de milieu minéral.

Les opérations d'aération, de décantation, d'élimination du surnageant et de restauration du volume initial sont répétées 3 fois.

La boue activée "lavée" ainsi obtenue correspond à l'inoculum frais, non acclimaté, qui sera utilisé dans les différents tests.

Préalablement à son utilisation dans les tests, cette inoculum frais est testé en vue de la détermination de son poids de matières sèches en suspension (Cf paragraphe 5.2).

4.2. Acclimatation de l'inoculum

Pour réaliser les essais de biodégradation avec un inoculum acclimaté, la boue activée subit un pré-conditionnement dans la milieu minéral.

La boue activée fraîche est conservée sous aération pendant 7 jours. Les pertes de liquide par évaporation sont compensées périodiquement par un ajout d'un volume d'eau distillée équivalent à celui de la perte (afin de ne pas modifier la structure ionique du milieu).

A la fin de la période d'acclimatation, une détermination du poids de matières sèches en suspension est réalisée (Cf paragraphe 5.2).

4.3. Test Sturm modifié (MST)

Ce test permet la détermination de la biodégradation totale d'une substance carbonée par un inoculum bactérien par une mesure de la production de dioxyde de carbone. Les caractéristiques générales de ce test sont données dans le paragraphe 3.2.3.

4.3.1. Principe

La biodégradation totale de composés chimiques organiques par les micro-organismes d'un inoculum maintenu sous aération constante à l'aide d'air épuré en dioxyde de carbone se traduit par la formation de dioxyde de carbone.

Ce dioxyde de carbone est drainé par le flux de gaz vers des "pièges" à dioxyde de carbone contenant une base (hydroxyde de sodium dans notre cas) où il est fixé sous forme de carbonate de sodium (NaHCO_3).

Le carbonate de sodium est dosé périodiquement par analyse dans les pièges du carbone inorganique dissous permettant ainsi d'établir une courbe de production de dioxyde de carbone résultant de l'oxydation totale du carbone organique. Puis par calcul, en prenant en compte la production théorique de dioxyde de carbone, on obtient une courbe de biodégradation de la substance testée exprimée en pourcentage de biodégradation par rapport à la production théorique maximale de CO_2 .

4.3.2. Méthode

La méthode de réalisation du test Sturm Modifié est celle donnée par la ligne directrice OCDE 301B. Toutefois, quelques déviations à cette méthode ont été apportées par le protocole du Ring test OCDE (OECD Ring Test for ready biodegradability testing, 1988). Ces déviations sont reprises dans le paragraphe 5.2.

4.4. Test Screening OCDE modifié (MOST)

Le test screening OCDE modifié permet de déterminer la biodégradation d'un composé organique soluble par mesure de la disparition du carbone organique dissous du milieu. Les caractéristiques générales de ce test sont reprises dans le paragraphe 3.2.2.

4.4.1. Principe

La substance organique soluble dans le milieu de test subit une biodégradation par les micro-organismes apportés par l'inoculum. Cette biodégradation est suivie par une mesure périodique de la disparition du carbone organique dissous présent dans le milieu test à l'aide d'un analyseur de carbone.

Elle est exprimée en pourcentage de biodégradation rapportée à la dégradation observée dans un test sans inoculum (ou dans lequel l'inoculum a été "empoisonné" au chlorure mercurique 1%).

4.4.2. Méthode

La méthode appliquée est décrite dans la ligne directrice OCDE 301E. Cette méthode est toutefois adaptée aux recommandations de l'OCDE pour la réalisation du Ring test OCDE (OECD Ring Test for ready biodegradability testing, 1988). Ces adaptations sont détaillées dans le paragraphe 5.2.

4.5. Test en fioles fermées

Contrairement aux 2 tests précédents, ce test de biodégradation en fiole fermée ne mesure la biodégradation ni par production de dioxyde de carbone, ni par disparition du carbone organique dissous. La biodégradation est déterminée par une mesure de la consommation en oxygène dissous.

Les caractéristiques générales de ce test sont données dans le paragraphe 3.2.4.

4.5.1. Principe

Dans un système hermétiquement clos contenant le milieu test (inoculum, substance et milieu minéral) saturé en oxygène, la concentration en oxygène dissous est suivie à l'aide d'une électrode à O₂ aux temps 0 ; 7 ; 14 ; 21 et 28 jours.

La biodégradation est alors exprimée en pourcentage de la consommation d'oxygène par rapport à la consommation théorique calculée, tout en tenant compte de la consommation d'oxygène liée au système de test (consommation endogène).

4.5.2. Méthode

La méthode utilisée correspond à la ligne directrice OCDE 301D modifiée pour les besoins du Ring Test OCDE (OECD Ring Test for ready biodegradability testing, 1988).

4.6. Récapitulatif des conditions des tests réalisés

Le tableau I.VII ci-après reprend les caractéristiques des 3 tests réalisés dans le cadre du Ring Test OCDE.

4.7. Substances

Cinq substances recommandées par l'OCDE ont été testées :

- | | |
|-------------------------------------|-------------------|
| - Aniline (substance de référence) | (MERCK 1261) |
| - Monoéthanolamine (MEA) | (FLUKA 36 007) |
| - 1,6 - dihydroxyhexane (DHH) | (ALDRICH 36 083) |
| - 2,4,6 - trichlorophénol (2,4,6-T) | (FLUKA 26 67 70) |
| - Penta-érythritol (PE) | (FLUKA 27 01 06). |

L'aniline est une des substances recommandée, au même titre que le benzoate de sodium, par les différentes normes (AFNOR, CEE,...) ou lignes directrices (OCDE) comme substance de référence. En effet, elle présente dans la plupart des tests de biodégradation immédiate une biodégradabilité variant entre 92 et 100 % (GERIKE et FISCHER, 1979).

Les 4 autres substances ont été choisies pour leur comportement irrégulier dans les différents tests de biodégradabilité (OCDE Ring Test, 1988).

Ainsi, le pentaérythritol présente une biodégradabilité variant de 0 % (test MITI, test screening OCDE) à 50 % (test Sturm modifié). Sa biodégradabilité atteint toutefois des valeurs proches de 97 % dans les tests de biodégradation inhérente (GERIKE et FISCHER, 1979, 1981) et il est considéré comme étant uniquement biodégradable de manière inhérente (PAINTER et KING, 1985)..

Test	Test Sturm modifié OCDE 301B	Test Screening OCDE modifié OCDE 301E	Test en fioles fermées OCDE 301D
substance	Comp. Organique non volatil	Comp. Organique soluble	Comp. Organique
Concentration (mg/l)	20.0 ± 0.1		20.0 ± 0.1
pH	7.0 ± 0.1		7.0 ± 0.1
température (C)	20 ± 1		20 ± 1
Inoculum	Boue activée		Boue activée
concentration mgSS/l	30		3
milieu minéral	*		*
Durée	28 j		28 j

Tableau I.VII: Récapitulatif des caractéristiques de 3 tests réalisés dans le cadre du Ring Test OCDE

* : décrit dans le paragraphe 5.2. (Table 1)

V. Résultats

Les résultats bruts obtenus pour ces 3 tests sont reportés sous forme de courbe en annexe I.I.

Ces résultats généraux obtenus pour les 3 tests, et plus particulièrement ceux du test en fioles fermées, sont repris dans le paragraphe suivant.

Les résultats obtenus dans les tests Sturm modifié et Screening OCDE modifié sont analysés dans le cadre de la publication "Carbon balance in ready biodegradability testing" (Cf paragraphe 5.2.).

5.1. Résultats généraux

Les résultats généraux de ces 3 tests sont divisés en 4 groupes.

5.1.1. Biodégradation maximale

Les Maxima de biodégradation obtenus au cours de ces 3 tests sont repris dans le tableau I.VIII., pour chaque traitement de l'inoculum (inoculum frais ou préconditionné), pour chacune des 5 substances testées.

Les valeurs de biodégradation obtenues dans le test MST montrent que seul le penta-érythritol n'atteint pas le seuil de biodégradabilité ("pass-level" en anglais) avec un inoculum frais alors que le penta-érythritol et le 2,4,6-trichlorophénol ne l'atteignent pas avec un inoculum préconditionné).

Par contre, toutes les substances testées présentent une biodégradabilité supérieure au seuil (70 % de biodégradation), et ce quelque soit l'inoculum utilisé (frais ou pré-conditionné), dans le test MOST.

Substances	MST(1)		MOST(2)		Fioles fermées(3)	
	F*	P*	F*	P*	F*	P*
aniline	73(2)	58(11)	96(5)	97(1)	72(0)	90(5)
MEA	92(4)	62(21)	94(4)	99(0)	73(8)	99(2)
1,6-DHH	91(3)	98(2)	94(2)	96(0)	65(3)	69(3)
2,4,6-T	80(8)	52(30)b	91(1)	93(3)	11(1)b	70(11)
PE	59ab	53ab	97(1)	97(0)	46(10)b	56(2)b

Tableau I.VIII : Valeurs de biodégradation maximales (%) observées dans le cadre du Ring Test OCDE

Biodégradation exprimée en :

- (1) %ThCO₂
- (2) % DOC
- (3) %DThO.

Les valeurs entre parenthèses sont des écarts à la moyenne.

* : F : inoculum frais ; P : inoculum préconditionné

a : écart à la moyenne non observé

b : n'atteint pas les seuils

Les valeurs de biodégradation maximales observées dans le test en fioles fermées montrent une nette amélioration de la biodégradabilité des substances avec un inoculum préconditionné. Ainsi, des 2 substances (2,4,6-T et PE) qui n'atteignent pas le seuil (60 % de biodégradation) avec un inoculum frais, seul le pentaérythritol ne l'atteint pas avec un inoculum préconditionné, tout en s'en approchant fortement (56 ± 2 % de biodégradation).

Ce phénomène peut trouver son explication dans le fait que l'acclimatation permet une réduction de la consommation d'oxygène endogène (consommation d'oxygène liée au métabolisme cellulaire de maintenance). Cette consommation endogène peut interférer au niveau de la consommation exogène (dûe à la biodégradation).

Les différences observées entre les trois tests peuvent trouver leur explication dans l'utilisation de techniques analytiques différentes :

- mesure de la disparition du carbone organique dissous (test screening OCDE modifié) ;
- mesure de la production de dioxyde de carbone (test Sturm modifié) ;
- mesure de la consommation d'oxygène (test en fioles fermées).

En effet, comme il le sera détaillé dans le paragraphe 5.2, le test MST est représentatif d'une biodégradation ultime (minéralisation), alors que le test MOST est représentatif d'une disparition du carbone organique dissous du milieu, carbone qui pénètre la cellule et intègre le métabolisme.

La figure I.2 résume le devenir d'un composé organique soluble qui est intégré dans les processus de biodégradation, et établit les relations entre ses processus et les tests biodégradation utilisés.

Le test en fioles fermées représente quant à lui un indice de biodégradation sans faire état du stade où la biodégradation s'arrête (si la valeur de biodégradation est inférieure à 100%).

La valeur de biodégradation observée dans le test en fioles fermées ($x\%$) correspond soit à la biodégradation totale de $x\%$ de la substance testée, soit à la consommation de $x\%$ de la valeur théorique de consommation d'oxygène pour cette substance (les $(100 - x)\%$ restant correspondant à la métabolisation d'un ou plusieurs produit(s) de biodégradation non encore métabolisé(s)).

Il n'est vraisemblablement pas possible, avec une technique mesurant la consommation d'oxygène, de situer la provenance de la consommation d'oxygène dans le processus global de biodégradation.

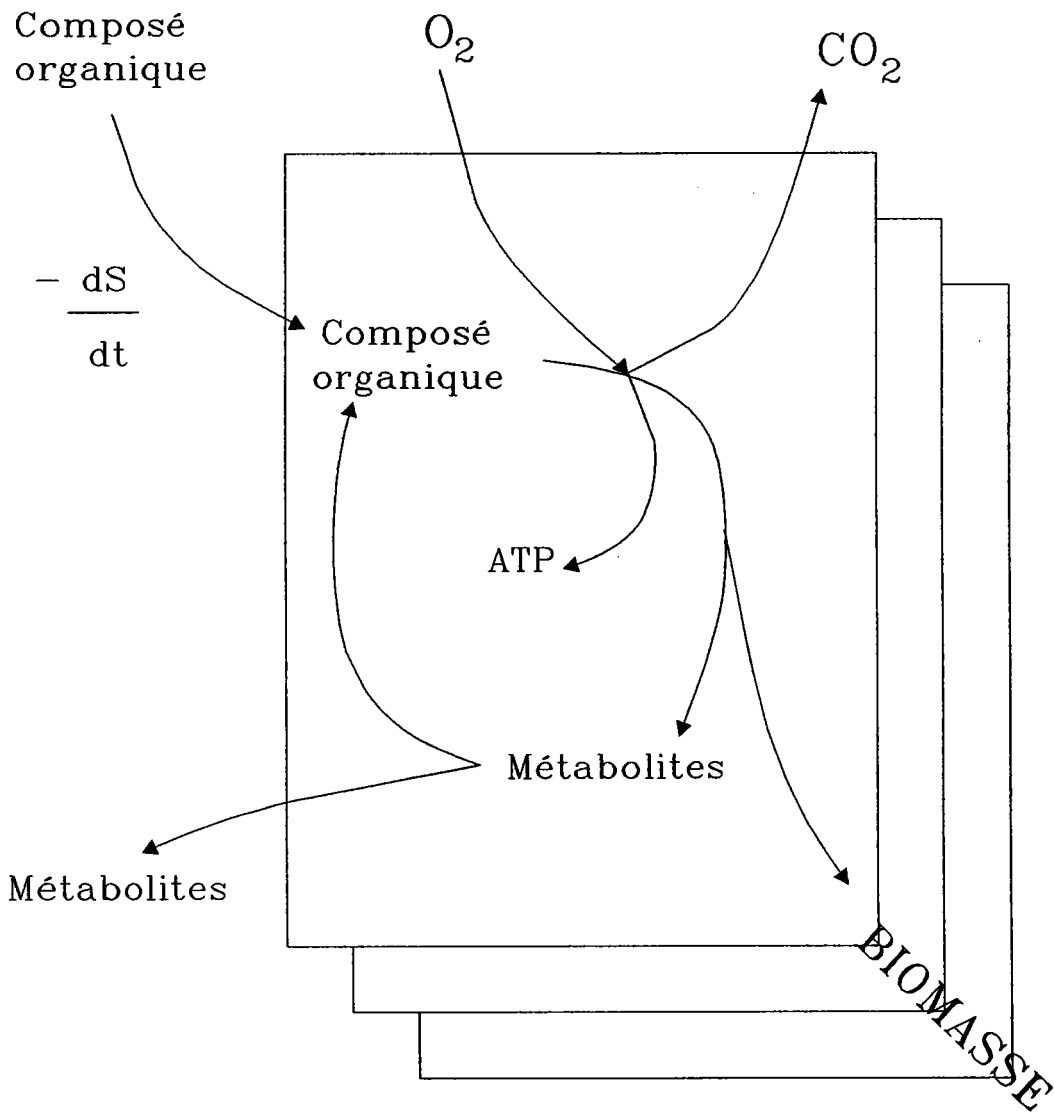


Figure I.2.: Processus métaboliques intervenant dans les phénomènes de biodégradation

5.1.2. Analyse des courbes de biodégradation

A partir des courbes de biodégradation obtenues (annexe I.I.), il est possible de définir 2 phases particulières (figure I.3.) :

- phase de latence ;
- phase de biodégradation.

La phase de latence peut être assimilée à la période durant laquelle les systèmes biochimiques de la biodégradation se mettent en place ; cette phase correspond à la période de temps où la biodégradation est inférieure à 10%.

La phase de biodégradation correspond quant à elle à la période de temps durant laquelle la biodégradation augmente de 10% à la valeur du seuil (60% pour les tests respirométriques et 70% pour les tests mesurant la disparition du carbone organique dissous). Cette phase correspond à la phase réelle de biodégradation durant laquelle les phénomènes biochimiques de la biodégradation interviennent.

a) Analyse de la durée des phases de latence

Les durées des phases de latence observées dans les différents tests, pour les 5 substances et les 2 inocula (frais, F et préconditionné, P), sont reprises dans le tableau I.IX..

Substances	MST		MOST		Fioles fermées	
	F	P	F	P	F	P
aniline	4	4	0	0	2	1
MEA	2	3	0	0	2	1
1,6-DHH	3	4	0	0	2	3
2,4,6-T	7	8	2	4	27	8
PE	19	22	11	13	10	17

Tableau I.IX : Durées des phases de latence (jours) observées dans le cadre du Ring Test OCDE

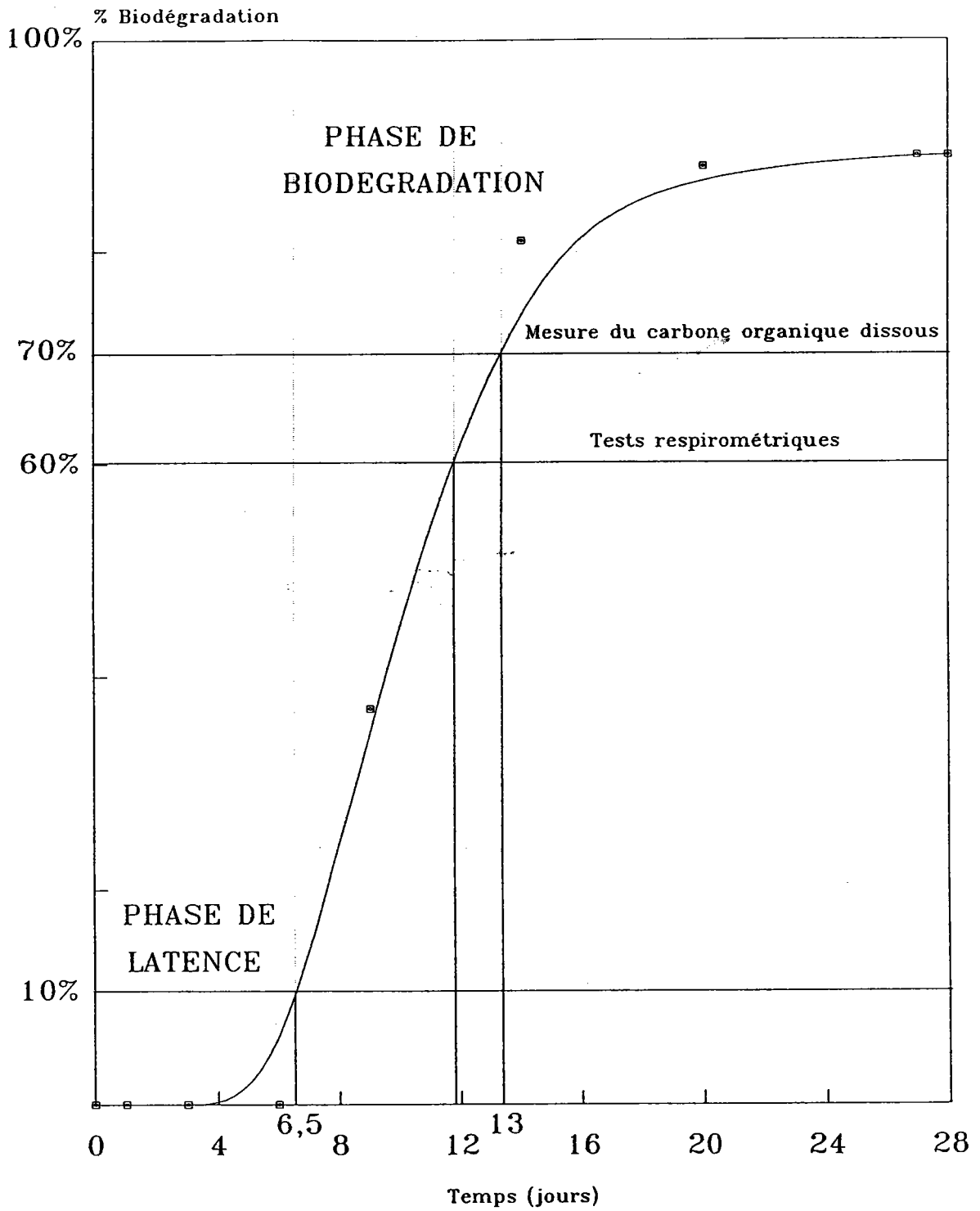


Figure I.3.: Courbe de biodégradation type (phase de latence - phase de biodégradation)

Les ordres de grandeur des phases de latence observées pour les 3 tests permettent d'établir une ébauche de la chronologie des événements qui interviennent lors d'un processus de biodégradation.

En effet, il semblerait que la disparition du carbone organique dissous soit le premier phénomène observable de la biodégradation. Une hypothèse peut être formulée en considérant l'intervention de mécanismes de transport (actif ou passif). Ceux-ci interviendraient, préalablement aux phénomènes propres à la biodégradation, pour faire pénétrer la substance au sein des cellules, la faisant ainsi disparaître du milieu.

L'apparition de signaux de la consommation d'oxygène, suivant la disparition de la substance du milieu, pourrait s'expliquer par l'intervention, en second lieu, de phénomènes oxydatifs transformant la substance initiale en produits de biodégradation.

L'apparition plus tardive de la production de dioxyde de carbone s'explique, quant à elle, par son caractère final dans un phénomène de minéralisation.

Il faut toutefois noter que ces 3 phénomènes peuvent intervenir après des périodes de temps qui varient de manière importante selon les substances.

Nous pouvons de plus constater que les phases de latence tendent à augmenter avec l'emploi d'inoculum préconditionné. Ce phénomène peut être expliqué par une diminution de l'activité métabolique au cours de la période d'acclimatation (URBAIN, 1988).

b) Analyse de la durée des phases de biodégradation

Les durées des phases de biodégradation relevées dans les différents tests, pour les 5 substances et les 2 inocula (frais, F et préconditionné, P), sont reprises dans le tableau I.X..

Substances	MST(1)		MOST(2)		Fioles fermées(1)	
	F	P	F	P	F	P
aniline	6	>25	3	5	2	6
MEA	4	4	3	3	13	5
1,6-DHH	3	6	4	5	20	22
2,4,6-T	5	>21	7	5	>1	6
PE	>9	>7	3	6	>18	>11

Tableau I.X. : Durées des phases de biodégradation (jours) observées dans le cadre du Ring Test OCDE

(1) seuil = 60%

(2) seuil = 70%.

Contrairement aux résultats obtenus pour les phases de latence, aucune classification des phases de biodégradation n'est réalisable en fonction des tests utilisés.

Par contre, nous pouvons aisément remarquer que les ordres de grandeur des phases de biodégradation sont plus longues dans le cas du test en fioles fermées excepté toutefois pour l'aniline et le 2,4,6-trichloro-phénol. Les différences observées entre les 2 autres tests (test Sturm modifié et test OCDE modifié) ne sont quant à elles pas notables.

5.2. Interest of Carbon balance in ready biodegradability testing

La biodégradation de composés organiques hydrosolubles peut être mise en évidence soit par la disparition de la phase aqueuse, soit, quand une biodégradation totale intervient, par son oxydation en dioxyde de carbone.

Ces 2 critères de détermination de la biodégradation sont recommandés par différentes méthodes normalisées telles que le test Sturm modifié (mesure de la production de dioxyde de carbone) et le test screening OCDE modifié (mesure de la disparition du carbone organique dissous).

La disparition du carbone organique dissous représente à la fois l'oxydation de la substance et sa métabolisation, qui peut conduire à la production de biomasse.

La production de dioxyde de carbone est une mesure de la minéralisation totale de la substance organique (oxydation totale).

La détermination, dans le même test (test Sturm modifié par exemple), de la disparition du carbone organique dissous et de la production de CO₂ donne une information complémentaire sur la biodégradation. La différence entre la quantité de carbone éliminé (de la solution aqueuse) et la quantité de carbone transformé en CO₂ peut être considérée comme le carbone assimilé par les bactéries et transformé en biomasse.

Cinq substances (aniline, mono-éthanolamine, penta-érythritol, 1,6-dihydroxyhexane et 2,4,6-trichlorophénol) ont été testés dans ces deux tests de biodégradabilité immédiate. La conduite simultanée de ces 2 tests permet de différencier le carbone totalement éliminé, le carbone transformé en dioxyde de carbone et le carbone assimilé.

Ces tests ont été réalisés en utilisant un inoculum frais et un inoculum préconditionné afin de déterminer comment ces paramètres pouvaient influencer les processus de biodégradation.

Bien que certaines substances choisies aient été rapportées dans la littérature (GERIKE et FISCHER, 1979, 1981) comme produisant des résultats erratiques, toutes présentent une biodégradabilité supérieure à 70 % lorsque l'on mesure la disparition du carbone organique dissous, et peuvent donc être considérées comme facilement biodégradables dans le test screening OCDE modifié (Cf table 2).

Par contre, la biodégradabilité observée pour toutes les substances dans le test Sturm modifié est inférieure à celle du test screening OCDE modifié (Cf Table 2).

Dans le test Sturm modifié, les valeurs de biodégradation obtenues par mesure de la production de dioxyde de carbone sont inférieures à celles obtenues par mesure de la disparition du carbone organique dissous (Cf Table 2).

Ces différences peuvent être expliquées par la prise en compte de la quantité de carbone assimilé (Cf Table 3).

D'autre part, il n'y a pas de modifications de la biodégradation exprimée en % DOC quand un inoculum préconditionné est utilisé (Cf Table 2) et ce quel que soit le test.

Toutefois, la production de dioxyde de carbone est réduite, (Table 2), alors que, dans le même temps, la quantité de carbone assimilé augmente lorsque l'on utilise un inoculum préconditionné (Table 3), sauf pour le 1,6-dihydroxyhexane.

De plus, à cause de la forte part de carbone assimilé (jusqu'à 45 %), certaines substances (monoéthanolamine, pentaérythritol et 2,4,6-trichlorophénol) n'atteignent pas le seuil ("pass-level") de 60 % de la quantité théorique de CO₂ produite après 28 jours dans le test Sturm modifié, alors qu'elles atteignent toutes le seuil de 70 % du carbone organique dissous dans le même temps, avec un inoculum frais ou préconditionné (Table 2).

La publication présentée dans les pages suivantes a été acceptée pour publication dans la revue CHEMOSPHERE.

INTEREST OF CARBON-BALANCE IN READY BIODEGRADABILITY TESTING

P. KUENEMANN¹, A. DE MORSIER², AND P. VASSEUR¹ *

¹ Centre des Sciences de l'Environnement, Metz, France

² CIBA-GEIGY, Basel, Switzerland

STRACT

Five substances (aniline, monoethanolamine, pentaerythritol, 1,6-hydroxyhexane, and 2,4,6-trichlorophenol) were tested with two Ready biodegradability Tests : Modified OECD Test and Modified Sturm Test. All substances reached 70% DOC removal in both tests corresponding to the mineralization of carbon. In the Modified Sturm Test, the same substances showed a lower biodegradation when measuring CO₂ production than with DOC removal. The differences observed between eliminated carbon and mineralized carbon may correspond to assimilated carbon.

With the exception of 1,6-dihydroxyhexane, the use of preconditioned inoculum leads to a decrease in mineralized carbon for these substances (i.e. from 80 to 52% of total carbon for 2,4,6-trichlorophenol) ; and consequently to an increase in assimilated carbon (i.e. from 13 to 45% of total carbon for 2,4,6-trichlorophenol).

WORDS : biodegradation, carbon balance, CO₂, DOC, Modified OECD Screening Test, Modified Sturm Test, acclimatization.

Organic substances can be used by bacteria either as a carbon source for maintenance and growth or as an energy source for the production of biomass via respiration processes.

In aerobic conditions, metabolism and respiration lead to the production of biomass and hence to the release of carbon dioxide, which is the ultimate fate of carbon oxidation.

Author to whom correspondence should be addressed

Thus the biodegradation of a hydrosoluble organic substance can be reflected by its disappearance from the aqueous phase or when complete biodegradation occurs by its oxidation to carbon dioxide.

These two criteria are recommended in certain standard biodegradation methods, i.e. the measurement of carbon dioxide production in the Modified Sturm Test (4), and the disappearance of Dissolved Organic Carbon (DOC) in the Modified OECD Screening Test (5).

Dissolved organic carbon disappearance represents both oxidation of the substance and its metabolization which may lead to the production of biomass.

Carbon dioxide production is a measure of complete mineralization of organic substances (total oxidation of the substance).

Measurement in the same test (i.e. the Modified Sturm Test) of both carbon dioxide evolution and DOC elimination gives complementary information on biodegradation. The difference between the amount of eliminated carbon and the amount of carbon transformed into carbon dioxide can be considered as being carbon assimilated by the bacteria as biomass.

This strategy was applied to 5 substances in this study (aniline, monoethanolamine, 2,4,6-trichlorophenol, pentaerythritol and 1,6-hydroxyhexane).

Running both tests simultaneously and in the same conditions makes a differentiation possible between total elimination of carbon, carbon transformed into carbon dioxide and assimilated carbon.

These tests were conducted using fresh and preconditioned activated sludge in order to determine whether these parameters influence the biodegradation process.

MATERIALS AND METHODS

Test organisms.

Fresh sludge.

The source of test organisms was an activated sludge taken from a sewage treatment plant which received predominantly domestic sewage (Einsiedeln, Switzerland). After transport to the laboratory (less than 30 minutes), the sludge was aerated (30 minutes) and settled (15 minutes). The supernatant was discarded and the sludge was washed 3 times (1) with mineral medium (6), then restored to its initial volume.

Preconditioned sludge.

Fresh activated sludge was acclimated to mineral medium for 7 days of aeration. It was then restored to its initial volume by addition of distilled water.

dry weight determination.

Fresh or preconditioned inoculum (10 ml) was filtered through a 0.45 µm filter (SARTORIUS). After filtration, the filters were dried in a microwave oven for 5 minutes and then cooled for 10 minutes in a desiccator. The dry weights of the inocula were determined by calculating the weight difference of the filter prior to and after filtration.

Test substances.

Five substances (1 reference and 4 test substances) were tested as recommended by the OECD Ring Test (6) :

Reference substance : aniline

Test substances : monoethanolamine (MEA), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-T), pentaerythritol (PE), 1,6-dihydroxyhexane (1,6-DHH).

Stock solutions of aniline, MEA, PE, and 1,6-DHH were prepared by dissolving the substance in distilled water. The 2,4,6-trichlorophenol stock solution was prepared by first dissolving the compound in 1N NaOH to form the water-soluble phenolate, and then in distilled water ; the pH was adjusted to 7 with 1N HCl in the test bottle before introducing the inoculum.

All stock solution concentrations were in the range 5 g/l to 7 g/l according to the revised biodegradation guidelines (6).

Ready biodegradability tests.

The test guidelines used in this study were :

- Modified OECD Screening Test (5)
- Modified Sturm Test (4)

These were modified according to the revised OECD Ready Biodegradability Test Guidelines and the protocol for the Ring Test (6).

The major modifications were the followings :

- in the Modified OECD Screening Test :
 - * the test was performed in brown flasks instead of dark room or diffuse light.
- in the Modified Sturm Test :
 - * test was performed in 2 litre instead of 5 litre flasks,
 - * brown flasks protected the test mixture from the light instead of darkness,
 - * sodium hydroxide was used to trap the carbon dioxide produced instead of barium dihydroxide,
 - * only one carbon dioxide trap was employed instead of 3 (previous studies and theoretical calculation had shown that the second and third traps were not necessary),
 - * carbon dioxide was analyzed by determination of inorganic carbon in a carbon analyzer instead of titration.

Test and reference substances were tested at an initial concentration of 20.0 ± 0.5 mg DOC/l.

Inoculum concentration were 30 mg suspended solids/l in all tests. The composition of the mineral medium is given in table 1.

Table 1 : Composition of mineral medium

Substance	Final concentration (mg/l)
KH ₂ PO ₄	85.0
K ₂ HPO ₄	217.5
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	334.0
NH ₄ Cl	5.0
CaCl ₂ , 2H ₂ O	27.5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	22.5
FeCl ₃	0.25
EDTA	0.4

Determination of organic and inorganic carbon.

Determinations of DOC as well as carbon dioxide trapped by sodium hydroxide were carried out on an organic and inorganic carbon analyzer (SHIMADZU TOC-500, ASI-520).

For DOC measurement, samples were filtered through a 0.45 µm glass fiber filter before analysis.

Calculations.

Calculations of biodegradation were made using the formula given in the OECD Guidelines 301B (4) and 301E (5).

The assimilated carbon was calculated by taking the differences between the results obtained in the Modified OECD Screening Test and the Turbidity Test.

RESULTS AND DISCUSSION

fresh inoculum.

Although some of the test substances chosen were reported to produce erratic results in biodegradation tests (2, 3), all substances reached the pass level in the Modified OECD Screening Test (i.e. $\geq 70\%$ DOC removal after 28 days). In this test all substances can be considered as readily biodegradable (Table 2).

Table 2 : Biodegradation amounts observed for fresh (F) and reconditioned (P) inocula in the Modified OECD Screening Test (MOST) and the Modified Sturm Test (MST)

		aniline		MEA		PE		1,6-DHH		2,4,6-T	
		F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
MOST (%DOC)		96(5)		94(4)		97(1)		94(2)		91(1)	
		97(1)		99(0)		97(0)		96(0)		93(3)	
MST	%DOC (a)	99		97		96		98		93	
		97		96		97		98		97	
	%ThCO ₂	73(2)		92(4)		59 ^{b*}		91(3)		80(8)	
		58(11)*		62(21)		53 ^{b*}		98(2)		52(30)*	

Values in brackets are standard deviations

a : all standard deviations are below 0.5

b : no standard deviations observed

* : substances which do not reach pass levels (i.e. 70% in MOST and 60% in MST)

The biodegradation obtained for all substances in the Modified Sturm Test were lower than those observed in Modified OECD Screening Test.

In the Modified Sturm Test the values of biodegradation obtained from carbon dioxide measurements were lower than those obtained from DOC measurements. This was observed with all substances (Table 2). One substance, pentaerythritol, failed to reach the pass level (Table 2).

These differences can be explained by taking into account the assimilated carbon (Table 3).

Table 3 : Assimilated carbon (%) calculated for fresh (F) and preconditioned (P) inocula

		aniline		MEA		PE		1,6-DHH		2,4,6-T	
		F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Assimilated carbon (%)		26		5		37		7		13	
		39		34		44		0		45	

Assimilated carbon (%) = %DOC - %ThCO₂ in MST.

reconditioned inocula.

There was no change in biodegradation expressed in %DOC either in the Modified OECD Screening Test or in the Modified Sturm Test when reconditioned inocula were used (Table 2).

However the carbon dioxide production was reduced for all substances except 1,6-DHH : the use of preconditioned inocula increased the amount of assimilated carbon for all the substances except 1,6-dihydroxyhexane (Table 3).

Due to the important assimilation of carbon which can occur, some substances may not reach the pass level of 60 % of ThCO₂ after 28 days in the Modified Sturm Test (Table 2) ; while the same substances reach the pass level of 70% DOC (after 28 days) with fresh or preconditioned inocula (Table 2).

An explanation of these variations can thus be proposed.

During the 7 days of preconditioning in the mineral medium under aeration, bacteria did not receive any "carbon food". For survival bacteria had to consume their reserves or cellular constituents. As a consequence the dry weight of suspended solids (SS) in the sludge decreased from 7 gSS/l to 4 gSS/l. It can be assumed that preconditioned bacteria, in order to reconstitute their reserves or cellular constituents, had a tendency to assimilate more carbon than freshly collected bacteria.

CONCLUSIONS

The measurement of carbon as CO₂ evolution and DOC elimination in the Modified Sturm Test enables the differentiation and the calculation of 3 different forms of carbon elimination :

- * total of eliminated carbon (determined by DOC elimination),
- * carbon completely mineralized (determined by CO₂ production),
- * assimilated carbon (calculated).

Substances (aniline, monoethanolamine, 2,4,6-trichlorophenol, erythritol and 1,6-dihydroxyhexane) are readily biodegradable in the Modified OECD Screening Test with fresh and preconditioned inoculum.

In the Modified Sturm test when measuring CO₂ production, erythritol does not reach the pass level for fresh inoculum.

The differences in biodegradation results observed between carbon dioxide production and DOC removal may be explained by assimilated carbon.

Furthermore the use of preconditioned inocula may increase the amount of assimilated carbon and consequently decrease the amount of mineralized carbon ; the total eliminated carbon did not vary when using preconditioned inoculum.

Due to the important part played by assimilated carbon, certain substances may not reach the pass level of 60% of ThCO_2 within 28 days of the Modified Sturm Test either with fresh inoculum (pentaerythritol) or with preconditioned inoculum (aniline, 2,4,6-trichlorophenol, and pentaerythritol). This phenomenon can be observed with fresh inoculum (pentaerythritol) but occurred mostly with preconditioned inoculum. Carbon dioxide production can be considered as a more stringent criterion than dissolved organic carbon removal. Thus it will be important to reconsider the value of pass level for respirometric tests (especially the Modified Sturm Test) in order to reduce errors in the interpretation of results or classification of substances.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Pascal Pandard and Kevan Connelly for their collaboration in correcting the form of this paper.

REFERENCES

Blok, J., A. de Morsier, P. Gerike, L. Reynolds, and H. Wellens. 1985. Harmonisation of ready biodegradability tests. *Chemosphere*. (11/12), 1805-1820.

Gerike, P., and W.K. Fischer. 1979. A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 3, 159-173.

Gerike, P., and W.K. Fischer. 1981. A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Additional results and conclusions. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 5, 41-55.

OECD 301B. 1981. OECD guideline for testing of chemicals. Ready biodegradability : Modified Sturm Test.

OECD 301E. 1981. OECD guideline for testing of chemicals. Ready biodegradability : Modified OECD Screening Test.

OECD. Ring test for Ready Biodegradability Testing. Revised OECD Ready Biodegradability Testing guidelines and protocols for ring test. February 1988.

VI. Conclusion

Les résultats obtenus lors de notre étude permettent d'établir quelques commentaires dont l'intérêt n'est pas négligeable du point de vue de la compréhension des diversités de résultats observés entre les tests de biodégradabilité immédiate, et même entre les résultats obtenus dans un même test mais réalisés dans des endroits différents.

Ainsi, il est possible d'expliquer les différences observées pour une même substance testée, dans des conditions identiques (origine et traitement de l'inoculum, température de l'essai, conditions de réalisation de l'essai, opérateur,...) dans 2 tests différents (test screening OCDE modifié et test Sturm modifié).

En effet, la différence entre les biodégradations obtenues dans ces 2 tests peut être expliquée par l'intervention d'une catégorie de carbone non encore prise en compte par les tests traditionnels de biodégradation immédiate : le carbone assimilé.

En observant les quantités (%) de carbone appartenant aux 3 classes (carbone minéralisé, carbone éliminé et carbone assimilé), nous pouvons remarquer, suite à une acclimatation, des comportements différents selon le "carbone".

En effet, nous pouvons observer une augmentation de la quantité de carbone assimilé et par conséquent une diminution du carbone minéralisé, alors que, dans le même temps, la quantité de carbone éliminé ne varie pas.

L'analyse des courbes de biodégradation des différentes substances permet de remarquer qu'il existe une augmentation légère de la phase de latence après une acclimatation. Cette augmentation, bien que non-significative, montre que les processus d'acclimatation tendent à ralentir l'activité des micro-organismes quant à la biodégradation.

Une observation plus précise du comportement des différentes substances dans les tests de biodégradation sus-cités, et plus précisément des phases de latence, nous permet d'établir une chronologie des phénomènes de biodégradation.

Ainsi, un processus de biodégradation peut être décomposé en 3 phases successives distinctes décelables par les 3 tests de biodégradation utilisés dans notre étude :

- une phase de transfert du composé organique du milieu nutritif vers l'intérieur des cellules mise en évidence par la disparition du carbone organique du milieu, dans le test screening OCDE modifié dont la phase de latence est la plus courte ;
- une phase de dégradation par des phénomènes oxydatifs mise en évidence par la consommation de l'oxygène dissous dans le milieu, dans le test en fioles fermées dont la phase de latence présente une valeur intermédiaire entre celles du test screening OCDE modifié et du test Sturm modifié ;
- une phase de minéralisation totale mise en évidence par la production de dioxyde de carbone dans le test Sturm modifié dont la phase de latence est la plus longue.

Ces 3 phases, bien que distinctes d'un point de vue mise en jeu de processus enzymatiques, n'en sont pas moins imbriquées les unes dans les autres et liées entre elles.

CHAPITRE II

Détermination de la biomasse active dans les tests "environnementaux"

CHAPITRE II

Détermination de la biomasse active Technique du nombre le plus probable au ^{14}C

I. Introduction.....	53
II. Analyse bibliographique	55
2.1. Technique du nombre le plus probable au ^{14}C	55
(LEHMICKE et coll., 1979)	
2.1.1. Principe.....	55
2.1.2. Caractéristiques générales.....	56
2.2. Modifications apportées à la technique	57
du nombre le plus probable au ^{14}C	
2.2.1. Milieu pour la détermination des bactéries totales.....	57
2.2.2. Température d'incubation.....	59
2.2.3. Durée d'incubation.....	59
III. Matériel et méthodes.....	61
3.1. Préparation des inocula	61
3.1.1. Prélèvements.....	61
3.1.2. Cas de la boue activée.....	62
3.1.3. Procédure d'acclimatation de la boue activée.....	63
3.1.4. Procédure d'adaptation de la boue activée.....	63
3.2. Numération sur gélose nutritive	63
3.3. Détermination des bactéries nitrifiantes.....	65
3.3.1. Milieu de SORIANO et WALKER.....	66
3.3.2. Milieu de SCHMIDT et BELSER.....	66
3.3.3. Révélation de la présence des bactéries nitrifiantes.....	68
3.3.4. Numération.....	69

3.4. Technique du nombre le plus probable au ^{14}C	69
3.4.1. Préparation	69
3.4.2. Réalisation de la numération.....	70
3.4.3. Préparation des solutions radioactives	72
IV. Résultats.....	75
4.1. Numération bactérienne sur gélose	75
4.1.1. Bactéries hétérotrophes	76
4.1.2. Bactéries oligotrophes.....	76
4.2. Numération des bactéries nitrifiantes.....	77
4.3. <i>Application of ^{14}C-Most-Probable-Number method to enumerate</i>	78
<i>total heterotrophic bacteria and specific degraders in natural waters and during</i>	
<i>biodegradability test</i>	
V. Conclusion.....	88

I. Introduction

Les techniques de détermination de la biodégradation ultime des substances organiques actuellement pratiquées (OCDE, CEE, ...) ne permettent que peu de situer la biodégradation par rapport aux autres phénomènes qui régulent la persistance des composés chimiques dans l'environnement dans la mesure où elles génèrent des données en terme de pourcentage d'élimination.

Bien que cette démarche soit utile pour l'évaluation d'un nouveau composé chimique, ces données sont d'un intérêt limité pour prédire le taux de biodégradabilité dans les milieux environnementaux. Il y a donc un besoin urgent de méthodes qui permettent la détermination de cinétiques d'élimination des xénobiotiques.

Les expressions des taux de biodégradation sont des composantes importantes des modèles mathématiques utilisés pour prédire la distribution et les concentrations environnementales des composés organiques. Celles-ci peuvent de plus permettre de classer la biodégradation parmi d'autres phénomènes naturels tels que la dégradation abiotique, la photolyse, l'hydrolyse, l'adsorption,...pour lesquelles des cinétiques sont aisément réalisables.

Un grand nombre d'expressions cinétiques utilisés pour décrire la biodégradation contiennent un terme représentant une unité de biomasse, telle que le nombre de bactéries capables de métaboliser le composé chimique considéré (BATTERSBY, 1990).

Comme le nombre de ces bactéries compétentes ne représente qu'une faible part de la biomasse totale, et comme la biodégradation peut intervenir sans qu'il y ait une croissance cellulaire, les techniques conventionnelles de numération bactérienne (détermination du nombre de colonies se développant sur milieu gélosé, détermination du poids de matières sèches, détermination de la concentration d'ATP,...) ne peuvent pas donner d'indications précises sur le nombre de bactéries actives (réellement impliquées dans le phénomène de biodégradation).

Ainsi, il faut envisager, pour déterminer la biomasse active, et par conséquent obtenir des expressions cinétiques de qualité, l'utilisation de techniques plus spécifiques. La technique du nombre le plus probable au carbone 14, développée en 1979 par Lehmicke et ses collaborateurs, permet la détermination et de la biomasse active (réellement impliquée dans la biodégradation) et de la biomasse totale.

Parmi les techniques de détermination de la biomasse bactérienne contenue dans des inocula mixtes, notre attention c'est portée sur 5 techniques.

Les deux premières permettent respectivement la détermination du nombre de bactéries hétérotrophes et oligotrophes par une technique de croissance sur gélose nutritive. Ces numérations bactériennes nous serviront par la suite de référence.

Les deux techniques suivantes permettent de déterminer respectivement le nombre de bactéries nitrifiantes (oxydant l'ammonium et oxydant les nitrites). Ces techniques ont été appliquées afin de caractériser plus précisément les inocula, d'autant plus que les phénomènes de nitrification sont problématiques en Angleterre (d'où sont issus les inocula) et dans les tests de biodégradation mesurant la consommation d'oxygène. En effet, les phénomènes de nitrification "pompe" l'oxygène au détriment de la biodégradation, induisant une surestimation de cette dernière.

La dernière technique utilisée est la technique du nombre le plus probable au carbone 14 (LEHMICKE et coll., 1979).

Cette technique a été modifiée afin d'être encore plus représentative des milieux environnementaux.

Une analyse bibliographique décrira plus particulièrement cette dernière technique et développera les modifications qui y ont été apportées ainsi que leurs raisons.

Les chapitres suivant développent ainsi successivement :

- la technique de LEHMICKE et les modifications qui y sont apportées ;
- les matériels et méthodes mis en oeuvre pour la réalisation de la numération bactérienne selon ces 5 techniques;
- les résultats obtenus pour la numération des bactéries d'inocula originaires d'une chaîne de traitement des eaux usées (eau d'égout, boue activée, effluent secondaire et eau de rivière) adapté (uniquement pour la boue activée) ou non.

I. Analyse bibliographique

Cette analyse bibliographique détaille la technique de numération des bactéries compétentes développée par LEHMICKE et ses collaborateurs en 1979, ainsi que les modifications qui y ont été apportées pour la réalisation de notre étude.

2.1. Technique du nombre le plus probable au ^{14}C (LEHMICKE et coll., 1979)

Cette technique a été développée par ces auteurs pour l'étude des populations bactériennes des eaux naturelles.

2.1.1. Principe

Des bactéries issues d'un inoculum environnemental sont incubées dans un milieu contenant une source de carbone marquée au carbone 14 (^{14}C).

Lors de leur dégradation par les micro-organismes contenus dans l'inoculum, du dioxyde de carbone marqué au ^{14}C ($^{14}\text{CO}_2$) est produit. Ce $^{14}\text{CO}_2$ est piégé par une solution basique (soude normale). Après addition d'un liquide de scintillation, la radioactivité du milieu (soude normale + $^{14}\text{CO}_2$) est mesurée par passage au compteur à scintillation liquide afin de déterminer la quantité de radioactivité produite.

En effectuant le rapport de la radioactivité introduite dans le milieu test et la radioactivité piégée dans la soude, il est possible de déterminer une biodégradation de la substance par analogie au test Sturm modifié (Cf chapitre I).

De plus, en utilisant des replicats de dilutions successives de l'inoculum original (au dixième par exemple), il est possible de déterminer, par la technique du nombre le plus probable (ALEXANDER, 1965), le nombre de bactéries compétentes (bactéries qui ont réellement participé à la biodégradation de la source carbonée).

L'utilisation comme source de carbone de glucose marqué au ^{14}C permet à LEHMICKE et ses collaborateurs de déterminer le nombre de bactéries totales présentes dans l'inoculum.

2.1.2. Caractéristiques générales (d'après LEHMICKE et coll., 1979)

a) Milieu de croissance

Le milieu de croissance pour la détermination du nombre le plus probable est une eau stérilisée par autoclavage issue du site de prélèvement. Cette eau est supplémentée par 5 à 25 g d'un composé marqué au ^{14}C par litre.

b) Substances

Toutes les substances marquées sont commandées avec une activité spécifique telles que, pour les concentrations testées, la radioactivité soit d'au moins 2000 dpm/replicat.

LEHMICKE et ses collaborateurs ont utilisé des substances commerciales dont la pureté était supérieure à 99 %.

c) Réalisation du test

Les cinq replicats de chacune des dilutions au dixième utilisées par LEHMICKE et ses collaborateurs sont placés dans des fioles à scintillation liquide contenant 1 ml de soude normale puis incubés à température ambiante (20 à 24 C) et à l'obscurité pendant 6 semaines.

A la fin de l'incubation, les fioles sont préparées en vue de leur comptage.

d) Numération

Les répliquats présentant une radioactivité supérieure à 1% de la radioactivité introduite (après soustraction des valeurs de radioactivité des contrôles) sont affectées d'un score positif.

Le nombre le plus probable est alors calculé selon la méthode de RODINA (LEHMICKE et coll., 1979).

2.2. Modifications apportées à la technique de LEHMICKE et coll. (1979)

Afin de rendre la technique du nombre le plus probable au ^{14}C plus adaptée aux conditions environnementales, 3 points principaux ont été modifiés :

- composition du milieu (initialement ^{14}C -glucose) pour la détermination des bactéries totales ;
- durée de l'incubation ;
- température de l'incubation.

Ces 3 points sont discutés dans les paragraphes suivants.

2.2.1. Milieu pour la détermination des bactéries totales

La technique développée par LEHMICKE et collaborateurs (1979) préconise l'utilisation d'une source de carbone ubiquiste : le glucose.

Toutefois, il nous a semblé plus opportun d'utiliser un mélange de composés carbonés proposant aux bactéries un "choix" plus important de sources de carbone et de substances nutritives, afin de mieux satisfaire leurs besoins.

Ainsi, notre choix de source carbonée pour la numération des bactéries totales s'est porté sur un mélange de composés marqués au ^{14}C reproduisant la composition moyenne d'une eau d'égout et d'une boue activée anglaise, basée sur des données de PAINTER (1971).

La composition de l'eau d'égout synthétique que nous avons utilisée est reprise dans le tableau II.I. Elle nous a été dictée d'une part par la disponibilité sous forme de composés marqués des différentes substances, d'autre part par un souci de représentativité maximum des milieux étudiés (eau d'égout et boue activée).

Groupe	Constituants	Concentration (mg/l)
EN SOLUTION		
<u>Sucres</u>		<u>70</u>
	D-glucose	35
	sucrose	30
	D-xylose	5
<u>Acides volatils</u>		<u>26</u>
	acide acétique	21
	acide propionique	5
<u>Acides non volatils</u>		<u>34</u>
	acide L-lactique	17
	acide acétique	17
<u>Acides aminés</u>		<u>18</u>
	hydrolysat de protéines	18
	urée	18
	créatinine	6
EN SUSPENSION		
<u>Acides gras</u>		<u>140</u>
	acide palmitique	140
<u>Sucres</u>		<u>34</u>
	amidon	34
<u>Protéines</u>		<u>42</u>
	hydrolysat de protéines	42

Tableau II.I. : Composition d'une eau d'égout synthétique (d'après PAINTER, 1971)

Les détails de composition des milieux marqués utilisés pour les tests sont développés dans le paragraphe 4.3.

2.2.2. Température d'incubation

LEHMICKE et ses collaborateurs incubent leurs essais à une température de 20 à 24 C (température ambiante). Toutefois, il nous a semblé plus opportun de réaliser des essais à la température du prélèvement, afin de mieux pouvoir extrapoler les résultats à l'environnement.

De plus, nombre d'auteurs ont adopté un principe identique (Tableau II.II.).

2.2.3 Durée de l'incubation

Un grand nombre de durées d'incubation différentes ont pu être relevées dans la littérature concernant les tests de biodégradation ou les numérations utilisant des composés marqués au ^{14}C (Tableau II.II.).

Auteurs (année)	Durée	Température
AELION et coll. (1987) *	22 - 26 jours	17 C **
BOETHLING et coll. (1979)	< 10 jours	29 C
LEHMICKE et coll. (1979) *	6 semaines	20-24 C
SEKI (1976)	24h - 48h	in situ temp.
SOMMERVILLE et coll. (1985) *	2 semaines	20 - 24 C
SPAIN et coll. (1980)	48h - 5 jours	25 C
SWINDOLL et coll. (1988) *	2 semaines	17 C **
WYNDHAM et COSTERTON (1981) *	6 - 8 semaines	in situ temp.

Tableau II.II. : Caractéristiques d'incubation de différents travaux utilisant des composés marqués.

* travaux relatant des numérations bactériennes par la technique du nombre le plus probable au ^{14}C

** correspond à la température du prélèvement

Notre choix c'est porté sur une durée de 3 semaines d'incubation. En effet, cette valeur correspond à une valeur moyenne des travaux cités (Tableau II.II.) et est une valeur qui semble correspondre aux durées de biodégradation des différentes substances que nous allons tester (Cf paragraphe 3.4.3.).

Ainsi, pour les expériences citées précédemment (Tableau II.II.), les inocula sont issus de milieux naturels dont les concentrations bactériennes sont reconnues comme étant faibles, ou tout du moins plus faible que les inocula que nous testons (eau d'égout, boue activée, effluent et, à un niveau moindre eau de rivière) :

- eau de rivière (LEHMICKE et coll., 1979 ; WYNDHAM et COSTERTON, 1981) où les numérations montrent une quantité de bactéries totales toujours inférieure à $2,4 \times 10^4$ bactéries/ml ;

- eau de lac (LEHMICKE et coll., 1979) avec des nombres de bactéries inférieurs à $1,1 \times 10^5$.

De plus, SOMMERVILLE et coll. (1985) réussissent à déterminer un nombre le plus probable de après 2 semaines d'incubation d'inocula issus de rivière et de détroit.

En se basant sur une valeur moyenne des radioactivités dans les contrôles (90 ± 20 dpm/ml), et sur le fait que nous introduisons 2000 dpm/ml dans chaque fiole, il nous faudrait une biodégradabilité des différents composés testés de moins de 7 % pendant la durée d'incubation pour ne pas avoir de signal de biodégradabilité, et donc pas de numération. Or, les différents composés testés offrent tous des biodégradabilités plus importantes que 7 % :

- un mélange de composés marqués offre une biodégradabilité de l'ordre de 90 % en 3 semaines ;

- le para-nitrophénol montre une biodégradabilité de 10 % en 10 jours (SPAIN et coll., 1980) ;

- le 2,4-dichlorophénol montre une biodégradabilité de l'ordre de 70 % en 14 jours en eau de rivière (BOETHLING et ALEXANDER, 1979).

A partir de ces données, nous avons fixé la durée d'incubation à 3 semaines.

III. Matériels et méthodes

3.1. Préparation des inocula

3.1.1. Prélèvement

Quatre inocula distincts ont été prélevés sur une chaîne de traitement des eaux usées traitant majoritairement des effluents d'origine domestique, à la station d'épuration de WARGRAVE (UK). La localisation des points de prélèvement des 4 inocula sont représentés sur la figure II.1.

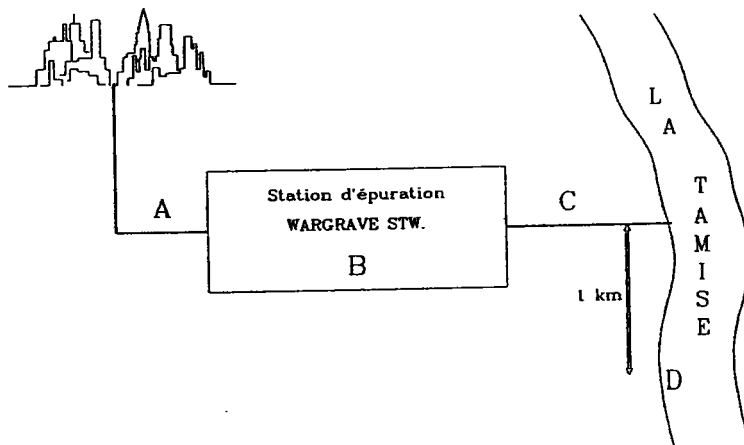


Figure II.1. : Schématisation des points de prélèvement des inocula

A : eau d'égout décantée

B : boue activée

C : effluent secondaire

D : eau de rivière

L'inoculum D est prélevé dans la Tamise en aval de la station d'épuration à environ 1 km de celle-ci.

Les inocula prélevés sont acheminés au laboratoire où ils sont maintenus sous aération pendant 30 minutes jusqu'à leur utilisation dans les différents tests de numération.

3.1.2. Cas de la boue activée

a) Homogénéisation

De par leur grande hétérogénéité du point de vue structural (boues libres en suspension, agrégats bactériens, floccs, bactéries fixées sur des particules,...), il est nécessaire de traiter les boues activées afin d'accroître leur homogénéité (KING et FORSTER, 1990). Le traitement utilisé, et décrit ci-dessous, est celui préconisé par PIKE et collaborateurs (1972) :

ultrasonication durant une minute d'une dilution au dixième de la boue activée dans une solution de pyrophosphate stérilisée par autoclavage.

La solution de pyrophosphate est préparée en diluant 5 mg de triphosphate de sodium (SIGMA) dans 1 litre d'eau distillée.

Remarque : les dilutions de la boue activée (pour les numérations) sont effectuées à partir de l'homogénat.

b) Détermination du poids sec des matières en suspension

Préalablement à tout traitement (Homogénéisation, acclimatation ou adaptation) la boue activée subit une détermination du poids sec des matières en suspension selon le protocole suivant :

- 1) sécher un filtre de 0,45 (WHATMAN diamètre 7,0 cm GF/C) pendant 2 minutes dans un four à micro-ondes avant de le peser (P1) ;
- 2) filtrer 25 ml de boue activée sur ce filtre et rincer à l'aide de 5 ml d'eau distillée ;
- 3) sécher 6 minutes au four à micro-ondes, puis refroidir pendant 5 minutes au dessiccateur ;
- 4) déterminer le poids du filtre (P2).

Le calcul du poids sec des matières en suspension (PS) s'effectue selon la formule :

$$PS = (P2 - P1) \times 40 \text{ gSS/l}$$

3.1.3. Procédure d'acclimatation de la boue activée

Le protocole d'acclimatation de la boue activée au milieu minéral est conforme à celui développé par l'OCDE pour la réalisation du Ring Test 1988 (OCDE Ring Test, 1988) pour la détermination de la biodégradabilité immédiate (Cf paragraphe 4.4.).

La boue activée acclimatée est utilisée de la même manière qu'une boue activée fraîche non traitée (détermination du poids sec, Homogénéisation, numération).

3.1.4. Procédure d'adaptation de la boue activée au para-nitrophénol

Le protocole d'adaptation de la boue activée au paramidophénol est développé par la suite (Cf paragraphe 4.4.)

La boue activée adaptée est utilisée de la même manière qu'une boue activée fraîche non traitée (détermination du poids sec, Homogénéisation, numération).

3.2. Numération sur géloses nutritives

Des dilutions au dixième des différents inocula sont effectuées dans un milieu stérile (stérilisé par autoclavage) contenant 0,1 % (poids/vol.) de peptone dans une solution à 0,85 % de chlorure de sodium (Tableau II.III.)

Substance	Quantité (g)
NaCl	21,25
Peptone	2,5
Eau distillée	qsp 2,5 l

Tableau II.III. : Composition du milieu de dilution de inocula

La mise en culture des différentes dilutions des inocula est effectuée sur une gélose nutritive :

- Caséine-Peptone-Amidon (CPA) pour la détermination des bactéries hétérotrophes (COLLINS, 1984) ;

- Caséine-Peptone-Amidon 1% (CPA 1%) pour la détermination des bactéries oligotrophes.

Le tableau II.IV reprend la composition de ces 2 milieux.

Substance	Milieu CPA (g)	Milieu CPA 1% (mg)
KH_2PO_4	0,5	5
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,125	1,25
Amidon	1,125	11,25
Caséine	1,25	12,5
Peptone	1,25	12,5
Glycérol	2,5 ml	25 l
$\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$	10 gouttes *	1 goutte **
Agar N 1	25	25×10^3
Eau distillée	qsp 2,5 l	qsp 2,5 l

Tableau II.IV. : Composition des géloses nutritives CPA et CPA 1% pour la détermination des bactéries hétérotrophes et oligotrophes.

* : solution 0,01% (P/V) de $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$

** : solution 0,001% (P/V) de $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$

Les milieux sont autoclavés avant de remplir les boîtes de Pétri stériles.

Deux replicats de 0,1 ml de chaque dilution (de 10^{-1} à 10^{-8} pour tous les inocula et de 10^{-2} à 10^{-9} pour la boue activée) sont inoculés dans les boîtes puis incubés 10 jours à 10 C à l'obscurité.

En fin d'incubation, les unités formant colonies (UFC) sont comptées sur les boîtes afin d'obtenir une numération.

Compte tenu de la croissance plus lente des bactéries oligotrophes, les boîtes ayant servi à la numération des bactéries oligotrophes (CPA 1%) sont ré-incubées pour une durée totale de 1 mois, après quoi une nouvelle numération est effectuée.

3.3. Détermination des bactéries nitrifiantes

Les numérations des 2 types de bactéries nitrifiantes (oxydant l'ammonium NH_4^+ et oxydant les nitrites NO_2^-) sont effectuées par une technique basée sur la technique du nombre le plus probable et développée par ROWE et coll. (1977).

Cette technique utilise des micro-plaques de 8 X 12 puits.

Chaque puits contient 0,1 ml du milieu spécifique à la numération des 2 espèces de bactéries nitrifiantes (3.3.1. et 3.3.2.).

Les puits de la première rangée reçoivent 0,1 ml de l'inoculum (non dilué). Des dilutions au 1/2 sont réalisées de proche en proche sur 2 ou 3 plaques ; les 2 dernières rangées de la dernière plaque ne sont pas inoculées et servent de contrôle négatif à la numération.

Remarque : l'ensemencement de 3 plaques et donc de 34 puits permet de numérer jusqu'à $5,02 \times 10^{11}$ bactéries/ml ($2,921 \times 2^{34} \times 1/0,1$).

Les micro-plaques sont incubées 35 jours à 20 C à l'obscurité. En fin d'incubation, la présence de bactéries nitrifiantes est révélée par une coloration spécifique au réactif de Gries-Ilosvay (BDH, UK), permettant de déterminer les scores :

- + présence de bactéries
- absence de bactéries.

Les milieux de culture utilisés sont spécifiques du type de bactéries à mettre en évidence.

3.3.1. Milieu de SORIANO et WALKER
Détermination des bactéries oxydant l'ammonium

Le milieu de SORIANO et WALKER (SORIANO et WALKER, 1968) permet la numération et l'isolement des bactéries oxydant l'ammonium. Sa composition est reprise dans le tableau II.V.

Composé	Quantité (g)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5
KH_2PO_4	0,2
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,04
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,04
Séquestrène 138 Fe	0,5
Eau distillée	qsp 1 l

Tableau II.V. : Composition du milieu de SORIANO et WALKER

Après stérilisation par autoclavage (121 C, 15 min.) et ajustement pH à 7,5-8,0 de manière aseptique à l'aide d'une solution stérile de carbonate de sodium 5%, le milieu peut être utilisé pour les numérations.

3.3.2. Milieu de SCHMIDT et BELSER
Détermination des bactéries oxydant les nitrites

Le tableau II.VI. donne la composition du milieu de SCHMIDT et BELSER (SCHMIDT et BELSER, 1982) permettant la numération et l'isolement des bactéries oxydant les nitrites.

Substance	Concentration finale du milieu (mg/l)	Volume de solution mère (ml) à ajouter à 1l d'eau distillée	Concentrations des solutions mères (g/100ml)
KNO ₂	8,5	1	0,85
CaCl ₂ , 2H ₂ O	13,4	1 *	1,34
MgSO ₄ , 7H ₂ O	4,0	5 *	4,00
K ₂ HPO ₄	34,8	4	3,48
KH ₂ PO ₄	27,5	1	2,75
Fe chélaté	2,5	1	0,25
Eléments traces		1	
NaMoO ₄ , 2H ₂ O	0,1		0,01
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,3		0,03
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,002		0,0002
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,1		0,01
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,02		0,002

Tableau II.VI. : Composition du milieu de SCHMIDT et BELSER

* : les solutions de chlorure de calcium et de sulfate de magnésium sont stérilisées sur membrane 0,2 m puis ajoutées à une solution autoclavée contenant tous les autres éléments.

3.3.3. Révélation de la présence des bactéries nitrifiantes

Le réactif utilisé pour la révélation de la présence des bactéries nitrifiantes est le réactif de Gries-Ilosvay (BDH, UK).

Dix microlitres de chacun des 2 composants du réactif sont introduits dans chaque puits. En présence de nitrites, le réactif forme un composé de couleur rose.

a) Détermination des bactéries oxydant l'ammonium

Remarque : le milieu de SORIANO et WALKER ne contient pas de nitrites.

Durant l'oxydation par les bactéries de l'ammonium contenu dans le milieu, des ions nitrites (NO_2^-) et nitrates (NO_3^-) sont formés successivement.

L'obtention d'une coloration rose, indiquant la présence de nitrites, et donc l'oxydation des ions ammonium présents dans le milieu, montre la présence de bactéries oxydant les ions ammonium :

VRAI POSITIFS (score +)

Toutefois, la non-obtention de la coloration rose peut résulter de 2 Phénomènes :

i) oxydation de la totalité des ammoniums et des nitrites avec formation de nitrates indétectables par le réactif de Gries-Ilosvay.

Dans ce cas, la visualisation de l'action des bactéries oxydant les ions ammonium en nitrites se fait en réduisant les nitrates par de la poudre de zinc :

FAUX NEGATIFS (score +)

ii) pas d'oxydation des ammoniums et donc pas d'apparition de coloration rose même si l'on réduit le milieu par du zinc :

VRAIS NEGATIF (score -)

b) Détermination des bactéries oxydant les nitrites

Remarque : le milieu de SCHMIDT et BELSER ne contient pas d'ammonium.

L'obtention d'une coloration rose par le réactif de Gries-Ilosvay montre la présence des nitrites (apportés par le milieu de SCHMIDT et BELSER) qui n'ont pas été oxydés, montrant ainsi l'absence de bactéries oxydants les nitrites :

NEGATIFS (score -)

Par contre, une absence de coloration montre une disparition des nitrites et rend donc compte d'une présence de bactéries oxydants les nitrites :

POSITIFS (score +)

3.3.4. Numération

La numération des bactéries oxydant soit l'ammonium soit les nitrites se fait par la technique du nombre le plus probable (dilutions au demi, 8 replicats) conformément à la technique développée par ROWE et ses collaborateurs (1977), à partir des scores (+ ou -) obtenus précédemment pour les différentes dilutions.

3.4. Numération par la technique du nombre le plus probable au carbone 14

La technique du nombre le plus probable au ^{14}C , décrite ci-dessous, est dérivée de la technique développée en 1979 par LEHMICKE et collaborateurs. Les modifications qui y ont été apportées sont développées dans le paragraphe 2.2.

Le protocole développé pour cette étude est détaillé dans les paragraphes suivants.

3.4.1. Préparation

La préparation du milieu de dilution s'effectue par filtration sur membrane 0,2 m dans des enceintes stériles de 300 ml (NALGENE) des différents inocula.

Dans le cas de la boue activée, une pré-filtration est effectuée sur une membrane 0,45 m préalablement à la filtration stérilisante.

3.4.2. Réalisation du test

Cinq replicats de 0,1 ml de chacune des dilutions de l'inoculum sontensemencées dans des fioles à sérum WHEATON de 4 ml en présence de 1 ml de milieu stérile de dilution (inoculum stérilisé) contenant la substance ou le mélange marqué au ^{14}C (Figure II.2.).

Cinq replicats de contrôle stériles (stérilisés par adjonction de 10 l d'une solution de HgCl_2 1% par millilitre de milieu de test.

Les 50 fioles 9 X 5 dilutions et 5 contrôle) sont placées dans des fioles de scintillation liquide de 18 ml (BECKMAN) contenant 1 ml de soude normale.

a) Incubation

Les fioles de scintillation liquide (contenant les fioles à sérum) sont fermées hermétiquement, puis incubées à l'obscurité dans un incubateur pendant 3 semaines à la température du prélèvement.

En fin d'incubation, les fioles sont retirées de l'incubateur et les fioles en verre contenant le milieu réactif (milieu stérile, inoculum et substance marquée) sont éliminées.

b) Comptage

Les fioles à scintillation liquide reçoivent alors 10 ml de liquide de scintillation (HIONIC-FLUOR, PACKARD) et sont comptées immédiatement sur un compteur à scintillation liquide (BECKMAN).

Remarque: le cocktail de scintillation utilisé a été choisi pour ses caractéristiques remarquables quant à son utilisation avec des solutions alcalines, sa résistance élevée au quenching et par le fait qu'il permet une élimination des erreurs liées à la chimiluminescence.

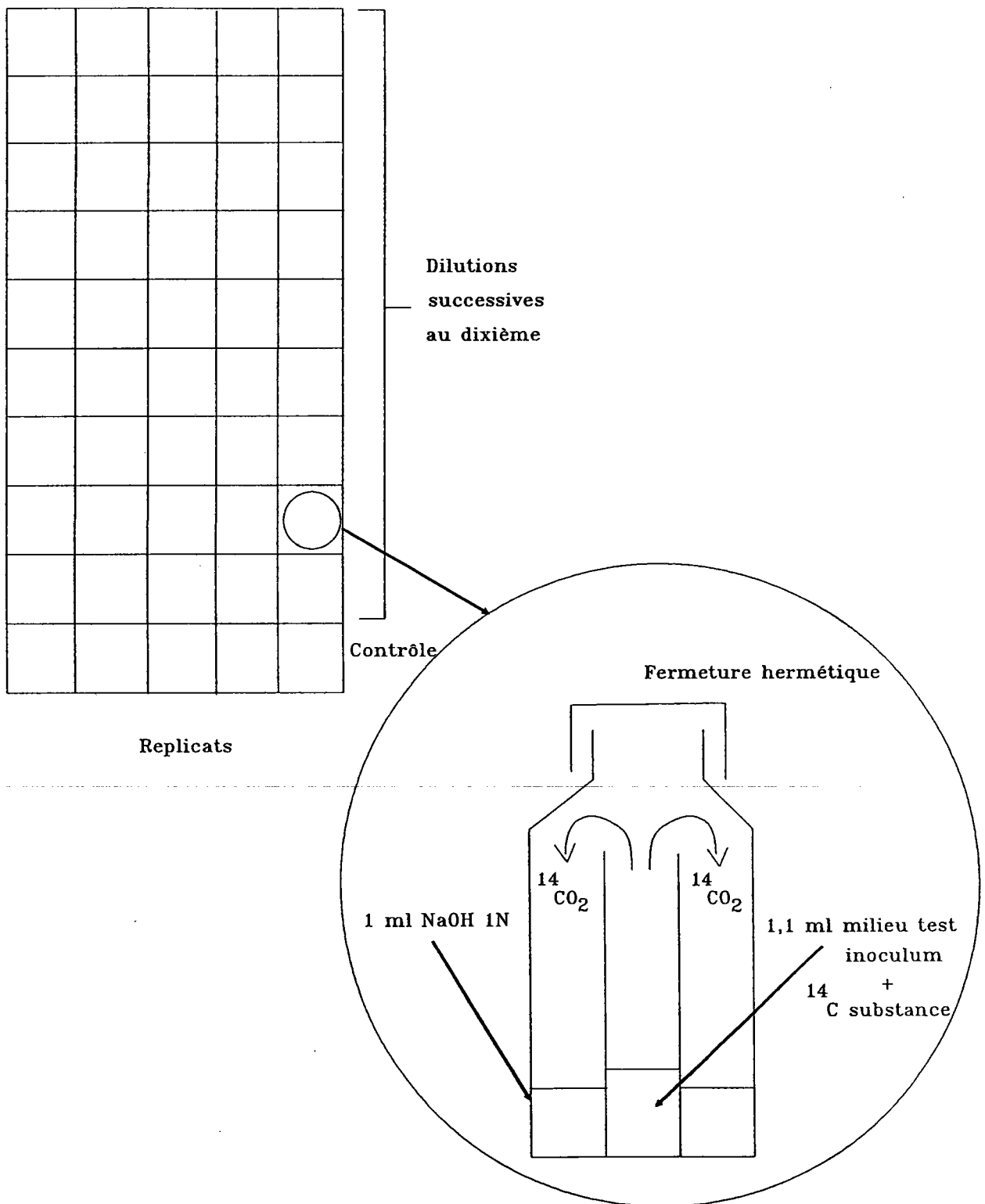


Figure I.2. : Représentation schématique du système développé par LEHMICKE et al (1979)

c) Numération

Les numérations sont effectuées par la technique du nombre le plus probable.

Les scores "+" correspondent à des valeurs de radioactivité par fiole supérieure à la valeur moyenne des contrôles augmentée de 2 écarts-types.

Les score "-" correspondent quant à eux à des valeurs de radioactivité inférieure à la valeur moyenne des contrôles augmentée de 2 écarts-types.

Les lectures de nombre le plus probable se font sur une table du nombre le plus probable 5 tubes par dilution, dilution au dixième (ALEXANDER, 1965).

3.4.3. Préparation des solutions radioactives

a) Numération des bactéries totales

Deux solutions-mère sont préparées.

La première renferme tous les éléments uniformément marqués au ^{14}C et décrits préalablement dans le paragraphe 2.2.1.

La seconde renferme l'acide palmitique ([U- ^{14}C] acide palmitique) dont l'activité spécifique et la concentration sont élevées.

La composition de la solution mère ^{14}C -MIX est reprise dans le tableau II.VIII.

Le milieu test pour la numération des bactéries totales est réalisé en ajoutant à 50 ml d'échantillon stérile 50 l de la solution mère ^{14}C -MIX et 75 l de la solution de palmitate.

La radioactivité totale ainsi apportée à 1 ml de milieu test est d'environ 2000 dpm/ml. La solution mère ^{14}C -MIX apporte 366 dpm/ml et la solution de palmitate apporte quant à elle 1665 dpm/ml.

Substance	volume de substance pour 1l de ^{14}C -MIX (l)	radioactivité (10^6 dpm)
[U- ^{14}C] D-glucose	76	2,109
[U- ^{14}C] sucrose	57	3,164
[U- ^{14}C] D-xylose	80	8,880
[U- ^{14}C] acide-L-acétique	110	48,840
[2- ^{14}C] acide propionique	90	9,990
[U- ^{14}C] acide lactique	200	88,800
[1,5- ^{14}C] acide citrique	314	34,844
[U- ^{14}C] hydrolysate de protéines	864	95,904
[^{14}C] urée	108	59,940
[carboxyl- ^{14}C] créatinine	64	1,776
[U- ^{14}C] amidon	90	12,488

Tableau II.VIII. : Composition de la solution mère ^{14}C -MIX

Les volumes donnés dans le tableau permettent de préparer 1 l de solution test.

Tous les composés ont une pureté supérieure à 95 %.

La composition de l'hydrolysate de protéines est donnée dans le tableau II.IX.

La concentration en carbone apportée par les composés radioactifs est négligeable par rapport à celle apportée par l'inoculum. De ce fait, aucune modification de la composition globale du milieu de test n'est apportée par les composés marqués, ceux-ci sont considérés comme étant des traceurs.

Acide aminé	% (w/w)	PM
L-alanine	9,5	89,1
L-arginine	6,9	174,2
acide L-aspartique	10,0	133,1
acide L-glutamique	9,0	147,1
glycine	5,8	75,1
L-histidine	1,6	155,2
L-leucine	12,7	131,2
L-isoleucine	5,8	131,2
L-lysine	4,8	146,2
L-méthionine	0,6	149,2
L-phénylalanine	7,4	165,2
L-proline	5,3	115,1
L-sérine	3,2	105,1
L-thréonine	5,7	119,1
L-tyrosine	5,8	181,2
L-valine	5,9	117,2

Tableau II.IX : Composition de l'hydrolysate de protéines

Tous les acides aminés sont uniformément marqués.

Le poids moléculaire moyen calculé est de 131,96

b) Numération des bactéries compétentes

Six substances sont utilisées en vue de déterminer le nombre de bactéries capables de les dégrader.

Ces 6 substances sont utilisées de manière à obtenir une concentration, dans chaque fiole de numération, de 30 g/l environ.

Les volumes (a) des solutions à ajouter pour 50 ml de solution stérile (milieu) pour obtenir une concentration par fiole de 30 g/l, ainsi que les quantités de radioactivité (b) obtenues dans chaque fiole de numération, sont reprises dans le tableau II.X.

Substance	marquage	a (l)	b (dpm)
<u>diéthylhexylphtalate</u>	U- ¹⁴ C	48	2114
	carbonyl- ¹⁴ C	37	1635
<u>acide 2,4-dichloro phénoxyactétique</u>	U- ¹⁴ C	113	5002
	carboxy- ¹⁴ C	43	1899
<u>para-nitrophénol</u>	U- ¹⁴ C	74	3304
<u>pentachlorophénol</u>	U- ¹⁴ C	60	2651

Tableau II.X. : Caractéristiques des différentes substances testées.

Les procédures d'acclimatation et d'adaptation de la boue activée au para-nitrophénol sont développées dans le chapitre 4.4.

IV. Résultats

4.1. Numération bactérienne sur gélose

Les numérations des bactéries hétérotrophes et oligotrophes ont été effectuées sur les 4 inocula décrits précédemment (Cf paragraphe 3.1.1.). Seule la boue activée a fait l'objet d'une détermination du poids sec des matières en suspensions. Le poids sec des matières en suspension de la boue activée est de $4,88 \pm 0,37$ g de matières en suspension/l.

4.1.1. Bactéries hétérotrophes

Les résultats des numérations des bactéries hétérotrophes (cellules/ml) sont repris dans le tableau II.XI.

Inoculum	Eau d'égout	Boue activée	Effluent	Eau de rivière
Moyenne	1,93 10 ⁵	2,45 10 ⁶	2,39 10 ⁵	4,18 10 ⁴
écart-type	1,11 10 ⁵	0,91 10 ⁶	1,12 10 ⁵	2,23 10 ⁴

Tableau II.XI. : Résultats des numérations des bactéries hétérotrophes (en cellules/ml)

Le nombre de bactéries hétérotrophes observé dans la boue activée et l'effluent secondaire sont en accord avec les valeurs données par PAINTER (1971) pour une moyenne des boues activées et d'effluent de station de traitement des eaux usées en Angleterre.

4.1.2. Bactéries oligotrophes

Le tableau II.XII. reprend les valeurs de numérations des bactéries oligotrophes obtenues après 10 jours et 1 mois d'incubation.

Durée	Inoculum	Eau d'égout	Boue activée	Effluent	Eau de rivière
10 j.	Moyenne	2,08 10 ⁴	1,11 10 ⁵	2,16 10 ⁴	4,63 10 ³
	écart-type	1,49 10 ⁴	0,65 10 ⁵	1,57 10 ⁴	1,02 10 ³
1 mois	Moyenne	4,53 10 ⁴	3,66 10 ⁶	4,03 10 ⁴	1,53 10 ⁴
	écart-type	2,96 10 ⁴	5,97 10 ⁶	2,91 10 ⁴	1,19 10 ⁴

Tableau II.XII. : Résultats des numérations des bactéries oligotrophes (en cellules/ml)

Le nombre de bactéries oligotrophes est dans tous les cas plus faible, d'un facteur 10, que celui des bactéries hétérotrophes, après une incubation de 10 jours.

Après 1 mois d'incubation, on observe un nombre de bactéries oligotrophes plus important, qui n'atteint tout de même pas les valeurs de numération des bactéries hétérotrophes.

4.2. Numération des bactéries nitrifiantes

Les numérations des bactéries nitrifiantes (oxydant l'ammonium et oxydant les nitrites) sont reprises le tableau II.XIII.

Ce tableau présentent les valeurs de numération pour les 4 inocula testés (eau d'égout; boue activée, effluent secondaire et eau de rivière).

Inoculum	Eau d'égout	Boue activée	Effluent second.	Eau de rivière
Nombre de bactéries (cell./ml) oxydant les ammonium ± écart-type	1,36 10 ³ ± 0,19 10 ³	7,65 10 ⁷ ± 0,82 10 ⁷	3,15 10 ³ ± 0,38 10 ³	1,70 10 ² ± 0,24 10 ²
Nombre de bactéries (cell./ml) oxydant les nitrites ± écart-type	99 ± 13	3,10 10 ⁶ ± 0,96 10 ⁶	1,86 10 ³ ± 0,37 10 ³	56 ± 11

Tableau II.XIII. : Détermination du nombre de bactéries oxydant l'ammonium (milieu de SORIANO et WALKER) et oxydant les nitrites (milieu de SCHMIDT et BELSER) selon la technique du Nombre le Plus Probable (NPP)

Ces résultats montrent un nombre plus faible de bactéries nitrifiantes par rapport aux bactéries totales (hétérotrophes ou oligotrophes).

De plus le nombre de bactéries oxydant les nitrites est toujours plus faible que le nombre de bactéries oxydant l'ammonium.

4.3. Application of ¹⁴C-Most-Probable-Number method to enumerate total heterotrophic bacteria and specific degraders in natural waters and during Biodegradability test

Les modèles utilisés pour prédire la distribution et la concentration des composés organiques dans l'environnement nécessitent pour la plupart des données quantitatives sur les taux de biodégradation. Ils sont obtenus en général en ajustant les données observées (disparition de la substance, production de CO₂,...) à une expression mathématique qui décrit une cinétique de biodégradation. Une approche commune consiste à établir une relation de premier ordre où le taux de biodégradation dépend de la concentration. Toutefois, ces expressions dépendent en réalité de la concentration en substance et de la concentration en biomasse active. Cette fraction de la communauté microbienne capable de dégrader un composé chimique varie de manière importante en fonction des sites et est la source la plus importante de variation entre ces cinétiques de premier ordre.

Un moyen de réduire cette variation inter-site est de prendre en compte la biomasse active, généralement évaluée par comptage sur gélose nutritive, pour générer une cinétique de second ordre. Toutefois, ces techniques ne prennent pas en compte la biomasse bactérienne réellement impliquée dans les phénomènes de biodégradation. Une technique prometteuse pour numérer les dégradeurs spécifiques est la technique du Nombre le Plus Probable au ¹⁴C de LEHMICKE et collaborateurs (1979). Cette technique et les modifications que nous y avons apportés sont développées dans le paragraphe 3.4.

Cette technique nous a permis de déterminer le nombre de bactéries totales en utilisant un cocktail de composés organiques correspondant en proportion à la composition d'une boue activée anglaise, le nombre de dégradeurs spécifiques du 4-nitrophénol et l'action des processus d'acclimatation et d'adaptation sur ces populations bactérienne.

Les données présentées dans le tableau 2 montrent que le nombre de bactéries hétérotrophes obtenues par la technique du Nombre le Plus Probable au ¹⁴C sont plus grands de 2 à 4 ordres de magnitude par rapports à ceux obtenus par comptage sur gélose nutritive.

Le nombre de dégradeurs spécifiques du 4-nitrophénol sont de 10 à 10^4 fois moins nombreux que les bactéries totales (figure 1).

D'autre part, les processus d'acclimatation et d'adaptation ne modifient pas le nombre de bactéries hétérotrophes totales. Toutefois, leur influence sur le nombre de dégradeurs spécifiques diffèrent ; en effet, alors qu'une acclimatation réduit fortement leur nombre (environ 10^4 fois moins), une adaptation n'en modifie pas le nombre.

Par contre, la proportion de dégradeurs spécifiques par rapport au nombre de bactéries hétérotrophes totales augmente de 1/900 à 1/70 après adaptation au 4-nitrophénol.

La publication présentée dans les pages suivantes a été soumise à la publication dans la revue CHEMOSPHERE.

USE OF THE ^{14}C -MOST-PROBABLE-NUMBER METHOD TO ENUMERATE
ACTIVE HETEROTROPHIC BACTERIA IN AQUEOUS SAMPLES

P. KUENEMANN¹ AND N.S. BATTERSBY^{2,3*}

¹Centre des Sciences de l'Environnement,
Université de Metz, 57040 Metz, FRANCE

²WRc Medmenham Laboratory, PO Box 16
Marlow, Buckinghamshire SL7 2HD, U.K.

ABSTRACT

An adaptation of the ^{14}C -most-probable-number (^{14}C -MPN) method is described which enables it to be used to enumerate the number of active heterotrophic bacteria in the aquatic environment. A mixture of ^{14}C -labelled sugars, fatty acids, amino acids, a polysaccharide and other compounds is used as the substrate in proportions which approximate to those found in a typical U.K. wastewater. Applications of the method to compare the numbers of active heterotrophic bacteria and specific degraders of synthetic chemicals in aqueous samples and in ready biodegradability test inocula are reported.

INTRODUCTION

Reliable counts of metabolically active bacteria in the aquatic environment are useful to microbial ecologists and to workers studying the biodegradability of synthetic chemicals. For example, information on the proportion of the microbial community able to degrade a chemical may be correlated with previous exposure (Somerville *et al.* 1985).

³ Present address: Shell Research Limited, Sittingbourne Research Centre, Sittingbourne, Kent ME9 8AG, U.K.

In addition, a knowledge of the numbers of active heterotrophic bacteria and specific degraders of a synthetic chemical present in the inocula of standard ready biodegradability tests (OECD, 1981; EEC, 1984) may help in attempts to reduce the large variability associated with such test data (Battersby et al., 1992).

The limitations of standard plate counts for enumerating the total number of viable bacteria in environmental samples, and novel techniques for detecting viable cells, have been reviewed by Roszak and Colwell (1987). One useful method for enumerating active bacteria in natural waters is the ^{14}C -most-probable-number (^{14}C -MPN) technique of Lehmicke et al. (1979). The method uses sterilised water from the sampling site as the growth medium, amended with a low concentration of a single radiolabelled chemical. Evolved $^{14}\text{CO}_2$ from individual dilution replicates is trapped and counted. The replicates are then scored as positive or negative depending on the amount of radioactivity above background.

The authors proposed that the total number of active heterotrophic bacteria in a sample could be enumerated by the ^{14}C -MPN technique if a cocktail of ^{14}C -labelled sugars, organic acids and amino acids was used in place of a single substrate. In this note we describe such an adaptation to the method and give examples of its application.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Settled sewage, activated sludge and secondary effluent (in situ temperature 19 °C) were collected from a sewage treatment works in the south east of England. Surface river water samples (in situ temperature 19 °C) were taken from the River Thames approximately 1 km downstream from the discharge point of the treatment works. All samples were used on the day of collection.

Radiochemicals

The following radiochemicals were obtained from Amersham International and were supplied as sterile aqueous solutions or in an organic solvent: [U-¹⁴C] glucose (specific activity = 0.62 MBq/mg), [U-¹⁴C] sucrose (1.07 MBq/mg), [U-¹⁴C] D-xylose (18.4 MBq/mg), [U-¹⁴C] acetic acid (23.2 MBq/mg), [2-¹⁴C] propionic acid (20.8 MBq/mg), [U-¹⁴C] protein hydrolysate (2.1 GBq/m atom C), [U-¹⁴C] starch (3.7 MBq/mg), [U-¹⁴C] palmitic acid (119.0 MBq/mg), [U-¹⁴C] sodium-L-lactate (53.4 MBq/mg), [1,5-¹⁴C] citric acid (20.8 MBq/mg), [¹⁴C] urea (33.4 MBq/mg) and [carboxyl-¹⁴C] creatinine hydrochloride (3.0 MBq/mg).

Model xenobiotic chemicals were obtained from Sigma: [ring-UL-¹⁴C] bis(2-ethylhexyl) phthalate (1.17 MBq/mg), [carbonyl-¹⁴C] bis(2-ethylhexyl) phthalate (0.92 MBq/mg), [ring-UL-¹⁴C] 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2.78 MBq/mg), [carboxy-¹⁴C] 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (1.05 MBq/mg), [U-¹⁴C] 4-nitrophenol (1.83 MBq/mg) and [U-¹⁴C] pentachlorophenol (1.47 MBq/mg).

¹⁴C-Mixture for enumerating active heterotrophic bacteria

The composition of the ¹⁴C-mixture used in this study is given in Table 1. The main chemical groups and the relative proportions of the individual compounds approximated to those found in a typical U.K. wastewater and were taken from Painter (1971). The mixture was diluted so that the final amount of radioactivity in each replicate was approximately 2 000 dpm. The additional concentration of substrates added was negligible compared to the total carbon content of the sterilised source water used as the growth medium.

Table 1. Composition of ^{14}C -labelled mixture used to enumerate active heterotrophic bacteria in aqueous samples.

Substrate (Typical concentration in wastewater)	Volume supplied radiochemical added to 1 l sterile water (μl)	Concentration radiochemical (ng carbon/l)	Concentration radioactivity (10^6 dpm/l)
<u>Carbohydrates in solution:</u>			
D-glucose (14 mg carbon/l)	76	23	2.1
Sucrose (13 mg carbon/l)	57	21	3.2
D-xylose (2 mg carbon/l)	80	3	8.9
<u>Carbohydrates in suspension:</u>			
Starch (14 mg carbon/l)	90	23	12.5
<u>Organic acids:</u>			
Acetic acid (8 mg carbon/l)	110	14	48.8
Propionic acid (2 mg carbon/l)	90	4	10.0
L-lactate (7 mg carbon/l)	200	3	88.8
Citric acid (6 mg carbon/l)	314	11	34.8
<u>Fatty acids:</u>			
(Palmitic acid (105 mg carbon/l)	75	175	1 700}* }
<u>Proteins and amino acids</u> (in solution & suspension):			
Protein hydrolysate (29 mg carbon/l)	864	48	95.9
<u>Urine-derived materials:</u>			
Urea (4 mg carbon/l)	108	6	59.9
Creatinine (3 mg carbon/l)	64	4	1.8
Total: 207 mg carbon/l	-	335	2 066

* The ^{14}C -labelled medium was prepared by adding 50 μl of the above mixture and 75 μl of the supplied palmitic acid solution (in toluene) to 50 ml filter-sterilised river water, secondary effluent or activated sludge.

¹⁴C-MPN enumeration procedure

The method followed was essentially that described by Lehmicke et al. (1979) using filter-sterilised (0.2 µm membrane filter) river water, secondary effluent or activated sludge (pre-filtered through 1.0 µm membrane filter) as the dilution and growth medium. Ten-fold dilutions of the samples were made and aliquots of 0.1 ml added to replicate Wheaton vials of 5 ml capacity containing 1 ml sterile water from the sampling site supplemented with either 2 000 dpm of the ¹⁴C-mixture, or 1 700 to 5 000 dpm of the xenobiotic chemical (final concentration 30 µg chemical/l). Activated sludge mixed liquor samples were homogenised by ultrasonication in sodium tripolyphosphate solution (Pike et al., 1972) prior to dilution.

The Wheaton vials were placed in 20 ml scintillation vials containing 1 ml 1 M NaOH as the CO₂-trapping agent and tightly closed. Sterile controls were used to determine background radioactivity and were poisoned with 10 µl 1% w/v HgCl₂. Incubation was at in situ temperature ± 2 °C for three weeks in the dark.

At the end of this period the Wheaton vials were removed and 10 ml Hionic-Fluor (Packard) scintillation cocktail added to each scintillation vial prior to liquid scintillation counting. The cocktail used is formulated for counting aqueous alkaline solutions and eliminated any errors due to chemiluminescence. Replicates which contained more than the mean of the relevant abiotic control plus two standard deviations were scored as positive and the MPN of organisms in the original sample calculated from standard statistical tables (Alexander, 1965).

The numbers of heterotrophic micro-organisms in the samples were also estimated using conventional plate counts on casein-peptone-starch (CPS) agar incubated at 10 °C for 10 days, and 1% CPS agar (10 °C 30 days) as described by Pike et al. (1972).

Pre-conditioning and pre-exposure of activated sludge

Pre-conditioning of the activated sludge to ready biodegradability test conditions was performed by aerating sludge for 15 minutes and then allowing the solids to settle-out. The supernatant liquid was decanted and replaced with an equal volume of buffered, mineral salts medium (OECD, 1987). This procedure was repeated twice. After aeration for one week at 20 ± 2 °C, evaporation losses were replenished with distilled water and ^{14}C -MPN counts performed on the mixed liquor as described above.

Activated sludge was pre-exposed to a model xenobiotic chemical by aerating for one week at 20 ± 2 °C in the presence of 4-nitrophenol (20 mg carbon/l). At the end of this period, evaporation losses were made up with distilled water and ^{14}C -MPN counts performed as before.

RESULTS AND DISCUSSION

The ^{14}C -MPN method has been widely used to enumerate specific degraders of synthetic chemicals in freshwaters, estuaries, aquifers and peat bogs (Lehmicke et al., 1979; Somerville et al., 1985; Larson & Ventullo, 1986; Aelion et al., 1987; Swindoll et al., 1988). Although it has the disadvantages of being labour intensive and requiring the use of radiochemicals, it has the advantages of using a natural growth medium, an environmentally realistic substrate concentration and provides unequivocal evidence of mineralisation via the production of $^{14}\text{CO}_2$. In addition, specific groups of bacteria can be examined through the use of uniformly and side-chain labelled compounds. To our knowledge, this is the first report of the technique being used with a mixture of radiolabelled, naturally-occurring compounds to provide an estimate of the total numbers of active heterotrophic bacteria in the aquatic environment.

Table 2. Counts of active heterotrophic bacteria in activated sludge, secondary effluent and river water using standard plate counts on casein-peptone-starch agar (CPS) and the ^{14}C -MPN method.

Sample	Micro-organisms/ml (incubation period)		
	CPS (10 d)	1% CPS (30 d)	^{14}C -MPN (21 d)
Activated sludge	1.2×10^6	2.5×10^6	$>1.6 \times 10^{10}$
Secondary effluent	2.0×10^7	2.1×10^7	2.1×10^7 ($0.6-6.9 \times 10^7$) ^a
River water	1.1×10^3	2.1×10^4	2.2×10^6 ($0.7-7.3 \times 10^6$) ^a

^a 95% Confidence limits

Enumeration of bacteria in aqueous samples

The data given in Table 2 show that counts of active heterotrophic bacteria in activated sludge and river water made using the ^{14}C -MPN method were two to four orders of magnitude greater than the number of colony-forming units (cfu) recovered by standard plate counts with either full-strength or dilute media. However, there was no difference in the numbers of active heterotrophic bacteria estimated by the ^{14}C -MPN method in secondary effluent and cfu recovered on CPS agar. The counts obtained were similar to those previously reported by Dutton *et al.* (1983) who also found that there was no difference in the numbers of bacteria counted directly by epifluorescence microscopy or as active (respiring) bacteria.

Figure 1.
 Counts of active heterotrophic bacteria and specific degraders in river water and activated sludge obtained using the ^{14}C -MPN method.

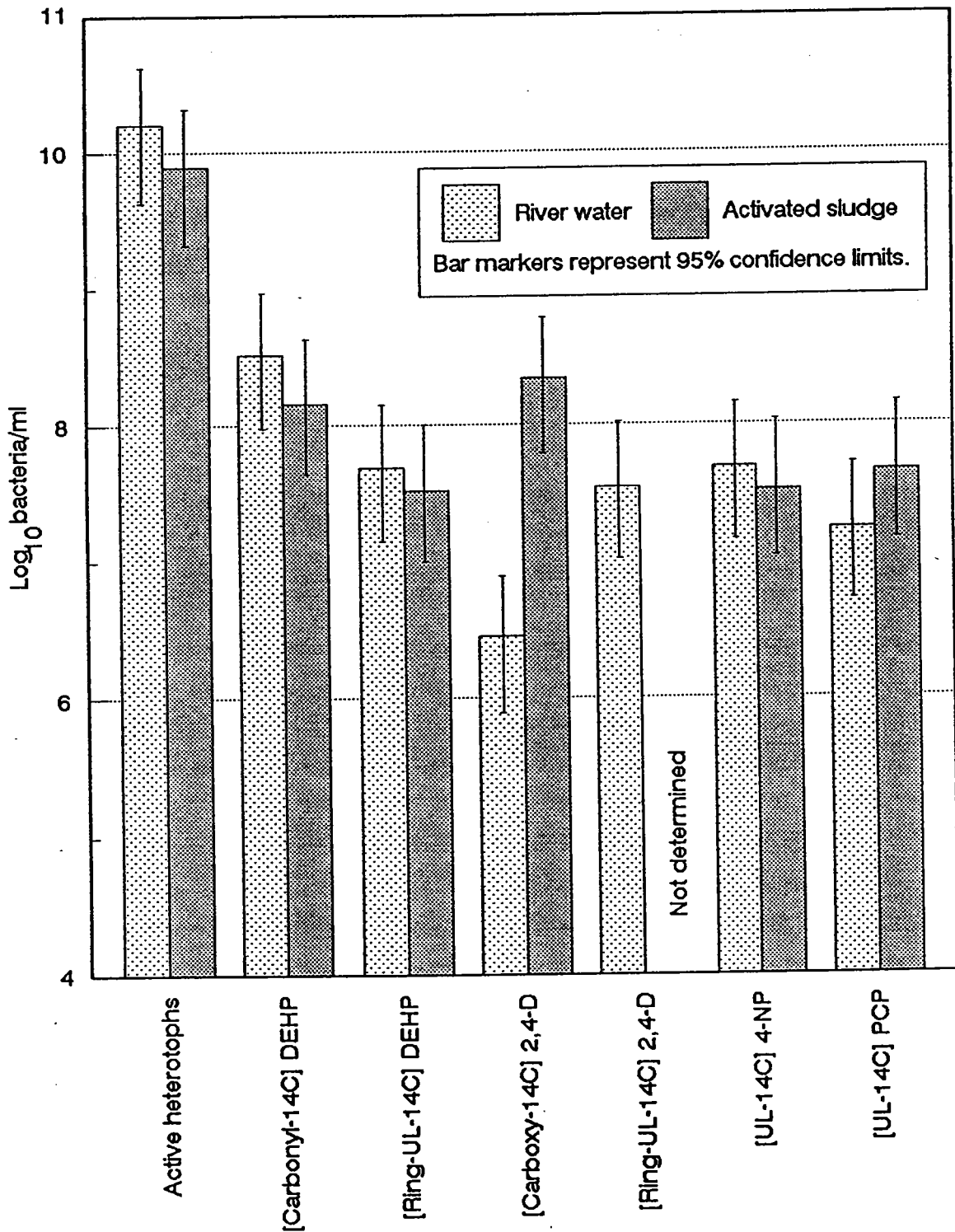


Figure 1 shows counts of active heterotrophic bacteria and specific degraders of xenobiotic chemicals in samples of activated sludge and river water. The sites were sampled one month later than in Table 1 after a period of heavy rain and run-off of micro-organisms from the surrounding land may have accounted for the high counts in the river water sample.

Specific degraders of the synthetic chemicals studied were one to four orders of magnitude less numerous than the total heterotrophic populations in the two sites studied. There appeared to be no difference in the numbers of organisms capable of degrading a chemical at either the wastewater treatment plant or the receiving river. In contrast to a previous report (Lehmicke et al., 1979), we observed no difference in the numbers of bacteria capable of utilising only the side chain of a molecule and those capable of ring degradation.

The advantage of the low substrate concentration (30 $\mu\text{g/l}$) used in the ^{14}C -MPN technique was illustrated by the high counts of bacteria capable of degrading 4-nitrophenol and pentachlorophenol which are toxic to aquatic bacteria at the high substrate concentrations required for standard MPN and plate counts (Walker, 1988).

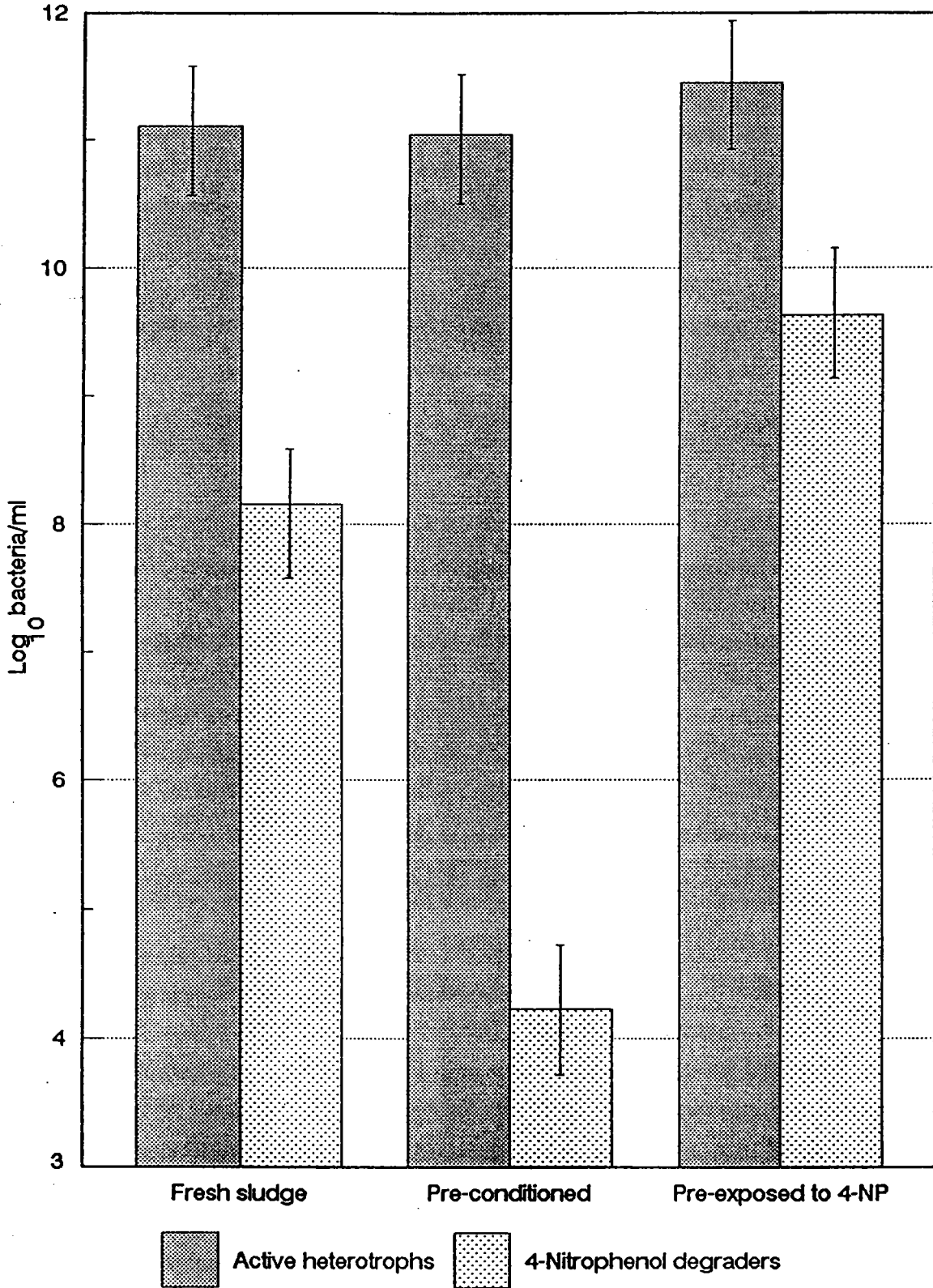
Enumeration of bacteria in ready biodegradability test inocula

Data from ready biodegradability tests are required for the marketing of new chemicals in the European Economic Community (EEC, 1979) and are often used to assess the environmental acceptability of existing products. The tests use mixed populations of micro-organisms (usually derived from wastewater treatment plants) as inocula and as a consequence there is a large variability associated with test results (Battersby et al., 1992). This can make between-laboratory and even between-test comparisons of data difficult.

Ready biodegradability tests measure biodegradation as net differences in respiration or carbon removal between test vessels and unamended controls. High blank values can therefore reduce the precision with which test substance biodegradation can be measured. Pre-conditioning of the inoculum prior to a test, by incubation under the test conditions (but in the absence

Figure 2.

Changes in the numbers of active heterotrophs and 4-nitrophenol degraders in activated sludge after pre-conditioning and pre-exposure to 4-NP.



Bar markers represent 95% confidence limits.

of test substance), can reduce this blank activity (OECD, 1987). However, little is known about the effect of this process on the microflora of the inoculum.

The preliminary data shown in Figure 2 indicate that while pre-conditioning may have no effect on the numbers of active heterotrophic bacteria, there can be a large reduction in the numbers of organisms capable of degrading a synthetic chemical.

Ready biodegradability tests have a relatively low potential for biodegradation to occur and as a consequence "fails" are commonplace. It has been proposed that it should be permissible to repeat a test using an inoculum which had been pre-exposed to the test chemical - a chemical then achieving a pass would be described as "readily biodegradable after adaptation" (Nyholm *et al.*, 1984).

At present there are no standard methods for producing acclimated inocula, although initiatives have been made by the International Organization for Standardization (Painter, 1987). Data shown in Table 2 indicate that the ratio of 4-nitrophenol degraders to total active heterotrophic bacteria increased from 1:900 to 1:70 after exposure to the test chemical for one week. Unfortunately, the effect of this change on the rate and extent of 4-nitrophenol degradation in a ready biodegradability test was not determined. However, predictions based on typical bacterial growth kinetics have indicated that a difference of only 10-50 in the concentration of specific degraders in the inoculum can yield ready biodegradability scores varying between a fail and a pass over the 28 day test period (Blok & Booy, 1984).

In conclusion, our adaptation of the ^{14}C -MPN method provides a relatively simple method for studying the populations of active heterotrophic bacteria in the aquatic environment. It should also be a useful tool for studying the effect of inoculum composition on the biodegradability of organic chemicals in standard ready biodegradability tests.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant to PK from The British Council.

REFERENCES

- Aelion C.M., Swindoll C.M. and Pfaender F.K. (1987). Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer. Applied and Environmental Microbiology 53, 2212-2217.
- Alexander M. (1965). Most-probable-number method for microbial populations. In Methods of Soil Analysis. Part 2 Chemical and Microbiological Properties, edited by C.A. Black, pp 1467-1472.
- Battersby N.S., Girling A.E., Stephenson R.R. and Watkinson R.J. (1992). Variability in results from aquatic toxicity and biodegradability studies: implications for data interpretation. Proceedings of the 3rd CESIO International Surfactants Congress and Exhibition, London.
- Blok J. and Booy M. (1984). Biodegradability test results related to quality and quantity of inoculum. Ecotoxicology and Environmental Safety 8, 410-422.
- Dutton R.J., Bitton G. and Koopman B. (1983). Malachite green-INT (MINT) method for determining active bacteria in sewage. Applied and Environmental Microbiology 46, 1263-1267.
- EEC (1979). Council Directive 79/831/EEC Amending for the Sixth Time Directive 67/548/EEC on the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances. Official Journal of the EC L259 10.
- EEC (1984). Part C: Methods for the determination of ecotoxicity. Official Journal of the EC L251 27.
- Larson R.J. and Ventullo R.M. (1986). Kinetics of biodegradation of nitrilotriacetic acid (NTA) in an estuarine environment. Ecotoxicology and Environmental Safety 12, 166-179.

Lehmicke L.G., Williams R.T. and Crawford R.L. (1979). ^{14}C -most-probable-number method for the enumeration of active heterotrophic microorganisms in natural waters. Applied and Environmental Microbiology 38, 644-649.

Nyholm N., Lindgaard-Jørgensen P. and Hansen N. (1984). Biodegradation of 4-nitrophenol in standardized aquatic degradation tests. Ecotoxicology and Environmental Safety 8, 452-470.

OECD (1981). Guidelines for Testing of Chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris.

OECD (1987). Information on the 1988 OECD Ring-test of Ready Biodegradability. Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris.

Painter H.A. (1971). Chemical, physical and biological characteristics of wastes and waste effluents. In Water and Water Pollution Handbook Vol. 1, edited by L.L. Ciaccio, pp 329-364. Marcel Dekker Inc: New York.

Painter H.A. (1987). Degradation With Adapted Inocula: A Survey. Discussion paper for ISO Secretariat ISO/TC 147/SC 5/WG 4. International Organization for Standardization.

Pike E.B., Carrington E.G. and Ashburner P.A. (1972). An evaluation of procedures for enumerating bacteria in activated sludge. Journal of Applied Bacteriology 35, 309-321.

Rozsak D.B. and Colwell R.R. (1987). Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. Applied and Environmental Microbiology 53, 2889-2983.

Somerville C.C., Monti C.A. and Spain J.C. (1985). Modification of the ^{14}C -most-probable-number method for use with nonpolar and volatile substrates. Applied and Environmental Microbiology 49, 711-713.

Swindoll C.M., Aelion C.M., Dobbins D.C., Jiang O., Long S.C. and Pfaender F.K. (1988). Aerobic biodegradation of natural and xenobiotic organic compounds by subsurface microbial communities. Environmental Toxicology and Chemistry 7, 291-299.

Walker J.D. (1988). Effects of chemicals on microorganisms. Journal of the Water Pollution Control Federation 60, 1106-1121.

V. Conclusion

A partir des résultats obtenus par ces différentes techniques de numération, nous pouvons observer que la technique du nombre le plus probable au ^{14}C donne dans tous les cas des valeurs de numération des bactéries totales supérieures aux autres techniques.

Ceci tendrait à prouver que cette technique est plus adaptée pour donner des résultats de numération de bactéries totales précises, d'autant plus précises que la source de carbone n'est pas composée d'un seul élément carboné, mais d'un cocktail de composés dégradables qui représentent les types de composés carbonés les plus représentatifs des milieux testés, en proportion.

De plus, cette technique présente l'avantage par rapport aux autres méthodes de permettre la détermination du nombre de dégradeurs spécifiques (ou bactéries compétentes). Ainsi, la connaissance du nombre des bactéries réellement impliquées dans un processus de biodégradation, et non des bactéries totales, devrait permettre d'améliorer les tests de biodégradabilité existant.

L'observation globale des différents résultats de numération obtenus montre, de plus, une évolution du nombre de bactéries totales (quelle que soit la technique de numération) au cours de la chaîne de traitement des eaux usées. En fait, après un dopage du nombre de bactéries contenues dans l'eau d'égout par la boue activée, nous pouvons observer une diminution d'un facteur 10 environ du nombre de bactéries après épuration (dans l'effluent secondaire) puis une dilution d'un facteur 5 environ lors du passage dans l'eau de rivière.

En conclusion, la technique du nombre le plus probable au ^{14}C semble être une technique d'avenir dans l'amélioration des tests de biodégradabilité en milieu environnemental, d'autant plus qu'avec quelques aménagements (évaluation de la biodégradation dans le temps,...) celle-ci pourrait permettre de se substituer aux autres tests de biodégradabilité classique et de déterminer des cinétiques de biodégradation.

D'autre part, les processus d'acclimatation (préconditionnement) et d'adaptation ne modifient pas le nombre de bactéries hétérotrophes totales. Par contre, ces deux procédés ont des actions opposées sur le nombre de bactéries dégradant spécifiquement un composé chimique (le para-nitrophénol dans notre cas). L'acclimatation d'une boue activée induit une diminution importante du nombre de dégradeurs spécifiques. Une adaptation d'une boue activée au composé chimique, induit quant à elle une augmentation du nombre de dégradeurs spécifiques de ce composé ; ce phénomène pouvant être assimilé à une sélection des bactéries.

De plus, cette technique, avec la détermination du nombre de dégradeurs spécifiques permettrait de définir des cinétiques de biodégradation plus précises et réalistes. Il serait alors possible de classer, sur la base de cinétiques, différents phénomènes (biodégradation, photolyse, adsorption, dégradation abiotique,...) afin d'estimer l'importance de leur action au niveau de la diffusion et de la persistance des composés organiques dans les milieux environnementaux.

CHAPITRE III

Les Q.S.B.R.

**Alternative ou complément
des tests de biodégradabilité**

CHAPITRE III

Les Relations Structure-Biodégradabilité Quantitatives

I. Introduction.....	94
II. Définition - Généralités.....	95
III. Les données de biodégradabilité.....	96
3.1. Généralités.....	96
3.2. Les tests de biodégradabilité utilisés dans les Q.S.B.R.	96
IV. Les descripteurs de la structure chimique.....	98
4.1. Généralités.....	98
4.2. Les descripteurs physico-chimiques.....	99
4.2.1. Les paramètres généraux.....	99
4.2.2. Les paramètres hydrophobiques.....	99
4.2.3. Les paramètres électroniques.....	102
4.2.4. Les paramètres stériques.....	104
4.2.5. Autres paramètres.....	107
4.3. Les indices topologiques.....	108
4.3.1. Généralités.....	108
4.3.2. Les indices de connectivité.....	109
4.3.3. L'autocorrélation.....	112

V. Méthodes d'analyse utilisées pour l'élaboration de Q.S.B.R.....	113
5.1. Analyse empirique.....	114
5.1.1. Classification booléenne.....	114
5.1.2. Classement.....	115
5.2. Analyse statistique.....	115
5.2.1. Analyse quantitative.....	115
5.2.2. Analyse qualitative.....	116
VI. <i>Structure-Biodegradability Relationships</i>	118
VII. Conclusion.....	147

III. Les données de biodégradabilité

3.1. Généralités

Les tests de biodégradabilité actuels permettent de quantifier, par l'analyse, la biodégradabilité de xénobiotiques (substances chimiques de synthèse) dans différents compartiments de l'environnement (eau, sol pour la plus grande partie) et dans des conditions aérobie ou anaérobie. Ces tests, méthodes ou lignes directrices ont été décrites plus en détail dans la chapitre I.

3.2. Etude de biodégradabilité utilisées pour l'établissement des Q.S.B.R.

Comme on peut le remarquer dans la littérature, les études de biodégradabilité des xénobiotiques se composent en grande majorité d'études de la biodégradabilité d'une seule substance chimique plus ou moins complexe, dans des conditions expérimentales définies par les protocoles de tests normalisés (normes, lignes directrices) ou par des protocoles permettant de répondre aux problèmes posés (voies de biodégradation, recherche de la population bactérienne impliquée et identification,...).

Bien qu'en théorie il devrait être possible de comparer la biodégradabilité de différentes substances quand elles ont été testées dans les mêmes conditions (même test, même ligne directrice par exemple), il faut toutefois remarquer qu'un grand nombre de paramètres - qualité et quantité de l'inoculum, existence ou non de processus d'adaptation ou d'acclimatation,...- peuvent varier et rendre impossible une comparaison entre les résultats. Ainsi, les résultats de biodégradabilité d'une même substance testée selon la même méthode, mais en 2 endroits distincts peuvent différer d'une manière plus ou moins importante (GERIKE et FISCHER, 1979).

De ce fait, ces travaux ne présentent qu'un intérêt restreint en ce qui concerne la classification relative des xénobiotiques testés et l'utilisation de telles données dans l'établissement de Q.S.B.R.. Il en est de même pour tous les travaux "non normalisés" utilisant des conditions expérimentales différentes ou des méthodes spécifiques d'analyse (HPLC, CPG,...) pour l'étude de la biodégradabilité de substances chimiques.

Par conséquent, les seules études présentant un intérêt pour l'établissement de Q.S.B.R. sont les études, moins nombreuses, ou plusieurs substances (d'une même famille chimique ou non) sont testées dans les mêmes conditions, selon des protocoles identiques et, si possible, simultanément. Il est possible de trouver, dans la littérature, plusieurs études de biodégradabilité qui satisfont ces dernières conditions (tableau III-I).

Substances chimiques	Auteurs	Année
<u>Composés aliphatiques</u>		
alcools	DIAS et ALEXANDER	1971
	YONEZAWA et URUSHIGAWA	1979
	VAISHNAV et coll.	1987
amides-imides	ENNIS et coll.	1978
alcanes	SOLANAS et coll.	1984
	BARTHA	1968
<u>Composés alicycliques</u>		
cycloparaffines	BEAM et PERRY	1974
<u>Composés aromatiques</u>		
monoaromatiques		
hydrocarbures	BANNERJEE et coll.	1984
phénols	PARIS et coll.	1982
phtalates	SUGATT et coll.	1984
biphényles	FURUKAWA et coll.	1978
pyridine	SIMS et SOMMERS	1984
alkylbenzènesulfonates	GLEDHILL	1975

Tableau III-I : Exemples tirés de la littérature d'études permettant une exploitation pour établir des Q.S.B.R.

Toutefois, la diversité des moyens d'expression des résultats de biodégradabilité rend difficile la compréhension et la comparaison des différentes relations Structure-Biodégradabilité observées. En effet, il est possible d'obtenir des résultats de biodégradabilité dont les expressions diffèrent : résultats exprimés en quantité de substance biodégradée pour une durée définie (test à analyse spécifique,...), en quantité de dioxyde de carbone produit par rapport à la théorie (OCDE 301 B,...), en quantité de carbone dissout disparaissant (OCDE 301 E,...), en quantité d'oxygène consommé par rapport à la théorie (CBT,...), et des résultats exprimés en cinétique de biodégradation.

La diversité de ces modes d'expression de la biodégradabilité accentue encore plus la diversité des relations Structure-Biodégradabilité ainsi élaborées.

IV. Les descripteurs de la structure chimique

4.1. Généralités

Une analyse générale des relations Structure-Biodégradabilité dans la littérature permet de relever une grande diversité de "descripteurs" de la structure chimique utilisés avec un succès plus ou moins important.

La caractéristique générale de ces "descripteurs" est d'exprimer sous une forme numérique la structure moléculaire des xénobiotiques ou leur propriétés physiques, chimiques ou physico-chimiques.

Ces descripteurs peuvent faire référence à des propriétés générales, hydrophobes, électroniques, stériques et topologiques des substances chimiques (Tableau III-II).

Propriété de la molécule décrite par le descripteur	Descripteurs
propriétés générales	Poids moléculaire pKa
Propriétés hydrophobes	Coefficient de partage octanol/eau logP Temps de rétention en chromatographie
Propriétés électroniques	Constantes de HAMMETT Différence de module de charge d'une liaison
Propriétés stériques	Rayon de VAN DER WAALS Longueur de STERIMOL Surface moléculaire
Propriétés topologiques	Indices de connectivité

Tableau III-II : Principaux descripteurs de la structure chimique utilisés pour l'établissement des Q.S.B.R.

4.2. Les descripteurs physico-chimiques

4.2.1. Les paramètres généraux

Quelques paramètres généraux sont utilisés dans l'élaboration des relations Structure-Activité. Ils caractérisent :

- des propriétés physiques : Poids moléculaire (PM), point de fusion et pression de vapeur ;
- des propriétés chimiques : pKa (constante d'hydrolyse), solubilité (BASAK, 1990).

Il faut noter que le PM, le pKa et la solubilité peuvent être respectivement considéré comme des paramètres stériques, électroniques ou hydrophobes par différents auteurs (DEARDEN, 1990). Ils seront de ce fait traités plus en détail dans les chapitres correspondants.

Toutefois, seuls le PM et le pKa ont été introduits dans des relations Structure-Biodégradabilité.

4.2.2. Les paramètres d'hydrophobicité

Ces paramètres sont les plus anciens qui furent utilisés pour l'élaboration de relations Structure-Activité, au même titre que l'hydrosolubilité, tout en étant les plus appropriés (DEARDEN, 1990). Par la suite, de nombreux auteurs (HANSCH et LEO, 1980 ; ...) ont démontré que le "comportement de partition (sous-entendu entre une phase aqueuse et une phase organique) d'un composé chimique est un des facteurs parmi les autres qui contrôle la capacité d'un xénobiotique à engendrer une réponse biologique" (DEARDEN, 1990).

Les paramètres d'hydrophobicité conditionnent la pénétration des composés organiques dans les cellules bactériennes (BLOCK et coll., 1990) qui est la première étape des phénomènes de biodégradation.

De nombreuses formes ou expressions de l'hydrophobicité des composés chimiques ont été utilisées dans l'établissement de Q.S.A.R., et plus particulièrement de Q.S.B.R. : K_{OH} , $\log P$; rétention en chromatographie en phase gazeuse,... et l'hydrosolubilité !

a) Coefficient de partition ou $\log P$

Le coefficient de partition défini initialement par BERTHELOT et JUNGFLAISCH en 1872 (DEARDEN, 1990) est le rapport des concentrations à l'équilibre d'un soluté (sous la même forme chimique) distribué entre deux phases liquides non miscibles (une phase aqueuse et une phase organique, ou octanolique pour le K_{ow}). La concentration dans la phase la plus hydrophobe est, par convention, placée au numérateur dans toutes ces expressions.

Il a été démontré que le coefficient de partition octanol/eau (ou K_{ow}) permettait d'obtenir des relations Structure/Activité (ou Structure/Bio-dégradabilité) plus précises et performantes que les autres coefficients de partage (benzène/eau par exemple) (DEARDEN, 1990).

a.1.) Détermination du coefficient de partition par le calcul

Sur la base de valeurs de $\log P$ mesurées, LEAHY a pu démontrer en 1986 que le coefficient de partage pouvait être factorisé en un terme de volume (V_1 = volume moléculaire), un terme électronique (μ = moment dipolaire) et un terme caractéristique des accepteurs d'hydrogène (β) (DEARDEN, 1990) :

$$\log P = 5,15 (V_1/100) - 0,30\mu - 3,58\beta + 0,42 \quad (\text{Eq. 1})$$

D'autres relations ou corrélations ont pu être observées entre le $\log P$ et différents paramètres physico-chimiques, par exemple entre le $\log P$ et le volume de Van der Waals (V_w) comme l'ont montré MORIGUCHI et ses collaborateurs en 1976 (DEARDEN, 1990) :

$$\log P = 2,51 V_w + 0,23 \quad n=60 \quad r=0,98 \quad s=0,228 \quad (\text{Eq. 2})$$

Ce type de relations permettent, outre de déterminer par le calcul le $\log P$, de constituer une expression mécanistique des Q.S.A.R. ou Q.S.B.R. observées.

a.2.) Mesure du coefficient de partage

De par sa définition, il est relativement simple de conceptualiser une méthode de mesure du logP. Toutefois, de nombreux écueils (obtention de la saturation des phases, séparation des 2 phases, mesures, influence de la température,...) interviennent dans cette détermination, occasionnant une grande variation des valeurs de logP observées.

De nombreuses méthodes de mesure du logP existent ; la méthode la plus recommandée est celle développée en 1971 par LEO et ses collaborateurs (DEARDEN, 1990).

b) Détermination de l'hydrophobicité par chromatographie

Bien que ne représentant pas correctement le logP (LEO, 1987), les paramètres d'hydrophobicité obtenus par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou chromatographie en couche mince (CCM ou TLC) tels que le "rate flow" (Rf) présentent l'avantage principal de pouvoir être mesurés rapidement, avec une grande précision de mesure, et la possibilité d'obtenir facilement des replicats de mesure.

c) Constante d'hydrophobicité d'un substituent (π)

D'autres paramètres tels que la constante de substitution hydrophobe définie comme :

$$\pi = \log P_{\text{dérivé}} - \log P_{\text{parent}} \quad (\text{HANSCH et FUJITA, 1964}) \quad (\text{Eq. 3})$$

permettent de quantifier la variation d'hydrophobicité apportée par un substituant. Les valeurs ainsi obtenues, reprises dans différentes tables ou banques de données, permettent aussi l'établissement de Q.S.A.R., d'autant plus que est fonction de la nature du substituant et de la position de la substitution sur le composé parent.

d) Solubilité

Par définition, la solubilité peut être considérée comme l'inverse de l'hydrophobicité, et, de ce fait, est une mesure d'hydrophobicité. De nombreuses corrélations négatives ont été établies entre solubilité et hydrophobicité (DEARDEN, 1990).

De plus, la solubilité est facile à mesurer, bien que dépendant, entre autre, de la température.

4.2.3. Les paramètres électroniques

Les forces qui contrôlent les interactions entre les xénobiotiques et leurs accepteurs sur les organismes ou les micro-organismes sont toutes de forces d'interaction. De ce fait, les paramètres caractérisant, au niveau des structures chimiques, ces forces d'interaction ont fréquemment été utilisées dans l'élaboration des Q.S.A.R. et des Q.S.B.R..

Plusieurs paramètres électroniques ont été utilisés pour l'élaboration des Q.S.A.R. (DEARDEN, 1990) :

- constantes de HAMMETT (développées par HAMMETT en 1935) ;
- réfractivité moléculaire ;
- pKa ;
- moment dipolaire ;
- force des liaisons hydrogène.

Toutefois, seuls la constante de HAMMETT et le pKa ont souvent été retenus pour l'établissement de Q.S.B.R..

a) Constantes de HAMMETT (σ)

Les constantes de HAMMETT (σ) permettent d'évaluer l'effet électronique d'un substituant X d'un composé chimique.

Elles sont calculées à partir de l'équation développée en 1935 par HAMMETT :

$$\log K_X = \delta \sigma + \log K_H \quad (\text{Eq. 4})$$

avec :

- K_X : constante de dissociation du composé chimique substitué dans l'eau à 25 C
- K_H : constante de dissociation du composé chimique non substitué dans l'eau à 25 C
- δ : constante de réaction (caractérise la réaction étudiée indépendamment du substituant) ;
- σ : constante de HAMMETT.

En se basant, par référence, sur l'effet d'un tel composé sur la dissociation de l'acide benzoïque, HAMMETT établit en 1935 une nouvelle formulation des constantes de HAMMETT :

$$\log (K_{aX}/K_{aH}) = \delta \sigma \quad (\text{Eq. 5})$$

avec :

- σ : constante de HAMMETT ;
- δ : constante de série, $\delta = 1$ pour l'acide benzoïque ;
- K_{aX} et K_{aH} : constantes de dissociation d'une substance chimique substituée par le composé X et de cette substance chimique non substituée respectivement.

Ainsi, pour l'acide benzoïque ($\delta = 1$), cette relation s'écrit, après transformation (NORRINGTON et coll., 1975) :

$$\sigma = K'_H/K'_X = \log(K_{aX}/K_{aH}) \quad (\text{Eq. 6})$$

Cette équation est vérifiée à la température de 25 C.

Ce paramètre (σ) est caractéristique du substituant sur la molécule (HANSCH et LEO, 1980).

HAMMETT a aussi développé des constantes caractéristiques de la position de la substitution pour des composés aromatiques : σ_o , σ_m et σ_p pour les positions *ortho*, *meta* et *para* de la substitution (HAMMETT, 1935).

D'autres constantes de HAMMETT ont été modifiées pour rendre compte d'autres particularités structurales telles que :

- Indice de TAFT σ^* représentant l'effet électronique de composés aliphatiques en 1956 ;

- σ^+ et σ^- développés par BROWN et OKAMOTO en 1958 caractérisant respectivement les substituants accepteurs et donneurs d'électrons (DEARDEN, 1990).

Actuellement, plus de 20 types de constantes de HAMMETT ont été, ou sont utilisées (SWAIN et LUPTON, 1968).

Bien que ces constantes puissent être calculées, elles peuvent être facilement retrouvées dans des banques de données ou des tables (DEVILLERS, Communication personnelle).

b) Constante de dissociation (pKa)

le pKa peut être également considéré comme un paramètre électronique. En réalité, il caractérise l'effet de "délocalisation des électrons" permettant de donner naissance à une hydrolyse des composés chimiques.

Le pKa peut être calculé à partir des valeurs de σ (cf équation 6), mais il est préférable de recourir à un système expérimental afin de mesurer le pKa.

4.2.4. Les paramètres stériques

Les paramètres stériques caractérisent la taille et/ou la silhouette des substances chimiques. Leur importance dans les relations Structure/Activité (ou Structure/Biodégradabilité) est d'autant plus grande qu'ils interviennent dans l'activité biologique des micro-organismes au niveau du contact substance/micro-organisme (site accepteur) et au niveau de la biodisponibilité des substances pour les micro-organismes.

Il est possible de distinguer deux types de paramètres stériques :

- paramètres caractérisant la taille des substances ;
- paramètres caractérisant la silhouette des substances.

a) Paramètres de "taille"

Divers paramètres, des plus simples au plus complexes, peuvent être relevés dans la littérature des Q.S.A.R. : poids moléculaire, volume molaire, surface moléculaire, rayon de Van der Waals (et paramètres rattachés),... .

a.1.) Le poids moléculaire (PM)

C'est certainement le plus simple et le plus facile à obtenir de tous les paramètres structuraux que l'on peut relever dans la littérature sur les relations Structure/Biodégradabilité. Il caractérise la masse relative de la molécule considérée.

a.2.) Le volume molaire

Il est défini comme étant le rapport de la masse moléculaire sur la densité.

Il peut être déterminé, pour une substance chimique solide, soit expérimentalement par une mesure du volume extrapolée à une dilution infinie de la substance dans l'eau, soit par le calcul en sommant les volumes de Van der Waals (obtenus à partir des rayons de Van der Waals) de chacun de ses constituants.

a.3.) La surface moléculaire

Ce paramètre caractérise la structure tridimensionnelle de la molécule. Son accès semble simple, mais nécessite toutefois un outil informatique puissant afin d'en déterminer une valeur numérique. Il peut néanmoins être estimé à partir des valeurs de rayon de Van der Waals des constituants atomiques de la molécule concernée (BONDI, 1964).

a.4.) Le rayon de Van der Waals (et les paramètres rattachés)

Le rayon de Van der Waals est fréquemment utilisés pour l'étude physique des composés chimiques. Il est de plus en plus employé dans les études de relations Structure/Activité. Il caractérise en effet la longueur de la liaison d'un substituant à une molécule mère et de ce fait ne devrait être appliqué qu'à des composés chimiques substitués, et qui plus est des substituants dont la forme est la plus sphérique possible, afin de n'en pas limiter l'usage (DEARDEN, 1990).

Il peut être mesuré par diffraction aux rayons X de la liaison considérée (BONDI, 1964).

b) Paramètres de "silhouette"

Comme pour le chapitre précédent, de nombreux paramètres peuvent être relevés dans cette catégorie : paramètres de Stérimol, Indice Kappa, indice de branchement de Austel, analyse de la surface moléculaire, différence topologique minimale, paramètres en 3-dimensions,...(DEARDEN, 1990).

Dans cette catégorie, seule la longueur de Stérimol est utilisée comme paramètre physico-chimique dans l'élaboration de relations Structure/Biodégradabilité.

b.1.) Paramètre de Stérimol

La longueur de Stérimol est la longueur définie selon l'axe principal d'énergie minimale ("minimal overlay" en anglais) de la substance et/ou de ses substituants.

De même, des profondeurs de Stérimol (notées B1 à B4) peuvent être envisagées.

Tous ces paramètres sont calculés à partir des rayons de Van der Waals, enchaînés les uns aux autres selon les angles entre les directions que prennent les atomes (variant entre 0 et 90).

Le tableau III-III donne un aperçu de quelques valeurs de paramètres de Stérimol pour différents substituants (DEARDEN, 1990).

Substituant	L	B1	B2	B3	B4
H	2,06	1,00	1,00	1,00	1,00
Cl	3,52	1,80	1,80	1,80	1,80
CH ₃	3,00	1,52	1,90	1,90	2,04
n-C ₄ H ₉	6,17	1,52	1,90	1,90	4,42
OH	2,74	1,35	1,35	1,35	1,93
NO ₂	3,44	1,70	1,70	2,44	2,44

Tableau III-III : Exemples de valeurs de paramètres de Stérimol pour différents substituants

b.2.) Autres paramètres stériques

L'indice Kappa, basé sur les graphes de molécules différentes de l'hydrogène dans une substance chimique, et l'indice de branchement de Austel, basé sur le nombre de liaison ne faisant pas intervenir l'hydrogène, sont des paramètres qui caractérisent le taux de branchement (substitution) de la molécule (DEARDEN, 1990).

Bien qu'intéressants au niveau des relations Structure/Biodégradabilité, ces indices n'y trouvent pas encore d'applications à cause de la difficulté de trouver des données sur ces paramètres.

4.2.5. Autres paramètres

D'autres paramètres ont été utilisés par différents auteurs pour élaborer des relations Structure/Biodégradabilité. Ainsi, DEARDEN et NICHOLSON (1986) utilisent la différence de module de charge atomique d'une liaison X-Y d'une molécule ($\Delta|\delta|_{X-Y}$ abrégée DMC $X-Y$).

La différence de module de charge atomique d'une liaison déterminée à partir des valeurs d'énergie minimale d'une molécule prend en compte les effets des substituants et leur position sur une molécule.

Récemment, l'utilisation de données de spectroscopie (GC-MS, GC/IR-FT) ont été utilisées pour l'élaboration de Q.S.B.R. (MOORE et coll., 1989). Ainsi, la fréquence et l'intensité des pics IR (correspondant à une structure définie, liaison C=O par exemple) ont été employés avec succès pour établir des Q.S.B.R. (STEEN et COLLETTE, 1987).

4.3. Les indices topologiques

4.3.1. Généralités

Dans l'élaboration de relations Structure/Activité ou Structure/Bio-dégradabilité, l'idée est de représenter par une valeur numérique la structure moléculaire. Le moyen le plus simple d'y arriver est d'assigner aux structures des nombres nommés "indices", qui appliqués au graphe structural de la molécule définissent un "indice topologique".

Les indices topologiques représentent alors de manière simple, et numérique, une structure moléculaire, quelque soit sa complexité.

La majorité des indices topologiques sont rapportés à un terme de voisinage entre les atomes, ou à un terme de distance absolue entre ceux-ci. De ce fait, ils peuvent être calculés sur des matrices de voisinage ou de distance (SABLJIC, 1990).

En 1990, SABLJIC établit une liste exhaustive des différents indices topologiques existants (indice du groupe ZAGREB, indices de connectivité, indice Z de HOSOYA, nombre de WIENER, index de GORDON-SCANTLEBURY, index J de BALABAN, indices d'information, indice centrique).

Parmi ces indices topologiques, seuls les indices de connectivité ont été utilisés pour établir des Q.S.B.R.

4.3.2. Les indices de connectivité

Introduits par RANDIC (1975) puis développés et exploités par KIER et HALL en 1976 et par de nombreux autres auteurs (MURAKAMI et FUKAMI, 1985,...), ces indices topologiques sont ceux qui ont été les plus utilisés dans les études de relations Structure/Activité et Structure/Biodégradabilité, ainsi que dans d'autres domaines de la physique ou de la chimie.

a) Nomenclature

Les indices de connectivité sont tous représentés sous la même forme caractéristique,

$${}^n X_i^v$$

où :

- X correspond à l'indice lui-même,
- un exposant entier (n) situé à gauche du X désigne l'ordre de l'indice,
- un exposant (v) à droite du X caractérise un indice de valence ou non,
- un indice (i) à droite du X (p, c, pc ou ch) spécifie la sous-classe du graphe structural étudié.

b) Caractéristiques des sous-graphes

La longueur des sous-graphes, ainsi que leur forme interviennent dans le calcul des indices de connectivité.

b.1.) Longueur des sous-graphes

L'ordre de l'indice de connectivité définit la longueur des sous-graphes structuraux impliqués dans le calcul de l'indice de connectivité (Tableau III-IV).

ordre de l'indice de connectivité	longueur du graphe
0	1 atome
1	2 atomes
2	3 atomes
⋮	⋮
n	n + 1 atomes

Tableau III-IV : Exemples de longueurs de sous-graphes en fonction de l'ordre des indices de connectivité.

b.2.) Forme des sous-graphes

Elle est définie par la nature de l'indice situé à droite de l'indice de connectivité. Ainsi, "p" correspond à des sous-graphes linéaires ("path"), "c" correspond à des sous-graphes ramifiés ("cluster"), "pc" correspond à des sous-graphes mixtes, linéaires possédant des branchements ("path/cluster") et "ch" correspond à des graphes de forme cyclique ("chain type").

c) Formulation - Calcul

Les informations utilisées dans le calcul des indices de connectivité sont le nombre et le type d'atomes et de liaisons, ainsi que le nombre de valences électroniques des atomes.

Tous les indices de connectivité sont calculés sur la fraction non-hydrogène de la molécule. Chaque atome (différent de l'atome d'hydrogène) est affecté d'une valeur qui est égale soit au nombre d'atome (différents de l'atome d'hydrogène) qui lui sont adjacents (voir exemples en annexe III-I), soit à la valence de cet atome (cas des indices de connectivité de valence).

Les indices de connectivité peuvent alors être calculés selon la formule générale :

$$X_g^{m,v} = \sum_{i=1}^{n_m} \left[\prod_{j=1}^{m+1} (\delta_j) \right]_S^{-0,5} \quad (\text{Eq. 7})$$

avec : m : ordre de l'indice de connectivité,
 n_m : nombre de sous-graphe S (de type g) correspondant au produit des valeurs attribuées aux sommets (ou atomes) δ_j

Ainsi, en appliquant cette formule générale à la détermination des indices de connectivités d'ordre 0, 1, 2,... et n, on peut obtenir les équations suivantes :

$$\text{ordre 0 : } {}^0X = \sum^n (\delta_i)^{-0,5} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\text{ordre 1 : } {}^1X = \sum^n (\delta_i \delta_j)^{-0,5} \quad (\text{Eq. 9})$$

$$\text{ordre 2 : } {}^2X = \sum^n (\delta_i \delta_j \delta_k)^{-0,5} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$\text{ordre n : } {}^nX = \sum^n (\delta_i \delta_j \delta_k \delta_l \dots \delta_n)^{-0,5} \quad (\text{Eq. 11})$$

d) Cas des indices de connectivité de valence

Il est possible de faire la différence entre des indices de connectivité dits "simples" où chaque atome est caractérisé par le nombre de ces voisins (différents de l'atome d'hydrogène) et des indices de connectivité dits "de valence" (X^v) où l'on considère la valence de chaque atome impliqué dans un sous-graphe.

La valence d'un atome peut être calculée selon la formule :

$$\delta^v = Z^v - h \quad (\text{Eq. 12})$$

avec Z^v : valence électronique de l'atome,
 h : nombre d'atome d'hydrogène.

En 1986, BOETHLING définit une formule corrigée pour le calcul de la valence des hétéroatomes des molécules comportant des liaisons doubles ou triple :

$$\delta^v = \frac{Z^v - h}{Z - Z^v - h} \quad (\text{Eq. 13})$$

avec Z : nombre total d'électron de l'hétéroatome,
 Z^v : valence électronique de l'atome,
 h : nombre d'atome d'hydrogène.

La formule générale devient, pour le calcul d'un indice de valence :

$$X_g^m = \sum_{i=1}^{n_m} \left[\prod_{j=1}^{m+1} (\delta_j^v) \right]_S^{-0,5} \quad (\text{Eq. 14})$$

avec : m : ordre de l'indice de connectivité,
 n_m : nombre de sous-graphe S (de type g) correspondant au produit π des valeurs de valence attribuées aux sommets (ou atomes) δ_j^v .

Des indices de connectivité dont l'ordre peut atteindre 6 on pu être observés pour l'élaboration de Q.S.B.R. (NIEMI et coll., 1987). Il faut de plus noter que certains indices de connectivité peuvent être corrélés avec différents autres paramètres physico-chimiques tels que la solubilité ou le Kow (SABLJIC et PROTIC, 1982).

4.3.3. L'autocorrélation

Les difficultés à trouver suffisamment de données structurales en vue d'élaborer des Q.S.B.R. a rendu nécessaire l'utilisation de nouveaux outils de "quantification" de la structure chimique.

Un premier pas a été franchi avec l'utilisation des indices topologiques et plus particulièrement des indices de connectivité.

Dans ces conditions, MOREAU et BROTO (1980) et DEVILLERS et coll. (1986) proposent une nouvelle approche pour décrire la structure chimique. Cette approche est basée sur l'utilisation des méthodes d'autocorrélation, et l'emploi des fonctions d'autocorrélation. (BROTO et DEVILLERS, 1990).

Ces méthodes d'autocorrélation permettent de définir pour chaque molécule un vecteur d'autocorrélation correspondant au graphe structural de la molécule, et mettant en jeu n'importe quelle propriété physique, chimique ou physico-chimique liée aux atomes (volume de Van der Waals, logP,...).

Cette technique, dont un exemple est cité en annexe III-II, présente de nombreux avantages (possibilité de codage d'un grand nombre de molécules, calcul standardisé quel que soit la substance, adaptation possible à une structure tridimensionnelle,...) malgré la nécessité d'un recours à l'ordinateur pour le calcul (BROTO et DEVILLERS, 1990).

V. Méthodes d'analyse utilisées pour l'élaboration des O.S.B.R.

L'établissement de relations Structure/Biodégradabilité, bien que subordonnée principalement à l'existence de données de biodégradabilité et de descripteurs de la structure moléculaire, nécessite la mise en oeuvre d'un système d'analyse de ces données.

Deux types de démarches sont à priori envisageables.

La première consiste en une analyse empirique des résultats de biodégradabilité sans y corréliser de terme descripteurs de la structure chimique. Cette démarche est la plus simple, mais elle n'offre toutefois qu'un intérêt limité dans les études de relations Structure/Biodégradabilité. Elle conduit à deux grands types de relations empiriques (Fig. III-1).

La deuxième démarche peut être considérée comme l'étape centrale des études de relations Structure/Biodégradabilité. Deux approches peuvent toutefois être distinguées, permettant d'obtenir respectivement des relations Structure/Biodégradabilité quantitatives et qualitatives (Fig III-1).

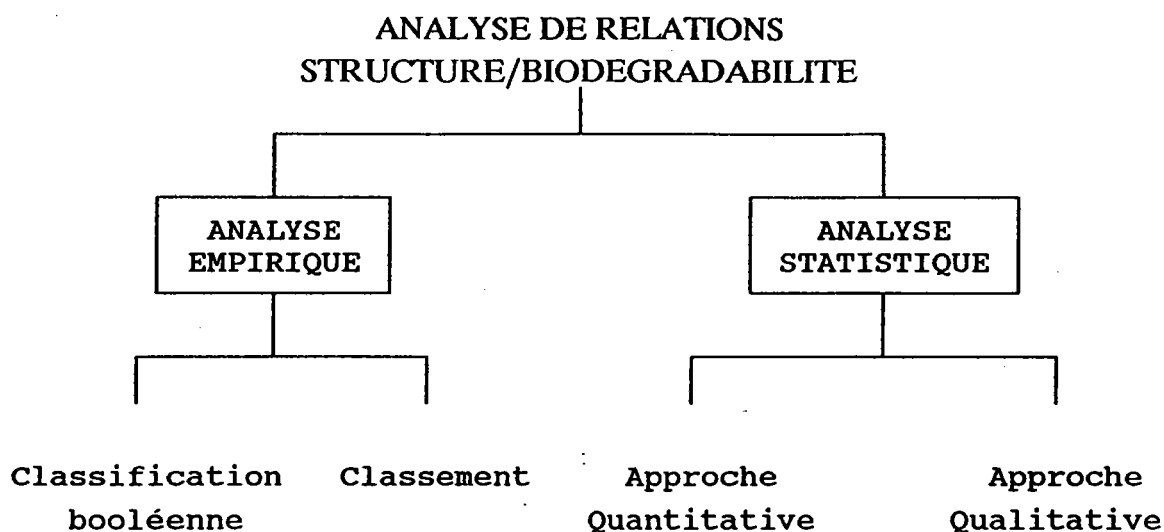


Figure III-1 : Méthodes d'analyse utilisées pour les Q.S.B.R.

5.1. Analyse empirique

Ces analyses, uniquement basées sur une observation logique de la biodégradabilité des substances chimiques permettent d'obtenir 2 types de relations :

- des classifications booléennes,
- des classements.

5.1.1. Les classifications booléennes

Ce type de classification permet uniquement de regrouper en 2 classes - biodégradables et non biodégradable - des substances qui ont vu leur biodégradabilité testée selon une même technique de détermination de la biodégradabilité ; la nature des substances peut toutefois varier.

5.1.2. Les classements

Il s'agit de classer les substances dans un ordre de biodégradabilité croissante (ou décroissante) suite à une simple observation de leur biodégradabilité respective.

De telles relations (relations d'ordre) peuvent mener à des relations plus évoluées que l'on appelle "relations inductives". Dans ces dernières, on établit un parallèle de variation entre la biodégradabilité de substances chimiques, issues de la même famille chimique et testées dans des conditions identiques, et un caractère de la structure chimique.

Ces relations sont plus rigoureuses bien que tout aussi intuitives que les précédentes

De plus, elles peuvent engendrer des études plus précises en mettant en jeu un (ou des) descripteur(s) de la structure chimique, et donc mener à des relations statistiques.

5.2. Analyse statistique

Selon le type des données de biodégradabilité (qualitative ou quantitative) il est possible d'appliquer différents types d'analyses statistiques (DEVILLERS, 1989).

Ainsi, deux types principaux d'analyses statistique peuvent être distinguées à ce niveau : des analyses quantitatives - menant à des relations Structure Biodégradabilité Quantitatives - et des analyses qualitatives - menant à des relations Structure Biodégradabilité Qualitatives.

5.2.1. Analyses quantitatives

Les seules démarches statistiques correspondant à des analyses quantitatives sont des analyses en régression (simple ou multiple, pas à pas,...) qui entraînent l'établissement d'équations mathématiques plus ou moins complexes. Ces équations conduisent alors à un modèle de corrélation quantitative (KARCHER et DEVILLERS, 1990).

Régression

Le concept de base de la régression est d'expliquer une variable y_i (dans le cas qui nous concerne, la biodégradabilité) par une autre variable x_i (dans le cas qui nous concerne, la structure moléculaire représentée par un descripteur) selon l'équation :

$$y_i = \alpha + \beta x_i + \gamma_i \quad (\text{Eq. 15})$$

avec : $i = 1, 2, \dots, n$

α et β coefficients de régression (α l'intersection avec l'axe des ordonnées de la ligne de régression et β la pente de la ligne de régression).

La qualité de cette équation du point de vue statistique est donnée par le résultat d'une analyse de la variance des résultats (théoriques et calculés). Cette analyse conduit à l'obtention d'un F de FISCHER qui permet d'estimer si la relation est significative.

"Outliers"

L'étude de la variance résiduelle permet d'établir l'existence de points que l'on peut considérer comme "outliers".

L'existence "d'outliers" exprime le fait qu'une substance ne se comporte pas comme ses congénères, qu'une erreur de mesure s'est produite, que le descripteur de la structure d'une molécule est entaché d'une erreur (DEVILLERS et LIPNICK, 1990).

5.2.2. Analyses qualitatives

Dans les cas où les données sont non-numériques, où les variables explicatives (paramètres structuraux) sont fortement inter-corrélés, des limitations interviennent dans les analyses statistiques rendant nécessaire l'utilisation d'outils statistiques d'analyse qualitative :

- analyse en composantes principales,
- analyse factorielle des correspondances,

- analyse discriminante,
- régression stochastique,
- méthode des projections.

a) Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) développée dès le début du siècle par PEARSON en 1901, puis HOTELLING en 1933 (NIEMI, 1990) a connu un regain de popularité dans les dernières années. En effet, cette technique dont les objectifs sont (1) de développer de nouvelles variables (non corrélées entre elles) en vue d'une nouvelle analyse, (2) de détecter une liaison entre des variables sur la base d'une réduction des données et (3) de confirmer la structure d'un ensemble de variable et de déterminer le poids de ces variables dans un système explicatif, a été utilisée pour l'établissement de relations Structure/Activité. Cette technique est toutefois moins développées dans le cas des relations Structure/Biodégradabilité.

Il est possible à l'heure actuelle d'envisager une utilisation croissante de l'ACP dans les études de relations Structure/Biodégradabilité.

Un exemple d'analyse en composantes principales est développé en annexe III-III sur la bases de données de biodégradabilité de différentes substances, dans différents tests, obtenues par GERIKE et FISCHER, (1979).

b) Analyse factorielle des correspondances

L'analyse factorielle des correspondances (AFC) est une approche multivariée permettant de représenter les lignes et colonnes d'une matrice de données dans un espace vectoriel de faible dimension, et ainsi de faciliter leur représentation graphique.

Des exemples d'AFC appliquées à l'étude des relations Structure/Activité sont développés par DEVILLERS et KARCHER (1990). Peu d'exemples appliqués aux études des relations Structure/Biodégradabilité peuvent être observés dans la littérature.

c) Autres analyses qualitatives

D'autres méthodes d'analyse qualitative ont été utilisées pour développer des S.A.R., alors qu'elles ne l'ont pas ou peu été pour les S.B.R.

Ces techniques bien connues au niveau statistique commencent à pointer au niveau des études de relations Structure/Activité, avec plus ou moins de bonheur :

- analyse discriminante

Cette technique d'analyse dichotomique multi-étape permet de développer des modèles de relation Structure/Activité (BORGSTEDT et ENSLEIN, 1990).

- méthode de projection des variables

Cette technique développée récemment permet, après classification, détection des "outliers" analyse des données, d'établir à partir d'une matrice de données (centrées et réduites) une régression par une méthode des moindres carrés partielle ou SIMCA, et de représenter ainsi les différents points (GELADI et TOSATO, 1990).

VI. Structure-biodegradability relationships

Le document présenté dans les pages suivantes (p 117 à 143) a été publié dans l'ouvrage :

"Practical Applications of Quantitative Structure-Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology"
W. KARCHER and J. DEVILLERS (Eds.), 1990.

STRUCTURE-BIODEGRADABILITY RELATIONSHIPS

P. KUENEMANN¹, P. VASSEUR¹, and J. DEVILLERS²

¹Centre des Sciences de l'Environnement
57000 METZ - France.

²Centre de Traitement de l'Information Scientifique
01500 AMBERIEU en BUGEY - France.

Biodegradability is one of the most important parameters governing the persistence of pollutants in the environment and consequently influencing their behaviour and their toxicity in aquatic and terrestrial ecosystems.

Biodegradability tests which have to be conducted for the assessment of substances notified to regulatory authorities, are thus of major importance. Yet, such tests are not easy to carry out and their interpretation may be problematic. So, assessing the fate of chemicals in the environment from the simple study of their structure would be interesting. This review is a survey of studies dealing with the relationships between the structure and the biodegradation of organic chemicals.

In the first part, data relating to Structure-Biodegradability Relationships, will be considered. The second part will focus on Quantitative Structure-Biodegradability Relationships (QSBRs) and on the most relevant statistical methods and descriptors available in this context. The discussion deals with the strengths and weaknesses of QSBR studies and with recommended approaches and areas of future investigations. Experimental or environmental conditions of the selected studies are not mentioned here to keep the text concise ; though parameters such as temperature, pH, inoculum, nutrients, aerobic or anaerobic conditions, and concentration of the tested chemicals must be considered in interpreting the results, as they play a leading part in the process of biodegradation.

1. Structure-Biodegradability Relationships

Two sets of biodegradability studies can be distinguished :

- studies leading to a boolean classification : substances are declared biodegradable and non biodegradable without establishing any scale of degradability,
- studies allowing a ranking of substances in their order of biodegradability.

343

W. Karcher and J. Devillers (eds.), *Practical Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology*, 343-370.
© 1990 ECSC, EEC, EAEC, Brussels and Luxembourg.

1.1. BOOLEAN CLASSIFICATION

The most recalcitrant molecules or polymers were first listed by Alexander (1) : polychlorobiphenyls, synthetic polymers (acetate rayon, carboxymethyl cellulose, cellulose acetate, nylon, poly(methyl methacrylate), polystyrene, polyurethane, silicon resins), pesticides (mostly chlorinated hydrocarbon insecticides), surfactants belonging to alkylbenzene sulfonates with highly branched alkyl moieties, industrial organic pollutants (chloroanilines, chloronitrobenzenes, dioxane,...).

Another interesting study was done by Kawasaki (45) classifying the degradation potency of various chemicals tested with the same MITI procedure (aliphatic, alicyclic, aromatic, polycyclic, heterocyclic compounds). Some chemical structures were proven not to be biodegradable :

- quaternary or tertiary carbon bondings, (table 1)
- halogens on aliphatic, aromatic or heterocyclic compounds,
- tertiary amines (table 2),
- alicyclic structures (except cyclopentene and cyclohexanone),
- nitro, amino, and sulfonic substituents on aromatic derivatives (phenol, benzoic acid, aniline, toluene).

The capacity to biodegrade depends not only on the chemical structure but also on the experimental or environmental conditions. Thus, Vaishnav and Babeu (73) studying the influence of native microorganisms from different aquatic origins showed that naphthalene and N-methylamine were resistant in every condition tested, since hexadecane and 4-*tert*-butylbenzoic acid, that were persistent with microorganisms from ground waters, were in contrast biodegraded by bacteria from surface waters. Gerike and Fischer (30) comparing the performances of standard methods of biodegradability assessment on 40 various chemicals, found discrepancies among test responses for some not easily biodegradable substances (table 3). They stressed that resistance may also be due to toxic or inhibitory properties of the test compound.

1.2. RANKING OF DEGRADATION POTENTIAL

The ranking of substances in their relative order of biodegradability is more valuable than boolean classification to establish Structure-Biodegradability Relationships. Such studies imply an evaluation in identical experimental conditions ; they generally concern substances derived from the same chemical structure and bearing different substituents.

Yet, some studies deal with compounds belonging to various chemical categories ; substances can be ranked in order of decreasing biodegradation. An evaluation of the scale of biodegradation of 78 priority organic compounds was done by Urano and Kato (71) ; according to their structure, substances could be classified as follows:

STRUCTURE	DEGRADABLE		DEGRADATION-RESISTANT	
$n \cdot C_n H_m (Y)$ $n \cdot R \cdot O \cdot nR'$ $n \cdot R \cdot CO \cdot O \cdot nR'$	$n \cdot R \cdot C \cdot n \cdot R'$ Y	R_2 $R_1 \cdot C \cdot R_3$ Y	R_2 $R_1 \cdot C \cdot R_3$ R_4	
<p>TESTED COMPOUNDS</p> <p>pentadecane $H_3C \cdot (CH_2)_{12} \cdot OH$ $H_3C \cdot CH=CH \cdot CH_2 \cdot CN$</p> <p>$H_{17}C_8 \cdot O \cdot C_8H_{17}$ O \parallel $H_{25}C_{12} \cdot C \cdot O \cdot C_2H_5$</p> <p>$H_3C \cdot CH=CH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot O \cdot C_2H_5$ $H_3C \cdot (CH_2)_{16} \cdot CO \cdot O \cdot C_2H_5$</p>	H $n \cdot R \cdot C \cdot n \cdot R'$ Y H $H_3C \cdot C \cdot CH_2OH$ CH_3 H CH_3 $H_3C \cdot C \cdot CH_2 \cdot C \cdot CH_3$ OH OH H $H_3C \cdot (CH_2)_3 \cdot C \cdot CH_2OH$ C_2H_5 H $H_3C \cdot O \cdot CH_2 \cdot C \cdot O \cdot CO \cdot CH_3$ CH_3 H $H_9C_4 \cdot O \cdot CH_2 \cdot C \cdot O \cdot CO \cdot CH_3$ CH_3	R_2 $R_1 \cdot C \cdot R_3$ Y CH_3 $H_3C \cdot C \cdot OH$ CH_3 CH_3 $HOH_4C_2 \cdot C \cdot C_2H_4OH$ OH CH_3 $H_3C \cdot C \cdot CH \cdot CH_2OH$ $HO \cdot CH_2OH$ CH_3 $H_3C \cdot C \cdot CH_2 \cdot CH_2OH$ OCH_3	$H_3C \cdot CH_3$ H CH_3 $H_3C \cdot C \cdot C \cdot CH_2 \cdot C \cdot CH_2 \cdot C \cdot H$ CH_3 CH_3 $H_3C \cdot CH_3$ CH_3 H CH_3 $H_3C \cdot (C \cdot CH_2)_2 \cdot C \cdot CH_2 \cdot C \cdot CH_3$ CH_3 CH_3 CH_2OH CH_2OH $HOH_2C \cdot C \cdot CH_2OH$ CH_2OH CH_3 $HOH_2C \cdot C \cdot CH_2OH$ CH_3	

Table 1 : Degradability of aliphatic compounds (45).

STRUCTURE	DEGRADABLE		DEGRADATION-RESISTANT
R-NH ₂	$\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{R} \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{R} \\ \diagdown \quad / \\ \text{R} \quad \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R} \end{array}$
TESTED COMPOUNDS	$\begin{array}{l} \text{HOH}_5\text{C}_2\text{-NH}_2 \\ \text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2 \\ \text{HCO-NH}_2 \\ \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{H}_3\text{C} \\ \text{(HOH}_5\text{C}_2\text{)}_2\text{-NH} \\ \text{(H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_2\text{-NH} \\ \text{C}_6\text{H}_{11} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C}_6\text{H}_{11} \\ \text{HN}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2 \\ \text{H}_2\text{N-H}_4\text{C}_2 \\ \text{HOH}_4\text{C}_2 \end{array}$	$\begin{array}{l} [\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{-}]_3\text{-N} \\ (\text{HOH}_4\text{C}_2)_3\text{-N} \\ (\text{CH}_3\text{-CHCH}_2\text{-})_3\text{-N} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{OH} \\ (\text{HOOCH}_2\text{-})_2\text{-N-C}_2\text{H}_4\text{-N-(-CH}_2\text{COOH)}_2 \\ \text{N-(-CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_3 \\ (\text{H}_3\text{C-)}_2\text{-N-C}_{12}\text{H}_{25}\text{-----degradable} \end{array}$
		$\text{NH} \text{-----Degradation-resistant}$	$\text{NH} \text{-----Degradation-resistant}$

Table 2 : Alkyl- and alkenylamines, and amides biodegradation (45).

Non biodegradable in every test	Non Biodegradable in one or two tests *	discrepancies among other test results	Inhibitory substances
Cyclopentanetetra carboxylic acid	1-Methylpyrrolidone	N-Methylaniline	2-Nitrophenol
Polyvinyl alcohol (PVA)	Benzylamine	Pyridine	Hydroquinone
Carboxymethyl cellulose (CMC)	3-Nitrophenol	2-Chlorobenzoic acid	T B S ^a
Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA)	Diethylene glycol	3-Aminophenol	L A S ^b
Ethylene oxide-propylene oxide block polymer	Terephthalic acid	Pentaerythritol	B D M D A C ^c
1,3-Benzenedisulfonic acid	2-Nitrobenzoic acid	Tertiary butanol	C T A B ^d
3-Aminobenzene-sulfonic acid	Diethanolamine	3-Chlorobenzoic acid	
	4-Nitrophenol	2-Chloroaniline	
	Triethanolamine	Sulfanilic acid	
		3-Aminobenzoic acid	

* MITI or closed bottle test.

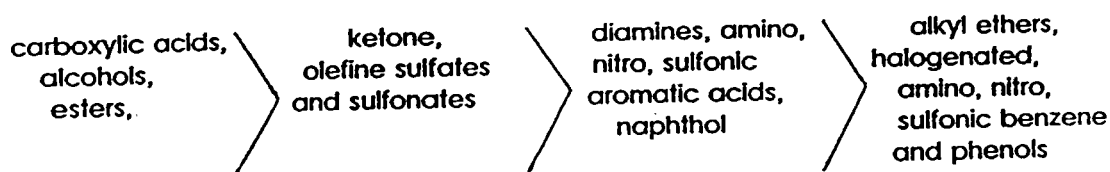
a) TBS tetrapropylenebenzenesulfonate.

b) LAS linear alkylbenzenesulfonate.

c) BDMDAC benzyldimethyldodecylammonium chloride

d) CTAB cetyltrimethylammonium bromide.

Table 3 : comparison between biodegradability results for various chemicals tested with OECD Screening test, AFNOR T 90-302 test, Sturm test, MITI test, Zahn-Wellens test, Closed Bottle Test, and OECD confirmatory test (30).



Volkman *et al* (75), Oudot (53), and Bayona *et al* (4) studying the biodegradation of oil components showed that alkanes, cyclic alkanes, and monoaromatics were the most biodegradable, while pentaaromatics and asphaltene resins were the most resistant.(table 4)

Order of biodegradability	Author
Saturated > unsaturated aliphatic paraffins > Aromatic hydrocarbons straight chains > branched chains	Leuenberger (48)
alkanes > aromatics	Solanas et al (67)
n and iso alkanes > cyclic alkanes, sulphur aromatics > di, tricyclic aromatics > tetraaromatics, steranes, triperpanes, naphthenoaromatics > pentaaromatics, asphalthenes, resins	Oudot (53)
alkanes > alkyl cyclohexanes, alkyl benzenes > acyclic isoprenoid alkanes > methylnaphthalene > C14-C16 bicyclic alkanes > steranes > diasteranes	Volkman et al (75)
saturated > monocyclic > polycyclic > S-PAHs	Bayona et al (4)

Table 4 : order of biodegradability of different classes of chemicals

The following relationships could be established for some pesticides :

. Methoxychlor > Lindane > Heptachlor, suggesting that under anaerobic conditions, the *Clostridium* sp. involved possess an enzyme system which can degrade a variety of chlorinated hydrocarbons (64, 65).

. Carbaryl > Methylparathion > Pentachlorophenol , with saltmarsh microorganisms (10).

Biodegradation of some aliphatic and polyaromatic hydrocarbons expressed in % $^{14}\text{CO}_2$, gave the following order :

Naphthalene > Hexadecane > Pristane > Benzanthracene (25)

Roubal and Atlas cited in (25) noted that supplementing the mineral medium with nitrogen and phosphorus resulted in a change in this order : Hexadecane being then more rapidly degraded than naphthalene.

The approach consisting of studying derivatives of a similar basic structure is more fruitful ; the length of carbon chains, the presence of alcene bonds, diazo groups, or polycyclic structures, the nature, the position, and the number of substituents can be correlated with the rate of the process of biodegradation : substitutions of aromatic rings were often used for this purpose.

The influence of the following will be considered :

- size of a molecule (number of carbons, number of rings),
- saturated or unsaturated,
- nature and degree of substitution.

1.2.1. *Influence of carbon number in aliphatic chains.* This parameter is directly related to the size and the molecular weight. It expresses the length of linear carbon chains whether they are saturated or unsaturated, straight or branched. Two situations can be observed :

- "An increased number of carbons favours biodegradation", in the case of imides and amides (23), C₃-C₁₀ aliphatic ketones and C₁-C₈ alcohols (74), C₄-C₈ aliphatic alcohols (77), C₁-C₈ 2,4-D esters (55), and diamines, the latter required 3 or more carbons between the 2 nitrogen groups to be biodegradable (62).

- "An increased number of carbons reduces biodegradation", in the case of linear alkanes (3, 67), fatty acids (29), adipic acid esters (63), aliphatic acids and alcohols (20, 34), C₉-C₁₅ aliphatic alcohols (73), C₁₁-C₁₄ alkyl benzene sulfonates (31), aromatic hydrocarbons substituted with alkyl chains (75), and phthalates in which the long aliphatic chains reduce the rate of hydrolysis of the ester bond (52, 69, 72).

1.2.2. *Influence of ring number in cyclic compounds.* Many studies, specially those of Fedorak and Westlake (25), Oudot (53), Volkman *et al* (75), Bayona *et al* (4) demonstrate that:

- "An increased number of rings impedes biodegradation" Nevertheless, the following order was obtained by Oudot (53) studying the microbial degradation of petroleum components : n and isoalkanes > 6, 1, 5 and 2 ring alkanes, sulphur aromatics, mono aromatics > 3 and 4 ring alkanes, 2 and 3 ring aromatics > tetraaromatics, steranes, triterpanes, naphthenoaromatics > pentaaromatics, asphaltthenes, and resins.

As for sulphur heterocycles, they are considered more resistant than their non-sulphur equivalents (4, 53).

1.2.3. *Influence of double bond (-C = C-).* Contradictory results were found ; saturated compounds were reported to degrade more readily than unsaturated (48) ; but Una and Garcia (70) found that double bond on the acid moiety facilitates the biodegradation of non ionic surfactants.

1.2.4. *Influence of diazo groups (-N = N-).* According to the results of Brown and Laboureur (12), Brown and Hamburger (11) showing that polyazo dyestuffs are less likely to be reliably degraded than mono or diazo classes :

- "An increased azo bond reduces biodegradation".

1.2.5. *Influence of the nature of a monosubstituent.* Whether an aromatic or aliphatic structure, it appears that :

- "An hydroxyl or carboxylic group enhances biodegradability".

as shown for aliphatic, aromatic non substituted hydrocarbons (59, 60, 71) alicyclic compounds (76), or pyridine derivatives (66). The carboxylation of phenol and hydroxylation of benzoic acid still increase their degradation (59, 60).

In contrast :

* "Amino, and above all halogens, nitro, and sulfonic groups generally decrease susceptibility to biodegradation"

The influence of these substituents on benzene, phenol, benzoic acid, and toluene was studied in depth by Pitter (59,60), Paris *et al* (54), Urano and Kato (71), Young and Rivera (78) (table 5).

The recalcitrant effects of sulfonic derivatives were shown by Leidner *et al* (47), Urano and Kato (71), Brown and Hamburger (11), and other authors.

As for alkyl substituents, their unfavourable effects are in relation to the length and the branching character of the carbon chain attached on an aliphatic or aromatic compound as outlined above by Volkman *et al* (75), Johnson *et al* (42), Sugatt *et al* (69), and Urushigawa and Yonezawa (72).

Branching prevents as well the microbial degradation of cycloparaffins (6).

Monomethylation of aliphatic acids and alcohols does not affect appreciably their degradation (20, 34).

The unfavourable effects of halogens were also observed on aliphatic compounds, specially on acids and alcohols by Kaufman (44), Dias and Alexander (20) and on biphenyl compounds by Furukawa *et al* (27) and Furukawa (28).

It is not clear whether chlorinated alkanes are more easily biodegraded than brominated and iodinated ones. Differences may be attributed to experimental conditions and to the species involved. Jafvert and Wolfe (40) using native sediment microorganisms under anaerobic conditions, found the following order of biodegradation for dihalogenated ethanes, $I > Br > Cl$.

In contrast, chlorinated alkanes were more rapidly degraded than the brominated ones by *Acinetobacter sp* isolated from activated sludge, as shown by Janssen *et al* (41).

Nocardia degraded the mono halogenated propionates in the order $I > Br > Cl$. On the other hand, the *Pseudomonad* degraded 2-iodopropionate less rapidly than either the chloro and bromo derivatives ; but, neither organism could decompose these fluorinated compounds (44).

1.2.6. Influence of the position of a monosubstituent. It also affects the facility of decomposition. The ortho position of OH, COOH groups on phenols and benzoic acids increases the rate of their biodegradation, as ortho hydroxylation is one of the steps leading to ring opening.

Phenol substituted with chlorine decomposes in the order *ortho* > *meta* > *para* according to Banerjee *et al* (2).

Anilines substituted with COOH, OH or Cl groups in ortho biodegrade more rapidly than the meta and para corresponding derivatives (59). On the other hand, ortho position is unfavourable for methyl and methoxyanilines (46).

BASIC STRUCTURE	POSITION	SUBSTITUENT									REF.
		+ Biodegradability									-
BENZENE		COOH	CHO	CH ₂ OH	COH ₃	OH	CH ₃	NH ₂	NO		(71)
		CHO	COOH		NH ₂	NO ₂	NHCOCH ₃				(60)
PHENOL	<i>p</i>	H	CH ₃	Cl	Br	COCH ₃	OCH ₃	NO ₂	CN		(54)
	<i>o</i>	COOH	H	OH	CH ₃	Cl	NH ₂	NO ₂			(60)
	<i>m</i>		H	OH	CH ₃	Cl	NO ₂	NH ₂			
	<i>p</i>	COOH	H	OH	CH ₃	Cl	NO ₂	NH ₂			
			2(OH) _m	H	CH ₃ _p	OH _p					
	<i>o,m</i>	COOH			NH ₂		NO ₂				(71)
	<i>p</i>	COOH	SO ₃ H		NH ₂		NO ₂				
BENZOIC ACID	<i>o</i>	OH	H	COOH			NH ₂	NO ₂			(60)
	<i>m</i>		H	COOH			NO ₂	NH ₂			
	<i>p</i>	OH	H				NO ₂	NH ₂			
	<i>o</i>	OH			NH ₂		NO ₂				(71)
<i>m</i>	OH			NH ₂ = NO ₂							
<i>p</i>	OH				NO ₂		NH ₂				
TOLUENE	<i>o</i>	OH			NO ₂		NH ₂				(60)
	<i>m</i>	OH			NH ₂		NO ₂				
	<i>p</i>	NO ₂	NH ₂		OH		SO ₃ Na				
ANILINE	<i>o</i>	COOH	OH	H			CH ₃	Cl			(60)
	<i>m</i>	CH ₃	H	OH			COOH	Cl			
	<i>p</i>	CH ₃	H	OH			COOH	Cl			
	<i>o,m</i>		COOH		OH		NO ₂				(71)
	<i>p</i>		COOH		OH		NO ₂	SO ₃ H			
CATECHOL		CH ₃	H	Cl							(22)
PYRIDINE		COOH = OH	H	CH ₃	Cl	NH ₂					(66)
PROPIZAMIDES		CN	NO ₂	CH ₃	OCH ₃	Br	Cl	F	H		(13)

Table 5 : Influence of the nature and the position of a substituent on the order of biodegradability of aromatic derivative compounds.

In the case of aliphatic compounds, a substituent near the end of a chain bearing the carboxyl or hydroxyl group where the microbial metabolism is presumably initiated, makes the molecule less susceptible to attack as shown with halogenated aliphatic acids and alcohols by Dias and Alexander (20), and phenylcarboxylic acids by Leidner *et al* (47) and Bayona *et al* (5).

1.2.7. *Influence of the number of substituents.* The following relationship was confirmed in many studies (table 6) :

• "An increased substituent number decreases the susceptibility to biodegrade".

It applies for :

- *methyl substituents* on naphthalenes (75), aliphatic acid, and alcohols (20, 44) : dimethylation on different carbons prevents their degradation, since monomethyl does not.

- *alkyl substituents* on aromatic hydrocarbons (75),
- *sulfonic groups* on substituted benzenes (29) and azo dyes (11)

- *halogens* (chlorine, bromide) on aliphatic, aromatic, and polycyclic compounds (20, 28, 44).

In fact, *the position of the polysubstituents* interferes greatly with the biodegradability of aliphatic compounds as well as aromatic hydrocarbons.

Disubstitution on the same carbon, leading to a quaternary carbon, results in the recalcitrance of a linear chain.

Dimethylation of naphthalenes is more or less prejudicial depending on the carbon substituted ; an orthoposition would be harmful according to Volkman *et al* (75) : he found that 1,2-DMN and 2,3-DMN were less rapidly degraded than 1,3-DMN, 1,4-DMN, and 1,5-DMN. On the other hand, Solanas *et al* (67) found that 1,2-DMN was among the most easily degraded naphthalenes, that he had studied, while 1,4-DMN was not.

Dihydroxylated pyridine was shown by Sims and Sommers (66) to be less easily degraded with OH groups in ortho position.

Adjacent chlorines impede the microbial decomposition of aromatic compounds : 3,4-dichlorocatechol is poorly degraded compared to 3,5-dichlorocatechol as shown by Dorn and Knackmuss (22) ; in general, compounds with chlorines in meta position decomposed more readily than others (44).

In fact, this seems dependent on species : Steiert *et al* (68) noted that *Flavobacterium* completely dechlorinated and mineralized 2,6-dichlorophenol, while other dichlorophenols were not rapidly degraded ; in contrast, 2,6-dichlorophenol was not decomposed by *Pseudomonas cepacia* AC1100, but 2,3-, 2,4-, and 2,5-dichlorophenol were. These differences may be related to the specific toxicity of the compounds to the microorganisms involved in the degradation process.

1.2.8. *Influence of structural complexity.* The above parameters relate to the size, the molecular weight, and the structural complexity of a substance.

An increase in these parameters is generally associated with a decrease in the capacity to biodegrade (table 6) ; as shown by Herbes (36) on polycyclic aromatic hydrocarbons, Colberg and Young (14) on oligolignols under anaerobic conditions, and Volkman *et al* (75) on cyclic and aromatic compounds. As summarized by Oudot (53) :

* "A higher molecular weight results in a lower biodegradability".

order of biodegradability	Substances	Authors
threo form = erythro form	Veratrylglycerol β -2,4-dichlorophenyl ether (model for lignin biodegradation study)	Zitzelsberger <i>et al</i> (79)
Copolymers > homopolymers ester-containing polymers > polymers with amide, urea and urethane groups	Polymers	Huang <i>et al</i> (39)
monosubstituent > disubstituent $C_w > C_\delta > C_\beta > C_\alpha$ tertiary > quaternary carbon	Aliphatic Acids and alcohols	Dias and Alexander (20)
Straight > branched chains Secondary amine > tertiary amine $N-C-C-C-N > N-C-C-N$ Recalcitrant except amines with OH, COOH group tertiary N = heteroatom	Alicyclic Amines Diamines tertiary amines	Rothkopf and Bartha (62)

Table 6 : Observed relationships between biodegradability and structure for different hydrocarbons.

This explains the complex structure of degradation residues of petroleum components (53, 75) and the recalcitrance of polymers. In this case, the goal is the synthesis of more degradable polymeric structures : according to Huang *et al* (39), an increase in ester group or hydrolyzable linkages would grant higher conformational flexibility to the polymer, which would therefore be more easily degradable.

It would also be interesting to be able to foresee the bonding sites on a molecule susceptible to enzymatic attack. Mass spectroscopy (MS) would provide valuable information. De Jong and Testa (43) considered MS was the most suitable means of predicting the biodegradation behaviour of alkylbenzene sulfonates.

These data demonstrate the closed correlations existing between structure and biodegradation. They argue for a study of the quantitative relationships between these parameters.

2. Modelling and statistical analyses of biodegradability data.

The process of applying QSAR and SAR techniques to biodegradation studies is dubbed QSBR (Quantitative Structure-Biodegradability Relationships) and SBR (Qualitative Structure-Biodegradability Relationships) respectively.

2.1. QUANTITATIVE STRUCTURE-BIODEGRADABILITY RELATIONSHIPS (QSBRs).

There are based on simple and multiple regression analyses ; the models obtained are presented in table 7. The biodegradation parameter used as dependent variable can be the following : biodegradation rate constant (Kb) (72), second-order rate constant (RC) (7, 69), percentage of decomposition after 12 days (% D) (44), percentage of theoretical oxygen demand (% ThOD) (20, 34, 74), rate of biodegradation (v in $\text{mg} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) (59), five-day biological oxygen demand (BOD) (15, 16, 17), biodegradation half-time (T_{50}) (2, 58, 59), AERUD (aerobic ultimate biodegradation) which is a semi quantitative estimation of biodegradation given by experts (8),.... These activities have been successfully correlated with different molecular descriptors such as : molecular weight (MW) (7) ; pKa (2, 58, 59) ; Hammett constants (58, 59) ; K_{OH^-} the rate constant for alkaline hydrolysis ; log P (7, 74) ; retention times (RT) (72) ; hydrophobicity constant π (13) ; van der Waals radius (56) ; Sterimol length parameter (L) (15) ; accessible molecular surface (ASA) (15) ; molecular connectivity indexes (7) ; atomic charge (15, 16, 17) ; infrared peak frequencies and intensities (49)...

The biological interpretation of most of the obtained equations is principally based on the sign of slope of the regression curve.

Most of univariate structure biodegradability relationships, using only one descriptor of the molecular structure concern relationships with hydrophobicity.

Thus, if we consider the following equation obtained by Boethling (7) for 12 phthalate esters :

$$\text{RC} = - 24.308 \log P + 394.840 \quad n = 12 \quad r = -0.931 \quad s = 37.477 \quad F = 65.1$$

we can stress that an increase in the log P value is correlated with the decrease of the primary biodegradability (RC) of the phthalate esters.

On the same family of compounds, by analogy with the classical parabolic model of Hansch as cited in (19), Urushigawa and Yonezawa (72) found that the rate of biodegradation could be estimated by the following parabolic equation :

$$\log K = - 2.09 (\log RT)^2 + 1.19 \log RT - 1.15 \quad r^2 = 0.986$$

These authors suggested that the rate determining step of the degradation of the phthalate esters by activated sludge was the penetration through the cell membrane system.

Vaishnav *et al* (74) have also proposed a parabolic model as an expression of a quantitative relationship between log % ThOD and log P for acyclic ketones. Their equation was the following :

$$\log (\% \text{ ThOD}) = - 0.106 (\log P)^2 + 0.241 \log P + 1.682$$

$$n = 10 \quad r = 0.99989 \quad r^2 = 0.99979 \quad s = 0.03 \quad F = 11.068$$

However, to properly model the biodegradation of these compounds they used the following bilinear equation :

$$\log (\% \text{ ThOD}) = 0.698 \log P - 0.867 \log (0.617 P + 1) + 1.870$$

$$n = 10 \quad r = 0.99996 \quad r^2 = 0.99992 \quad s = 0.02 \quad F = 18.583$$

Indeed, from a statistical standpoint, the differences between the two above equations are marginal, but according to Vaishnav *et al* (74) the bilinear model appeared to give a somewhat closer fit to the experimental data.

Urushigawa and Yonezawa (72), Vaishnav *et al* (74), Banerjee *et al* (2) observed also a negative relationship between hydrophobicity and biodegradability.

Note that experimental hydrophobic constants do not integrate branching of aliphatic structure, cycling of chemicals, and do not allow for closed correlations with biodegradability in the case of non-linear structures, as for instance substituted phenols (54) or substituted aromatic compounds (58, 59).

Paris *et al* (55) found on the contrary a positive relationship between the hydrophobicity and hydrolysis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) esters with C1-C8 aliphatic substituting chain :

$$\log K_b = (0.799 \pm 0.098) \log K_{ow} - (11.463 \pm 0.204) \quad r^2 = 0.945 \quad (n=6)$$

For chlorinated 2,4-D esters, the relation does not fit so well :

$$\log k_b = (0.135 \pm 0.082) \log K_{ow} - (10.865 \pm 0.313) \quad r^2 = 0.473 \quad (n=5).$$

The same observation was done by Yonezawa and Urushigawa (77) for aliphatic alcohols ; but as the chemical concentrations introduced in the test medium were taken into account instead of dissolved concentrations, these results have to be interpreted with care.

Moore *et al* (49) from the results of Banerjee *et al* (2) for chlorinated phenols, and Pitter (58, 59) from their studies on phenols and anilines, observed a positive correlation between pKa and biodegradability.

Note that 2,6-dichlorophenol for chlorinated phenols, dimethylphenols for phenols, and 2,5-dimethyl- and 2-chloroanilines were considered as outliers by Pitter (59) and withdrawn from the correlation analysis.

Correlations were obtained between Hammett σ (33, 35, 51) and biodegradability for substituted aromatic compounds that degrade more rapidly when the corresponding Hammett constant is higher (58, 59). This was also observed with catechols (22) and substituted propizamides (13).

The biodegradability of a lot of chemicals (alcohols, acids, 2,4-D esters, phthalates,...) could be correlated with connectivity indexes (32).

A synthesis of results from Dias and Alexander (20), Hammond and Alexander (34) for alcohols and acids, Paris *et al* (55) for 2,4-D esters and Sugatt *et al* (69) for phthalates has been made by Boethling (7).

It appears that connectivity indexes which express branching (${}^2\text{Chi}$, ${}^3\text{Chi}_c$, ${}^4\text{Chi}_c$ and ${}^4\text{Chi}_{pc}$) provide a negative correlation with biodegradation, as do more complex indexes.

The only exception concerns works on 2,4-D esters (55) where an increase in connectivity indexes (${}^2\text{Chi}^v$ and ${}^3\text{Chi}_p$) leads to an increase in hydrolysis of the ester bond.

A number of positive correlations were obtained between the difference in the modulus of atomic charge of a selected bond of a substance (DMAC X-Y) and the biodegradability (expressed in five-days BOD) for different substances. The linear regressions obtained by Dearden and Nicholson (15, 16, 17) are those presenting the best correlation coefficients. An increase in the difference in the modulus of atomic charge of a selected bond X-Y in a molecule was correlated with an increase in the BOD₅, as shown by the following equation :

$$\text{BOD} = 1.015 \cdot 10^3 \text{ DMAC}_{X-Y} + 1.523 \quad r = 0.991 \quad s = 3.822$$

obtained with 197 substances (alcohols, amines, acids, ketones,...) (17).

Other physical-chemical parameters, Sterimol length parameter (L), molecular surface (ASA), and molecular weight (MW) provide correlations with the biodegradability of different substances. Sterimol length parameter and molecular surface correlate positively for alkanes (15), while molecular weight correlates negatively for phthalates (7).

Paris *et al* (56) found that van der Waals radii were the best descriptors for the biodegradation of substituted phenols. In contrast, constants indicative of hydrophobic effects did not correlate for these compounds.

Two physical-chemical parameters, Hammett σ and hydrophobicity constant π , were able to modelize the biodegradation of propizamides and their analogues in soils (13).

The use of spectroscopy (GC-MS, GC/FT-IR) may be extended to QSBRs (49). Correlations have been found for substances containing substituent groups that affect both biodegradation rate constants and IR peak frequencies or intensities. Correlations were observed between pesticide amide linkage hydrolysis and IR amide I and II peak. A negative correlation has been found between biodegradation of di-n-alkyl-phthalate esters and IR C-H peak intensity. In this last case, an increase in the length and the degree of branching of the alkyl chain

increases IR $C-H$ peak intensity and is associated with a decrease in biodegradation rate constants (49).

Other studies added Fourier Transform-IR (FT-IR) to the QSBR approach by means of multivariate regression analysis.

Substances	Equations	r (r ²)	n	F : s	Ref.
phthalates	$\log K_b = -2.09 (\log Rt)^2 + 1.19 \log Rt - 1.15$	(0.986)	5	ND	72
phthalates	$RC^* = -24.31 \log P + 394.84$	-0.931	12	65.1 ; 37.477	7
acyclic ketones	$\log(\%ThOD) = -0.106 (\log P)^2 + 0.241 \log P + 1.682$	0.99989	10	11.068 ; 0.03	74
	$\log(\%ThOD) = 0.698 \log P - 0.867 \log(0.617P + 1) + 1.870$	0.99996	10	18.583 ; 0.02	74
C8-C12 alcohols	$\log(\%ThOD) = -0.192 \log P + 2.338$	-0.997	5	579 ; 0.0129	74
chloro-phenols	$\log(T_{50}) = -0.68 pKa + 7.0$	(0.977)	5	ND	49 (2)
phenols	$\log(T_{50}) = -0.21 pKa + 2.0$	(0.886)	20	ND	49(58 .59)
anilines	$\log(T_{50}) = -0.48 pKa + 2.67$	(0.887)	17	ND	49 (59)
substituted phenol	$\log v = -0.43 \sigma_o + 1.70$	0.980	5	ND	59
<i>m</i>	$\log v = -0.62 \sigma_m + 1.72$	0.940	4		
<i>p</i>	$\log v = -0.32 \sigma_p + 1.65$	0.990	4		
Mean	$\log v = -0.32 \Sigma\sigma + 1.43$	0.950	7		
substituted aniline	$\log v = -0.30 \sigma_o + 1.24$	0.975	4	ND	59
<i>m</i>	$\log v = -1.53 \sigma_m + 1.31$	0.970	3		
<i>p</i>	$\log v = -0.78 \sigma_p + 1.04$	0.942	5		
alcohols	$\%ThOD = -34.451 {}^2Chi + 122.765$	-0.871	14	37.6 ; 15.586	7
branched acids	$\%ThOD = -194.107 {}^4Chi_c + 64.651$	-0.946	10	67.9 ; 10.03	(20)

Table 7 : Quantitative Structure-Biodegradability Relationships observed in the literature.

acids	$\%ThOD = -286.999 \text{ }^4Chi_c + 86.069$	-0.935	10	55.1 ; 16.46	7 (20)
	$\%ThOD = -67.158 \text{ }^3Chi^v_c + 96.557$	-0.912	20	88.7 ; 15.433	7(20 ,34)
acids + alcohols	$\%ThOD = -148.734 \text{ }^4Chi_c + 56.678$	-0.850	24	57.2 ; 16.148	7 (20)
2,4-D esters	$\log RC = 0.816 \text{ }^2Chi^v - 11.928$	0.977	6	82.2 ; 0.185	7 (55)
	$\log RC = 1.198 \text{ }^3Chi_p - 14.378$	0.974	6	73.0 ; 0.195	
carbamates	$\log \%D = -1.565 \text{ }^4Chi_{pc} + 3.768$	-0.985	7	167.2 ; 0.112	7 (44)
	$\log \%D = -2.145 \text{ }^4Chi^v_{pc} + 2.765$	-0.981	7	125.3 ; 0.129	
ethers	$\log \%ThOD = -0.517 \text{ }^2Chi^v + 2.597$	-0.987	6	149.3 ; 0.076	7 (26)
	$\log \%ThOD = -0.899 \text{ }^4Chi_{pc} + 1.816$	-0.977	6	84.8 ; 0.100	
phthalates	$RC^* = -37.156 \text{ }^2Chi + 547.519$	-0.969	12	151.9 ; 25.523	7 (69)
	$RC^* = -37.312 \text{ }^2Chi^v + 436.429$	-0.968	12	147.8 ; 25.857	
aromatic and aliph.amines	$BOD = 1.004 \times 10^3 \text{ } DMAC_{C-N} - 0.106$	0.999	15	1.043**	15
phenols	$BOD = 0.998 \times 10^3 \text{ } DMAC_{C-O} + 2.108$	(0.983)	11	4.044**	16
alcohols	$BOD = 1.023 \times 10^3 \text{ } DMAC_{C-O} + 1.504$	(0.990)	20	2.538**	16
ketones	$BOD = 1.021 \times 10^3 \text{ } DMAC_{C=O} + 0.605$	(0.989)	7	4.340**	16
ethers	$BOD = 1.020 \times 10^3 \text{ } DMAC_{C-O} + 1.486$	(0.983)	14	2.721**	16
carboxylic acids	$BOD = 0.996 \times 10^3 \text{ } DMAC_{C-O} + 3.234$	0.987 (0.974)	40	4.412**	16,17

Table 7 : Quantitative Structure-Biodegradability Relationships observed in the literature (Continued).

glycols	$BOD = 0.993 \times 10^3 \text{ DMAC}_{C=O} + 1.309$	0.994	8	2.736**	17
aldehydes	$BOD = 1.067 \times 10^3 \text{ DMAC}_{C=O} - 4.231$	0.990	9	2.175**	17
esters	$BOD = 1.001 \times 10^3 \text{ DMAC}_{C=O} + 2.340$	0.981	19	3.086**	17
Halogenated hydrocarbons	$BOD = 8.29 \text{ L} - 1.187$	0.976	9	4.118**	15
Alkanes	$BOD = 0.0996 \text{ ASA} + 0.055$	1.000	12	0.270**	15
Phthalates esters	$RC^* = -0.977 \text{ MW} + 532.976$	-0.954	12	100.5 ; 30.895	7
Alcohols	$\%ThOD = -141.493 \text{ }^4\text{Chi}_c$ $- 32.147 \text{ }^3\text{Chi}_p^v + 83.613$	-0.951	14	51.7 ; 10.256	7 (20)
Linear and branch.acids	$\%ThOD = -252.507 \text{ }^4\text{Chi}_c$ $- 22.048 \text{ }^3\text{Chi}_p + 122.303$	-0.980	10	85.6 ; 9.799	7 (34)
Acids and alcohols	$\%ThOD = -161.432 \text{ }^4\text{Chi}_c$ $- 27.083 \text{ }^3\text{Chi}_p^v + 85.192$	-0.929	24	65.9 ; 11.626	7 (20)
Phthalate esters	$RC^* = -73.343 \text{ }^4\text{Chi}_p^v$ $- 59.181 \text{ }^3\text{Chi}_c^v + 613.022$	-0.975	12	85.8 ; 24.169	7 (69)
	$RC^* = -73.343 \text{ }^4\text{Chi}_p$ $- 59.207 \text{ }^3\text{Chi}_c + 643.506$	-0.975	12	85.8 ; 24.173	
Propizamides esters	$\log K = -2.74 - 1.22 \sigma + 0.58 \pi$	0.910	40	ND	13
Diverse chemicals	$AERUD = 0.64 \ln \text{ }^2\text{Chi}^v$ $+ 58.13 \text{ nCl/MW} + 1.57$	0.850	46	55.9 ; 0.344	8
	$AERUD = 0.60 \ln \text{ }^2\text{Chi}^v$ $+ 57.25 \text{ nCl/MW}$ $+ 17.56 \text{ }^4\text{Chi}_{pc}/\text{MW}$ $+ 1.45$	0.868	46	42.9 ; 0.328	

ND : F and s values were not given by the authors.

* : $RC \times 10^3$

** : only s values were given by the authors.

References in brackets correspond to authors who give biodegradation data.

Table 7 : Quantitative Structure-Biodegradability Relationships observed in the literature.

A careful inspection of the models listed in Table 7 can reveal statistical problems allowing us to explain some discrepancies between authors. These problems concern the number of compounds of the training set (generally very limited) and/or the

number of molecular descriptors introduced in the regression analysis procedures which can be too high in some cases compared to the size of the training set, and the quality of the statistical parameters (i.e. ; r , r^2 , s , and F). Furthermore, the lack of consistency between some QSBR models can be due to discrepancies between the biological data (e.g. ; endpoints, source of microorganisms, state of acclimatation, concentration of the test chemical...). This last point is crucial and explains the methodological problems occurring in QSBR studies. Indeed, the scarcity of biodegradation data in the literature, the multiplicity of standardized testing procedures, the lack of well-defined endpoints for biodegradation, and the variability of the obtained results for a same compound (49) are responsible for the limited size of the training sets (comparatively to those used in toxicology) and the poor predictive qualities of the obtained QSBR models. Therefore, it is obvious that the regression analysis procedures are not suitable to model biodegradation data while multivariate analyses can be used to overcome some methodological and statistical problems.

2.2. QUALITATIVE STRUCTURE-BIODEGRADABILITY RELATIONSHIPS (SBRs)

One advantage of SBR studies over QSBR studies, is that more chemicals can be introduced in the training sets because less stringent requirements are placed on the data. Indeed, while in QSBR studies the data are defined quantitatively, in the SBR approaches the biodegradability of the organic compounds is only scored semi-quantitatively (e.g. ; biodegradable or non-biodegradable, according to different classes of activity). However, from a methodological point of view, the creation of two or more groups of activity can be difficult to justify and some statistical problems can arise when these different classes are not balanced in number. In order to identify the differences between the persistent and the biodegradable compounds, the discriminant analysis (DA) can be used. Thus, Enstein *et al* (24) have employed this statistical approach in order to model approximately 250 chemicals for which BOD values were available. Their compounds were described by means of molecular connectivity indexes, the number of hydrogens, the number of oxygens, and so forth. Their model (run 10) classified 88 % of the classifiable chemicals accurately, producing approximately 11 % of false positives and 1 % of false negatives, with approximately 42 % of chemicals that could not be evaluated. DA has been also used by Niemi *et al* (50) in order to examine the structural features associated with the persistence or degradation of 287 chemicals tested with the standard BOD procedure. Their multivariate statistical analysis consisted of (i) calculating 54 molecular connectivity indexes (MCI), five physicochemical properties and eight principal components from the MCI, (ii) clustering the chemicals on the basis of the principal components and log P, and (iii) discriminating between persistent and degradable chemicals using the MCI and the physicochemical properties as discriminating variables within each cluster. The best iteration correctly predicted 85 % of the degradable chemicals and 94 % of the persistent chemicals. As a second step, these authors proposed a heuristic approach using the results of the above multivariate analysis and the literature on biodegradation to identify a series of structural features associated with degradable and persistent chemicals. This new approach allows to correctly predict 91 % of the degradable chemicals and 96 % of the persistent compounds.

Twelve structural features or chemical classes associated with degradable compounds could be defined (table 8).

Description of association	Number of chemicals	
	Correctly predicted	Incorrectly predicted
- one halogen substitution on an unbranched chemical	4	0
- one cyano substitution on an unbranched chemical	3	0
- aldehydes	15	0
- hydrocarbons	6	0
- alcohols, esters, and amines	64	13
- acids	29	2
- amino acids	13	0
- sulfonates	15	3
- benzene rings with various substitutions and log P < 2.18	21	0
- biphenyl and 2 or less hydroxy-substituted polyaromatics	4	0
- cyclic chemicals consisting only of C, O, N, and H	21	2
- two aromatic rings (naphthalene and aminonaphthalene)	2	0

Table 8 : Structural features associated with biodegradability in 5-days BOD test (50).

On the other hand, sixteen structural features or chemical classes were associated with the persistent compounds (table 9).

These approaches, which give rather good results, can be used to rapidly assess the relative biodegradability of organic compounds. However, it is important to note that false negatives and false positives do not have the same meaning depending on the context of data evaluation. Thus, in industry, a false prediction on a biodegradable substance would be expensive because bioassays have to be done, though unnecessary. On the other hand, as for environmental monitoring is concerned, considering as degradable a non-degradable chemical could be a real problem for ecosystems. It would be interesting to test other molecular descriptors (e.g. ; autocorrelation descriptors) and new statistical methods (e.g. ; factorial discriminant analysis) (18) in order to minimize the number of false negatives and false positives and to improve the quality of the SBR models.

Description of association	Number of chemicals	
	Correctly predicted	Incorrectly predicted
- the presence of at least one tert-butyl terminal branch	11	0
- epoxides	6	0
- aliphatic chemicals with fused rings and no branches	3	0
- two terminal isopropyl subgroups for a noncyclic chemical	3	0
- aliphatic cyclic chemicals without branches	5	0
- one or more halogen substitution on a branched, noncyclic or cyclic chemical	12	1
- at least one isopropyl or dimethyl amine substitution on a cyclic chemical without other degradable substitutions*	4	2
- two halogen substitutions on an unbranched, noncyclic chemical	3	0
- more than two hydroxy substitutions on an aromatic ring	2	0
- two or more rings (with a few exceptions*)	8	0
- two terminal diamino groups on a noncyclic chemical	1	0
- more than 1 amino branch on a ring with nitrogen as a member of the ring	2	0
- two terminal double-bonded carbons on an unbranched chemical	1	0
- benzene ring with > 2 substitutions (non-hydroxy) and log P > 2.18	1	0
- cyano group on a chain consisting of > 8 atoms	1	0
- highly branched chemicals	1	0

* See table 8

Table 9 : Structural features associated with resistance in 5-days BOD test (50).

3. Discussion

Establishing structure biodegradability relationships requires care in the quality of data used in the analyses ; this applies to biodegradability criteria as well as to descriptors of chemical structure used in Quantitative Structure-Biodegradability Relationships and Structure-Biodegradability Relationships.

Biodegradability may be appreciated differently according to authors : primary biodegradability expresses the disappearance of the active and characteristic functions of the molecule ; it signifies that microorganisms initiate a decomposition but it does not mean that the compound will be completely mineralized. From an environmental point of view, ultimate degradation is the best criterium to consider : it can be evaluated by means of Biochemical Oxygen Demand (BOD), CO₂ release, or disappearance of Dissolved Organic Carbon (DOC) ; the period of time for studying biodegradation is also highly variable : it ranges from 5 to 42 days in standard methods. Five days BOD is a criterion often used in Structure-Biodegradability studies since BOD₅ data are available for a lot of chemicals ; moreover, its evaluation does not require a long period of time. But BOD₅ must be considered only as a screening tool as it expresses simply the ability of a compound to be rapidly degraded : poor BOD₅ results does not mean that the substance cannot be decomposed over a longer period of time.

So, the significance of biodegradability results will be different according to the criteria and the timing used in the studies. The results themselves may vary according to the experimental or environmental conditions for not easily degradable substances : they depend on the concentration of the tested chemical, the nature and the quantity of inoculum used, or whether or not this inoculum is adapted to the structure concerned. The importance of testing procedures has been underlined by many authors (21, 30, 37, 38). Consequently, one needs to be aware of the influence of these parameters when interpreting results and to use homogeneous data when establishing QSBRs.

A multicriteria approach, that integrates the various situations occurring in the environment as well as laboratory results of biodegradability, would be desirable. In fact, such a strategy is still uncommon and a unique criterion of biodegradability is generally considered in most studies. Boethling *et al* (9) when studying the feasibility of developing an expert system for biodegradability assessment, are the only authors accounting for both aerobic and anaerobic processes of biodegradation, and on the fate of chemicals in wastewater treatment and receiving waters.

The quality of descriptor values is also a necessity when setting quantitative relationships. This requirement is fulfilled when data can be calculated and withdrawn from standard tables. The problem may exist when measurements are necessary and when different methods can be used that lead to somewhat varying results. For instance, although BOD₅ methods have been standardized, numerous intrinsic variations may exist between bank or literature data for identical substances.

Beside the need for coherent data, validity of QSBRs implies wide applicability : QSBRs based on a few chemicals can be considered as unproven ; elimination of outliers, without understanding the reason(s) why some chemicals fail to fit a relationship, makes its applicability doubtful.

The review of literature on Structure-Biodegradability Relationships allows the definition of general features of poorly degradable substances : complex or polyaromatic structure, high molecular weight, branched chains, or substitutions with halogenated, nitro, amino, and sulfonic groups are as many different parameters leading to recalcitrance. Predicting the biodegradability of simple organic chemicals is possible on the basis of these rules ; the feasibility of an expert system for biodegradability assessment was demonstrated by Boethling *et al* (9) ; there was a general agreement among microbiologists participating to the expertise on the above negative structural factors of biodegradation, as well as on the hierarchy of various groups contributing to aerobic and anaerobic biodegradability. But predicting points of initial microbial attack and rates of biodegradation was not so obvious for some chemicals; difficulties are encountered as soon as the structure becomes more complex. So, the development of statistical and rational tools to express biodegradability is necessary; at this time, it is the subject of a great deal of research and much interest.

Attempts to search for simple QSBRs to predict biodegradability with only one descriptor were first made. For this purpose short series of chemicals were used. Consequently, the applicability of relationships obtained may be limited, as validity is restricted to specific classes of compounds.

It appears that hydrophobicity expressed as partition coefficient $\log P$, R_T coefficient from reverse-phase chromatography, is negatively correlated with biodegradability of C_8 - C_{12} alcohols (73). In contrast, a positive relationship is found with hydrolysis of C_1 - C_8 esters of 2,4 D ; this is coherent with the higher capacity of microorganisms in using alkyl chains when their carbon number increases in the range from C_1 to C_8 . Results are not so clear for phthalate esters though they are rapidly degraded. Urushigawa and Yonezawa (72) showed that the rate of hydrolysis is the highest for dibutyl and dipentyl esters and decreases greatly with dioctylphthalate ; Sugatt *et al.* (69) found in contrast a negative relationship between hydrolysis and complexity of the dialkyl chains in the entire range C_1 - C_{30} .

Increasing pK_a is correlated with a higher biodegradability for substituted phenols (49), chlorophenols (2), and substituted anilines (49). The applicability of the last two relationships can be discussed as outliers were excluded. The QSBRs for phenols was established on a limited series comprising chlorine, nitro, amino, and sulfonic substituents : *p*-cyano and *p*-methoxyphenol which were considered as outliers by Paris *et al.* (54) were not included in the series studied. The inverse relationship observed between pK_a and degradability may be explained by the fact that electronic effects would be the dominant factor governing the kinetics of microbial oxydation of phenols ; electron-withdrawing substituents, such as chlorine, decrease the nucleophilic character of phenols and could impede the electrophilic attack by the oxygenase.

This descriptor could be relevant to ring oxygenation as soon as an explanation to outliers is given. Nevertheless its use is limited to ionizable substances.

Electronic Hammett constant σ , that increases with electrophilic character of a substituent, is also representative of the aptitude of a molecule to undergo enzymatic attack. The increase in σ value leads to an inhibition of the biodegradation as shown by Pitter (57, 58) on phenols and anilines.

In fact 1,2-dioxygenase involved in the first step of degradation of the aromatic ring is not only influenced by electronicity of the substituents but this enzyme can be much more stereospecific and sensitive to steric effects. In these cases, Van der Waals radius of substituents gives better correlations than Hammett constant σ as shown by Reineke and Knackmuss (61) on the dioxygenation of metasubstituted benzoates by *Pseudomonas B₁₃*.

Molecular connectivity indexes seem to be valuable descriptors, accounting for the structural complexity, branching, and electronic character that impede enzymatic access to binding sites and formation of complexes with decomposing enzyme. Such indexes are negatively correlated with biodegradability of substituted aliphatic acids and alcohols, phthalate esters, dialkylethers, and N-phenylcarbamates (7).

The indexes ^0chi and ^1chi can be considered as the most representative indexes of the molecular weight ; ^2Chi indicates molecular mass and branching as well ; $^3\text{Chi}_p$ correlates with alkane density and reflects their "flexibility" which decreases in the same time of their biodegradability . $^3\text{Chi}_c$ $^4\text{Chi}_c$ and $^4\text{Chi}_{pc}$ are indicative of branching and are well correlated with biodegradability when chain branching constitutes a negative factor of biodegradability, as for instance dimethyl substituents on monocarboxylic acids and primary alcohols (20, 34).

Problems encountered with molecular connectivity indexes arise from the redundancy in atom counting, which occurs with indices of order superior to 3. Minimizing this shortcoming would imply to include the frequency counts for the indexes in the calculations, as was done by Niemi *et al* (50) in a multivariate statistical procedure ; another way for solving the problem is to normalize the connectivity index to the compound's molecular weight (8); such normalization is critical as it reduces the weight of the parameter "position of substituents" and minimizes the negative influence of branching on polycyclic or complex structures as soon as different classes of chemicals are considered.

2,4-D esters contrasted with other compounds reviewed by Boethling (7), as their transformation rate constants increased with increasing connectivity indexes. This may be due to the fact that 2,4-dichlorophenoxyacetic acid was esterified with simple linear chains, ranking from methyl to octyl, without branching that could impede the biodegradation ; as noted above, the microbial use of C₁-C₈ aliphatic alcohols increases with the number of carbons in the linear alkyl chain (55).

The univariate structure-biodegradability relationships can be useful to elucidate mechanisms of enzymatic activity in the steps of biodegradation. Notwithstanding their interest, they display shortcomings due to their limited applicability, as they were established from limited series of analogues. In order to predict the biodegradability of chemicals, regardless of their chemical structure, more reliable methods are necessary which have to consider a series of

descriptors representative of a wide variety of substances rather than one defined parameter available for only one small series of chemicals. The study of Niemi *et al* (50) aimed at this objective by using a multivariate statistical procedure and a heuristic method to examine the biodegradability of a number of chemicals. It appeared that biodegradability of halogens on branched, cyclic or non cyclic chemicals, as well as biodegradability of isopropyl or dimethyl amine cyclic chemicals was the most difficult to predict : this can be explained by the fact that biodegradability is greatly influenced by the number and the position of substituents on a cyclic or alicyclic structure, and that the influence of these substitutions is also dependent on the species involved and the experimental conditions of degradability.

4. Conclusion

Biodegradability structure relationships are the subject of a large amount of research. But these studies are still in their early stages. At present, the possibilities of applying QSBR to practical problems are limited. The quality of biodegradability data, of molecular descriptor values are absolute requirements for good QSBRs ; the search for multivariate statistical methods allowing relevant predictions of degradability has to be extended. Fruitful results are expected from the development of such studies.

Acknowledgements

The authors would like to thank the french "Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée" (S.E.F.A.) for initiating and granting this study. They acknowledge too the french Ministry of the Environment (Paris) for supporting a research on QSBRs (Contract n° 9005).

5. References

1. Alexander, M. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* 15, 611-647.
2. Banerjee, S., Howard, P.H., Rosenberg, A.M., Dombrowski, A.E., Sikka, H., and Tullis, Denzil L. (1984) *Environ. Sci. Technol.* 18, 416-422.
3. Bartha, R. (1968) *J. Agr. Food Chem.* 16, 602-604.
4. Bayona, J.M., Albaiges, J., Solanas, A.M., Pares, R., Garrigues, P., and Ewald, M. (1986) *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 23, 289-303.
5. Bayona, J.M., Albaiges, J., Solanas, A.M., and Grifoll, M. (1986) *Chemosphere* 15, 595-598.

6. Beam, H.W. and Perry, J.J. (1974) *J. Bacteriol.* 118, 394-399.
7. Boethling, R.S. (1986) *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 797- 806.
8. Boethling, R.S. and Sabljic, A. (1989) *Environ. Sci. Technol.* 23, 672-679.
9. Boethling, R.S., Gregg, B., Frederick, R., Gabel, N.W., Campbell, S.E., and Sabljic, A. (1989) *Ecotoxicol. Environ. Safety* 18, 252-267.
10. Bourquin, A.W., Spain, J.C., and Pritchard, P.H. (1979) *Gulf Breeze Contribution N° 437, paper N° 21, 354-369.*
11. Brown, D. and Hamburger, B. (1987) *Chemosphere* 16, 1539-1553.
12. Brown, D. and Laboureur, P. (1983) *Chemosphere* 12, 397-404.
13. Cantier, J.-M., Bastide, J., and Coste, C. (1986) *Pestic. Sci.* 17, 235-241.
14. Colberg, P.J. and Young, L.Y. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 350-358.
15. Dearden, J.C. and Nicholson, R.M. (1986) *Pestic. Sci.* 17, 305-310.
16. Dearden, J.C. and Nicholson, R.M. (1987) in K.L.E. Kaiser (ed.). *QSAR in Environmental Toxicology -II*, Reidel D. Publishing Company, pp 83-89.
17. Dearden, J.C. and Nicholson, R.M. (1987) in D. Hadzi and B. Jerman-Blazic (eds.). *QSAR in Drug Design and Toxicology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 307-312.
18. Devillers, J. (1988), *Formation continue Essais d'Ecotoxicité et de Cancérogénicité des substances chimiques*, C.S.E. Metz.
19. Devillers, J. and Lipnick, R.L. (1990) in W. Karcher and J. Devillers (eds.). *Practical Applications of Quantitative Structure Activity Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
20. Dias, F.F. and Alexander, M. (1971) *Appl. Microbiol.* 22, 1114-1118.
21. Divo, C. and Cardini, G. (1980) *Tenside Detergents* 17, 30-36.
22. Dorn, E. and Knackmuss H.-J. (1978) *Biochem. J.* 174, 85-94.
23. Ennis, D.M., Kramer, A., Jameson, C.W., Mazzochi, P.H., and Bailey, W.J. (1978) *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 51-53.
24. Enstein, K., Tomb, M. E., and Lander, Tom R. (1984) in K.L.E. Kaiser (ed.). *Q.S.A.R. in Environmental Toxicology*, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, pp. 89-107.
25. Fedorak, P.M. and Westlake, W.S. (1981) *Can. J. Microbiol.* 27, 432-443.
26. Fujiwara, Y., Kinoshita, T., Sato, H., and Kojima, I. (1984) *Yukagaku* 33, 111-114.

27. Furukawa, K., Tonomura, K., and Kamibayashi, A. (1978) *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 223-227.
28. Furukawa, K. (1982) in A.M. Chakrabarty (ed.). *Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants*, CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 33-57.
29. Gerike, P. (1984) *Chemosphere* 13, 169-190.
30. Gerike, P. and Fischer, W.K. (1979) *Ecotoxicol. Environ. Safety* 3, 159-173.
31. Gledhill, W.E. (1975) *Appl. Microbiol.* 30, 922-929.
32. Kier, L.B. and Hall, L.H. (1976) *Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research*, Academic Press, New York.
33. Hammett, L.P. (1935) *Chem. Rev.* 17, 125-136.
34. Hammond, M.W. and Alexander, M. (1972) *Environ. Sci. Technol.* 6, 732-735.
35. Hansch, C. and Leo, A. (1980) *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, J. Wiley and Sons, New-York.
36. Herbes, S.E. (1981) *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 20- 28.
37. Howard, P.H. (1984) *Environ. Toxicol. Chem.* 3, 551-562.
38. Howard, P.H., Hueber, A.E., and Boethling, R.S. (1987) *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 1-10.
39. Huang, S.J., Bitritto, M., Leong, K.W., Pavlisko, J., Roby, M., and Knox, J.R. (1978) *Stabilization and Degradation of Polymers*, American Chemical Society, pp. 205-213.
40. Jafvert, C.T. and Wolfe, N.L. (1987) *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 827-837.
41. Janssen, D.B., Jager, D., and Witholt, B. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 561-566.
42. Johnson, B.T., Heitkamp, M.A., and Jones, J R. (1984) *Environ. Pollut. (ser.B)* 8, 101-118.
43. Jong, A.L. de and Testa, M.C. (1967) *Belg. Chem. Ind.* 32, 1-5.
44. Kaufman, D.D. (1966) in *Pesticides and Their Effect on Soil and Water*, Soil Sci. Soc. Am., Madison, pp. 85-94.
45. Kawasaki, M. (1980) *Ecotoxicol. Environ. Safety* 4, 444- 454.
46. Kool, H.J. (1984) *Chemosphere* 13, 51-761.
47. Leidner, H., Gloor, R., Wüest, D., and Wuhmann, K. (1980) *Xenobiotica* 10, 47-56.

48. Leuenberger, H.G.W. (1984) In K. Kieslich (ed.). *Biotechnology. A Comprehensive Treatise in 8 volumes*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Basel, pp. 5-30.
49. Moore, S.A., Pope, J.D., Barnett, J.T. Jr. and Suarez, L.A. (1989) *Structure-Activity Relationships and Estimation Techniques for Biodegradation of Xenobiotics*. U.S. Environmental Protection Agency, Athens.
50. Niemi, G.J., Weith, G.D., Regal, R.R., and Vaishnav, D.D. (1987) *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 515-527.
51. Norrington, F.E., Hyde, R.M., Williams, S.G., and Wooton, R. (1975) *J. Medicinal Chem.* 18, 604-607.
52. O'Grady, D.P., Howard, P.H., and Werner A.F. (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 443-445.
53. Oudof, J. (1984) *Mar. Environ. Res.* 13, 277-302.
54. Paris, D.F., Wolfe, N.L., and Steen, W.C. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 153-158.
55. Paris, D.F., Wolfe, N.L., and Steen, W.C. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 7-11.
56. Paris, D.F., Wolfe, N.L., Steen, W.C., and Baughman, G.L. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1153-1155.
57. Pitter, P. (1976) *Water Res.* 10, 231-235.
58. Pitter, P. (1984) *Coll. Czechoslovak Chem. Commun.* 49, 2891-2896.
59. Pitter, P. (1985) *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 13, 453-460.
60. Pitter, P. (1985) *Technol. Water Environ. Engn.* 26, 15-67.
61. Reineke, W. and Knackmuss, H.-J. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* 542, 412-423.
62. Rothkopf, G.S. and Bartha, R. (1984) *J.A.O.C.S.* 61, 977-980.
63. Saeger, V.W., Kaley II, R.G., Hicks, O. Tucker, E.S., and Mieure, J.P. (1976) *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 746-749.
64. Sethunathan, N. (1973) *Residue Reviews* 47, 143-165.
65. Sethunathan, N. and Yoshida, T. (1973) *Plant Soil* 38, 663-666.
66. Sims, G.K. and Sommers, L.E. (1986) *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 503-509.
67. Solanas, A.M., Pares, R., Bayona, J.M., and Albaiges, J. (1984) *Chemosphere* 13, 593-601.

68. Steiert, J.G., Pignatello, J.J., and Crawford, R.L. (1987) *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 907-910.
69. Sugatt, R.H., O'Grady, D.P., Banerjee, S., Howard, P.H., and Gledhill, W.E., (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 601-606.
70. Una, G.V. and Garcia, M.J.N. (1983) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 315-319.
71. Urano, K. and Kato, Z. (1986) *J. Hazard. Materials* 13, 147-159.
72. Urushigawa, Y. and Yonezawa, Y (1979) *Chemosphere* 5, 317-320.
73. Vaishnav, D.D. and Babeu, L. (1987) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 237-244.
74. Vaishnav, D.D., Boethling, R.S., and Babeu, L. (1987) *Chemosphere* 16, 695-703.
75. Volkman, J.K., Alexander, R., Kaji, R.I., Rowland, S.J., and Sheppard, P.N. (1984) *Org. Geochem.* 6, 619- 632.
76. Wotzka, J., Giest, B., and Pfitzner, S. (1985) *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 13, 583-590.
77. Yonezawa, Y. and Urushigawa, Y. (1979) *Chemosphere* 3, 139-142.
78. Young, L.Y. and Rivera, M.D. (1985) *Water Res.* 19, 1325-1332.
79. Zitzelsberger, W., Ziegler, W., and Wallnöfer, P.R. (1987) *Chemosphere* 16, 1137-1142.

VII. Conclusion

Cette revue plus ou moins exhaustive des relations structure-biodégradabilité permet d'effectuer quelques remarques concernant l'intérêt de ce type de relations.

En effet, malgré un nombre conséquent d'études ayant entraîné des relations structure-biodégradabilité quantitatives ou qualitatives (nombre qui ne va qu'en s'accroissant), il faut noter qu'un grand nombre de problèmes (plus ou moins importants) se posent concernant autant la réalisation et l'obtention de ces relations, que leur utilité.

La première critique, concernant les problèmes liés à l'obtention de ces relations, a été discutée en profondeur dans le chapitre précédent, et peut se résumer à :

- une utilisation de techniques d'évaluation de la biodégradabilité désuètes (BOD₅,...) ou impropres à une extrapolation à l'environnement (tests standardisés, par exemple) ;
- une utilisation de descripteurs de la structure chimique qui ne sont pas suffisamment représentatifs de celle-ci (solubilité, hydrophobicité, pKa,...) ou qui en sont trop spécifique (différence de module de charge atomique, index de connectivité,...) ;
- une utilisation de techniques statistiques impropres ou insuffisamment puissantes (exceptées les techniques qualitatives).

Toutefois, cette première critique peut être liée à une jeunesse relative de ces démarches, et pourra vraisemblablement être jugulée par une progression de la recherche dans ce domaine, à tous les niveaux.

Récemment, l'utilisation de systèmes informatiques, hormis le fait qu'ils favorisent l'utilisation de techniques d'analyse statistique de plus en plus complexes et réalistes, a permis d'aborder une nouvelle approche des relations structure-biodégradabilité (et structure-activité en général) :

l'application des systèmes d'intelligence artificielle (SZLADOW, 1991).

Ces techniques d'application de l'intelligence artificielle liées à des banques de données exhaustives concernant les produits chimiques permettront certainement d'obtenir des résultats probants dans le domaine de la réalisation de relations structure-biodégradabilité.

La deuxième critique est plutôt liée à, un problème de mauvaise définition, ou interprétation, de ce type d'études. En effet, les démarches entreprises par le passé dans les relations structure-biodégradabilité visaient surtout à établir une alternative à la réalisation de tests de biodégradabilité.

Cette démarche n'est toutefois pas correcte, il est en effet utopique, en l'état actuel de nos connaissances, de penser à se passer de la réalisation de tests de biodégradabilité.

Par contre, le concept "relations structure-biodégradabilité", lié à des systèmes d'aide à la décision cohérents, pourra apporter une aide précieuse quant à la nécessité d'effectuer ces tests de biodégradabilité, et pourra être d'un intérêt important pour les industriels en quête d'enregistrement.

Ainsi, l'amélioration des techniques, l'utilisation de systèmes d'intelligence artificielle, de banques de données sur la biodégradation (cinétiques et environnementales) et sur les structures chimiques, permettront peut être dans le futur de trouver en les "relations structure-activité" et en les relations structure-biodégradabilité en particulier, l'outil qui améliorera la connaissance des substances chimiques et qui diminuera les coûts d'étude de certaines de celle-ci.

CONCLUSION

Les tests de biodégradabilité actuellement utilisés pour déterminer la biodégradabilité immédiate des substances organiques présentent une grande hétérogénéité entre eux quand aux résultats obtenus. La plupart de ces différences voient certainement leur origine dans des conditions expérimentales différentes. En effet, ces conditions expérimentales varient de manière importante selon les tests.

Ces différences peuvent être réparties en différences fondamentales - appareillage, technique analytique, concentration du produit testé (liée à la technique analytique) - et historiques (sans fondements scientifiques apparents) - inoculum (origine, concentration et préparation), milieu minéral (concentration et composition), température et pH, et intervalles de mesure.

Une des améliorations qu'il serait possible d'apporter aux tests de biodégradation immédiate serait d'homogénéiser leurs conditions expérimentales. Un effort important a été entrepris par l'OCDE dans ce sens.

Toutefois, il serait plus opportun d'aller encore plus loin dans une telle homogénéisation en tentant de rapprocher ces conditions expérimentales des conditions environnementales dans lesquelles les substances devraient être testées. Le choix de ces conditions environnementales se ferait par rapport aux horizons dans lesquels ces substances risqueraient de se retrouver.

Un deuxième point important à développer dans le domaine de l'étude de la biodégradabilité des substances chimiques est lui aussi lié à une difficulté à comparer les résultats obtenus entre eux, et à comparer la biodégradabilité à d'autres phénomènes importants régissant la persistance des composés organiques dans l'environnement (dégradation abiotique, hydrolyse, adsorption,...).

Cette difficulté a pour origine 2 facteurs principaux : une différence des conditions expérimentales (développés ci-dessus), et un mauvais contrôle de l'inoculum et plus particulièrement de la concentration en bactéries réellement impliquées dans le phénomène de biodégradation.

Une des solutions parmi les plus évidentes pour pallier à ce problème semble être de déterminer la biomasse active (réellement impliquée dans le processus de biodégradation).

Toutefois, malgré un aspect simple dans le concept, les difficultés techniques liées à la détermination de la biomasse active sont plus importantes. L'avenir, à ce niveau, d'une technique telle que la technique du nombre le plus probable au ^{14}C , développée par LEHMICKE et ses collaborateurs (1979) et reprise par nos soins dans ce document, doit être prometteur.

En effet, cette technique utilisant des composés marqués au ^{14}C présentent des attraits importants (facilité à concevoir, difficulté relativement faible, précision importante,...) qui devraient jouer en sa faveur.

La réalisation des tests de biodégradation retraçant des conditions environnementales et autorisant la détermination de la biomasse active va alors permettre de développer des cinétiques de biodégradation et de replacer la biodégradabilité dans le cortège des phénomènes environnementaux.

D'un autre coté, les processus de préparation des inocula, acclimatation et adaptation, peuvent permettre une amélioration des études de biodégradation. en effet, ils permettent de standardiser les inocula (acclimatation) et d'augmenter la capacité des micro-organismes à dégrader les substances organiques en augmentant la spécificité des mécanismes enzymatiques (adaptation).

Toutefois, ces deux processus (acclimatation et adaptation) ne relèvent des conditions environnementales que dans le cas de rejets continus ou de pollutions chroniques, et ne permettent donc pas d'extrapoler les résultats de biodégradation, obtenus dans les tests, à l'environnement.

La dernière question posait le problème de l'intervention des relations structure-biodégradabilité dans la détermination de la biodégradabilité, les relations structure-biodégradabilité sont-elles une alternative aux tests de biodégradation ou seulement un complément de celles-ci.

En définitive, il faudrait considérer les relations structure-biodégradabilité au sein d'un système informatisé d'aide à la décision, et non plus comme une entité à part.

Les relations structure-biodégradabilité développées placées dans un contexte strict pourrait permettre de définir le test le plus approprié à mettre en oeuvre pour définir sa biodégradabilité en se rapprochant le plus possible des conditions environnementales.

Toutefois, pour arriver à des relations structure-biodégradabilité correctes du point de vue biologique, il faudrait mettre en place, et respecter, les préceptes préalablement définis au niveau de la réalisation des tests de biodégradabilité servant de base à l'établissement de ces relations.

D'autre part, l'apport d'analyses statistiques correctement menées et une connaissance plus grande des descripteurs de la structure moléculaire devraient rendre ces relations structure-biodégradabilité encore plus précises

La biodégradabilité et l'étude des mécanismes de biodégradabilité, bien qu'ils semblent bien connus, n'offrent à l'heure actuelle que des réponses trop spécifiques sur la biodégradation des substances organiques. En effet, les études de biodégradabilité ne s'appliquent qu'à la biodégradation de quelques substances "réputées" (pesticides, hydrocarbures pétroliers,...), dans des conditions par trop spécifiques et sélectives, sur lesquelles l'intérêt général se focalise.

En fait, nous avons une connaissance spécifique et précise de la biodégradation de quelques substances dans des conditions particulières , et une connaissance des phénomènes globaux de la biodégradation beaucoup trop faible.

L'amélioration dans le futur de ce dernier point permettra peut-être à la biodégradabilité d'être mieux comprise, permettant ainsi un réel progrès dans les études de biodégradabilité, l'interprétation des résultats qui en découlent, et leur application dans des relations structure-biodégradabilité.

BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR, 1984,
 Evaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles, Méthode par analyse du dioxyde de carbone dégagé, Norme expérimentale T 90-306,
 Association Française de Normalisation, Paris.
- AFNOR, 1990,
 Les tests de biodégradation immédiate. Définitions.
 Association Française de Normalisation, Paris.
- AELION C.M., SWINDOLL C.M. et PFAENDER F.K., 1987,
 Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer,
Appl. Environ. Microbiol., 53(9), 2212-2217.
- ALEXANDER M., 1965,
 Most-probable-number method for microbial populations,
 in Methods in soil analysis, part 2, C.A. BLACK (Ed.), 1467-1472, Am. Soc. Agronomy Inc., Madison, Wis.
- BANNERJEE S., HOWARD P.H., ROSENBERG A.M., DOMBROWSKI A.E., SIKKA H., TULLIS D.L., 1984,
 Development of a general kinetic model for biodegradation and its application to chlorophenols and related compounds,
Environ. Sci. Technol., 18, 416-422.
- BARTHA R., 1968,
 Biochemical transformation of anilide herbicides in soil,
J. Agr. Food Chem., 16 (4), 602-604.
- BASAK S.C., 1990,
 A nonempirical approach to predicting molecular properties using graph-theoretic invariants,
 in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in environmental chemistry and toxicology, 83-103, KARCHER et DEVILLERS (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- BATTERSBY N.S., 1990,
 A review of biodegradation kinetics in the aquatic environment,
Chemosphere, 21, 1243-1284.
- BEAM H.W. et PERRY J.J., 1974,
 Microbial degradation and assimilation of n-alkyl-substituted cycloparaffins,
J. Bacteriol., 118 (2), 394-399.

BLOCK J.C., FERARD J.F., FLAMBEAU J.P., KUENEMANN P., THOUAND G. et VASSEUR P., 1990,

Aspects microbiologiques de la dégradation : une revue,
in Evaluation de la biodégradation des substances organiques dans l'environnement,
p. 25-73, Rapport et communications du congrès international de Paris, SEFA.

BLOK J., De MORSIER A., GERIKE P., REYNOLDS L. et WELLENS H, 1985,
Harmonisation of ready biodegradability tests,
Chemosphere, 14, 1805-1811.

BOETHLING, 1986,
Application of molecular topology to quantitative structure-biodegradability
relationships,
Environ. Toxicol. Chem., 5, 797-806.

BOETHLING R.S. et ALEXANDER M., 1979,
Effects of concentration of organic chemicals on their biodegradation by natural
microbial communities,
Appl. Environ. Microbiol., 37(6), 1211-1216.

BONDI A., 1964,
Van der Waals volumes and radii,
J. Phys. Chem., 68 (3), 441-451.

BORGSTEDT H.H. et ENSLEIN K., 1990,
The development of practical discriminant models in toxicology,
in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in
environmental chemistry and toxicology, 145-152, KARCHER et DEVILLERS (Eds.),
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

BROTO P. et DEVILLERS J., 1990,
Autocorrelation of properties distributed on molecular graphs,
in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in
environmental chemistry and toxicology, 83-103, KARCHER et DEVILLERS (Eds.),
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

COLLINS, 1984,
The fresh water environment and its significance in industry,
J. Appl. Bacteriol., 27, 145-150.

DEARDEN J.C., 1990,
Physico-chemical descriptors,
in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in
environmental chemistry and toxicology, 105-128, KARCHER et DEVILLERS (Eds.),
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

DEARDEN J.C., NICHOLSON R.M., 1986,
The prediction of biodegradation by the use of quantitative structure-activity relationships : correlation of biological oxygen demand with atomic charge difference, Pesti. Sci., 17, 305-310.

DEVILLERS J., 1989,
Les relations structure-activité quantitatives (QSAR) en écotoxicologie,
Formation continue Mars 1988 : Essais d'écotoxicité et de cancérogénicité des molécules chimiques, C.S.E. METZ.

DEVILLERS J. et KARCHER W., 1990,
Correspondance factor analysis as a tool in environmental SAR and QSAR studies, in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in environmental chemistry and toxicology, 181-196, KARCHER et DEVILLERS (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

DEVILLERS J. et LIPNICK R.L., 1990,
Practical applications of regression analysis in environmental QSAR studies, in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in environmental chemistry and toxicology, 129-144, KARCHER et DEVILLERS (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

DEVILLERS J., CHAMBON P., ZAKARYA D. et CHASTRETTE M., 1986,
A new approach in ecotoxicological QSAR studies, Chemosphere, 15, 993-1002.

DIAS F.F., ALEXANDER M., 1971,
Effect of chemical structure on the biodegradability of aliphatic acids and alcohols, Appl. Microbiol., 22 (6), 1114-1118.

ECETOC, 1985,
Technical report, N 18, Harmonisation of ready biodegradability tests, avril, 1985, European Chemical Industry Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

ENNIS D.M., KRAMER A., JAMESON C.W., MAZZOCHI P.H., BAILEY W.J., 1978,
Structural factors influencing the biodegradation of imides, Appl. Environ. Microbiol., 35 (1), 51-53.

Essai en fioles fermées, 1985,
ISO TC 147/SC 5/GT 4/ N 53.

FURUKAWA K., TONOMURA K., KAMIBAYASHI A., 1978,
Effect of chlorine substitution on the biodegradation of polychlorinated biphenyls, Appl. Environ. Microbiol., 35 (2), 223-227.

- GELADI P. et TOSATO M.L., 1990,
Multivariate latent variable projection methods : SIMCA and PLS,
in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in environmental chemistry and toxicology, 171-180, KARCHER et DEVILLERS (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- GERIKE P. et FISCHER W.H., 1979,
A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various test,
Ecotoxicol. Environ. Safety, **3**, 159-173.
- GERIKE P. et FISCHER W.H., 1981,
A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various test, II. Additional results and conclusions,
Ecotoxicol. Environ. Safety, **5**, 45-55.
- GLEDHILL W.E., 1975,
Screening test for assessment of ultimate biodegradability : linear alkylbenzene sulfonates,
Appl. Microbiol., **30** (6), 922-929.
- HAMMETT L.P., 1935,
Some relations between reaction rates and equilibrium constants,
Chem. Rev., **17**, 125-136.
- HANSCH et FUJITA, 1964.
- HANSCH C. et LEO A., 1980,
I. Electronic parameters, II. Steric parameters, III. Hydrophobic parameters,
in Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology, 1-17,
HANSCH C. and LEO A. (Eds), JOHN WILEY and Sons, New-York.
- KARCHER W. et DEVILLERS J., 1990,
SAR and QSAR in environmental chemistry and toxicology : scientific tool or wishful thinking ?
in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in environmental chemistry and toxicology, 1-12, KARCHER et DEVILLERS (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- KIER L.B. et HALL L.H., 1976,
Molecular connectivity in chemistry and drug research, Academic Press, New-York.
- KING R.O. et FORSTER C.F., 1990,
Effects of sonication on activated sludge,
Enzyme Microb. Technol., **12**, 109-115.

LEHMICKE L.G., WILLIAMS R.T. et CRAWFORD R.L., 1979,
14C-MPN method for enumerating of active heterotrophic microorganisms in natural waters,
Appl. Environ. Microbiol., **38**(4), 644-649.

LEO A.J., 1987,
Some advantages of calculating octanol-water partition coefficients,
J. Pharm. Sci., **76**, 166-168.

LEPAILLEUR H., 1987,
Essais de biodégradation immédiate,
Formation continue, Septembre 1987, IRCHA.

MEYER H., 1901,
cité par KARCHER W. et DEVILLERS J., 1990.

MOREAU G. et BROTO P., 1980,
The autocorrelation of topological structure. A new molecular descriptor,
Nouv. J. Chem., **4**, 359-360.

MOORE S.A., POPE J.D., BARNETT J.T. Jr et SUAREZ L.A., 1989,
Structure-Activity relationships and estimation techniques for biodegradation of xenobiotics,
US Environmental Protection Agency, Athens.

MURAKAMI M. et FUKAMI J.-I., 1985,
Specific molecular connectivity analysis of pesticides and related compounds: a preliminary study,
Bull. Environ. Contam. Toxicol., **34**, 775-779.

NIEMI G.J., 1990,
Multivariate analysis and QSAR : application of principal components analysis, in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in environmental chemistry and toxicology, 153-170, KARCHER et DEVILLERS (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

NIEMI G.J., WEITH G.D., REGAL R.R. et VAISHNAV D.D., 1987,
Structural features associated with degradable and persistent chemicals,
Environ. Toxicol. Chem., **6**, 515-527.

NORRINGTON F.E., HYDE R.M., WILLIAMS S.G., WOOTON R., 1975,
Physicochemical-activity relations in practice. 1. A rational and self-consistent data bank,
J. Medicinal Chem., **18** (6), 604-607.

OCDE 301 B,
Test Sturm modifié,
Organisation de Coopération et de Développement Economique, 1981.

OCDE 301 C,
Essai MITI modifié,
Organisation de Coopération et de Développement Economique, 1981.

OCDE 301 D
Essai en fioles fermées,
Organisation de Coopération et de Développement Economique, 1981.

OCDE 301 E
Test de screening modifié,
Organisation de Coopération et de Développement Economique, 1981.

OCDE 302 B,
Biodégradabilité dite intrinsèque : essai Zahn-Wellens modifié,
Organisation de Coopération et de Développement Economique, 1981.

OCDE 303 A,
Essai de simulation - Traitement aérobie des eaux usées : essai d'unités couplées,
Organisation de Coopération et de Développement Economique, 1981.

OECD Ring Test, 1988,
OECD Ring Test for Ready Biodegradability testing,
Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

OVERTON E., 1901,
in Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie,
GUSTAV FISCHER (Ed.), Jena.

PAINTER H.A., 1971,
Chemical, physical and biological characteristics of wastes and waste effluents,
in Water and water pollution handbook Vol.1, CIACCIO (Ed.), 329-364, Marcel
DEKKER Ic., New-York.

PARIS D.F., WOLFE N.L., STEEN W.C., 1982,
Structure-activity relationships in microbial transformation of phenols,
Appl. Environ. Microbiol., 44 (1), 153-158.

PHILIPPEAU G., 1986,
Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales ?, 63 p.,
Institut Technique des Céréales et des Fourrages, Paris.

PIKE E.B., CARRINGTON E.G. et ASHBURNER P.A., 1972,
An evaluation of procedures for enumerating bacteria in activated sludge;
J. Appl. Bacteriol., 35, 309-321.

RANDIC, 1975, cité par SABLJIC, 1990.

ROWE R., TODD R. et WAIDE J., 1977,
Microtechnique for MPN analysis,
Appl. Environ. Microbiol., 33(3), 675-680.

SABLJIC A., 1990,
Topological indices and environmental chemistry,
in Practical application of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in environmental chemistry and toxicology, 61-82, KARCHER et DEVILLERS (Eds.),
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

SABLJIC A. et PROTIC, 1982,
Molecular connectivity : a novel method for prediction of bioconcentration factor of hazardous chemicals,
Chemico-Biological Interact., 42, 301-310.

de SAXCE, 1990,
Méthodes d'évaluation de la biodégradation aérobie dans les milieux aquatiques,
in Evaluation de la biodégradation des substances organiques dans l'environnement,
p. 158, Rapport et communications du congrès international de Paris, SEFA.

SCHMIDT E.L. et BELSER L.W., 1982,
Nitrifying bacteria,
in Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, Agronomy monographs N9 (2 ed.), Madison, Wis.

SEKI H., 1976,
Method for estimating the decomposition of hexadecane in the marine environment,
Appl. Environ. Microbiol., 31(3), 439-441.

SIMS G.K., SOMMERS L.E., 1985,
Biodegradation of pyridine derivatives in soil suspensions,
Environ. Toxicol. Chem., 5, 503-509.

SOLANAS A.M., PARES R., BAYONA J.M., ALBAIGES J., 1984,
Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial cultures,
Chemosphere, 13 (5/6), 593-601.

SOMMERVILLE C.C., MONTI C.A. et SPAIN J.C., 1985,
Modification of 14C-MPN method for use with non-polar and volatile substrates,
Appl. Environ. Microbiol., 49(3), 711-713.

- SORIANO S. et WALKER N., 1968,
Isolation of ammonia-oxidizing autotrophic bacteria
J. Appl. Bacteriol., **31**, 493-497.
- SPAIN J.C., PRITCHARD P.H. et BOURQUIN A.W., 1980,
Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine
and freshwater environments,
Appl. Environ. Microbiol., **40**(4), 726-734.
- STEEN W.C. et COLLETTE T.W., 1987,
Microbial degradation of seven amides by suspended bacterial populations,
Appl. Environ. Microbiol., **55**(10), 2545-2549.
- SUGATT R.H., O'GRADY D.P., BANERJEE S., HOWARD P.H., GLEDHILL W.E.,
1984,
Shake flask biodegradation of 15 commercial phthalate esters,
Appl. Environ. Microbiol., **47** (4), 601-606.
- SWAIN et LUPTON, 1968,
- SWINDOLL C.M., AELION C.M., DOBBINS D.C., JIANG O., LONG S.C. et
PFAENDER F.K., 1988,
Aerobic biodegradation of natural and xenobiotic organic compounds by subsurface
microbial communities,
Environ. Toxicol. Chem., **7**, 291-299.
- SZLADOW A.J., 1991,
Application of DATALOGIC™ artificial intelligence software to the derivation of
QSAR correlations,
Reduct Systems Inc., Saskatchewan, Canada.
- URBAIN V., 1988,
Evolution de la physiologie bactérienne en absence d'apport nutritif,
DEA de Toxicologie, Centre des Sciences de l'Environnement, Metz.
- VAISHNAV D.D., BOETHLING R.S., BABEU L., 1987,
Quantitative structure-biodegradability relationships for alcohols, ketones and alicyclic
compounds,
Chemosphere, **16** (4), 695-703.
- WINDHAM R.C. et COSTERTON J.W., 1981,
Heterotrophic potentials and hydrocarbon biodegradation potentials of sediment
microorganisms within Athabasca oil-sand deposit,
Appl. Environ. Microbiol., **41**(3), 783-790.

YONEZAWA Y., URUSHIGAWA Y., 1979,
Chemico-biological interactions in biological purification systems V. Relation between
biodegradation rate constants of aliphatic alcohols by activated sludge and their
partition coefficients in a 1-octanol-water system,
Chemosphere, 3, 139-142.

ADDENDUM

Les publications suivantes ont été ommises dans la liste bibliographique :

GRADY, 1985

KITANO et TAKATSUKI, 1988

Toutefois, les références exactes de ces 2 publications n'ont pu être retrouvées
malgré une interrogation à l'INIST.

ANNEXES

ANNEXE I-I

**Courbes
de biodégradation immédiate**

Figures 1 à 5

Courbes de biodégradation dans le test de biodégradabilité immédiate OCDE modifié avec un inoculum frais.

Figure 1 : aniline

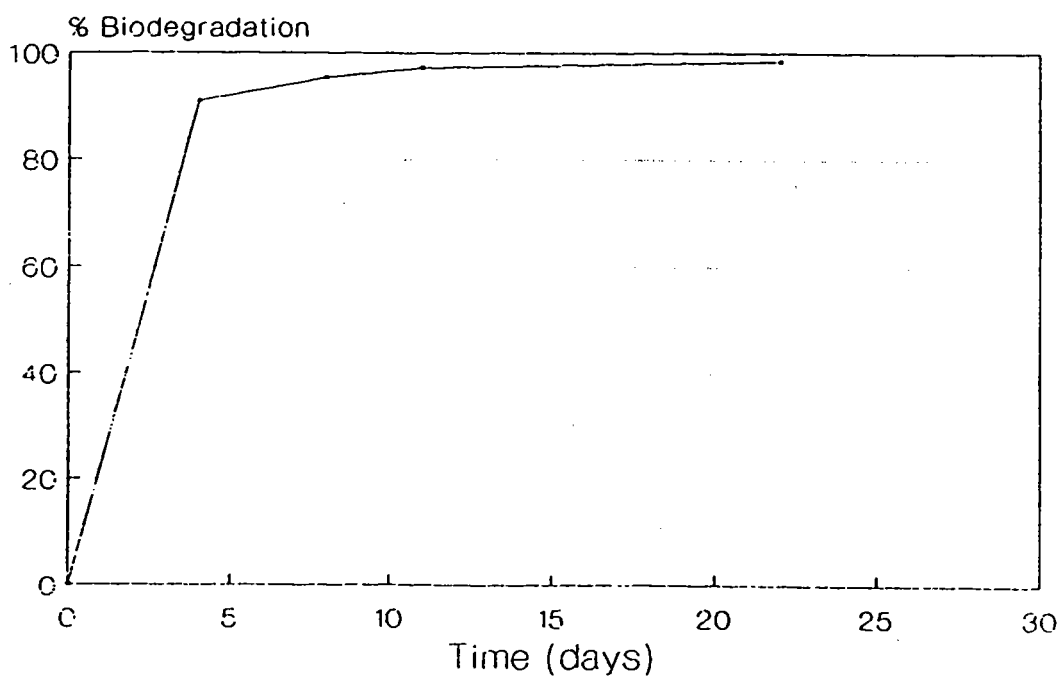
Figure 2 : 1,6-dihydrooxyhexane

Figure 3 : monoéthanolamine

Figure 4 : pentaérythritol

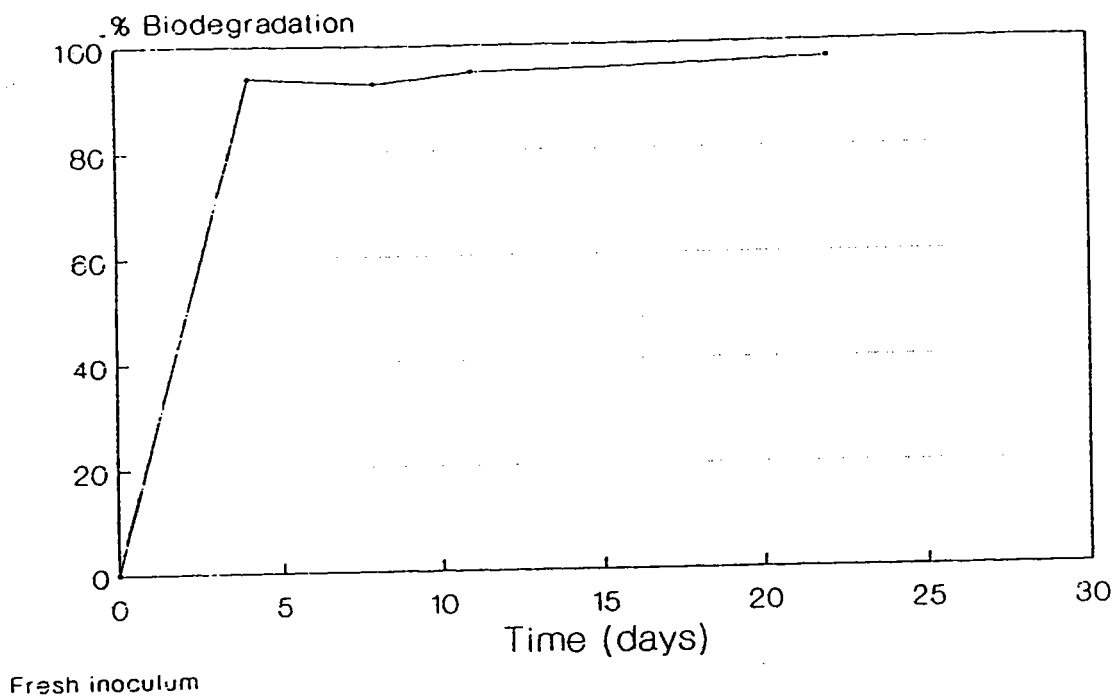
Figure 5 : 2,4,6-trichlorophénol

ANILIN DOC Die-Away

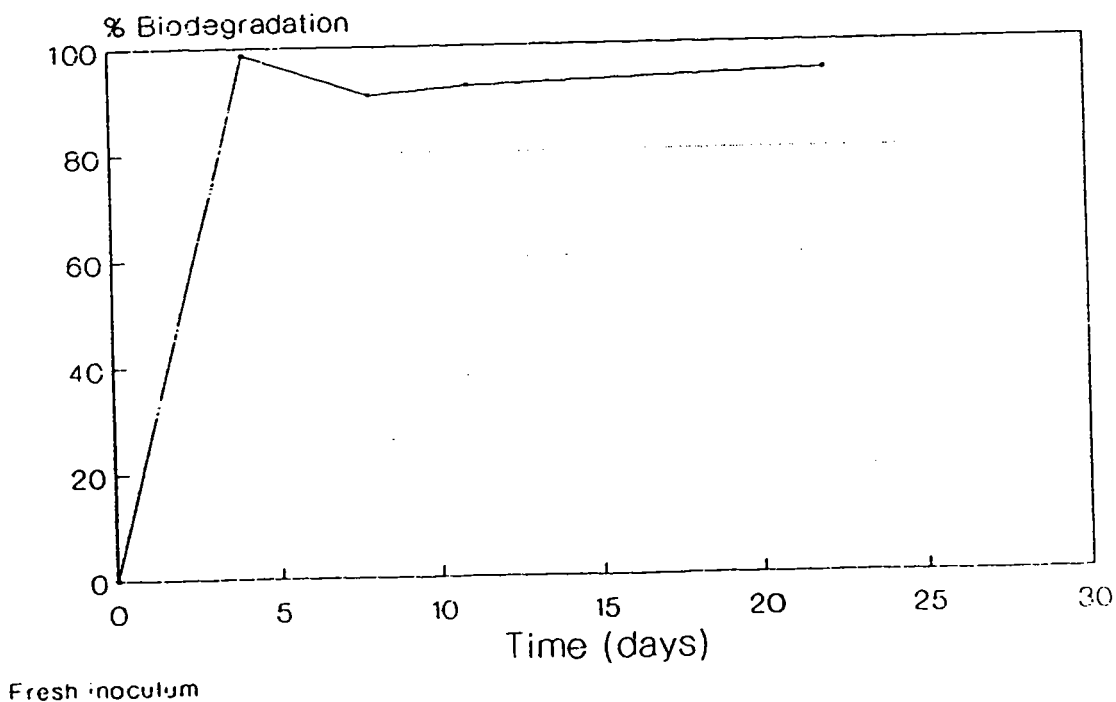


Fresh inoculum

1,6-DIHYDROXYHEXANE DOC Die-Away

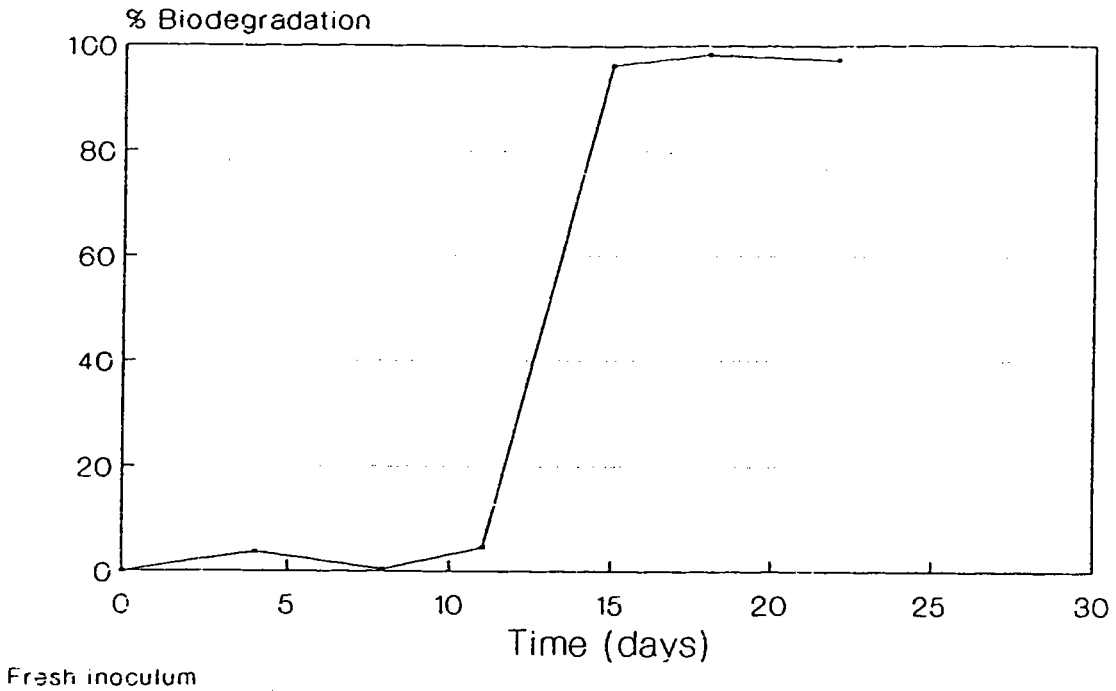


MONOETHANOLAMINE DOC Die-Away



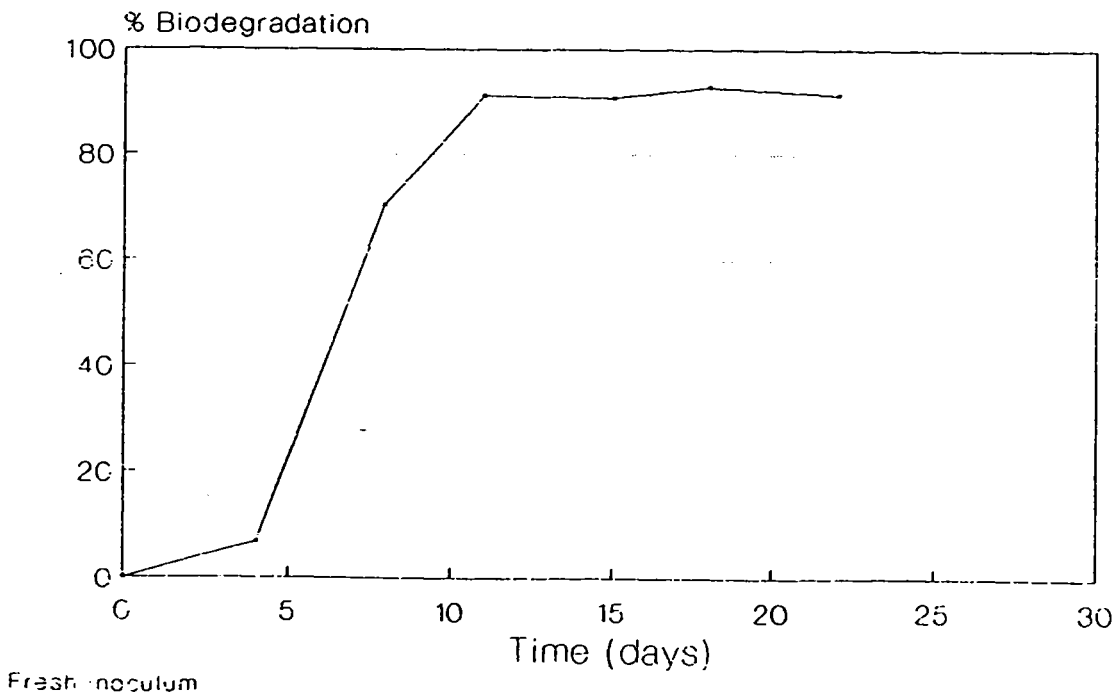
PENTAERYTHRITOL

DOC Die-Away



2,4,6-TRICHLOROPHENOL

DOC Die-Away



Figures 6 à 10

Courbes de biodégradation dans le test de biodégradabilité immédiate OCDE modifié avec un inoculum préconditionné.

Figure 6 : aniline

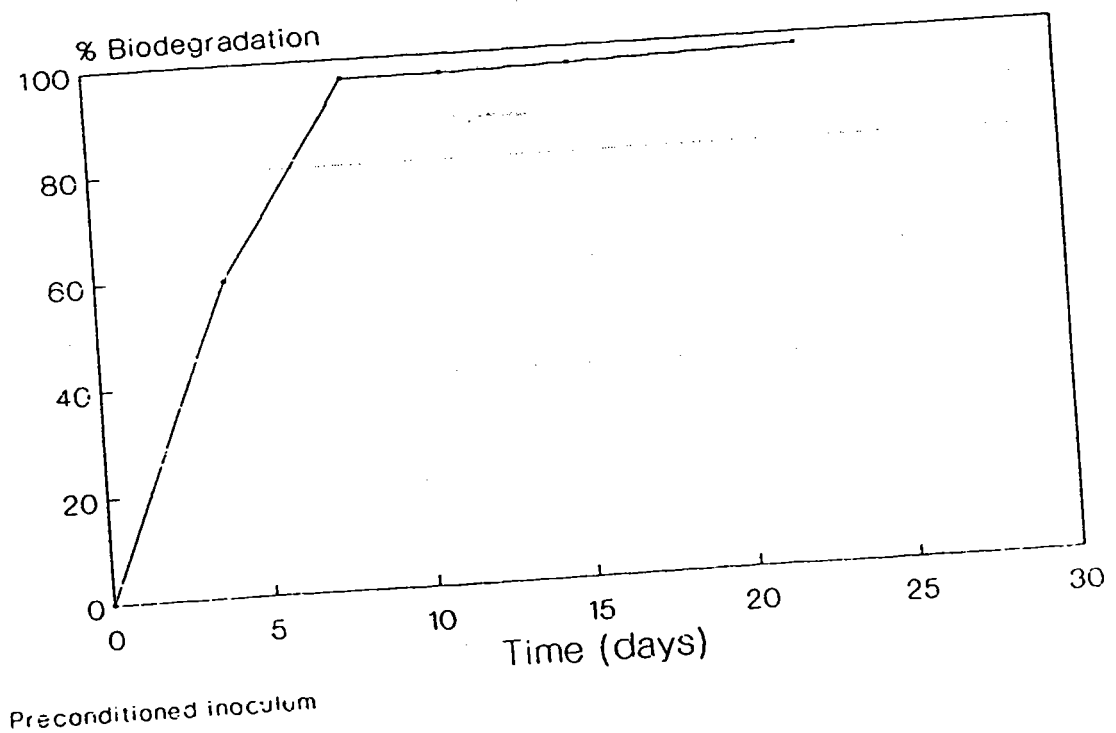
Figure 7 : 1,6-dihydroxyhexane

Figure 8 : monoéthanolamine

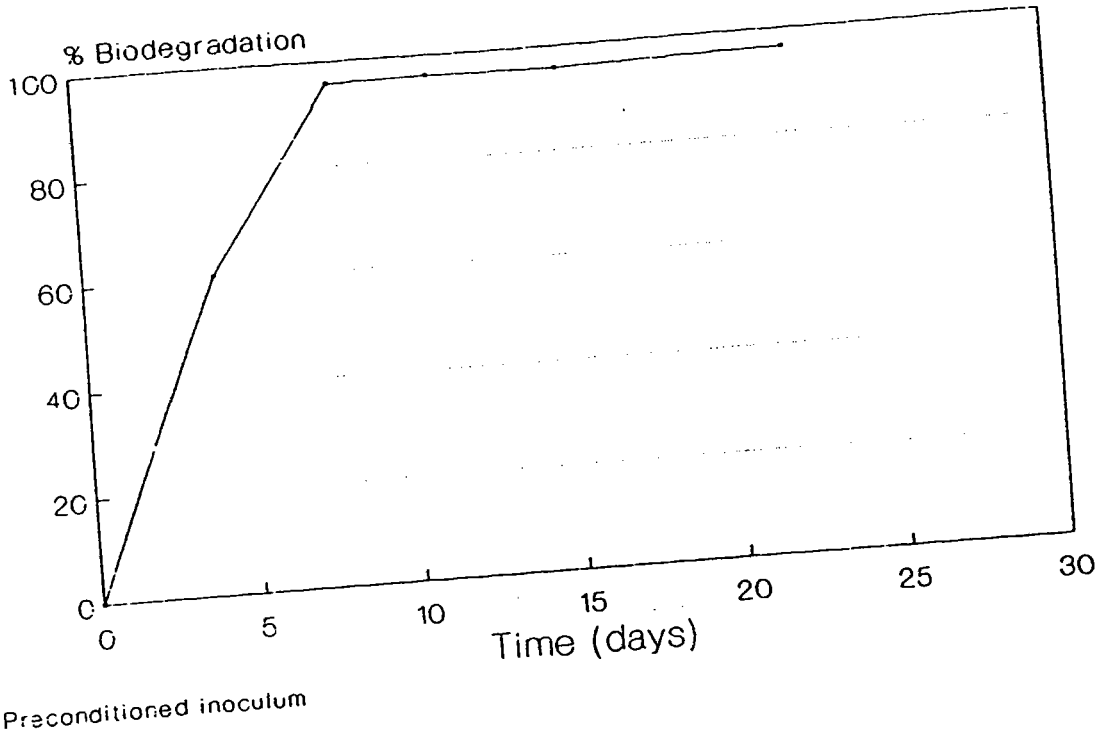
Figure 9 : pentaérythritol

Figure 10 : 2,4,6-trichlorophénol

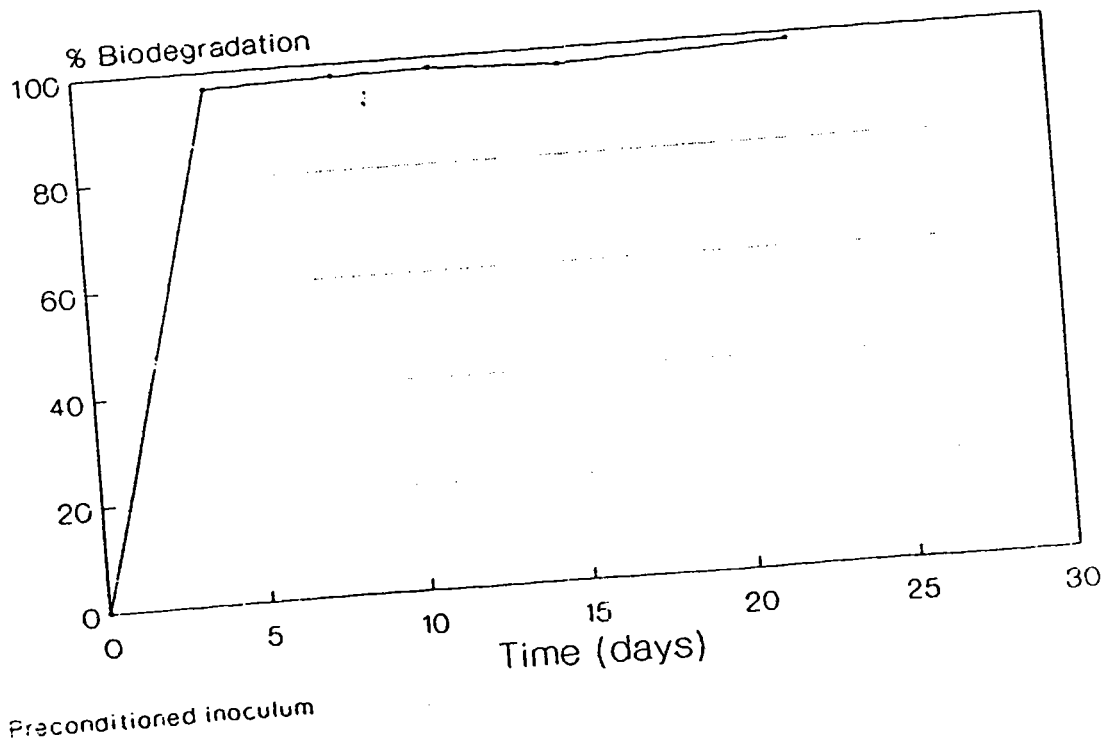
ANILIN DOC Die-Away



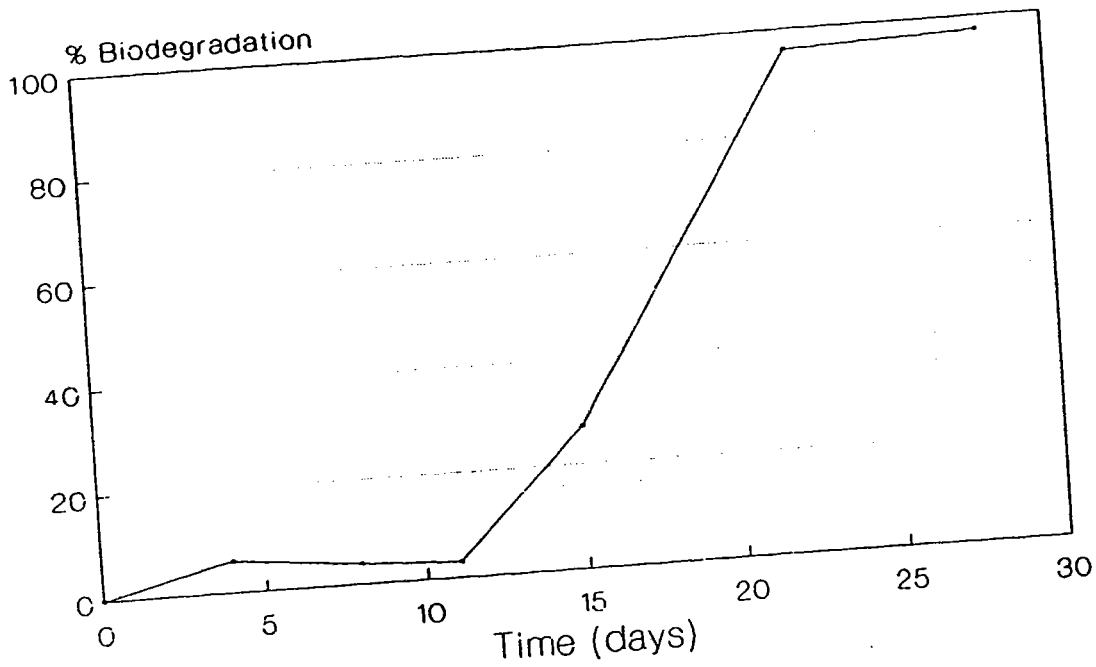
1,6-DIHYDROXYHEXANE DOC Die-Away



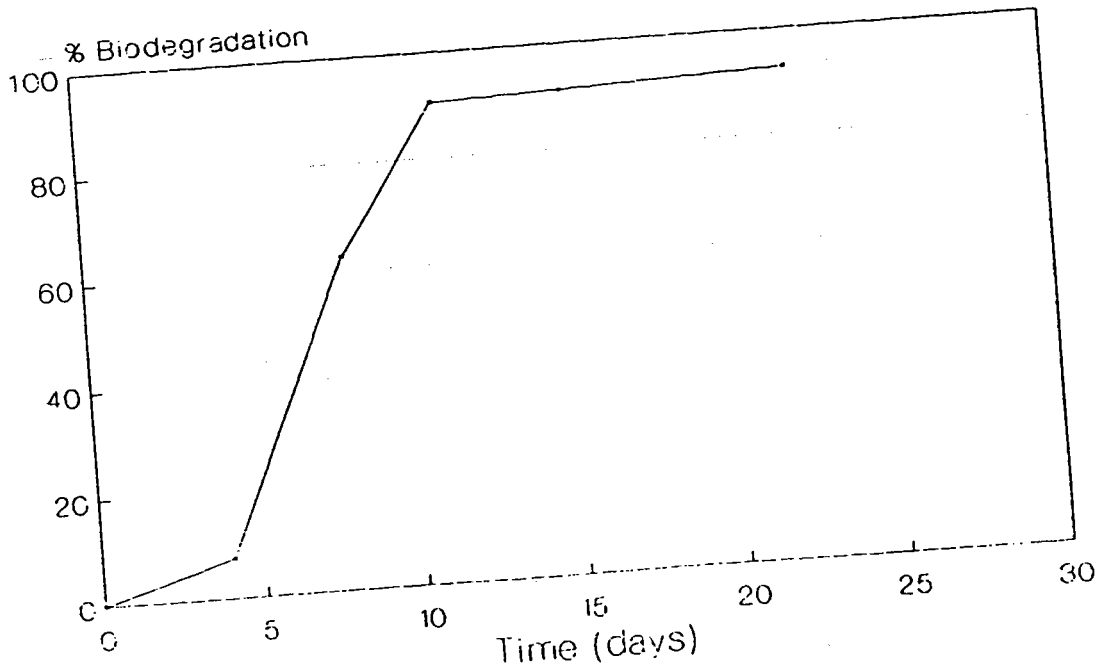
MONOETHANOLAMINE DOC Die-Away



PENTAERYTHRITOL DOC Die-Away



2,4,6-TRICHLOROPHENOL DOC Die-Away



Figures 11 à 15

Courbes de biodégradation dans le test de biodégradabilité immédiate
Strum modifié avec un inoculum frais.

Figure 11 : aniline

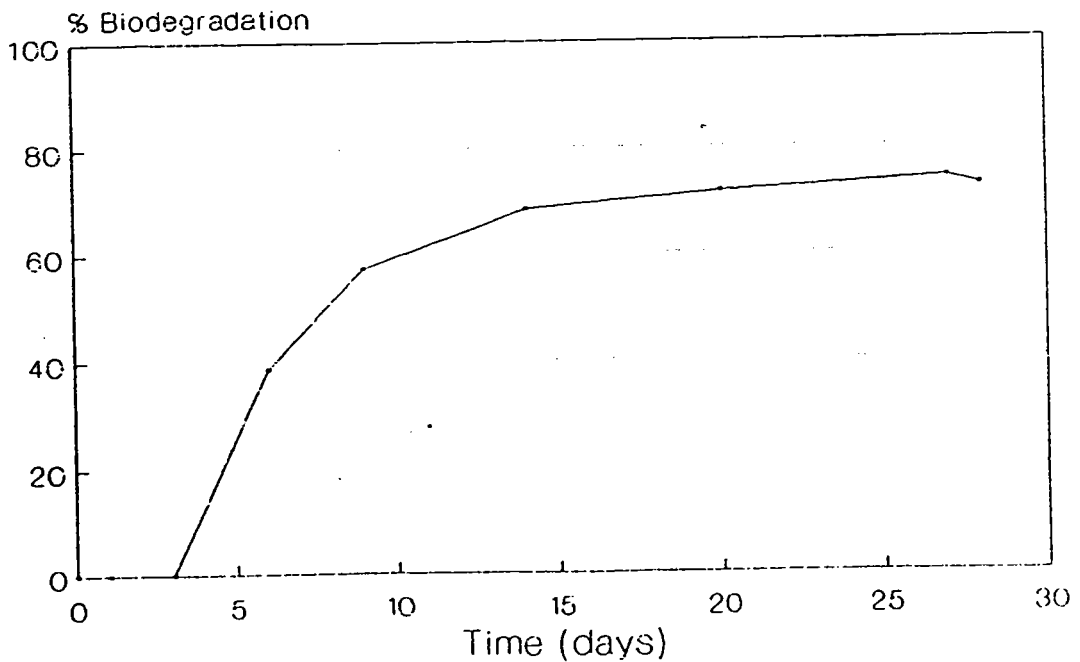
Figure 12 : 1,6-dihydrooxyhexane

Figure 13 : monoéthanolamine

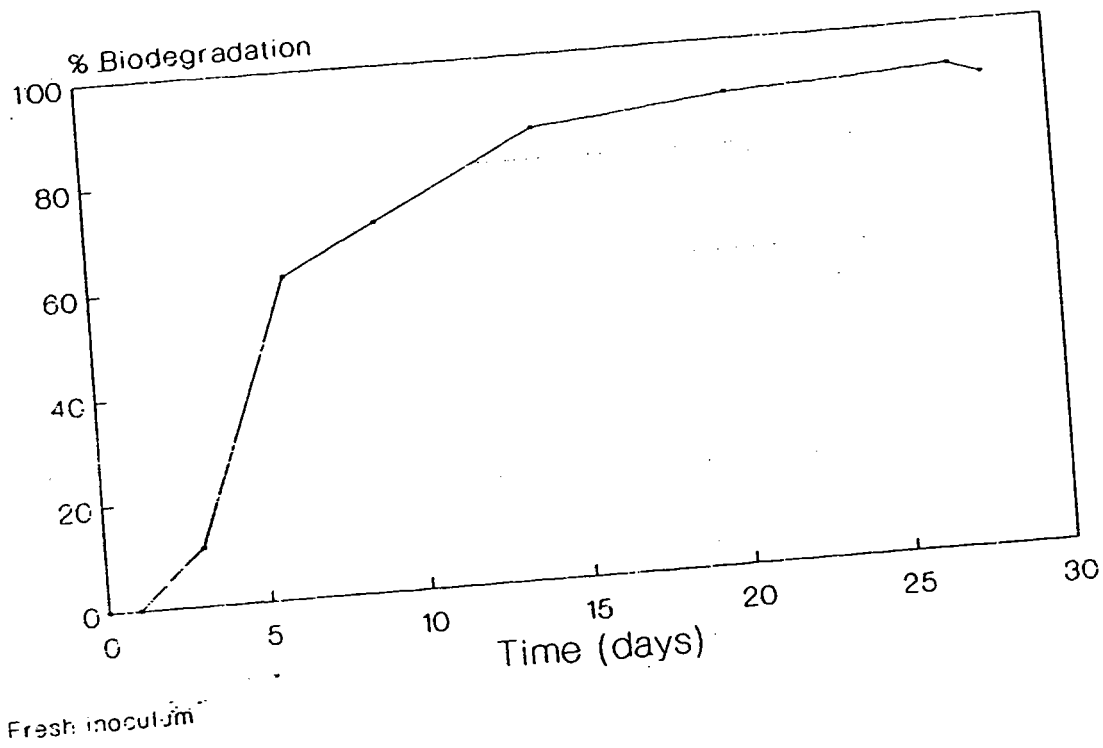
Figure 14 : pentaérythritol

Figure 15 : 2,4,6-trichlorophénol

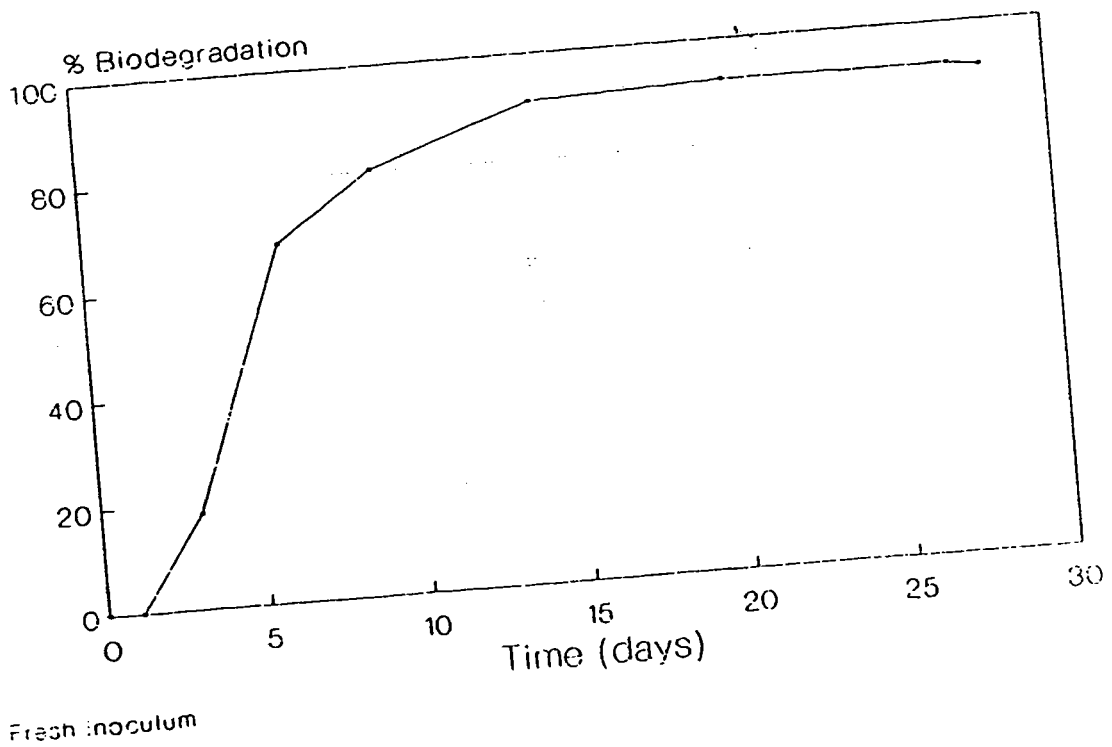
ANILIN CO₂ evolved



1,6-DIHYDROXYHEXANE CO₂ evolved

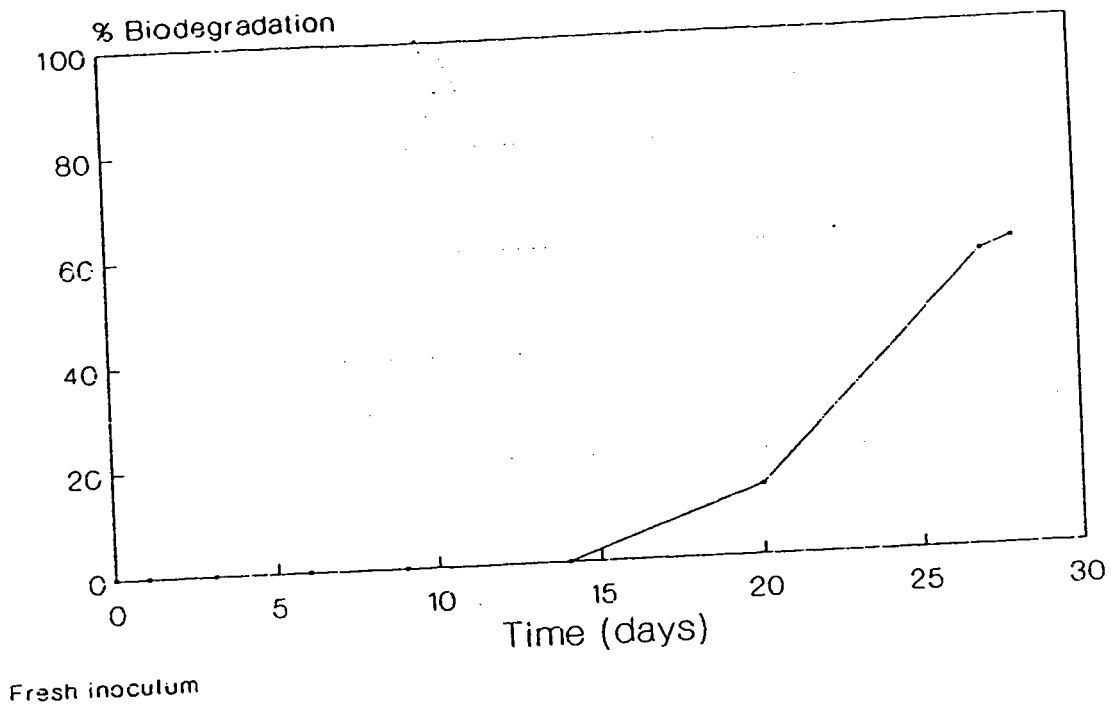


MONOETHANOLAMINE CO₂ evolved



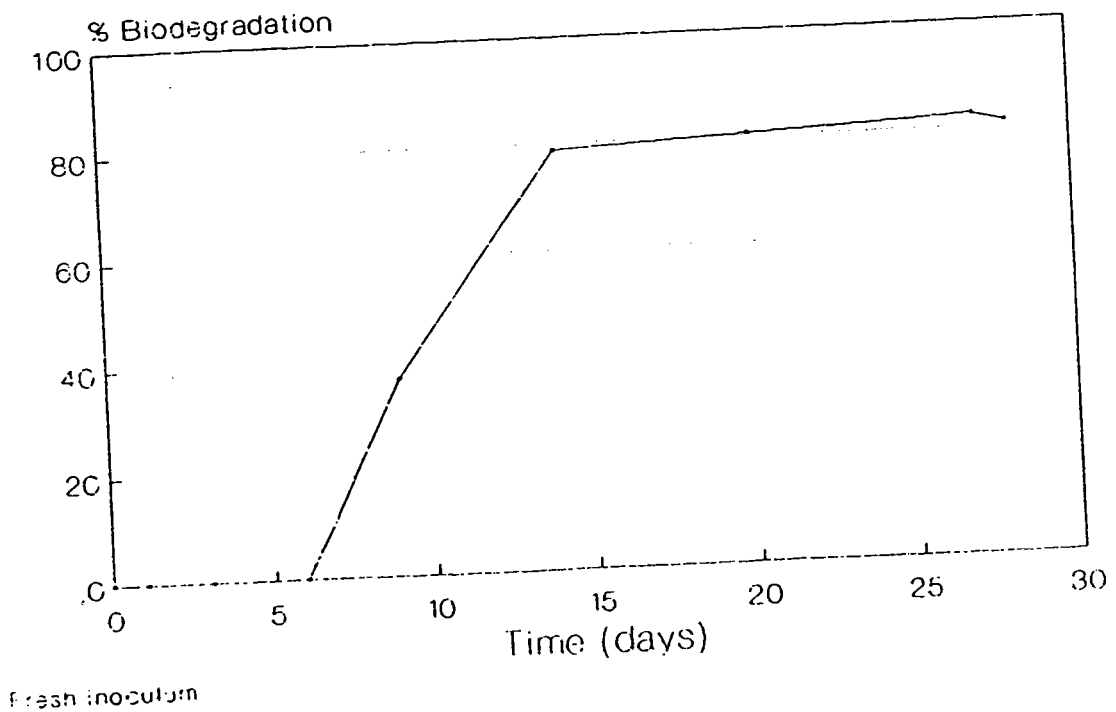
PENTAERYTHRITOL

CO₂ evolved



2,4,6-TRICHLOROPHENOL

CO₂ evolved



Figures 16 à 20

Courbes de biodégradation dans le test de biodégradabilité immédiate
Strum modifié avec un inoculum préconditionné.

Figure 16 : aniline

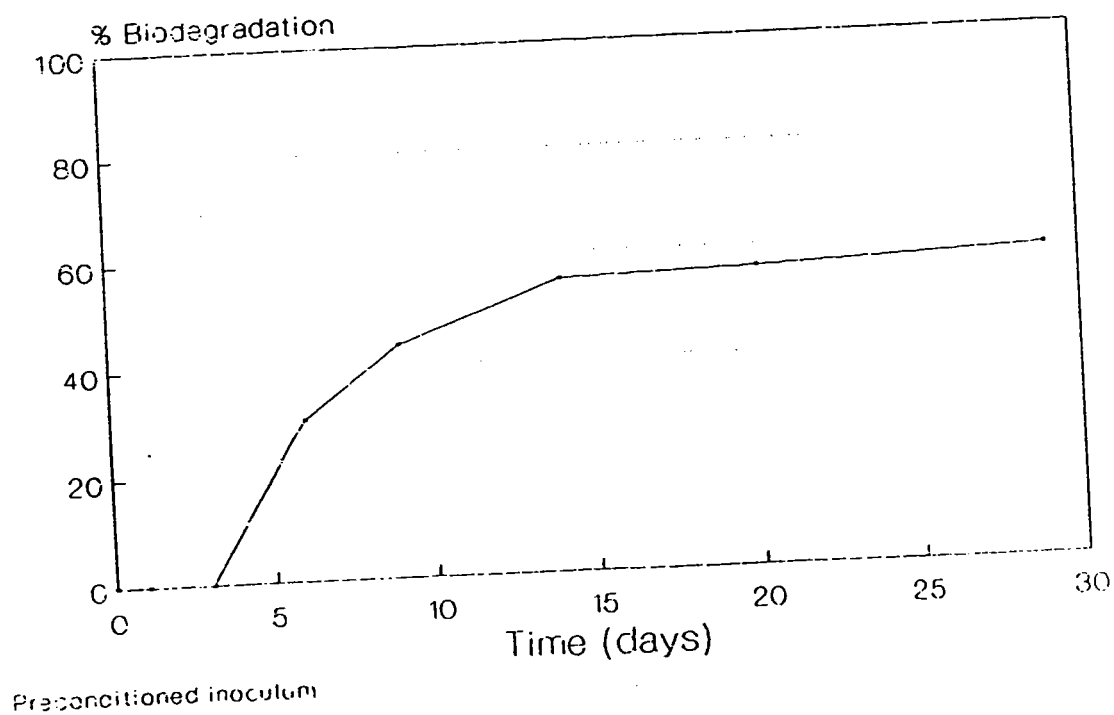
Figure 17 : 1,6-dihydroxyhexane

Figure 18 : monoéthanolamine

Figure 19 : pentaérythritol

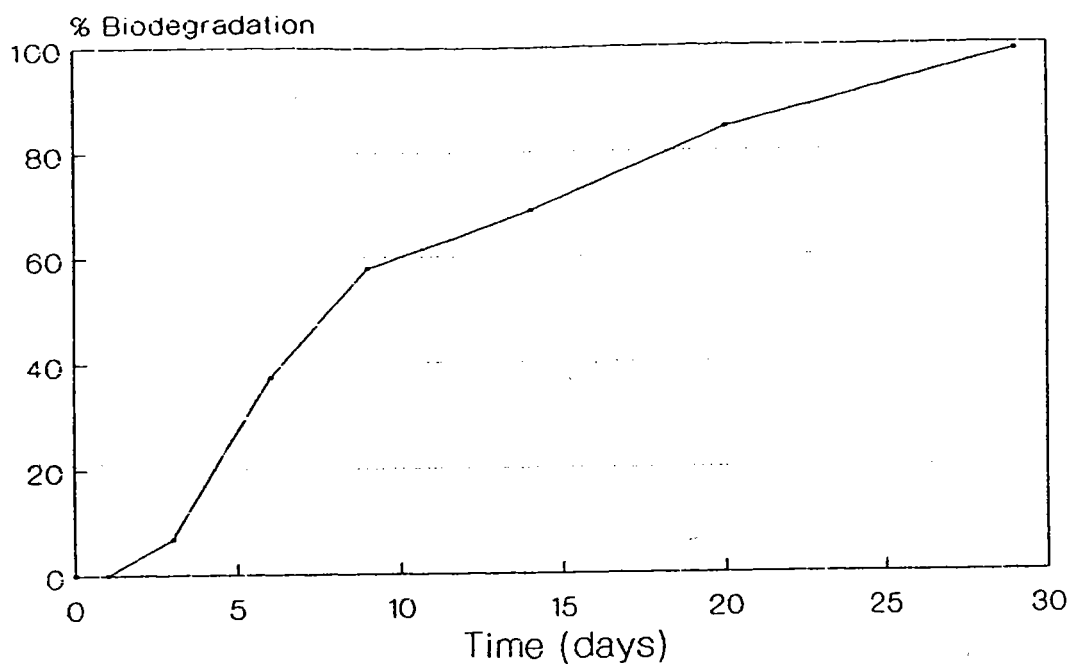
Figure 20 : 2,4,6-trichlorophénol

ANILIN CO₂ evolved



1,6-DIHYDROXYHEXANE

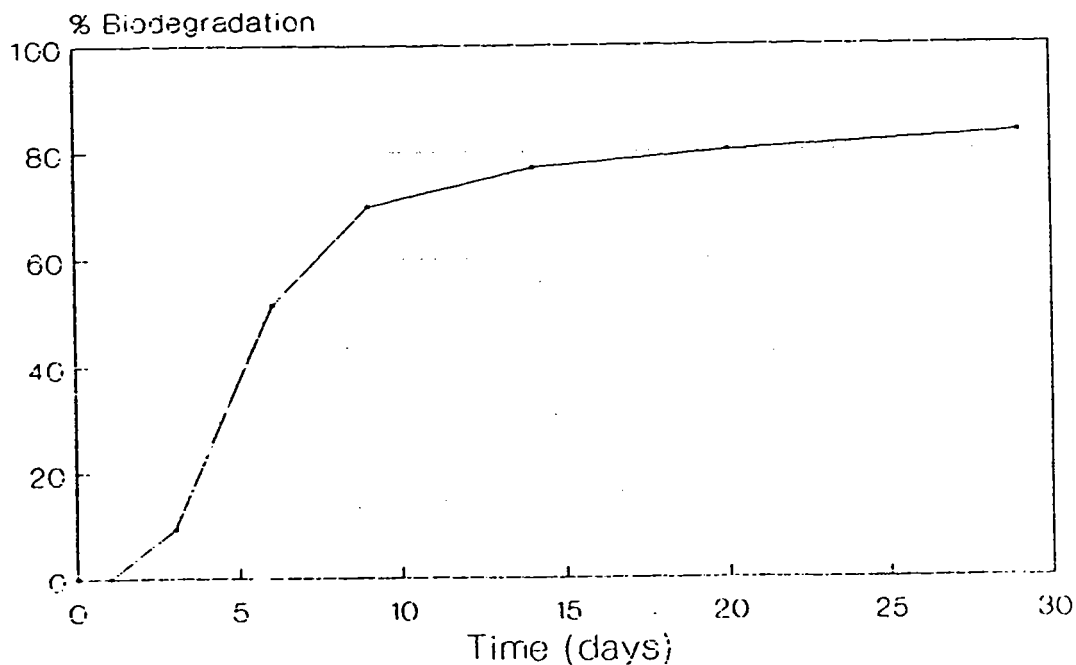
CO₂ evolved



Preconditioned inoculum

MONOETHANOLAMINE

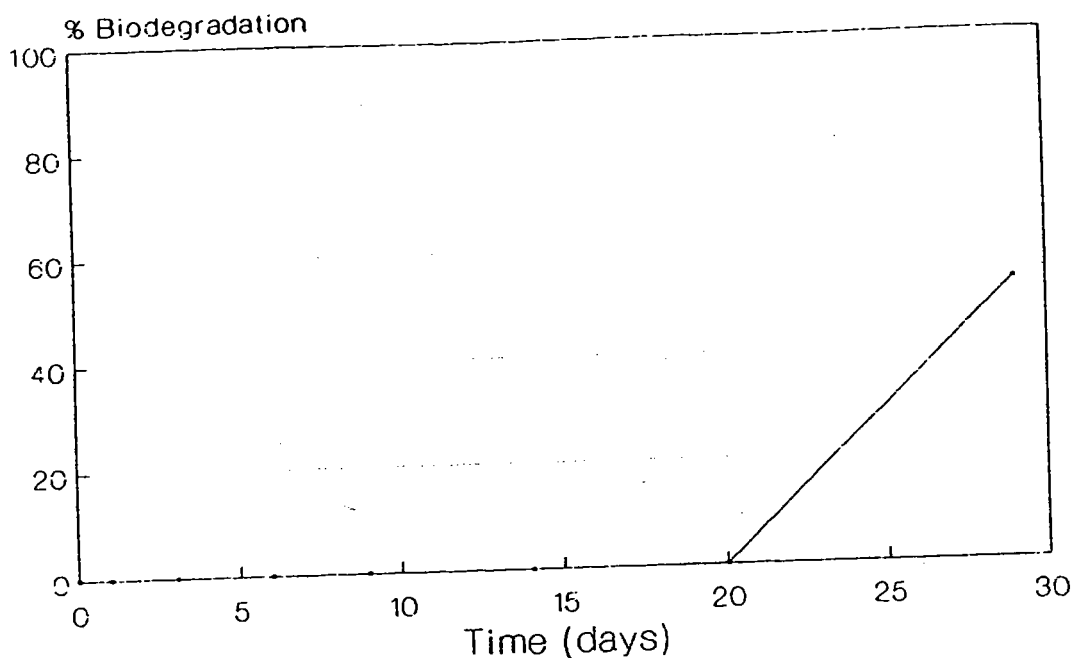
CO₂ evolved



Preconditioned inoculum

PENTAERYTHRITOL

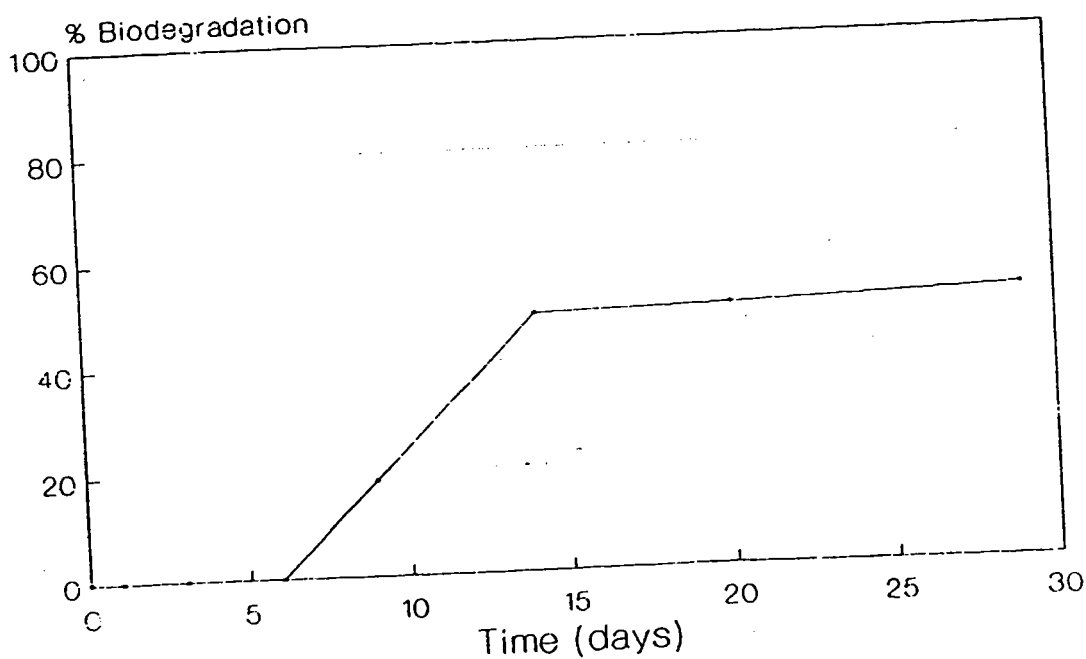
CO2 evolved



Preconditioned inoculum

2,4,6-TRICHLOROPHENOL

CO2 evolved



Preconditioned inoculum

Figures 21 à 25

Courbes de biodégradation dans le test de biodégradabilité immédiate en fioles fermées avec un inoculum frais.

Figure 21 : aniline

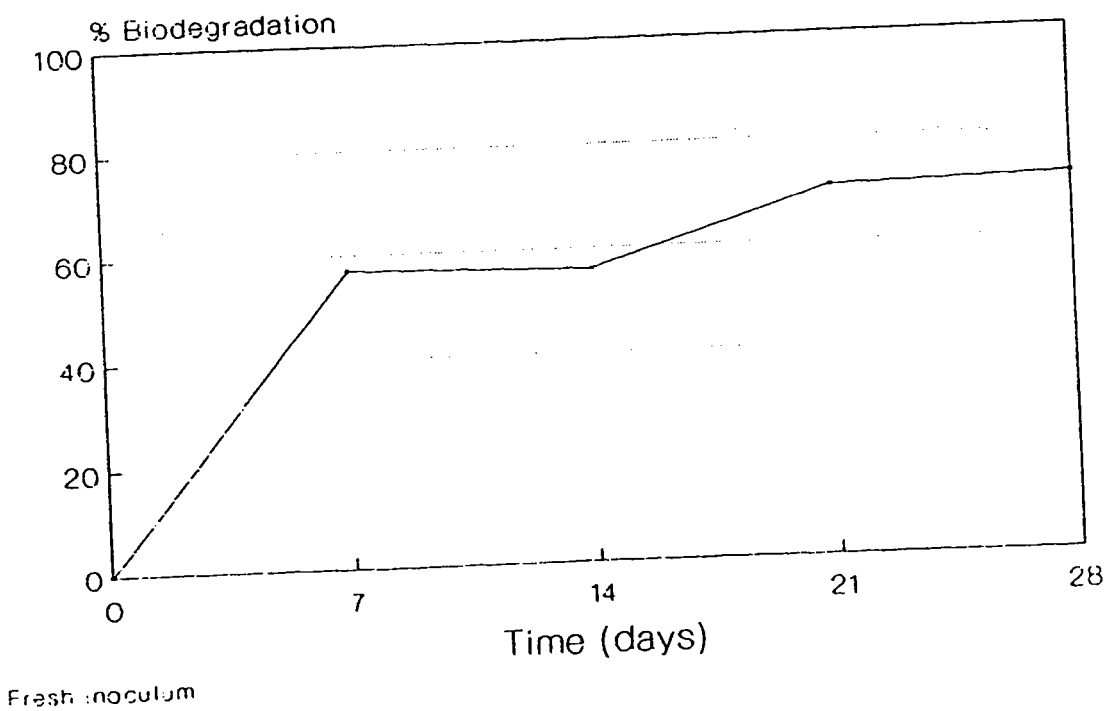
Figure 22 : 1,6-dihydroxyhexane

Figure 23 : monoéthanolamine

Figure 24 : pentaérythritol

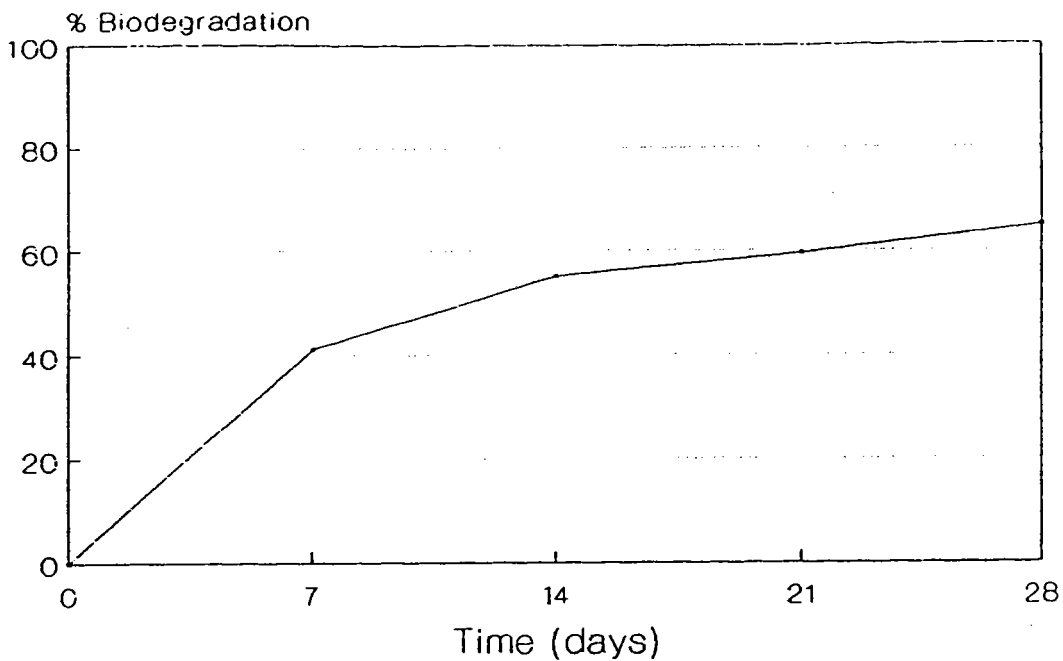
Figure 25 : 2,4,6-trichlorophénol

ANILINE Closed Bottle Test



1,6-DIHYDROXYHEXANE

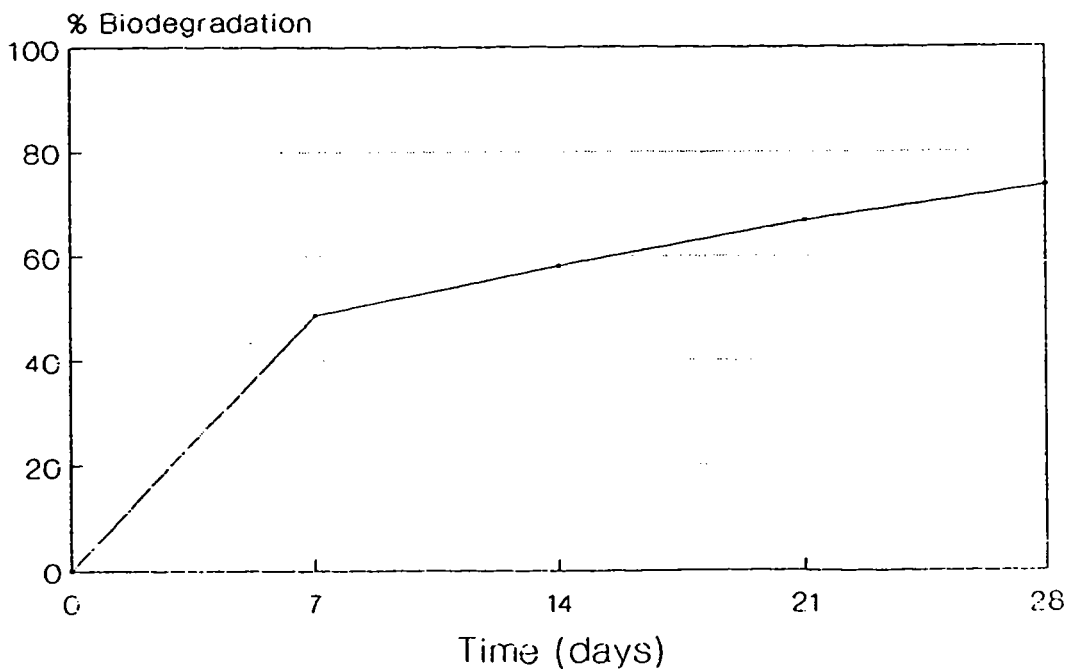
Closed Bottle Test



Fresh inoculum

MONOETHANOLAMINE

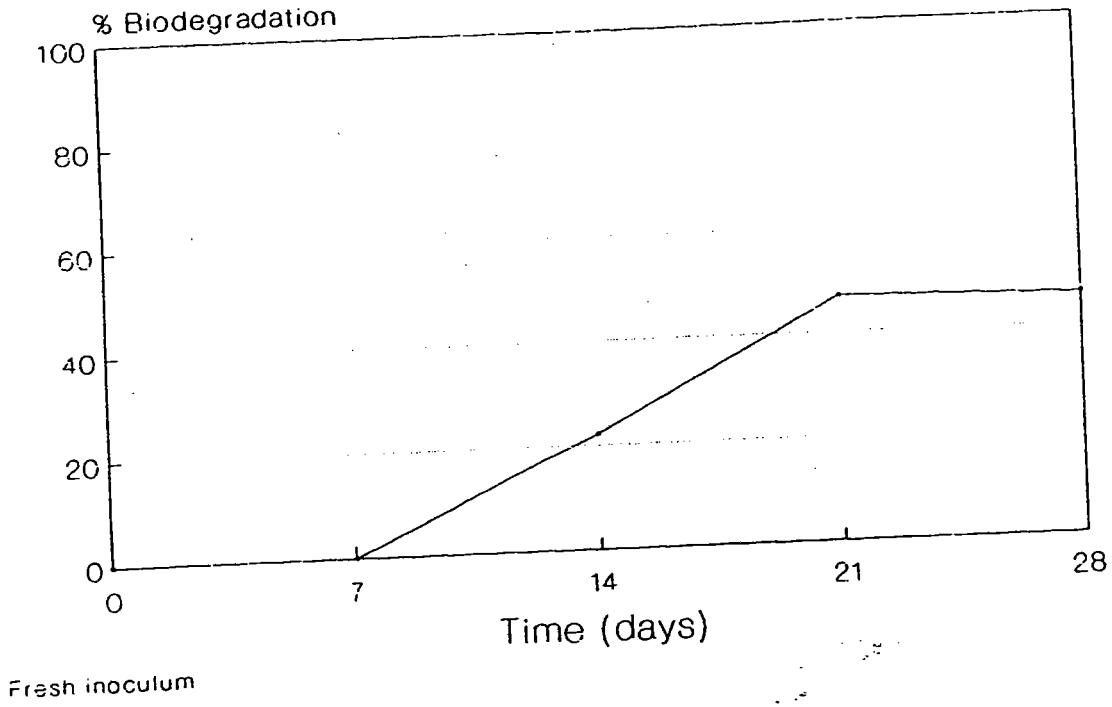
Closed Bottle Test



Fresh inoculum

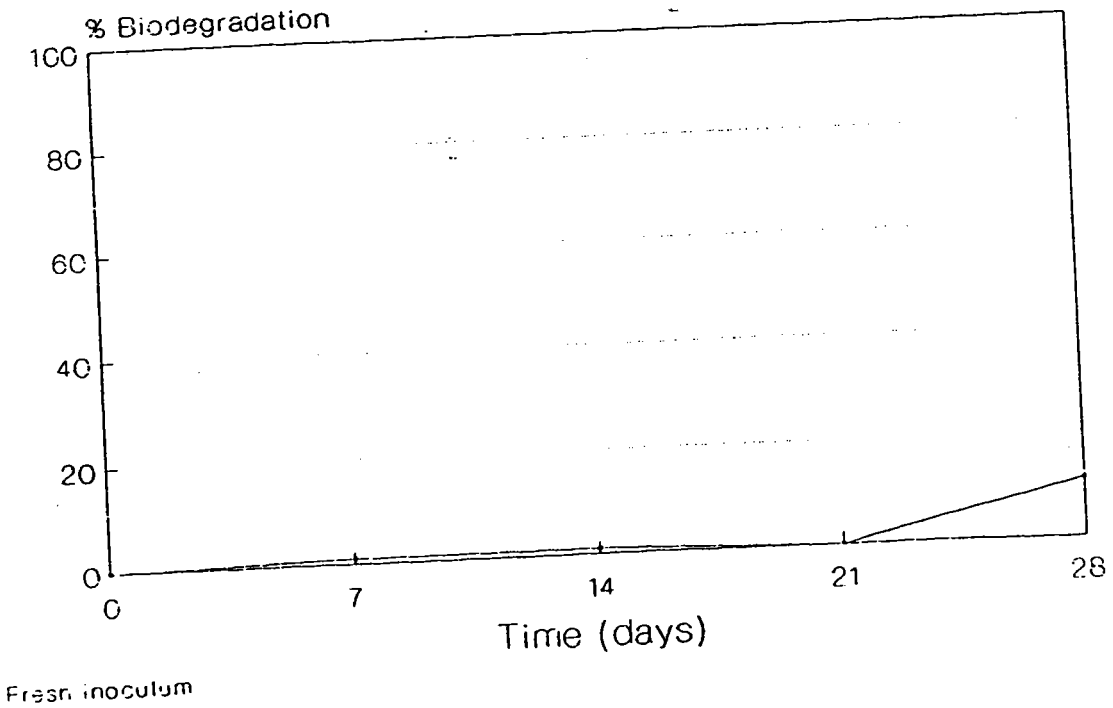
PENTAERYTHRITOL

Closed Bottle Test



2,4,6-TRICHLOROPHENOL

Closed Bottle Test



Figures 26 à 30

Courbes de biodégradation dans le test de biodégradabilité immédiate en fioles fermées avec un inoculum préconditionné.

Figure 26 : aniline

Figure 27 : 1,6-dihydrooxyhexane

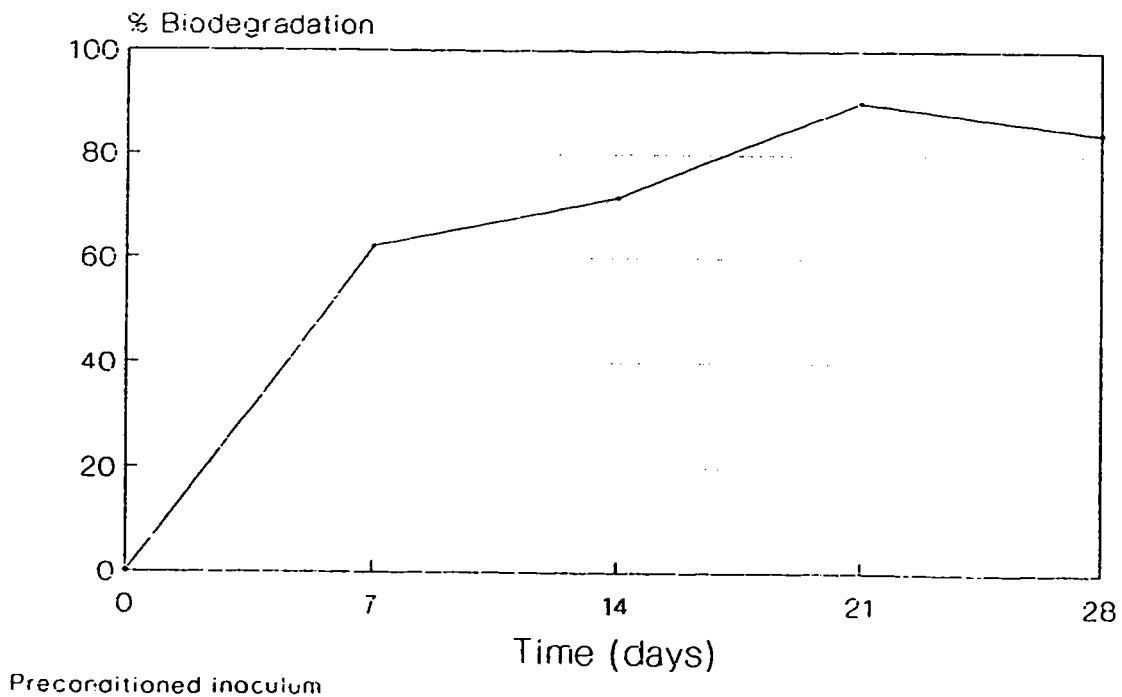
Figure 28 : monoéthanolamine

Figure 29 : pentaérythritol

Figure 30 : 2,4,6-trichlorophénol

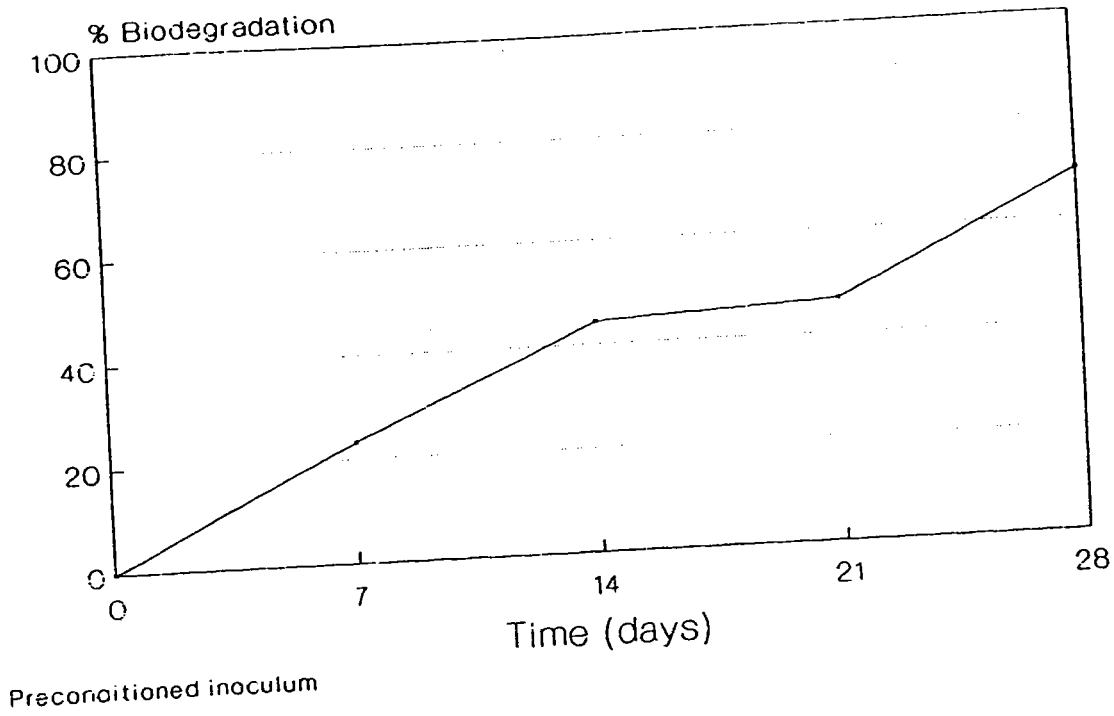
ANILINE

Closed Bottle Test



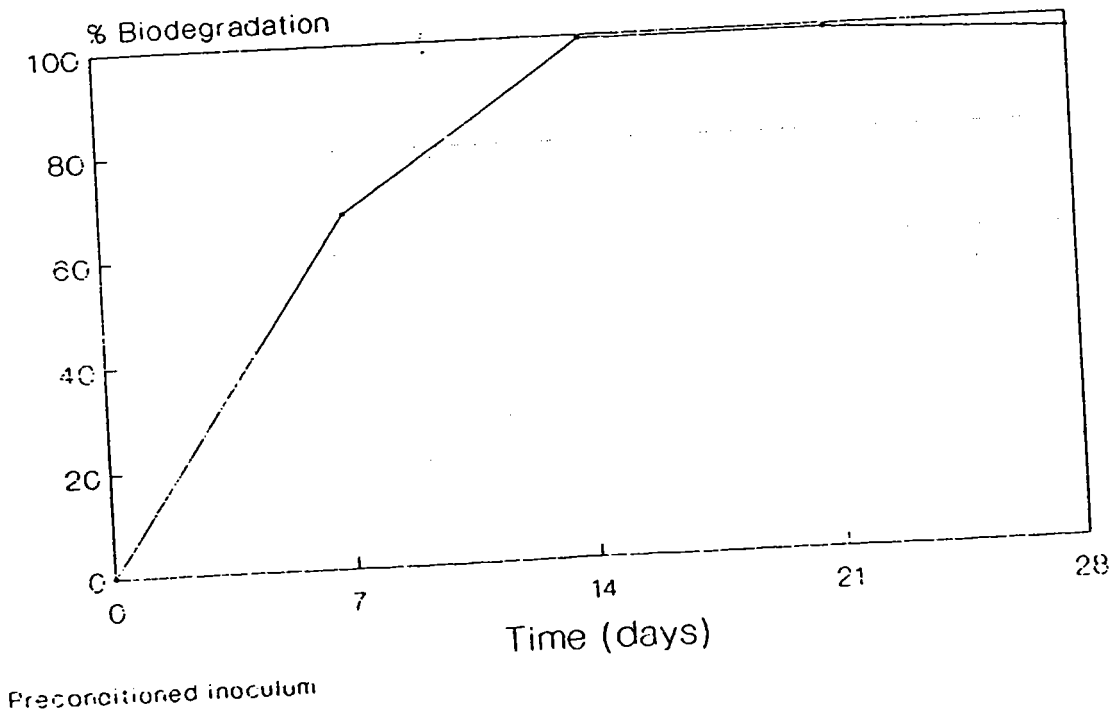
1,6-DIHYDROXYHEXANE

Closed Bottle Test



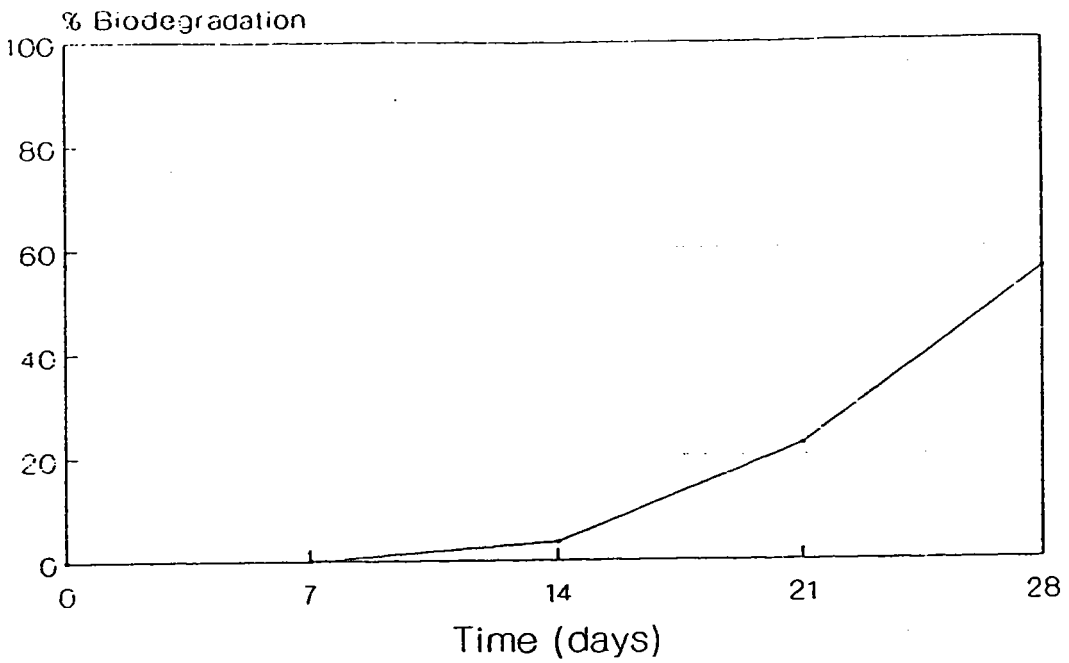
MONOETHANOLAMINE

Closed Bottle Test



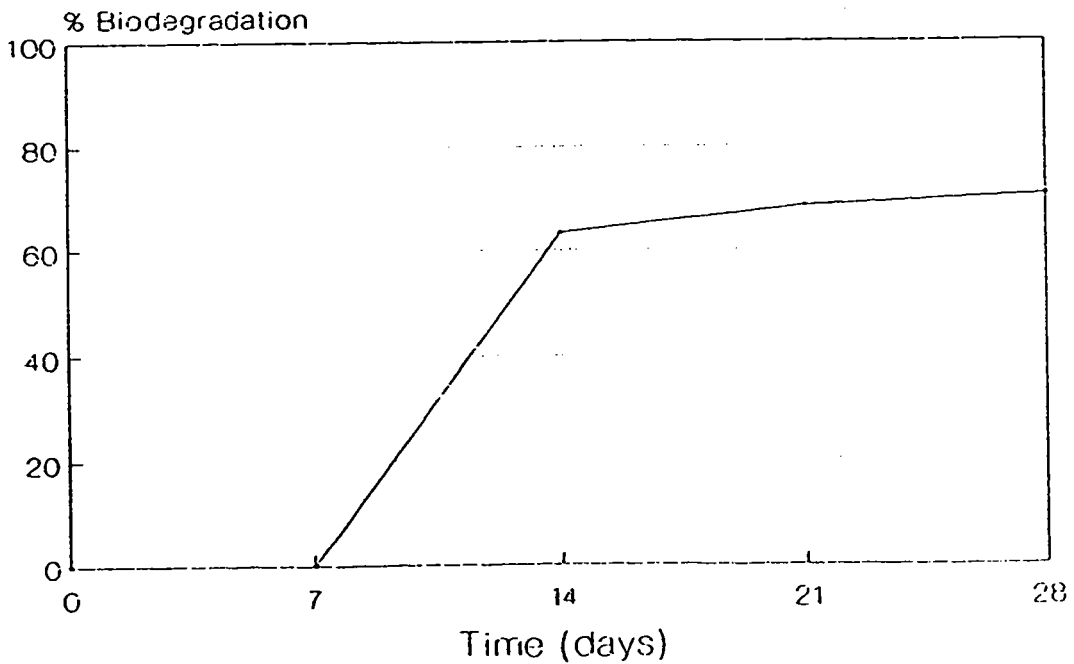
PENTAERYTHRITOL

Closed Bottle Test



2,4,6-TRICHLOROPHENOL

Closed Bottle Test



ANNEXE III - I

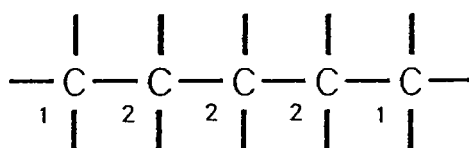
Exemples de calcul des indices de connectivité

1) Calcul d'indices de connectivité simples

a) Cas des pentanes (BOETHLING, 1986)

a.1.) Pentane

STRUCTURE



(Les nombres apposés aux sommets correspondent aux nombres de voisins de chaque sommet)

-⁰X Motif structural de base : 1 atome

$${}^0X = (1)^{-0,5} + (2)^{-0,5} + (2)^{-0,5} + (2)^{-0,5} + (1)^{-0,5} = 4,1213$$

-¹X Motif structural de base : 2 atomes

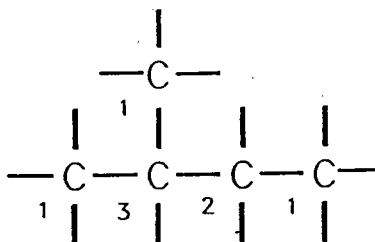
$${}^1X = (1)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} + (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} + (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} + (1)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} = 2,4142$$

-²X Motif structural de base : 3 atomes

$${}^2X = (1)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} + (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} + (1)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} = 1,3536$$

a.2.) Méthyl-2-butane

STRUCTURE



(Les nombres apposés aux sommets correspondent aux nombres de voisins de chaque sommet)

- 0X Motif structural de base : 1 atome

$${}^0X = (1)^{-0,5} + (3)^{-0,5} + (2)^{-0,5} + (2)^{-0,5} + (1)^{-0,5} = 3,9916$$

- 1X Motif structural de base : 2 atomes

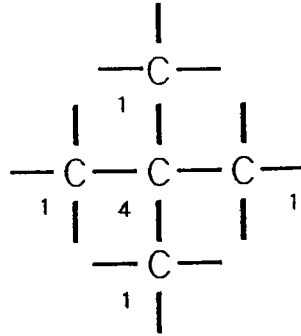
$${}^1X = (1)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} + (3)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} + (3)^{-0,5} \times (1)^{-0,5} + (2)^{-0,5} \times (1)^{-0,5} = 2,2701$$

- 2X Motif structural de base : 3 atomes

$${}^2X = (1)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (1)^{-0,5} + (1)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} + (3)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (1)^{-0,5} = 1,8021$$

a.3.) Diméthylpropane

STRUCTURE



(Les nombres apposés aux sommets correspondent aux nombres de voisins de chaque sommet)

- 0X Motif structural de base : 1 atome

$$^0X = (1)^{-0,5} + (1)^{-0,5} + (4)^{-0,5} + (1)^{-0,5} + (1)^{-0,5} = 4,5000$$

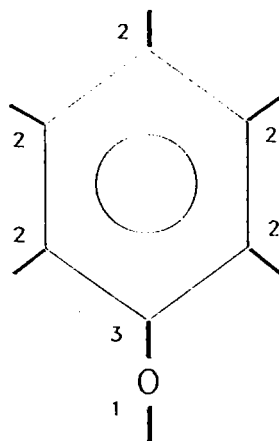
- 1X Motif structural de base : 2 atomes

$$^1X = 4 \times [(1)^{-0,5} \times (4)^{-0,5}] = 2,0000$$

- 2X Motif structural de base : 3 atomes

$$^2X = 4 \times [(1)^{-0,5} \times (4)^{-0,5} \times (1)^{-0,5}] + 2 \times [(1)^{-0,5} \times (4)^{-0,5} \times (1)^{-0,5}] = 3,0000$$

b) Cas du phénol



STRUCTURE

(Les nombres apposés aux sommets correspondent aux nombres de voisins de chaque sommet)

-⁰X Motif structural de base : 1 atome

$${}^0X = (1)^{-0,5} + (3)^{-0,5} + 5 \times [(2)^{-0,5}] = 5,1129$$

-¹X Motif structural de base : 2 atomes

$$\begin{aligned} {}^1X &= [(1)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] + 2 \times [(3)^{-0,5} \times (2)^{-0,5}] \\ &\quad + 4 \times [(2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5}] \\ &= 3,3938 \end{aligned}$$

-²X Motif structural de base : 3 atomes

$$\begin{aligned} {}^2X &= 2 \times [(1)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (2)^{-0,5}] \\ &\quad + 2 \times [(3)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5}] \\ &\quad + 3 \times [(2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5}] \\ &= 2,4546 \end{aligned}$$

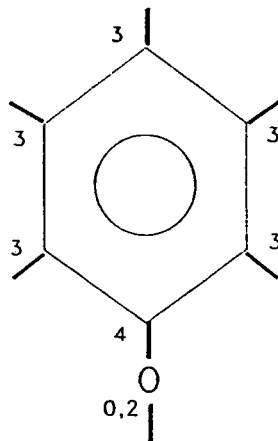
- 3X Motif structural de base : 3 atomes

$$\begin{aligned} {}^3X &= 3 \times [(1)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5}] \\ &+ 2 \times [(3)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5}] \\ &+ 2 \times [(2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5} \times (2)^{-0,5}] \\ &= 1,7742 \end{aligned}$$

2) Calcul d'indices de connectivité de valence cas du phénol

Les valeurs attribuées aux sommets (atomes) sont corrigées par la valence de ces atomes selon les formules des équations 12 et 13 du chapitre III.

STRUCTURE



Valeur attribuée à l'atome d'hydrogène :

$$= (2 - 1)/(8 - 2 - 1) = 0,2$$

- $^0X^v$ Motif structural de base : 1 atome

$${}^0X^v = (4)^{-0,5} + (0,2)^{-0,5} + 5 \times [(3)^{-0,5}] = 5,6228$$

- ${}^1X^v$ Motif structural de base : 2 atomes

$$\begin{aligned} {}^1X^v &= [(0,2)^{-0,5} \times (4)^{-0,5}] + 2 \times [(4)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &\quad + 4 \times [(3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &= 3,0287 \end{aligned}$$

- ${}^2X^v$ Motif structural de base : 3 atomes

$$\begin{aligned} {}^2X^v &= 2 \times [(0,2)^{-0,5} \times (4)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &\quad + 2 \times [(4)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &\quad + 3 \times [(3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &= 2,2017 \end{aligned}$$

- ${}^3X^v$ Motif structural de base : 3 atomes

$$\begin{aligned} {}^3X^v &= 3 \times [(0,2)^{-0,5} \times (4)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &\quad + 2 \times [(4)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &\quad + 2 \times [(3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &= 1,5328 \end{aligned}$$

3) Calcul d'indices de connectivité prenant en compte le type de sous-graphes structuraux (mX_p et mX_c)
Cas du phénol

Ces types d'indice de connectivité tiennent compte respectivement des motifs structuraux ne contenant pas de ramifications et des motifs structuraux contenant des ramifications latérales.

$$\begin{aligned} {}^3X_p^v &= 2 \times [(0,2)^{-0,5} \times (4)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &\quad + 2 \times [(4)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &\quad + 2 \times [(3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] \\ &= 1,1601 \end{aligned}$$

$${}^3X_c^v = [(0,2)^{-0,5} \times (4)^{-0,5} \times (3)^{-0,5} \times (3)^{-0,5}] = 0,3727$$

ANNEXE III - II

Exemple d'autocorrélation

1) Généralités

Considérons une étude de la distribution dans une structure chimique d'une propriété chimique, physique ou physico-chimique quelconque f (caractérisée par $f(i)$ pour le $i^{\text{ème}}$ atome).

Chaque fonction d'autocorrélation $F(\theta)$ sera définie par la formule :

$$F(\theta) = \sum_{i,j} (f(i) \times f(j))$$

avec : $f(i)$: propriété du $i^{\text{ème}}$ atome,
 $f(j)$: propriété du $j^{\text{ème}}$ atome,
 θ : intervalle de temps.

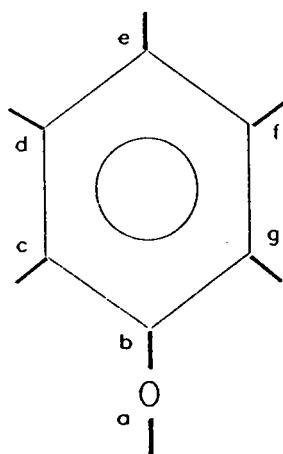
L'intervalle de temps θ peut être assimilé à la distance relative entre 2 éléments (ou atomes) dans le graphe moléculaire.

Il est alors possible de calculer pour chaque valeur de θ , dans le graphe, une fonction F d'autocorrélation. L'ensemble de ces fonctions définit alors un vecteur d'autocorrélation propre à la molécule.

2) Exemple

Cas du phénol

STRUCTURE



La détermination du vecteur d'autocorrélation peut être expliquée plus simplement par l'emploi d'un tableau d'autocorrélation (nomenclature personnelle) (Tableau I) dans lequel chaque colonne contient le produit $f(i) \times f(j)$ des propriétés f de deux atomes i et j séparés par une distance donnée. Les sommes des produits de chaque colonne (pour chaque distance, $\Sigma_0, \Sigma_1, \dots, \Sigma_4$) correspondent aux composantes du vecteur d'autocorrélation.

Distance à partir de	0	1	2	3	4
a	$f(a)xf(a)$	$f(a)xf(b)$	$f(a)xf(c)$ $f(a)xf(g)$	$f(a)xf(d)$ $f(a)xf(f)$	$f(a)xf(e)$
b	$f(b)xf(b)$	$f(b)xf(c)$ $f(b)xf(g)$	$f(b)xf(d)$ $f(b)xf(f)$	$f(b)xf(e)$	
c	$f(c)xf(c)$	$f(c)xf(d)$	$f(c)xf(e)$ $f(c)xf(g)$	$f(c)xf(f)$	
d	$f(d)xf(d)$	$f(d)xf(e)$	$f(d)xf(f)$	$f(d)xf(g)$	
e	$f(e)xf(e)$	$f(e)xf(f)$	$f(e)xf(g)$		
f	$f(f)xf(f)$	$f(f)xf(g)$			
g	$f(g)xf(g)$				
	Σ_0	Σ_1	Σ_2	Σ_3	Σ_4

Tableau I : Tableau d'autocorrélation du phénol.

A N N E X E I I I - I I I

Analyse en composantes principales

de données de biodégradation

D'après des données de GERIKE et FISCHER (1979)

**Analyse en composantes principales
de données de biodégradation
D'après des données de GERIKE et FISCHER (1979)**

I. Introduction

I.1. Généralités

L'analyse en composantes principales (ACP) vise à présenter, sous une forme graphique interprétable, le maximum de l'information contenue dans un tableau de données constitué par des individus disposés en ligne (dans notre cas des substances chimiques), pour lesquels sont mesurés des variables quantitatives disposées en colonne (dans notre cas des valeurs de biodégradation observées dans différents tests de biodégradation normalisés).

Pour un tableau comprenant p variables quantitatives, les individus peuvent être représentés dans un "espace à p dimensions" que même les physiciens n'ont pas la capacité à "voir".

L'analyse en composantes principales (ACP) permet de visualiser les individus dans des espaces de dimension plus petite (1 : droite, ou 2 : plan) pour permettre une observation plus simple de ces individus.

I.2. Principe (D'après PHILIPPEAU, 1986)

L'ACP permet de définir des droites, et des plans, qui sont réalisés par des combinaisons linéaires des variables initiales, formant des variables synthétiques. L'ACP cherche ainsi l'indice qui permet de "voir" au mieux les individus, c'est à dire celui pour lequel la variance pour les individus est maximale ; cet indice est appelé 1^{ère} composante principale ou 1^{er} axe principal.

Ensuite, une 2^{ème} composante principale est recherchée de manière à avoir :

- i) une corrélation linéaire nulle avec la première composante principale,**
- ii) la variance la plus élevée.**

Le processus se répète jusqu'à obtention de la p ^{ième} composante principale.

3) Données de biodégradation introduites dans l'ACP (GERIKE et FISCHER, 1979)

En 1979, GERIKE et FISCHER ont testé la biodégradabilité de 42 substances (Tableau I) couvrant un large éventail de propriétés physiques, chimiques et biologiques dans 7 tests de biodégradation différents :

- Test à unités couplées (unité Husman) (OCDE 303 A)	HUS
- Test ZAHN-WELLENS (OCDE 302 B)	Z-W
- Test MITI (Essai MITI modifié, 1981)	MIT
- Test STURM (Evaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles, (Méthode par analyse du dioxyde de carbone dégagé, 1984) avec mesure :	
(i) de la production de CO ₂	CO2
(ii) de la disparition du carbone organique dissous (COD)	COD
- Test de screening de l'OCDE (OCDE 301 E)	SCR
- Test en fiole fermée (Essai en fiole fermée, 1981, 1985)	CBT

Il faut noter que, par rapport aux données de GERIKE et FISCHER (1979), diverses substances, ainsi que le Test AFNOR ont été éliminés pour la réalisation de cette ACP, trop de valeurs de biodégradation étant inexistantes.

Les données brutes de biodégradabilité sont disponibles dans la publication originale de GERIKE et FISCHER (1979).

Numéro	Substance
1	acide cyclopentanetétracarboxylique
2	éthylène oxyde-propylène oxyde (polymère)
3	acide 3-aminobenzènesulfonique
4	acide adipique
5	acide déhydracétique
6	n-dodécylsulfate
7	acide 2-aminobenzoïque
8	acide 4-aminobenzoïque
9	aniline
10	1,2-dihydroxybenzene
11	acide 4-hydroxybenzoïque
12	acide 3-hydroxybenzoïque
13	acide 4-nitrobenzoïque
14	1-méthylpyrrolidone
15	benzylamine
16	3-nitrophénol
17	diéthylèneglycol
18	acide terphthalique
19	acide 2-nitrobenzoïque
20	diéthanolamine
21	4-nitrophénol (pNP)
22	triéthanolamine

Tableau I :

Noms des substances testées par GERIKE et FISCHER reprises dans l'analyse en composantes principales (1ère partie)

23	N-méthylaniline
24	pyridine
25	acide 2-chlorobenzoïque
26	Idem
27	3-aminophénol
28	Idem
29	pentaérythritol
30	butanol tertiaire
31	acide 3-chlorobenzoïque
32	Idem
33	2-chloroaniline
34	acide sulfanilique
35	Idem
36	acide 3-aminobenzoïque
37	2-nitrophénol
38	Hydroquinone
39	tétraprolnène benzènesulfonate
40	alkylbenzène sulfonate linéaire
41	BDMDAC
42	bromure de cetyltriméthylamonium

Tableau I : Noms des substances testées par GERIKE et FISCHER reprises dans l'analyse en composantes principales (2ème partie)

II. Résultats

II.1. Analyse des statistiques élémentaires

a) On peut constater en observant les moyennes et les écarts-types pour les différentes variables que la population étudiée présente une variation importante dans chaque test (de 0 à 100%) (Tableau II).

Variables	Moyennes	Ecart-types
test Husman	72,405	37,218
test Zahn-Wellens	77,976	33,134
test MITI	32,357	35,823
test Sturm CO ₂	55,524	36,303
test Sturm COD	71,548	34,745
test Screening	51,500	42,194
test CBT	30,524	39,574

Tableau II : Moyennes et écarts-types observées pour les 7 variables.

b) Les corrélations obtenues entre les variables montrent qu'il n'existe pas de corrélations importantes entre celles-ci, excepté entre les résultats de biodégradation du test Sturm CO₂ et COD où le coefficient de corrélation est de $r = 0,911$ (Tableau III).

Toutefois, cette observation est à faire avec précaution ; l'ACP permettant par la suite de la confirmer ou de l'invalidier.

Tests	HUS	Z-W	MIT	CO2	COD	SCR	CBT
HUS	1,000						
Z-W	0,602	1,000					
MIT	0,307	0,305	1,000				
CO2	0,483	0,386	0,530	1,000			
COD	0,542	0,403	0,484	0,911	1,000		
SCR	0,551	0,351	0,551	0,628	0,563	1,000	
CBT	0,412	0,361	0,604	0,415	0,380	0,589	1,000

Tableau III : Corrélations inter-variables.

II.2. Valeurs propres - Vecteurs propres.

a) Valeurs propres.

Les valeurs propres (ϵ_i) représentent la variance des individus sur l'axe correspondant (Tableau IV). En transformant ces valeurs propres en valeurs relatives (pourcentages) de la variance totale selon la formule (1), l'interprétation devient plus simple.

$$\text{Valeur relative} = 100 \times \left(\frac{\epsilon_i}{\sum \epsilon_i} \right) \quad (1)$$

Axes	Valeurs propres	Contribution à la variance totale (%)
Axe 1	3,992	57,0
Axe 2	0,944	13,5
Axe 3	0,851	12,2
Axe 4	0,502	7,2
Axe 5	0,335	4,8

Tableau IV : Valeurs propres et contributions à la variance globale des 5 axes.

Il est alors aisé de comprendre que la part de l'information expliquée par les deux premiers axes donnés est égale à la somme des part expliquées par chacun des axes, et ce car les axes sont **non corrélés entre eux par définition**.

Ainsi pour le plan principal (plan 1-2), la part d'information expliquée par les 2 axes est de $(57,0 + 13,5) = 70,5\%$.

Les parts d'information expliquées par les autres axes sont reprises dans le tableau IV.

On peut alors constater que les plans 1-2, 1-3, 1-4 et 1-5 sont les seuls à apporter une explication de plus de 60% de l'information ; et par conséquent, sont les plus intéressants à observer. Toutefois, l'observation des 3 premiers axes apportera une explication de plus des 4/5ème de l'information totale (82,7%) (Tableau V).

Plan	Axe 1	Axe 2	Axe 3	Axe 4	Axe 5
Axe 1	-	70,5	69,2	64,2	61,8
Axe 2		-	25,7	20,7	18,3
Axe 3			-	19,4	17,0
Axe 4				-	12,0
Axe 5					-

Tableau V : Contributions des axes à l'explication de l'information des plans

De plus, la part dégressive de l'apport des axes à l'explication de l'information montre que le plan principal (plan 1-2) explique la plupart de l'information (70,5%).

b) Vecteurs propres

Les vecteurs propres contiennent les coefficients à affecter aux variables pour calculer les composantes principales (Tableau VI.).

Les cinq composantes principales (CPI) (ou axes) peuvent alors s'écrire selon les équations (2) à (6).

$$\text{CP1} = - 0,37 \text{ HUS} - 0,31 \text{ Z-W} - 0,36 \text{ MIT} - 0,42 \text{ CO2} - 0,42 \text{ COD} - 0,41 \text{ SCR} - 0,35 \text{ CBT} \quad (2)$$

$$\text{CP2} = - 0,50 \text{ HUS} - 0,59 \text{ Z-W} + 0,49 \text{ MIT} + 0,04 \text{ CO2} - 0,06 \text{ COD} + 0,18 \text{ SCR} + 0,35 \text{ CBT} \quad (4)$$

$$\text{CP3} = - 0,16 \text{ HUS} - 0,35 \text{ Z-W} - 0,18 \text{ MIT} + 0,51 \text{ CO2} + 0,53 \text{ COD} - 0,07 \text{ SCR} - 0,52 \text{ CBT} \quad (4)$$

$$CP4 = -0,40 \text{ HUS} + 0,50 \text{ Z-W} + 0,47 \text{ MIT} + 0,10 \text{ CO2} + 0,11 \text{ COD} - 0,58 \text{ SCR} - 0,09 \text{ CBT} \quad (5)$$

$$CP5 = 0,18 \text{ HUS} + 0,01 \text{ Z-W} + 0,54 \text{ MIT} - 0,17 \text{ CO2} - 0,22 \text{ COD} + 0,35 \text{ SCR} - 0,69 \text{ CBT} \quad (6)$$

Remarque : les coefficients s'appliquent aux valeurs centrées-réduites des variables.

II.3. Etude des variables.

a) Dans le plan principal. (Figure 1)

Les 7 variables sont toutes corrélées à l'axe 1 avec des coefficients de corrélation variant de 0,62 à 0,85 (en valeur absolue), mais par contre ne sont que peu à l'axe 2 (coefficients de corrélation variant de 0,04 à 0,58 en valeur absolue) (Tableau VII).

Test	Axe 1	Axe 2	Axe 3	Axe 4	Axe 5
HUS	- 0,732 (0,536)	- 0,484 (0,235)	- 0,150 (0,023)	- 0,285 (0,081)	0,107 (0,011)
Z-W	- 0,621 (0,386)	- 0,575 (0,331)	- 0,321 (0,103)	0,355 (0,126)	0,002 (0,000)
MIT	- 0,714 (0,510)	0,478 (0,228)	- 0,164 (0,027)	0,335 (0,112)	0,314 (0,099)
CO2	-0,846 (0,715)	0,042 (0,002)	0,475 (0,225)	0,071 (0,005)	- 0,097 (0,009)
COD	- 0,832 (0,692)	- 0,054 (0,030)	0,493 (0,243)	0,077 (0,006)	0,016 (0,016)
SCR	- 0,812 (0,659)	0,175 (0,031)	- 0,062 (0,004)	- 0,410 (0,167)	0,203 (0,041)
CBT	- 0,703 (0,494)	0,339 (0,115)	- 0,476 (0,227)	- 0,061 (0,004)	- 0,398 (0,159)

Tableau VII : corrélations entre variables et axes, et corrélations au carré (entre parenthèses).

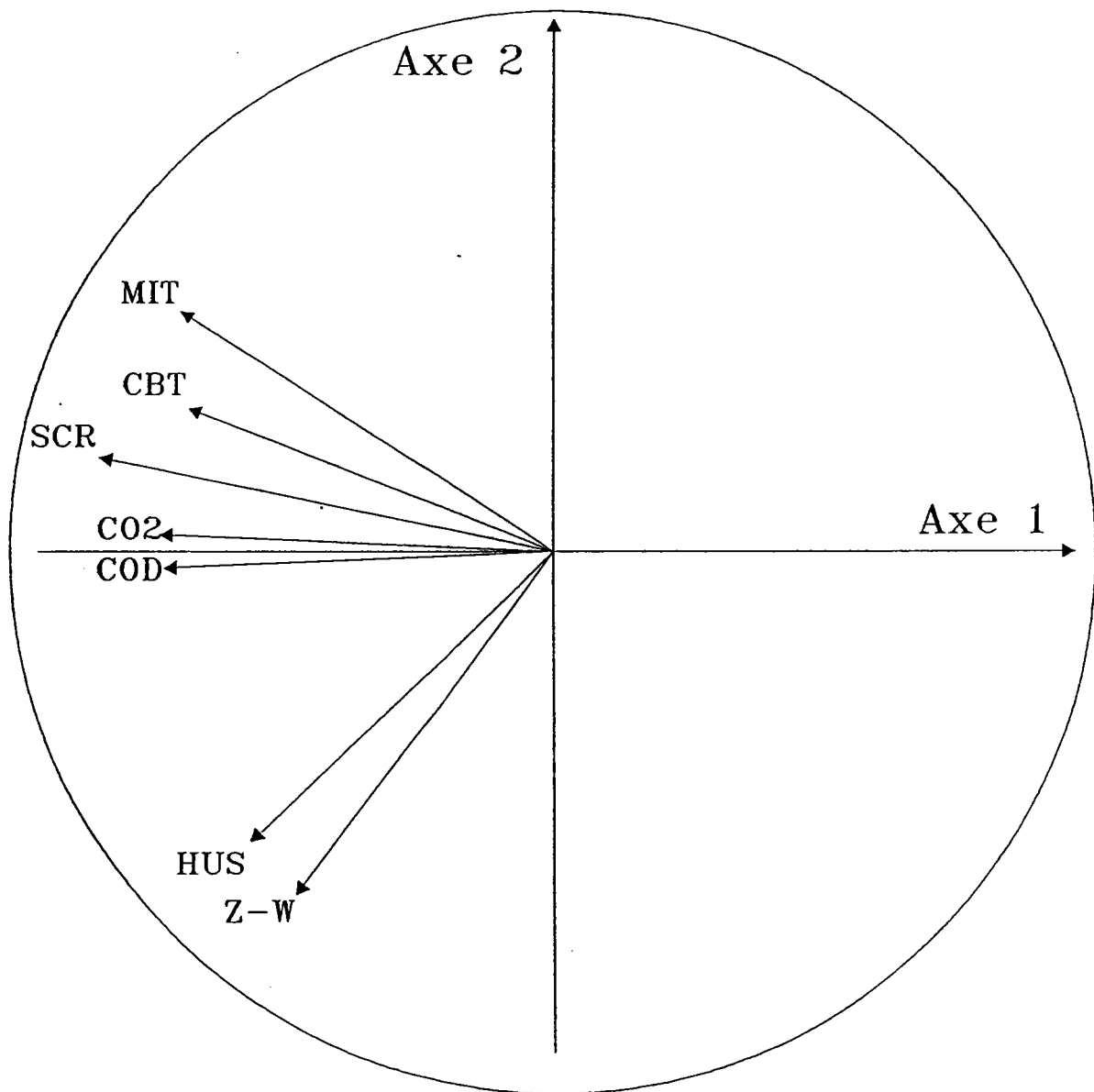


Figure 1 : Représentation des variables dans le plan principal

Cette corrélation relativement forte observée entre les variables et l'axe 1 laisse supposer que cet axe peut être représentatif de la biodégradation, indiquant une augmentation de celle-ci lorsque l'on va de gauche à droite.

Les 7 variables peuvent être considérées comme étant bien représentées dans le plan principal. En effet, la part de la variation d'une variable (corrélation au carré) expliquée par les axes 1 et 2 sont toutes comprises entre 61 et 77%.

On peut remarquer une forte proximité entre elles des variables HUS et Z-W, COD et CO₂, ainsi que MIT et CBT comme le montre la figure 1. La variable SCR se situe quant à elle dans une position intermédiaire entre CO₂ et COD, et MIT et CBT.

b) Dans les autres plans (non représentés).

L'étude des plans 2-3, 2-4 et 2-5 montre une répartition différente des variables. On peut toutefois noter la proximité des variables CO₂ et COD quelque soit le système d'axes choisi, tout comme la proximité des variables MIT et CBT dans les plans 1-5, 2-3 et 2-5.

c) Considérations générales sur les variables.

Les 7 variables sont fortement corrélées à l'axe 1. De ce fait, cet axe peut être représentatif de la biodégradation des substances chimiques, avec une augmentation de la biodégradation de gauche à droite.

De plus, on peut observer une proximité des différentes variables entre elles montrant ainsi une similitude dans les résultats obtenus pour ces différents tests de biodégradation :

Z-W et HUS : plans 1-2, 1-3, 1-5 et 2-3

COD et CO₂ : plans 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 2-5,...

MIT et CBT : plan 1-2

MIT et SCR : plans 1-5, 2-5 et 3-5

Z-W et SCR : plan 1-5

La signification de certaines proximités semble toutefois difficile à interpréter :

CBT-HUS-SCR dans le plan 1-4.

On notera une concordance généralement importante entre :

(i) les variables (tests) de simulation et de biodégradabilité inhérente (HUS et Z-W),

(ii) les variables (tests) respirométriques mesurant la consommation d'oxygène (CBT et MIT),

(iii) les variables COD et CO₂ du test Sturm (COD et CO₂).

II.4. Etude des individus

Le problème posé vise à rechercher les individus (substances) qui se "ressemblent" ou ceux qui "diffèrent", ainsi qu'à essayer de les regrouper par classes.

On peut considérer, d'après les valeurs du cosinus carré des individus, pour les axes 1 et 2, que seuls les individus 16, 17, 18, 20, 21, 22, 31, 36, 37 et 40 sont mal ou très mal représentés dans ce système d'axe ($\cos^2 < 0,50$). Les autres individus sont plus ou moins bien représentés dans ce plan, leurs cosinus carré variant de 0,54 (individu 14) à 0,99 (individu 1).

On constate que les composés 1, 2 et 3, regroupés dans le même secteur du plan principal sont non dégradables dans tous les tests (Figure 2). Cette observation est conforme à celle de GERIKE et FISCHER (1979).

Les individus, 4 à 15, regroupés à gauche dans la partie supérieure par rapport à l'axe 1, ainsi que les individus 18, 19 et 38, peuvent être considérés comme étant dégradables dans tous les tests. Cette observation est elle aussi conforme aux observations de GERIKE et FISCHER (1979), exception faite pour les individus 14, 15 et 34.

Les individus 18, 19, 21 et 22 présents dans la partie inférieure-gauche du plan principal peuvent être regroupés dans une même classe, celle des individus présentant une biodégradation faible dans les tests respirométriques mesurant la consommation d'oxygène. Cette dernière interprétation de la figure 2 est elle aussi conforme aux observations de GERIKE et FISCHER (1979).

Le cas des individus 14 et 15 peut s'expliquer par le fait qu'ils présentent une forte dégradation dans le test MITI (95% chacun) et une faible biodégradation dans le test en fiole fermée (0% et 11% respectivement), les positionnant à la limite des classes "biodégradables dans tous les tests" et "biodégradables sauf pour MIT ou CBT".

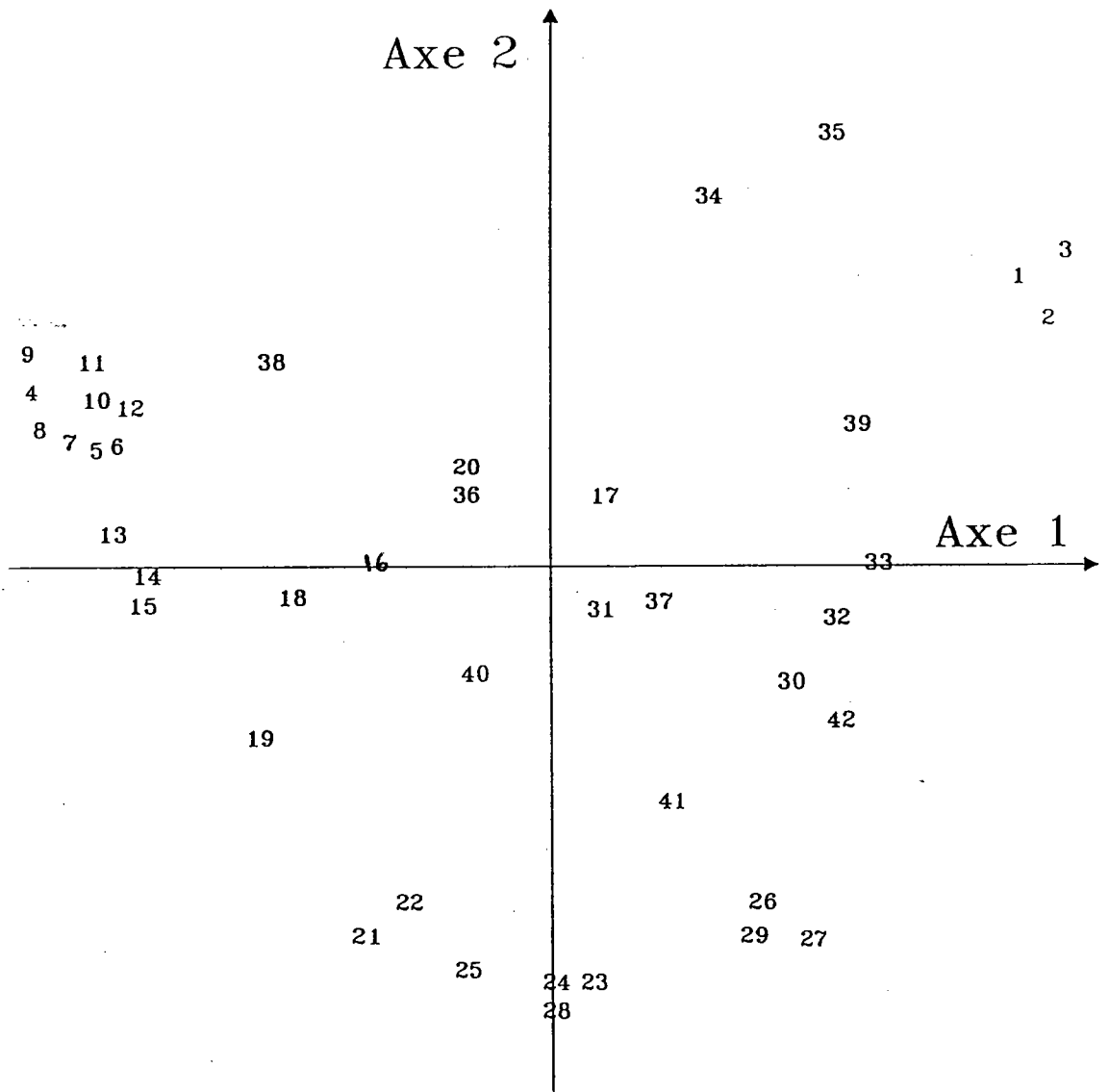


Figure 2 : Représentation des individus (substances) dans le plan principal

Les individus 23 à 31, et 35, 37 et 38 se répartissent tous dans une vaste zone à la droite du plan principal. De ce fait, ils peuvent être considérés comme peu dégradables ou du moins présenter des variations importantes selon les tests. La répartition, dans la partie inférieure à l'axe 1, des composés montre une augmentation de la biodégradation dans les tests de simulation et de biodégradation inhérente lorsque l'on "descend" ; les composés 23 et 24 en sont un exemple.

III. Discussion

Quatre classes peuvent être définies en observant les représentations de l'ACP :

- Composés non dégradables (1, 2, 3)
- Composés dégradables dans la majorité des tests (4 à 15, et 38)
- Composés dégradables dans la majorité des tests mais peu ou pas dégradables dans les tests de biodégradation respirométrique mesurant la consommation d'oxygène (18, 19, 21 et 22)
- Composés présentant une biodégradation faible dans tous les tests ou présentant de fortes variations selon les tests (23 à 31 et 35, 37 et 38).

Cette classification ne permet toutefois que faiblement de ressortir tous les paramètres structuraux qui font que les substances se répartissent dans ces différentes classes.

Cette remarque est vraisemblablement due à la forte disparité des structures.

IV. Conclusion

L'analyse des données de GERIKE et FISCHER (1979) à l'aide d'une ACP permettent de retrouver approximativement la même classification que les auteurs avec toutefois quelques différences.

(i) Certains composés, classés par GERIKE et FISCHER (1979) dans une classe se retrouvent par ACP dans une autre (Cas des composés 14 et 15, 34 par exemple).

(ii) L'ACP ne permet pas de définir une classe regroupant les composés inhibitrices de la biodégradation.