Thèse de Doctorat

Cyril SWEETLOVE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : Sciences Pour l'Ingénieur (ED 498 - SPIGA)

Discipline : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Unité de recherche : ***Laboratoire de génie des procédés, environnement, agroalimentaire*** *(GEPEA – UMR_C 6144)*
Soutenue le 15/12/2017 **Thèse N° :** *(10)*

Développement de techniques permettant d'améliorer la prédiction de la biodégradabilité en milieu naturel de produits organiques faiblement hydrosolubles dans des tests de laboratoire

JURY

PRESIDENT DU JURY :	**PHILIPPE GUARRIGUES**, PROFESSEUR, UNIVERSITE DE BORDEAUX
RAPPORTEURS :	**PASCAL DEGRAEVE,** PROFESSEUR, UNIVERSITE DE LYON **ROBERT DURAN,** PROFESSEUR, UNIVERSITE DE PAU
EXAMINATEURS :	**PASCAL PANDARD,** DOCTEUR, INERIS **VERONIQUE POULSEN**, DOCTEUR, ANSES
INVITE :	**MARKUS SEYFRIED,** DOCTEUR, FIRMENICH
DIRECTEUR DE THESE :	**GERALD THOUAND,** PROFESSEUR, UNIVERSITE DE NANTES
CO-ENCADRANT DE THESE :	**JACQUES L'HARIDON**, DOCTEUR, L'OREAL

Remerciements

Cette recherche n'aurait jamais vu le jour sans la société L'Oréal pour laquelle je travaille, mes responsables hiérarchiques, Laurent Gilbert et Marc Léonard ainsi que les responsables des ressources humaines qui m'ont permis de réaliser ce projet : Mathilde Pelat-Schwertz, Carla Groos, Jean-Baptiste Potié et Nadjia Benkhelif.

Je tiens en premier lieu à adresser mes remerciements au Professeur Gérald Thouand, mon directeur de thèse qui a su m'épauler à chaque étape de ce projet ainsi qu'à Jacques L'Haridon, mon responsable hiérarchique direct et co-encadrant de thèse qui ont fortement contribué à l'élaboration de ce doctorat.

Je tiens également à exprimer mes plus vifs remerciements aux rapporteurs de ce manuscrit, le Professeur Degraeve et le Professeur Duran ainsi qu'aux membres du jury : le Professeur Guarrigues, le Docteur Pandard, la Docteur Poulsen ainsi que le Docteur Seyfried.

Tout au long de cette aventure, nous avons, avec Jean-Charles Chenèble, échangé, débattu et discuté des résultats de biologie et de chimie obtenus. De par son expérience, Yves Barthel, m'a accompagné lors de l'ensemble des essais de biodégradabilité réalisés. Ces deux personnes m'ont aidé et ont su critiquer mon travail lorsque cela était nécessaire et je les en remercie.

Dans chaque domaine, j'ai eu l'opportunité de rencontrer et de travailler avec des personnes disponibles et compétentes que je souhaite remercier, que ce soit pour la microbiologie avec Marie-José Durand-Thouand et Mickaël Crégut. Mais également en chimie, avec Franck Hernandez et Julien Portal pour la partie analyse des solvants, dissolution et évaporation, et avec Alexandre Guépet et Stéphane Ambert pour les analyses de substances. Grâce aux stages de Jérôme Sanchez sur les essais avec système PreSens® et d'Héléna Bouyer sur les mélangeurs statiques, de nouvelles méthodes ont pu être explorées dans le temps imparti. J'exprime ma profonde gratitude à Marie Thomas et Julien Faugère de l'équipe statistique de L'Oréal et aussi à Olivier Perin de l'équipe Bioinformatique pour leur support. J'ai aussi pu échanger et travailler avec Madame Capron, spécialiste des émulsions Pickering, avec Monsieur Vallée pour l'application des champs électromagnétiques et avec l'équipe de l'INRA transfert de Narbonne pour les analyses métagénomiques.

Je remercie les personnes travaillant dans le département de Recherche Environnementale et au laboratoire GEPEA et qui ont contribué de près ou de loin à ce travail, notamment Fabienne Andrei, Laurent Colombe, Patricia Martz, Sulivan Jouanneau, Emilie Faury, Marine Bittel, François Brillet ainsi que Sacha Laruelle de la société CEHTRA.

J'ai également une pensée pour mon ami et collègue Marc Vanpoucke avec qui j'ai beaucoup partagé depuis mes premiers pas en écotoxicologie.

A mon épouse Marie, mes enfants Laura et Téo ainsi qu'à ma mère et mon frère.

A mon père et ma fille Pauline.

Table des matières

TABLE DES MATIERES **5**

LEXIQUE **9**

PREAMBULE **11**

I. PROLEGOMENES **12**

1. Pollution humaine et environnement *12*

1.1. La pollution humaine sur l'environnement du néolithique à nos jours 12

1.2. La pollution chimique et les compartiments de l'environnement 12

1.3. Effets des produits cosmétiques 14

2. Biodégradation des substances organiques *15*

2.1. Concepts préliminaires : de la dégradation à la biodégradabilité facile 15

2.2. Biodégradabilité des substances faiblement hydrosolubles 18

3. Les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité *26*

3.1. Les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité déjà décrites 26

3.2. Les méthodes exploratoires d'amélioration de la biodisponibilité 34

4. Objectif de l'étude *41*

II. MATERIELS ET METHODES **42**

1. Substances modèles et milieux utilisés *42*

1.1. Substances modèles 42

1.2. Milieux Sturm et Sturm modifié 43

1.3. Milieu de culture LB 44

1.4. Solution de $MgSO_4$ 44

2. Inoculum *45*

2.1. Boue de station d'épuration 45

2.2. Souches bactériennes isolées 49

3. Description des tests de mesure de la biodégradation *52*

3.1. Test préliminaire de respirométrie avec le système PreSens® 52

3.2. Test de criblage de la biodégradabilité facile avec le Respicond VI® 55

3.3. Test de confirmation de la biodégradabilité facile (OCDE 301 B) 60

4. Méthodes d'amélioration de la biodisponibilité – MAB *63*

4.1. Descriptif des Méthodes d'amélioration de la biodisponibilité 63

4.2. Modes opératoires 64

5. Exploitation des résultats ... *70*
5.1. Analyses statistiques ... 70
5.2. Détermination d'un indice de classification des MAB ... 72
III. RESULTATS ... 74
1. Recherche des dégradeurs spécifiques sur un panel de substances modèles ... *74*
1.1. Substances chimiques présélectionnées ... 74
1.2. Recherche de dégradeurs spécifiques ... 75
2. Evaluation de la variabilité du test de biodégradabilité due à l'inoculum ... *84*
2.1. Comment choisir le meilleur inoculum ? ... 85
2.2. Caractérisation de la boue activée et effet de son prétraitement ... 86
2.3. Comparaison entre la boue activée et les deux souches isolées sélectionnées ... 92
3. Stratégie d'évaluation des substances peu hydrosolubles (Sweetlove et al., 2016) ... *94*
3.1. Description de la stratégie ... 94
3.2. Validation de la stratégie sur les 2 substances modèles MGZ et IN ... 107
4. Méthodes exploratoires susceptibles d'améliorer la biodisponibilité ... *110*
4.1. Méthodes chimiques d'amélioration de la biodisponibilité ... 110
4.2. Méthode physique d'amélioration de la biodisponibilité ... 118
4.3. Associations de méthodes d'amélioration de la biodisponibilité ... 124
4.4. Influence des méthodes d'amélioration de la biodisponibilité sur la variabilité des résultats et la composition de l'inoculum ... 126
IV. DISCUSSION ... 131
1. Variabilité du test de biodégradabilité facile ... *131*
2. Stratégie d'évaluation des substances peu hydrosolubles ... *136*
3. Méthodes d'amélioration de la biodisponibilité ... *138*
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES ... 144
1. Conclusion ... *144*
2. Perspectives ... *147*
BIBLIOGRAPHIE ... 149
ANNEXES ... 161
Annexe I : Avantages et inconvénients des méthodes d'amélioration de la biodisponibilité ... 162
1. Avantages et inconvénients théoriques des MAB ... *162*
2. Les MAB déjà appliquées aux tests de biodégradabilité ... *163*
Annexe II : Mode opératoire de la détermination de l'hydrophobie des souches bactériennes ... 166
Annexe III : Répertoire des souches bactériennes sélectionnées ... 168

Annexe IV : Préparation des microorganismes et de la microplaque en vue de la détermination des dégradeurs de 9 substances chimiques (système PreSens®) 170
1. Culture des microorganismes 170
1.1. La pré-culture des cellules bactériennes 170
1.2. La préparation des inocula 170
2. Préparation des microplaques de criblage 172
Annexe V : Mode opératoire de préparation des souches isolées en vue de réaliser un test de biodégradabilité facile avec Respicond VI® 173
1. Préparation des souches 173
2. Lavage des souches 173
3. Mesure de la concentration bactérienne pour les essais 175
4. Préparation de la souchothèque congelée 176
Annexe VI : Protocole de lancement du Respicond VI® 177
1. Principe 177
2. Vue générale 177
2.1. Dispositif d'essai 178
2.2. Configuration de test 178
3. Lancement du test 178
3.1. Solution de KOH 178
3.2. Mise en fonction du respiromètre RESPICOND VI® 179
4. Récupération des données 180
5. Exemple de plan de Respicond® 181
Annexe VII : Données brutes des résultats du test de criblage Respicond® 182
Annexe VIII : Résultats obtenus avec le système PreSens® sur 9 substances chimiques avec 48 souches bactériennes 184
Annexe IX : Analyse du néopentanoate d'isodecyle et du mexanyl GZ dans un milieu d'essai suite à des traitements dispersifs 186
1. Présentation de l'analyse 186
2. Résultats du Néopentanoate d'isodécyle (IN) après traitements aux ultrasons et aux ondes électromagnétiques 187
3. Résultats du Mexanyl GZ (MGZ) après traitements aux ultrasons et aux ondes électromagnétiques 188
4. Conclusion 189
Annexe X : Résultats détaillés de l'analyse portant sur l'hydrophobie des bactéries 190

Annexe XI : Mesures de la biodégradabilité du MGZ et de l'IN selon la phase de croissance de l'inoculum (souches bactériennes isolées) 192
Annexe XII : Sources secondaires de variabilité du test de biodégradabilité facile..... 197
1. Variabilité du résultat de biodégradabilité due au milieu d'essai et au flacon d'essai de criblage 197
2. Variabilité du résultat de biodégradabilité due à la pesée de la substance..... 197
Annexe XIII : Analyse des résultats des témoins et des essais par addition directe 199
1. Témoins inoculum 199
2. Témoins positifs..... 200
3. Témoins additifs chimiques 200
4. Essais par addition directe..... 202
VI. TABLE DES ILLUSTRATIONS..... 204

Lexique

ASTM: American Society for Testing and Material

Biosphère : Ensemble des écosystèmes de la Terre, correspondant à la mince couche (20 km max.) de l'atmosphère, de l'hydrosphère et de la lithosphère où la vie est présente (dictionnaire Larousse)

Biote : Ensemble des organismes vivants peuplant un lieu défini

Boue activée : Ensemble de microorganismes utilisés dans l'épuration biologique par cultures libres dans le traitement des eaux usées des stations d'épuration

Boue d'effluents secondaires : elles proviennent d'une épuration biologique des eaux (boues activées, disques biologiques, lits bactériens…). Ces boues sont très organiques car elles sont principalement constituées de corps bactériens et de leurs sécrétions

CEN : Comité Européen de Normalisation

CLP : Acronyme désignant le règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances chimiques et des mélanges. (Classification, Labelling, Packaging en anglais)

COD : Carbone organique dissous

COT : Carbone organique total

CO_2Th : dioxyde de carbone théorique

DGGE : Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant (Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis en anglais)

DLS : Diffusion Dynamique de la Lumière (Dynamic Light Scattering en anglais)

DthO : Demande théorique en oxygène

ECHA : Agence Européenne des produits chimiques (European Chemicals Agency en anglais)

Intervalle des 10 jours (10-d window) : Pour déterminer la biodégradabilité facile, les niveaux de seuil à atteindre sont : une diminution de 70 % du COD et dans le cas des méthodes respirométriques une consommation de 60 % de la DThO ou une production de 60 % du CO_2. Ces valeurs de seuil doivent être atteintes dans un intervalle de temps de 10 jours compris à l'intérieur de la durée d'essai de 28 jours. Cet intervalle de 10 jours débute lorsque le taux de biodégradation atteint 10 % du COD, de la DThO ou du CO_2Th et doit se terminer avant le 28ème jour de l'essai. On considère les substances chimiques qui atteignent les niveaux de seuil après la période d'essai de 28 jours comme n'étant pas facilement biodégradables. Le concept de l'intervalle de 10 jours ne s'applique pas à la méthode MITI modifiée (OCDE 301 C). L'expression « fenêtre de 10 jours » est également utilisée.

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

INCI : Nomenclature internationale des ingrédients cosmétiques (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients en anglais)

ISO : Organisation internationale de la normalisation (International Organization for Standardization en anglais)

MAB : Méthode d'amélioration de la biodisponibilité (Bioavailibility Improvment Method, BIM en anglais)

MAD : Ecart absolu médian (Median absolute deviation en anglais)

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économique

OTU : L'Unité Taxonomique Opérationnelle (Operational Taxonomic Unit en anglais) est un regroupement d'organismes basé sur la similarité de leur séquence ADN. Le seuil de similarité est souvent fixé à 97%

PCB : Composé organique chloré de type polychlorobiphényles

Pollution : Introduction directe ou indirecte, par suite de l'activité humaine, de substances ou de chaleur dans l'air, l'eau ou le sol, susceptibles de porter atteinte à la santé humaine ou à la qualité des écosystèmes aquatiques ou des écosystèmes terrestres, qui entraînent des détériorations aux biens matériels, une détérioration ou une entrave à l'agrément de l'environnement ou à d'autres utilisations légitimes de ce dernier. La contamination atteint un niveau seuil où elle produit des dommages, des déséquilibres ou des effets nocifs et interfère avec le bien-être des organismes vivants (Le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne, 2000).

ppb : Partie par milliard (part per billion en anglais). Il correspond à un rapport de 10^{-9}, et est utilisé pour exprimer une concentration (exemple : en $\mu g.kg^{-1}$).

REACH : Réglementation européenne portant sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction de mise sur le marché des produits chimiques (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals en anglais)

TSCA : Toxic Substances Control Act

Préambule

J'ai présenté le sujet de recherche sur la biodégradabilité des substances peu hydrosolubles chez L'Oréal à l'été 2012. Considéré comme un projet prioritaire, ma hiérarchie (Laurent Gilbert, Marc Léonard et Jacques L'Haridon) ainsi que la responsable des Ressources Humaines (Madame Pelat-Schwertz) ont validé la réalisation d'un doctorat sur ce sujet en novembre de cette même année.

Mon temps de travail a été réparti à 80% pour cette thèse et 20% consacrés à mes missions d'ingénieur de recherche dans le département Recherche environnementale.

Pour diriger ces recherches, nous avons proposé le sujet à Gérald Thouand, dont le laboratoire GEPEA[1] est reconnu pour son expertise sur la biodégradabilité.

L'ensemble des expériences associées à ce sujet ont été réalisées dans les laboratoires de trois sites différents : (1) Aulnay-sous-Bois (L'Oréal) pour les expériences associées à la physico-chimie, l'exploitation des résultats et la rédaction, (2) La Roche-sur-Yon (Université de Nantes) pour les expériences de microbiologie, de recherche fondamentale et sur les micromélangeurs et (3) Maxéville (Eurofins Expertises Environnementales) pour les essais de biodégradabilité.

Plusieurs collaborations ont permis d'explorer des voies scientifiques originales grâce notamment à Madame Isabelle Capron de l'Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages de l'INRA de Nantes pour la partie portant sur l'émulsion Pickering, à l'INRA Transfert de Narbonne pour l'analyse métagénomique et à la société Biophys - Solutions©, située à Paris, pour explorer une nouvelle voie de dispersion des substances dans l'eau via des champs électromagnétiques.

[1] *Le laboratoire de Génie des procédés – environnement – agro-alimentaire (GEPEA) UMR CNRS 6144/ Université de Nantes*

I. Prolégomènes

1. Pollution humaine et environnement

1.1. La pollution humaine sur l'environnement du néolithique à nos jours

L'histoire de la pollution humaine est décrite par Ramade (Ramade, 2007) comme suit : « Les origines de la pollution remontent au Néolithique. Cette époque, qui est marquée par la découverte de l'agriculture, a permis la sédentarisation des groupes humains et donc la création de cités où la densité des populations dépassa de beaucoup celle qui caractérise toute autre espèce de mammifères, fût-elle grégaire. Pendant des millénaires, les causes de pollution furent peu nombreuses et d'importance limitée. Elles résultaient surtout de contaminations des eaux superficielles ou de nappes phréatiques par des bactéries pathogènes et de substances fermentescibles contenues dans les effluents et les détritus d'origine domestique. Il en fût ainsi jusqu'à la fin du XVIIIe siècle, au cours duquel les pollutions de nature industrielle demeurèrent limitées malgré le remarquable accroissement de l'artisanat et du commerce, ainsi que l'apparition de grandes manufactures. Au cours du XIXe siècle, la grande industrie naissante fit de plus en plus appel aux combustibles fossiles, charbon puis pétrole, pour obtenir les quantités sans cesse accrues d'énergie nécessaires au fonctionnement des usines et des nouveaux modes de transport. En outre, à ces causes anciennes de contamination de l'environnement par les résidus de l'activité humaine s'en ajoutent de nouvelles, liées par exemple aux récents développements de la chimie organique de synthèse ».

1.2. La pollution chimique et les compartiments de l'environnement

Les produits chimiques peuvent exister dans notre biosphère à l'état naturel dans l'environnement comme dans les plantes, l'air… Certains, synthétiques, sont utilisés dans des articles de la vie quotidienne comme les médicaments, les ordinateurs, les tissus et les carburants. En revanche, d'autres produits chimiques ne sont pas fabriqués de façon délibérée, mais sont des sous-produits de processus chimiques. De nombreux produits chimiques sont utilisés pour améliorer notre qualité de vie, et la plupart sont sans danger pour l'environnement et pour la santé humaine (Gouvernement du Canada, 1999). Toutefois, certains peuvent présenter un danger, il convient ainsi d'évaluer leur impact sur l'environnement.

Par exemple, les polluants organiques persistants (POP) qui, contrairement aux autres polluants ne sont pas définis en fonction de leur nature chimique mais à partir de quatre propriétés :

- La toxicité (elles ont un ou plusieurs impacts prouvés sur la santé humaine),
- La persistance dans l'environnement (molécules résistantes aux dégradations naturelles comme l'hydrolyse et la photolyse),
- La bioaccumulation dans les tissus vivants et la bioamplification (augmentation des concentrations le long de la chaîne alimentaire),
- La dissémination à large échelle dans l'environnement via l'air ou les cours d'eau.

Les produits chimiques peuvent ainsi, lors de leur fabrication, de leur utilisation ou de leur fin de vie, pénétrer les différents compartiments de l'environnement répartis entre l'atmosphère (l'air), les sols (agricoles, industriels et naturels) et l'hydrosphère (eau douce et eau de mer ainsi que les sédiments associés). Chacun de ces compartiments peut être impacté par la pollution soit directement soit par transfert d'un compartiment à l'autre (figure 1).

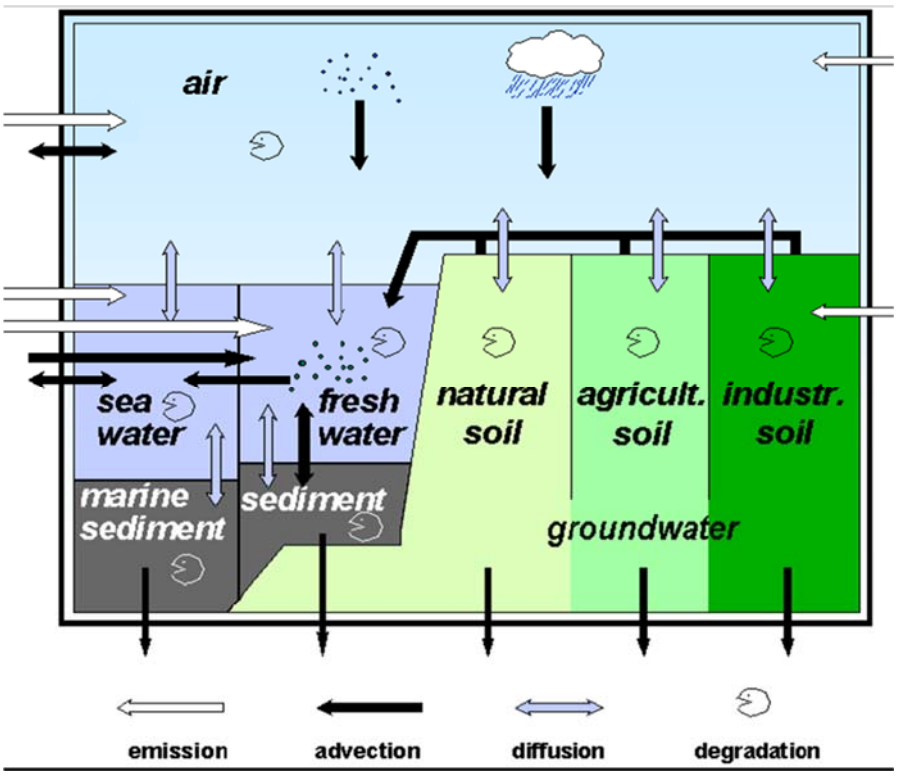


Figure 1 : Répartition et déplacements des polluants dans les différents compartiments de l'environnement (European Chemicals Agency (ECHA), 2012) **– Chap. R16**

L'impact environnemental des produits chimiques peut ne pas être immédiatement visible. Ceux-ci peuvent devenir préoccupants en raison de leur capacité à pénétrer dans la chaîne alimentaire ou à persister dans l'environnement (Gouvernement du Canada, 1999).

1.3. Effets des produits cosmétiques

Un produit cosmétique est défini par l'Union Européenne comme « toute substance ou tout mélange destiné à être mis en contact avec les parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaire, ongles, lèvres et organes génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles » (Le Parlement Européen Et Le Conseil De L'Union Européenne, 2009).

La particularité des produits cosmétiques est qu'ils ne doivent pas être altérés et restent sur la surface corporelle jusqu'à élimination par démaquillage ou par rinçage (shampoings, coloration capillaire). Par conséquent, à travers une utilisation régulière par de nombreux consommateurs, des quantités importantes de ces composés se retrouvent telles quelles dans l'environnement (Ternes, T.A., Joss, A., Siegrist, 2004) et certains y persistent (Mackay, D., Barnthouse, 2010; Peck, 2006). Les pouvoirs publics considèrent que les produits cosmétiques produisent un rejet dans le milieu aquatique qui est dispersif et continu, c'est-à-dire partout et tout le temps (Cosmetics Europe, 2012).

Les industries cosmétiques doivent donc se préoccuper de l'impact potentiel des produits cosmétiques sur la vie aquatique (Díaz-Cruz M. S., 2015) y compris pour répondre aux problématiques émergentes telle que l'exposition des espèces marines aux plastiques (dont les microbilles présentes dans les nettoyants pour le visage ou les gels douches) ou aux filtres solaires.

De plus, les pouvoirs publics européens (CE Commission Européenne, 2013) souhaitent mettre en place une réglementation sur l'étiquetage des produits de consommation, incluant les cosmétiques, pour mesurer leur empreinte environnementale (basée sur l'impact environnemental potentiel d'un produit tout au long de son cycle de vie).

Les industriels de la cosmétique sont ainsi confrontés à des enjeux importants lors de l'évaluation de l'impact potentiel de leurs produits sur l'environnement (Brausch and Rand, 2011). Aussi, la variété des substances utilisées en cosmétique, allant de l'ingrédient mono-substance au mélange complexe avec une large diversité de familles chimiques représentées, rendent leur évaluation difficile. Les mélanges complexes hétérogènes, tels que les extraits naturels et les huiles essentielles sont difficiles à tester avec les méthodes d'évaluation environnementale actuelles, qui ont été conçues pour les mono-substances et les mélanges chimiquement homogènes. De plus, l'interprétation des résultats pour les mélanges pose des difficultés lors des tests qui ne requièrent pas d'analyse chimique spécifique comme l'évaluation de la biodégradabilité facile. Mais, même des ingrédients spécifiques mono-constituants tels que les nano-matériaux, les microplastiques, les produits chimiques chargés de façon permanente et les substances très hydrophobes, sont actuellement en marge du domaine d'applicabilité classique des méthodes d'essai normalisées à cause

de leurs propriétés physico-chimiques. Cela rend l'évaluation de leurs risques écologiques complexe à réaliser, notamment pour déterminer leur biodégradabilité.

2. Biodégradation des substances organiques

2.1. Concepts préliminaires : de la dégradation à la biodégradabilité facile

La dégradation est un processus important qui entraîne la transformation d'une substance chimique dans l'environnement. La dégradation des produits chimiques organiques dans l'environnement influence l'exposition. C'est par conséquent, un paramètre clé pour estimer le risque à long terme sur le biote. La dégradabilité est déterminée par des tests qui peuvent être de simples tests de criblage ou des tests de simulation relativement complexes. Un produit chimique est considéré comme persistant lorsqu'il résiste aux processus de dégradation et va être présent dans l'environnement pour une longue période de temps. La notion de persistant (P) et très persistant (vP – en anglais) font référence à des produits chimiques dont la dégradation correspond à des temps de demi-vie mesurés ou calculés supérieurs à des seuils définis pour les eaux de surface, les sédiments et le sol. Ils sont décrits dans le tableau 1 (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a).

Tableau 1 : Critères de persistance selon l'annexe XIII de REACH et tests de simulation associés
(European Chemicals Agency (ECHA), 2014b)

According to REACH, Annex XIII, a substance fulfils the P criterion when:	According to REACH, Annex XIII, a substance fulfils the vP criterion when:	Biodegradation simulation tests from which relevant data may be obtained include:
The degradation half-life in marine water is higher than 60 days, or The degradation half-life in fresh- or estuarine water is higher than 40 days, or	The degradation half-life in marine, fresh- or estuarine water is higher than 60 days, or	OECD TG 309: Simulation test – aerobic mineralisation in surface water
The degradation half-life in marine sediment is higher than 180 days, or The degradation half-life in fresh- or estuarine water sediment is higher than 120 days, or	The degradation half-life in marine, fresh- or estuarine sediment is higher than 180 days, or	OECD TG 308: Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment systems
The degradation half-life in soil is higher than 120 days	The degradation half-life in soil is higher than 180 days	OECD TG 307: Aerobic and anaerobic transformation in soil

Une substance peut ne pas persister dans l'environnement du fait de phénomènes de dégradation abiotique physique ou chimique comme l'hydrolyse, la photolyse et les interactions avec d'autres produits chimiques comme l'oxydation sans intervention d'organismes vivants. La mesure de la dégradation biotique, faisant intervenir des organismes vivants, permet de mesurer la persistance grâce à des essais de simulation en aérobie et anaérobie, qui fournissent des informations sur la biodégradation dans des conditions spécifiées et environnementalement pertinentes. Ces tests tentent de simuler la dégradation dans un environnement spécifique par l'utilisation de la biomasse

indigène, les milieux pertinents (comme, par exemple, le sol, les sédiments, les boues activées) pour mimer la sorption de la substance chimique, et une température spécifique représentative de l'environnement étudié. Une concentration représentative et faible de la substance (environ 1 à 50 $mg.L^{-1}$) est utilisée dans des tests visant à déterminer le taux de biodégradation tandis que des concentrations plus élevées (jusqu'à plusieurs centaines de $mg.L^{-1}$) sont utilisées pour des raisons analytiques afin d'identifier et de quantifier les principaux produits de transformation (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a). Mais l'évaluation de la persistance ne nécessite pas forcément le recours à ces essais de simulation qui sont complexes et onéreux (> 50 000€ hors développement analytique). Il est possible d'envisager d'autres types de mesure pour évaluer la dégradation d'une substance chimique. Les différents types de dégradation ainsi que les tests associés sont décrits ci-après.

Un simple changement structurel (transformation) d'une substance chimique par des microorganismes, entraînant la perte de l'identité chimique d'origine, correspond à de la biodégradation primaire (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a).

La biodégradabilité ultime, ou minéralisation, correspond à la décomposition complète de la substance chimique. Réalisée en présence d'oxygène, la biodégradabilité ultime aérobie conduit à la transformation d'une substance chimique organique en dioxyde de carbone et en nouvelle biomasse, et selon sa structure élémentaire, en sulfates et en nitrates. Réalisée en l'absence d'oxygène (O_2), la biodégradabilité ultime anaérobie amène à la formation de dioxyde de carbone (CO_2) et de produits finaux de réduction tels que le méthane (CH_4), l'hydrogène sulfuré (H_2S), l'ammoniac (NH_3), ou des sels minéraux et d'une nouvelle biomasse (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a).

La biodégradation primaire peut entrainer la création de nouvelles molécules (métabolites) persistantes dans l'environnement. Seule la biodégradabilité ultime démontre une dégradation complète et l'absence de persistance dans la nature.

Le test de biodégradabilité intrinsèque est un test de biodégradabilité ultime effectué dans des conditions aérobies en présence d'une forte concentration de micro-organismes et dans lequel le taux de biodégradation est mesuré. Les procédures d'essai offrent une plus grande chance de détecter la biodégradation de la substance testée par rapport aux tests de biodégradabilité facile. Ainsi, un résultat négatif dans ce test pourrait indiquer un potentiel de persistance dans l'environnement. (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a).

Au contraire, le test de biodégradabilité facile est un test de criblage drastique, effectué dans des conditions aérobies en présence d'une concentration modérée à forte de substance d'essai (de 2 à 100 mg/L) et d'une faible concentration d'inoculum microbien. Ce test est utilisé pour mesurer la biodégradabilité ultime par des paramètres non spécifiques comme le carbone organique dissous (COD), la demande biochimique en oxygène (DBO) et la production de CO_2. De faibles quantités d'eaux

usées domestiques, de boues activées ou d'effluents secondaires forment l'inoculum microbien. L'inoculum ne doit pas avoir été artificiellement pré-adapté par une exposition préalable à la substance d'essai ou à des produits chimiques structurellement apparentés. La substance à tester est la seule source de carbone ajoutée à la solution d'essai pour l'énergie et la croissance de l'inoculum. Un résultat positif, c'est-à-dire démontrant une biodégradabilité, obtenu dans un test de biodégradabilité facile peut être considéré comme un indice de dégradation rapide et ultime dans les stations d'épurations biologiques et dans la plupart des compartiments de l'environnement (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a).

Il est alors normalement inutile de procéder à de nouvelles études de la biodégradabilité du composé ou des effets éventuels sur l'environnement de ses produits de transformation. Un résultat négatif dans un essai de biodégradabilité facile n'implique pas nécessairement que le produit chimique ne sera pas dégradé dans des conditions environnementales réelles, mais indique qu'il faut envisager de passer à des niveaux de tests de seconde intention décrits précédemment, comme la mesure de la biodégradabilité intrinsèque ou un essai de simulation.

L'ensemble de ces notions est résumé dans la figure 2 :

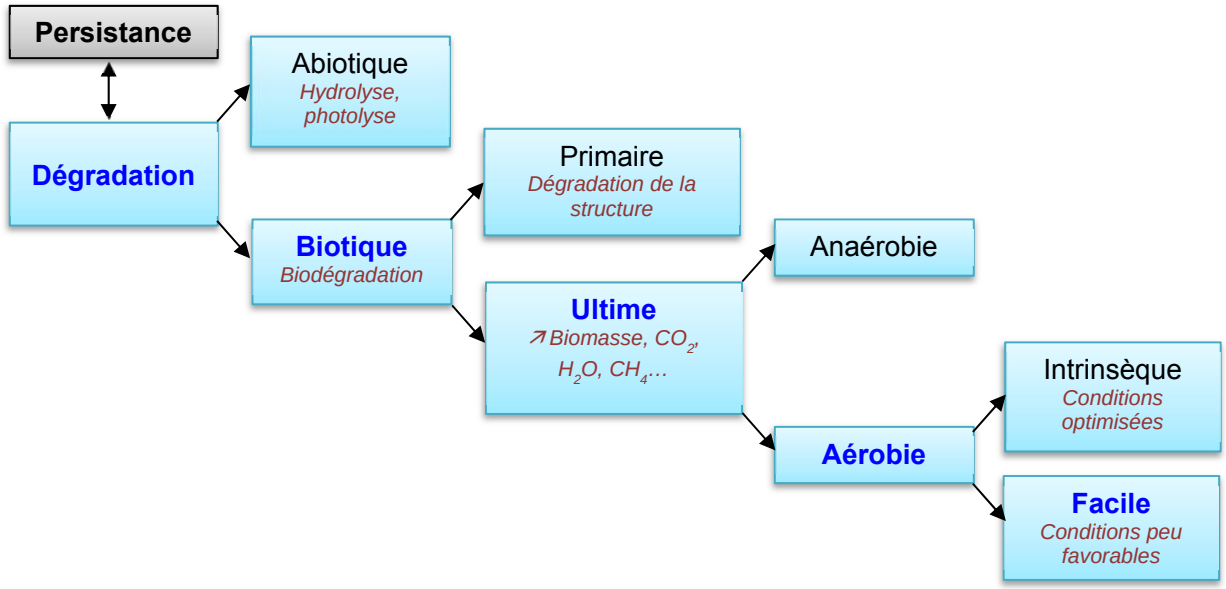


Figure 2 : De la Persistance au test de biodégradabilité facile aérobie

Dans ce contexte, les industries peuvent s'inscrire dans une démarche de progrès. Ainsi, la société L'Oréal, très impliquée dans le développement durable, s'est engagée dans un programme ambitieux nommé Sharing Beauty With All - Partager la beauté avec tous[2].

[2] http://www.sharingbeautywithall.com/

La biodégradabilité apparait comme l'un des paramètres prépondérants pour l'ensemble des évaluations environnementales à visée réglementaire et de développement durable. Ce paramètre ne décrit pas l'impact direct du produit sur le compartiment étudié comme l'écotoxicité mais plutôt son devenir dans l'environnement. Ainsi, l'évaluation de la dégradation et plus précisément de la biodégradation permet d'estimer le temps nécessaire aux microorganismes, si cela leur est possible, pour éliminer la substance évaluée. Cette notion temporelle, associée à l'ensemble de ses caractéristiques physico-chimiques, est essentielle à l'évaluation du risque pour l'environnement d'une substance. Pour certaines substances dites difficiles comme les substances peu hydrosolubles, il est recommandé d'adapter les conditions du test pour pouvoir évaluer leur biodégradabilité facile.

2.2. Biodégradabilité des substances faiblement hydrosolubles

2.2.1. *Les substances peu hydrosolubles : définition et caractéristiques*

Le nombre de produits chimiques sur le marché européen est supérieur à 100 000 et de nouveaux produits chimiques sont commercialisés chaque année. Le règlement REACH impose l'enregistrement des produits chimiques fabriqués ou importés dans l'UE à une quantité d'une tonne ou plus par an, et l'ECHA prévoit qu'au moins 30 000 produits chimiques existants seront enregistrés dans cette catégorie d'ici à 2018[3]. D'autre part, l'OCDE ne fournit pas, pour toutes les lignes directrices, d'indication explicite concernant la mesure de la biodégradabilité des substances peu solubles dans l'eau (*i.e.* dont la solubilité dans l'eau est inférieure à 100 mg.l^{-1}) (OECD/OCDE, 2013). Estimer globalement le nombre de substances peu hydrosolubles n'est pas chose aisée. Ainsi, l'OECD QSAR Toolbox[4] permet de faire une estimation de ce nombre sur la base des données de solubilités aqueuses expérimentales consultables. Deux estimations ont donc été réalisées. La première, sur 6573 substances chimiques possédant une donnée expérimentale, montre que 1893 possèdent une hydrosolubilité inférieure à 100 mg.L^{-1}, soit 28,8%[5]. La deuxième sur plus de 1000 substances chimiques renseignées et utilisées en cosmétique, indique que 53,8% sont considérées comme insolubles ou ayant une hydrosolubilité < 100 mg.L^{-1}[6].

Pour être biodégradé, un composé chimique organique doit impérativement être accessible aux micro-organismes ou aux molécules qu'ils produisent. On parle alors de biodisponibilité. Dans un

[3] *Site internet de l'ECHA, le 26/10/2015 :* http://echa.europa.eu/fr/chemicals-in-our-life/why-are-chemicals-important

[4] *Site internet de l'OCDE, le 13/05/2016 :* http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm

[5] *Information fournie par le Laboratory of Mathematical Chemistry, LMC (Burgas University)*

[6] *Information interne L'Oréal générée par Jean-Charles Chenèble, Département Recherche environnementale*

environnement donné, ces composés chimiques se répartissent entre les différentes phases, liquide, solide ou gazeuse, selon leurs caractéristiques physico-chimiques, celles de la matrice qui les contient, ainsi que les conditions environnementales associées. La structure chimique du composé détermine plusieurs caractéristiques comme sa taille, son encombrement stérique, sa solubilité et sa volatilité. Ces caractéristiques conditionnent le partage préférentiel dans l'une des phases liquide, solide ou gazeuse de la matrice dans laquelle il se trouve.

Ainsi, la solubilité en phase aqueuse des molécules organiques peut être caractérisée par plusieurs paramètres : elle est inversement proportionnelle à la pression de vapeur saturante de la substance et elle diminue généralement avec la température et la force ionique du milieu. Les conditions physico-chimiques (pH, température, …) du milieu aqueux peuvent également fortement influencer ce paramètre.

On peut apprécier la solubilité d'un composé directement par sa valeur limite de solubilité dans l'eau. On remarque ainsi que dans le cas des alcanes, plus la chaine aliphatique est longue, plus la solubilité est faible. Quatre atomes de carbone supplémentaires entre l'hexane et le décane font ainsi chuter la solubilité de 12,5 $mg.L^{-1}$ à 0,022 $mg.L^{-1}$. Néanmoins, une hydrosolubilité quasiment nulle n'empêche pas totalement la biodégradabilité : par exemple, la biodégradation du triacontane (30 atomes de carbone), peu hydrosoluble, a été décrite (Rapp and Gabriel-Jürgens, 2003). La solubilité peut également être évaluée par mesure du coefficient de partage entre le n-octanol et l'eau, qui définit la solubilité différentielle du composé chimique dans les deux solvants, le n-octanol étant d'une polarité proche des tissus gras des organismes vivants. Plus la valeur de Poe (coefficient de partage octanol/eau) (ou Kow en anglais) est élevée, plus la molécule est hydrophobe et donc se trouvera préférentiellement dans la phase liquide non aqueuse (n-octanol). De même, une valeur élevée de Koc (coefficient de partage carbone organique/eau) indique un fort potentiel d'adsorption. Ainsi, seule une faible fraction de ces molécules se retrouve à l'état dissous dans la phase aqueuse et par conséquent, seulement une partie de ces molécules est susceptible d'entrer en contact avec les micro-organismes et d'être biodégradée. Par exemple, le log Poe de l'anthraquinone est égal à 3,39, ce qui correspond pour ce composé à une concentration dans le n-octanol 2000 fois plus importante que dans la phase aqueuse.

A la solubilité aqueuse, il faut ajouter, pour notre problématique, la notion de biodisponibilité. « La biodisponibilité » désigne la fraction d'une substance ayant la possibilité d'être absorbée et d'être utilisée par le métabolisme d'un organisme vivant. Dans le cas d'un polluant, cela se traduit par une accumulation dans les tissus des organismes (fraction bioaccumulée) et /ou une contamination de ces mêmes organismes (fraction toxique). Ainsi par exemple, les contaminants organiques, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) générés par la combustion de matières fossiles, sont considérés comme insolubles dans l'eau. Dans une rivière, les matières organiques présentes dans les

sédiments peuvent piéger ces contaminants et les rendre indisponibles pour les organismes vivants. Cependant si la matière organique est elle-même ingérée par les organismes aquatiques, sa capacité à fixer les polluants devient au contraire un vecteur de biodisponibilité et non une protection » (Gourlay-Francé et al., 2010). Dans le cas de notre étude, cette fraction biodisponible de la substance chimique sera la partie accessible aux micro-organismes.

Les composés chimiques sont également impliqués dans des interactions de surface (adsorption) ou volumiques (partage par dissolution ou diffusion) lorsqu'ils sont présents dans les milieux polyphasiques incluant une phase aqueuse, une phase solide ou une phase lipidique. L'adsorption a une influence prépondérante sur le devenir des composés organiques en solution, en particulier sur leur mobilité et leur biodisponibilité (Carmichael et al., 1997; Connaughton et al., 1993; Handley et al., 2002; Hatzinger and Alexander, 1995). Les phénomènes de sorption d'une molécule chimique sur une surface dépendent de la nature de la molécule et de la surface. Ils sont dépendants de facteurs physico-chimiques du milieu tels que le pH, la polarité, le type et quantité d'ions présents, la présence de matière organique, la température. Les mécanismes conduisant à l'adsorption d'un composé sont divers et complexes. La biodisponibilité des composés chimiques peut être réduite par séquestration dans la matrice par des phénomènes d'adsorption de surface sur le solide, inclusion dans des pores intra-particulaires de petite taille ou dissolution des phases solides. Elle peut également être augmentée lorsque le composé chimique se trouve faiblement adsorbé à la surface d'un support inerte faiblement poreux ou possédant une large porosité, immergé dans le milieu liquide. Cette propriété est exploitée pour favoriser la biodisponibilité de composés chimiques faiblement hydrosolubles dans le cadre d'essais de biodégradabilité (Handley et al., 2002). L'intensité des forces d'interaction impliquées entre la solution et les surfaces va rendre les composés organiques plus ou moins disponibles aux micro-organismes présents dans le milieu et aux molécules qu'ils sécrètent. La désorption peut ainsi être un paramètre limitant de la biodégradation (Benbelkacem, R., et al., 2006) et peut aussi être plus rapide que la minéralisation.

Si la présence d'un matériau solide peut permettre d'immobiliser le composé organique à dégrader, il peut aussi servir de support à la croissance d'un biofilm bactérien. Les molécules à dégrader se retrouvent ainsi adsorbées sur la même matrice solide que les micro-organismes réalisant leur biodégradation. Le contact des micro-organismes avec les composés à dégrader est ainsi favorisé (Léglize, 2004). De nombreux facteurs influencent la formation du biofilm. Les principaux paramètres à prendre en compte sont : les caractéristiques des micro-organismes, la composition du support d'adsorption et ses propriétés physico-chimiques, la composition du fluide le traversant, ainsi que de nombreux paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, la force ionique, etc. On devra également tenir compte des contraintes hydrodynamiques dans le milieu (vitesse du fluide, turbulence, attrition…), ainsi que de la présence de particules organiques ou minérales.

Les caractéristiques physico-chimiques du milieu dans lequel se trouve le composé chimique d'intérêt peuvent conditionner sa forme chimique prédominante et par conséquent modifier ses propriétés. Les caractéristiques physico-chimiques, qui tendent à augmenter la probabilité de contact entre un composé chimique et les micro-organismes, facilitent son éventuelle biotransformation. Ainsi, un composé chimique dont la solubilité varie en fonction du pH, aura une disponibilité pour les micro-organismes présents dans l'environnement aqueux, plus favorable aux valeurs de pH proches de sa solubilité maximale. La norme internationale ISO 10634 (International Standard Organization (ISO), 1995), qui identifie les lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux, indique ainsi la possibilité d'introduire les composés organiques difficiles à dissoudre sous forme de solutions mères acides ou basiques.

La température également joue un rôle majeur sur certaines propriétés des composés chimiques comme leur solubilité et leur volatilité qui augmentent généralement avec la température. Apporter de l'énergie sous forme de chaleur peut permettre, dans une certaine mesure, d'augmenter la solubilité de la plupart des composés chimiques. L'agitation atomique et donc moléculaire qui résulte d'une augmentation de température, augmente en milieu fluide la probabilité de contact entre un composé chimique et un micro-organisme et surtout accélère les cinétiques de biotransformation. En phase aqueuse, le pH est le paramètre déterminant des équilibres ioniques des molécules ionisables, ce qui peut conduire à un renforcement ou à une réduction des phénomènes d'adsorption. L'adsorption des molécules ionisables dépend du pH du milieu et du pKa de la molécule. Dans le cas des molécules basiques comme les triazines, l'affinité pour la matière organique est élevée mais ce phénomène est amplifié en milieu acide car la forme protonnée de ce type de molécules aminées a une affinité accrue pour la matière organique du sol mais aussi pour les argiles qui sont globalement chargées négativement. Dans le cas des acides carboxyliques, la forme neutre (COOH) s'adsorbe sur la matière organique, alors que la forme anionique (COO^-) est peu adsorbée.

2.2.2. *Recommandations des normes et des lignes directrices*

Les premiers tests de biodégradabilité remontent à plus d'une cinquantaine d'années (Borstlap and Kooijman, 1963). Afin d'évaluer la décomposition des produits chimiques, des méthodes ont été développées par des chercheurs qui ont fait l'objet de travaux de standardisation par des organisations internationales telles que l'OCDE ou l'ISO.

Parmi ces tests, les essais de biodégradabilité facile permettent d'estimer la dégradabilité biotique ultime en milieu aqueux dans des conditions aérobies. Ces tests mettent en évidence la biodégradation rapide des produits chimiques dans la plupart des milieux environnementaux (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a). Cela confère à ce test trois avantages : le premier est de

permettre l'estimation du devenir dans l'environnement des substances chimiques, le second est de pouvoir remplir aux exigences réglementaires (classification et étiquetage) et le troisième est de pouvoir valoriser, pour l'industriel, un résultat de biodégradabilité positif.

Les recommandations fournies par l'OCDE concernent les produits chimiques de structure et composition constante qui ne peuvent être séparés en leurs composants par des méthodes de séparation physique, sans rupture des liaisons chimiques. Elles ne sont pas toujours adaptées pour déterminer la biodégradation de matériaux complexes ou faiblement biodisponibles. En particulier, l'OCDE ne fournit pas d'indications explicites concernant la mesure de la biodégradabilité des substances peu solubles dans l'eau (*i.e.* dont la solubilité dans l'eau est inférieure à 100 $mg.L^{-1}$) impliquant la mise en œuvre de techniques de préparation et de traitement à même d'accroitre la biodisponibilité des composés pour les micro-organismes.

Car, lorsque ces tests sont appliqués aux substances peu solubles dans l'eau, les difficultés rencontrées dans l'estimation de leur biodégradabilité sont souvent liées à leur biodisponibilité limitée vis-à-vis des micro-organismes (Stucki and Alexander, 1987). Ainsi, de nombreux scientifiques ont travaillé à l'amélioration de l'évaluation de la biodégradabilité de ces substances faiblement hydrosolubles (Blok and Booy, 1984; De Morsier, A., et al., 1987; Dumont et al., 2006; Gerike, 1984; Handley et al., 2002; Ingerslev et al., 2000; Li and Chen, 2009; Nyholm, 1990; Painter, 1995; Rodrigues et al., 2013; Thomas et al., 1986; van Ginkel et al., 2008). Le développement de méthodes d'amélioration de la biodisponibilité (MAB) des substances peu solubles dans l'eau est une approche intéressante car techniquement accessible. En effet, l'approche véritablement réaliste consistant à réaliser des expériences à une concentration chimique représentative de l'environnement, souvent de quelques ppb ($\mu g.kg^{-1}$) au plus, est expérimentalement irréalisable sans marquage radioactif de la substance à tester.

La plupart des travaux a été réalisée, sur ce sujet précis, entre 1984 et 1995, année de parution de la norme ISO 10634 « Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux » (International Standard Organization (ISO), 1995).

Les travaux menés au sein de l'ISO ont montré qu'il n'était pas envisageable de normaliser une méthode unique pour l'évaluation de la biodégradabilité des composés organiques peu solubles dans l'eau. En effet, le choix du mode opératoire le plus approprié pour obtenir une émulsion ou une dispersion satisfaisante de ces substances dans les milieux d'essai dépend, en particulier, de leurs propriétés physico-chimiques. Il est donc nécessaire de laisser à l'appréciation du laboratoire chargé des essais, la sélection de la méthode la plus adaptée en fonction de son expérience propre et des informations mis à sa disposition sur la substance à évaluer. La norme internationale ISO 10634 (International Standard Organization (ISO), 1995) fournit toutefois des lignes directrices pour la

préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux. Cette norme recommande de réaliser, en premier lieu, les essais de biodégradabilité par addition directe du composé à expérimenter dans le milieu d'essai et ensuite de réaliser cet essai en parallèle aux essais faisant appel aux techniques de dispersion. L'emploi de solvants, de techniques de dispersion ou d'émulsion peuvent être des sources supplémentaires d'erreurs lors de l'évaluation de la biodégradabilité des composés d'intérêt et peuvent conduire à des résultats d'essais différents de ceux obtenus sans utiliser ces techniques. De plus, des dispersions ou émulsions n'existant pas comme telles à l'état naturel, peuvent être produites. Ces faits doivent ainsi être considérés pour évaluer et interpréter des résultats d'essai de biodégradabilité.

Tout en défendant l'emploi de techniques physiques ou chimiques de dispersion ou d'émulsion permettant d'améliorer la biodisponibilité de ces composés, l'OCDE ne fournit que quelques indications (broyage et traitement aux ultrasons) de méthodes de dispersion utilisables et ne donne aucune indication sur l'acceptabilité de ces méthodes dans le cadre d'essais de biodégradation. Les orientations méthodologiques proposées pour ces composés peu hydrosolubles concernent uniquement l'applicabilité d'une gamme restreinte de méthodes analytiques (OECD/OCDE, 2013, 2006a). L'exigence d'essais témoins supplémentaires permet d'évaluer le comportement et l'impact des émulsifiants, solvants et autres supports de fixation censés améliorer la biodisponibilité des composés organiques peu solubles, dans le cadre des essais de biodégradation (De Wilde B, 2005). De nombreuses approches méthodologiques, laissées à l'appréciation du laboratoire chargé des essais, peuvent ainsi être mises en œuvre, rendant difficile l'identification formelle de méthodologies acceptables ou réalisables (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a). Reste que la biodégradation de toute substance chimique dépend aussi des microorganismes capables de la dégrader. Or, dans les tests de biodégradabilité facile, l'inoculum n'est pas un paramètre fixe et reproductible (malgré la possibilité de réaliser un inoculum moyenné avec le mélange de plusieurs sources d'inoculum pour les tests MITI).

2.2.3. *L'inoculum microbien, acteur de la biodégradation*

a) Populations mixtes de microorganismes

L'inoculum microbien d'origine environnementale utilisé est formé par un ensemble de microorganismes très variés en diversité génétique et phénotypique. Il est caractérisé par son origine (boue activée de station d'épuration (figure 3), eau de rivière, sol, …), son niveau d'adaptation à la molécule testée, le nombre de bactéries totales et actives, la présence de particules organiques et inorganiques qui conditionnent la biodisponibilité de la molécule testée et enfin la présence de prédateurs bactériens (protozoaires), de virus et de mycètes. Toutes ces caractéristiques sont

différentes d'un prélèvement à l'autre et non qualifiées dans les tests de biodégradabilité, ce qui explique la faible reproductibilité des essais, observée pour une même molécule et un même test (Blok and Booy, 1984; Goodhead et al., 2014; Painter and King, 1985; Thouand, 1993).



Figure 3 : Station d'épuration de Maxéville (54)[7]

Afin d'améliorer la reproductibilité des essais de biodégradabilité due à la variabilité de l'inoculum, différentes alternatives sont envisageables et sont décrites ci-après.

La boue activée pré-acclimatée est une boue pré-adaptée aux conditions d'essai (par exemple une aération de la boue pendant 7 jours dans le milieu minéral utilisé pour le test) mais sans substance à tester. Cette adaptation peut être réalisée avec une phase d'aération prolongée ou une culture en présence de substances nutritives ou facilement assimilables par les bactéries (milieu peptone-glucose du milieu MITI I). Comme indiqué par G. Thouand en 1993 (Thouand, 1993), ces traitements entrainent inéluctablement une pression de sélection qui va changer la nature de l'inoculum dont le nombre total de cellules, l'activité déshydrogénasique, la diversité cellulaire…, et par conséquent l'aptitude à la biodégradation. De plus, l'état physiologique des cellules sera variable selon la charge carbonée initiale. L'intérêt de cette pré-acclimatation est relative car aucune différence n'est observée entre les résultats de biodégradation de 5 composés testés comparativement avec une boue activée fraiche ou aérée durant 5 jours (Kuenemann et al., 1992). Ce pré-conditionnement n'est pas recommandé pour les test de biodégradabilité facile (Vázquez-Rodríguez et al., 2007).

La réalisation du test MITI nécessite l'acclimatation préalable de l'inoculum à un mélange peptone/glucose durant un mois avec renouvellement quotidien d'une partie du volume réactionnel. Son intérêt n'est pas démontré (Painter and King, 1985) et peut entrainer une augmentation de la

[7] Image du site internet de Vinci Construction (http://www.tradilor.fr/france/DDEst/ddest.nsf/WebContent?readform&accueil_references.htm&ent=entreprise_tradilor.htm)

phase de croissance, notamment établie lors de la biodégradabilité du diéthylène glycol, numéro CAS : 111-46-6 (Baleux, B., Got, P ., Bibent, 1991). Cette méthode comporte donc un intérêt limité voire défavorable à la dégradation des substances peu hydrosolubles. Elle ne sera donc pas retenue pour la suite des travaux.

La boue activée pré-exposée est incubée en présence de la substance à tester dans le but d'améliorer ses capacités de dégradation. G. Thouand (1993) précise que la préadaptation de l'inoculum pendant une période courte revient à concentrer les biodégradeurs du xénobiotique (si ces bactéries sont initialement présentes). Ainsi, une pré-adaptation réduit la disparité des inocula et leur origine n'a plus d'effet (Thouand et al., 1996). Des techniques différentes existent comme par exemple une adaptation en batch (Sturm, 1973), en semi-continu avec peptone en plus du xénobiotique (Pitter, 1976) ou une adaptation par pallier (Boatman et al., 1986; Buitron et al., 1993). On observe, d'après ces différentes publications, qu'une adaptation préalable diminue le temps de latence de l'essai de biodégradabilité (Ruffo et al., 1984). Cependant, sur la base des travaux étudiés, seules les expériences de Nyholm et collaborateurs (Nyholm et al., 1984) apportent des arguments quant à l'impact d'une préculture par adaptation sur la reproductibilité entre essais de biodégradabilité sans pour autant représenter une démonstration sans équivoque. Pour s'affranchir de la variabilité entre inocula, une méthode a été proposée (Thouand et al., 1995) (Blok, 2001) qui consiste à ajouter une concentration optimisée de microorganismes (environ 10^{10} cellules/L). Cette concentration, indispensable à l'amélioration de la reproductibilité des essais et plus élevée (d'au moins un facteur 100) que les recommandations normatives. Cela nous éloigne des documents guides pour les essais de biodégradabilité facile (OECD/OCDE, 2013) et se rapproche plutôt des concentrations en inoculum des essais de biodégradabilité intrinsèque. L'inoculum « boue pré-exposée » n'est donc pas retenu pour la suite des travaux.

De nombreux scientifiques ont testé des inocula commerciaux dans le but de standardiser les résultats obtenus lors des essais de biodégradabilité facile. Ces travaux ont permis d'évaluer ces inocula : Bi-Chem, Biolen (Paixao, S.M., Baeta-Hall, L., Anselmo, 2000), Bioseed (Fitzmaurice, G.D., Gray, 1989), BODseed, Polyseed (Khan et al., 2005) (Waggy et al., 1994), Actyzym (Tabka et al., 1993). Il ressort que ces inocula permettent de réaliser des essais de DBO_5 et parfois de biodégradabilité facile sur des substances facilement biodégradables avec les mêmes résultats que ceux obtenus avec la boue activée (Vázquez-Rodríguez et al., 2011). Ils ne semblent pas pouvoir fournir de résultats plus reproductibles à l'égard de la capacité à dégrader des xénobiotiques persistants (comme le carbone organique des effluents secondaires). Par conséquent, il est peu probable que des inocula commerciaux permettent d'augmenter la robustesse des résultats obtenus avec les tests de biodégradabilité facile. Ces inocula, non adaptés aux substances non facilement biodégradables (Thouand et al., 1999), ne sont pas retenus pour la suite de nos travaux.

b) Souches bactériennes isolées

La description génétique des microorganismes contenus dans les boues activées est décrite dans plusieurs études (Ju and Zhang, 2014; Xia et al., 2010; Yu and Zhang, 2012). Ces études rapportent que la densité microbienne au sein de l'environnement boue activée est estimée entre 2 et 10 $g.L^{-1}$ (Zhang et al., 2012) pour une large diversité de bactéries pouvant atteindre plus de 700 genres microbiens et des milliers d'operational taxonomic units (OTUs) (Grady et al., 2011). Mais il n'existe pas d'étude détaillée portant sur la création d'un souchier bactérien représentatif de la boue activée en vue d'évaluer la biodégradabilité. L'utilisation d'une souche isolée ou de plusieurs souches comme inoculum pourrait réduire la variabilité du résultat de biodégradabilité due à la boue activée. Ainsi une sélection de 48 souches bactériennes a été réalisée dans le cadre d'une étude de recherche et de développement du GEPEA pour L'Oréal. Notre recherche s'est ensuite portée vers l'identification de souches bactériennes, parmi ces 48 souches, possédant la capacité de dégrader les substances modèles sélectionnées. Les caractéristiques de culture, de lipophilie, de capacité de biodégradation et de croissance de ces souches devraient donc être compatibles avec la réalisation de test de biodégradabilité facile.

3. Les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité

3.1. Les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité déjà décrites

Les travaux portant sur la problématique de la biodégradabilité des substances peu hydrosolubles ont démarrés en 1984 (Boethling, 1984; Gerike, 1984). Boethling présentait dans une « letter to the editor » différentes méthodes adaptées aux tests de biodégradabilité et pouvant améliorer la biodisponibilité : dispersion par ultrasons, utilisation de solvant non biodégradable, d'émulsifiant, d'agent stabilisant inerte ou d'huile minérale. Gerike présentait une évaluation plus technique sur quatre méthodes, réalisées avec six substances chimiques. Il montrait d'une part que les essais de biodégradabilité utilisant la mesure du carbone organique dissous (COD) ne sont pas adaptés, la complexité à évaporer totalement les solvants organiques, le faible potentiel de certains émulsifiants et d'autre part, l'intérêt de la mesure du CO_2, de l'agitation dans les flacons et de l'utilisation des ultrasons pour disperser une substance peu hydrosoluble. Les méthodes déjà décrites dans la littérature sont détaillées ci-dessous.

3.1.1. *Méthodes chimiques*

a) Solubilisation par solvant volatil

Les solvants sont utilisés pour accroitre la solubilité du composé à dégrader. Ils sont choisis en fonction de leur pouvoir solubilisant vis-à-vis du composé testé. Les solvants polaires tels que l'eau, dissolvent les composés ioniques et/ou polaires hydrophiles. Les solvants utilisés dans le cadre de la préparation des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux, sont principalement choisis non biodégradables et suffisamment hydrosolubles. La norme ISO 10634 (International Standard Organization (ISO), 1995) préconise l'élimination du solvant volatil par évaporation avant l'essai (voir principe figure 4).

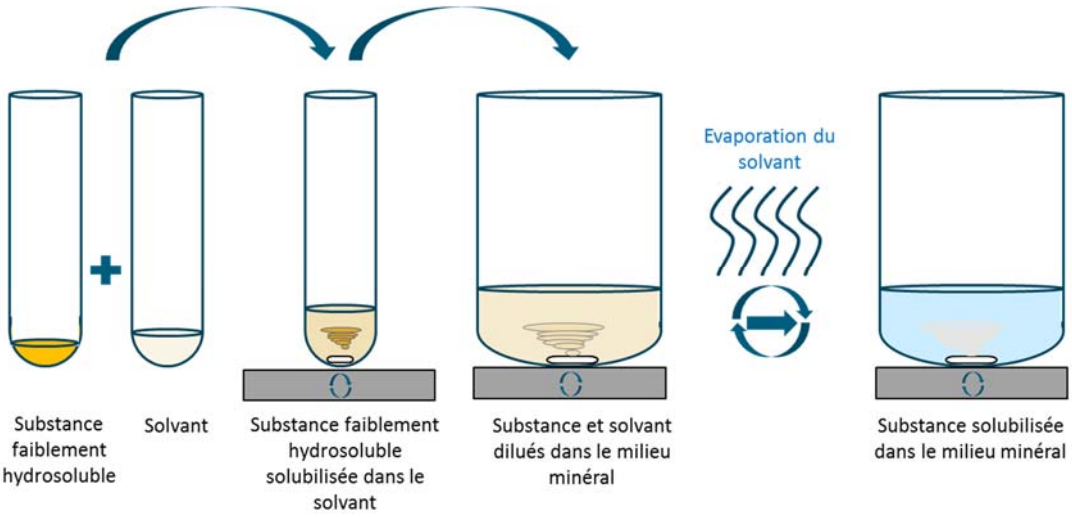


Figure 4 : principe de l'utilisation du solvant volatil

Des solvants biodégradables miscibles à l'eau, peuvent également être utilisés pour disperser en phase aqueuse des composés organiques peu hydrosolubles. La majorité des solvants hydrosolubles sont d'origine synthétique ou hémi-synthétique. Les plus couramment cités sont les glycérides, les alcools, le polyéthylène glycol (Hauss, 2007; Sae Houer, 2010). L'utilisation de solvants biodégradables pour la solubilisation de composés chimiques peu hydrosolubles dans le cadre d'essais de biodégradabilité facile ou intrinsèque est envisageable et acceptée réglementairement (European Chemicals Agency (ECHA), 2017), mais doit être assortie de conditions expérimentales adaptées (enceintes réactionnelles fermées dans le cas de solvants volatils) et de la mise en œuvre d'essais témoins permettant de mesurer et de corriger leur impact sur le résultat de la mesure.

Il est par contre quasi impossible d'évaporer complètement les solvants type dichlorométhane, acétone, chloroforme et diéthyléther. Ils contribuent ainsi à la difficulté d'interpréter les résultats car leur présence engendre de fort taux de respiration dans les témoins due au carbone résiduel du solvant présent (Gerike, 1984; Handley et al., 2002; Marcoux et al., 2000; Sweetlove et al., 2016).

b) Dispersion ou solubilisation avec un liquide non volatil

Différents types de liquides non volatils peuvent être utilisés pour disperser une substance chimique. Certaines huiles possèdent des caractéristiques de solubilisation ou de dispersion associées à une biodégradabilité faible ou nulle compatibles avec les essais de biodégradabilité. Par exemple, la mise en solution préalable du composé à tester dans une huile de silicone (figure 5) non biodégradable (PDMS) augmente la biodisponibilité et la biodégradabilité des composés faiblement hydrosolubles (Mead, 2014; Sweetlove, 2014; van Ginkel et al., 2008). Il faut toutefois souligner que l'huile de silicone, utilisée notamment pour le traitement biologique en réacteur biphasique eau/huile des composés organiques volatils hydrophobes au sein des effluents gazeux, apparaît comme un solvant à la fois non toxique et ne présentant aucune biodégradabilité intrinsèque (Aldric, 2009; Boudreau and Daugulis, 2006; Darracq et al., 2012). D'autres huiles peuvent également être utilisées, comme l'huile minérale 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (Auffret et al., 2009) qui possède des caractéristiques intéressantes comme celle d'être non biodégradable, non toxique pour les bactéries et avoir une forte capacité de dispersion (Sweetlove et al., 2016). Il est également possible de l'associer à d'autres méthodes comme un additif chimique (type tensioactif) ou un traitement aux ultrasons.

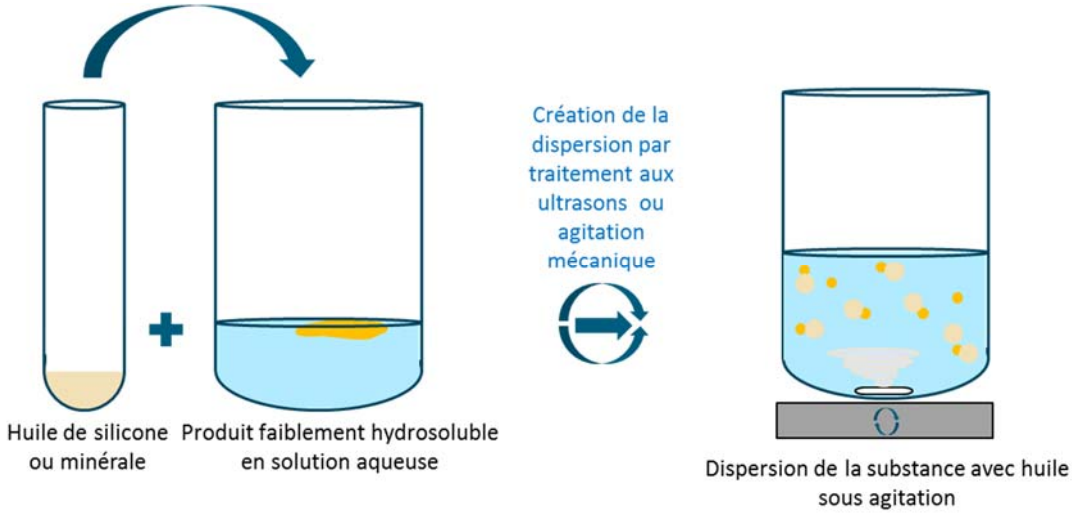


Figure 5 : Principe de l'utilisation d'une huile

c) Dispersion par tensioactifs

Le transfert vers une phase aqueuse peut être facilité par l'adjonction de substances chimiques tensio-actives. Les tensioactifs ou surfactants sont des molécules organiques amphiphiles, c'est à dire, constituées de deux parties de polarité différente :

- une partie polaire à caractère hydrophile,

- une partie apolaire à caractère hydrophobe (lipophile).

La partie hydrophile, ou tête polaire est constituée par un (ou plusieurs) groupement polaire, ionique ou non ionique. La partie lipophile est constituée par une (ou plusieurs) chaîne(s)

hydrocarbonée(s) aliphatique(s) (linéaire ou ramifiée, saturée ou partiellement insaturée), aromatique(s), ou alkylaromatique(s). Les composés tensioactifs ont, du fait de leur structure dissymétrique, la propriété de s'adsorber aux interfaces. Ainsi, les molécules tensioactives se positionnent aisément à l'interface eau / phase liquide non aqueuse, la partie hydrophobe placée au contact de la phase organique et la partie hydrophile placée dans la phase aqueuse.

A des concentrations dans l'eau inférieures à une valeur seuil, les molécules de tensioactifs sont solubles. Au-delà de cette valeur appelée Concentration Micellaire Critique (CMC), les molécules de tensioactifs commencent à se rassembler sous forme d'agrégats ordonnés appelés micelles (figure 6). Les parties hydrophobes s'associent spontanément et forment le centre de l'agrégat alors que les parties hydrophiles sont dirigées vers l'eau. La région centrale de la micelle constitue donc une pseudo-phase hydrophobe (appelée phase micellaire). Les tensioactifs peuvent alors "emprisonner" des composés hydrophobes dans des micelles où la partie lipophile des molécules de tensioactif interagit avec le composé au centre de la micelle par interactions hydrophobes. On obtient donc ainsi une dispersion micellaire.

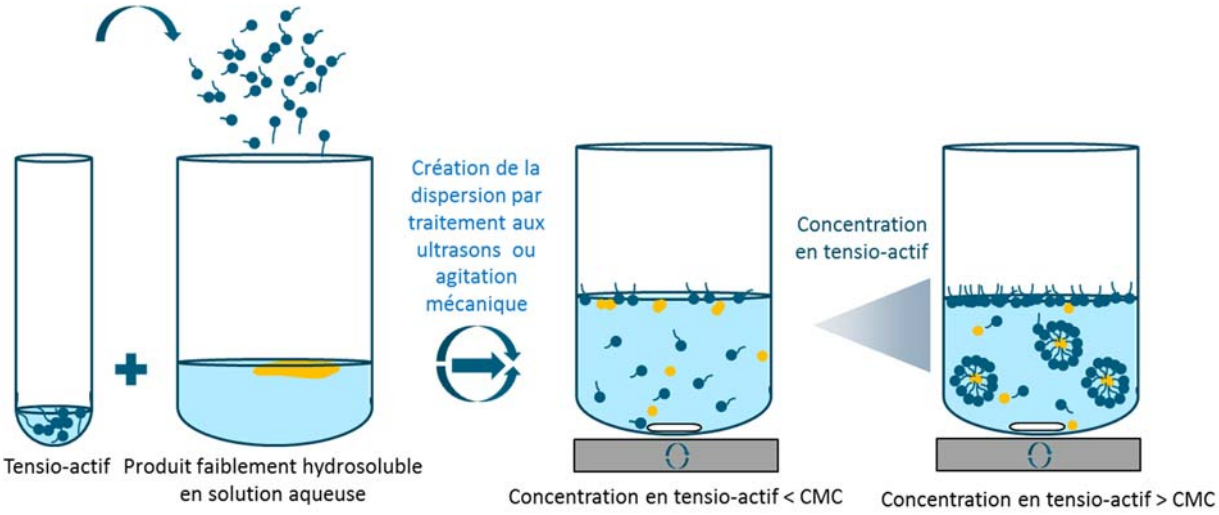


Figure 6 : Principe de l'utilisation d'un tensioactif

Les agents tensioactifs sont classés en fonction de la nature de la partie hydrophile. Il existe quatre classes d'agents tensioactifs : les tensioactifs anioniques, les tensioactifs cationiques, les tensioactifs non ioniques et les tensioactifs amphotères (c'est-à-dire anionique, cationique ou non ionique selon le pH). Notons que les tensioactifs cationiques et amphotères ont une forte capacité d'adsorption sur les matériaux et ne sont donc généralement pas utilisés dans les techniques de dispersion. Ce sont principalement des tensioactifs non ioniques, et parfois anioniques, qui sont sélectionnés pour disperser les composés hydrophobes en phase aqueuse.

Laha et Luthy (Laha and Luthy, 1992) ont étudié, en milieu dispersé, l'influence de tensioactifs non-ioniques commercialisés (dont Polysorbate 20, Polysorbate 80 et des mélanges de tensioactifs) sur la minéralisation du phénanthrène. Les auteurs constatent, pour des concentrations en tensioactif

supérieures à la concentration micellaire critique, que la minéralisation du phénanthrène est fortement inhibée. De même, Bramwell et Laha (Bramwell, DAP and Laha, 2000) évaluent l'effet de plusieurs tensioactifs non-ioniques (Tween 20®), cationiques (tetradecyltrimethylammonium bromide - TTAB) et anioniques (Sodium dodecyl sulfate - SDS) et constatent, pour des concentrations supérieures ou égales à la concentration micellaire critique, un effet inhibiteur de ces trois tensioactifs sur la minéralisation du phénanthrène. Ces observations sont confirmées par les travaux de Li (Li and Bai, 2005; Li and Chen, 2009) qui montrent qu'à une concentration donnée de phénanthrène, sa biodégradabilité dans des solutions micellaires diminue lorsque la concentration en tensioactif non-ionique (Tergitol 15-S-7) augmente. Cette inhibition peut être attribuée à un effet « protecteur » de la micelle, qui limite la biodisponibilité du phénanthrène, à l'effet toxique de certains tensioactifs pour les micro-organismes, ou à la biodégradation de ces tensioactifs qui constituent des substrats préférentiels pour les micro-organismes. Ces phénomènes limitent leur application dans le cadre de la mesure de biodégradabilité. De plus, il a été montré que les tensioactifs synthétiques affectent la structure, les propriétés et les fonctions de la membrane cellulaire des micro-organismes (Angelova and Schmauder, 1999). La biodisponibilité des polluants varie ainsi en fonction du type de tensioactif et de sa concentration. Ce phénomène est attribué à une biodisponibilité réduite du phénanthrène, due à sa solubilisation accrue dans la phase micellaire et peut-être aussi à une diminution (à concentration en tensioactif élevée) de la vitesse de transfert de la phase micellaire vers la phase aqueuse ou vers les cellules bactériennes. Les tensioactifs peuvent également avoir une action biocide, allant jusqu'à la lyse cellulaire.

D'autres études montrent une amélioration de la biodégradation des polluants organiques hydrophobes en présence de tensioactifs à des concentrations inférieures à la concentration micellaire critique. Aronstein et Alexander (Aronstein and Alexander, 1992) notent une amélioration de la minéralisation du phénanthrène avec des tensioactifs non-ioniques (Alfonic 810-60 et Novel II) à des concentrations de 10 à 100 $\mu g.g^{-1}$. Les auteurs conseillent l'utilisation de tensioactifs à faible concentration (inférieure à la concentration micellaire critique). Kim et al. (Kim et al., 2001) observent une amélioration de la dégradation du naphtalène et du phénanthrène en présence du tensioactif non-ionique Brij 30, facilement biodégradable et utilisé comme source de carbone par les bactéries. Par conséquent, la biodégradabilité facile du tensioactif est à prendre en compte comme possible facteur de co-métabolisation.

d) Dispersion avec un polymère

Certains polymères comme les acides humiques (qui sont des polymères à haut poids moléculaire, résultants de la dégradation de la matière organique naturelle après quelques décennies ou siècles), permettent d'augmenter la biodégradation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques

(Smith et al., 2009) et de limiter la toxicité des substances lors d'essais de biodégradabilité (van Ginkel et al., 2008). Les acides humiques ne possèdent pas une composition parfaitement définie car elle dépend de la source d'approvisionnement et des procédés de purification (Sugahara and Inoko, 1981). Ils présentent par contre un profil d'intérêt pour améliorer la biodisponibilité dans les essais de biodégradabilité car non toxiques pour les bactéries et non facilement biodégradables. Le principe d'utilisation est détaillé dans la figure 7.

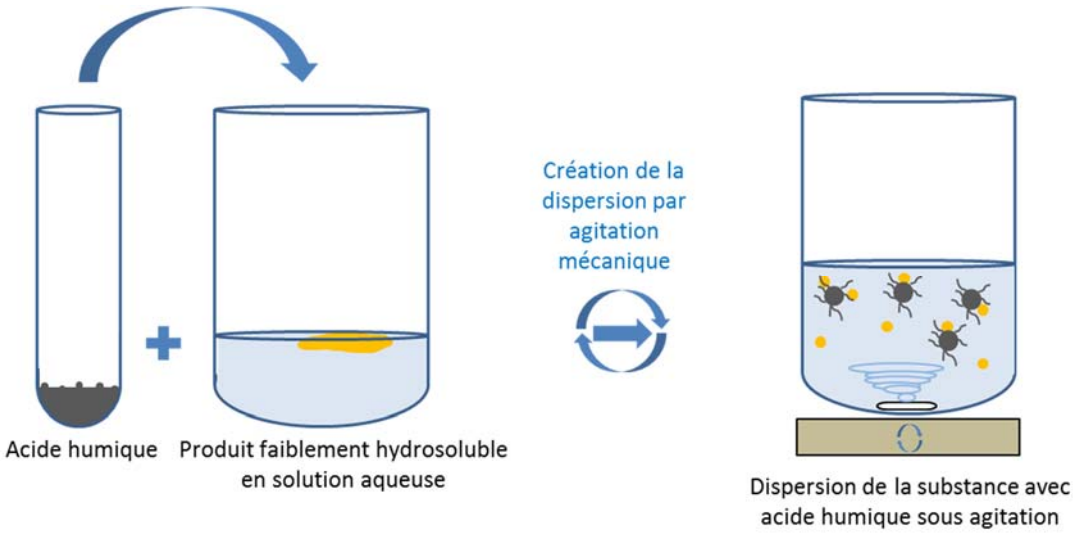


Figure 7 : Principe de l'utilisation de l'acide humique

3.1.2. *Méthodes physiques*

a) Dispersion par agitateur mécanique

Lors des essais de biodégradabilité facile de substances peu hydrosolubles, l'agitation des flacons au cours du test est recommandée (Gerike, 1984; Nyholm, 1990). Mais il est également possible de créer une homogénéisation de la solution d'essai par les forces de cisaillement générées à l'aide d'un disperseur mécanique dont le principe est décrit en figure 8. Cette méthode est applicable aux composés solides et liquides et doit faire l'objet d'une évaluation préliminaire de faisabilité, notamment pour les substances moussantes (Sweetlove et al., 2016).

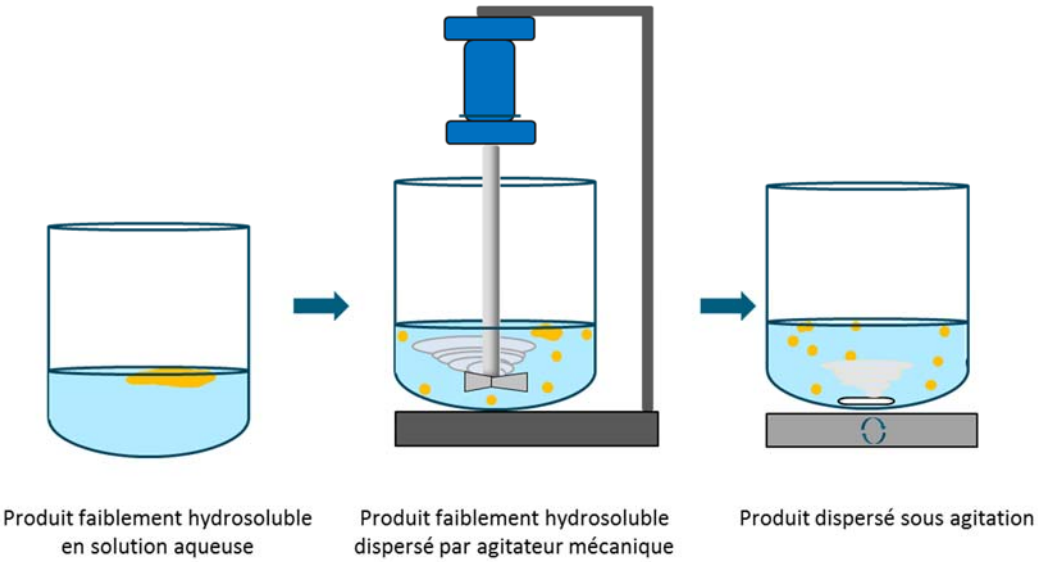


Figure 8 : Principe de l'utilisation d'un agitateur mécanique

b) Traitement aux ultrasons

Les ultrasons sont des ondes élastiques dont la fréquence est comprise entre 18 kHz et quelques centaines de MHz. Aux fréquences inférieures à cette bande, on parle de sons ou d'infrasons, au-delà d'hypersons (Sapriel, 1994). Les ultrasons ont des propriétés remarquables par l'interaction qu'ils peuvent avoir avec les milieux dans lesquels ils se propagent. En milieu gazeux, les ultrasons sont rapidement atténués et ne présentent donc que peu d'intérêts. En milieu solide, l'application d'ultrasons à forte intensité peut modifier la surface du solide. En milieu liquide, la formation de bulles de gaz dans le liquide soumis à une dépression (la cavitation) est le phénomène prépondérant induit par les ultrasons. C'est ce phénomène qui peut permettre l'application des ultrasons comme technique de dépollution ou plus généralement comme procédé de prétraitement.

Lors du phénomène de cavitation, la bulle de cavitation est remplie d'eau et de molécules organiques volatiles à l'état gazeux. Sous l'effet d'une onde ultrasonore, une bulle de cavitation se forme et voit sa taille augmenter au cours de cycles de compression et de dépression induits par l'onde ultrasonore. Lorsqu'elle a atteint sa taille de résonance (pouvant atteindre 100 µm), la bulle de cavitation implose en moins d'une microseconde. L'implosion de la bulle entraîne alors localement la libération d'une grande quantité d'énergie thermique (localement, la température peut atteindre 5000°C et la pression plusieurs centaines d'atmosphères) et d'énergie mécanique (émission de jets de liquide se déplaçant à la vitesse d'une centaine de mètres par seconde) sans modification notable de l'ensemble du milieu (en termes de température et de pression).

Différents mécanismes permettent d'augmenter la biodisponibilité des composés organiques. La désagrégation de particules/agrégats solides par les ondes ultrasonores rend les composés plus solubles et améliore leur biodégradabilité (Van Lier JB et al., 2001).

L'agitation induite par effet mécanique des ultrasons permet la dispersion des composés chimiques dans la phase aqueuse et/ou la création d'une émulsion. Le principe simplifié de la dispersion avec un bain à ultrasons est présenté dans la figure 9 suivante :

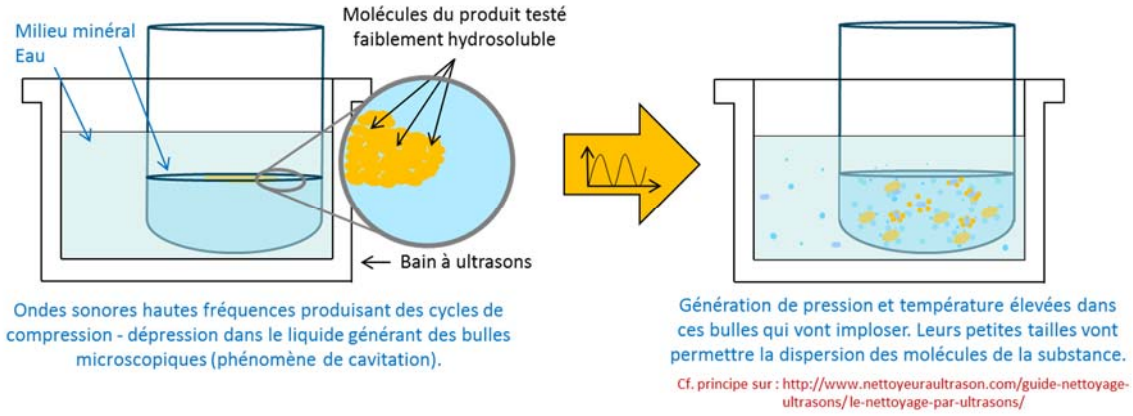


Figure 9 : Principe des phases de compression et de décompression d'un bain à ultrasons

La libération d'énergie thermique lors de l'implosion de la bulle de cavitation peut induire la pyrolyse des molécules volatiles présentes, ainsi que la production de radicaux hydroxyles hautement réactifs, formés par scission homolytique de l'eau. La sonication agit alors comme un procédé d'oxydation avancée à l'origine d'une dégradation physico-chimique des composés organiques en solution, difficilement compatible avec la réalisation d'une mesure ultérieure fiable de biodégradabilité. La norme internationale ISO 10634 prévoit un contrôle strict de la température de la solution soumise aux ultrasons afin d'éviter ce phénomène. Ce procédé peut améliorer la biodégradabilité de substances peu hydrosolubles comme le di-isooctylphtalate (Nyholm, 1990) mais ne semble pas adapté à toutes les substances car l'émulsion ou la dispersion créées ne sont pas forcément stables (Handley et al., 2002).

Les ultrasons peuvent également améliorer la sécrétion d'enzymes par les cellules et, augmenter la perméabilité des membranes cellulaires et accélérer les échanges de matières, le transport et la pénétration. Ce phénomène est observé immédiatement après le traitement et augmente l'efficacité de l'activité biologique par une production d'enzymes qui peut être multipliée par 50 (Liu et al., 2005). Cette seconde voie d'utilisation des ultrasons n'a pas pour vocation de rendre la substance à tester plus biodisponible mais plutôt d'améliorer l'activité biologique. Ce traitement de l'inoculum, d'intérêt pour effectuer de la bioremédiation, n'est pas applicable pour réaliser des tests de biodégradabilité facile.

c) Fixation sur support solide

L'utilisation de support solide inerte pour accroitre la biodisponibilité des composés peu solubles dans l'eau dans le cadre de la mesure de leur biodégradabilité, est décrite dans la norme ISO 10634. Les matériaux cités pour cet usage spécifique sont la fibre de verre, le gel de silice, le verre

(sous forme de lamelles ou de billes) et le polytétrafluoroéthylène (téflon). Cette technique, qui peut être couplée à l'utilisation d'un solvant, est efficace pour certains composés faiblement solubles. Elle semble moins adaptée aux composés hydrophobes de très faible ou de très forte densité qui, rapidement désorbés lors de l'ajout du milieu liquide, forment un film non miscible, limitant ainsi leur biodisponibilité. Parmi ces matériaux, le gel de silice semble être le mieux adapté pour favoriser la dispersions des composés faiblement hydrosolubles dans le cadre d'essais de biodégradabilité (Handley et al., 2002). Il possède l'avantage d'être inerte chimiquement, de ne pas perturber la mesure par relargage de carbone et de permettre une bonne dispersion de la substance testée sous agitation. Le principe de son utilisation est décrit dans la figure 10 :

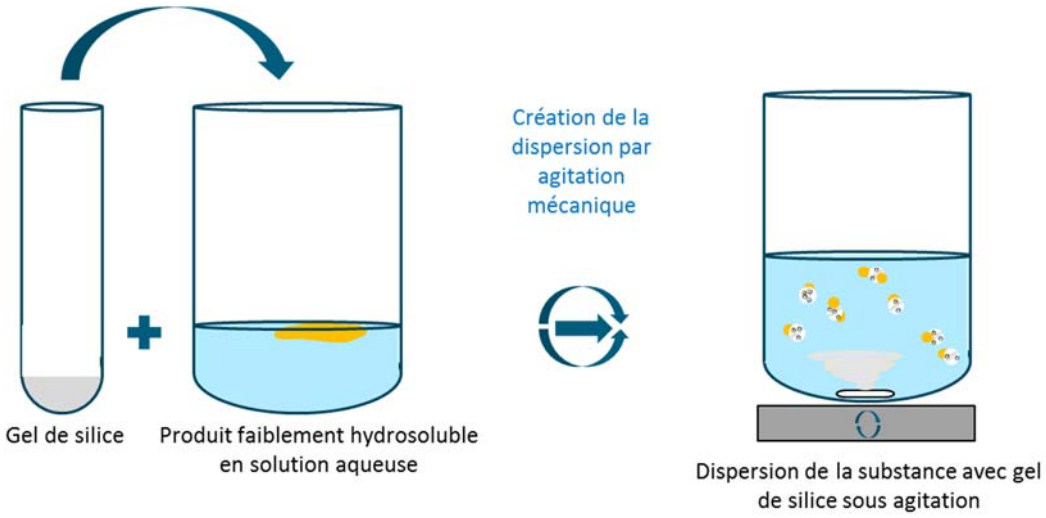


Figure 10 : Principe de l'utilisation du gel de silice

Son couplage avec un solvant comme agent de fixation de la substance à tester sur le support peut être envisagé. Il est alors nécessaire de vérifier également l'impact du solvant sur le système et la mesure de la biodégradabilité.

3.2. Les méthodes exploratoires d'amélioration de la biodisponibilité

3.2.1. *Méthodes chimiques*

a) Les biotensioactifs

Les micro-organismes sont capables de synthétiser des tensioactifs dits biotensioactifs (ou biosurfactants). Aujourd'hui, des recherches se focalisent sur la production de ces tensioactifs d'origine microbienne. Ces biotensioactifs présentent plusieurs intérêts industriels : ils peuvent être produits à partir de substrats largement disponibles (déchets de l'industrie agroalimentaire, agricoles et industriels), ils sont non toxiques et sont souvent biodégradables. Comme les tensioactifs synthétiques,

ils peuvent être utilisés pour disperser ou solubiliser des molécules organiques faiblement hydrosolubles et/ou faciliter l'accès de ces substances aux micro-organismes (Ward, 2010). Les biotensioactifs sont produits par les micro-organismes de différents groupes taxonomiques. Une grande variété de biotensioactifs produits par les micro-organismes est déjà connue et leurs propriétés physico-chimiques étudiées en détail (Alizadeh Kaloorazi and Fekri Sabet Choobari, 2013; Desai and Banat, 1997; Mulligan et al., 2001; Neu, 1996; Van Hamme et al., 2006). L'augmentation de la biodégradation de composés organiques en présence de biotensioactifs a été mise en évidence pour des polluants tels que les PCB (Van Hamme et al., 2006), les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques (Al-tahhan et al., 2000; Janbandhu and Fulekar, 2011; Johnsen AR, 2004; Noordman and Janssen, 2002; Van Hamme et al., 2006; Zhang and Miller, 1994).

Le transfert du substrat solubilisé de la micelle à l'intérieur de la cellule est composé de trois étapes. La première étape est le transport des substrats solubilisés dans les micelles à proximité de la cellule par mélange. Ensuite, la couche hémi-micellaire composée de tensioactifs se forme sur la cellule et enfin le substrat transite de l'hémi-micelle vers la cellule (figure 11).

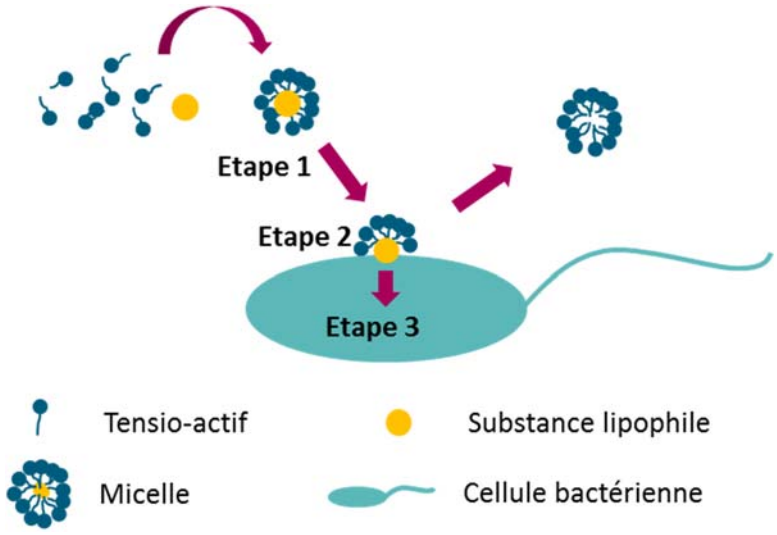


Figure 11 : Absorption du substrat par une cellule bactérienne via des micelles figure inspirée de la publication (Li and Chen, 2009)

Garcia-Junco et al. (García-Junco et al., 2001) ont étudié la biodégradabilité du phénantrène en présence d'un biotensioactif produit par la souche *Pseudomonas aeruginosa 19SJ* et ont observé que celui-ci entrainait une augmentation significative du taux de dissolution du phénantrène, mais seulement à des concentrations proches de la concentration micellaire critique (CMC). La plupart des microorganismes produisent des mélanges de biotensioactifs avec des structures chimiques proches mais qui possèdent des propriétés physico-chimiques différentes. Par exemple, les Rhamnolipides produits par les souches *P. aeroginosa* sont constitués de 4 principaux types de structures : mono-rhamnolipide acide, mono-rhamnolipide methyl ester, di-rhamnolipide acide (dR-A), et di-

rhamnolipide methyl ester (dR-Me). Ces rhamnolipides sécrétés en mélange peuvent varier en composition (Hirayama and Kato, 1982; Itoh et al., 1971) et dépendent de la source de carbone présente dans le milieu (Suzuki et al., 1974).

De manière générale, qu'ils soient d'origines biologique ou synthétique, l'utilisation de faibles concentrations en tensioactifs a un effet positif sur la dispersion et la biodisponibilité des composés organiques apolaires faiblement hydrosolubles. L'influence de la nature du tensioactif et de sa concentration (supérieure ou inférieure à la concentration micellaire critique) est primordiale.

b) Emulsion Pickering

Une émulsion Pickering (découverte par Walter Ramsden en 1903 et nommée par S.U. Pickering en 1907) est une émulsion stabilisée par des particules solides qui vont s'adsorber à l'interface des deux phases (liquides non miscibles) en présence. Lorsque de l'huile et de l'eau sont mélangées, des gouttelettes d'huile se forment et peuvent être dispersées dans l'eau. Il est alors possible que ces gouttelettes coalescent pour diminuer la quantité d'énergie du système. Cependant, lorsque des particules solides sont ajoutées au mélange, elles vont se lier à l'interface huile/eau et empêcher les gouttelettes de fusionner, rendant ainsi l'émulsion plus stable (Pickering, 1907; Ramsden, 1903) (figure 12).

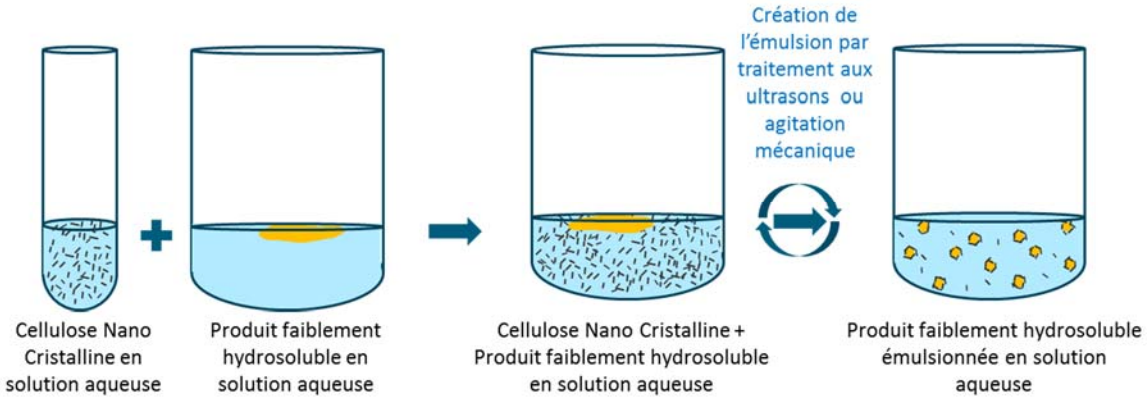


Figure 12 : Description de l'émulsion Pickering avec Cellulose Nano Cristalline comme support

Il est possible d'utiliser les nanotubes de cellulose comme support (Kalashnikova et al., 2013) de l'émulsion de Pickering. Les nanocristaux obtenus à partir d'hydrolyse de cellulose bactérienne peuvent être irréversiblement adsorbés à l'interface huile-eau et former des émulsions ultrastables, d'au moins un an (figures 13 et 14).

Ce type d'émulsion pourrait donc comporter un intérêt, notamment pour les substances huileuses. La cellulose nanocristalline est faiblement ou non toxique pour les bactéries mais peut être biodégradée. En effet, sa forme microcristalline sert de substance de référence pour des essais de compostage ou de dégradation intrinsèque des plastiques (AFNOR, 2004, 2000). Toutefois, les conditions de ces essais sont différentes de celles des essais de biodégradabilité facile. Ainsi, si la

cellulose nanocristalline s'avérait facilement biodégradable, son utilisation présenterait un inconvénient comme support de dispersion pour déterminer la biodégradabilité facile de substances peu hydrosolubles.

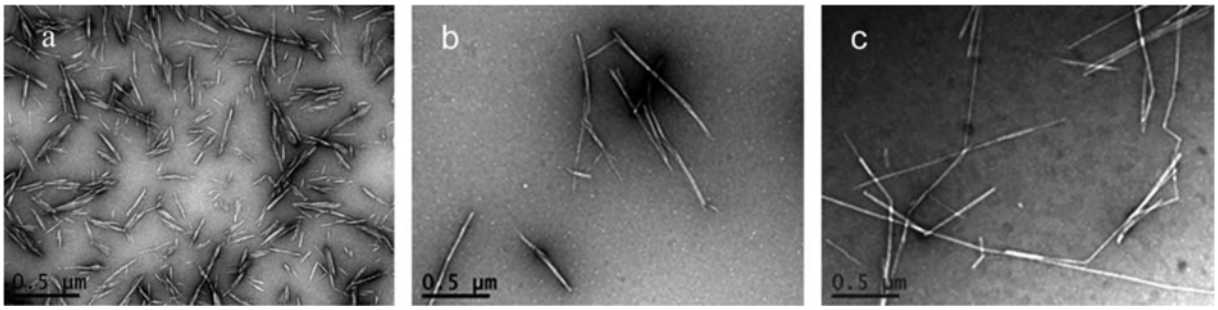


Figure 13 : Images (microscopie électronique à transmission) de cellulose nanocristalline obtenues à partir de CCN (a), BCN (b) et ClaCN (c)*. (Kalashnikova et al., 2013)

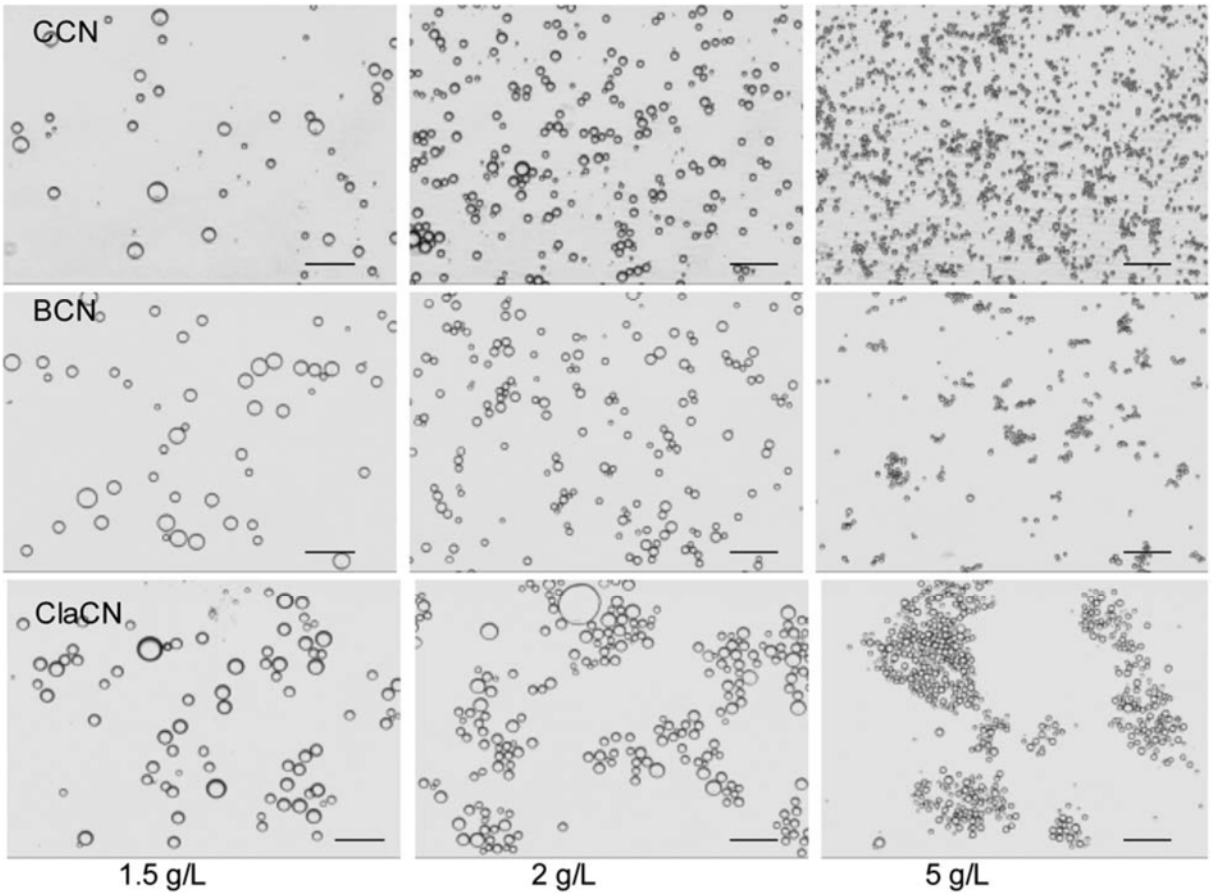


Figure 14 : Images montrant la distribution de gouttelettes une semaine après préparation d'une émulsion Pickering d'hexadécane dans l'eau par différentes sources de cellulose nanocristalline et à différentes concentrations : 1.5 g/L; 2 g/L and 5 g/L for CCN (haut), BCN (milieu) and ClaCN (bas)*. Barre d'échelle : 10 mm. (Kalashnikova et al., 2013)

** Légende des figures 13 et 14 :*

BCN : cellulose nanocristalline bactérienne

CCN : cellulose nanocristalline de coton

CLaCN : cellulose nanocristalline de Cladophores (algues vertes)

c) Molécules cages

Les molécules cages sont des édifices moléculaires souvent appelées « supermolécules » par analogie avec le domaine de la chimie supramoléculaire. Elles sont dites « cages » car elles présentent une cavité permettant des associations avec une autre molécule. Il existe plusieurs types de molécules permettant la réalisation de ce genre d'association moléculaire (Janus, 2003).

Parmi ces molécules, les plus exploitées sont les cyclodextrines qui sont utilisées en particulier dans le domaine de la dépollution en vue d'augmenter la biodisponibilité des polluants organiques du milieu poreux à traiter (déchet, sol ou sédiment pollué) (Benbelkacem, R., Desjardin, V., Ducom, G., Gourdon, 2006). Elles sont connues pour leur aptitude à accroître la solubilité apparente de nombreuses molécules organiques comme le phénanthrène (Gao et al., 2013) par formation de composés ou complexes d'inclusion. Du fait de leur caractère amphiphile (hydrophile à l'extérieur, hydrophobe à l'intérieur), les cyclodextrines sont capables d'inclure dans leur cavité apolaire des molécules hydrophobes pour former des complexes d'inclusion solubles dans l'eau.

Ces molécules (cyclodextrines) présentent un profil intéressant mais sont facilement biodégradables (Verstichel et al., 2004). Elles semblent ainsi peu adaptées à l'optimisation de tests de biodégradabilité facile.

3.2.2. *Méthodes physiques*

a) Fragmentation solide

La dispersion solide ou fragmentation consiste à réduire la taille des particules d'un matériau solide en l'exposant à des contraintes physiques. Il est possible de distinguer différents types de fragmentation, selon le procédé employé et selon la granulométrie obtenue, depuis la fragmentation grossière millimétrique jusqu'à une fragmentation ultrafine nanométrique (Peuker et al., 2004). L'augmentation de la biodisponibilité du composé chimique solide est due à l'augmentation de la surface de contact du solide fragmenté qui augmente sa solubilité et impacte directement sa bioaccessibilité, l'effet étant maximal pour des tailles de particules nanométriques (Li, 2014).

La fragmentation ultrafine par broyage est largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique, ainsi que dans d'autres secteurs comme l'industrie agro-alimentaire ou l'industrie de la peinture, en vue d'obtention de particules fines et ultrafines. Elle consiste essentiellement en une opération de broyage par des corps broyant libres (boulets ou galets). Les corps broyants, le milieu de dispersion (souvent l'eau), le composé et éventuellement l'agent stabilisant, sont chargés dans la chambre de broyage. Les forces de cisaillement et les chocs générés par le mouvement des corps de broyage conduisent à la réduction de taille des particules. La méthode de broyage est une technique à basse énergie. Les corps de broyage sont généralement des sphères constituées de céramique, d'acier

inoxydable, de verre ou encore enveloppées de résine de polystyrène extrudé (Junghanns J. and Müller R.H., 2008; Li, 2014).

b) Méthodes par pression

- L'homogénéisation à haute pression est couramment utilisée dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique pour favoriser la bioaccessibilité des composés faiblement hydrosolubles, par création de micro/nanocristaux (Li, 2014) celle-ci nécessite néanmoins beaucoup d'énergie.

- L'extrusion, procédé largement éprouvé dans l'industrie des plastiques et pharmaceutique, fonctionne à température élevée et sous pression. Cela permet de fabriquer des mélanges à l'échelle moléculaire de composés pour augmenter leur biodisponibilité (Sauceau M, Rodier E, 2011).

- La solubilisation peut être réalisée par fluide supercritique comme le dioxyde de carbone supercritique et l'eau supercritique. Ces solvants dits "écologiques" possèdent la viscosité faible du gaz, la densité élevée du liquide et une faible tension superficielle. Cela permet une diffusivité importante des solutés. Ces propriétés, qui peuvent être pondérées par les paramètres pression et température, facilitent le transfert des faiblement hydrosolubles vers le fluide supercritique (Tiruta-Barna LR, 1995).

Ces trois méthodes peuvent augmenter la biodisponibilité de solutés par changement de leur état physique et n'ont jamais été utilisées pour des essais de biodégradabilité. Elles sont, par contre, difficilement applicables aux essais de biodégradabilité facile car leurs mises en œuvre nécessitent un équipement couteux.

c) Traitement par ondes électromagnétiques

Le traitement électromagnétique est une technique relativement récente en évaluation environnementale. L'utilisation de champs électromagnétiques (EMF pour « Electromagnetic Fields » en anglais) a montré des propriétés intéressantes notamment, dans la gestion de la croissance des plantes et le traitement des eaux usées.

Vallée (Vallée, 2005) a développé un processus physique breveté basé sur les EMF qui permet d'augmenter la solubilité et / ou la dispersion de substances actives afin d'optimiser leur bioassimilation. Il (Vallée, 2004; Vallée et al., 2005) suggère que l'action des EMF sur des particules colloïdales va, par l'action des nanobulles de gaz présentes dans l'eau, perturber l'interface de la double couche ionique de ces colloïdes. Les composés actifs adsorbés sont ainsi libérés et mieux solubilisés/dispersés dans les solutions aqueuses.

Cette voie, non explorée jusqu'à présent pour des essais de biodégradabilité, pourrait permettre une meilleure dispersion des substances peu solubles dans l'eau. La figure 15 décrit de façon schématique la mise en œuvre des EMF.

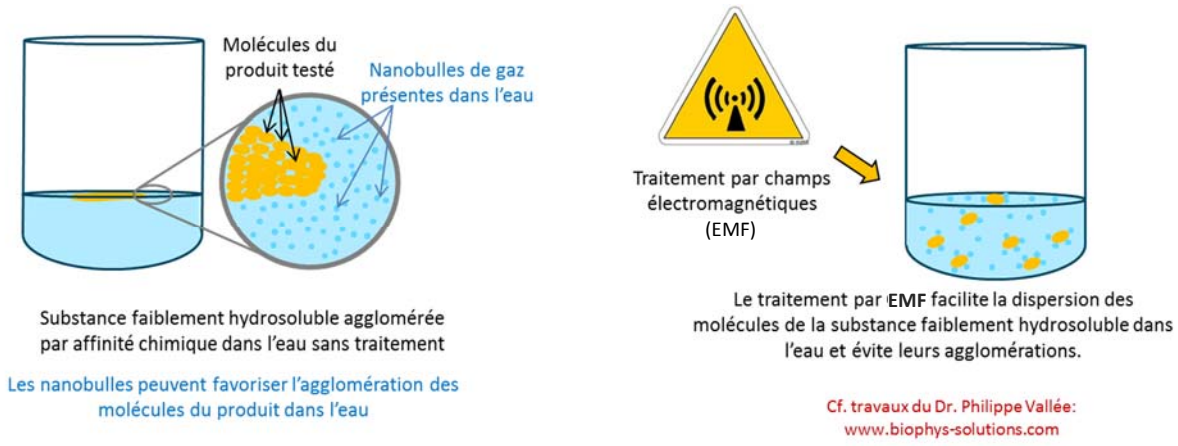


Figure 15 : Principe de l'utilisation des ondes électromagnétiques

d) Méthode par mélangeur statique

Une voie alternative aux méthodes chimiques et physiques est également possible. La méthode par mélangeur statique consiste à générer des perturbations hydrodynamiques en continu en associant un système de pompage à un mélangeur statique dans le réacteur d'essai. Un mélangeur statique est un composant constitué d'un ensemble de pièces immobiles, qui sont assemblées les unes derrière les autres dans un tube. De par l'orientation et la géométrie des éléments qui le compose, le mélangeur statique créé des perturbations qui favorisent la dispersion des molécules du fluide le traversant (Poux and Canselier 2004). Pour cela, le liquide est acheminé au mélangeur statique par un système de pompage (Paul et al. 2004).

Ce développement, innovant, serait applicable aux tests de biodégradabilité facile et nécessiterait d'être réalisé en deux étapes. La première étape devrait permettre la définition des conditions opératoires pertinentes pour la réalisation d'un dispositif de mélange pour créer l'émulsion. La seconde étape consisterait à adapter le dispositif aux problématiques inhérentes aux tests de biodégradation, faisant intervenir des cellules vivantes. Cette seconde étape non finalisée ne sera pas traitée dans ce manuscrit.

Les avantages et inconvénients des MAB sont décrits dans l'annexe I (p.162).

4. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude était de développer une stratégie d'optimisation de la mesure de la biodégradabilité facile des substances peu solubles dans l'eau, en améliorant leur biodisponibilité dans les conditions d'essai. Pour y parvenir, nous avons tout d'abord été amenés à sélectionner des substances chimiques modèles présentant des caractéristiques adaptées à notre problématique. Les tests de biodégradabilité présentant une variabilité notable (*cf. I. Prolégomènes 2.2.3 p.23*), des expérimentations ont ensuite été réalisées afin de la réduire par l'utilisation de souches bactériennes isolées et d'améliorer la compréhension de cette variabilité par analyse métagénomique (figure 16). Ces travaux auront également pour vocation de faire évoluer la norme pilier ISO 10634 de 1995 (International Standard Organization (ISO), 1995) qui décrit les méthodes améliorant la biodisponibilité des substances peu hydrosolubles en vue d'évaluer leur biodégradabilité.

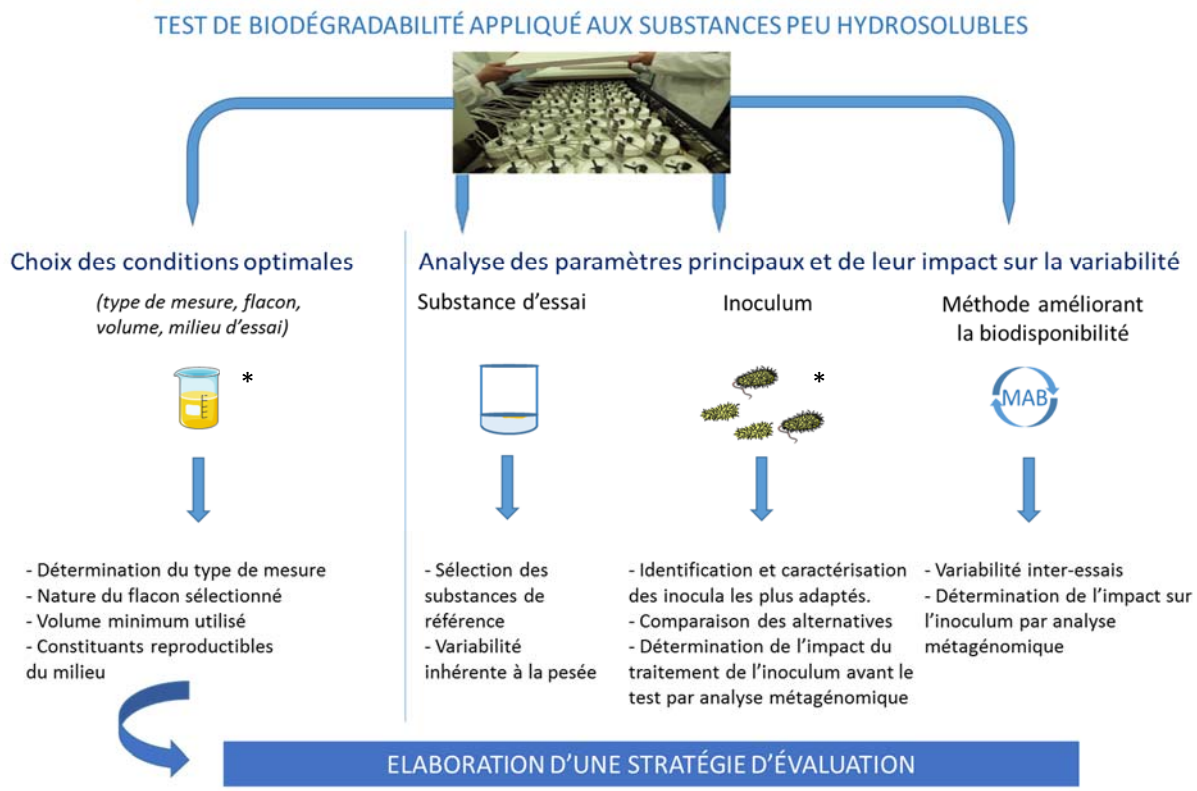


Figure 16 : Objectif de l'étude

** Images provenant de http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint*

II. Matériels et Méthodes

1. Substances modèles et milieux utilisés

1.1. Substances modèles

Compte-tenu du nombre de Méthodes d'Amélioration de la Biodisponibilité (MAB) envisagé, et de la durée des tests de biodégradabilité, il était nécessaire de limiter à 2 le nombre de substances modèles, de préférence un solide et un liquide. Ces substances devaient présenter différentes caractéristiques physico-chimiques et de biodégradation compatibles avec notre projet de recherche et être d'intérêt pour le Groupe L'Oréal. Ces caractéristiques ont abouti à une présélection de 9 substances puis à la sélection des 2 substances modèles comme décrit en figure 17 :

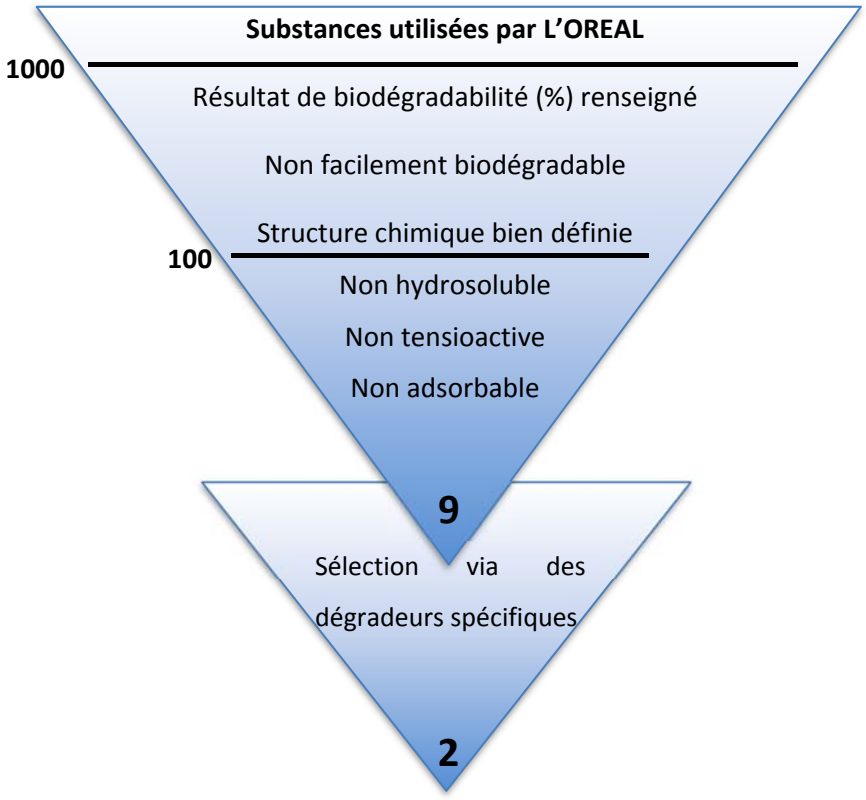


Figure 17 : Démarche de sélection des substances modèles

Les 9 substances présélectionnées sont : l'ISODODECANE (Interchim, référence 031324), l'ISODECYL NEOPENTANOATE (Stéarinerie Dubois, référence 16072), le TOCOPHERYL ACETATE (Interchim, référence A14505), l'HOMOSALATE (Interchim, référence H07450), le 2-OLEAMIDO-1,3-OCTADECANEDIOL (Mexanyl GZ de Chimex, référence 71260), l'ACETYL TRIBUTYL CITRATE (Interchim, référence A10430), le TRIBEHENIN (Interchim, référence T1391), l'ASCORBYL PALMITATE (Interchim, référence 032791) et le PIGMENT BLUE 15 (Interchim, référence 043650).

1.2. Milieux Sturm et Sturm modifié

1.2.1. *Milieu Sturm*

Dans nos conditions de test, les essais de biodégradabilité facile sont réalisés dans un milieu minéral appelé milieu Sturm dont la composition est décrite ci-après :

Préparer les solutions mères suivantes en utilisant des réactifs de qualité analytique :

(a)	Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4	8,50	g
	Hydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4	21,75	g
	Hydrogénophosphate de sodium dihydraté, $Na2HPO4.2H_2O$	33,40	g
	Chlorure d'ammonium, NH_4Cl	0,50	g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 L.

Le pH de la solution doit être égal à 7,4. Ajuster, si besoin par HCl ou NaOH.

(b)	Chlorure de calcium anhydre, $CaCl_2$	27,50	g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 L.

(c)	Sulfate de magnésium heptahydraté, $MgSO_4.7H_2O$	22,50	g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 L.

(d)	Chlorure de fer (III) hexahydraté, $FeCl_3.6H_2O$	0,25	g

Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 L.

Remarque : pour éviter d'avoir à préparer cette solution juste avant usage, ajouter une goutte d'HCl concentré ou 0,4 $g.L^{-1}$ d'acide éthylènediamine-tétraacétique. S'il se forme un précipité dans une solution-mère, la remplacer par une solution fraîchement préparée.

Autoclaver chaque solution pendant 20 minutes à 120°C à 1,2 bar.

Mélanger 10 mL de solution (a) avec 800 mL d'eau, ajouter ensuite 1 mL des solutions (b), (c) et (d) et compléter le volume à 1L (OECD/OCDE, 2013).

1.2.2. *Milieu Sturm modifié*

Afin de réaliser les tests de biodégradabilité facile dans les conditions les plus proches possible du test standardisé mais également en accord avec les contraintes dues à l'utilisation de souches bactériennes isolées comme inoculum, le milieu Sturm est utilisé avec 3 solutions complémentaires nécessaires aux croissances de certaines souches isolées utilisées (Solutions SL7, biotine et thiamine).

a) Solution SL7

La solution SL7 est préparée en mélangeant 1,44 g de $ZnSO_4$ $7H_2O$, 1 g de $MnCl_2$ $4H_2O$, 620 mg de H_3BO_3, 1,9 g de $COCl_2$ $6H_2O$, 249 mg de $CuSO_4$, 523 mg de $NiSO_4$ et 624,2 mg de Na MO_4 $2H_2O$ dans 1 litre d'eau ultrapure. La solution est ensuite autoclavée 20 minutes à 120°C à 1,2 bars.

b) Solution de biotine et solution de thiamine

Pour ces solutions, 5 mg de biotine ou de thiamine sont solubilisés dans 25 mL d'eau ultrapure (Falcon® de 50 mL). Chaque solution est filtrée avec une seringue à filtre (0,22 µm) dans une bouteille en verre d'1 L. Le volume est ensuite ajusté à 1 L avec de l'eau ultrapure afin d'obtenir une solution à 5 $mg.L^{-1}$. Chaque solution est conservée à 4°C.

c) Préparation du milieu d'essai Sturm modifié

Pour réaliser 1 L de milieu d'essai (sous agitation), ajouter 300 mL d'eau ultrapure, 1mL de solution (b), 10 mL de solution (a), 1 mL de solution (c), 1 mL de solution (d), 1 mL de solution SL7, 1 mL de solution de Biotine, 1 mL de solution de Thiamine et ajuster à 1 L avec de l'eau ultrapure.

Le milieu d'essai est préparé extemporanément (pas de conservation).

1.3. Milieu de culture LB

Le milieu LB pour lysogeny broth (bouillon lysogène en français) est un milieu nutritif pour initier et permettre la croissance de souches bactériennes. Ce milieu de culture bactérien préparé en ajoutant 10 g de tryptone (USP Biokar Diagnotics A1401H), 5g de NaCl et 5g d'extrait autolytique levure (Yeast extract, Biokar Diagnostics A1202HA) dans 1 L d'eau ultrapure. Pour obtenir un milieu gélosé, ajouter 15g d'Agar bactériologique type E (Biokar Diagnostics A1012HA) au mélange. La solution est ensuite autoclavée 20 minutes à 120°C à 1,2 bars.

1.4. Solution de $MgSO_4$

Cette solution est réalisée en pesant 2,46 g de $MgSO_4$, 7 H_2O (Sigma-Aldrich, référence 1001181032) dans 1 L d'eau ultrapure, puis autoclavée 20 minutes à 120°C à 1,2 bars.

2. Inoculum

2.1. Boue de station d'épuration

2.1.1. *Provenance*

L'inoculum utilisé pour nos expériences est la boue activée provenant de la station d'épuration de Maxéville (Meurthe et Moselle, France) d'une capacité de 500 000 équivalent-habitants et traitant principalement des eaux ménagères. Le choix de la boue activée est souvent fait car il a été constaté que les inocula provenant d'autres sources comme par exemple l'eau de rivière, montrent généralement des densités cellulaires inférieures et donnent des résultats plus dispersés (OECD/OCDE, 2013).

2.1.2. *Préparation*

Après avoir prélevé environ 5 litres de boue en station d'épuration, il convient de la centrifuger à 1100 g pendant 10 minutes, puis d'éliminer le surnageant et laver la boue dans le milieu minéral. Cette opération de lavage est réalisée 3 fois. La boue concentrée est mise en suspension dans le milieu minéral de façon à obtenir une concentration de 3 à 5 $g.L^{-1}$ de matières en suspension, puis aérée jusqu'à son utilisation. Un échantillon de boue remise en suspension ou de boue non traitée (non lavée) est prélevé juste avant utilisation afin de déterminer le poids sec des matières en suspension (OECD/OCDE, 2013).

2.1.3. *Description des bactéries de l'inoculum par analyse métagénomique*

a) Méthode

Les études métagénomiques réalisées sur l'inoculum n'intègrent uniquement la partie bactérienne de celui-ci et ne couvre donc qu'une partie de la flore susceptible de dégrader la substance testée. Les identifications bactériennes peuvent permettre de répondre aux questions liées à la variabilité de l'inoculum au cours de sa préparation et à l'impact des méthodes améliorant la biodisponibilité (MAB) sur l'inoculum. Les analyses métagénomiques et l'exploitation statistique, décrites ci-après, ont été confiées à la société INRA Transfert Environnement.

Après réception et prétraitement des échantillons, les expériences se sont déroulées en deux étapes : l'extraction et la purification de l'ADN de la matrice extraite puis la vérification et la quantification de la matrice par nanoquantification. L'extraction des acides nucléiques est réalisée par un protocole développé par l'INRA d'après Godon (Godon J.-J. et al., 1997). L'identification

taxonomique est basée sur le séquençage du gène d'ARN ribosomique, qui est présent dans tous les génomes microbiens. L'ADN génomique a été extrait et purifié de l'ensemble des cellules de chaque échantillon, puis tous les gènes d'ARN ribosomique 16S spécifiques aux bactéries sont amplifiés par PCR grâce à des oligonucléotides ciblant des régions d'ARN conservées communes à tous les microorganismes. Le séquençage haut-débit de chaque fragment d'ADN ainsi dupliqué a ensuite été réalisé. L'analyse des séquences obtenues et leur comparaison aux bases de données internationales permettent de positionner phylogénétiquement les microorganismes présents dans chaque échantillon par rapport aux organismes déjà connus. Le séquençage a été réalisé sur un séquenceur MiSeq (Illumina) présenté figure 18, assurant 50 000 séquences brutes garanties pour les bactéries. Les amorces utilisées ciblent les régions variables V4-V5 de la séquence de l'ARN ribosomique 16S des procaryotes permettant de distinguer spécifiquement les espèces recherchées. Les séquences d'ADN bactérien obtenues sont regroupées en séquences uniques (100% d'homologie entre deux séquences) ou en Operationnal Taxonomic Unit - OTU correspondant à 97 % d'homologie entre deux séquences.

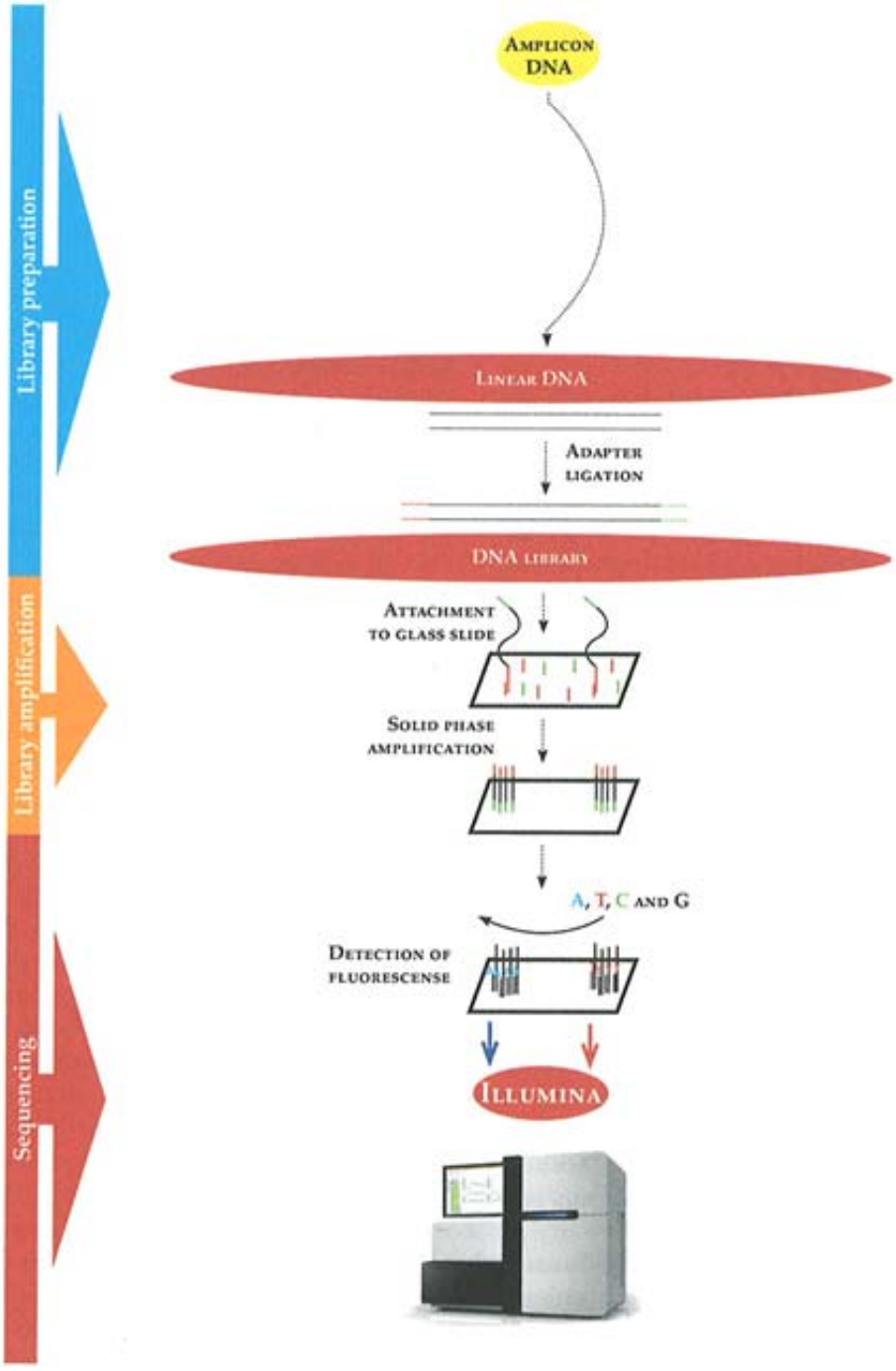


Figure 18 : Présentation schématique de la technologie de séquençage Illumina : préparation de la bibliothèque, amplification et procédé de séquençage (Dlugonski, 2016)

L'analyse bioinformatique des données de séquençage permet d'identifier les microorganismes présents à différents niveaux taxonomiques (phylum et genre). L'analyse permettant l'affiliation phylogénétique jusqu'au niveau genre a été réalisée par un pipeline informatique développé par l'INRA fonctionnant sous Mothur (version 1.33.1) pour le traitement des grandes quantités de données de séquences. L'identification a été réalisée sur la base de la taxonomie SILVA (version 119) pour les bactéries (Quast et al., 2013).

b) Exploitation statistique

Les informations détaillées portant sur l'exploitation statistique ont été fournies par l'INRA Transfert de Narbonne. La diversité d'un échantillon est évaluée sur la base de la proportion et du nombre d'OTUs différents présents. Celle-ci est calculée avec l'indice de diversité de Shannon selon Hill (Hill, 1973) décrit dans l'équation suivante :

$$\textbf{Équation 1 :}\quad \mathbf{H} = -\sum_{\mathbf{i=1}}^{\mathbf{S}} \mathbf{pi}\,\mathbf{ln}(\mathbf{pi})$$

Où : pi est la proportion d'OTUi

S est le nombre d'OTUs (la somme de tous les pi = 1).

La comparaison des indices de diversité de Shannon est réalisée avec trois analyses. La première est l'analyse de la variance (ANOVA) : les trois répliques ont été utilisés pour les « one-way ANOVAs ». L'ANOVA se base sur la moyenne de chaque groupe de données. L'hypothèse nulle (H0) est que les moyennes des différents groupes sont égales. Si l'hypothèse nulle est rejetée ($p < 0.05$), les moyennes des différents groupes diffèrent. Les résultats de l'ANOVA n'indiquent pas quelles moyennes diffèrent. La seconde analyse est la boite à moustaches (« boxplot ») qui montrent la variabilité dans les répliques de chaque groupe. La boîte présente les quartiles (25%, 50% (médiane) et 75%). Des segments aux extrémités mènent jusqu'aux valeurs extrêmes. La troisième analyse est le test « post-hoc de Tukey » ou comparaisons multiples qui a été effectué pour comparer les moyennes de deux groupes. Les tests HSD de Tukey avec ajustement de l'erreur « single-step » ont aussi été réalisés.

Les échantillons ont ensuite été comparés sur la base des données d'abondance au niveau 'famille' pour les 20 familles majoritaires. Les 20 familles majoritaires ont été identifiées pour chaque question traitée. Pour cela, les « permutational multivariate analyses of variance (PERMANOVA) » ont été réalisées sur des matrices de dissimilarité Bray-Curtis. Avant le calcul de la matrice de dissimilarité, les abondances absolues ont été standardisées suivant la méthode de Hellinger. Le « non-metric multidimensional scaling » (NMDS) est une approche d'ordination, se basant sur une matrice de distance ou de dissimilarité. Le NMDS est une approche fondée sur des rangs qui présente la dissimilarité par paires entre objets dans deux dimensions. Le NMDS peut utiliser aussi des distances autres que les distances Euclidiennes. Des variables quantitatives, semi-quantitatives, qualitatives et un mélange de variables peuvent être utilisés. Le NMDS est tolérant aux distances manquantes. Enfin, les analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées sur la base des abondances absolues des 20 familles majoritaires sans transformation de données.

2.2. Souches bactériennes isolées

Afin de répondre à la variabilité engendrée par l'utilisation d'une boue de station d'épuration comme inoculum, notre recherche s'est portée vers l'identification de souches bactériennes parmi un panel représentatif de la boue activée capable de dégrader les substances modèles (cf. *I. Prolégomènes 2.2.3.b p.26*). Une première étape de définition de l'hydrophobie des souches bactériennes du panel et de sa relation avec la lipophilie des substances modèles a été étudiée. Un essai préliminaire de respirométrie a ensuite permis d'évaluer la capacité des souches à dégrader les substances modèles. Le potentiel des souches sélectionnées a été confirmé lors d'essais de biodégradabilité réalisés avec l'automate Respicond VI® dont le principe est décrit dans *II. Matériels et Méthodes 3.2*. p.55. Enfin, l'impact de la phase de croissance des souches d'intérêt sur la biodégradabilité a été étudié. L'ensemble de ces expériences est détaillé dans les paragraphes qui suivent.

2.2.1. *Détermination de l'hydrophobie des bactéries*

L'hydrophobie est la propriété d'une cellule ou d'une molécule à ne pas être soluble dans l'eau du fait de son incapacité à créer des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau (Ben-Naim, 1980). La mesure de l'hydrophobie des bactéries du panel de 48 souches pourrait être une voie d'explication de la prise en charge des molécules peu hydrosolubles par certaines de ces bactéries. Le protocole utilisé sur l'ensemble des bactéries du panel est décrit par Jorand (Jorand, F, 1994) avec deux modifications : d'abord, les souches pures sont cultivées dans un milieu LB, ensuite la phase aqueuse n'est pas de l'eau distillée mais une solution de lavage (eau stérile à 10^{-2} mol.L^{-1} de $MgSO_4$) afin de limiter le stress osmotique. Le détail du mode opératoire est fourni en Annexe II (p.166), un mode opératoire simplifié est décrit ci-dessous (figure 19).

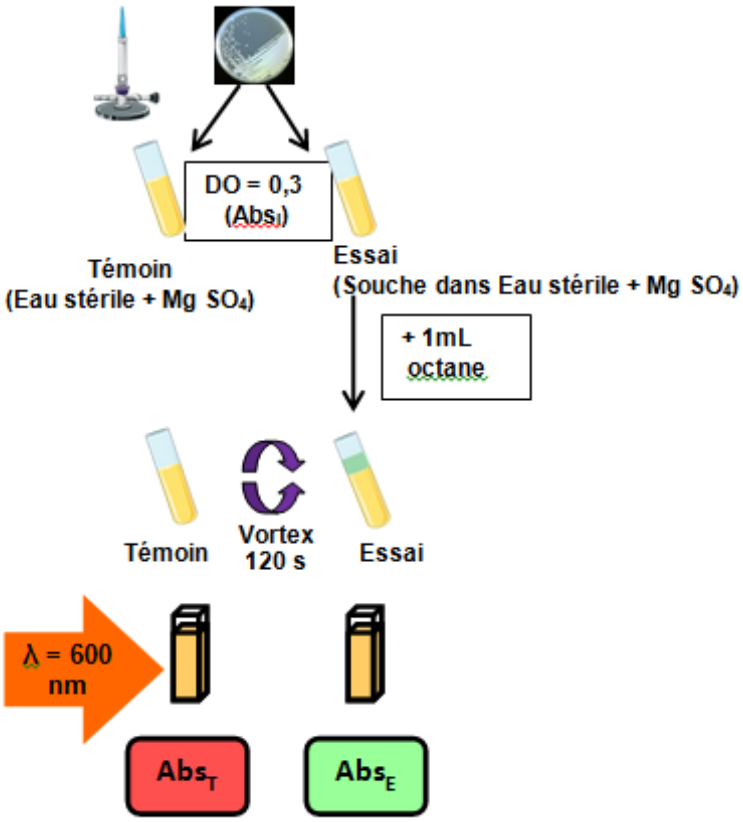


Figure 19 : Mode opératoire simplifié du test de détermination de l'hydrophobie des bactéries

Une mesure de la densité optique (DO) à λ = 600 nm est réalisée dans la phase aqueuse pour définir la répartition de la souche bactérienne entre la solution aqueuse de $MgSO_4$ et le n-octane (Sigma-Aldrich - référence : 101310158 discontinué). L'indice d'adhésion à l'octane est similaire au log Poe (coefficient de partage octanol / eau) et est calculé de la manière suivante :

Équation 2 : Octane adhesion index (A %) = $[1 - Abs_E / Abs_T] \times 100$

Un indice de floculation est également calculé :

Équation 3 : Flocculation index (F %) = $[1 - Abs_T / Abs_i] \times 100$

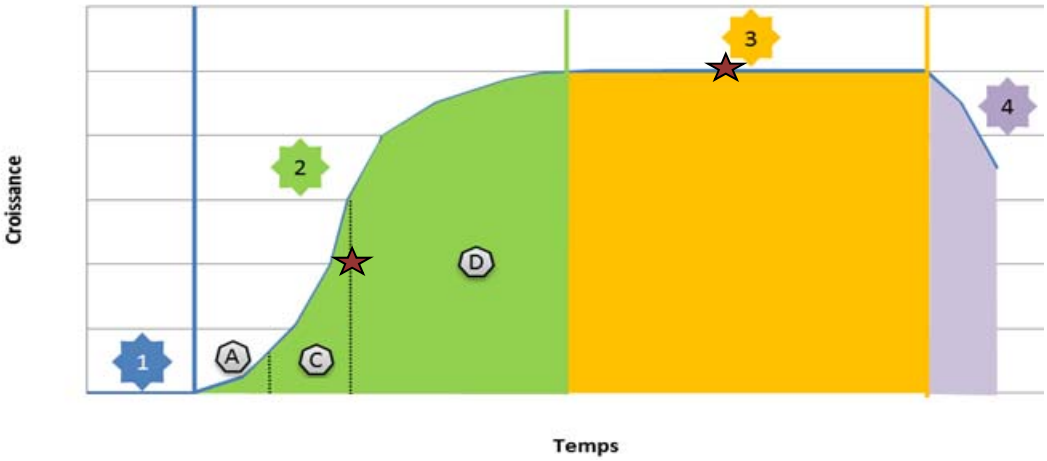
La bactérie est considérée comme hydrophile lorsqu'elle possède un indice d'adhésion à l'octane considéré comme faible (≤ 20 %) et lipophile lorsque cet indice est considéré comme fort (≥ 80 %). Cette interprétation est synthétisée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Interprétation des résultats de l'indice d'adhésion à l'octane des bactéries

Indice A (%)	≤ 20%	20 % < x < 80 %	≥ 80 %
Bactérie	Hydrophile	Neutre	Lipophile

2.2.2. *Détermination des phases de croissance bactérienne des souches d'intérêt*

Les tests de biodégradabilité facile utilisent généralement un inoculum provenant d'une station d'épuration des eaux usées à dominante urbaine. Les multiples souches bactériennes qui composent cet inoculum sont, lors de leurs prélèvements, à des phases de croissance différentes (figure 20). Il était donc intéressant de vérifier l'effet de la phase de croissance sur l'hydrophobie et la capacité de biodégradation de bactéries. Les deux phases : exponentielle et stationnaire d'intérêt pour cette étude sont matérialisées par une étoile rouge.



1. ***Phase de latence** : La phase de latence correspond à une phase d'adaptation enzymatique.*
2. ***Phase de croissance** : Les bactéries se multiplient.*
   - *A- Phase d'accélération : Les divisions cellulaires commencent.*
   - *C- **Phase exponentielle de croissance** : La vitesse de reproduction cellulaire est maximum*
   - *D- Phase de décélération : Epuisement des nutriments du milieu et de l'accumulation des déchets*
3. ***Phase stationnaire** : Autant de cellules apparaissent et disparaissent par lyse cellulaire.*
4. ***Phase de déclin** : Le nombre de cellules qui meurent augmente.*

Figure 20 : Phases de croissance bactérienne inspirée de (Augustin, 2005)

Chaque souche isolée a été préparée dans un flacon en verre de 500 mL préalablement stérilisé, en ajoutant 450 mL de milieu de culture LB. Les flacons sont ensuite stérilisés par un passage de 20 minutes à l'autoclave à 120°C puis laissés à refroidir à température ambiante. Les souches sélectionnées contenues dans des tubes Eppendorf® sont décongelées sur un lit de glace (environ 30 minutes). L'intégralité du contenu du tube Eppendorf® (entre 750 µL et 1500 µL) est prélevée à l'aide d'une pipette de 2 mL en condition stérile puis inoculé dans la bouteille en verre contenant le milieu de culture LB. Les bouteilles en verre sont ensuite placées dans une enceinte thermostatée à 28°C sous agitation. La mesure de densité optique DO à λ = 620 nm est réalisée en préparant, en condition stérile, dans 2 cuves à spectrophotomètre une cuve témoin avec 1 mL de milieu LB et une cuve essai avec 1 mL de milieu LB contenant la souche bactérienne. Si la DO obtenue est supérieure à 1, il est nécessaire de réaliser une nouvelle mesure avec une dilution. Cette mesure est effectuée au départ (T0) puis environ toutes les 2 heures (soit 4 à 6 mesures par jour), jusqu'à obtention d'un plateau correspondant à la phase stationnaire.

3. Description des tests de mesure de la biodégradation

3.1. Test préliminaire de respirométrie avec le système PreSens®

Une méthode fondée sur les microplaques PreSens® (figure 21) en développement au sein du laboratoire GEPEA donne l'opportunité de déterminer[8] l'existence d'un ou de plusieurs dégradeurs bactériens spécifiques aux 9 substances présélectionnées parmi un panel de 48 souches (Annexe III p.168). Les préparations des souches et des microplaques sont détaillées en Annexe IV p.170.

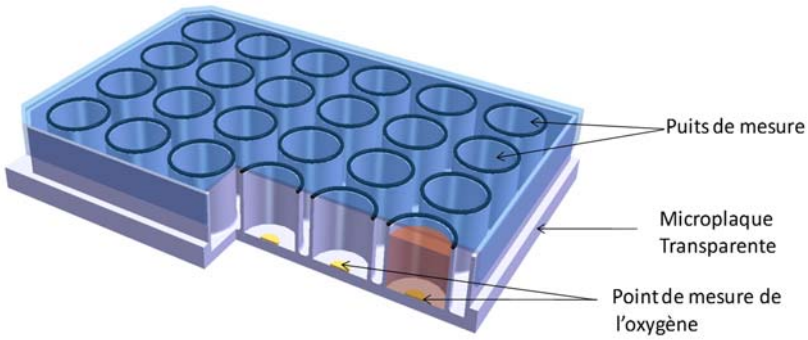


Figure 21 : microplaque Oxodish OD24 pour lecteur PreSens®

Ce criblage haut débit a été nécessaire pour sélectionner les deux substances modèles et les souches bactériennes isolées utilisées comme inocula pour finaliser la configuration du test de biodégradabilité. Les mesures respirométriques réalisées par le lecteur SDR v4 Basic de chez PreSens® fournissent une cinétique de consommation de l'O_2 pour chaque association substance/souche bactérienne. Les substances d'intérêt étant insolubles ou faiblement solubles dans l'eau, aucune solution mère n'a été préparée. Les substances ont été déposées en excès dans les puits pour obtenir une fraction solubilisée saturante dans le milieu Sturm modifié (décrit dans II. *Matériels et méthodes 1.2.2.* p.43). Ainsi l'intensité de la réponse n'est pas forcément proportionnelle à la capacité de la bactérie à dégrader la substance. La méthode ne peut donc pas être qualifiée de quantitative mais peut indiquer, pour une même quantité de substance, une prise en charge plus ou moins importante d'une souche à une autre. De plus, l'absence de consommation d'O_2 est une bonne indication de l'absence de dégradation ou d'une toxicité microbienne.

L'appareil se présente sous la forme d'un lecteur de plaque (figure 22) permettant de mesurer la concentration en O_2 dissous grâce à des capteurs situés dans le fond des microplaques adaptées au système (figure 23). Le volume d'essai des puits est de 3 mL.

[8] Ce travail a fait l'objet d'un stage de 2e année de DUT au laboratoire CBAC réalisé par Jérôme Sanchez



Figure 22 : Microplaque Oxodish OD24 posées sur un Lecteur Sensor Dish Reader (PreSens®)[9]

La mesure, effectuée en double pour chaque couple substance/souche bactérienne, est une cinétique de consommation de l'O_2 avec 3 mesures par jour réalisées sur 28 jours (durée d'un test de biodégradabilité facile). Le transfert d'O_2 opéré est décrit dans la figure 22.

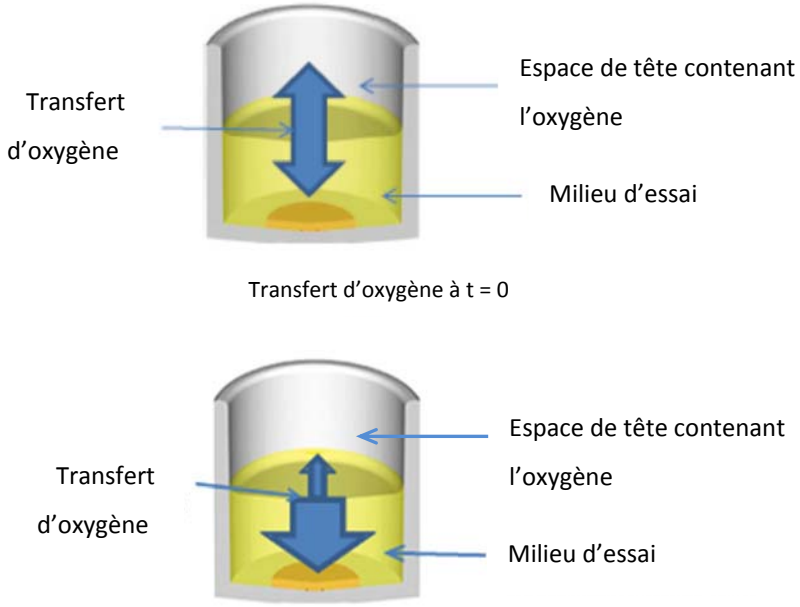


Figure 23 : Transfert de l'oxygène dans un puits

Chaque puits fournit, par l'intermédiaire du logiciel PreSens®, une concentration en mg $O_2.L^{-1}$ au cours du temps. Il existe deux types de configuration de puits, les témoins négatifs et les essais. Les puits « témoins négatifs » réalisés avec 2 répliques dans chaque essai, contenant le milieu Sturm modifié et la souche bactérienne. Ce témoin sans substance sert de référence de respiration et quantifie la quantité d'oxygène consommée par la souche bactérienne dans le milieu d'essai. Cette consommation reste relativement stable au cours du temps, car la concentration en oxygène du milieu est rééquilibrée en permanence par l'oxygène contenu dans l'espace de tête. Les puits « essais » réalisés en 2 répliques dans chaque essai, contiennent le milieu Sturm modifié, la souche bactérienne et la substance testée. Dans le cas d'une prise en charge de la substance par la bactérie, la

[9]*Source image : http://www.selectscience.net/products/sdr-sensordish-reader/?prodID=20332*

concentration en oxygène dans le milieu va diminuer fortement. Une fois l'activité biologique terminée (atteinte de la plus faible concentration en oxygène dans le milieu), le titre en oxygène va remonter par rééquilibrage en oxygène entre le milieu d'essai et l'air de « l'espace de tête » du puits (figure 24).

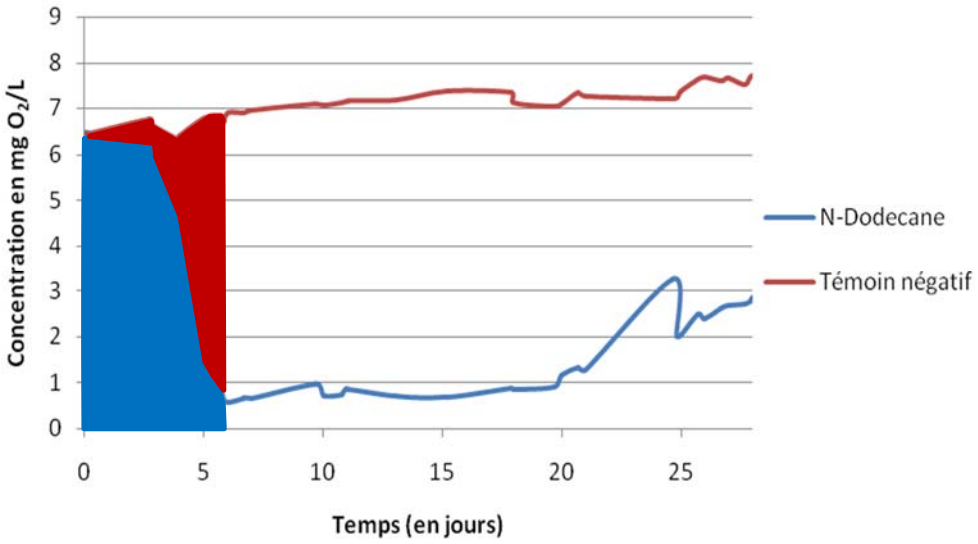


Figure 24 : Différence entre les aires du témoin inoculum et de l'essai

Afin de définir si la présence de la substance a créé une activité biologique bactérienne, le résultat est calculé par la différence entre les aires sous la courbe des cinétiques de consommation d'O_2 du témoin négatif et de l'essai (substance testée). La courbe est exploitée du début de l'expérience jusqu'au plus bas niveau d'O_2 obtenu dans l'essai (fin de l'activité biologique). Ce résultat est exprimé en % et est appelé « % O_2 » (Equation 4).

$$\textbf{Équation 4 : } \%\ \mathbf{O2} = \frac{\textbf{Aire du témoin} - \textbf{Aire échantillon}}{\textbf{Aire du témoin}}\ \mathbf{x\ 100}$$

Pour pouvoir affirmer que la respiration d'une souche bactérienne est significativement différente en présence de la substance testée, des seuils ont été définis. Un panel représentatif de 28 témoins du souchier de bactéries a été étudié afin de comparer les variations d'aire moyenne entre chaque réplique. Le test T de Student a mis en évidence une différence significative et statistique pour un pourcentage supérieur à 2,048 % (α = 0,05 et 28 échantillons). La valeur du seuil sans effet a donc été fixée à 5 % (afin de conforter le résultat). Ainsi, un seuil :

- < 5 % indiquera que la souche ne dégrade pas significativement la substance
- Compris entre 5 et 10 % O_2 indiquera un dégradeur spécifique potentiel
- > 10 % O_2 indiquera un dégradeur spécifique confirmé.

L'exploitation de ces seuils et les codes couleur correspondants sont précisés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Exploitation des résultats du système Présens®

Résultat	< 5%	5 % < x < 10 %	> 10 %
Dégradeur spécifique	Non	Potentiel	Confirmé

3.2. Test de criblage de la biodégradabilité facile avec le Respicond VI®

3.2.1. *Choix du respiromètre Respicond VI®*

Afin d'évaluer les différents inocula et les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité par un essai de criblage, l'appareil utilisé devait être automatisé et posséder une forte capacité de test. Ses flacons doivent avoir un volume de test supérieur à 50 mL et être agités. Les différents respiromètres permettant de réaliser des essais de biodégradabilité facile avec ces caractéristiques sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Respiromètres compatibles avec les essais de biodégradabilité facile

Dénomination du Respiromètre	Distributeur/ Fournisseur	Type de mesure	Nombre de réacteurs	Volume d'essai (mL)	Prix (€ HT)
BSBdigi	Selutec	O_2 ou **CO_2**	20	**150**	45 900
CES	Co-ordinated environmental services Ltd	O_2 et **CO_2**	20	**1000**	72 950
DBO Track II	Hach	O_2	6	**150**	2 650
OxiTop	Grosseron	O_2	40	**500**	15 000
Oxymax	Columbus Intruments	O_2 ou **CO_2**	60	**150**	117 800
Respicond VI	**Nordgren Innovations AB**	**CO_2**	**95**	**150**	75 000
Sapromat	Selutec	O_2	20	**1000**	≈ 30 000

Sur la base de ces informations, le Respicond VI® a été sélectionné comme l'équipement le plus adapté à nos besoins car il possède tous les critères identifiés comme pertinents associés à la plus forte capacité de test (95 flacons).

3.2.2. *Description d'un test de biodégradabilité avec le Respicond VI®*

La préparation d'un test Respicond VI® débute par la pesée des substances chimiques (substance de référence, substances à tester, additifs) directement dans le flacon d'essai de 250 mL en polypropylène / Nalgene® chimiquement inerte et autoclavable (référence VWR : 216-8225) visible en figure 25.

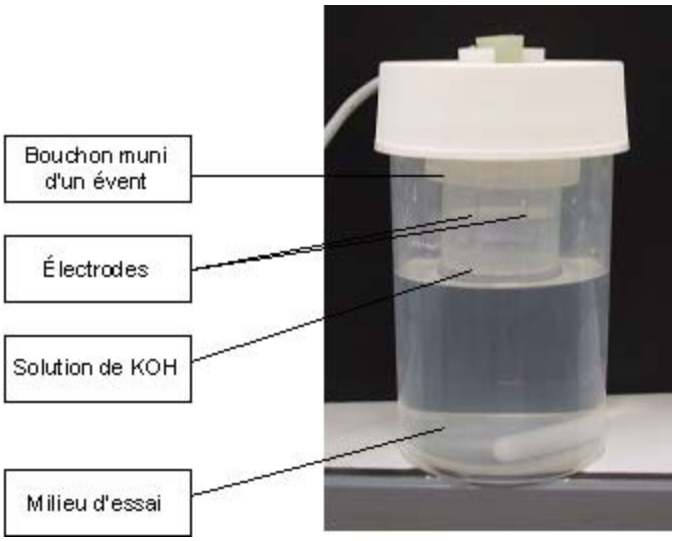


Figure 25 : Flacon d'essai Respicond VI®

Il est ensuite nécessaire de préparer le milieu d'essai (Milieu Sturm décrit dans *II. Matériels et Méthodes 1.2.1. p.43*).

Si l'inoculum utilisé est de la boue activée comme décrit précédemment au *2.1. Boue de station d'épuration p.45*, il est utilisé à une concentration finale de 30 mg de matière sèche.L^{-1}.

Lorsque l'inoculum utilisé est une souche bactérienne isolée, celle-ci doit être préparée en suivant le mode opératoire décrit dans l'annexe V p.173. La concentration classique de l'inoculum boue activée est de maximum 30 mg de matière en suspension.L^{-1} (≈10^5 bactéries.mL^{-1}). Les souches isolées étant plus fragiles que la boue activée, la concentration est fixée à 10^7 bactéries.mL^{-1} équivalente à une DO de 0,05 à λ = 620 nm. Cette concentration correspond à la concentration des essais préliminaires réalisés avec le système PreSens®. Pour ces essais avec souches isolées, le milieu utilisé est le milieu Sturm modifié.

Pour réaliser un flacon réactionnel, il convient d'ajouter à un volume mesuré de milieu minéral une concentration connue de substance à tester (20 mg.L^{-1} de COD ou de carbone organique total - COT) représentant l'unique source de carbone organique (hors inoculum) puis l'inoculum. La dégradation est suivie par l'analyse du dioxyde de carbone produit pendant une période de 28 jours. Le dégagement de CO_2 est mesuré comme décrit par Nordgren (Nordgren, 1988), sur la base de la variation de la conductivité d'une solution d'hydroxyde de potassium contenant du CO_2 piégé. Le CO_2 absorbé dans cette solution d'hydroxyde de potassium forme brièvement des ions carbonates qui réduisent la conductivité de la solution. Cette modification de la conductivité peut être mesurée et permet de quantifier la quantité de CO_2 absorbé, permettant une mesure intégrée de la respiration. Ce principe est similaire à celui recommandé dans la ligne directrice de l'OCDE 301 B (OECD/OCDE, 2013).

Le protocole de lancement et de récupération des données brutes du Respicond VI® sont décrits en annexe VI p.177. Les résultats provenant du logiciel sont ensuite extraits sous format .csv et

convertis en .txt puis au format Excel exprimés en mg de CO_2. La première étape consiste à corriger cette valeur de CO_2 cumulée obtenue pour chaque réplique et pour chaque jour d'essai par la valeur du témoin correspondant :

- Pour les résultats obtenus avec la substance de référence, la substance d'essai testée en addition directe ou après traitement aux ultrasons[10], il convient de retrancher la valeur de la médiane des répliques du témoin inoculum obtenue pour le jour correspondant.

- Pour les résultats obtenus avec la substance d'essai testée avec une MAB (excepté le traitement aux ultrasons), il convient de retrancher la valeur de la médiane des répliques du témoin inoculum associée à la même MAB sans substance d'essai obtenue pour le jour correspondant.

Ensuite, l'ensemble de ces données de mg de CO_2 cumulé corrigé (mg de CO_2 produit) est converti en % de biodégradation selon l'équation 5 suivante :

Équation 5 :

$$\%\ \textbf{de dégradation} = \frac{\textbf{mg de CO2 produit}}{\textbf{mg de COT ajouté dans l'essai x 3,67}}\ \textbf{x 100}$$

$$\%\ \textbf{de dégradation} = \frac{\textbf{mg de CO2 produit}}{\textbf{11}}\ \textbf{x 100}$$

Où :

- 3,67 est le facteur de conversion (44/12) du carbone en dioxyde de carbone. On obtient le pourcentage de dégradation à un instant donné, en effectuant la somme des pourcentages de dioxyde de carbone théorique (CO_2Th) calculés pour chaque jour où des mesures ont été réalisées, pendant la période considérée (OECD/OCDE, 2013).

- Le « *mg de COT ajouté dans l'essai* » correspond à la concentration de carbone provenant de la substance (20 $mg.L^{-1}$) multipliée par le volume d'essai (150 mL). Cela correspond pour nos essais Respicond® à la valeur de 3 mg.

Les données brutes (annexe VII p. 182) sont ensuite présentées sous la forme d'un tableau comme présenté ci-dessous permettant de réaliser des représentations graphiques sous format Excel (tableau 5 et figure 26) :

[10] *Il est admis que le traitement aux ultrasons, réalisé sur le milieu minéral sans inoculum, n'a pas d'incidence sur les caractéristiques de l'inoculum (après introduction de celui-ci dans le milieu).*

Tableau 5 : Exemple de résultats en pourcentage de biodégradation obtenus pour 5 répliques d'acétate de sodium testé en addition directe avec le Respicond VI® (le tableau sur 28 jours est ici coupé en deux pour faciliter la lecture)

Durée (j)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
T-ANa 1 (%)	0	3	11	19	23	26	28	30	32	35	37	40	43	46
T-ANa2 (%)	0	5	17	27	37	45	52	58	62	66	69	71	74	76
T-ANa3 (%)	0	4	15	24	33	39	46	52	57	60	64	66	69	71
T-ANa4 (%)	0	2	11	20	27	34	40	46	52	56	59	63	66	68
T-ANa5 (%)	0	3	11	19	25	30	34	39	44	49	53	58	62	65
Médiane (%)	**0**	**3**	**11**	**20**	**27**	**34**	**40**	**46**	**52**	**56**	**59**	**63**	**66**	**68**
Médiane (%) +15	**15**	**18**	**26**	**35**	**42**	**49**	**55**	**61**	**67**	**71**	**74**	**78**	**81**	**83**
médiane (%) -15	**-15**	**-12**	**-4**	**5**	**12**	**19**	**25**	**31**	**37**	**41**	**44**	**48**	**51**	**53**

Durée (j)	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
T-ANa 1 (%)	50	52	55	58	60	62	64	66	67	68	69	70	69	70	70
T-ANa2 (%)	77	78	79	80	81	82	83	83	84	84	84	85	84	85	84
T-ANa3 (%)	73	74	75	76	77	78	80	80	81	82	82	82	82	82	82
T-ANa4 (%)	71	71	72	74	75	76	77	77	77	78	78	78	77	78	77
T-ANa5 (%)	68	70	72	75	77	79	81	82	83	84	85	85	86	86	86
Médiane (%)	**71**	**71**	**72**	**75**	**77**	**78**	**80**	**80**	**81**	**82**	**82**	**82**	**82**	**82**	**82**
Médiane (%) +15	**86**	**86**	**87**	**90**	**92**	**93**	**95**	**95**	**96**	**97**	**97**	**97**	**97**	**97**	**97**
médiane (%) -15	**56**	**56**	**57**	**60**	**62**	**63**	**65**	**65**	**66**	**67**	**67**	**67**	**67**	**67**	**67**

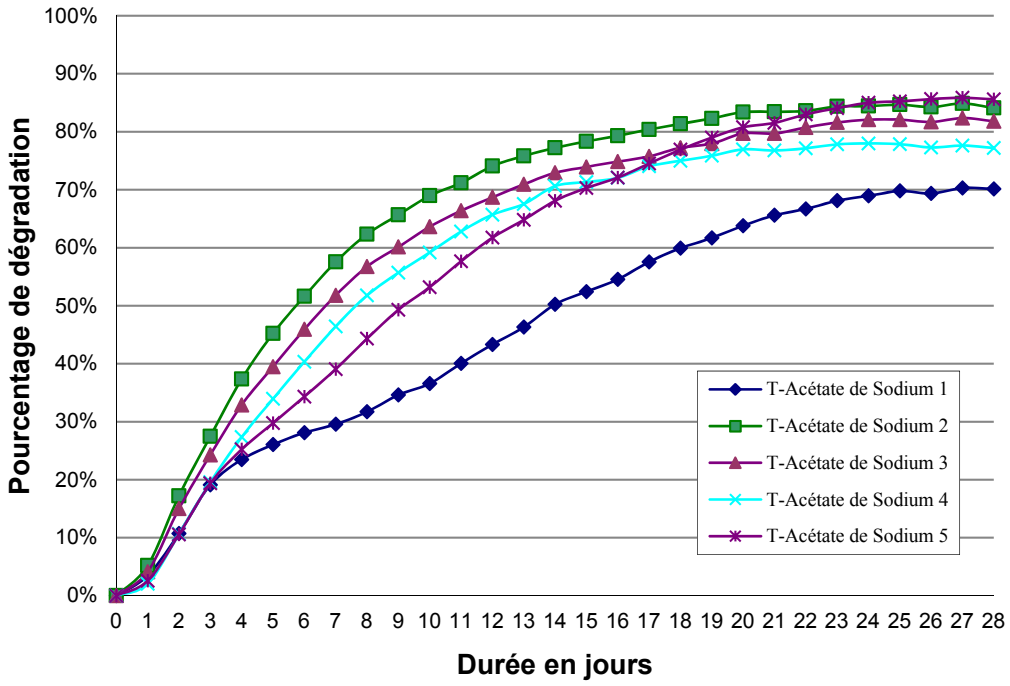


Figure 26 : Exemple de représentation graphique de 5 répliques d'acétate de sodium testé en addition directe avec le Respicond VI®

3.2.3. *Critère de validité des essais*

Les critères de validité sont identiques à ceux décrits dans la ligne directrice OCDE 301 B :

Un essai est considéré comme valide si les valeurs des mesures de disparition de la substance d'essai, au niveau du plateau, à la fin de l'essai ou à la fin de l'intervalle de 10 jours, selon les cas, ne présentent pas de différence de plus de 20%, et si le taux de dégradation du composé de référence a atteint le niveau seuil de 60% en moins de 14 jours. Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'essai devra être recommencé.

Si, lors d'un essai de toxicité mettant en œuvre à la fois la substance à tester et un produit de référence, la dégradation est inférieure à 25 % (établie d'après le CO_2Th du mélange des deux produits) au cours des 14 premiers jours, on peut estimer que la substance d'essai a un effet toxique pour les bactéries. La série d'essais doit être répétée, en utilisant une concentration de substance à tester plus faible et/ou une concentration d'inoculum plus élevée, sans toutefois dépasser 30 $mg.L^{-1}$ de matières en suspension.

La teneur en carbone inorganique de la suspension d'essai en milieu minéral doit être inférieure à 5 % du carbone total au début de l'essai ; le dégagement de CO_2 total dans le témoin avec inoculum ne doit normalement pas dépasser 40 $mg.L^{-1}$ de milieu en fin d'essai. Si l'on obtient des valeurs supérieures à 70 $mg.L^{-1}$ de CO_2, il convient d'examiner les résultats et les méthodes expérimentales avec un esprit critique (OECD/OCDE, 2013).

De plus, l'utilisation de l'appareil Respicond VI© peut induire, de par le faible volume d'essai de 150 mL, un décalage dans le temps du début de la cinétique de biodégradation pouvant s'expliquer par une hétérogénéité de composition ou de concentration des micro-organismes biodégradeurs dans les différents flacons d'essai. Ainsi l'utilisation du Respicond VI©, par rapport à un test standard avec 2 répliques et un volume d'au moins 1 L, a nécessité l'adaptation de certains critères de validité de la ligne directrice OCDE 301 B. Ces nouveaux critères sont :

- Pour au moins 75 % des valeurs des témoins positifs, le pourcentage de dégradation de la substance de référence : acétate de sodium (Merck, référence 1062680250) doit être supérieur ou égal à 60 % après 14 jours (le critère de la ligne directrice OCDE 301 B est alors systématiquement atteint)
- Au minimum 75 % des valeurs de biodégradation obtenues (ou 2 valeurs sur 3) pour les témoins positifs et les produits testés sont comprises dans l'intervalle médian des valeurs initiales plus ou moins 15 % de biodégradation pour, au minimum :
    - Le 14ème jour pour les valeurs des témoins positifs (et éventuellement les valeurs des contrôles de toxicité).
    - Le 28ème jour, le début et la fin de l'intervalle de 10 jours pour les valeurs des produits testés.

Dans le cas où le critère de validité pour les valeurs des produits testés n'est pas respecté en début et/ou fin de l'intervalle de 10 jours, il convient de vérifier si un décalage du démarrage de la biodégradation (atteinte du seuil de 10 %) n'a pas eu lieu entre les répliques (chacune étant préparée individuellement). Avec le volume de solution d'essai du Respicond VI® (150 mL), ce phénomène peut s'expliquer par une hétérogénéité de composition ou de concentration des micro-organismes biodégradeurs dans les différents flacons d'essai. Dans ce cas, la cohérence entre les répliques sera vérifiée indépendamment pour conclure sur la validité de l'essai (respect ou non de l'intervalle des 10 jours pour chaque réplique, résultat de la biodégradabilité à 28 jours).

3.3. Test de confirmation de la biodégradabilité facile (OCDE 301 B)

Les tests de confirmation sont réalisés en suivant les recommandations de la ligne directrice OCDE 301 B (OECD/OCDE, 2013).

3.3.1. *Principe et description de la méthode*

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de substance à tester (20 $mg.L^{-1}$ de COD ou de COT) comme unique source nominale de carbone organique ajoutée, est aéré dans l'obscurité ou sous lumière diffuse, par passage d'air exempt de dioxyde de carbone sous débit contrôlé. La dégradation est suivie par l'analyse du dioxyde de carbone produit pendant une période de 28 jours. Le CO_2 est piégé par de l'hydroxyde de baryum ou de sodium, puis il est dosé par titration de l'hydroxyde en excès ou en tant que carbone inorganique. La quantité de dioxyde de carbone produit par la substance d'essai (corrigée de la valeur obtenue pour le témoin contenant l'inoculum) est exprimée sous forme de pourcentage du CO_2Th. Le taux de biodégradation peut également être calculé à partir d'une analyse supplémentaire du COD au début et à la fin de l'incubation.

Les conditions d'essai sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Conditions d'essai du test de biodégradabilité OCDE 301 B

Concentration de la substance d'essai	**Concentration de l'inoculum**			**pH**	**T°C**
	$mg.L^{-1}$ de matières en suspension	mL d'effluent.L^{-1}	cellules.L^{-1} (approx.)		
10-20 mg COD.L^{-1}	≤ 30 $mg.L^{-1}$	≤ 100	10^7 - 10^8	7,4 ± 0,2	22 ± 2 °C

Le milieu d'essai Sturm a été décrit dans *II. Matériels et Méthodes 1.2. p.43*.

Dans chaque flacon de 3 L, verser 800 mL de milieu Sturm. Ajouter un volume de boue activée préparée au préalable tel que la concentration en matières en suspension ne dépasse pas 30 $mg.L^{-1}$

dans le volume final de 1 L du mélange ensemencé. Ou bien, diluer d'abord la boue préparée dans le milieu minéral afin d'obtenir une concentration de 500 à 1 000 $mg.L^{-1}$ de matière en suspension, puis ajouter une partie aliquote de cette suspension au contenu du récipient de 3 L de façon à atteindre une concentration de 30 $mg.L^{-1}$; ceci permet d'obtenir la concentration désirée avec une plus grande précision. Aérer ces mélanges ensemencés pendant une nuit avec de l'air exempt de CO_2 afin d'éliminer le dioxyde de carbone.

Ajouter séparément des quantités connues de la substance d'essai directement dans les flacons et de volumes connus de la solution mère du composé de référence dans des flacons préparés en double de telle sorte que les produits ajoutés conduisent à des concentrations de 10 à 20 $mg.L^{-1}$ de COD ou de COT ; ne pas ajouter de produit dans les flacons qui serviront de témoins pour l'inoculum. Dans tous les récipients, compléter les volumes des suspensions à 1 L avec le milieu minéral aéré préalablement au moyen d'air exempt de CO_2.

Si on utilise de l'hydroxyde de baryum pour mesurer le dioxyde de carbone dégagé, connecter, à chaque flacon de 3 L, trois flacons absorbeurs en série, contenant chacun 100 mL de solution d'hydroxyde de baryum 0,0125 M. La solution doit être exempte de sulfate et de carbonate précipités, et il convient d'en déterminer la teneur en dioxyde de carbone juste avant son utilisation.

Dans un essai type, on utilise les flacons suivants :

- Flacons 1 et 2 - contiennent la substance d'essai et l'inoculum (suspension d'essai) ;
- Flacons 3 et 4 - ne contiennent que l'inoculum (témoin inoculum) ;
- Flacon 5 - contient le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure)

Lorsqu'une substance auxiliaire, telle qu'un émulsifiant, un solvant ou un support, est utilisée, il convient d'effectuer un témoin avec cette substance, ainsi :

- Flacon 7 et 8 - contiennent la substance d'essai, la substance auxiliaire et l'inoculum (suspension d'essai avec méthode d'amélioration de la biodisponibilité - MAB)
- Flacon 9 et 10 - contiennent la substance auxiliaire et l'inoculum (témoin inoculum avec méthode d'amélioration de la biodisponibilité - MAB)
- Flacon 11 et 12 - contiennent la substance auxiliaire et la substance d'essai (témoin abiotique avec méthode d'amélioration de la biodisponibilité - MAB)

Commencer l'essai en faisant barboter de l'air exempt de CO_2 dans les suspensions, à un débit de 30 à 100 $mL.min^{-1}$.

3.3.2. *Résultats et critères de validité* (OECD/OCDE, 2013)

Il est obligatoire de suivre le dégagement de CO_2 en parallèle dans les suspensions d'essais et dans les témoins contenant l'inoculum et il est conseillé de faire la même chose dans les autres récipients d'essai.

Au cours des dix premiers jours, il est recommandé d'effectuer les analyses du CO_2 tous les deux ou trois jours, puis au moins tous les cinq jours jusqu'au 28ème jour, de façon à pouvoir identifier l'intervalle de temps de 10 jours. Le jour de l'analyse du CO_2, débrancher le flacon absorbeur contenant de l'hydroxyde de baryum situé le plus près du récipient d'essai et titrer la solution d'hydroxyde par de l'HCl à 0,05 M en utilisant de la phénolphtaléine comme indicateur. Rapprocher du récipient d'essai les flacons absorbeurs restants en les décalant d'une place et ajouter à l'extrémité de la série un nouveau flacon absorbeur contenant 100 mL d'une solution fraîche d'hydroxyde de baryum à 0,0125 M. Effectuer les titrations quand cela est nécessaire, par exemple quand on voit un précipité important dans le premier flacon piégeur et avant qu'un précipité n'apparaisse dans le second ou, à défaut au moins une fois par semaine. Le 28ème jour, on peut éventuellement prélever des échantillons pour déterminer le COD et/ou pour des analyses chimiques spécifiques. Ajouter 1 mL d'acide chlorhydrique concentré dans chaque récipient d'essai, puis aérer jusqu'au lendemain afin de chasser le dioxyde de carbone présent dans les suspensions d'essai. Le 29ème jour, effectuer la dernière analyse du dioxyde de carbone dégagé. On analyse, au 29ème jour seulement, le contenu du deuxième flacon absorbeur, afin d'apporter des corrections éventuelles si du dioxyde de carbone est transporté dans ce flacon. Les résultats obtenus le 29ème jour correspondent en fait aux résultats du test à 28 jours.

On calcule la quantité de CO_2 produite à partir de la quantité d'hydroxyde restant dans le flacon absorbeur. Quand on utilise comme absorbant du $Ba(OH)_2$ 0,0125 M, on détermine la quantité restante par titration avec de l'HCl 0,05 M (ainsi pour titrer 100 mL de $Ba(OH)_2$, on utilisera 50 mL de HCl). Puisque 1 mmole de CO_2 est produite pour chaque mmole de $Ba(OH)_2$ utilisée, et que 2 mmoles d'HCl sont nécessaires pour titrer 2 mmole de $Ba(OH)_2$ restante, entraînant la formation de $BaCl_2$, et sachant que le poids moléculaire du CO_2 est de 44 g, on en déduit le poids de CO_2 dégagé (en mg) d'après l'équation 6 :

Équation 6 : $$\frac{\mathbf{0,05\ x\ (50 - mL\ HCl\ titré)\ x\ 44}}{\mathbf{2}} = \mathbf{1,1\ x\ (50 - mL\ HCl\ titré)}$$

Dans ce cas, le facteur de conversion du volume d'HCl titré en mg de CO_2 produit est de 1,1. Calculer les quantités de CO_2 produites à partir de l'inoculum seul et du mélange inoculum plus substance d'essai, en utilisant les valeurs respectives de titration ; la différence donne la quantité de CO_2 produite uniquement par la substance d'essai. Par exemple, si, lors de la titration, l'inoculum seul donne une valeur de 48 mL, et l'inoculum plus la substance d'essai une valeur de 45 mL : CO_2 de l'inoculum = 1,1 x (50 - 48) = 2,2 mg, CO_2 de l'inoculum plus la substance d'essai = 1,1 x (50 - 45) = 5,5 mg, la quantité de CO_2 produite par la substance d'essai est de 3,3 mg. Le taux de biodégradation est ensuite calculé à partir de l'équation 5 qui a été décrite au *3.2.2 Description d'un test de biodégradabilité avec le Respicond VI® p.55*. Les critères de validité suivent les préconisations de la ligne directrice 301 B et ont été décrits au *3.2.3 Critères de validité p.59*.

4. Méthodes d'amélioration de la biodisponibilité – MAB

4.1. Descriptif des Méthodes d'amélioration de la biodisponibilité

L'ensemble des MAB déjà décrites et exploratoires testées lors de la phase de criblage est présenté dans le tableau suivant, avec en orange les MAB chimiques, en gris les MAB physiques et en bleu les combinaisons de MAB :

Tableau 7 : Liste des MAB expérimentées

Type de MAB	MAB déjà décrites
Huile de silicone	1. Association avec huile de silicone à 10 mL.L^{-1} (sol. Mère)
	2. Association avec huile de silicone à 1 mL.L^{-1} (sol. Mère)
	3. Association avec huile de silicone à 1 mL.L^{-1}
	4. Association avec huile de silicone à 0,5 mL.L^{-1}
Huile minérale	5. Association avec huile minérale - HMN 10 mg.L^{-1}
Tensioactif	6. Association avec Pluronic 9400® 10 mg.L^{-1}
Polymère	7. Association avec acide humique 10 mg.L^{-1}
Broyage	8. Broyage
Traitement aux ultrasons	9. Traitement aux ultrasons 10 min
Support solide	10. Pesée sur filtre en fibre de verre
	11. Association à du gel de silice 5000 mg.L^{-1}
	12. Association à du gel de silice 500 mg.L^{-1}
	13. Association à du gel de silice 50 mg.L^{-1}

Type de MAB	MAB exploratoires
Rhamnolipide	14. Association avec Rhamnolipide R 10 mg.L^{-1}
	15. Association avec Rhamnolipide E 10 mg.L^{-1}
Emulsion Pickering	16. Association avec cellulose nanocristalline (CNC) 10 mg/L par dispersion mécanique
	17. Association avec CNC 10 mg/L par traitement aux ultrasons 10 min
Dispersion par champs électromagnétiques	18- Milieu traité
	19- substance traitée
Mélangeur statique	20. Utilisation d'un mélangeur statique et d'une pompe dans le système*
Huile de silicone et traitement aux ultrasons	21. Association avec huile de silicone 1 mL.L^{-1} et traitement aux ultrasons 10 min
	22. Association avec huile de silicone 0,5 mL.L^{-1} et traitement aux ultrasons 30 min
Tensioactif et huile de silicone	23. Association avec Pluronic 9400® 10 mg.L^{-1} et huile de silicone à 10 mL.L^{-1}
	24. Association avec Pluronic 9400® 10 mg.L^{-1} et huile de silicone à 1 mL.L^{-1}

** Pour cette méthode, seule l'évaluation de la dispersion a été réalisée*

4.2. Modes opératoires

4.2.1. *Méthodes chimiques, physiques et combinaisons de MAB*

Chaque résultat de MAB est comparé au résultat de la méthode de référence (addition directe de la substance testée) du même test pour s'affranchir de la variabilité due à l'inoculum (Goodhead et al., 2014; Nyholm, 1990; Thouand et al., 1996; van Ginkel et al., 1995).

La concentration de l'ensemble des additifs chimiques utilisés pour disperser la substance à tester suit la recommandation de la norme ISO 10634 (International Standard Organization (ISO), 1995) qui propose une concentration (en émulsifiant) équivalente à la moitié de la concentration de la substance d'essai. Nous avons utilisé une concentration en substance d'essai à 20 mg carbone.L^{-1} pour l'ensemble de nos tests. La concentration en additif est fixée à 10 mg.L^{-1} (tableau 8). Une exception est faite pour l'huile de silicone (silicon oil AR20®, Sigma-Aldrich, référence 10836), pour laquelle nous avons testé une concentration de 10 mL.L^{-1} (van Ginkel et al., 2008) et une concentration plus faible de 1 mL.L^{-1} (concentration présentée dans le tableau 8).

Tableau 8 : Teneur en carbone des additifs chimiques dans les flacons de test

Additif chimique	Teneur en carbone organique (%)	Concentration dans le flacon (mg/L)	Quantité de carbone Essais Respicond VI® (mg)	Quantité de carbone Essais 301 B (mg)
Pluronic PE9400®	57,6	10	0,86	5,76
Acide humique	39,0	10	0,59	3,90
Huile de silicone AR20®	41,0	1102	67,77	451,82
Rhamnolipide E	47,1	10	0,71	4,71
Rhamnolipide R	41,0	10	0,62	4,10
HMN	84,3	10	1,26	8,43
CNC	4,7	10	0,07	0,47

Pour chaque MAB, un témoin sans substance à tester est réalisé sauf pour le traitement aux ultrasons. Pour les tests de criblage, la méthode par addition directe est réalisée en ajoutant 4,0 mg de Mexanyl GZ (Chimex, référence 71260) ou 4,1 mg d'Isodecyl Neopentanoate (Stéarinerie Dubois, référence 16072) dans 148,5 mL de milieu minéral afin d'obtenir une concentration finale de 20 mg de carbone par litre.

Dispersion avec huile de silicone (solution mère – MAB 1 et 2)

Une dispersion avec huile de silicone de type solution mère a été préparée dans un tube Eppendorf® en mélangeant 50 mL d'huile de silicone et 134 mg d'IN. 1,5 mL de ce mélange a été homogénéisé dans 147 mL de milieu minéral pour obtenir une dispersion d'huile de silicone à une concentration finale de 10 mL.L^{-1}. Le mélange est préparé avec un mélangeur IKA® (mélangeur hélice),

à une vitesse de 500 tours par minute pendant 5 minutes à température ambiante. 150 µL du mélange huile de silicone et substance d'essai ont également été homogénéisés avec 148,35 mL de milieu minéral pour obtenir une dispersion dans l'huile de silicone à une concentration finale de 1 $mL.L^{-1}$.

Dispersion avec huile de silicone (3, 4, 20 et 21)

Une émulsion avec 1 et 0,5 $mL.L^{-1}$ d'huile de silicone ont été réalisée en mélangeant 150 µL et 75 µL d'huile de silicone respectivement avec 4,0 mg de MGZ ou 4,1 mg d'IN dans 147 mL de milieu minéral, en utilisant un mélangeur IKA® à 500 tours par minute pendant 1 minute à température ambiante pour l'agitation mécanique. Lors de la dispersion par ultrasons, la solution est dispersée pendant 10 minutes avec le bain à ultra-sons à 35 kHz immédiatement avant d'ajouter l'inoculum.

Dispersion avec additifs chimiques (5, 6, 7, 14, 15, 16)

Les émulsions avec les additifs chimiques : HMN (2,2,4,4,6,8,8 heptamethylnonane, Sigma-Aldrich, référence 128511), Pluronic 9400® (BASF SE), acide humique (Sigma-Aldrich, référence 58680), Rhamnolipides E ou R (L'Oréal, substances en développement) et la cellulose nanocristalline (The University of Maine, USA) dispersée par agitation mécanique ont été réalisées avec 10 mg d'additif, 4,0 mg de MGZ ou 4,1 mg d'IN dans 147 mL de milieu minéral. Le mélange est ensuite préparé avec un mélangeur IKA®, à une vitesse de 500 tours par minute pendant 1 minute à température ambiante.

Broyage (8)

Le solide MGZ est broyé dans un mortier en marbre avec un pilon jusqu'à obtention d'une poudre fine.

Traitement aux ultra-sons (9)

La dispersion par ultra-sons est conduite de la même manière que l'addition directe, exceptée que la solution contenant le milieu minéral et la substance à tester est dispersée à 22°C et à 35 kHz pendant 10 minutes avec le bain à ultra-sons 9L SHE10000 (Labomoderne, Paris, France) immédiatement avant d'ajouter l'inoculum. Le bain à ultrasons a été préféré à la sonde car il permet de traiter 7 flacons en parallèle. De plus, cela évite la possible contamination d'un flacon à l'autre et l'adsorption de la substance hydrophobe sur la sonde.

Pesée sur filtre en fibre de verre (10)

Pour la pesée sur filtre en fibre de verre, 4,0 mg de Mexanyl GZ (MGZ) ou 4,1 mg d'Isodecyl Neopentanoate (IN) sont pesés directement sur le filtre et le tout est ajouté tel quel dans le flacon d'essai. Ensuite, les recommandations suivent celles de l'addition directe.

Association à du gel de silice (11, 12 et 13)

Afin d'adsorber 4,1 mg d'IN sur 750 mg de gel de silice (concentration finale à 5000 $mg.L^{-1}$), ces deux constituants ont été mélangés par agitation pendant 5 minutes. Ce mélange a ensuite été ajouté sous agitation magnétique à 250 tours par minute à 147 mL de milieu minéral. Deux autres solutions

d'essai ont été préparées avec 75 mg et 8,0 mg de gel de silice pour obtenir des concentrations finales en gel de silice à environ 500 et 50 mg.L^{-1}.

Emulsion Pickering avec dispersion par ultrasons (17)

L'émulsion Pickering (traitement aux ultrasons) a été réalisée avec 10 mg de cellulose nanocristalline et 4,0 mg de MGZ ou 4,1 mg d'IN dans 147 mL de milieu minéral. La solution est ensuite dispersée pendant 10 minutes avec le bain à ultra-sons à 35 kHz immédiatement avant d'ajouter l'inoculum.

Traitement par champs électromagnétiques (18 et 19)

La méthode utilisant le traitement électromagnétique (EMF) a été réalisée par la société BioPhys - Solutions©. Le mode opératoire breveté (PCT n° WO 2005-115921) de ces préparations n'est pas détaillé. Pour le traitement EMF, "une antenne électromagnétique" est placée dans le flacon en verre de 500 mL contenant l'échantillon et est alimentée en courant permettant l'induction de champs électromagnétiques programmés selon le savoir-faire de la société prestataire. "L'antenne électromagnétique" est placée dans une cage de Faraday customisée, mise au point pour une isolation des champs électriques et magnétiques environnementaux. De cette façon en absence d'alimentation de cette antenne, un champ géomagnétique et électromagnétique environnemental atténué est mesuré. Trois conditions de préparation (CP) différentes ont été utilisées pour traiter MGZ et IN directement dans le milieu d'essai : CP1 avec une durée d'exposition de 6h, CP2 avec une intensité de traitement quatre fois plus faible que CP1 et une durée d'exposition de 12h et CP3 avec un type de signal différent (carré) pour le traitement et 6h d'exposition. L'ensemble des essais réalisés avec ces méthodes a été lancé lors du même test de criblage. Les préparations nécessitant une durée importante, certains flacons ont été préparés plusieurs semaines avant le lancement du test. Les deux substances ont également été testées en addition directe dans le milieu minéral non traité et fraichement préparé et dans du milieu minéral préalablement traité par champs électromagnétiques (CP1). Deux témoins inoculum ont été conçus en ajoutant la boue activée dans le milieu minéral classique et dans le milieu minéral traité (CP1). Ainsi, pour cette étude, trois types d'échantillons ont été réalisés par substance :

- Les flacons contenant la substance à tester traitée par champs électromagnétique selon 3 conditions de préparation (CP1, CP2 et CP3) et ajoutée par addition directe avec l'inoculum placé dans du milieu minéral fraichement préparé (Essai)
- Les flacons avec la substance à tester ajoutée par addition directe et l'inoculum dans du milieu minéral fraichement préparé (T_{AD})
- Les flacons avec la substance à tester ajoutée par addition directe et l'inoculum placé dans un milieu préalablement traité par champs électromagnétique (T_{AD} Mtb).

Dispersion avec un mélange de tensio-actif et d'huile de silicone (23 et 24)

Le mélange Pluronic PE9400® et huile de silicone a été préparé avec 10 mg de Pluronic 9400® et 1,5 mL ou 150 µl d'huile de silicone selon la concentration en huile de silicone souhaitée (10 $mL.L^{-1}$ ou 1 $mL.L^{-1}$). On ajoute ensuite 4,0 mg de MGZ ou 4,1 mg d'IN et 147 mL de milieu minéral. Le mélange est préparé avec un mélangeur IKA®, à une vitesse de 500 tours par minute pendant 5 minutes à température ambiante.

Essais Standards

Les essais standards OCDE 301 B ont été réalisés avec les mêmes modes opératoires que les essais de criblage sur Respicond VI® excepté que les quantités ont été ajustées pour 1 L de volume d'essai final au lieu de 150 mL.

4.2.2. *Méthode physique par mélangeur statique (20)* [11]

La méthode par mélangeur statique consiste à générer des perturbations hydrodynamiques en continu en associant un système de pompage à un mélangeur statique dans le réacteur d'essai (figure 27).



Figure 27 : Montage du réacteur associé à un système de mélange couplant pompe et mélangeur statique

Pour ces expérimentations, deux mélangeurs statiques ont été testés : un mélangeur en grille, le X-grid® (StamixCo, France) et un laminaire, le In-line mixer® (Koflo, France) dont les caractéristiques techniques sont détaillées dans le tableau 9.

[11] *Ce travail a été réalisé par d'Héléna Bouyer en 2016 pour son mémoire de Master 2*

Tableau 9 : Mélangeurs statiques utilisés pour accroitre la biodisponibilité des substances chimiques peu hydrosolubles

	X grid StamixCo®	In-line mixer Koflo®
		
Type d'éléments	Grille	Hélice
Nombre d'élements	12	24
Matériaux	Polyacétal - polypropylene	Polyacétal - polypropylene
Longueur totale (mm)	182	184
Diameter interne (mm)	11.7	10

L'étude de l'homogénéisation du mélange a été réalisée en étudiant l'aspect macroscopique de l'émulsion formée avec une huile commerciale, par mesure de la turbidité et par l'aspect microscopique. Pour ce faire, de l'huile de tournesol a été colorée au Nile Red (Sigma-Aldrich, N3013), un colorant liposoluble de couleur rouge, fluorescent sous UV. Cette coloration a permis de faciliter la caractérisation de l'émulsion en améliorant le contraste pour l'observation des gouttes formées. Un échantillon de l'émulsion formée par le dispositif de mélange, a été stabilisé par l'ajout d'une solution de dodecyl sulfate de sodium (Sigma-Aldrich – L4390-100G) à 8 $g.L^{-1}$, diluée au 1:2 dans l'échantillon. Après stabilisation, un prélèvement de 20 µL a été déposé sur cellule de Malassez pour la caractérisation microscopique, en utilisant un microscope confocal Olympus BX 51 (Bruker, France), au grossissement x100. Une caméra à haute résolution pilotée par le logiciel OPUS (Bruker, France) a permis de photographier les gouttelettes contenues dans les échantillons, afin d'en étudier la taille et le nombre.

Les photographies des émulsions précédemment réalisées ont été traitées à l'aide du logiciel image J, afin de mesurer le diamètre des gouttes générées par le dispositif de mélange. Pour cela, la calibration de l'échelle s'est faite par rapport à la longueur d'un carré contenu dans les rectangles quadrillés de la cellule de Malassez, à savoir 0,25/5 = 50 µm. L'image a été mise en niveaux de gris (16 bits), le bruit a été réduit et l'arrière-plan supprimé. Enfin, les gouttelettes, ont été mises en évidence par ajustement du seuil d'acquisition (figure 28).

Le module d'analyse de particule du logiciel, a permis de déterminer la taille des gouttes simultanément sur chaque image. Les mesures ont été réalisées sur le calcul du diamètre de Féret et seulement pour les objets présentant un minimum de 60% de circularité. La distribution de la taille des gouttes a ensuite été obtenue, en choisissant 20 classes de taille entre 1 et 14 µm.

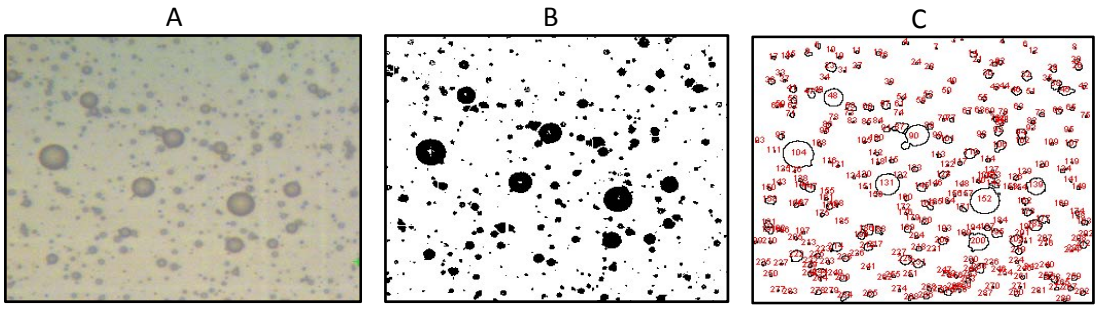


Figure 28 : Observation microscopique (x100) d'une émulsion formée après 18h de mélange

(A) image Brute, (B) Image traitée par le logiciel Image J et (C) Phase d'analyse des particules

5. Exploitation des résultats

5.1. Analyses statistiques[12]

5.1.1. *Exploitation des résultats des tests de biodégradabilité*

L'ensemble des essais de biodégradabilité préliminaire PreSens®, de criblage par Respicond VI® et de confirmation en test standardisé OCDE 301 B ainsi que les essais de détermination de l'hydrophobie des bactéries a été réalisé avec un nombre de répliques compris entre 2 et 5.

Les analyses statistiques effectuées se sont basées sur la valeur médiane des répliques de chaque essai car celle-ci est plus robuste que la moyenne pour un nombre d'occurrences limité (Falissard, 2005). En conséquence, la variabilité entre les répliques ne sera pas réalisée avec l'écart-type mais avec l'écart médian absolu, le MAD (median absolute deviation en anglais) décrit dans l'équation 7 (Wonnacott and Wonnacott, 1995). Cet indicateur de variabilité est plus approprié au faible nombre de données générées par essai et moins affecté par les valeurs extrêmes obtenues sur peu de répliques.

Équation 7 : $$\mathbf{MAD} = \mathbf{médiane}\left(\left|\mathbf{X_i} - \tilde{\mathbf{X}}\right|\right)$$

Avec x_i: valeur du résultat du groupe

$\tilde{x}$: valeur médiane du groupe

5.1.2. *Indicateurs statistiques utilisés pour réaliser les comparaisons*

Compte tenu du faible nombre de répliques par mesure, il est jugé pertinent d'utiliser un test non paramétrique Wilcoxon (pas d'hypothèse sur la normalité des données) pour évaluer les différences entre les résultats. Ce test est réalisé avec deux indicateurs : la mesure des intervalles de confiance estimés (test de contraste) et la taille d'effet (Equation 8). Ces deux indicateurs statistiques complémentaires ont été utilisés pour réaliser les différentes comparaisons et mesurer la significativité de l'effet et sa force. La p-value permet de statuer sur la significativité des effets. Les tailles d'effet sont fournies pour estimer la significativité de ces différences estimées. Ces analyses de variance permettent de tester les différences entre deux groupes.

Équation 8 : $$\mathbf{Taille\ d'effet} = \frac{\mathbf{médiane\ du\ groupe\ A - médiane\ du\ groupe\ B}}{\mathbf{MAD\ médian\ des\ 2\ groupes}}$$

[12] *L'ensemble de ces analyses a été validé par l'équipe statistique de L'Oréal.*

Pour interpréter la taille d'effet, on estime qu'un effet, pour qu'il soit non négligeable statistiquement, doit être au moins de l'ordre de l'écart absolu médian (MAD).

Des notes ont été attribuées à chaque interprétation statistique pour pouvoir classer les résultats de biodégradabilité obtenus avec les MAB, ce choix a été validé par l'équipe statistique de L'Oréal. La première note se base sur le test de contraste qui définit l'existence d'une différence significative à l'aide des p-value (tableau 10).

Tableau 10 : Interprétation, seuils et notes statistiques attribués au test de contraste

Interprétation	seuil statistique	Note
Statistiquement significatif	p-value < 5%	10
Tendance	5% < p-value < 10%	5
Non statistiquement significatif	p-value > 10%	0

La seconde note est attribuée par la taille d'effet (effect-size) qui vient compléter le test de contraste par une mesure descriptive de la force de l'effet observé (tableau 11). Cette grandeur statistique descriptive est quantitative.

Tableau 11 : Interprétation, seuils et notes statistiques attribués à la taille d'effet

Interprétation	Valeur absolue de la taille d'effet	Note
Effet très fort	]2, + infini]	4
Effet fort	]1,5 ; 2]	3
Effet moyen	]0,8 ; 1,5]	2
Effet faible	]0,5 ; 0,8]	1
Effet très faible	]0 ; 0,5]	0

Afin de comparer et de classer les résultats obtenus avec les méthodes améliorant la biodisponibilité (MAB), une note statistique (Nst), a été créée en additionnant les notes attribuées par le test de contraste et la taille d'effet. Des notes négatives, basées sur les mêmes principes, sont attribuées lorsque la MAB va avoir un impact défavorable sur le résultat. Ainsi, pour les essais de criblage avec le Respicond VI®, il est définit qu'une MAB est potentiellement d'intérêt si elle atteint au moins une fois une Nst comprise entre 1 et 4 et qu'une MAB est d'intérêt si elle atteint au moins une fois une Nst strictement supérieure à 4 (tableau 12).

Tableau 12 : Note statistique et classement attribués aux résultats obtenus avec les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité lors des essais de criblage Respicond VI®

Classement des MAB	Nst
Très favorable	n > 4
Favorable	0 < n ≤ 4
Neutre	n = 0
Défavorable	-4 ≤ n < 0
Très défavorable	n < -4

Lors des essais de confirmation, deux répliques sont réalisées, ainsi seule la taille d'effet peut être utilisée. Les résultats sont interprétés de la manière suivante :

Tableau 13 : Note statistique et classement attribués aux résultats obtenus avec les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité lors des essais de confirmation

Classement des MAB	Nst
Favorable	0 < n ≤ 4
Neutre	n = 0
Défavorable	-4 ≤ n < 0

5.2. Détermination d'un indice de classification des MAB

La comparaison des différentes méthodes de préparation des substances est influencée par le choix du ou des paramètre(s) considéré(s) comme révélateur(s) d'une amélioration de la biodisponibilité et est perturbée par la variabilité de l'inoculum qui rend les résultats peu reproductibles.

Les résultats des tests de biodégradabilité facile sont habituellement décrits par 2 paramètres (figure 29) : (i) le pourcentage de biodégradation à la fin de l'intervalle des 10 jours (Biod10d) et (ii) le pourcentage de biodégradation à la fin de l'essai au 28ème jour (BiodF). Mais, lorsqu'une méthode de préparation de l'échantillon améliore la biodisponibilité de la substance testée par rapport au résultat obtenu par son addition directe (méthode de référence), elle peut également accélérer le démarrage de la biodégradation et avancer le premier jour de l'intervalle de 10 jours. Un troisième paramètre basé sur ce jour de démarrage de la biodégradation est ainsi intégré : (iii) le pourcentage de temps disponible aux micro-organismes pour biodégrader la substance au cours du test (T_B) dont le calcul est décrit par l'équation 9.

Équation 9 : $$T_B = ((28\text{-}PJ)) / 28 \times 100$$

Avec PJ : premier jour de démarrage de l'intervalle des 10 jours (10% de biodégradation atteint).

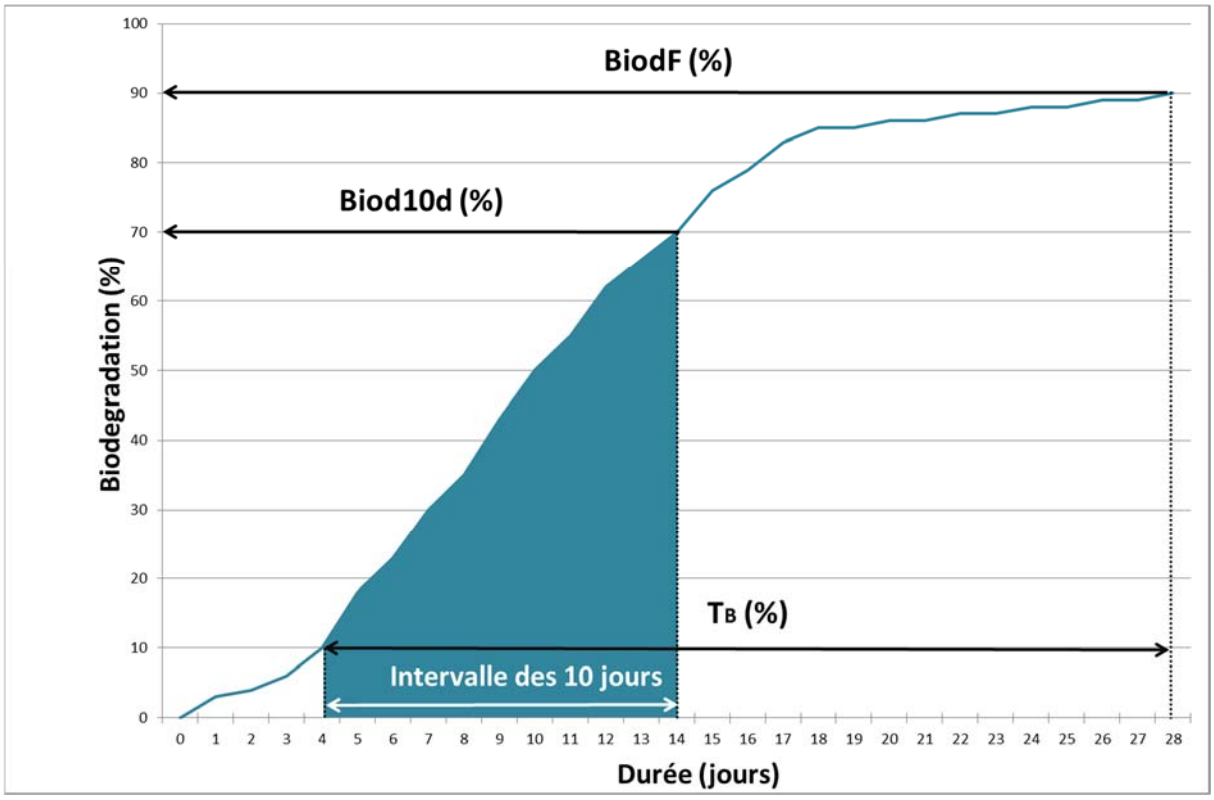


Figure 29 : Exemple de courbe de biodégradation avec les 3 paramètres TB, Biod10d et BiodF identifiés

Ces 3 paramètres ont été considérés comme ayant le même poids (cf. IV. 2. Discussion p.136) pour quantifier la progression de la biodégradation durant les 28 jours du test. Nous avons défini un coefficient de quantification, C_{MAB} (équation 10), qui permet de comparer les résultats obtenus avec les différentes MAB (ou BIM en anglais).

Equation 10 : $$C_{MAB} = (T_B + Biod10d + BiodF) / 3$$

Avec T_B *: pourcentage du temps disponible pour la biodégradation*

Biod10d : pourcentage de biodégradation à la fin de l'intervalle des 10 jours

BiodF : pourcentage de biodégradation à la fin du test (28ème jour)

Lorsque l'intervalle des 10 jours démarre après le 18ème jour, le résultat du 28ème jour est utilisé comme résultat de la fin de l'intervalle des 10 jours.

Afin de s'affranchir de l'impact de la variabilité de l'inoculum sur les résultats obtenus au cours des différents tests, chaque MAB est comparée au résultat obtenu avec la même substance, testée par addition directe au cours du même test. Ainsi, un coefficient équivalent au C_{MAB} est calculé pour la méthode de référence (addition directe), le C_{AD}, est utilisé comme valeur de référence pour chaque test. L'indice de classification des MAB, le R_{MAB} (équation 11), se définit comme le rapport entre le résultat obtenu avec la MAB et le résultat médian obtenu par addition directe :

Équation 11 : $$R_{MAB} = C_{MAB} / C_{AD\ médian}$$

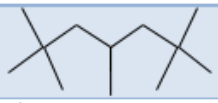
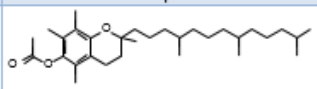
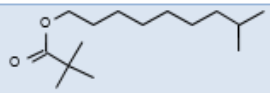
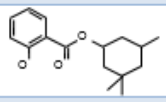
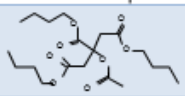
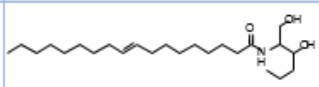
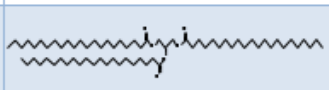
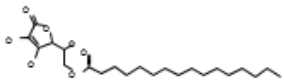
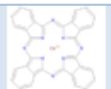
III. Résultats

1. Recherche des dégradeurs spécifiques sur un panel de substances modèles

1.1. Substances chimiques présélectionnées

L'analyse de données de plus d'un millier de substances chimiques utilisées par L'Oréal a abouti à une présélection de 9 substances dont les caractéristiques principales sont détaillées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Substances chimiques présélectionnées d'après les données fournisseurs et littérature

CAS RN	Nom INCI*	Structure	Solubilité (mg/L)	Aspect	Densité	Biodégradabilité
93685-81-5	ISODODECANE		0,04	liquide incolore	0,74	21 % à 31 j (TI)
7695-91-2	TOCOPHERYL ACETATE		< 0,8	Liquide visqueux	0,95	17 % à 28 j (TF)
60209-82-7	ISODECYL NEOPENTANOATE		insoluble	liquide incolore	0,866	35 % à 28 j (TF)
118-56-9	HOMOSALATE		insoluble	liquide incolore	1,051	21 % à 28 j (TF)
77-90-7	ACETYL TRIBUTYL CITRATE		4,49	liquide huileux incolore	1,0528	16 % à 28 j (TF)
54422-45-6	2-OLEAMIDO-1,3-OCTADECANEDIOL		< 0,2	poudre crème	0,916	36 % à 28 j (TF)
18641-57-1	TRIBEHENIN		insoluble	solide blanc cassé	0,899	37 % à 28 j (TF)
137-66-6	ASCORBYL PALMITATE		insoluble	poudre blanche	1,15	48 % à 28 j (TI)
147-14-8	PIGMENT BLUE 15		<0,0008	poudre bleue	1,6	≤ 5 % à 28 j (TF)

Légende : test de biodégradabilité facile (TF) ; test de biodégradabilité intrinsèque (TI)
** INCI: International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

On note que les pourcentages de biodégradabilité facile des substances présélectionnées n'excèdent pas 37% à 28 jours. Afin de finaliser la sélection des deux substances modèles, notre recherche s'est portée sur l'identification de souches bactériennes isolées capables de les dégrader, en faisant l'hypothèse que les souches pures apporteraient moins de variabilité au test.

1.2. Recherche de dégradeurs spécifiques

1.2.1. *Potentiel de biodégradation de souches spécifiques aux substances présélectionnées*

Sur la base d'un projet de collaboration entre L'Oréal et le GEPEA, un souchier représentatif de la boue activée contenant 48 souches bactériennes différentes a été créé. Notre recherche s'est ainsi portée sur l'identification de souches bactériennes dégradeuses spécifiques des substances présélectionnées. L'évaluation de la biodégradabilité facile des 9 substances présélectionnées avec 48 souches pures différentes nécessiterait 108 essais de confirmation OCDE 301 B ou 48 essais de criblage avec l'automate Respicond VI®. Ce nombre de tests nécessitait plus de 4 ans pour les essais de criblage ou 9 ans pour les essais de confirmation. En conséquence, un test préliminaire de criblage à haut débit de respirométrie (système PreSens®) a été utilisé. L'ensemble des résultats est décrit dans l'annexe VIII (p.184) et un résumé est présenté dans le tableau 15.

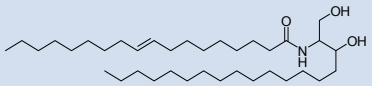
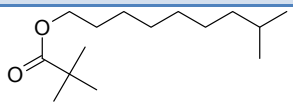
Tableau 15 : Nombre et type de dégradeurs pour 9 substances chimiques

Nom de la substance chimique	Nombre de dégradeurs spécifiques confirmés	Nombre de dégradeurs spécifiques potentiels
PALMITATE D'ASCORBYLE	31	5
ISODODECANE	21	0
ISODECYL NEOPENTANOATE	16	2
MEXANYL GZ	13	3
ACETYL TRIBUTYL CITRATE	3	12
HOMOSALATE	2	2
TRIBEHENIN	1	0
PIGMENT BLUE 15	0	1
TOCOPHERYL ACETATE	0	0

On observe que le nombre de dégradeurs spécifiques confirmés est élevé pour 4 substances : l'ascorbyl palmitate (31), l'isododécane (21), l'isodécyl néopentanoate (16) et le Mexanyl GZ (13). Notre sélection finale avait pour but de ne conserver qu'un solide et un liquide parmi ces 4 substances. Ainsi, après réactualisation des évaluations, un test de biodégradabilité facile (OCDE 301) concluant à un résultat facilement biodégradable (91% à 28 jours) a été trouvé pour le palmitate d'ascorbyle. Par ailleurs, les résultats très favorables obtenus avec l'isododecane n'étaient pas en accord avec la littérature. En fait, le fournisseur nous a involontairement fait parvenir du n-dodécane facilement biodégradable au lieu de l'isododécane. En conséquence, le palmitate d'ascorbyle et le n-dodecane, tous les deux facilement biodégradables, ont été éliminés de la sélection. Les substances modèles

sélectionnées ont donc été l'isodécyl néopentanoate (liquide) et le Mexanyl GZ (solide). Leur capacité théorique à franchir le seuil de 60% de biodégradabilité à la fin de l'intervalle des 10 jours a été établi sur la base d'analyse *in silico*. D'après ces calculs réalisés selon deux séries de modèles[13], ces deux substances sont ultimement biodégradables, ne conduisent pas à la formation de métabolites stables et sont décrites dans le tableau 16.

Tableau 16 : Substances modèles

CAS RN	Nom INCI (Appellation)	Structure chimique	Solubilité dans l'eau	Résultat de Biodégradation	Aspect
54422-45-6	2-OLEAMIDO-1,3-OCTADECANEDIOL (MGZ)		< 0,2 mg/L	36% à 28 j (OCDE 310)	Poudre
60209-82-7	ISODECYL NEOPENTANOATE (IN)		insoluble	35% à 28 j (OCDE 301B)	Huile

De plus, ces deux substances ont l'avantage d'être stables dans les conditions classiques de stockage (date de validité du bulletin d'analyse supérieure à 2 ans) et de conserver leur intégrité structurelle lors des traitements appliqués pour les deux méthodes physiques d'amélioration de la biodisponibilité : traitements aux ultrasons et par champs électromagnétiques (Annexe IX p.186)[14].

1.2.2. *Relation entre capacité à biodégrader les substances lipophiles et hydrophobie des souches bactériennes*

Les substances lipophiles sont, par définition, peu accessibles aux bactéries vivant dans un milieu aqueux. La lipophilie des bactéries a donc été mesurée (annexe X p.188) afin de vérifier si cette caractéristique bactérienne (bactérie hydrophobe) pouvait être reliée à leur capacité de métabolisation des substances lipophiles. La comparaison entre l'indice d'adhésion à l'octane des 48 bactéries sélectionnées et le log Poe (coefficient de partage n-octanol/eau) des 9 substances chimiques lipophiles sélectionnées ainsi que de l'acétate de sodium[15] et de l'anthraquinone, est présentée dans le tableau 17. On peut noter que l'hydrosolubilité n'est pas forcément corrélée au log Poe d'une substance. Une substance peut être à la fois soluble dans l'eau et l'octanol, ainsi, sa solubilité dans

[13] *Analyse réalisée par Jean-Charles Chenèble, L'Oréal Recherche et Innovation, sur les modèles Epi Suite Biowin v.4.10 et OASIS Catalogic 301C v.08.12, Kinetic 301B v.02.09, Kinetic 301F v.13.16.*

[14] *Analyses réalisées par Alexandre GUEPET du pôle d'analyse structurale de L'Oréal*

[15] *L'acétate de sodium est la substance de référence du test de biodégradabilité facile et ne figure pas dans le tableau 17*

l'octanol va également avoir un impact sur sa valeur de Poe. Par exemple, l'anthraquinone, qui possède une solubilité dans l'eau ($7{,}46.10^{-2}$ mg.L^{-1}) plus faible que l'acetyl tributyl citrate (4,49 mg.L^{-1}), possède également un log Poe (3,4) plus faible (4,29 pour l'acétyl tributyl citrate) synonyme d'une meilleure solubilité dans l'eau que dans l'octanol comparé à l'acetyl tributyl citrate.

Tableau 17 : Relation entre le log Poe, l'hydrosolubilité des substances chimiques et l'hydrophobie des dégradeurs spécifiques parmi 48 souches bactériennes

Substances testées	Log Poe	Hydrosolubilité (mg.L^{-1})	Dégradeurs spécifiques hydrophiles	Dégradeurs spécifiques neutres	Dégradeurs spécifiques lipophiles	Ratio Hydrophile / Lipophile
BENZOATE DE SODIUM	-2,27	$5{,}56.10^{5}$	16	13	9	1,8
ANTHRAQUINONE*	3,4	$7{,}46.10^{-2}$	0	0	0	-
ACETYL TRIBUTYL CITRATE	4,29	4,49	1	0	2	0,5
PIGMENT BLUE 15	4,95	<0,0008	0	0	0	-
ASCORBYL PALMITATE	6,17	Insoluble (pas de valeur)	14	10	6	2,3
IN	6,08	0,05	6	5	5	1,2
HOMOSALATE	6,16	Insoluble (pas de valeur)	1	0	1	1
N-DODECANE	6,98	$4{,}86.10^{-3}$	8	7	5	1,6
TOCOPHERYL ACETATE	12,2	< 0,8	0	0	0	-
MGZ	13,3	< 0,2	5	5	3	1,7
TRIBEHENIN	29,83	Insoluble (pas de valeur)	0	1	0	-

** L'anthraquinone a été testée car substance modèle utilisée pour la norme ISO 10634 et pour valider la méthode PreSens®*

La figure 30 illustre le nombre de dégradeurs spécifiques en fonction du log Poe de ces substances chimiques. Cette analyse descriptive confirme qu'il n'existe pas de relation entre le log Poe des 11 substances chimiques évaluées et l'hydrophobie des 48 bactéries.

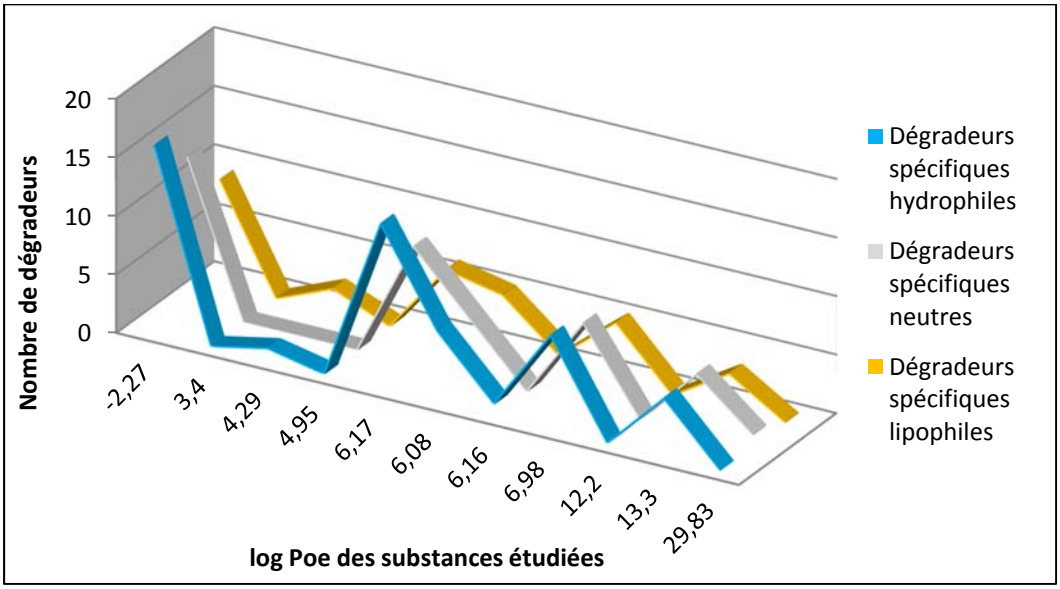


Figure 30 : Log Poe de 11 substances chimiques comparés à l'hydrophobie de 48 souches bactériennes

On remarque que seulement 8 substances sur 11 possèdent des dégradeurs spécifiques. Pour ces 8 substances, les dégradeurs mis en évidence sont majoritairement hydrophiles quel que soit le log Poe des substances (6/8). Les nombres de dégradeurs et le ratio (dégradeurs potentiels hydrophile/hydrophobe) ne montrent pas de tendance ou de lien entre l'hydrophilie des bactéries et celle des substances chimiques. On peut noter que les substances qui possèdent des dégradeurs spécifiques ont une répartition assez homogène entre les 3 types de dégradeurs (hydrophile, neutre et lipophile). Le type de bactérie (hydrophile, neutre ou lipophile) n'apparait pas, dans nos conditions d'essai, comme un critère influençant la capacité des bactéries à dégrader une substance lipophile.

En outre, l'hydrophobie des bactéries semble indépendante de la filiation génétique. Il n'existe que peu ou pas de regroupement(s) possible(s) par phylum ou par classe. Certains ordres semblent cependant s'orienter vers des bactéries plutôt hydrophiles (Pseudomonadales : 6 hydrophiles/9 et 1 hydrophobe, Rhodocyclales : 2 hydrophiles/2, Bacillales : 4 hydrophiles/7 et 1 hydrophobe) ou plutôt hydrophobes (Burkholderiales : 2 hydrophobes/6 et 0 hydrophile, Rhizobiales : 2 hydrophobes/3 et 0 hydrophile).

Les deux substances modèles ont été sélectionnées sur l'aspect et le nombre de candidats biodégradeurs spécifiques. Ainsi, nos deux substances modèles sont un solide, le Mexanyl GZ (MGZ) et un liquide, l'isodecyl neopentanoate (IN).

L'hydrophobie des 48 souches bactériennes n'apparait pas liée à leur phylum ou à leur classe et ne semble pas non plus corrélée avec leurs capacités à biodégrader une substance lipophile. En conséquence, cette caractéristique n'a pas été retenue comme critère de sélection des souches isolées que nous souhaitions utiliser comme inoculum alternatif à la boue activée.

1.2.3. *Capacité des souches bactériennes à biodégrader les deux substances modèles MGZ et IN*

Pour affiner la sélection des souches à cultiver et à tester, nous n'avons pas pu nous baser sur le paramètre d'hydrophobie. Afin de limiter le nombre de souches à évaluer, notre choix a été de conserver, parmi les 16 et 13 dégradeurs spécifiques identifiés respectivement pour MGZ et IN, les 10 souches dégradeuses communes aux deux substances (tableau 18).

Tableau 18 : Dix biodégradeurs spécifiques communs aux deux substances modèles détectés avec le système Presens®

N° collection	Nom des souches bactériennes
CIPA105	*Corynebacterium pseudodiphthericum*
LMG7135	*Bacillus subtilis*
DSM13387	*Proteus vulgaris*
DSM11634	*Pseudomonas aeruginosa*
CIP103198	*Alteromonas macleodii*
DSM14801	*Delftia acidovorans*
ATCC19718	*Nitrosomonas europaea*
CIPA235	*Proteus mirabilis*
DSM1057	*Micrococcus sp.*
DSM6900	*Sphingobium yanoikuyae*

Ce premier choix de souches bactériennes a ensuite été éprouvé avec des essais de biodégradabilité facile réalisés selon la méthode de criblage Respicond VI®. Une première série d'expérience a consisté à tester chacune des 10 souches sur les deux substances modèles avec trois répliques (20 tests). Les deux souches DSM14801 et CIPA235 ont été écartées pour la suite de l'étude car elles ont fourni des résultats de biodégradabilité facile nuls ou très faibles pour les 2 substances (résultats non illustrés). Une seconde série a été effectuée en trois répliques avec les 8 souches restantes (tableau 19).

Tableau 19 : Résultats médian de biodégradabilité facile du MGZ et de l'IN avec 10 souches bactériennes isolées selon le test de criblage Respicond VI®

Souche	Résultat de biodégradabilité à 28 jours (%)			
	MGZ Essai 1	MGZ Essai 2	IN Essai 1	IN Essai 2
ATCC19718	**5**	**31**	**20**	**47**
CIPA105	**16**	**15**	**22**	**43**
CIPA235	1	-	5	-
CIPA103198	-1	25	12	16
DSM1057	9	-1	26	34
DSM6900	2	8	15	23
DSM11634	10	6	24	34
DSM13387	12	11	30	37
DSM14801	-13	-	-11	-
LMG7135	3	9	12	35
mélange 8 souches	-	12	-	30

Les souches ATCC19718 et CIPA105 (tableau 19 et 20) présentent les résultats de dégradation les plus élevés (sur la moyenne des deux essais) de biodégradation sur nos 2 substances et ont donc été conservées pour la suite de l'étude. On note cependant une variabilité importante non prévisible d'un essai à l'autre pour une même souche isolée et une même substance. On obtient par exemple pour IN une biodégradabilité de 20% et de 47% avec ATCC19718 et de 22% et 43% pour CIPA105 lors des essais 1 et 2, respectivement. Cette faible reproductibilité, rédhibitoire à leur utilisation comme inoculum lors de nos travaux, devait être confirmée ou infirmée sur plusieurs essais. Parmi ces 2 souches, ATCC19718 (*Nitrosomonas europaea*) est une protéobactérie à Gram négatif intervenant dans le traitement des eaux usées et des déchets industriels notamment pour les composés azotés (Chain et al., 2003). Cette propriété ne sera pas exploitée pour nos recherches car les composés testés ne sont pas azotés. Le bacille à Gram positif CIPA105 (*Corynebacterium pseudodiphthericum*) est peu décrit dans la littérature pour son action de bioremédiation ou de dégradation de composés chimiques.

Tableau 20 : souches bactériennes sélectionnées

N° de collection	Phylum	Classe	Ordre	Genre/espèce
CIPA105	Actinobactéries	Actinobacteria	Actinomycetales	*Corynebacterium pseudodiphthericum*
ATCC19718	Protéobactéries	β-Proteobactéries	Nitrosomonadales	*Nitrosomonas europaea*

Sachant que les phases de croissance peuvent influencer la capacité métabolique des bactéries, des expériences ont permis d'évaluer cet impact sur les deux souches précédemment sélectionnées pour leur aptitude à la biodégradation des substances modèles. La figure 31 montre l'évolution de la densité optique (DO) dans le milieu LB utilisé pour la production des bactéries. Les phases de croissance

exponentielles sont comprises pour ATCC19718 entre 7h et 10h et pour CIPA105 entre 10h et 15h. Les phases stationnaires débutent après 15h pour les deux souches.

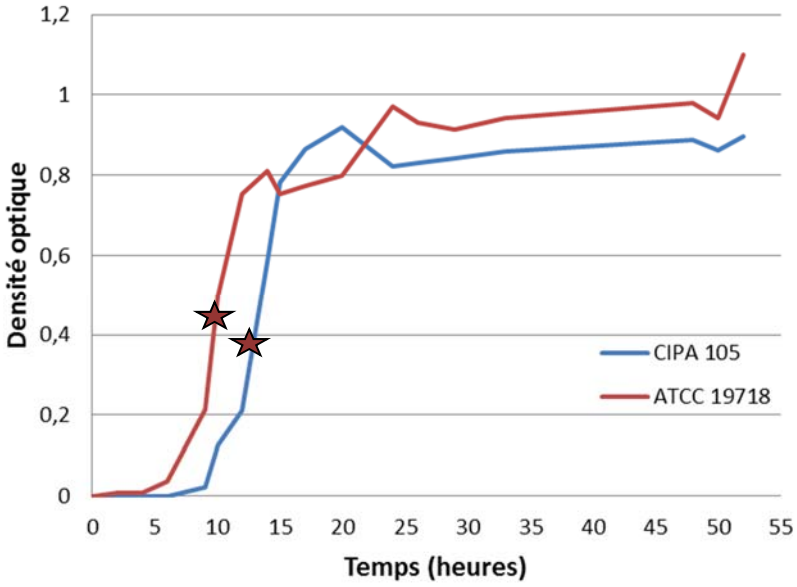


Figure 31 : Mesure de la croissance des bactéries ATCC19718 et CIPA105 par DO à λ=620 nm dans le milieu LB à 28°C sous agitation.

L'hydrophobie des souches bactériennes CIPA105 et ATCC19718 est similaire et considérée comme faible (≤ 20) au cours des phases de croissance exponentielle et stationnaire testées avec un indice d'adhésion à l'octane respectivement de -6,77 et -1,10 pour ATCC19718 et -5,80 et -3,31 pour CIPA105.

Les deux souches sélectionnées ATCC19718 et CIPA105 sont et restent hydrophiles pour les deux phases de croissance exponentielle et stationnaire.

Par la suite, la biodégradation du MGZ et IN a été évaluée à l'aide de l'appareil Respicond VI® avec, comme inoculum, les souches ATCC19718 et CIPA105 en phases de croissance exponentielle et stationnaire (annexe XI p.192). Les résultats synthétisés de ces essais sont présentés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Résultats de biodégradabilité facile des substances modèles en fonction de la phase de croissance des souches utilisées comme inoculum

Souche	Substance testée	Phase de croissance	Médiane (%)	Min (%)	Max (%)	N (nombre)
ATCC19718	IN	Exponentielle	56	45*	70*	5
ATCC19718	IN	Stationnaire	52	38	58	5
ATCC19718	MGZ	Exponentielle	31	19	42	5
ATCC19718	MGZ	Stationnaire	18	14	26	5
CIPA105	IN	Exponentielle	37	31	40	5
CIPA105	IN	Stationnaire	14	0	15	5
CIPA105	MGZ	Exponentielle	40	28*	54*	5
CIPA105	MGZ	Stationnaire	61	40	63	3

** L'amplitude (différence entre valeurs min et max) soulignée montre une variabilité notable avec au moins 25% d'écart entre les deux essais.*

Compte-tenu du faible nombre de répliques (5) par essai, l'impact de la phase de croissance bactérienne sur la dégradation d'une substance est vérifié par analyses statistiques descriptives. Les boites à moustache (figure 32) permettent d'évaluer visuellement la différence de biodégradation en fonction de la phase de croissance, et mettent en évidence une meilleure biodégradation du MGZ par ATCC19718 et d'IN par CIPA105 lorsque ces souches sont en phase exponentielle de croissance. Dans les deux autres cas, la biodégradabilité n'est pas augmentée lorsque la souche est utilisée en phase exponentielle de croissance. La variabilité n'est, quant à elle, pas améliorée. Par exemple, pour l'inoculum CIPA105, l'écart entre les valeurs extrêmes de biodégradabilité du MGZ est d'environ 25% pour les résultats obtenus avec les deux phases de croissance. Les analyses statistiques réalisées du seuil de significativité statistique (test de contraste) et de la taille d'effet (effect size en anglais), confirment ces résultats. Ainsi, la phase exponentielle n'a pas diminué la variabilité intra-essai lors de ces expériences. De plus, son utilisation nécessite un investissement technique en matériel (nombre de flacons, incubateurs), en temps (nombre de flacons à préparer pour obtenir la bonne concentration pour les essais) et en espace trop important pour être utilisée pour la suite des travaux.

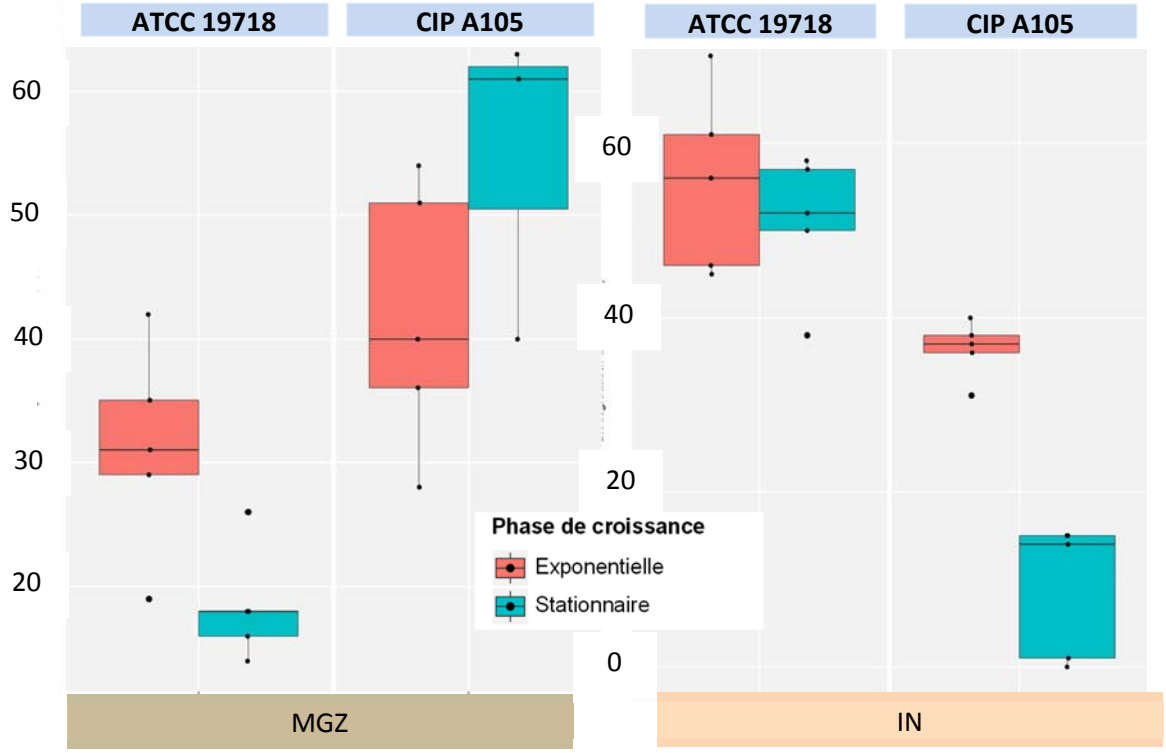


Figure 32 : Boîtes à moustache de l'impact des phases de croissance exponentielle et stationnaire des souches ATCC19718 et CIPA105 sur la biodégradabilité facile de MGZ et d'IN

Des expériences seront réalisées avec des souches bactériennes isolées afin de réduire la variabilité des tests de biodégradabilité facile. Ces bactéries seront utilisées en phase de croissance stationnaire afin de pouvoir réaliser le nombre d'essais prévus (> 300).

2. Evaluation de la variabilité du test de biodégradabilité due à l'inoculum

Les résultats des tests de biodégradabilité facile avec de la boue activée comme inoculum sont variables comme le montrent ceux que nous avons obtenus pour une même substance peu soluble (figure 33, exemple du MGZ). Notre objectif étant d'établir une stratégie d'évaluation de la biodégradabilité facile des substances peu hydrosolubles, il était nécessaire d'identifier la variabilité de ces tests et de la réduire le plus possible. Ainsi, la variabilité due à l'inoculum, cause principale de variabilité du test, est étudiée ci-après. La variabilité due aux méthodes d'amélioration de la biodisponibilité, est évaluée dans *III. Résultats 4.4. p.126*. D'autres sources de variabilité (pesée de la substance, milieu minéral et flacons des essais de criblage), dont l'impact sur la variabilité est limité à environ 10%, sont décrites en Annexe XII p.197.

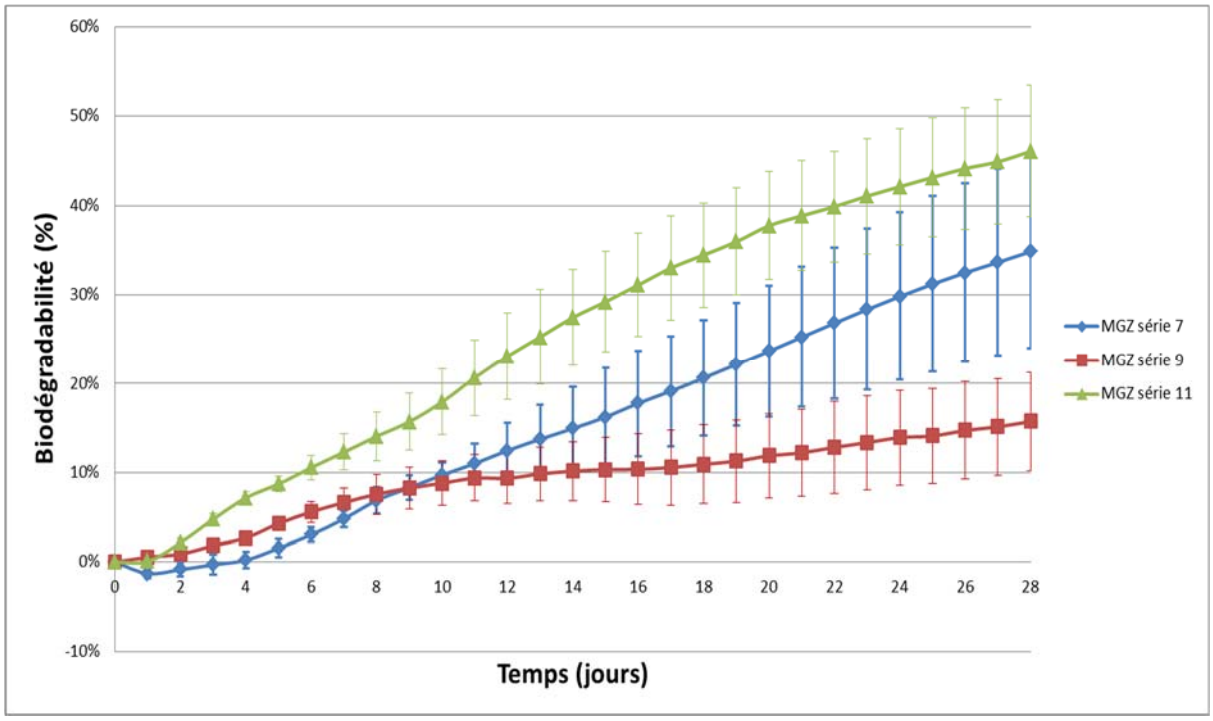


Figure 33 : Exemple de trois essais de criblage de biodégradabilité facile du MGZ en addition directe sur appareil Respicond VI®. *Pour les 3 essais : MGZ (lot 2) à 20 mg de carbone.L^{-1}, inoculum boue activée à 30 mg de matières sèches.L^{-1}. Les résultats présentés sont basés sur les médianes de chaque essai, les barres d'erreur représentent les écarts absolus médians (MAD).*

L'inoculum boue activée est reconnu comme facteur de variabilité des essais de biodégradabilité (Thouand, 1993). Ainsi, pour tenter de s'en affranchir, notre recherche s'est orientée sur la détermination du meilleur inoculum pour évaluer la biodégradabilité des substances peu hydrosolubles sans pour autant optimiser les conditions d'utilisation de la biomasse (concentration, température…). Nous avons, de plus, cherché à mieux comprendre les différences et les évolutions des populations bactériennes contenues dans l'inoculum boue activée au cours des expérimentations.

2.1. Comment choisir le meilleur inoculum ?

Cinq paramètres ont été définis pour comparer entre eux les différents inocula adaptés aux tests de biodégradabilité facile (tableau 22). Des notes allant de 0 à 5 ont été attribuées pour chaque paramètre, avec une note de 0 lorsque l'inoculum ne répond pas au critère étudié et 5 lorsqu'il y répond parfaitement. A noter que l'écart absolu médian (MAD) est l'outil utilisé pour définir la variabilité dans cette étude.

Tableau 22 : Notations des cinq paramètres d'évaluation de l'inoculum

Paramètre	Note					
	0	1	2	3	4	5
Capacité de biodégradation (X)	< 5 %	5 ≤ X < 15 %	15 ≤ X < 30 %	30 ≤ X < 45%	45 ≤ X < 60%	≥ 60%
Variabilité pour le test (MAD en %)	MAD > 25	20 ≤ MAD < 25	15 ≤ MAD < 20	10 ≤ MAD < 15	5 ≤ MAD < 10	MAD < 5
Accessibilité inoculum	-	Prélèvement en milieu naturel de plusieurs inocula (trajet)	-	Prélèvement en milieu naturel d'un inoculum	-	souche(s) commerciale(s) disponible(s)
Préparation inoculum	-	souche(s) difficilement cultivable(s) et à croissance lente	stabulation/ préparation/ lavage de plusieurs inocula naturels	souche(s) facilement cultivable et à croissance lente	stabulation/ préparation/ lavage d'un inoculum naturel	souche(s) facilement cultivable et à croissance rapide
Représentativité environnementale	Souche pure OGM	Souche pure issue de l'environnement	-	Mélange de souches	-	Inoculum issu de l'environnement*

** L'inoculum issu de l'environnement regroupe l'ensemble des inocula acceptés dans les lignes directrices OCDE 301 et 310.*

Sur la base de ces 5 paramètres, l'inoculum idéal devrait présenter une note maximale de 25. Bien que représentatif de l'environnement, l'inoculum utilisé (boue activée de station d'épuration) a comme faiblesse principale son impact sur la variabilité du test ainsi que sa capacité modérée à dégrader nos substances modèles (note globale de 17/25). A l'opposé, l'alternative souche isolée, non représentative de l'environnement mais dégradeur spécifique des substances modèles, présente un meilleur profil théorique avec une note globale de 21/25 (figure 34).

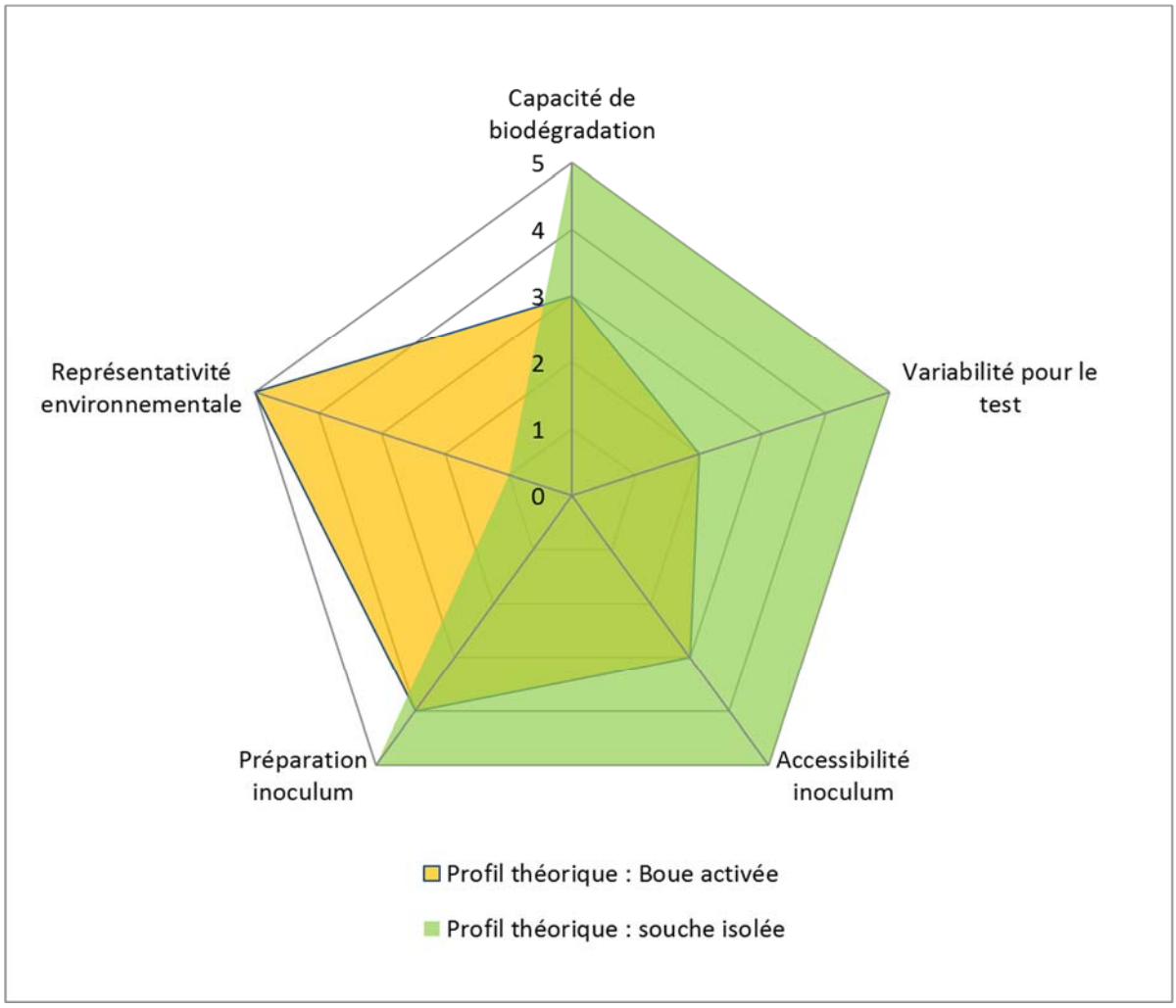


Figure 34 : Profils théoriques des inocula boue activée et souche isolée selon cinq paramètres

2.2. Caractérisation de la boue activée et effet de son prétraitement

2.2.1. *Diversité bactérienne comparée entre les boues utilisées et celles décrites dans la littérature*

Dans un premier temps nous avons souhaité vérifier si les boues activées utilisées dans 6 de nos essais étaient comparables aux boues de stations d'épuration décrites dans la littérature. Notre analyse (figure 35) met en évidence que la composition en phyla bactériens de ces 6 boues brutes - BB (station d'épuration de Maxéville, France) est proche. Les phyla présents à plus de 5% dans au moins un échantillon sont les Bacteroïdetes (40,5 à 59,7%), les Beta-protéobactéria (12,0 à 21,4%), les Chlorobi (3,7 à 16,6%), les Gamma-Proteobacteria (2,7 à 7,8%), les Alpha-Proteobacteria (2,2 à 5,3%), les Chloroflexi (1,4 à 4,7%) et les Actinobacteria (0,2 à 0,7%). Les phyla composant les inocula étudiés possèdent une répartition proche des boues de station d'épuration décrites dans (Zhang et al., 2012), à l'exception que, dans la publication de Zhang *et al.,* le phylum Bacteroïdetes est moins représenté que les Proteobacteria.

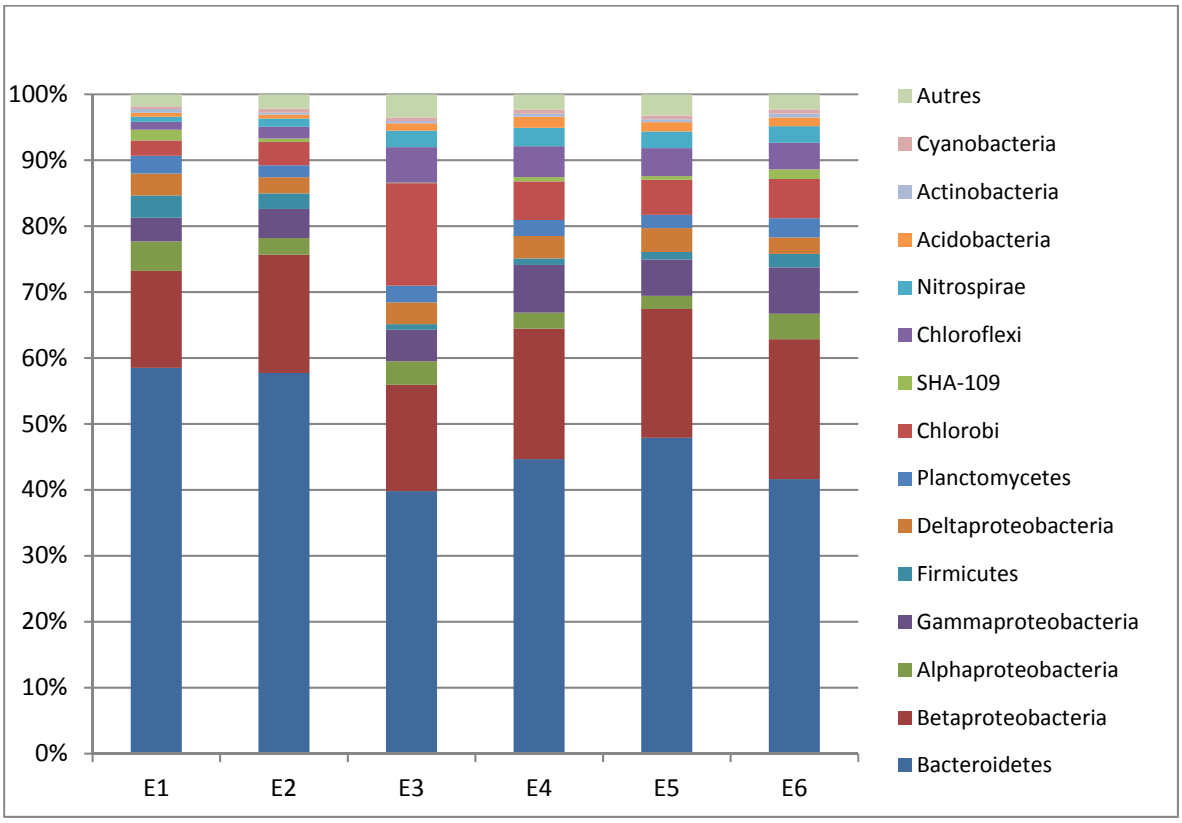


Figure 35 : Répartition des phyla des 6 boues activées brutes (BB) provenant de la station d'épuration de Maxéville et utilisées dans les essais de criblage E1, E2, E3, E4, E5 et E6

Les boues brutes utilisées dans 6 de nos études ont une répartition en phyla bactériens similaire aux boues de station décrites dans la publication de Zhang et al., 2012. On observe également que la répartition des phyla présents dans nos 6 boues brutes est globalement homogène.

Sur la base des phyla, nous avons confirmé que le paysage bactérien des boues activées utilisées était proche de ceux déjà décrits dans la littérature. Mais, au vu de la période étendue des prélèvements (7 mois), il était moins prévisible de découvrir que la répartition des familles

bactériennes majoritaires des 6 inocula était similaire. Ainsi, pour évaluer l'impact de l'échantillonnage, les caractéristiques de la station d'épuration ont été étudiées. La station d'épuration de Maxéville, avec 500 000 équivalents-habitants (EH), est la 17ème plus importante station de France, sur plus de 4 000 stations dont la capacité est ≥ 2 000 EH.

Celle-ci est à dominante urbaine et les industries qui y sont raccordées ne sont pas du domaine de la chimie lourde[16]. Cette notion est importante car la sélection bactérienne n'a donc été que peu influencée par des concentrations fortes en substances issues de l'industrie chimique. De plus, les caractéristiques météorologiques (pluviométrie et température) sont stables sur l'ensemble des prélèvements, seul le débit d'entrée en station va connaitre une variabilité allant jusqu'à doubler d'un échantillon à un autre (tableau 23).

Tableau 23 : Caractéristiques de la station d'épuration aux jours de prélèvement (informations Véolia© station d'épuration de Maxéville)

N° d'essai	Jour de prélèvement	Pluie (mm)	Débit entrée station (m3.j^{-1})	Température eau brute (°C)
RT12	06/05/2015	0,2	102 495	15,0
RT15	23/06/2015	2,9	96 443	17,5
RT14	25/08/2015	0,1	54 414	20,7
RT17	06/10/2015	6,9	110 223	18,6
RT18	14/10/2015	0,3	60 401	17,9
RT19	14/11/2015	0	53 748	16,5

La stabilité de composition bactérienne des boues brutes sur les 7 mois de prélèvement s'explique, au moins en partie, par la constance des caractéristiques de pluviométrie et de température de la station ainsi que par le type d'industries raccordées à cette station.

2.2.2. *Influence du prétraitement de la boue activée sur la diversité microbienne de l'inoculum de test*

Lors de sa préparation pour un test de biodégradabilité, la boue activée passe par 3 stades successifs : la boue brute fraichement prélevée (BB), la boue lavée (BL) et la boue diluée servant de témoin au test de biodégradabilité à J0 (témoin J0). Pour confirmer l'homogénéité que nous avons pu

[16] *Industries : Alsa France, Ardagh Metal Packaging France SAS, Brasseries Champigneulles, C. Marion et Cie, Centre Alexis Vautrin, Centre Hospitalier Régional de Nancy, Clinique Louis Pasteur, Etablissement Français du Sang, Initial, Laboratoires Serobiologiques, S.A. Polyclinique de Gentilly, Schweitzer SA, SDF Barthe Chantal et Pascal, ST Hubert, Synd Interhosp Nanceen CHIR APP LOC.*

http://rhin-meuse.eaufrance.fr/resultats-EPU?perimetre=025435700075

observer avec les phyla bactériens des boues brutes, nous avons étudié plus en détail la composition de ces échantillons. L'analyse réalisée s'est portée sur l'identification des bactéries présentes et leurs abondances relatives. Une première étude a été réalisée sur les genres bactériens mais environ 50% des OTUs présents dans chaque inoculum possèdent des séquences non attribuées et étaient identifiés comme « unclassified » par l'automate (fiabilité du résultat < 80%). La précision a donc été réajustée à la famille bactérienne et l'analyse a porté sur les 20 familles majoritaires de chaque inoculum, suffisantes pour représenter 65 à 83% des échantillons.

La figure 36 permet de visualiser l'homogénéité de répartition des familles majoritaires présente pour les boues brutes, les boues lavées et, dans une moindre mesure, pour les témoins J0. Cette homologie est plus soutenue pour les essais E4, E5 et E6 dont les prélèvements ont été réalisés en octobre 2015 (E4 et E5) et en novembre 2015 (E6). On note également, pour un même essai, qu'il n'y a pas de changement significatif de répartition des familles entre les prétraitements, avec, par exemple, une conservation lors des traitements de la surexpression de la famille *SJA-28* dans l'essai E2 ou de la sous-expression de la famille *Cytophagaceae* dans l'essai E3. Les familles majoritaires des inocula BB, BL et témoin J0 dépassant 5% dans au moins un échantillon sont : *Saprospiraceae* (Bacteroidetes), *Chitinophagaceae* (Bacteroidetes), *Rhodocyclaceae* (Betaproteobacteria), les bactéries non classées, *Methylophilaceae* (Betaproteobacteria) (excepté pour les témoins J0) et *SJA-28* (Chlorobi).

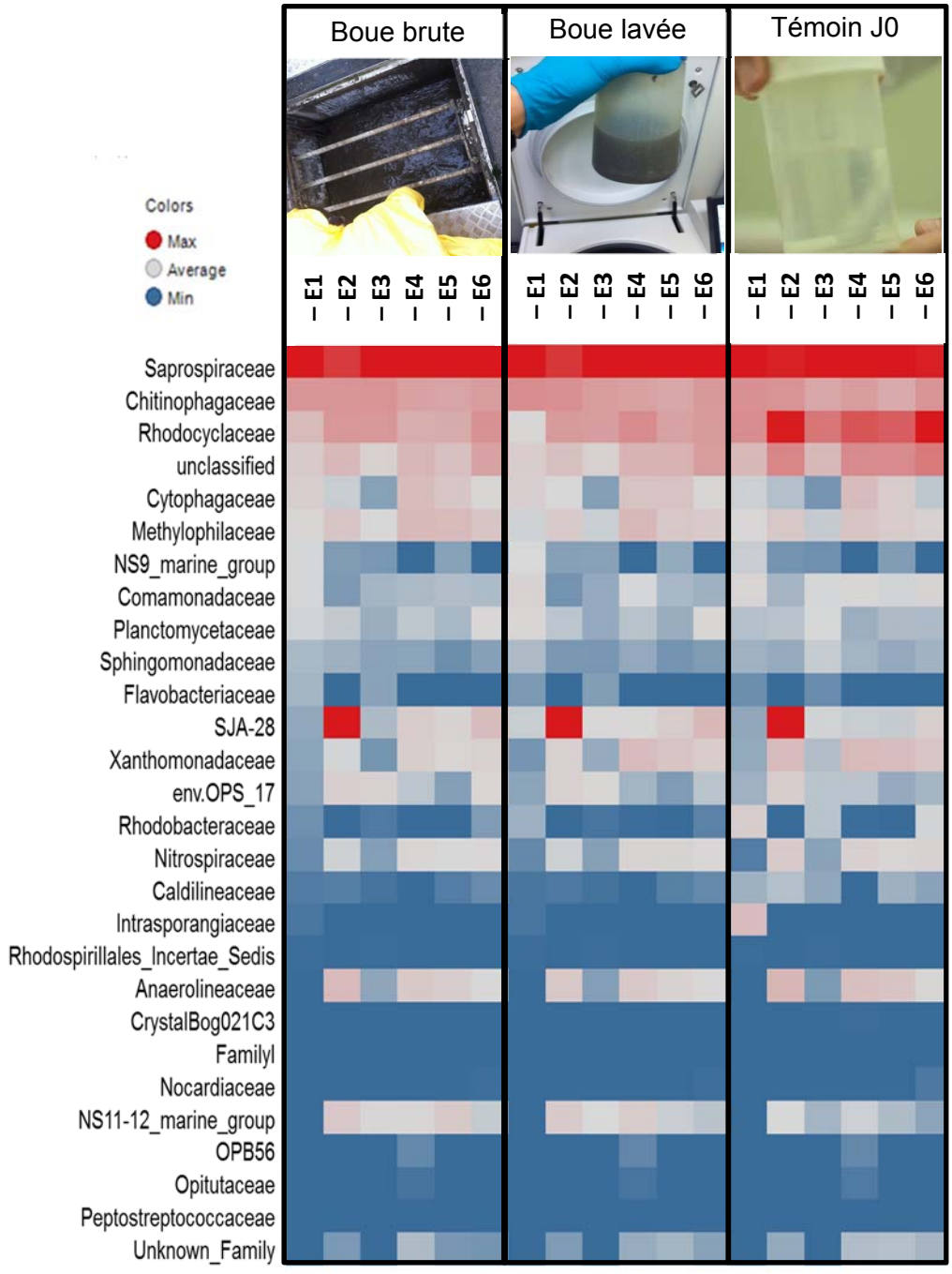


Figure 36 : Carte thermique (heat map) des 20 familles majoritaires des inocula dans différentes conditions regroupées par test

Sur la base des observations effectuées sur la carte thermique, les inocula possèdent une répartition des familles majoritaires proche dans les 6 essais pour les conditions boues brutes, boues lavées et témoins J0.

Dans cette configuration, le prélèvement (BB), le lavage (BL) et la dilution (J0) étant réalisés avec un milieu minéral non nutritif, il est attendu une diminution de la diversité et de la concentration

en bactéries entre le stade boue brute et le témoin J0. Nous avons donc travaillé de manière plus globale, sur l'ensemble des OTUs, pour définir si lors du processus de préparation, la diversité était diminuée. Les indices de Shannon, marqueurs de la diversité et de la représentativité des populations bactériennes présentes dans un échantillon, ont été comparés pour chaque stade de boue et chaque essai. La figure 37 montre que les indices de Shannon sont élevés et compris entre 4,51 et 5,36 pour l'ensemble de nos échantillons, correspondant à un environnement riche et diversifié. Il n'y a pas de perte de la diversité bactérienne avec le prétraitement, ces indices ayant tous augmenté entre les stades boue brute et témoin J0. Les tests statistiques réalisés (ANOVA et post hoc de Tuckey) confirment la présence de deux groupes (E1, E2, E3 d'un côté et E4, E5, E6 de l'autre).

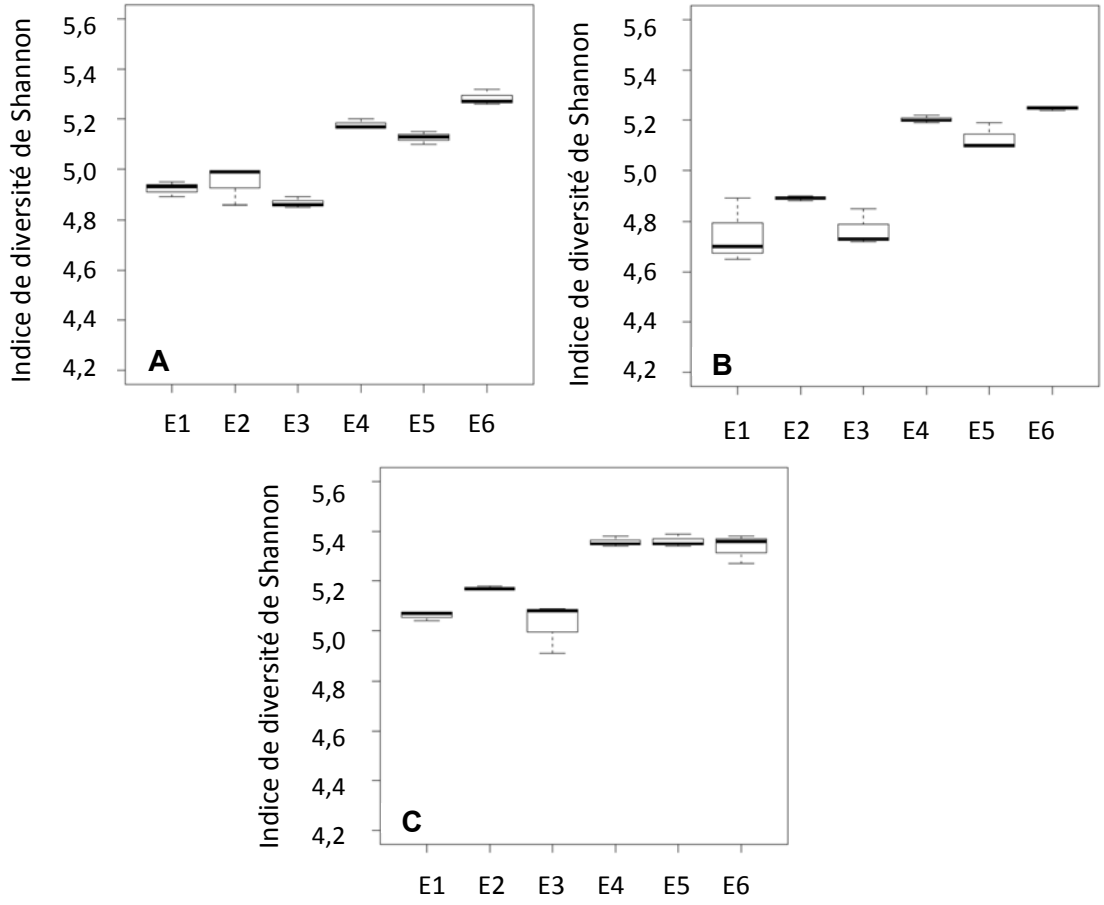


Figure 37 : Boxplot des indices de diversité de Shannon index pour les 6 expériences de biodégradabilité sur MGZ et IN (E1 à E6) pour les conditions (A) boue brute, (B) boue lavée et (C) témoin inoculum à J0

La diversité bactérienne est élevée pour tous les échantillons de boue activée (indice de Shannon > 4,5), quelle que soit la condition de la boue (au prélèvement, après lavage et après dilution) et ne diminue pas entre le prélèvement en station et le témoin J0. La préparation de l'inoculum n'a donc pas d'impact sur la diversité bactérienne de la boue activée. Nous en concluons ainsi que les essais réalisés sont, au démarrage, comparables.

2.3. Comparaison entre la boue activée et les deux souches isolées sélectionnées

Nous avons supposé que les deux souches bactériennes isolées (ATCC19718 et CIPA105) qui ont été sélectionnées pour nos deux substances modèles, conduiraient à une variabilité inter-essais moindre qu'avec la boue activée. Cette comparaison est effectuée avec la condition de référence « addition directe » pour nos 3 inocula (figure 38). Elle montre que la souche bactérienne ATCC19718 possède une meilleure efficacité à biodégrader MGZ et IN (respectivement 13% et 45% à 28 jours) que la boue activée –BA (10% pour MGZ et 30% pour IN) et que la souche CIP A105 (11,5% pour MGZ et 24,5% pour IN) ; même si cette différence de biodégradabilité pour le MGZ n'est pas significative. Il existe une variabilité forte d'un essai à l'autre pour chaque inoculum. Mais, le marqueur de variabilité (écart absolu médian – MAD) possède une valeur équivalente pour les 3 inocula pour les essais sur IN (MAD entre 9% et 13%) et diminue sensiblement pour les souches ATCC19718 (MAD à 8%) et CIPA 105 (MAD à 7%) par rapport à la boue activée (MAD à 14%) pour MGZ.

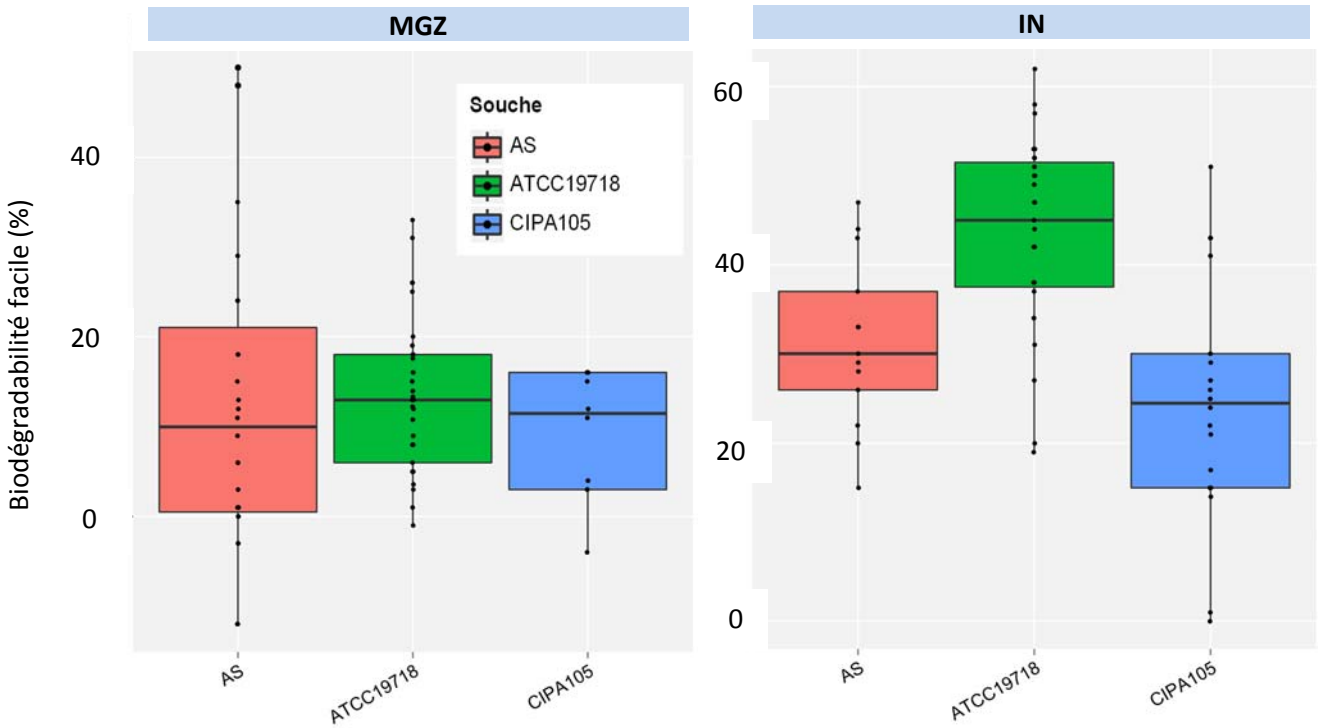


Figure 38 : Résultats des essais de criblage de biodégradabilité facile de MGZ et d'IN en addition directe (i.e. substance seule) avec 3 inocula : Boue activée (BA / AS en anglais) à 10^5 microorganismes.mL^{-1} et 2 souches pures ATCC19718 et CIPA105 à 10^7 bactéries.mL^{-1} en phase de croissance stationnaire au démarrage du test

La souche ATCC19718 dégrade mieux les deux substances modèles que la boue activée et la souche CIPA105. Cependant, l'utilisation des souches bactériennes isolées n'améliore pas la variabilité de la réponse de biodégradation comparée à la boue activée dans nos conditions d'essai.

Les résultats pratiques de biodégradabilité et de variabilité (MAD) obtenues pour les 2 substances permettent de dresser les profils observés des trois inoculas (figure 39) :

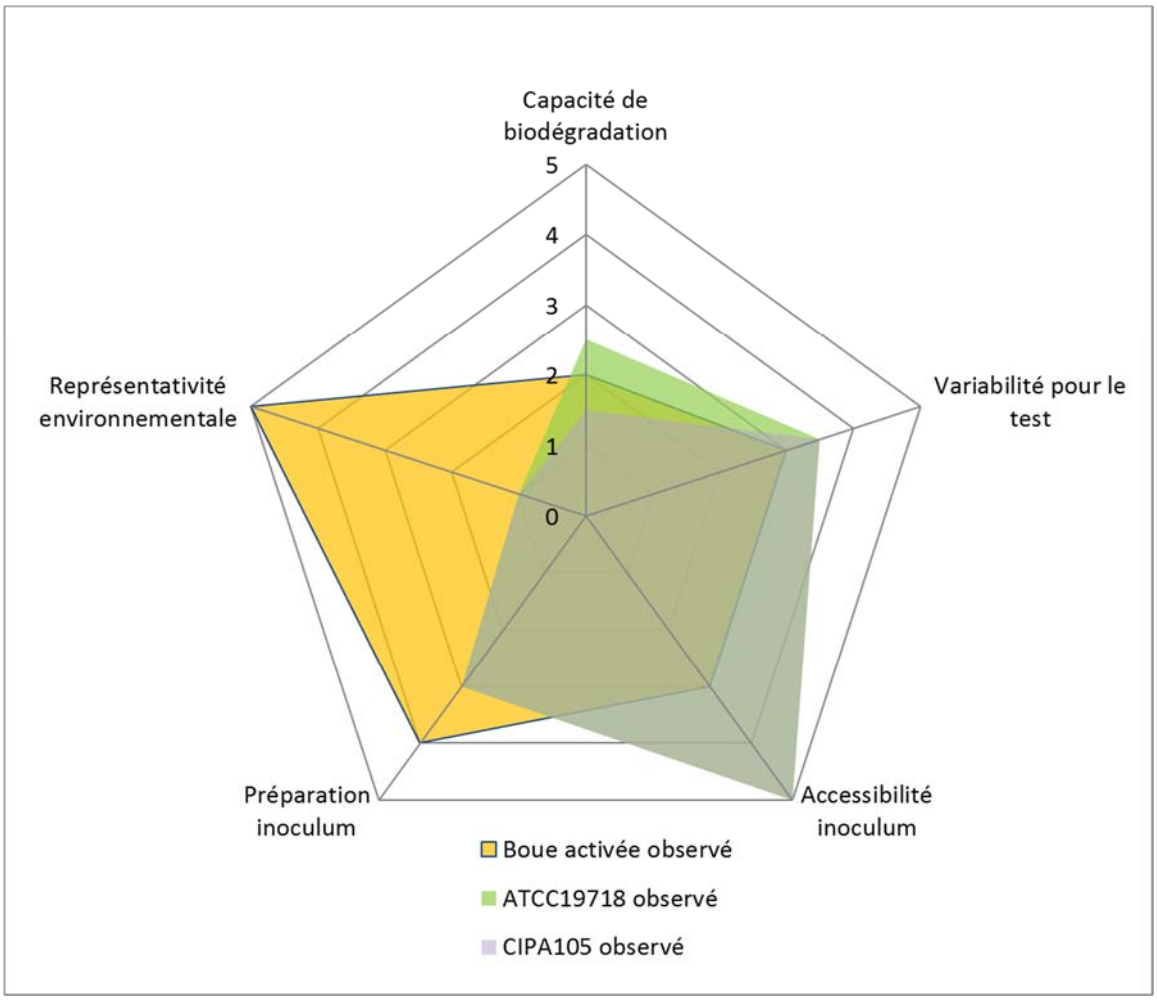


Figure 39 : Profils observés des inocula boue activée, souches isolées ATCC19718 et CIP A105 selon cinq paramètres

Ainsi, malgré son fort impact sur la variabilité inter-essais, la boue activée possède une grande diversité microbienne et permet la comparaison des résultats obtenus avec les tests standards de biodégradabilité facile par sa représentativité environnementale (note globale de 17/25). Les souches isolées, étudiées comme alternative pertinente à la boue activée, ne réduisent pas fortement la variabilité du test et obtiennent des notes globales inférieures à la boue activée, de 15/25 pour ATCC19718 et de 14/25 pour CIPA105.

Sur l'ensemble des cinq paramètres d'évaluation de l'inoculum et dans nos conditions de test, les souches isolées étudiées n'apportent pas la réduction de variabilité attendue.
L'inoculum le plus adapté pour développer notre stratégie d'évaluation de la biodégradabilité des substances peu hydrosolubles reste la boue activée.

3. Stratégie d'évaluation des substances peu hydrosolubles (Sweetlove et al., 2016)

3.1. Description de la stratégie

La littérature et les documents guides ne proposent pas de stratégie d'évaluation de la biodégradabilité des substances peu hydrosolubles. Seules des indications portant sur des méthodes utilisées de façon ponctuelle pour améliorer la biodisponibilité et leur mise en œuvre sont proposées. Dans ce contexte, il n'existe pas de définition du choix des méthodes à tester, de leur comparaison ou de stratégie d'évaluation. Une stratégie a ainsi été élaborée pour choisir la ou les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité (MAB) les plus appropriées à l'évaluation du potentiel de biodégradabilité facile des substances peu solubles dans l'eau. La première étape consiste à évaluer la biodégradabilité facile de la substance d'essai avec les différentes MAB par un test de criblage (figure 40). Ensuite, un ratio (R_{MAB}) est calculé et permet de comparer les résultats obtenus avec les différentes MAB. Etant donné que ce rapport tient compte à la fois de la courbe de biodégradation et des résultats obtenus par addition directe de la substance testée (méthode de référence), il est donc possible de comparer les résultats des différentes MAB réalisées dans différents tests. La seconde étape consiste à confirmer le résultat par un test standard réalisé sur les MAB identifiées d'intérêt. Cette stratégie est présentée en anglais dans la publication qui suit dont le résumé est le suivant :

« Les difficultés rencontrées pour estimer la biodégradation de substances peu solubles dans l'eau sont souvent liées à leur biodisponibilité limitée aux microorganismes.

De nombreuses méthodes d'amélioration de la biodisponibilité (MAB) ont été décrites, mais aucune approche globale n'a été proposée pour pouvoir comparer ces méthodes de manière standardisée. Cette possibilité de comparaison serait un outil précieux dans le cadre d'une stratégie plus large d'évaluation des substances peu solubles dans l'eau. Ainsi, le but de cette étude est de définir une stratégie d'évaluation des différentes MAB adaptées à des substances peu hydrosolubles lors des tests de biodégradabilité facile. L'étude a été réalisée avec deux produits chimiques peu solubles dans l'eau - un solide, l'anthraquinone et un liquide, l'isodecyl neopentanoate - et 5 MAB (i) dispersion par ultrasons, (ii) adsorption sur gel de silice, (iii) dispersion avec un émulsifiant, (iv) dispersion avec de l'huile de silicone, (v) dispersion avec émulsifiant et huile de silicone qui ont été comparés à la méthode d'addition directe (méthode de référence). Une stratégie d'évaluation en deux phases des produits chimiques solides et liquides a été développée impliquant la sélection des MAB les plus pertinents pour améliorer leur biodégradabilité (figure 40). Un rapport de classification des MAB (R_{MAB}) est décrit et

permet de comparer les différentes méthodes de préparation d'échantillons et cela, dans différents tests.

Avec cette stratégie, les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité permettant d'obtenir les taux de biodégradabilité les plus élevés étaient, pour la substance solide, la dispersion par ultrasons, la dispersion avec de l'huile de silicone et l'association de l'huile de silicone et d'un émulsifiant. Pour le liquide, les méthodes d'adsorption sur le gel de silice et la dispersion aux ultrasons ont été les plus performantes. » (Sweetlove et al., 2016). Les résultats obtenus avec les MAB confirmées sont retenus pour l'exploitation des résultats du pourcentage de biodégradabilité de la substance testée et pour statuer sur sa biodégradabilité facile.

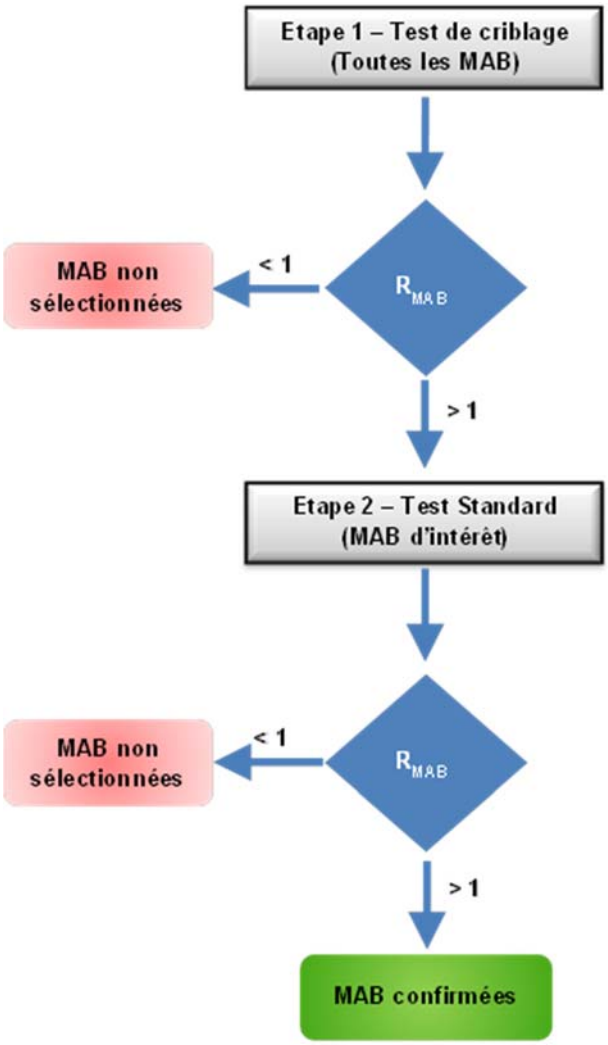


Figure 40 : Stratégie d'évaluation simplifiée (MAB : Méthode d'amélioration de la biodisponibilité, R_{MAB} : ratio MAB)

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-016-6899-3

RESEARCH ARTICLE

Evaluating the ready biodegradability of two poorly water-soluble substances: comparative approach of bioavailability improvement methods (BIMs)

Cyril Sweetlove[1,2] · Jean-Charles Chenèble[1] · Yves Barthel[3] · Marc Boualam[3] · Jacques L'Haridon[1] · Gérald Thouand[3]

Received: 1 February 2016 / Accepted: 12 May 2016
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Difficulties encountered in estimating the biodegradation of poorly water-soluble substances are often linked to their limited bioavailability to microorganisms. Many original bioavailability improvement methods (BIMs) have been described, but no global approach was proposed for a standardized comparison of these. The latter would be a valuable tool as part of a wider strategy for evaluating poorly water-soluble substances. The purpose of this study was to define an evaluation strategy following the assessment of different BIMs adapted to poorly water-soluble substances with ready biodegradability tests. The study was performed with two poorly water-soluble chemicals—a solid, anthraquinone, and a liquid, isodecyl neopentanoate—and five BIMs were compared to the direct addition method (reference method), i.e., (i) ultrasonic dispersion, (ii) adsorption onto silica gel, (iii) dispersion using an emulsifier, (iv) dispersion with silicone oil, and (v) dispersion with emulsifier and silicone oil. A two-phase evaluation strategy of solid and liquid chemicals was developed involving the selection of the most relevant BIMs for enhancing the biodegradability of tested substances. A description is given of a BIM classification ratio (R_{BIM}), which enables a comparison to be made between the different test chemical sample preparation methods used in the various tests. Thereby, using this comparison, the BIMs giving rise to the greatest biodegradability were ultrasonic dispersion and dispersion with silicone oil or with silicone oil and emulsifier for the tested solid chemical, adsorption onto silica gel, and ultrasonic dispersion for the liquid one.

Keywords Biodegradability · Poorly water-soluble substances · Ready biodegradability test · Bioavailability improvement method · Evaluation strategy · Silicon oil · Silica gel

Responsible editor: Philippe Garrigues

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-016-6899-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Cyril Sweetlove
csweetlove@rd.loreal.com

[1] L'Oréal Research & Innovation, Environmental Research Department, 93600 Aulnay-sous-Bois, France

[2] UMR CNRS 6144 GEPEA CBAC Lab, University of Nantes, 85035 La Roche-sur-Yon, France

[3] Eurofins Expertises Environnementales, Ecotoxicology Lab, 54521 Maxéville, France

Introduction

Chemicals produced by human activities are a potential source of environmental pollution, and concerns regarding their potential to cause adverse effects are greater when they are considered to be persistent. In many cases, degradation by bacteria, i.e., biodegradation, is a major factor in the assessment of the environmental persistence of chemicals (Ramade 1992). Interest in biodegradability testing dates back to 50 years (Borstlap and Kooijman 1963). Today, biodegradability is a key parameter in several international regulations on chemical substances, such as the European Union regulation REACH (ECHA 2006) and the European CLP regulation (European parliament 2008). In order to evaluate the complete mineralization of chemicals, i.e., ultimate biodegradation, tests have been designed under the umbrella of international organizations such as the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) and International Organization for Standardization (ISO).

Published online: 28 May 2016

Among these tests, the ready biodegradability tests enable the ultimate biodegradability in aqueous media to be assessed under aerobic conditions. Ready biodegradability test highlights the rapid biodegradation of chemicals under most environmental conditions (ECHA 2014).

Difficulties encountered in estimating the biodegradability of poorly water-soluble substances are often linked to their limited bioavailability to microorganisms (Stucki and Alexander 1987; Alexander 1999). Working on improving test solution preparations for poorly water-soluble substances is a potentially interesting approach, since a genuinely realistic approach—i.e., performing tests at the likely environmentally relevant chemical concentration of a few parts per billion (10^{-9} g/g)—is experimentally infeasible without the use of radiolabeled material. Many scientists have worked on this research subject (Gerike 1984; Blok et al. 1985; Thomas et al. 1986; De Morsier et al. 1987; Nyholm 1990; Ramade 1995; Painter 1995 ; Handley et al. 2002; Ingerslev et al. 2000; Dumont et al. 2006; Van Ginkel et al. 2008; Li and Chen 2009; Rodrigues et al. 2013). The most interesting test solution preparation methods described are sonication, adsorption onto solid supports (Nyholm 1990; Ramade 1995; Handley et al. 2002; Li and Chen 2009; Rodrigues et al. 2013), dispersion with emulsifier or solvent, dispersion with silicone oil (Dumont et al. 2006; Van Ginkel et al. 2008), or dispersion with emulsifier and silicone oil. The most appropriate methods for conducting these tests seem to be respirometric methods, which measure CO_2 production or O_2 consumption with constant flask stirring (Gerike 1984; Blok et al. 1985; Thomas et al. 1986; OECD 1992).

The main difficulty in comparing or reproducing these different bioavailability improvement methods (BIMs) is the variability of the microbial inoculum used to perform the biodegradability testing (Thouand et al. 1995, 1996; Van Ginkel et al. 1995; Goodhead et al. 2013; Kowalczyk et al. 2015). This variability can even be considered as a factor, making tests conducted with different inocula hardly comparable (Blok and Booy 1984). For example, Sweetlove et al. (2013) showed that ultrasonic dispersion improved the biodegradability of anthraquinone, while Nyholm (1990) concluded the opposite.

Many original bioavailability improvement methods (BIMs) have been described, but no global approach for a standardized comparison of these exists. The latter would be a valuable tool as part of a wider strategy for evaluating poorly water-soluble substances. The purpose of this study was to define an evaluation strategy by assessing five different BIMs on two reference poorly water-soluble substances with ready biodegradability tests.

The choice and performance of BIMs can be influenced by the physical state of the test material. Therefore, one solid and one liquid chemical were selected for evaluation. Anthraquinone was chosen because it is a reference standard in biodegradability tests for poorly water-soluble chemicals according to ISO 10634 (ISO 1995) and European Chemical Industry Council report No. MCC/007 (Comber and Holt 2010). Based on the supplier's Material Data Safety Sheet (MSDS), it is readily biodegradable (62 % biodegradation at day 28, according to EC Test Guideline C.4.E.) but does not meet the 10-day window (dw) criterion. Isodecyl neopentanoate, used as an emollient, is the only liquid cosmetic ingredient that meets all of the desired criteria; it has a defined chemical structure, is of very high purity and nontoxic to bacteria, and has a low water solubility, an oily form and moderate biodegradability according to the supplier's MSDS (35.4 % at 28 days in accordance with OECD Test Guideline 301B). This branched-chain ester is predicted readily biodegradable (92 % at 28 days with no stable metabolite) according to the OASIS CATALOGIC Kinetic 301B model, v02.09 (Dimitrov et al. 2011a, 2011b), cited in the REACH guidance (ECHA 2014).

The following BIMs were compared: (i) ultrasonic dispersion, (ii) dispersion using an emulsifier, (iii) adsorption onto silica gel, (iv) dispersion with silicone oil, and (v) dispersion with an emulsifier and silicone oil. The calculation of a BIM classification index is proposed, which enables the different operating conditions to being ranked.

Materials and methods

Materials

Anthraquinone (ref.: CAS RN: 84-65-1, 97 % purity, A90004 from Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and isodecyl neopentanoate (CAS RN: 60209-82-7, DUB VCI 10 from Stearinerie Dubois, Boulogne-Billancourt, France) were the two reference test substances. Sodium acetate (CAS RN: 127-09-3, Sigma-Aldrich) was used as a positive control substance. Silica gel (CAS RN: 112926-00-8, size 15 μm, Sigma-Aldrich) was chosen according to ISO 10634 (ISO 1995).

Silicone oil AR 20® (CAS RN: 63148-58-3, Sigma-Aldrich) was selected, based on Van Ginkel's research (Van Ginkel et al. 2008). The emulsifiers chosen among those proposed by the ISO 10634 guideline (ISO 1995) were Synperonic PE/P94® and PE/P103® (formerly Pluronic PE9400® and PE10300®, respectively). Pluronic PE9400® was obtained from BASF SE (Levallois-Perret, France).

Ultrasound treatments—35 kHz at 22 °C—were performed with an Ultrasonic Bath 9L SHE10000 (LaboModerne, Paris, France). Emulsions were made with an IKA® Eurostar Power Control Visc Euro-ST PCVS1 Mixer Stirrer at 50–2000 rpm. Carbon measurements were performed with a CHNS Elementar (VARIO model: Vario El Cube).

The mineral medium used in the ready biodegradability tests was made up according to OECD Test Guideline 301B

and contained the following nutrients per liter of ultra-pure water: 85 mg KH_2PO_4, 217.5 mg K_2HPO_4, 334 mg $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$, 5 mg NH_4Cl, 27.5 mg $CaCl_2$, 22.5 mg $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, and 0.25 mg $FeCl_3{\cdot}6H_2O$ (OECD 1992).

Biodegradation tests

Two types of biodegradation test, based on CO_2 measurements, were carried out in this study. A respirometer was used to perform screening tests for BIM selection, followed by a standardized ready biodegradability tests to confirm the results. In order to be considered readily biodegradable according to OECD Test Guidelines (OECD 1992), a biodegradation threshold of 60 % $ThCO_2$ has to be reached in a 10-10-dw within the 28-day test period. The 10-dw begins when biodegradation reaches 10 %.

A Respicond VI® respirometer from A. Nordgren Innovations AB (Bygdeå, Sweden) was chosen to compare the different BIMs. Respicond VI® has several advantages: (i) 95 closed test flasks (volume 150 mL) running in parallel allow a high number of operating conditions to being compared in the same test with the same microbial inoculum, (ii) stirring of the test solutions, and (iii) simple and accurate CO_2 detection to measure biodegradation of the test substance. CO_2 release was measured as described by Nordgren 1988, based on the change in conductivity of a solution of potassium hydroxide containing trapped CO_2. The CO_2 absorbed in this hydroxide solution briefly forms carbonate ions that reduce the solution's conductivity. This change in conductivity can be calibrated against the amount of absorbed CO_2 and provides an integrated measurement of respiration. This principle is similar to the one recommended in OECD Test Guideline 301 B (OECD 1992).

OECD Test Guideline 301 B was followed to perform standard tests with two flasks containing the test substance (with or without a BIM) and the inoculum, two flasks containing only the inoculum (with or without a BIM), and one flask containing the reference compound and the inoculum.

Activated sludge was collected from a predominantly domestic sewage treatment plant (Maxéville, France, 500,000 population equivalents). The activated sludge was kept at 20 °C and used within 24 h after collection as described in OECD Test Guideline 301 (OECD 1992). The final dry matter concentration of inoculum used in the Respicond® and standard test flasks was 29.5 ± 0.5 mg L^{-1}.

Immediately prior to the start of the Respicond test, 1.5 mL of the microbial inoculum described above (2.95 g of dry matter L^{-1}) was added to each flask.

Operating conditions for the standard 301 B tests were the same as those used for the screening tests carried out with the Respicond VI®, except that the amounts were adjusted to 1 L of test solution instead of 150 mL.

Positive controls were prepared with sodium acetate at 20 mg of carbon L^{-1} as the reference substance. Blanks were prepared with the microbial inoculum only. All tests were performed at 21.0 ± 0.2 °C.

Operating conditions

Each BIM was compared to the reference method result (direct addition of the tested substance to the inoculum) of the same test to avoid inherent variability due to the inoculum, which was sampled in a wastewater treatment plant (Nyholm 1990; Van Ginkel et al. 1995; Thouand et al. 1996; Goodhead et al. 2013).

For the screening tests, the direct addition method was performed by adding 3.7 mg of anthraquinone or 4.0 mg of isodecyl neopentanoate to 148.5 mL of mineral medium in order to obtain a final concentration of 20 mg carbon per liter.

Ultrasonic dispersion was conducted in the same way as direct addition, except that the solution was dispersed for 10 min with the ultrasonic bath at 35 kHz immediately prior to adding the inoculum.

As described in the NF EN ISO 10634 standard (ISO 1995), 150 mg of anthraquinone was adsorbed onto 30 g of silica gel with 150 mg of acetone. The amount of anthraquinone adsorbed onto the silica gel was measured three times with a solid total organic carbon analyzer; the concentration of anthraquinone was 4 mg carbon per gram of silica gel. Thus, 750 mg of silica gel with adsorbed anthraquinone was added to 148.5 mL of mineral medium in each test flask.

In order to adsorb isodecyl neopentanoate onto silica gel, 750 mg of silica gel was mixed for 5 min with 4.0 mg of isodecyl neopentanoate. This mixture was added under magnetic stirring at 250 rpm to 147 mL of mineral medium. Another test solution was prepared with 8.0 mg of silica gel.

An emulsion was made with an emulsifier by mixing 50 mL of Pluronic 9400® at 1 g L^{-1} into a mineral medium with 124 mg of anthraquinone or 134 mg of isodecyl neopentanoate, using an IKA® mixer at 500 rpm for 10 min at room temperature. Of this mixture, 1.5 mL was homogenized with 147 mL of mineral medium.

A silicone oil dispersion was prepared in an Eppendorf® tube by mixing 50 mL of silicone oil with 124 mg of anthraquinone or 134 mg of isodecyl neopentanoate. Of this mixture, 1.5 mL was homogenized with 147 mL of mineral medium to obtain a silicone oil dispersion with a final concentration of 10 mL L^{-1} and 150 μL of this mixture was homogenized with 148.35 mL of mineral medium to obtain a silicone oil dispersion with a final concentration of 1 mL L^{-1}.

The mixture of Pluronic PE9400® and silicone oil was prepared with 50 mL of Pluronic 9400® at 1 g L^{-1} in mineral medium and 124 mg of anthraquinone or 134 mg of isodecyl neopentanoate. Of this mixture, 1.5 mL was homogenized with 145.5 mL of mineral medium and 1.5 mL of silicone oil.

The operating conditions are summarized in the Table 1.

Exploitation of results

Statistical analysis

For screening tests with Respicond VI®, five replicates per test solution and control, and ten replicates per blank, were confirmed to be statistically adequate for experimental biodegradation tests. The median value of the five replicates was calculated for each day and was chosen as the biodegradation value because it is more robust than the mean value of outliers (Falissard 2005). Consequently, it was not appropriate to determine the standard deviation for the Respicond biodegradation results. Therefore, all test results (Respicond with five replicates and standard with two replicates) were evaluated with the median value of the replicates and the median absolute deviation—MAD (1)—as the variability indicator (Wonnacott and Wonnacott 1995), which is less affected by extreme values for results with few replicates.

$$\mathrm{MAD} = \mathrm{median}\left(\left|x_i - \tilde{x}\right|\right) \quad (1)$$

with

x_i Result value of the group
$\tilde{x}$ Median value of the group

The validity criteria were the same as described in Test Guideline OECD 301 B (OECD 1992), but the use of five replicates instead of two gave rise to an additional validity criterion. The difference between the median value and each replicate value was calculated. The validity criterion was defined by this difference, which was not to exceed 15 % biodegradation for three specific days: the beginning of the 10-dw, the end of the 10-dw, and the end of the test (D28). When at least four out of five replicate values complied with this validity criterion, the test was considered valid.

Determination of a BIM classification index

OECD biodegradability test results are usually described by two main parameters (Fig. 1): (i) the biodegradation percentage at the end of the 10-dw (Biod10d) and (ii) the biodegradation percentage at the end of the test at day 28 (BiodF). A BIM was considered favorable when the 10-dw began earlier in comparison with direct addition during the 28 days of testing. We calculated a third parameter (iii), the percentage of time available for the bacteria to biodegrade the product over 28 days (T_B) (2).

$$T_B = \frac{(28 - \mathrm{FD})}{28} \times 100 \quad (2)$$

with

FD First day when 10 % biodegradation is reached

We considered that these three parameters had the same weight in quantifying the progression of biodegradation during the 28 days of the test. We defined a quantification coefficient, C_{BIM} (3), which allows the results obtained using the different BIMs to being compared (Fig. 1).

$$C_{BIM} = \frac{(T_B + \mathrm{Biod10d} + \mathrm{BiodF})}{3} \quad (3)$$

with

T_B Percentage of time available for biodegradation
Biod10d Percentage of biodegradation at the end of the 10-dw
BiodF Percentage of biodegradation at day 28

When the10-dw began after day 18, the result at D28 was used as the result for the end of the 10-dw.

A coefficient was also calculated for the direct addition method (C_{DA}) and was used as a reference value for each test. In order to compare the BIM results with the direct addition results, we defined a BIM classification index (R_{BIM}) as the ratio $C_{BIM}/C_{DA\ median}$. C_{BIM} and C_{DA} were determined from the median biodegradation values obtained with each BIM and direct addition. The different C_{BIM}/C_{DA} median ratios were statistically compared to the direct addition ratio RDACDA/CDA median = 1. Three BIM classes were defined as follows:

- Class 1: favorable BIM, with $R_{BIM} > 1 + \mathrm{MAD}$ of R_{DA}
- Class 2: neutral BIM, with $1 - \mathrm{MAD}$ of $R_{DA} \leq R_{BIM} \leq 1 + \mathrm{MAD}$ of R_{DA}
- Class 3: unfavorable BIM, with $R_{BIM} < 1 - \mathrm{MAD}$ of R_{DA}

Table 1 Bioavailability improvement methods used, with their type and mode of action

BIM	Type of action	Mode of action
Ultrasonic dispersion	Physical dispersion	Ultrasonic dispersion
Silicon oil	Chemical emulsion	Emulsion with mechanical dispersion
Surfactant	Chemical emulsion	Emulsion with mechanical dispersion
Surfactant + silicon oil	Chemical emulsion	Emulsion with mechanical dispersion
Silica gel	Physical dispersion	Inert solid support with magnetic stirring dispersion

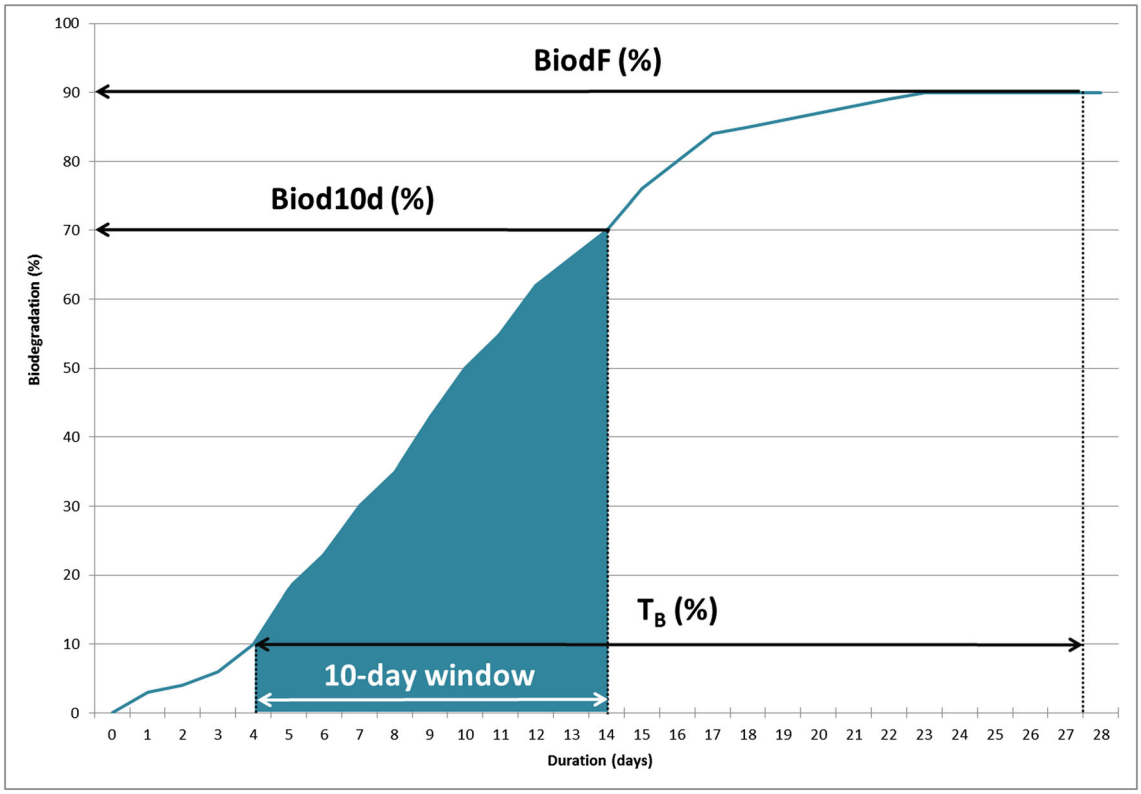


Fig. 1 Example of ready biodegradation test curve with parameters T_B, Biod10d, and BiodF identified

Results

Screening of the BIMs for the two substances: level 1

Anthraquinone

The biodegradation of anthraquinone without BIM gave a classical sigmoid curve reaching an ultimate biodegradation percentage of 49 % (Fig. 2). Ultrasonic dispersion, dispersion with silicone oil, and emulsion with an emulsifier (Pluronic 9400®) and silicone oil resulted in an improved final biodegradation rate without necessarily accelerating the start of biodegradation. Emulsion with the emulsifier Pluronic PE9400® did not improve the final biodegradation result. When using acetone to adsorb anthraquinone onto silica gel, the residual carbon content due to non-evaporated solvent affected the test result. Moreover, the final result obtained with this BIM showed no improvement in the biodegradation of anthraquinone. The two BIMs "emulsion with Pluronic PE9400®" and "adsorption onto silica gel" also gave similar biodegradation curves compared to the direct addition method.

Isodecyl neopentanoate

Biodegradation of isodecyl neopentanoate under direct addition conditions gave a linear profile and reached a final biodegradation percentage of 36 % (Fig. 3a). Ultrasonic dispersion gave a slightly better final biodegradation result of 40 %. Other BIMs (Fig. 3a) failed to provide evidence of improved final biodegradability results. Surprisingly, dispersion with Pluronic 9400® gave lower biodegradation results (16 %) than the direct addition method. Likewise, a high concentration of 10 mL silicone oil L^{-1} gave very low biodegradation at D28 (8 %). In spite of this, the combination of Pluronic 9400® and silicone oil at 10 mL L^{-1} gave a more favorable final result (26 %) than Pluronic 9400® and silicone oil at 10 mL L^{-1} tested separately, although this was less favorable than the final result by direct addition of isodecyl neopentanoate.

Based on these results, it seemed worthwhile to verify the impact of the concentration of oil and silica gel added in the test vessels. Therefore, a second screening test was performed (Fig. 3b) with lower additive concentrations for adsorption onto silica gel, dispersion with silicone oil, and dispersion with Pluronic PE9400® and silicone oil. In this second test, the biodegradation of isodecyl neopentanoate under direct addition conditions reached a final percentage of 48 % (Fig. 3b) as compared to 36 % for the first test, although the 10-dw began 2 days later. The addition of 1 mL L^{-1} of silicone oil led to a more favorable final result (33 %) than with 10 mL L^{-1} (8 %). For adsorption onto silica gel at 0.05 g L^{-1}, the final biodegradation result was slightly better

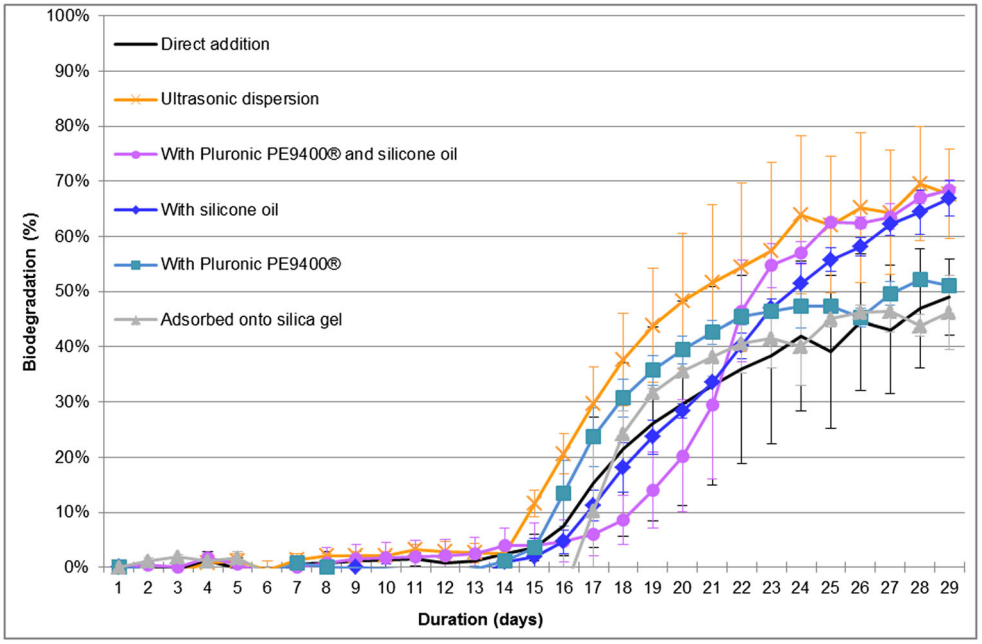


Fig. 2 Anthraquinone biodegradation screening test results. Anthraquinone at 20 mg carbon L^{-1} and inoculum at 30 mg dry matter L^{-1}. *Curves* represent the median value of five replicates per test condition. *Error bars* represent the median absolute deviation. Operating conditions with anthraquinone: ultrasonic dispersion for 10 min at 35 kHz, silica gel at 5 g L^{-1}, dispersed with 10 mL silicone oil L^{-1}, dispersed with 10 mg Pluronic 9400® L^{-1}, and dispersed with 10 mg Pluronic 9400® L^{-1} and 10 mL silicone oil L^{-1}

than at 5 g L^{-1} (36 and 33 %, respectively). For dispersion with Pluronic PE9400® and silicone oil, the 1 and 10 mL L^{-1} concentrations of silicone oil gave the same final result (25 %).

Comparison

These experiments revealed three class 1 BIMs improving the biodegradability of anthraquinone, i.e., ultrasonic dispersion, dispersion with silicone oil, and dispersion with Pluronic PE9400® and silicone oil. The potential of these three BIMs had to be confirmed by standard tests. Two class 2 BIMs were identified with anthraquinone, i.e., adsorption onto silica gel and dispersion with Pluronic 9400®.

For isodecyl neopentanoate, no class 1 BIM was found. In the absence of a favorable BIM, the two class 2 BIMs identified in the screening tests (ultrasonic dispersion and adsorption onto silica gel) were assessed using standard tests. All dispersions with silicone oil, Pluronic PE9400®, and with Pluronic PE9400® and silicone oil were class 3 BIMs.

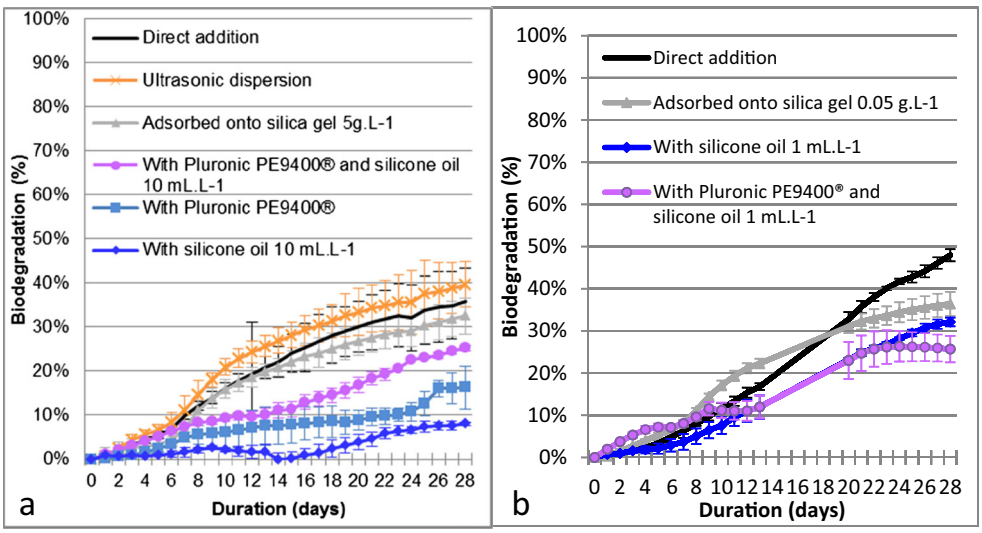


Fig. 3 Isodecyl neopentanoate: first screening biodegradation test. Isodecyl neopentanoate at 20 mg carbon L^{-1} and inoculum at 30 mg dry matter L^{-1}. *Curves* represent the median value of five replicates per test condition. *Error bars* represent the median absolute deviation. **a** Operating conditions with isodecyl neopentanoate: ultrasonic dispersion for 10 min at 35 kHz, adsorbed onto silica gel at 5 g L^{-1}, dispersed with 10 mL silicone oil L^{-1}, dispersed with 10 mg Pluronic 9400® L^{-1}, and dispersed with 10 mg Pluronic 9400® L^{-1} and 10 mL silicone oil L^{-1}. **b** Operating conditions with isodecyl neopentanoate: adsorbed onto silica gel at 0.05 g L^{-1}, dispersed with 10 mL silicone oil L^{-1}, and dispersed with 10 mg Pluronic 9400® L^{-1} and 10 mL silicone oil L^{-1}. CO_2 consumption was not recorded for days 14 to 19

Confirmation of BIMs of interest by standard tests: level 2

Ultrasonic dispersion, dispersion with silicone oil, and dispersion with an emulsifier and silicone oil gave final biodegradation levels ≥60 % within the 10-dw and improved biodegradation in standard tests for anthraquinone (Fig. 4a). These results confirmed those from the screening tests.

For technical reasons, the two selected BIMs for isodecyl neopentanoate (adsorption onto silica gel and ultrasonic dispersion) could not be performed simultaneously in the same test. These BIMs were therefore assessed in two different tests (tests 1 and 2). However, direct addition of the test substance gave a biodegradation curve showing the same lag phase and linear profile for both tests (Fig. 4b). This biodegradation profile was also similar to that resulting from direct addition in the screening tests. These two BIMs improved the biodegradation of isodecyl neopentanoate and were confirmed as favorable BIMs.

Based upon these experiments, ultrasonic dispersion, dispersion with silicone oil, or dispersion with an emulsifier and silicone oil improved the biodegradation levels of anthraquinone in standard tests and confirmed the results of screening tests. Ultrasonic dispersion and adsorption onto silica gel improved the biodegradation results of isodecyl neopentanoate in the standard tests, allowing it to rise from borderline class 2 (neutral BIM) to class 1 (favorable BIM).

Discussion

Respicond VI® allows conclusions to be drawn as to the benefits of a BIM in screening ultimate biodegradation tests, especially when the result is clearly favorable or unfavorable for the test substance. The test volume of Respicond® is relatively low (150 mL) but remains compatible with the majority of biodegradation tests (Ingerslev et al. 2000). This test volume may lead to an underestimation of the results due to the lower representativeness of bacterial inoculum sampling, with 4.425 mg of dry matter for 150 mL as compared to 29.5 mg for a test volume of 1 L (Blok and Booy 1984).

The standard ready biodegradability tests confirmed the class 1 (favorable) status of the anthraquinone BIMs. For isodecyl neopentanoate, the two BIMs, previously defined as class 2 (neutral) by the screening test, were found to be class 1 (favorable) in the standard ready biodegradabilty tests, as there was an improvement in biodegradation.

Anthraquinone obtains the status of "readily biodegradable," but no BIMs allow this status to be confirmed for isodecyl neopentanoate. Isodecyl neopentanoate is an ester that can potentially undergo rapid cleavage, by means of abiotic and biotic mechanisms, into alcohol and an acid. In the absence of analytical monitoring, it is very difficult to conclude whether or not ultimate degradation is actually achieved. The curves obtained do not appear to reach true plateaus after 28 days of incubation. Further tests could be performed over a longer period of time in order to verify the biodegradation potential of isodecyl neopentanoate.

In our evaluation strategy, screening tests could therefore be used as a first-tier test to select class 1 (favorable) BIMs and/or exclude class 3 (unfavorable) BIMs (Table 2).

Since it takes into account three parameters—the start of biodegradation and the percentages of biodegradation at the end of the 10-dw and at the end of the test—the R_{BIM} ratio was relevant for defining the impact of BIMs upon biodegradation. Comparison with the reference condition—direct addition—in the same series of experiments made it possible to overcome the variability of the inoculum. The R_{BIM} ratio proved to be a good way to compare the impact of sample preparation methods on biodegradation results.

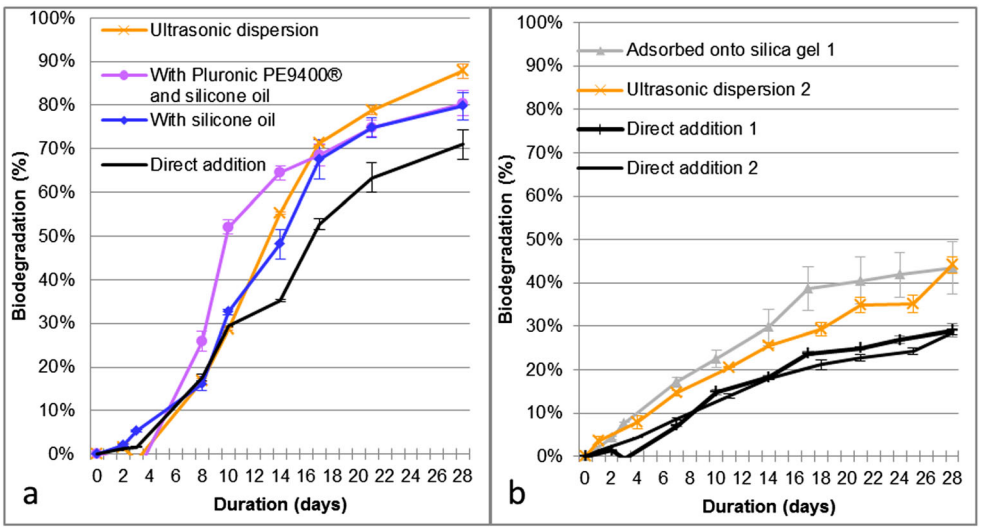


Fig. 4 Standard biodegradation tests. *Curves* represent the median value of two replicates per test condition. *Error bars* represent the median absolute deviation. **a** Operating conditions with anthraquinone: direct addition, ultrasonic dispersion for 10 min at 35 kHz, dispersion with silicone oil at 10 mL L^{-1}, and dispersion with 10 mg Pluronic 9400® L^{-1} and 10 mL silicone oil L^{-1}. **b** Operating conditions with isodecyl neopentanoate: direct addition, ultrasonic dispersion for 10 min at 35 kHz, and adsorption onto silica gel at 0.05 g L^{-1}

Table 2 Global test strategy for tier 1 and tier 2 results (A: results for anthraquinone, B: results for isodecyl neopentanoate)

BIM		Tier 1—screening test		Tier 2—standard test	
		R_{BIM}	Class	R_{BIM}	Class
A	Ultrasonic dispersion	1.29	1	1.18	1
	Silica gel	1.02	2	–	
	Silicone oil 10 mL L^{-1}	1.19	1	1.11	1
	Pluronic PE9400®	0.99	2	–	
	Pluronic PE9400® and silicone oil	1.28	1	1.19	1
B	Ultrasonic dispersion	1.06	2	1.21	1
	Silica gel 5000 mg L^{-1}	0.96	2	–	
	Silica gel 50 mg L^{-1}	0.94	2	1.27	1
	Silicone oil 10 mL L^{-1}	0.12	3	–	
	Silicone oil 1 mL L^{-1}	0.80	3	–	
	Pluronic PE9400®	0.45	3	–	
	Pluronic PE9400® and silicone oil 10 mL L^{-1}	0.75	3	–	
	Pluronic PE9400® and silicone oil 1 mL L^{-1}	0.76	3	–	

Class 1: favorable BIM, class 2: neutral BIM, class 3: unfavorable BIM

Poorly water-soluble ionic substances involve interactions depending on pH (ionization forms) and salts (solubility), but we cannot rule out potential interference for hydrolysis products in the case of the liquid model compound. For this study, we focused on non-ionic substances to avoid these interactions. Ultrasonic dispersion is an interesting BIM for solid and liquid substances. Unlike the results obtained by Nyholm 1990, ultrasonic dispersion gave better results than the direct addition method for anthraquinone (R_{BIM} = 1.18) and for isodecyl neopentanoate (R_{BIM} = 1.21).

The silica gel BIM requires a solvent for the solid chemical to being adsorbed onto silica particles. Identifying the appropriate solvent for each test substance is tedious because this solvent should be either completely removed or not readily biodegradable and non-toxic to bacteria and must not be harmful to human health. When acetone was used to adsorb anthraquinone onto the silica gel, the residual carbon content due to the unevaporated solvent affected the test results. The presence of the solvent led to a high variability of results for this BIM (De Morsier et al. 1987; Nyholm 1990 and Handley et al. 2002). The amount of silica gel added to the test solution depends on the adsorption potential of the substance to the gel and cannot be standardized. This method, associated with the use of a biodegradable solvent (acetone), does not seem appropriate to the evaluation of the ready biodegradability of a solid substance. For liquid chemicals, the amount of silica gel must be defined. It would appear worthwhile to work on adsorbing a hydrophobic substance to silica gel at various rates and evaluating the two sizes of silica gel (15 and 200–500 μm) proposed in the ISO Test Guideline (ISO 1995). This support is inert, is non-toxic to bacteria, and does not constitute a carbon source for the biodegradation test. This method is easily usable for liquid substances, and the standard biodegradability test result obtained for isodecyl neopentanoate with a R_{BIM} = 1.27 makes this an attractive option.

The concentration of emulsifier was chosen according to ISO guideline (ISO 1995). The tests performed did not aim to establish the optimal concentration at which the test substance can be properly dispersed without the formation of micelles. A high emulsifier concentration appears to reduce the availability of the test substance to the bacteria. This phenomenon was highlighted in the biodegradability tests with the liquid substance, the results obtained with the emulsifier being worse than those obtained by direct addition. This negative effect was probably due to the limited bioavailability of the substrate trapped in surfactant micelles (Rodrigues et al. 2013). In addition, micelles could have reduced oxygen diffusion that might have impaired bacterial respiration. Increased and decreased biodegradation rates in the presence of surfactants were reported by Volkering et al. 1997. The emulsifier should preferably be non-biodegradable, e.g., Pluronic 9400® (data specified in the supplementary material). If it is biodegradable, an additional control must be included and the presence of the biodegradable emulsifier should not jeopardize the accuracy of the test. The emulsifier must be non-toxic to bacteria, appropriate to the test substance, and added at an optimized concentration. It would therefore appear difficult to apply this BIM to a large number of substances.

Silicone oil AR20® (polydimethylsiloxane) is promising because of its affinity for hydrophobic substances while being non-biodegradable and non-toxic (data specified in the supplementary material). A promising screening test result—with R_{BIM} = 1.19 for the solid chemical anthraquinone—was confirmed by the standard ready biodegradability test results, with R_{BIM} = 1.11. For the liquid chemical isodecyl neopentanoate, the results for silicone oil were better results at the lowest of the two concentrations tested (1 and 10 mL L^{-1}). This result

could be attributed to the exceedingly high concentration of silicone oil, which may have trapped the test substance, thereby reducing its availability to the bacteria. When the BIM consisted of mixing with silicone oil and an emulsifier, biodegradation results for the solid substance were significantly improved (R_{BIM} of 1.28 and confirmed at 1.19). The formation of surfactant micelles due to a high emulsifier concentration probably reduced bioavailability. Emulsifiers still have some drawbacks such as specific critical micellar concentration (CMC) and specific affinities for each chemical. Optimizing the emulsifier concentration for this BIM could be useful if the performance of the test is significantly better than with silicone oil alone.

BIM optimization requires adjusted concentrations for each test substance while taking into account the emulsifier CMC. Other adjuvants could also be used, such as 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (Auffret et al. 2009), which has interesting characteristics, i.e., non-biodegradable, non-toxic to bacteria, and good solubilizing capacity.

Ultrasonic dispersion improves the biodegradability results of solid chemicals and could be combined with other supports. For example, combination with silicone oil or silica gel could be of interest for both solid and liquid substances.

Conclusion and perspectives

The use, under defined operating conditions, of a high-throughput screening respirometer, which has been proven capable of producing robust results (Sweetlove et al. 2013), made it possible to reliably compare up to nine different BIMs in a single run. The categorization of BIMs into three classes allowed BIMs to be selected for improving the rate of biodegradation of poorly water-soluble chemicals in ready biodegradability tests.

An evaluation strategy was developed for choosing the most appropriate BIM(s) for the assessment of the ready biodegradability potential of poorly water-soluble chemicals in standard tests (Fig. 5).

The R_{BIM} ratio makes it possible to compare the different test substance preparation methods and operating conditions used in the various tests. Since this ratio takes into account both the biodegradation curve and the results of direct addition, it is therefore possible to compare and contrast the results of the different tests. This makes it easier to assess the impact of the BIMs on the chemical's biodegradation.

BIMs of interest differ for the solid and the liquid reference substances used in this study. Enhanced biodegradation results were obtained for the solid substance anthraquinone with the following BIMs: ultrasonic dispersion, silicone oil, and the combination of an emulsifier and silicone oil. In contrast, the results for the liquid substance isodecyl neopentanoate were improved by using ultrasonic dispersion and adsorption onto silica gel. The BIMs featured showed anthraquinone to be consistently readily biodegradable. However, none of the tested BIMs enabled isodecyl neopentanoate to meet the criteria for ready biodegradability.

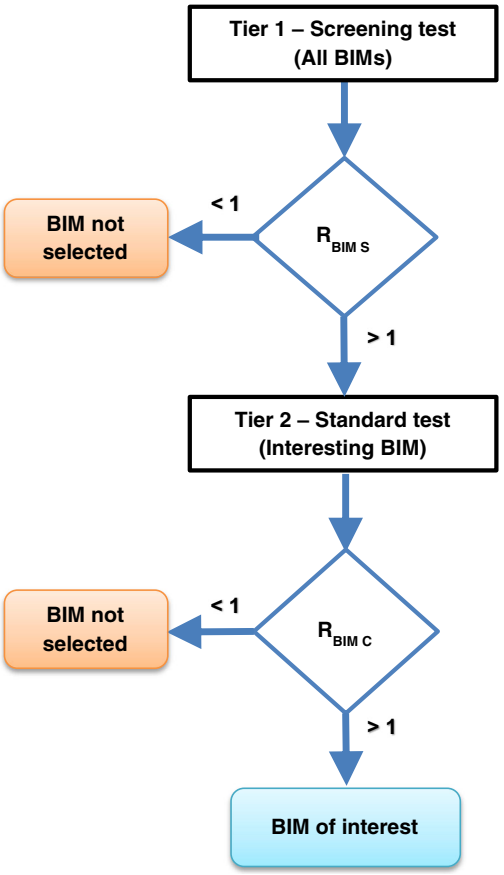


Fig. 5 Test methodology. $R_{BIM\ S}$ screening BIM, $R_{BIM\ C}$ confirmatory BIM

Future work will focus on the optimization of these BIMs and on the comparison with new BIMs. In order to facilitate the comparison between different BIMs, future work will also focus on reducing the variability of the metabolizing capacity of the microbial inoculum. Furthermore, additional chemicals will be evaluated to improve the proposed strategy and consolidate the results obtained for the liquid and solid chemicals.

Acknowledgments The authors would like to express their thanks to Christian Gancet for his scientific help, Marie Thomas for her help with the statistics, and Laurent Colombe and Marc Léonard for their help in writing this article.

Glossary

BIM	Bioavailability improvement method
DOC	Dissolved organic carbon is the organic carbon present in solution or that which passes through a 0.45-μm filter or remains in the supernatant after centrifuging at

	approx. 4000*g* (about 40.000 m s^{-2}) for 15 min (OECD 1992)
MAD	The median absolute deviation is a variability indicator, used for median values
FD	First day when 10 % biodegradation is reached
10-dw—ten-day window	The pass values of the biodegradation test (60 % for OECD 301B) have to be reached in a 10-day window and within the 28-day period of the test. The 10-day window begins when the degree of biodegradation has reached 10 % DOC, ThOD, or $ThCO_2$ and must end before day 28 of the test (OECD 1992)
T_B	Percentage of the test duration required by the inoculum for the biodegradation process
$ThCO_2$	Theoretical carbon dioxide (mg) is the quantity of carbon dioxide calculated to be produced from the known or measured carbon content of the test compound when fully mineralized, also expressed as milligram carbon dioxide evolved per milligram test compound (OECD 1992)
ThOD	Theoretical oxygen demand (mg) is the total amount of oxygen required to oxidize a chemical completely; it is calculated from the molecular formula and is also expressed as milligram oxygen required per milligram test compound (OECD 1992)
Biod10dw	Biodegradation percentage at the end of the 10-dw
BiodF	Biodegradation percentage at day 28 of incubation
C_{BIM}	Quantification coefficient allowing results obtained with the different BIMs to being compared
C_{DA}	Quantification coefficient for the direct addition method. Used as a reference value for each test
R_{BIM}	Ratio $C_{BIM}/C_{DA\ median}$. BIM classification index relative to direct addition. $R_{BIM\ S}$ screening *BIM*, $R_{BIM\ C}$: confirmatory BIM
R_{DA}	Ratio $C_{DA}/C_{DA\ median}$ for direct addition. Calculated for each replicate of the direct addition results

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

Alexander M (1999) Biodegradation and bioremediation. Acad Press Inc

Auffret M, Labbé D, Thouand G, Greer CW, Fayolle-Guichard F (2009) Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by Rhodococcus aetherivorans and Rhodococcus wratislaviensis. Appl Environ Microbiol 75(24):7774–7782

Blok J, Booy M (1984) Biodegradability test results related to quality and quantity of the inoculum. Ecotoxicol Environ Saf 8:410–422

Blok J, De Morsier A, Gerike P, Reynolds L, Wellens H (1985) Harmonisation of ready biodegradability tests. Chemosphere 14(ll/12):1805–1820

Borstlap C, Kooijman PL (1963) A study of the biodegradation of anionic synthetic detergents a new laboratory test. J Am Oil Chem Soc 40:78–80

Comber M, Holt M (2010) Developing a set of reference chemicals for use in biodegradability tests for assessing the persistency of chemicals. CEFIC. MCC report: MCC/007

De Morsier A, Blok J, Gerike P, Reynolds L, Wellens H, Bontinck WJ (1987) Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere 16(4):833–847

Dimitrov S, Pavlov T, Veith G, Mekenyan O (2011a) Simulation of chemical metabolism for fate and hazard assessment. I. Approach for simulating metabolism, SAR and QSAR in Environmental Research, DOI:10.1080/1062936X.2011.623323

Dimitrov S, Pavlov T, Dimitrova N, Georgieva D, Nedelcheva D, Kesova A, Valilev R, Mekenyan O (2011b) Simulation of chemical metabolism for fate and hazard assessment. II CATALOGIC simulation of abiotic and microbial degradation, SAR and QSAR in Environmental Research, DOI: 10.1080/1062936X.2011.623322

Dumont E, Andrès Y, Le Cloirec P (2006) Mass transfer coefficients of styrene and oxygen into silicone oil emulsions in a bubble reactor. Chem Eng Sci 61:5612–5619

ECHA (2006) The European parliament and the council of the European Union, directive 2006/121/EC of the European parliament and of the council of 18 December 2006 amending council directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances in order to adapt it to Regulation (EC) No 1907/2006 concerning the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH) and establishing a European chemicals agency

ECHA (2014) The European Chemicals Agency. Guidance on information requirements and chemical safety assessment, chapter R7b: endpoint specific guidance v2.0

European parliament (2008) REGULATION (EC) No 1272/2008 of the European parliament and of the council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006

Falissard B (2005) Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie. Masson

Gerike P (1984) The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere 13(1):169–190

Goodhead AK, Head IM, Snape JR, Davenport RJ (2013) Standard inocula preparations reduce the bacterial diversity and reliability of regulatory biodegradation tests. Environ Sci Pollut Res 21:9511–9521

Handley JW, Mead C, Rausina GA, Waid LJ, Gee JC, Herron SJ (2002) The use of inert carriers in regulatory biodegradation tests of low density poorly water-soluble substances. Chemosphere 48:529–534

Ingerslev F, Toräng L, Nyholm N (2000) Importance of the test volume on the lag phase in biodegradation studies. Environ Toxicol Chem 19(10):2443–2447

ISO (1995) ISO EN standard 10634: 1995—Qualité de l'eau—Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux (ISO 10634: 1995)

Kowalczyk A, Martin TJ, Price OR, Snape JR, van Egmond RA, Finnegan CJ, Schäfer H, Davenport RJ, Bending GD (2015) Refinement of biodegradation tests methodologies and the proposed utility of new microbial ecology techniques. Ecotoxicol Environ Saf 111:9–22

Li JL, Chen BH (2009) Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Materials 2:76–94

Nordgren A (1988) Apparatus for the continuous, long-term monitoring of soil respiration rate in large numbers of samples. Soil Biol Biochem 20(6):955–957

Nyholm N (1990) Biodegradability testing of poorly soluble compounds by means of manometric respirometry. Chemosphere 21(12):1477–1487

OECD (1992) OECD guideline for testing of chemicals—ready biodegradability 301, adopted by the council on 17th July 1992, OECD

Painter HA (1995) OECD series on the test guidelines program number 2, detailed review paper on biodegradability testing, environment monograph n° 98, OECD

Ramade F (1992) Précis d'écotoxicologie. Masson

Rodrigues A, Nogueira R, Melo LF, Brito AG (2013) Effect of low concentrations of synthetic surfactants on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) biodegradation. Int Biodeterior Biodegrad 83: 48–55

Stucki G, Alexander M (1987) Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. Appl Environ Microbiol 53(2):292–297

Sweetlove C, Chenèble JC, Barthel Y, Auchet C, Boualam M, L'Haridon J (2013). Comparison of different methods for improving the bioavailability of two organic chemicals to determine their ready biodegradability (poster). SETAC EUROPE, 23rd annual meeting, Glasgow, UK

Thomas JM, Yordy JR, Amador JA, Alexander M (1986) Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. Appl Environ Microbiol 52(2):290–296

Thouand G, Friant P, Bois F, Cartier A, Maul A, Block JC (1995) Bacterial inoculum density and probability of para-nitrophenol biodegradability test response. Ecotoxicol Environ Saf 30:274–282

Thouand G, Capdeville B, Block JC (1996) Preadapted inocula for limiting the risk of errors in biodegradability tests. Ecotoxicol Environ Saf 33:261–267

Van Ginkel CG, Haan A, Luuten MLGC, Stroo CA (1995) Influence of the size and source of the inoculum on biodegradation curves in closed-bottle tests. Ecotoxicol Environ Saf 31:218–223

Van Ginkel CG, Gancet C, Hirschen M, Galobardes M, Lemaire P, Rosenblom J (2008) Improving ready biodegradability testing of fatty amine derivatives. Chemosphere 73:506–510

Volkering F, Breure AM, Rulkens WH (1997) Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation 8: 401–417

Wonnacott TH, Wonnacott RJ (1995) Statistique. Economica, 4th edition

3.2. Validation de la stratégie sur les 2 substances modèles MGZ et IN

Afin d'éprouver la stratégie sur un nombre plus important de méthodes, les 10 MAB les plus pertinentes, déjà décrites dans la littérature, ont été testées sur nos deux substances modèles. Pour l'ensemble des essais, une analyse des résultats des témoins et des essais par addition directe a été réalisée (Annexe XIII p.199). La variabilité des essais étant un paramètre non prédictible, chaque MAB a été testée au moins deux fois sur les deux substances modèles pour un total de 70 conditions par substance avec de la boue activée comme inoculum. Les résultats ayant obtenus le meilleur score R_{MAB} pour chaque méthode sont présentés dans le tableau 24 et ont permis d'identifier les MAB d'intérêt à confirmer par un essai standard.

Tableau 24 : Résultats des tests de criblage (Respicond VI®) réalisés sur MGZ et IN avec des méthodes améliorant la biodisponibilité déjà décrites

MAB	MGZ				IN			
	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
Huile de silicone à 10 mL.L^{-1} (SM)	**Non réalisée**				28	8	8	**0,12**
Huile de silicone à 1 mL.L^{-1} (SM)	**Non réalisée**				11	25	32	**0,8**
Huile de silicone à 1 mL.L^{-1}	17	22	23	**7,17**	6	34	48	**1,04**
Huile minérale (HMN) à 10 mg.L^{-1}	6	35	54	**1,10**	6	36	52	**1,22**
Tensioactif à 10 mg.L^{-1}	6	43	57	**1,14**	4	21	28	**1,03**
Polymère (acide humique) à 10 mg.L^{-1}	12	22	27	**8,84**	9	21	28	**0,85**
Broyage	7	28	44	**1,00**	**Non applicable**			
Traitement aux ultrasons 10 min	9	17	22	**1,60**	4	32	42	**1,36**
Pesée sur filtre en fibre de verre	**Non applicable**				6	26	36	**1,02**
Gel de silice à 50 mg.L^{-1}	9	25	35	**1,23**	4	32	51	**1,30**

Code couleur associé au classement selon la note statistique (Nst) obtenue :

Très favorable	Favorable	Neutre	Défavorable	Très défavorable

Début f10j : 1er jour de démarrage de l'intervalle de 10 jours (j) ; F10j : Taux de biodégradabilité à la fin de l'intervalle des 10 jours (%) ; 28j : Taux de biodégradabilité à la fin du test (en %).

Excepté le broyage du MGZ qui n'a pas d'impact, les 6 autres MAB sélectionnées ont amélioré la biodégradabilité du MGZ avec des R_{MAB} associés supérieurs à 1. Deux résultats de biodégradabilité en fin d'essai se sont approchés du seuil de biodégradabilité facile (60% à 28 jours) avec 54% pour l'association avec une huile minérale et 57% avec la dispersion associée à un tensioactif. Ces 6 MAB pertinentes ont donc été retenues pour un test de confirmation. Pour l'IN, 5 MAB sur les 9 ont permis une amélioration significative de la biodégradabilité avec les meilleurs résultats à 28 jours obtenus pour les associations avec de l'huile minérale (52%) et avec le gel de silice (51%). Ces 5 MAB ont été retenues pour un test de confirmation. L'acide humique, dont l'association avec l'IN a conduit à un résultat défavorable, a été utilisé comme référence négative pour le test de confirmation et a aussi permis d'évaluer le pouvoir discriminant du test de criblage sur Respicond VI®.

Les essais standards ont été réalisés une ou deux fois pour chaque MAB. Les résultats présentant les R_{MAB} les plus élevés pour chaque MAB sont présentés dans le tableau 25. Les essais de confirmation étant réalisés avec un nombre de répliques très faible (2), les statistiques restreignent la classification des résultats en 3 catégories (favorable, neutre et défavorable). Les résultats obtenus confirment les résultats des essais de criblage avec, pour toutes les MAB d'intérêt testées (association avec huile de silicone, huile minérale, tensioactif, gel de silice, traitement aux ultrasons et l'acide humique pour MGZ), une amélioration de la biodégradabilité pour MGZ et IN. Les meilleurs résultats de biodégradabilité des tests de confirmation sont de 39% pour le MGZ avec le tensio-actif et 46% pour l'IN avec l'huile minérale. L'acide humique a également été confirmé comme ayant un impact négatif sur la biodégradabilité d'IN.

L'approche utilisée montre qu'un choix arbitraire de méthode pour une substance donnée peut, comme pour l'utilisation de l'acide humique avec la substance IN, aboutir à un résultat défavorable entrainant soit la réévaluation de la substance avec une ou plusieurs autres méthodes sans moyen de comparaison soit un résultat attribué obtenu dans des conditions défavorables. Ces résultats confirment la validité de la stratégie proposée dans la publication avec un pouvoir discriminant des MAB les plus adaptées lors de la première étape de test et une confirmation des résultats de biodégradabilité obtenus dans des conditions optimisées de biodisponibilité de la substance.

Tableau 25 : Résultats des tests de confirmation (OCDE 301B) réalisés sur MGZ et IN avec des méthodes améliorant la biodisponibilité déjà décrites

MAB	MGZ				IN			
	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
Huile de silicone à 1 mL.L^{-1}	6	26	36	**1,18**	7	33	44	**1,19**
Huile minérale (HMN) à 10 mg.L^{-1}	3	23	37	**1,26**	3	36	46	**1,34**
Tensioactif à 10 mg.L^{-1}	6	18	39	**1,18**	7	33	41	**1,07**
Polymère (acide humique) à 10 mg.L^{-1}	4	26	33	**1,33**	4	23	36	**0,99**
Traitement aux ultrasons 10 min.	6	27	34	**1,18**	4	26	44	**1,21**
Gel de silice à 50 mg.L^{-1}	7	22	30	**1,12**	3	30	44	**1,27**

Code couleur associé au classement selon la note statistique (Nst) obtenue :

Favorable	Neutre	Défavorable

Début f10j : 1er jour de démarrage de l'intervalle de 10 jours (j) ; F10j : Taux de biodégradabilité à la fin de l'intervalle des 10 jours (%) ; 28j : Taux de biodégradabilité à la fin du test (en %).

La stratégie détaillée dans la publication détaillée p.93 à p.106 (Sweetlove et al., 2016) est donc validée. Les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité ont permis d'augmenter le résultat de biodégradabilité de 24% à 37% pour le MGZ et de 29% à 46% pour l'IN par rapport à la méthode par addition directe. Cependant, aucune de ces MAB déjà décrites dans la littérature n'a permis d'atteindre le seuil de 60% de biodégradabilité en fin de test pour les deux substances modèles. En conséquence, nous avons investigué également des MAB novatrices.

4. Méthodes exploratoires susceptibles d'améliorer la biodisponibilité

Actuellement, il existe une vingtaine de méthodes améliorant la biodisponibilité décrites dans la littérature. Parmi ces méthodes, dix ont été choisies et étudiées. Les résultats de ces méthodes ont été détaillés dans *III. Résultats 3. Stratégie d'évaluation des substances peu hydrosolubles p.94.*

Les MAB déjà décrites correspondent à des méthodes chimiques (ajout d'une substance) ou physiques (comme les ultra-sons). Nous avons recherché des méthodes d'amélioration de la biodisponibilité novatrices qui ont été expérimentées dans ces deux axes, ainsi que des combinaisons de méthodes. Cette recherche avait pour objectif de déterminer si les MAB permettaient d'améliorer la biodégradabilité des substances modèles.

4.1. Méthodes chimiques d'amélioration de la biodisponibilité

4.1.1. *Dispersion des substances modèles par ajout de rhamnolipides*

Les rhamnolipides sont des tensio-actifs naturels, généralement d'origine bactérienne, qui peuvent être utilisés pour disperser une substance chimique dans un milieu aqueux. Ces biotensio-actifs possèdent une partie hydrophile et une partie lipophile, avec des structures chimiques diversifiées et qui peuvent être des glycolipides, des lipopeptides, des biosurfactants polymériques, des acides gras ou des phospholipides. Un exemple de structure di-rhamno di-lipidique est présenté figure 41 (Abdel-mawgoud, 2010).

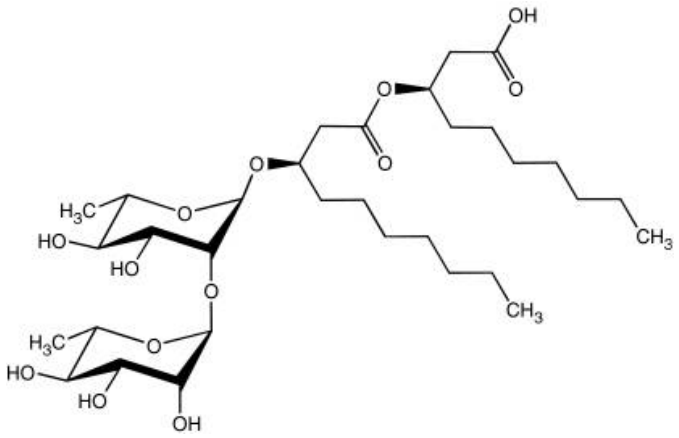


Figure 41 : Exemple de structure de rhamnolipide

Leur application est décrite dans les essais de bioremédiation pour augmenter la biodisponibilité et la biodégradation de substances peu solubles (Van Hamme et al., 2006). La recherche de biosurfactants accessibles commercialement et non facilement biodégradables n'ayant pas été couronnée de succès, notre choix s'est porté sur deux rhamnolipides, le rhamnolipide E qui se présente sous la forme d'une pâte visqueuse et le rhamnolipide R, une poudre blanche, tous deux non toxiques pour les bactéries, en étude chez L'Oréal et dont la biodégradabilité était inconnue au démarrage de nos expériences (figure 42).

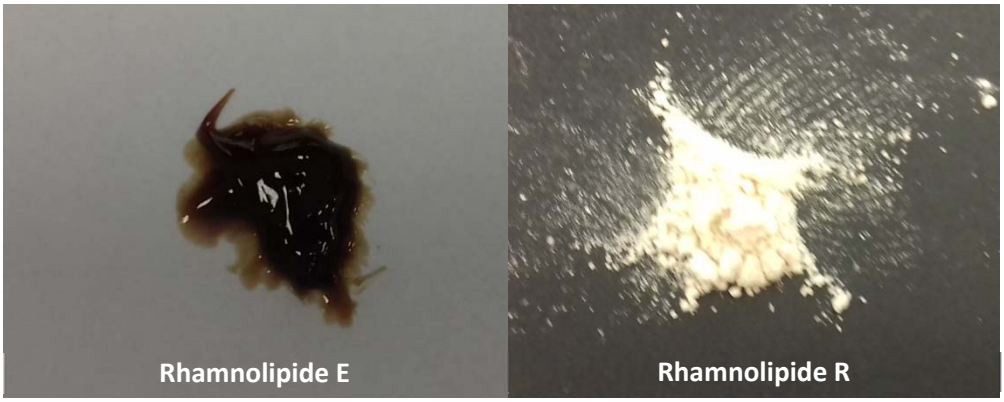


Figure 42 : Aspect des rhamnolipides E et R

En suivant les recommandations de la norme ISO 10634 (International Standard Organization (ISO), 1995), des essais de solubilisation ont été réalisés à des concentrations de 1 et 10 mg.L^{-1}, exprimées en rhamnolipide, pour chacun des deux rhamnolipides E et R en association avec les deux substances MGZ et IN. Les essais de mise en dispersion ont montré visuellement que la concentration de 10 mg.L^{-1} était la plus adaptée à nos deux substances. La biodégradabilité de ces supports n'étant pas connue au moment des essais, nous avons lancé en parallèle les essais de biodégradabilité des rhamnolipides seuls aux concentrations d'utilisation comme MAB ; mais également en association avec les substances MGZ et IN. Les rhamnolipides E et R contiennent 47,0% et 41,0% de carbone, respectivement. Les concentrations exprimées en carbone pour évaluer leurs biodégradabilités sont de 4,7 et 4,1 mg.L^{-1}, respectivement. Elles sont donc plus faibles que celles recommandées par la ligne directrice de l'OCDE 301B pour évaluer la biodégradabilité, qui indique des concentrations comprises entre 10 et 20 mg de carbone.L^{-1} (OECD/OCDE, 2013). Dans nos conditions d'évaluation, la biodégradabilité obtenue pour ces deux rhamnolipides a été supérieure à 100% à 28 jours (figure 43).

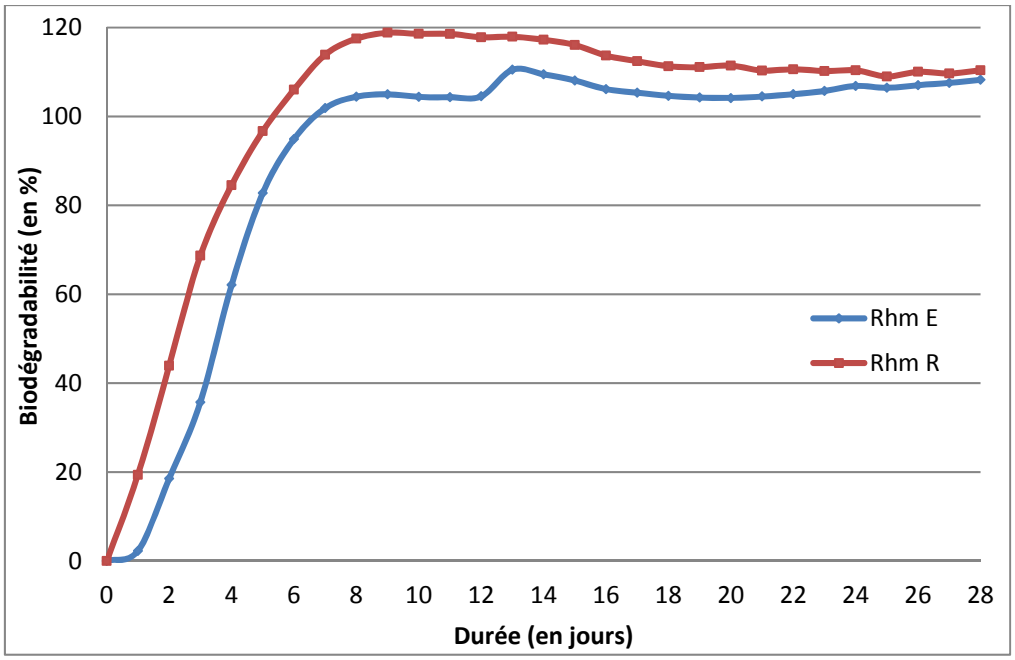


Figure 43 : Résultats du test de criblage de biodégradabilité facile avec l'appareil Respicond VI® des rhamnolipides E (Rhm E) et R (Rhm R) testés à 10 mg de rhamnolipide.L^{-1}

Le rhamnolipide E, a permis d'améliorer la biodégradabilité du MGZ avec un R_{MAB} à 13,4 tempéré par un résultat de biodégradabilité à 28 jours de seulement 11% (tableau 26). Par contre, le rhamnolipide E n'a apporté aucune amélioration de résultat de la biodégradabilité pour IN. Le rhamnolipide R s'est avéré plus performant et a permis d'améliorer la biodégradabilité de nos substances modèles de façon favorable avec un R_{MAB} à 1,63 pour le MGZ et à 1,08 pour IN.

Tableau 26 : Résultats des tests de criblage (Respicond VI®) de la biodégradabilité de MGZ et d'IN associés aux rhamnolipides E et R

MAB	MGZ				IN			
	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
Biosurfactant (Rhm E) à 10 mg.L^{-1}	10	12	11	**13,4**	18	17	17	**0,93**
Biosurfactant (Rhm R) à 10 mg.L^{-1}	9	19	28	**1,63**	3	26	32	**1,08**

Code couleur associé au classement selon la note statistique (Nst) obtenue :

Très favorable	Favorable	Neutre	Défavorable	Très défavorable

Début f10j : 1er jour de démarrage de l'intervalle de 10 jours (j) ; F10j : Taux de biodégradabilité à la fin de l'intervalle des 10 jours (%) ; 28j : Taux de biodégradabilité à la fin du test (en %).

L'objectif de notre recherche est de trouver des MAB novatrices plus performantes que les MAB déjà décrites dans la littérature. Ainsi, une expérience a été réalisée pour comparer l'action des rhamnolipides aux tensioactifs classiques, avec comme exemple l'action du rhamnolipide R et du tensio-actif Pluronic 9400® sur le MGZ (figure 44). On peut noter que le rhamnolipide R, le plus

performant avec MGZ parmi les deux rhamnolipides, permet d'obtenir une cinétique de biodégradation proche de celle obtenue avec le tensioactif classique (Pluronic 9400®) mais avec un résultat de biodégradabilité associé plus faible avec 21% à 28 jours pour 24% avec le tensioactif. On note également une variabilité en fin de test plus élevée avec le rhamnolipide R (MAD à 8%) qu'avec le tensioactif (MAD à 1%). Pour cet essai, la biodégradabilité du tensioactif classique est nulle alors que celle du rhamnolipide R est de 92% à 28 jours. Une action de cométabolisation avec le Rhamnolipide R était envisageable en raison de sa forte biodégradabilité. Toutefois, les courbes de dégradation obtenues pour le MGZ associé au Rhamnolipide et au tensioactif chimique sont similaires. Ainsi, dans l'essai présenté, le phénomène de cométabolisation ne semble pas intervenir et le témoin Rhamnolipide, soustrait lors de la mesure de la biodégradabilité, a permis de s'affranchir de la perturbation possible provoquée par la dégradation de celui-ci.

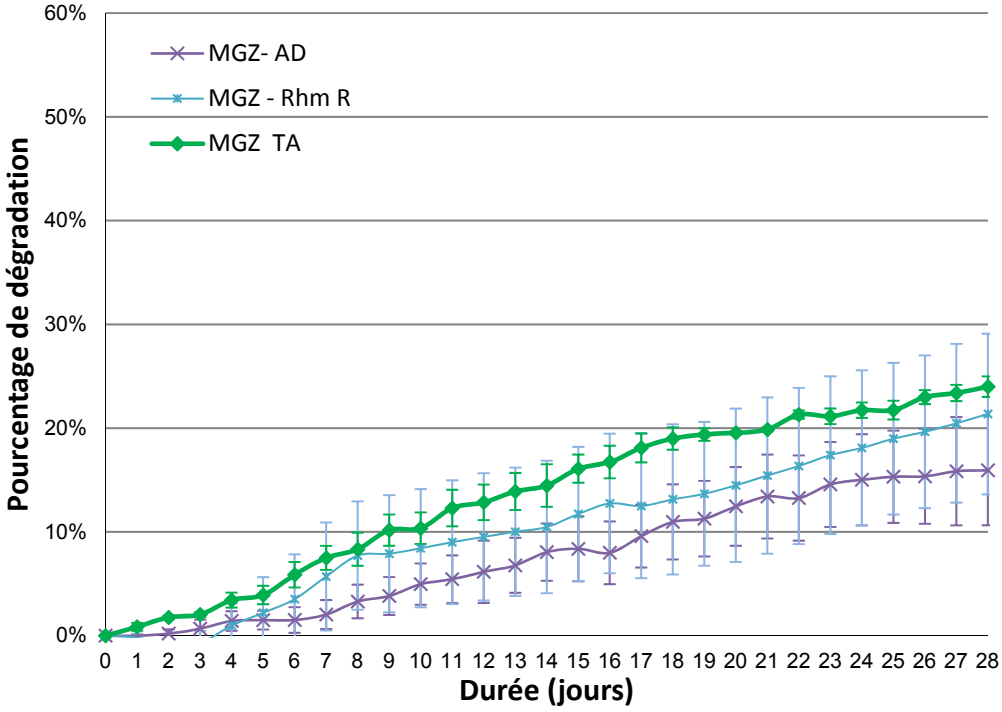


Figure 44 : Résultats médians de biodégradation du MGZ avec l'appareil Respicond VI® associés à différentes méthodes : addition directe (MGZ – AD), dispersion avec un tensio-actif Pluronic 9400® (MGZ TA) et dispersion avec le biosurfactant Rhamnolipide R (MGZ Rhm R). L'erreur type (MAD) est matérialisée par des barres verticales.

Les résultats encourageants obtenus en utilisant les biotensio-actifs Rhamnolipide R et E pour nos substances modèles ne sont pas supérieurs à ceux obtenus avec des tensio-actifs classiques. D'autre part, bien que cela n'ait pas été mis en évidence dans nos conditions, la forte biodégradabilité des rhamnolipides pourrait conduire à les considérer comme substrat pour réaliser une cométabolisation. Ainsi, compte tenu de ces données, l'intérêt des Rhamnolipides E et R n'a pas été conforté dans un essai de confirmation.

4.1.2. *Dispersion par émulsion Pickering*

Les émulsions Pickering employées sont des dispersions de la substance d'essai dans le milieu, stabilisées par des particules solides de taille réduite et réalisées par traitement aux ultrasons ou par mélange mécanique. Avec l'INRA de Nantes, nous avons identifié la cellulose comme présentant des caractéristiques pertinentes pour notre étude : dispersable dans un milieu aqueux, non toxique pour les bactéries et, selon la forme de cellulose sélectionnée, un profil de biodégradabilité facile attendu faible de par son statut de polymère. La forme d'intérêt (nano) n'étant pas disponible auprès des fournisseurs classiques de produits chimiques, nous nous sommes orientés vers l'Université du Maine (USA) qui propose de la cellulose de forme nanocristalline (CNC). La biodégradabilité n'était pas renseignée dans sa fiche de données de sécurité au moment des essais. Ce support est commercialisé dans une solution aqueuse, la CNC représentant 1 à 10% du mélange CNC dans l'eau. La cellulose nanocristalline mesure 5 nm de diamètre pour une longueur de 150-200 nm et se présente comme ci-dessous (figure 45) sous la forme d'un gel :



Figure 45 : Présentation de la cellulose nanocristalline

Comme la biodégradabilité des formes nano et cristalline de la cellulose est difficilement prédictible (Singh G, 2016), nous avons mesuré la biodégradabilité facile de la CNC sélectionnée. Au vu de la faible teneur en carbone (4,7%) de la solution de CNC commercialisée, il était nécessaire de réaliser un essai à une concentration de 20 mg de carbone de CNC.L^{-1}. La CNC s'est avérée être facilement biodégradable avec un résultat de biodégradabilité de 87% en 28 jours avec respect de l'intervalle de 10 jours (figure 46).

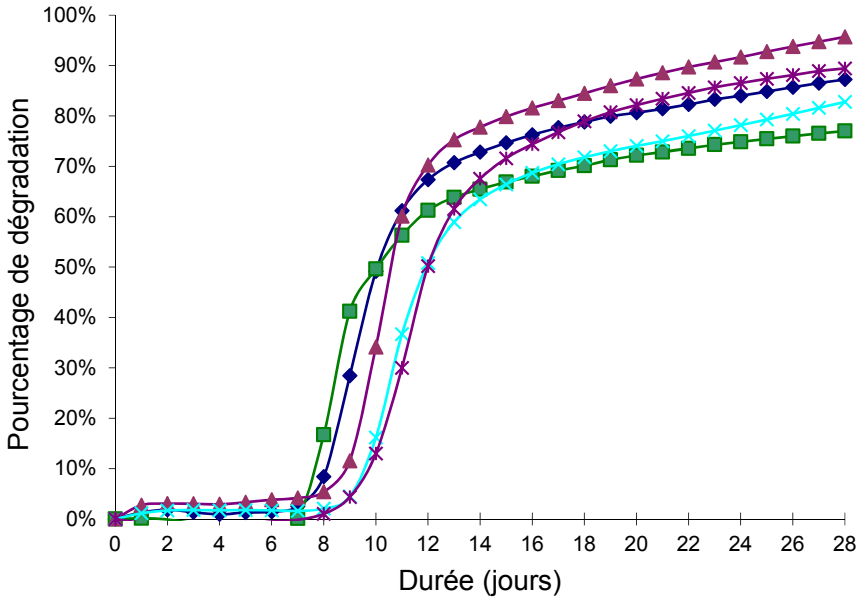


Figure 46 : Cinq répliques de la biodégradation de la cellulose nanocristalline à 20 mg de carbone. L^{-1} lors d'un essai de criblage sur appareil Respicond VI®

Cette méthode de dispersion étant innovante, nous avons souhaité confirmer son potentiel d'amélioration de la biodisponibilité et vérifier son potentiel de cométabolisation. Ainsi, l'impact des émulsions Pickering avec CNC sur la biodégradabilité de MGZ et IN a été évalué et les résultats associés sont présentés dans le tableau 27. Les résultats de biodégradabilité obtenus sont favorables ou très favorables quel que soit le type de dispersion réalisé et la substance modèle testée. On note, pour le MGZ, une augmentation de la biodégradabilité nettement supérieure par traitement aux ultrasons (46% à 28 jours) à comparer à 20% par dispersion mécanique et 16% en addition directe (résultat non présenté) dans un même test. Pour IN, la biodégradabilité à 28 jours est améliorée avec 31% par dispersion mécanique pour 25% lorsque la dispersion est réalisée par traitement aux ultrasons et 18% par addition directe au cours du même test.

Tableau 27 : Résultats des tests de criblage (Respicond VI®) de la biodégradabilité facile de MGZ et d'IN dispersés par émulsion Pickering

MAB	MGZ				IN			
	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
Emulsion Pickering (dispersion mécanique)	13	17	20	**4,69**	8	24	31	**1,66**
Emulsion Pickering (ultrasons)	7	26	46	**7,42**	8	21	25	**1,55**

Code couleur associé au classement selon la note statistique (Nst) obtenue :

Très favorable	Favorable	Neutre	Défavorable	Très défavorable

Début f10j : 1er jour de démarrage de l'intervalle de 10 jours (j) ; F10j : Taux de biodégradabilité à la fin de l'intervalle des 10 jours (%) ; 28j : Taux de biodégradabilité à la fin du test (en %).

La cellulose nanocristalline étant facilement biodégradable, son utilisation comme support de cométabolisation par les microorganismes présents dans l'inoculum n'est pas à exclure. Nous avons ainsi voulu la comparer avec un autre support solide inerte et non biodégradable (gel de silice). La figure 47 montre qu'en présence de CNC dispersée par ultrasons, la biodégradabilité du MGZ démarre précocement (7e jour) et est améliorée à 28 jours (46%) par rapport aux essais par addition directe (28e jour, 10%) et par dispersion mécanique avec comme support la CNC (12e jour, 20%) et le gel de silice (13e jour, 23%). Pour un même type de dispersion (mécanique), la cinétique de biodégradabilité est similaire avec un support biodégradable (CNC) et avec un support non biodégradable (gel de silice).

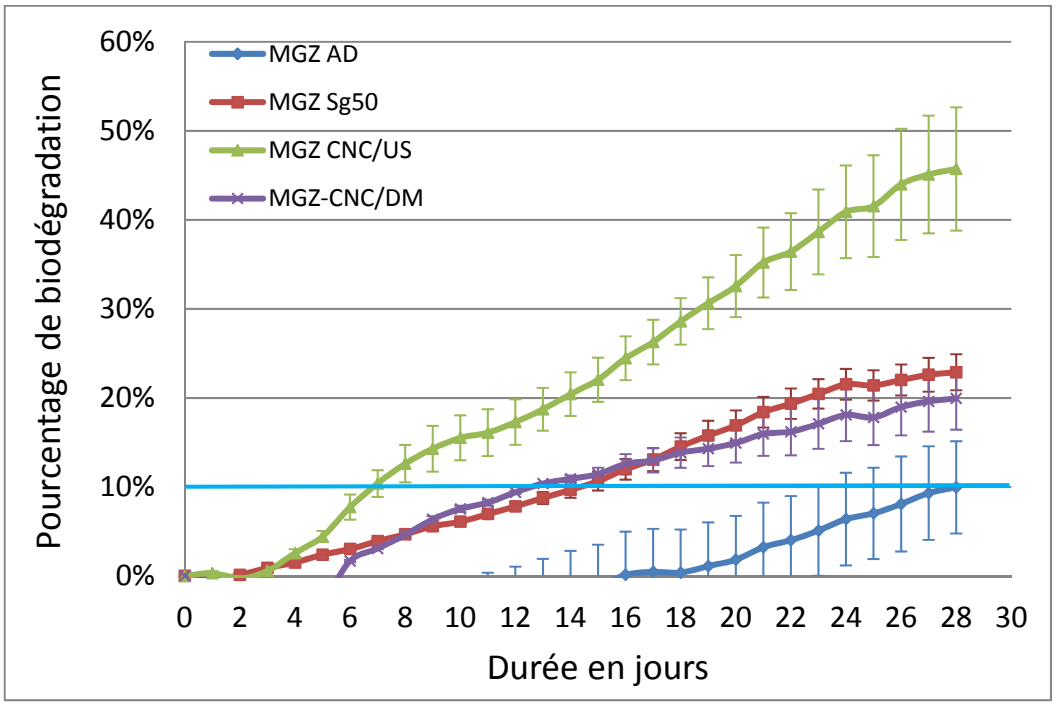


Figure 47 : Résultats médians de biodégradation de MGZ avec l'appareil Respicond VI® associés à différentes méthodes : addition directe (MGZ – AD), dispersion par émulsion pickering avec cellulose nanocristalline et dispersion mécanique (MGZ – CNC/DM) ou par ultrasons (MGZ – CNC/US) et dispersion avec du gel de silice (MGZ – Sg50). L'erreur type (MAD) est matérialisée par des barres verticales

L'amélioration de la biodégradabilité du MGZ associé à la CNC traitée par ultrasons peut être due soit à une meilleure dispersion et donc une meilleure biodisponibilité de la substance pour les bactéries, soit à un phénomène de cométabolisation. Cette cométabolisation peut se traduire par deux modes d'actions différents qui peuvent être conjoints, d'une part 1) un apport en substrat facilement biodégradable permettant d'augmenter la concentration bactérienne et d'autre part 2) d'optimisation de l'arsenal enzymatique utilisé pour dégrader la substance testée. Pour 1), la concentration de carbone provenant de la nanocellulose ajoutée dans le flacon d'essai représente moins de 2,5% de la quantité de carbone totale disponible dans le flacon d'essai, ainsi son utilisation comme substrat a été

limitée au cours du test. Cependant lors de la dispersion du MGZ avec la CNC par disperseur mécanique, on ne note aucune amélioration du démarrage de la biodégradabilité comparé au même traitement réalisé avec le gel de silice. Ainsi, on peut supposer que la CNC n'a pas conduit à une cométabolisation en tant que substrat. Pour 2), la nanocellulose cristalline étant un polymère, il n'a pas été possible d'utiliser les modèles *in silico* pour définir les voies enzymatiques utilisées pour sa dégradation. Extrapoler ces voies sur la base des monomères constituant le polymère n'est pas adapté car le comportement enzymatique de métabolisation des bactéries peut être différent entre les monomères et le polymère. Les voies enzymatiques décrites pour biodégrader les celluloses naturelles ne sont pas non plus des bons modèles car elles ne sont pas facilement biodégradables. Ainsi, dans l'essai présenté, le phénomène de cométabolisation ne semble pas intervenir et le témoin CNC, soustrait lors de la mesure de la biodégradabilité, a permis de s'affranchir de la perturbation possible provoquée par la dégradation de celui-ci.

L'émulsion Pickering propose une alternative intéressante de dispersion pour les substances peu hydrosolubles en vue d'évaluer leur biodégradabilité facile. Mais, en dépit des résultats favorables et très favorables obtenus avec ces méthodes pour MGZ et IN, elles n'ont pas été retenues pour conforter leur intérêt dans un essai de confirmation, car le support cellulose nanocristalline utilisé est facilement biodégradable et pourrait permettre une cométabolisation. Cette voie d'investigation, non applicable dans les tests normalisés, apparait cependant comme pertinente comme vecteur de dispersion et sera détaillée en discussion.

4.2. Méthode physique d'amélioration de la biodisponibilité

4.2.1. *Utilisation de champs électromagnétiques*

De nombreuses études théoriques mettent en avant que les propriétés chimiques de l'eau pure ne peuvent pas être modifiées par des champs électromagnétiques (EMF) (Vallée, 2004). Mais, dans le cas de solutions salines, notamment calciques, le dispositif de traitement magnétique pourrait être considéré comme un moyen physique pour créer une turbulence supplémentaire sur le liquide (Busch, K. W. and Busch, 1997). Ainsi, nous avons exploré l'impact que peuvent avoir les EMF sur un milieu minéral contenant du calcium comme celui utilisé pour les essais de biodégradabilité facile pour disperser les substances à tester.

Pour cela nous avons comparé les essais réalisés avec la substance ajoutée dans un milieu minéral traité par EMF à la condition de référence par « addition directe » où la substance est ajoutée dans le milieu non traité. Alors que la condition de référence a conduit à des résultats de biodégradabilité à 28 jours de 26% pour MGZ et 35% pour IN présentés dans la figure 48, les essais dans le milieu traité (Mtb pour milieu traité BioPhys - Solutions©) conduisent à des résultats nettement plus favorables : une biodégradabilité à 28 jours de 51% pour MGZ et de 66% pour IN associés à des R_{MAB} de 1,82 et 1,45 respectivement avec un démarrage de la biodégradabilité plus précoce (3 jours pour MGZ et 7 jours pour IN).

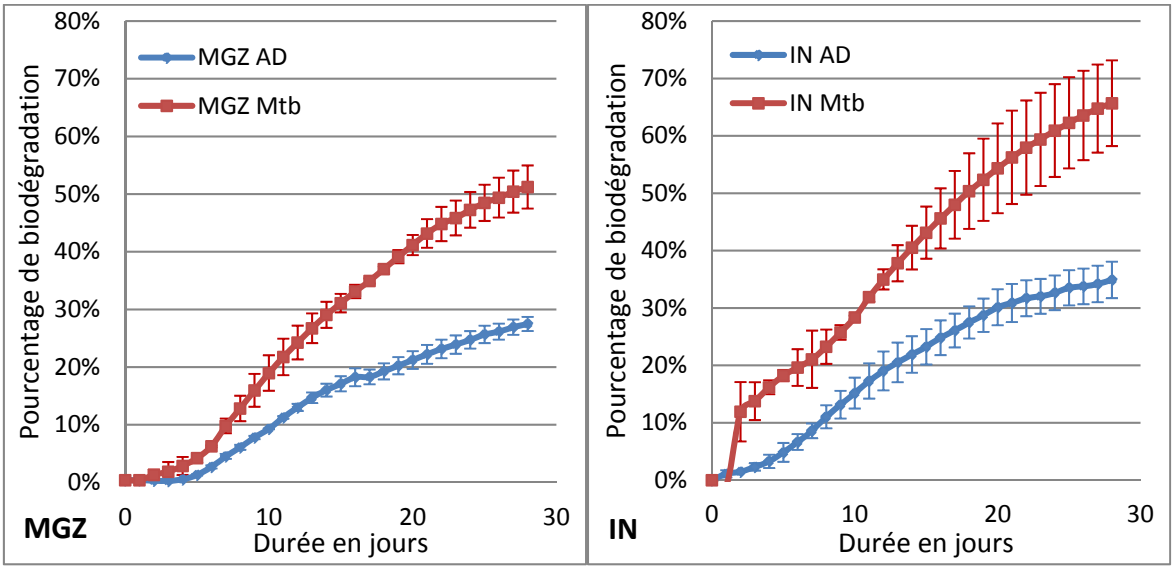


Figure 48 : Résultats médians de biodégradation du MGZ et de l'IN avec l'appareil Respicond VI® *en addition directe dans le milieu fraichement préparé (MGZ AD), en addition directe dans du milieu préalablement traité par EMF (MGZ Mtb).* L'erreur type (MAD) est matérialisée par des barres verticales.

Nous avons également réalisé des essais avec 3 conditions opératoires différentes (CP1 avec une durée d'exposition de 6h, CP2 avec une intensité de traitement quatre fois plus faible que CP1 et une durée d'exposition de 12h et CP3 avec un type de signal différent (carré) pour le traitement et 6h d'exposition) appliquant les EMF directement sur les substances MGZ et IN dispersées dans le milieu. Seule la condition CP1 utilisée sur MGZ a amélioré le résultat de biodégradabilité à 28 jours par rapport à l'addition directe mais reste moins performante que lorsque la substance est ajoutée dans le milieu traitée (résultat non présenté).

Les substances MGZ et IN se dégradent mieux lorsqu'elles sont placées dans le milieu d'essai traité par EMF (CP1) que dans le milieu d'essai non traité. Si l'effet des EMF sur le milieu minéral peut poser des difficultés de validité pour un test normalisé de biodégradabilité facile, cette méthode a démontré un fort potentiel pour d'autres applications comme la mise en dispersion de substances faiblement hydrosolubles, par exemple dans le domaine de l'émulsion, dans un milieu contenant des sels minéraux.

4.2.2. *Utilisation d'un mélangeur statique*[17]

Les contraintes inhérentes à l'utilisation d'additif chimique pourraient être contournées par l'utilisation d'une méthode de mélange permettant d'augmenter l'accessibilité de la substance aux microorganismes. Pour exploiter cette opportunité, notre choix s'est porté sur une mise en turbulence de la solution d'essai dans le flacon à l'aide d'un mélangeur statique et d'une pompe péristaltique ou à hélice.

a) Analyse de la cinétique de formation de l'émulsion

Une première expérience (figure 49) a été réalisée dans le but de définir le temps nécessaire à la formation d'une émulsion stable. Cette émulsion a été créée avec 1 mL d'huile de tournesol colorée au Nile Red dans un litre d'eau distillée d'une part avec une agitation par barreau aimanté (B) et d'autre part avec une association pompe péristaltique et mélangeur statique (C). D'après les résultats obtenus, le dispositif de mélange avec la pompe péristaltique est capable de produire une émulsion, aussi bien avec le mélangeur statique en grille qu'avec celui en hélice et ce, même avec une substance très visqueuse. La formation de l'émulsion a été confirmée par une absorbance à 450 nm proche de 2 au

[17] *Ces travaux ont été réalisés par Héléna Bouyer en 2016 et décrits dans son mémoire : « Influence des perturbations hydrodynamiques sur la bioaccessibilité de substances peu solubles dans les tests de biodégradation » du Master Sciences de l'Univers, Environnement, Ecologie - Spécialité : EcoPhysiologie et EcoToxicologie (Université de Nantes).*

bout d'une heure. Des essais similaires ont été conduits avec les autres pompes possédant des régimes de débit plus élevés et ont confirmé la production d'une émulsion avec les deux mélangeurs statiques. La production d'une émulsion est confirmée par un changement de coloration du milieu qui passe de transparent à blanc laiteux, couleur caractéristique d'une émulsion (Cabane and Hønon 2003).

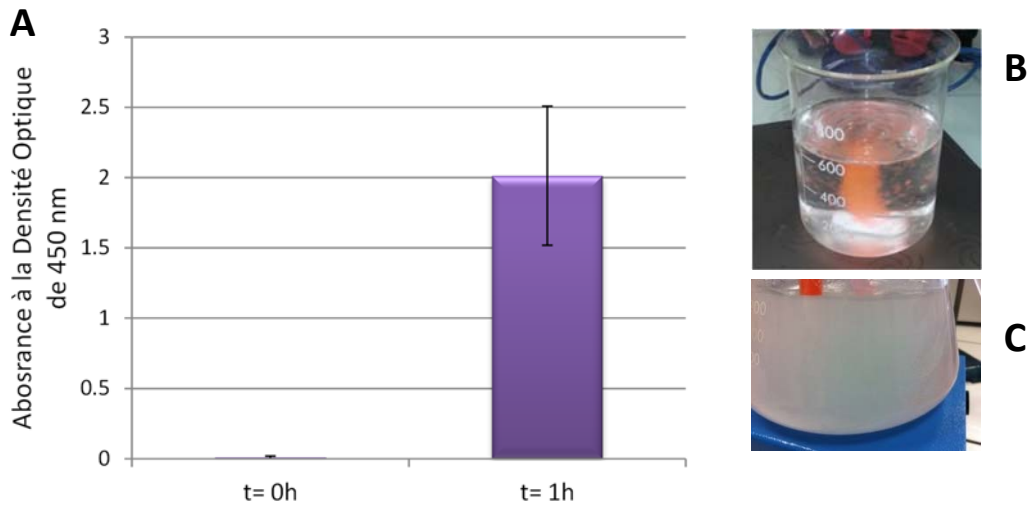


Figure 49 : Production d'une émulsion via le système de mélange

(A) graphique présentant la turbidité au bout d'une heure de mélange, (B) photo du mélange obtenu avec agitation magnétique seulement (C) émulsion obtenu via la pompe et le mélangeur

Les résultats d'homogénéité de la solution obtenus avec la pompe à hélice comparée à ceux de l'agitation par barreau aimanté sont en accord avec la littérature, le régime turbulent favorise bien la rupture des gouttelettes et réduit le temps nécessaire pour l'obtention d'une émulsion (Fang and Lee, 2001).

Une étude plus précise du mélange obtenu a ensuite été réalisée dans le but de définir le temps nécessaire à la formation d'une émulsion stable. En effet, une émulsion étant d'apparence homogène mais microscopiquement hétérogène, du fait de la formation de gouttelettes, l'observation macroscopique seule ne permet pas de la caractériser. Pour cela, l'homogénéité a été étudiée via la mesure de l'opacité du mélange par spectrophotométrie, mais aussi par dénombrement des gouttelettes d'huile formées. Le système a été mis en place avec la pompe péristaltique. Suite aux différents essais réalisés, un débit de 0,58 $L.min^{-1}$ avec le système de mélange a été retenu. La distribution de taille des gouttelettes a été analysée en parallèle du suivi de la vitesse d'homogénéisation de l'émulsion par absorbance. Le suivi de la densité optique met en évidence une stabilisation de l'homogénéisation de l'émulsion après 5 min de mélange en figure 50 (A). En outre, la quantité de gouttelettes formées augmente au cours de la cinétique et double en 20 minutes. Après 18 heures de mélange, le nombre de gouttelettes atteint une concentration de 1666 $gouttelettes.\mu L^{-1}$. Néanmoins, ces résultats ne permettent pas de déterminer si l'émulsion est grossière, fine ou

microscopique. Le temps de mélange maximal étudié (18 h) a donc été retenu pour réaliser les analyses granulométriques (figure 50-C).

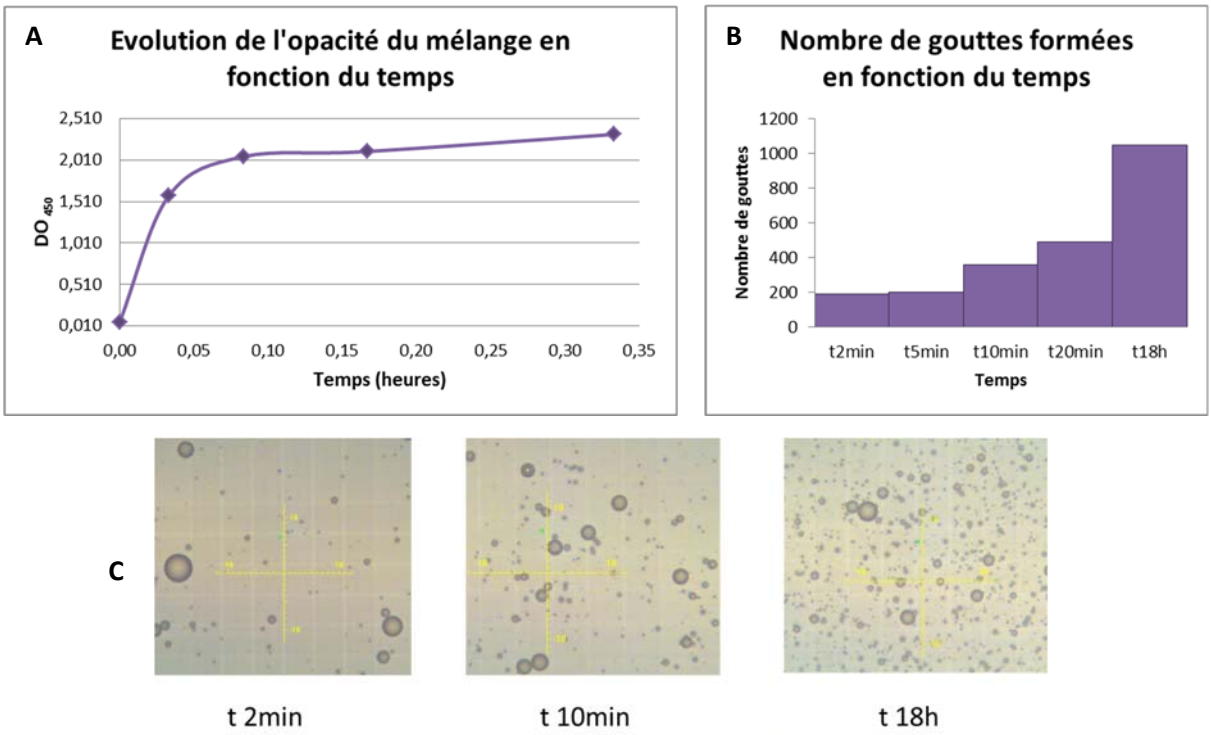


Figure 50 : Suivi de l'homogénéité et de la répartition de l'émulsion

(A) par mesure de l'opacité, (B) du nombre de gouttelettes par image (i.e. pour 0,6 µl) photographiées en (C). L'émulsion a été réalisée avec de d'huile alimentaire colorée diluée au 1 : 16 dans de l'eau distillée. Sa cinétique de *production a été étudiée* avec des prélèvements à 2 min, 5 min, 10 min, 20 min et 18h.

b) Analyse granulométrique de l'émulsion

Outre l'étude macroscopique de l'homogénéité et du fractionnement de la phase dispersée en gouttelettes, une analyse granulométrique a été engagée dans le but de caractériser l'aspect microscopique des émulsions (figure 50). La production d'émulsion n'ayant pas été observée pour la condition de référence constituée uniquement de l'agitateur magnétique, celle-ci n'a pas été étudiée.

Le dispositif avec la pompe péristaltique (pompe à galets) à débit faible (0,58 $L.min^{-1}$) induit un diamètre moyen des gouttes de 4,93 µm et l'émulsion créée est classée parmi les mini-émulsions (figure 51). De plus, la distribution de la taille des gouttes étant relativement resserrée, on peut supposer que l'émulsion obtenue est qualifiable de mono-disperse (Doumeix, 2011).

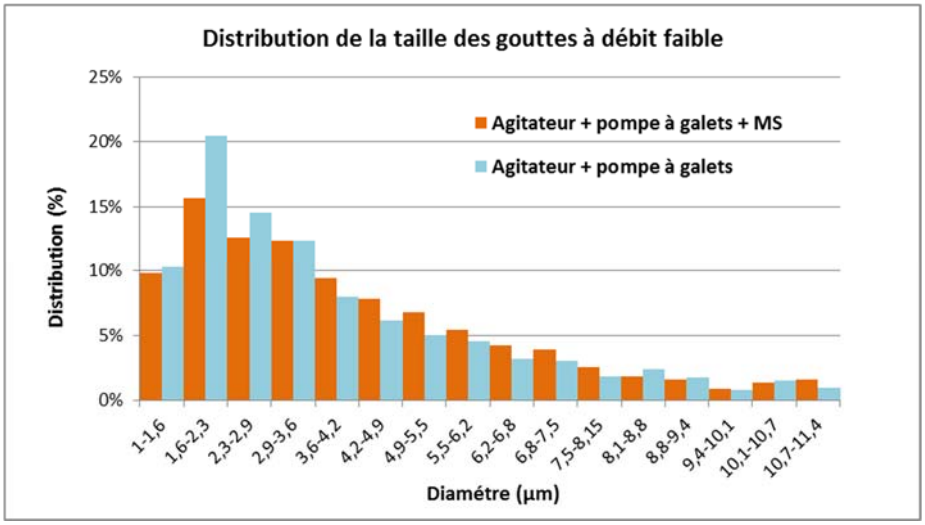


Figure 51 : Graphique représentant la distribution de la taille des gouttes formées avec le système à faible débit

Le dispositif étudié est un mélangeur statique (MS) en grille associé à une pompe péristaltique avec un débit faible de 0,58 L.min^{-1} (en orange). Un système sans mélangeur (en bleu) a été monté en parallèle, dans le but d'étudier l'influence de la pompe seule sur l'homogénéité de l'émulsion.

L'analyse granulométrique du dispositif pompe péristaltique équipé d'un mélangeur statique (MS) présente un profil de distribution des gouttelettes proche du dispositif dépourvu de mélangeur. La distribution de la taille des gouttelettes apparait même plus resserrée et le diamètre moyen des gouttes est légèrement inférieur (4,73 µm) au dispositif avec mélangeur statique (4,93 µm). Ce résultat quelque peu étonnant ne peut être comparé à la littérature, puisque aucune étude sur l'efficacité des mélangeurs statiques, ne semble avoir testé la pompe seule en parallèle. Le débit de la pompe et la dilution du mélange, ne permet peut-être pas de mettre en valeur l'effet du mélangeur sur l'amélioration de l'homogénéité dans ce cas.

Une analyse granulométrique a également été réalisée sur les émulsions produites par la pompe à hélice à 1,6 L.min^{-1}, avec et sans mélangeur (figure 52). Dans l'intention de se rapprocher des conditions de dilution des substances d'essais pour la biodégradation, tout en permettant une analyse représentative de la répartition des gouttes.

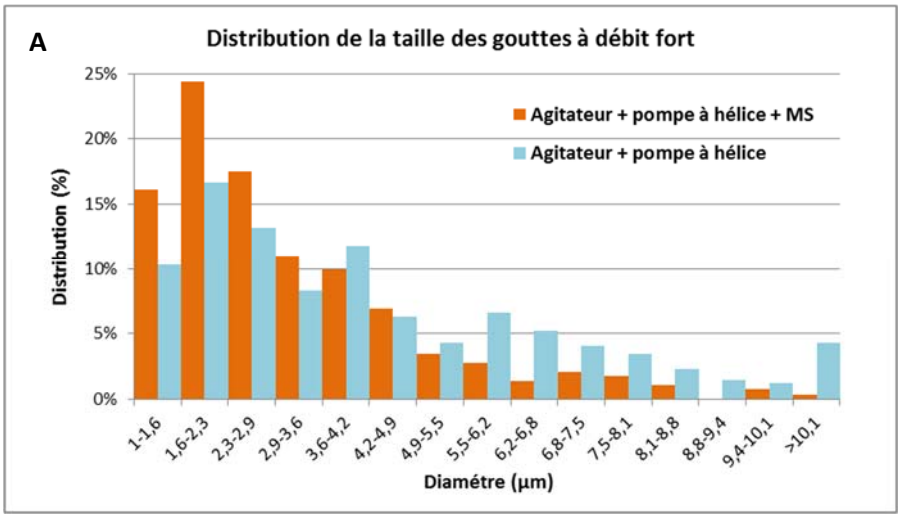




Figure 52 : Graphique de distribution de la taille des gouttes formées avec le système à fort débit (A) et photo du montage (B) avec l'huile alimentaire colorée au Nile Red, a été diluée au 1000ème

Le dispositif étudié est un mélangeur statique (MS) en grille associé à une pompe à hélice avec un débit plus fort de 1,60 L.min^{-1} (en orange). Un système sans mélangeur (en bleu) a été monté en parallèle, dans le but d'étudier l'influence de la pompe seule sur l'homogénéité de l'émulsion.

Les diamètres moyens des gouttes sont respectivement de 3,75 µm pour le dispositif de mélange équipé de la pompe à hélice et du mélangeur statique et de 4,92 µm pour le dispositif avec la pompe sans mélangeur. Dans ces conditions proches des essais de biodégradation, où la substance peu soluble est très diluée, les émulsions produites à débit élevé sont aussi fines que celles obtenues avec la pompe péristaltique. Néanmoins les distributions de tailles apparaissent plus resserrées, avec une proportion plus importante de petites gouttes en présence d'un mélangeur statique (figure 52).

Les dispersions créées par association d'une pompe et d'un mélangeur statique possèdent une homogénéité supérieure à celles obtenues par agitation magnétique. Les gouttelettes composant la dispersion produite par le dispositif à 1,6 L.min^{-1} (pompe à hélice et mélangeur statique) sont plus fines que celles produites avec le système à 0,58 L.min^{-1} (pompe péristaltique et mélangeur statique). Ces travaux ont permis de sélectionner le dispositif associant la pompe à hélice au mélangeur statique. Son application au test de biodégradabilité facile fera l'objet de futures études.

4.3. Associations de méthodes d'amélioration de la biodisponibilité

Afin d'évaluer des associations de méthodes, nous avons souhaité associer deux méthodes chimiques ensemble et une méthode chimique avec une méthode physique. Parmi les différentes possibilités de méthodes chimiques, l'huile de silicone apparaissait comme le candidat idéal car présentant une biodégradabilité de 0% à 28 jours (Annexe XIII p.199), non toxique pour les microorganismes et améliorant les résultats de biodégradabilité pour les deux substances modèles. Pour le second support chimique, l'action de dispersion du tensio-actif (Pluronic 9400®) a semblé pertinente quant à sa complémentarité avec l'action de solubilisation de l'huile de silicone et a donc été sélectionnée. Avec une concentration à 10 $mg.L^{-1}$ pour le tensioactif (Pluronic 9400®) et à 1 $mL.L^{-1}$ avec l'huile de silicone (résultats présentés dans le tableau 28), la biodégradabilité du MGZ a été améliorée et franchit le seuil de 60% à 28 jours (69%), pour 29% en addition directe, lui conférant ainsi un statut de non persistance (> 60% à 28 jours) associé à un R_{MAB} à 1,94. Pour IN, la biodégradabilité a atteint 34% avec un R_{MAB} à 1,00, pour 27% en addition directe.

La seconde association expérimentée combine l'huile de silicone comme méthode chimique avec le traitement aux ultrasons. Les gouttelettes d'huile de silicone formées après dispersion mécanique sont fines mais l'émulsion n'est pas forcément homogène. L'action des ultrasons apparaissait donc comme adaptée à une meilleure dispersion de l'association de l'huile de silicone avec les substances hydrophobes testées. Ainsi, l'association d'huile de silicone à 1 $mL.L^{-1}$ dispersée aux ultrasons pendant 10 minutes a permis une amélioration de la biodégradabilité à 30% pour MGZ (pour 11% par addition directe) et à 50% pour IN (pour 47% par addition directe) associée à des R_{MAB} à 3,11 et 1,05 respectivement (tableau 28).

Tableau 28 : Résultats des tests de criblage (Respicond VI®) réalisés sur MGZ et IN avec association de méthodes améliorant la biodisponibilité

MAB	MGZ				IN			
	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
Huile de silicone et tensioactif	3	43	69	**1,94**	8	23	34	**1,00**
Huile de silicone et traitement aux US	5	23	30	**3,11**	7	38	50	**1,05**

Code couleur associé au classement selon la note statistique (Nst) obtenue :

Très favorable	Favorable	Neutre	Défavorable	Très défavorable

Début f10j : 1er jour de démarrage de l'intervalle de 10 jours (j) ; F10j : Taux de biodégradabilité à la fin de l'intervalle des 10 jours (%) ; 28j : Taux de biodégradabilité à la fin du test (en %).

Nous avons vérifié que l'association de méthodes possède un effet supérieur sur la biodégradabilité de nos substances modèles par rapport aux deux méthodes prises individuellement en réalisant les 3 méthodes dans un même test. Pour cela, nous avons évalué l'association d'huile de silicone et de traitement aux ultrasons. L'association de méthodes présente des résultats de biodégradabilité meilleurs que ceux obtenus avec les méthodes utilisées indépendamment et cela pour les deux substances (figure 53). Cependant, cette différence est plus marquée pour MGZ. On remarque également que l'allure de la courbe de biodégradabilité obtenue avec l'association de méthodes est proche de celle obtenue avec l'huile de silicone seule pour les deux substances. Cela confirme une optimisation de l'utilisation de la dispersion à l'aide de l'huile de silicone par une meilleure émulsion réalisée grâce au traitement aux ultrasons.

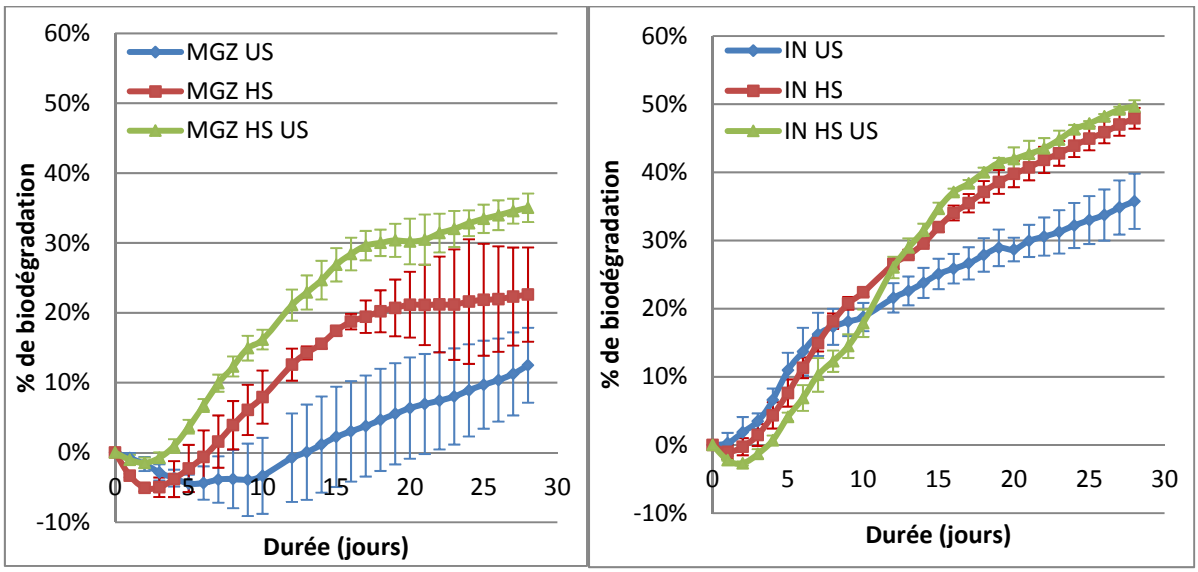


Figure 53 : Résultats médians de biodégradation de MGZ (A) et d'IN (B) avec l'appareil Respicond VI® associés à différentes méthodes : traitement aux ultrasons (US en bleu), dispersion avec de l'huile de silicone (HS en rouge) et association d'huile de silicone et de traitement aux ultrasons (HS US). L'erreur type (MAD) est matérialisée par des barres verticales.

Ces associations de méthodes huile de silicone et tensioactif (1) ainsi que l'huile de silicone et traitement aux ultrasons (2) ont été confirmées comme favorables par rapport à l'addition directe (tableau 29) pour nos deux substances modèles. Le gain en biodégradabilité est de 14% (1) et de 8% (2) pour MGZ et de 22% (1) et de 14% (2) pour IN.

Tableau 29 : Résultats des tests de confirmation réalisés sur MGZ et IN avec association de méthodes améliorant la biodisponibilité

MAB	MGZ				IN			
	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}	début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
Huile de silicone et tensioactif	6	30	43	**1,32**	7	34	51	**1,28**
Huile de silicone et traitement aux US	7	43	51	**1,14**	7	32	48	**1,13**

Code couleur associé au classement selon la note statistique (Nst) obtenue :

Favorable	Neutre	Défavorable

Début f10j : 1er jour de démarrage de l'intervalle de 10 jours (j) ; F10j : Taux de biodégradabilité à la fin de l'intervalle des 10 jours (%) ; 28j : Taux de biodégradabilité à la fin du test (en %).

Les associations de méthode huile de silicone avec tensio-actif et huile de silicone avec traitement aux ultrasons permettent d'obtenir les meilleurs résultats de biodégradabilité en 28 jours avec 51% pour MGZ et 51% pour IN en test de confirmation. Cette voie exploratoire d'association de méthodes pour combiner les effets est prometteuse pour optimiser la dispersion des substances peu hydrosolubles.

4.4. Influence des méthodes d'amélioration de la biodisponibilité sur la variabilité des résultats et la composition de l'inoculum

L'ajout d'un traitement ou d'un adjuvant chimique aux conditions classiques de test peut engendrer une augmentation de la variabilité du test et avoir un impact sur l'inoculum. Pour répondre à ces questions, la variabilité des résultats de test a été comparée entre les tests réalisés avec et sans méthode d'amélioration de la biodisponibilité (MAB). En parallèle, une analyse métagénomique, associée à une évaluation statistique, a été mise en place pour définir l'impact des MAB sur les inocula.

4.4.1. *Variabilité statistique induite par les MAB sur les résultats de biodégradabilité facile*

Afin de définir si l'utilisation des méthodes d'amélioration de la biodisponibilité (MAB) augmente la variabilité du test par rapport à l'addition directe et au vu du faible nombre de répliques (entre 2 et 5), nous avons comparé l'écart absolu médian des résultats obtenus avec et sans MAB.

Les essais de criblage réalisés sur 3 à 5 répliques montrent une variabilité globale en fin de test de 4% en médiane (figure 54) pour l'ensemble des essais et des conditions. Elle est réduite à 1% pour les essais standard qui ne comptent que deux répliques (non présenté). Les MAB présentent des résultats de variabilité équivalents à ceux obtenus avec la condition « addition directe » pour les essais

de criblage et de confirmation. Il apparait néanmoins certaines disparités, par exemple la variabilité obtenue avec les Rhamnolipides, explicables par un nombre d'essais réalisés moins élevé (2 essais par substances comparé à 12 essais en addition directe). Sur la base de ces résultats, on peut conclure que les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité n'engendrent pas de variabilité supérieure aux résultats obtenus par addition directe.

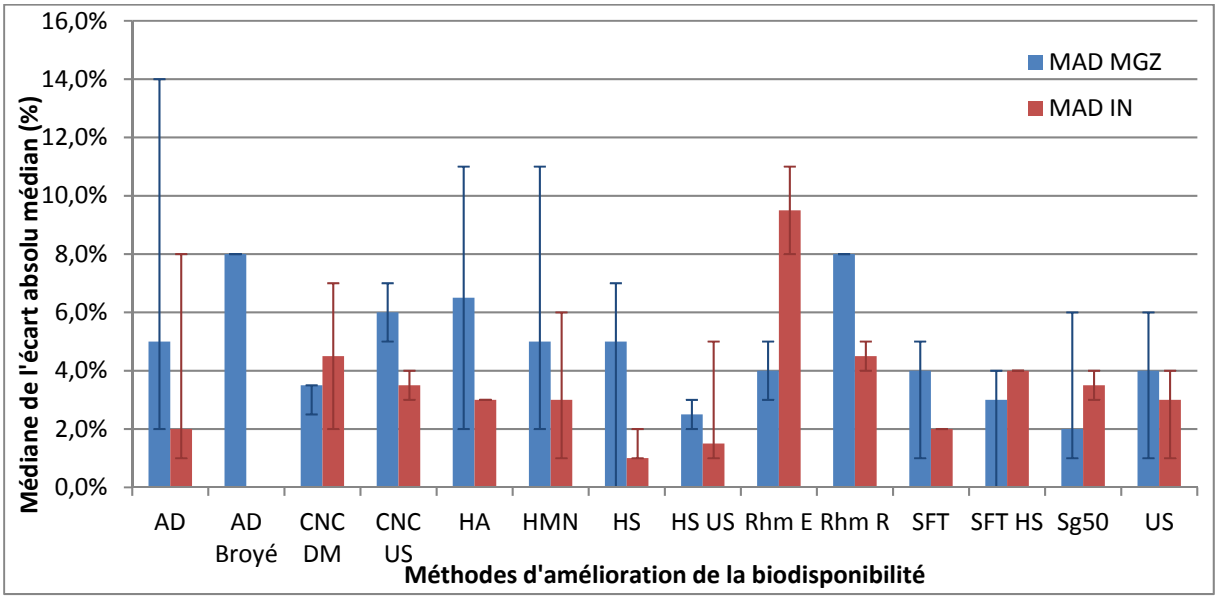


Figure 54 : Variabilité des résultats de biodégradabilité facile à 28 jours pour les essais de criblage sur MGZ et IN pour chaque méthode d'amélioration de la biodisponibilité sur la base de l'écart absolue médian (MAD)

Légende : Les barres d'erreur font figurer, pour chaque type d'essai, les valeurs minimale et maximale de biodégradabilité obtenues. AD : Addition directe, AD Broyé :Addition directe après broyage ; CNC DM : Emulsion Pickering avec cellulose nano cristalline avec dispersion mécanique ; CNC US : Emulsion Pickering avec cellulose nano cristalline avec dispersion par ultrasons ; HA : Dispersion avec de l'acide humique ; HMN : Dispersion avec de l'huile minérale (HMN) ; HS : Dispersion avec de l'huile de silicone ; HS US : Dispersion avec de l'huile de silicone et traitement aux ultrasons ; Rhm E : Dispersion avec le Rhamnolipide E ; Rhm R : Dispersion avec le Rhamnolipide R ; SFT : Dispersion avec un tensio-actif (Pluronic 9400®) ; SFT US : Dispersion avec un tensio-actif (Pluronic 9400®) et traitement aux ultrasons ; Sg 50 : Dispersion avec du gel de silice (50 mg.L^{-1}) ; US : Traitement aux ultrasons

L'utilisation de méthodes d'amélioration de la biodisponibilité n'augmente pas la variabilité du test de biodégradabilité facile par rapport à un ajout direct de la substance dans le flacon.

4.4.2. *Vérification par analyse métagénomique de l'impact des MAB sur la diversité bactérienne de l'inoculum*

Les méthodes améliorant la biodisponibilité sont évoquées dans les lignes directrices de l'OCDE mais aucune indication sur les critères d'acceptabilité n'est fournie (OECD/OCDE, 2013) : l'utilisation de ces MAB est laissée à la discrétion du laboratoire et leur acceptabilité réglementaire reste discutée (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a). Ainsi, nous avons cherché à comprendre l'impact des MAB sur le test de biodégradabilité facile non pas quant à leur capacité de dispersion de la substance d'essai, mais plutôt par rapport à l'effet de leur utilisation sur l'inoculum. Pour cela, notre postulat de départ est que l'utilisation des MAB permet soit d'augmenter la représentativité des 20 familles bactériennes majoritaires présentes sans les MAB (lorsque la substance est testée par addition directe) en favorisant la biodisponibilité de la substance testée aux familles déjà identifiées comme potentiels dégradeurs, soit de favoriser l'émergence d'autres familles bactériennes majoritaires pour lesquelles la substance n'était pas accessible sans les MAB.

La figure 55 montre que la diversité bactérienne mesurée par l'indice de Shannon est peu impactée par la substance d'essai, qu'elle soit associée ou non aux MAB. Chaque condition présente une forte richesse bactérienne avec un indice compris entre 4,4 et 5,3. Ces indices sont équivalents à ceux obtenus pour l'inoculum seul lors des phases de prétraitement (du prélèvement en station d'épuration au démarrage du test). On note également qu'il n'existe pas de lien entre la diversité bactérienne de l'inoculum et le pourcentage de biodégradabilité.

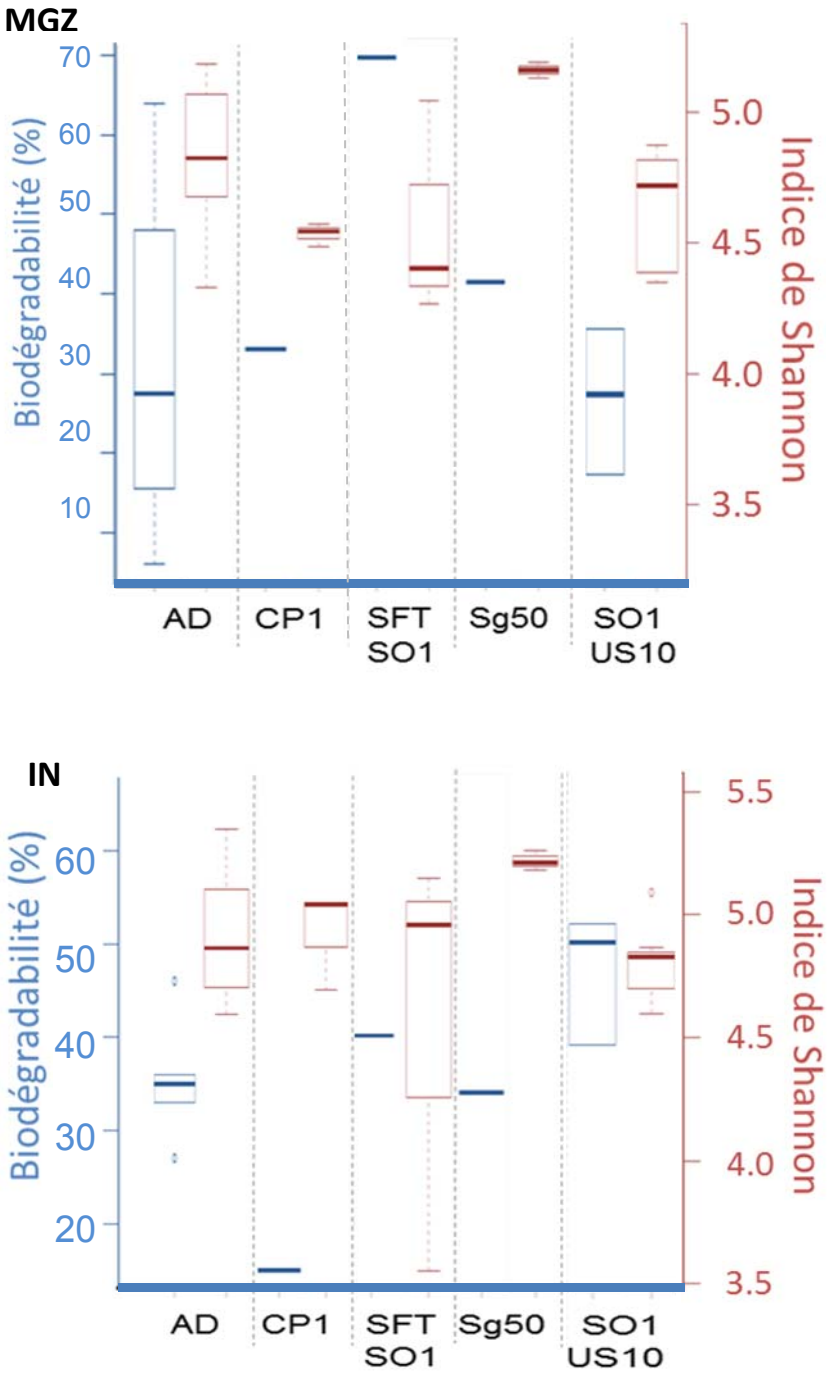


Figure 55 : Boites à moustache présentant les résultats médians des indices de diversité de Shannon et des biodégradabilités des 6 essais réalisés sur MGZ et IN par addition directe et avec différentes méthodes d'amélioration de la biodisponibilité

Légende : AD : Addition directe, CP1 : Condition de préparation par champs électromagnétiques (durée d'exposition 6h), SFT SO1 : Dispersion avec un tensio-actif (Pluronic 9400®) et huile de silicone, Sg 50 : Dispersion avec du gel de silice (50 mg.L^{-1}), SO1 US10 : Dispersion avec de l'huile de silicone et traitement aux ultrasons.

Après avoir démontré que les MAB n'avaient pas d'influence particulière sur la diversité bactérienne de l'inoculum, nous avons souhaité vérifier l'impact de l'ajout de la substance et des MAB sur sa composition bactérienne. Les compositions bactériennes des groupes Témoin à J28, Témoin MAB à J28, Essai substance à J28 et Essai Substance + MAB à J28 ont été comparés les uns aux autres pour chaque test mais également entre les tests.

L'analyse PERMANOVA (*II. Matériels et méthodes 2.1.3.b p.48)* (résultat non présenté) montre des différences entre chaque groupe au sein d'un même test et également entre les tests. On note que tous les paramètres (date du prélèvement de l'inoculum, substance et MAB) ont une incidence sur la composition de l'inoculum. Il est ainsi difficile statistiquement d'établir l'impact de la MAB seule sur la variabilité de l'inoculum. L'effet sur la composition bactérienne d'une MAB est différent d'un inoculum à l'autre et n'est donc pas reproductible.

L'étude de l'indice de Shannon montre qu'une diversité bactérienne élevée (> 5) n'induit pas une meilleure biodégradabilité des substances testées. D'après l'analyse statistique PERMANOVA, tous les paramètres étudiés (changement d'inoculum, ajout d'une MAB, d'une substance modèle ou d'une substance modèle associée à une MAB) ont un effet sur la répartition des 20 familles majoritaires de l'inoculum. Cependant, les MAB n'ont pas d'effet reproductible sur la composition bactérienne de l'inoculum et ne possèdent donc pas un effet spécifique sur l'orientation de l'inoculum. En d'autres termes, la présence d'une MAB ne va pas sélectionner, pour chaque inoculum, une même population bactérienne.

IV. Discussion

1. Variabilité du test de biodégradabilité facile

Les résultats des tests de biodégradabilité facile pour les substances peu hydrosolubles souffrent d'une forte variabilité inter-tests (reproductibilité). Parmi les différentes sources pénalisant la reproductibilité des résultats, nous avons démontré que le milieu d'essai et les flacons constitués de polypropylène et de Nalgene® utilisés pour les essais de criblage étaient des sources négligeables et que la pesée de la substance n'induisait qu'environ 10% de variabilité entre les flacons. Les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité conduisent, quant à elles, à une variabilité équivalente à celle obtenue avec la méthode de référence (addition directe), il n'y a donc pas d'augmentation de la variabilité induite par les MAB. Il restait ensuite à évaluer la principale source du manque de reproductibilité des essais de biodégradabilité facile déjà mise en évidence dans la littérature : l'inoculum boue activée (Blok and Booy, 1984; Paixao, S.M., 2005; Thouand, 1993; Thouand et al., 1996, 1995; van Ginkel et al., 1995). Nous avons obtenu, pour le MGZ par addition directe, des résultats qui varient d'un facteur 14 entre les valeurs extrêmes (3% à 46% à 28 jours) lors des essais de criblage et d'un facteur 2 entre les valeurs extrêmes (21% à 43% à 28 jours) lors des essais de confirmation. Pour IN, la variabilité inter-essais due à l'inoculum engendre une biodégradabilité par addition directe variant d'un facteur 3 entre les valeurs extrêmes (18% à 59% à 28 jours) lors des essais de criblage et d'un facteur 1,2 entre les valeurs extrêmes (29% à 35% à 28 jours) lors des essais de confirmation. Ces résultats, associés à des variabilités bien supérieures à 10% en biodégradabilité à 28 jours, confirment l'impact prépondérant de l'inoculum sur la variabilité du test.

En conséquence, nous avons cherché à savoir pourquoi l'inoculum boue activée induit une telle variabilité inter-essais. Il a déjà été démontré que le faible volume d'essai réduit la probabilité de présence des dégradeurs spécifiques de la substance d'essai (Ingerslev et al., 2000; Thouand et al., 1995) et augmente donc la variabilité. Ainsi, nous nous sommes posés la question de l'effet des traitements qui précèdent le test sur la boue activée. Les travaux de Goodhead et al. (Goodhead et al., 2014) ont déjà montré que la diversité bactérienne de la boue activée restait inchangée après filtration mais que la répartition des structures des communautés bactériennes de la boue avant et après filtration pouvait être différente. Ces études ont été réalisées avec la méthode de séparation des fragments d'ADN amplifiés par DGGE (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant). Cette méthode, qui permet de travailler sur des faibles volumes (< 1 mL), ne donne pas directement accès au détail des communautés bactériennes présentes dans les inocula. Une meilleure connaissance de ces communautés était, en revanche, accessible par une analyse métagénomique qui requiert des volumes

plus importants que la méthode DGGE mais qui restait compatible avec les volumes minimums des solutions d'essai employées pour notre étude (150 mL). Cette analyse a donc été conduite sur six boues activées différentes prélevées dans la station d'épuration à dominante urbaine de Maxéville (54, France) entre mai 2015 et novembre 2015. Elle a montré une forte diversité bactérienne de l'ensemble de ces boues, qui ont été utilisées pour 6 essais de biodégradabilité facile (test de criblage) lors de nos travaux, avec un indice de Shannon supérieur à 4,5 et cela aux différents stades de traitement : prélèvement en station, après le lavage de la boue et après dilution à J0. Cette diversité ne diminue pas du prélèvement de la boue au démarrage du test. Nous confirmons ainsi que la diversité bactérienne n'est pas impactée par la filtration (Goodhead et al., 2014) et qu'elle ne l'est pas non plus pour un traitement complet de préparation de la boue activée (filtration, lavage et dilution) en vue de la réalisation d'un essai de biodégradabilité selon la ligne directrice OCDE 301 B (OECD/OCDE, 2006b). De plus, avec l'identification des familles bactériennes présentes dans chaque échantillon, nous pouvons noter que les communautés bactériennes vont évoluer d'un échantillon à l'autre mais que les répartitions des 20 familles majoritaires des 6 boues activées aux 3 stades étudiés (boue brute, boue lavée, boue diluée) sont similaires.

Par contre, ce conservatisme des familles majoritaires lors des 3 stades de traitement de la boue activée disparait après 28 jours dans le milieu d'essai (Sturm) avec et sans substance (résultats non présentés). Les 6 différents inocula conservent une forte diversité mais ceux-ci évoluent fortement pendant 28 jours par rapport à leurs compositions à J0 et de manière radicalement différente les uns des autres. Ainsi, malgré une cartographie connue des boues à T0, ces inocula restent trop complexes pour prédire leurs évolutions après 28 jours, même dans un milieu non nutritif, que ce soit avec ou sans substance testée.

Les contraintes inhérentes à la boue activée (préparation, variabilité) nous ont conduit à la recherche d'un inoculum alternatif. La caractérisation du meilleur inoculum en lien avec notre problématique nous a orienté vers la souche isolée (Abrusci et al., 2011; Aissaoui et al., 2017; Alkhatib et al., 2015; Lata, 2013). Cette alternative apparaissait, sur le papier, comme un prétendant idéal selon nos 5 paramètres de sélection. Ces 5 paramètres ont été définis empiriquement et notés chacun de 0 à 5 que sont la capacité à dégrader, la variabilité, l'accessibilité, la préparation de l'inoculum et la représentativité environnementale (cf. *Résultats 2.1. Comment choisir le meilleur inoculum ? p.85*). Malheureusement, malgré un profil intéressant, les souches isolées sélectionnées n'ont pas apporté la réponse attendue. Avec des notes globales assez similaires de 14 et 15 (pour une note maximale possible à 25), les deux souches isolées étudiées ont été évaluées comme moins adaptées à notre problématique que la boue activée, avec une note à 17. La boue activée atteint ainsi la meilleure note avec une représentativité environnementale maximale et des résultats de capacité à biodégrader et de variabilité de résultats proches de ceux obtenus avec les souches isolées. Les hypothèses avancées

pour expliquer la variabilité des résultats quant à la capacité à biodégrader les deux substances modèles avec les souches isolées portent notamment sur le métabolisme des souches choisies. La souche *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718) est une bactérie Gram négatif nitrifiante aérobie facultative. Cette souche fait partie de la classe des beta-proteobacteria et est capable de moduler son métabolisme aérobie/anaérobie en fonction de la biodisponibilité de l'azote et de l'oxygène dans le milieu. La souche *Corynebacterium pseudodiphtericum* (CIP A105) est une bactérie Gram positif à haute teneur en GC (leur ADN contient un fort taux en paires de bases guanine-cytosine) et fait partie des Corynebacteriaceae. Le métabolisme de cette souche est aérobie "stricte". Toutefois, cette famille de microorganismes possède certaines particularités. En absence d'oxygène, un décalage métabolique leur permet de conserver de fortes activités fermentaires. La souche peut alors produire en anaérobiose un catabolisme de type fermentaire, en accumulant les métabolites intermédiaires qui finiront par diffuser dans le milieu (Delaunay et al., 2015). Pour ces 2 souches isolées, les conditions de pré-culture et d'oxygénation doivent donc être contrôlées rigoureusement pour éviter tout changement métabolique, qui pourrait occasionner des variations importantes du pourcentage de biodégradation. Sans rigueur suffisante, il est tout à fait possible d'observer des variations importantes dans leurs activités métaboliques, lors d'une culture. Un temps de pré-culture variable avec des souches entrant en phase stationnaire (ou fin de phase de croissance) et avec de fortes densités cellulaires ont pu conduire à des limitations en oxygène en fin de pré-culture impactant la physiologie des souches lors des tests de criblage (Mickaël Cregut, communications personnelles, GEPEA, Université de Nantes). Ces éléments sont associés aux contraintes techniques plus générales de l'étude comme le stress bactérien lors du cycle de congélation - décongélation, la mise en culture et la préparation de l'inoculum pour le test de biodégradabilité incluant des cycles de centrifugation pour les lavages des souches. Le lancement des tests de biodégradabilité en phase stationnaire de croissance (concentration élevée en souche lors du démarrage des tests et avec des capacités de biodégradation non optimales) et les conditions non stériles après lavage sont également susceptibles d'accentuer la variabilité des résultats de biodégradabilité obtenus avec ces deux souches. De manière plus générale, le choix d'une souche isolée comme inoculum n'est pas trivial. La complexité des structures chimiques étudiées induit des voies métaboliques de dégradation variées et successives. Une unique souche bactérienne pourrait ne pas avoir la capacité de toutes les exploiter (Sigoillot and Nguyen, 1990). Ainsi, sans dégradation complète de la structure, il peut être difficile d'estimer l'amélioration de la biodégradabilité obtenue, même avec une biodisponibilité accrue.

Sur la base des inocula évalués par la bibliographie et les tests, aucun ne semble correspondre parfaitement à l'étude de la biodégradabilité facile des substances peu hydrosolubles, que ce soit pour sa capacité à dégrader, sa variabilité, son applicabilité ou sa représentativité environnementale. De nombreux scientifiques se sont déjà penchés sur l'inoculum et son impact sur le test de

biodégradabilité facile. Les essais portant sur le préconditionnement de la boue activée ou sa substitution pour un inoculum plus simple (mélange bactérien commercial) ont montré soit une capacité de biodégradation plus faible soit un manque de reproductibilité similaire à la boue activée utilisée classiquement dans les conditions du test de biodégradabilité facile (Blok and Booy, 1984; Forney et al., 2001; Paixao, S.M., 2005; Struijs and Berg, 1995; Struijs et al., 1995; Vázquez-Rodríguez et al., 2011, 2007). Par contre, la préadaptation à la substance testée et l'augmentation de la concentration en microorganismes pour la boue activée au démarrage du test ont induit une amélioration de la reproductibilité et de la dégradation (Goodhead et al., 2014; Thouand et al., 2011, 1999, 1996; van Ginkel et al., 1995; Vázquez-Rodríguez et al., 2006). Ainsi, notre conclusion rejoint les études déjà réalisées sur ce sujet et confirme la boue activée comme étant l'inoculum le plus adapté au test de biodégradabilité facile. De plus, nous avons également montré, par analyse métagénomique, qu'il n'existait pas de relation entre diversité microbienne de l'inoculum boue activée et le résultat de biodégradabilité de nos substances modèles. D'autre part, une analyse statistique PERMANOVA appliquée aux résultats de métagénomique montre que la composition des 20 familles bactériennes majoritaires de cet inoculum est influencée par tous les paramètres étudiés (changement d'inoculum, ajout d'une MAB, d'une substance modèle ou d'une substance modèle associée à une MAB). Cependant, les MAB n'ont pas eu d'effet reproductible sur la composition bactérienne de l'inoculum et ne possèdent pas un effet spécifique sur l'orientation de l'inoculum. Par exemple, lors de l'essai E2 réalisé avec le MGZ, la famille *Sphingomonadaceae* va être fortement surexprimée en présence d'huile de silicone par rapport à l'addition directe. Lors de l'essai E5 réalisé également avec le MGZ, cette même famille va être légèrement sous-exprimée en présence d'huile de silicone par rapport à l'addition directe.

Au vu de la difficulté à évaluer la performance des MAB en présence d'un paramètre biologique aussi complexe et variable que l'inoculum boue activée, celle-ci aurait pu être évaluée par une analyse physico-chimique préliminaire au test de biodégradabilité, permettant de s'affranchir de l'inoculum. La qualité de la dispersion des substances modèles avec et sans MAB pourrait être réalisée soit par une analyse du carbone organique dissous (COD) permettant d'évaluer la fraction solubilisée de la substance lorsque les MAB physiques et chimiques dépourvues de carbone sont utilisées, soit par une analyse chimique spécifique pour les MAB avec additifs chimiques carbonés. Mais cette option n'aurait pu être qu'une première étape car elle n'aurait apporté qu'une réponse partielle à l'étude. En effet, certaines souches bactériennes, comme la Gamma-Proteobacteria *Nevskia,* sont des neustons, biocénose vivant à l'interface eau-air (Glöckner et al., 1998). Ce bactérioneuston joue un rôle important dans la dégradation des polluants toxiques concentrés dans la microcouche de surface (interface eau-air) (Contador, 2006). Ainsi, pour une substance de densité inférieure à 1 mieux solubilisée, la biodisponibilité va diminuer pour ces bactéries. Cela peut engendrer une compétition

entre ce bactérioneuston et les souches présentes dans le milieu, qui n'existait pas lorsque la substance flottait. En conséquence, l'évaluation de la biodisponibilité dans le milieu par analyse chimique ne peut nous dispenser d'une seconde étape d'évaluation de la biodégradabilité indispensable à une vision holistique de notre problématique.

Nous ne pouvons donc pas nous affranchir de la source principale de variabilité du test de biodégradabilité facile qu'est l'inoculum, rendant difficile l'interprétation et la comparaison des résultats. Ainsi, l'élaboration d'une stratégie d'évaluation est apparue comme indispensable pour comparer les MAB et optimiser les tests de biodégradabilité facile pour les substances peu hydrosolubles.

2. Stratégie d'évaluation des substances peu hydrosolubles

Les substances peu hydrosolubles posent des problèmes spécifiques de préparation pour l'évaluation de leur biodégradabilité facile qui ont amené à la recherche de méthodes améliorant leur biodisponibilité (Boethling, 1984; De Morsier, 1987; Fogel et al., 1985; Gerike, 1984; Nyholm, 1990; Painter and King, 1985; Painter, 1995; Thomas et al., 1986). L'ensemble de ces travaux a abouti à la norme ISO 10634 de 1995 (International Standard Organization (ISO), 1995) qui propose 4 types de méthodes de préparation des substances à tester : l'addition directe, la dispersion aux ultrasons, l'adsorption sur un support inerte, l'émulsion par un émulsifiant. Compte tenu du large spectre de méthodes que nous souhaitions étudier, il nous est apparu indispensable de mettre en place une stratégie permettant de comparer ces différentes méthodes d'amélioration de la biodisponibilité (MAB). Cette stratégie comporte trois étapes : (i) un test de criblage pour évaluer les différentes méthodes de préparation de la substance à tester, (ii) le calcul du ratio R_{MAB} qui permet de classer et sélectionner les méthodes d'intérêt en fonction d'une note attribuée aux résultats de biodégradabilité obtenus en criblage et (iii) un test de confirmation par un essai standard qui permet également de générer le résultat de biodégradabilité final.

La partie novatrice de cette stratégie repose sur le ratio R_{MAB} qui permet d'objectiver la comparaison des différentes méthodes pour toutes substances chimiques dans différents tests. En effet, la littérature a jusqu'alors basé la hiérarchisation des MAB pour une substance donnée essentiellement sur les observations de la suspension et la comparaison des résultats de biodégradabilité à 28 jours pour un même test (De Morsier, A., Blok, J., Gerike, P., Reynolds, L., Wellens, 1987; Gerike, 1984; Handley et al., 2002; Nyholm, 1990; van Ginkel et al., 2008). Ce ratio R_{MAB} permet de comparer les courbes de biodégradation d'une substance testée avec et sans MAB en prenant en compte trois paramètres : le début de la biodégradation (BT), le pourcentage de biodégradation à la fin de l'intervalle des 10 jours (Biod10) et le pourcentage de biodégradation à la fin de l'essai (BiodF). Nous avons choisi de donner un poids identique à chacun de ces paramètres. La valeur réglementaire de biodégradabilité pour la plupart des substances chimiques correspond, dans notre configuration d'essai, au résultat obtenu à la fin de l'intervalle des 10 jours. Ce Biod10 aurait donc pu se voir attribuer un coefficient majoré par rapport aux deux autres. Toutefois, la biodégradabilité finale est également un résultat qui permet de statuer sur la biodégradabilité facile des mélanges de structures chimiques homogènes (ex : triglycérides), mais également sur la persistance environnementale de l'ensemble des substances chimiques. Ce paramètre aurait donc également pu se voir attribuer un coefficient majoré. Le BT n'influe pas directement sur le résultat de biodégradabilité et n'est pas mis en avant comme un paramètre clé de la biodégradabilité dans les

textes de normalisation. De ce fait, le démarrage de la biodégradabilité pourrait voir son poids dans l'équation réduit. Cependant, il se présente comme un indicateur de l'accessibilité de l'inoculum à la substance. Il est donc difficile de sous-estimer son importance dans l'évaluation de la biodégradabilité de substances peu biodisponibles. Ainsi, l'importance respective des trois paramètres apparaît comme équivalente pour la problématique des substances peu solubles dans l'eau.

On remarque toutefois que, sur les 160 conditions traitées, certains R_{MAB} élevés ne sont pas révélateurs d'un fort impact sur la biodégradabilité. Ainsi, on obtient 4 R_{MAB} pour le MGZ dans 3 essais de criblage dont la valeur est supérieure à 3, mais dont le réel impact sur la biodégradabilité est faible. Cela est dû à la très faible valeur de biodégradabilité, évoluant de 6% à 11%, obtenue à 28 jours par addition directe pour ces essais. La MAB peut alors permettre de doubler la valeur de biodégradabilité obtenue à 28 jours sans pour autant avoir eu un fort impact car le résultat de biodégradabilité reste très inférieur au résultat de référence de 36% pour le MGZ. Pour éliminer cette limite du R_{MAB}, une note statistique est calculée pour chaque paramètre par combinaison de deux indicateurs statistiques : la taille d'effet et le test de contraste. Cette note statistique attribuant un score allant de -14 pour une MAB très défavorable à +14 pour une MAB favorable, a été détaillée dans *Matériel et méthodes Chapitre 5. 1. Analyses statistiques p.70*. Cette note statistique (Nst) est peu influencée par la valeur absolue des paramètres mesurés (BT, biod10 et BiodF). Cela permet de relativiser des R_{MAB} avec de fortes valeurs attribuées à des améliorations de biodégradabilité dont la valeur absolue est faible. Par exemple, pour le MGZ associé au Rhamnolipide E, on obtient un R_{MAB} à 13,4 qui semble révélateur d'une MAB très performante mais avec une BiodF de seulement 11% ; la Nst associée possède une valeur de 2 et permet ainsi de tempérer ce résultat avec un classement « favorable » et non pas « très favorable » comme le R_{MAB} le laissait présager. Il est donc possible, avec le R_{MAB} associé à sa Nst, de sélectionner la meilleure MAB à confirmer avec un test standard et de trier les MAB en fonction de leur impact sur le résultat de biodégradabilité.

Cette approche a permis de mettre en évidence 8 MAB d'intérêt sur 17 testées pour le solide MGZ et 7 MAB d'intérêt sur 23 pour le liquide IN qui ont été confirmées comme favorable à l'amélioration de la biodisponibilité par un test standard. L'étape de confirmation a permis de démontrer que la MAB identifiée comme favorable apporte, dans des conditions normalisées, un réel avantage pour la biodisponibilité et la biodégradabilité de la substance testée. La stratégie employée optimise la recherche de la méthode la plus adaptée à la substance pour mesurer sa biodégradabilité et cela, sans analyse chimique spécifique.

3. Méthodes d'amélioration de la biodisponibilité

Le test de biodégradabilité facile est réalisé en utilisant des concentrations en substance testée (quelques $mg.L^{-1}$) nettement supérieures aux concentrations rencontrées normalement dans le milieu aquatique naturel (Kowalczyk et al., 2015). L'évaluation à une concentration réaliste pour l'environnement de quelques ppb ($\mu g.kg^{-1}$) n'est expérimentalement pas réalisable avec les méthodes de mesures habituelles. Elle nécessiterait par exemple un radiomarquage ^{14}C pour la mesure du CO_2, une méthode non applicable à l'ensemble des substances organiques.

Avec les substances peu hydrosolubles, le problème de la concentration biodisponible lors des tests se pose avec acuité. En effet, ces substances ont des solubilités aqueuses très inférieures aux concentrations requises dans les tests de biodégradabilité facile. Ainsi, de même que le pH d'une substance acide ou basique est ajusté lors des essais d'écotoxicité pour évaluer la caractéristique intrinsèque d'écotoxicité sans l'action de son acidité ou sa basicité, la dispersion ou la solubilisation d'une substance peu hydrosoluble pour permettre son accessibilité aux bactéries paraît appropriée à la détermination de ses propriétés intrinsèques de biodégradabilité. Pour cette évaluation, l'état physique des substances peu hydrosolubles est une particularité à ne pas négliger (Gerike, 1984). C'est pour cela qu'un solide (MGZ) et un liquide (IN) ont été choisis comme substances modèles pour définir les méthodes améliorant la biodisponibilité les plus adaptées au test de biodégradabilité facile. Ces deux substances présentent un profil de biodégradabilité pertinent car elles possèdent une biodégradabilité facile non négligeable en addition directe dans un test réglementaire (36% pour MGZ et 35% pour IN) et leur capacité à franchir le seuil de 60% de biodégradabilité à la fin de l'intervalle des 10 jours a été établi sur la base d'analyse *in silico*. Cette évaluation a été réalisée selon deux séries de modèles reconnus par la réglementation, notamment européenne (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a). Les modèles de Biowin prédisent MGZ et IN comme facilement biodégradables. Les modèles de Catalogic prédisent une biodégradabilité facile limitée entre 18% et 51% pour MGZ mais sans métabolite stable. Pour IN, les résultats de biodégradabilité facile via Catalogic sont plus favorables et compris entre 58% et 92%. D'après ces calculs, les deux substances modèles sont ultimement biodégradables, ne conduisent pas à la formation de métabolites stables[18] et de ce fait, sont appropriées à l'évaluation des méthodes améliorant la biodisponibilité (MAB). Cette évaluation avait pour objectif de mettre en évidence deux aspects. D'une part, s'il existait une ou des MAB permettant d'accéder au statut facilement biodégradable pour ces substances. D'autre part,

[18] *Analyse réalisée par Jean-Charles Chenèble, L'Oréal Recherche et Innovation, sur les modèles Epi Suite Biowin v.4.10 et OASIS Catalogic 301C v.08.12, Kinetic 301B v.02.09, Kinetic 301F v.13.16.*

d'identifier les MAB les plus adaptées aux conditions d'essai du test de biodégradabilité facile. L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le tableau 30.

Tableau 30 : Résumé des résultats des MAB pour les substances MGZ et IN

Type de MAB	MAB déjà décrites	MGZ	IN
Huile de silicone	1- Association avec huile de silicone à 10 mL/L (sol. Mère)	-	☹
	2- Association avec huile de silicone à 1 mL/L (sol. Mère)	-	☹
	3- Association avec huile de silicone à 1 mL/L	☺	☺
	4- Association avec huile de silicone à 0,5 mL/L	☹	☹
Huile minérale	5- Association avec huile minérale - HMN 10 mg/L	☺	☺
Tensioactif	6- Association avec Pluronic 9400® 10 mg/L	☺	☺
Polymère	7- Association avec acide humique 10 mg/L	☺	☹
Broyage	8- Broyage	😐	-
Traitement aux ultrasons	9- Traitement aux ultrasons 10 min	☺	☺
Support solide	10- Pesée sur filtre en fibre de verre	-	😐
	11- Association à du gel de silice 5000 mg/L	-	☹
	12- Association à du gel de silice 500 mg/L	-	☹
	13- Association à du gel de silice 50 mg/L	☺	☺

Type de MAB	MAB exploratoires	MGZ	IN
Rhamnolipide	14- Association avec Rhamnolipide R 10 mg/L	😐	😐
	15- Association avec Rhamnolipide E 10 mg/L	😐	☹
Emulsion Pickering	16- Association avec cellulose nanocristalline (CNC) 10 mg/L par dispersion mécanique	😐	😐
	17- Association avec CNC 10 mg/L par traitement aux ultrasons 10 min	😐	😐
Dispersion par champs électromagnétiques	18- Milieu traité	☺	☺
	19- substance traitée	😐	😐
Dispersion mécanique	20- Utilisation d'un mélangeur passif*	-	-
Huile de silicone et traitement aux ultrasons	21- Association avec huile de silicone 1 mL/L et traitement aux ultrasons 10 min	☺	☺
	22- Association avec huile de silicone 0,5 mL/L et traitement aux ultrasons 30 min	-	☹
Tensioactif et huile de silicone	23- Association avec Pluronic 9400® 10 mg/L et huile de silicone à 10 mL/L	-	☹
	24- Association avec Pluronic 9400® 10 mg/L et huile de silicone à 1 mL/L	☺	☺

** Pour cette méthode, seule l'évaluation de la dispersion a été réalisée*

L'impact de la MAB peut être positif (☺), neutre/non confirmé (😐) ou négatif (☹) sur le résultat de biodégradabilité facile par rapport au test par addition directe

Parmi les 23 méthodes évaluées par des essais de biodégradabilité, certaines sont apparues comme pertinentes et ont été présentées dans le cadre de la publication détaillée dans *Résultats 3. Stratégie d'évaluation des substances peu hydrosolubles (Sweetlove et al., 2016)*. Le tensio-actif

Pluronic 9400® a notamment permis d'obtenir un résultat intéressant de biodégradabilité pour le MGZ avec 57% en test criblage et 39% en test standard à 28 jours, confirmant le potentiel des tensio-actifs pour cette application (Boethling, 1984; De Morsier, A., 1987; International Standard Organization (ISO), 1995; Kim et al., 2001; Li and Chen, 2009; Marcoux et al., 2000; Mohanty and Mukherji, 2013; Rodrigues et al., 2013). Toutefois, l'effet du Pluronic 9400® est plus modéré pour l'IN. Ce tensio-actif présente une biodégradabilité variable en fonction des essais, son utilisation comme source de cométabolisation par l'inoculum n'est donc pas à exclure. C'est une des raisons pour lesquelles les tensio-actifs sont parfois critiqués quant à leur utilisation comme vecteur de dispersion pour les essais de biodégradabilité et d'écotoxicité (ISO, 2006; OECD, 2000). D'autre part, ils ne sont pas forcément adaptés à la dispersion de toutes les structures chimiques (Bramwell, DAP and Laha, 2000; Laha and Luthy, 1992; Li and Chen, 2009; Marcoux et al., 2000; Nyholm, 1990; Rodrigues et al., 2013). L'utilisation d'un tensio-actif non toxique pour les bactéries et non biodégradable, est donc adaptée à notre problématique sous réserve d'identifier le candidat approprié et la concentration optimale à la dispersion de la substance testée.

Nous confirmons également l'intérêt de l'acide humique (Van Ginkel et al., 2008; Smith et al., 2009) sur le MGZ mais celui-ci a également été la seule MAB sélectionnée à être confirmée comme ayant un impact négatif sur la biodisponibilité de l'IN. Cet impact négatif, non décrit dans la littérature pour l'application à l'évaluation de la biodégradabilité, peut s'expliquer par la diversité des acides humiques. Il existe une multitude d'acides humiques qui sont définis par le prélèvement de l'humus et la méthode de purification employée (Sugahara and Inoko, 1981). Ainsi, l'optimisation de l'utilisation de l'acide humique nécessite la connaissance de ces deux paramètres et la détermination de sa concentration optimale d'utilisation de la même manière que pour les autres familles de dispersant comme les tensio-actifs. Toujours dans les méthodes chimiques, les huiles de silicone et minérale ont un profil intéressant car ces huiles sont non biodégradables, non toxiques pour les bactéries et ont apporté des résultats de biodégradabilité améliorés pour le solide et le liquide étudiés. Nos travaux ont corroboré l'intérêt de l'huile de silicone (Marcoux et al., 2000; Muñoz et al., 2006; van Ginkel et al., 2008; Darracq et al., 2012), et des huiles minérales (Auffret et al., 2009; Boethling, 1984; Sweetlove et al., 2016) pour améliorer la biodisponibilité des substances testées dans le contexte de l'évaluation de la biodégradabilité. La concentration de l'huile de silicone a été optimisée à 1 $mL.L^{-1}$ au lieu de 10 $mL.L^{-1}$ (van Ginkel et al., 2008) alors que pour l'huile minérale, la concentration proposée par la norme ISO 10634 (International Standard Organization (ISO), 1995) pour les émulsifiants à 10 $mg.L^{-1}$ a permis d'améliorer la biodisponibilité de nos deux substances modèles. Notons aussi, qu'il existe une grande diversité d'huiles de silicone ou minérale disponibles dans le commerce, induisant la possibilité d'optimiser le couple huile / substance à tester. L'utilisation d'un support inerte comme le gel de silice, a été confirmé comme pertinent (Handley et al., 2002; van Ginkel et al., 2008). Sa simplicité

d'utilisation, le fait de ne pas être une source de carbone pour l'inoculum et la preuve de la possibilité de l'utiliser sans solvant même pour certain solide en font une méthode intéressante pour une majorité de substances chimiques. Enfin, la dispersion aux ultrasons, déjà mise en évidence comme pertinente pour disperser la substance à évaluer (Boethling, 1984; Gerike, 1984; De Morsier, A., 1987; Nyholms, 1990), s'est révélée d'intérêt seule et en association avec l'huile de silicone. Finalement, aucune de ces méthodes déjà décrites n'a permis de franchir le seuil de 60% à 28 jours pour MGZ et IN, que ce soit dans les tests de criblage ou dans les tests de confirmation. En conséquence, nous avons choisi de réaliser une évaluation de différentes techniques novatrices ou de nouvelles approches, comme les associations de méthodes (tensioactif et huile de silicone ou huile de silicone et traitement aux ultrasons).

Dans la logique de l'utilisation d'un support inerte comme le gel de silice, l'utilisation d'un support solide nanométrique ou micrométrique comme support d'une dispersion de type émulsion Pickering a semblé être une voie d'investigation intéressante. Malheureusement, la cellulose nanocristalline testée, premier support chimique novateur, s'est avérée facilement biodégradable et n'a donc pas répondu au cahier des charges de l'étude. D'autres supports, sous forme nanométrique, non biodégradables et non toxiques pour les bactéries, pourraient apporter l'élément manquant à la réalisation de cette méthode. Ils n'ont pas été identifiés jusqu'à présent. Le second support chimique novateur, les rhamnolipides, n'a pas permis, malgré une capacité de dispersion intéressante, d'obtenir des résultats de biodégradabilité supérieurs à ceux obtenus avec le tensio-actif chimique Pluronic 9400®. Ces rhamnolipides, tensio-actifs produits naturellement par des microorganismes, présentent un potentiel à explorer (Congiu et al., 2015; Owsianiak et al., 2009), avec une légitimité environnementale accrue par rapport aux supports chimiques. Cependant, les rhamnolipides, comme la cellulose nanocristalline, possèdent une biodégradabilité élevée susceptible d'induire un phénomène de cométabolisation ; bien que, d'après nos études, ce phénomène n'ait pas été mis en évidence comme prépondérant dans nos conditions d'essai. Une recherche approfondie d'alternatives non biodégradables de ce type de support pourrait présenter un intérêt pour valoriser cette approche. Les rhamnolipides bactériens jouent un rôle sur la mobilité des bactéries, la virulence bactérienne, la création de biofilm et la solubilisation des substances difficilement accessibles (peu hydrosolubles). Notons toutefois que toutes les bactéries ne produisent pas de rhamnolipide. De plus, leur action sur la membrane bactérienne pour augmenter le contact entre la substance présente dans le milieu environnant et la bactérie est spécifique à chaque bactérie qui va produire le rhamnolipide utilisé (Chrzanowski et al., 2012; Zhang and Miller, 1995, 1994). Cette action engendre l'amélioration de la solubilisation des substances à métaboliser et la modification des structures cellulaires externes des bactéries permettant un contact facilité entre la cellule bactérienne et la source de carbone, et peut donc conduire à une augmentation de la biodégradabilité (Chrzanowski et al., 2012). Cette spécificité

rhamnolipide/bactérie peut être un frein à la prise en charge de la substance testée par un inoculum diversifié. Ainsi, ces éléments peuvent expliquer le résultat neutre que nous avons obtenu avec le rhamnolipide E pour la substance IN.

Une méthode physique novatrice a également été étudiée : la dispersion par champs électromagnétiques. Dans sa configuration actuelle, cette méthode n'est pas encore adaptée à un déploiement en routine. En effet, la préparation ne peut être effectuée que par la société BioPhys - Solutions® et son coût est élevé comparé aux autres méthodes de dispersion que nous avons étudiées. Il est de plus indispensable, comme pour le traitement aux ultrasons, de vérifier la conservation de l'intégrité de la structure chimique de la substance testée par analyse chimique spécifique. Cette méthode, appliquée directement sur la substance, a permis d'obtenir des résultats encourageants pour MGZ. Compte tenu de ses contraintes de mise en œuvre, elle est plutôt adaptée à l'acquisition de connaissance pour une substance donnée. De plus, l'utilisation du traitement par champs électromagnétiques appliqué uniquement au milieu minéral s'est révélée être une approche pertinente de dispersion (Busch, K. W. and Busch, 1997; Vallée, 2004) pour les deux substances modèles, permettant notamment à l'IN de franchir le seuil de 60% de biodégradation à 28 jours dans un test de criblage. Ce traitement nécessite néanmoins une exploration plus approfondie de son mode d'action sur le milieu minéral pour pouvoir être intégrée comme méthode de dispersion dans les lignes directrices d'essai.

Une autre approche exploratoire, totalement différente, a été envisagée. Il s'agit d'améliorer les bioréacteurs utilisés pour les tests de biodégradabilité facile, en optimisant le mélange réactionnel par l'association d'une pompe et d'un mélangeur statique. Le dispositif le plus performant possède une pompe de débit de 1,6 $L.min^{-1}$ et est équipé d'un mélangeur statique en forme de grille (Xgrid) adapté aux concentrations de test. Ce système favorise les turbulences et devrait assurer le maintien de la dispersion dans le temps. Le choix de ce dispositif doit être confirmé avec des essais incluant l'inoculum. Il sera intéressant de vérifier si les capacités de métabolisation de l'inoculum ne sont pas altérées par les turbulences générées. Dans le cas d'une amélioration de la biodisponibilité et de la biodégradabilité, un travail d'optimisation des réacteurs permettra de finaliser la mise en place de ce mélangeur statique. Les premiers essais prospectifs avec inocula ont été réalisés sur des périodes inférieures à 28 jours et n'ont pas présenté de résultats probants, mais les conditions d'essai (inoculum, concentration, montage) sont en cours d'optimisation. Une autre alternative pour créer des turbulences serait d'utiliser des flacons avec baffles (verre chicane) qui, à l'aide d'une agitation avec barreau aimanté classiquement utilisée pour le mélange des flacons. Cela pourrait apporter une réponse à la dispersion avec une mise en œuvre plus simple.

Dans un dernier temps, nous avons expérimenté des associations de méthodes, qui ont conduit à 51% de biodégradabilité à 28 jours pour les deux substances modèles, soit les meilleurs

résultats obtenus dans des tests standards. Ces études sur la complémentarité des modes de dispersion ont ainsi été les voies les plus performantes, démontrant une meilleure biodisponibilité des substances que celle obtenue en utilisant les méthodes (huile de silicone et traitement aux ultrasons par exemple) prises individuellement. Ainsi, l'association huile de silicone et tensioactif a démontré la non persistance du MGZ dans un test de criblage avec un résultat à 69% à 28 jours.

L'ensemble de ces résultats montrent aussi qu'il existe une certaine spécificité de l'effet des MAB au type de substance testée, solide ou liquide. En effet, parmi les 24 méthodes étudiées (déjà décrites et novatrices), le solide MGZ a trouvé sa biodisponibilité fortement améliorée avec l'huile minérale (R_{MAB} = 1,26), l'acide humique (R_{MAB} = 1,33) et l'association huile de silicone et tensio-actif (R_{MAB} = 1,32). Pour le liquide IN, on retrouve, pour les meilleures MAB, l'huile minérale (R_{MAB} = 1,34), le gel de silice (R_{MAB} = 1,27) et l'association huile de silicone et tensio-actif (R_{MAB} = 1,28). La recherche de nouvelles MAB et d'optimisation des MAB présentées est toujours une voie d'exploration car les connaissances acquises pour ces méthodes ne sont probablement pas applicables à l'ensemble des solides et liquides peu hydrosolubles. On note cependant que les MAB huile minérale et l'association huile de silicone et tensio-actif semblent être polyvalentes.

Les expérimentations réalisées avec des méthodes novatrices ont permis de révéler la non persistance du MGZ et d'IN lors d'essais de criblage. Ces résultats ne sont pas réglementairement exploitables car seules les méthodes proposées dans les normes en vigueur possèdent une légitimité quant à leur utilisation dans les tests de biodégradabilité facile (European Chemicals Agency (ECHA), 2014a). Il a donc semblé pertinent de présenter ces résultats afin de faire évoluer la norme pilier ISO 10634 de 1995 (International Standard Organization (ISO), 1995) qui décrit les méthodes améliorant la biodisponibilité des substances peu hydrosolubles en vue d'évaluer leur biodégradabilité. Ces évolutions intègrent notamment (i) de nouvelles méthodes d'amélioration de la biodisponibilité (huile de silicone, huile minérale, association de méthodes) ainsi que des méthodes exploratoires en développement (biotensioactif et émulsion pickering) et (ii) la suppression de certains additifs chimiques facilement biodégradables comme le tensioactif Tween 85® et les solvants pentane, acétone, n-hexane et dicholomethane ; ainsi que le solvant 1,1-dichloro-1-fluoroethane qui a été interdit en 2015 car il détruit la couche d'ozone (Union Européenne, 2009).

V. Conclusion et perspectives

1. Conclusion

Le test de biodégradabilité facile est le test de première intention le plus communément utilisé pour évaluer la biodégradabilité d'une substance chimique dans l'environnement. C'est un test simple et facilement réalisable car il fait appel à des mesures non spécifiques à la substance à tester. Toutefois, sa mise en œuvre se complexifie lorsque la substance à tester possède des caractéristiques comme une faible hydrosolubilité, une toxicité microbienne, une forte adsorbabilité, ou s'il s'agit d'un mélange. Or, les substances faiblement hydrosolubles représentent environ un tiers des substances chimiques commercialisées. Il est donc essentiel de pouvoir évaluer leur biodégradabilité facile de la façon la plus pertinente afin d'obtenir la meilleure connaissance possible de leur devenir dans l'Environnement. L'objectif de cette thèse a ainsi été le développement d'une stratégie et de méthodes permettant d'améliorer la mesure de biodégradabilité facile prédictive de la biodégradabilité en milieu naturel pour les produits organiques faiblement hydrosolubles.

Pour se faire, nous avons commencé par un travail conséquent de sélection des substances modèles. Cela a nécessité une recherche approfondie des caractéristiques physico-chimiques et environnementales de plus d'un millier de substances pour aboutir à la sélection du Mexanyl GZ et de l'Isodecyl Neopentanoate présentant respectivement une biodégradabilité facile de référence à 36% et 35% à 28 jours.

Nous avons ensuite étudié la variabilité inter-essais du test de biodégradabilité facile qui est élevée, en particulier lors des essais menés sur les substances peu hydrosolubles. Parmi les différentes sources pénalisant la reproductibilité des résultats, nous avons démontré que le milieu d'essai et les flacons constitués de polypropylène et de Nalgene® utilisés pour les essais de criblage étaient des sources négligeables de variabilité. La pesée de la substance n'induisait par ailleurs qu'environ 10% de variabilité entre les essais. Les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité conduisent, quant à elles, à une variabilité équivalente à celle obtenue avec la méthode de référence (addition directe), il n'y a donc pas d'augmentation de la variabilité induite par les MAB. Par contre, la boue activée, inoculum généralement utilisé dans ce type de test, va engendrer une variabilité élevée pouvant doubler le résultat de biodégradabilité obtenu pour une même substance d'un essai à l'autre. Pour mieux comprendre ce facteur majeur de la variabilité, l'inoculum boue activée a été analysé par métagénomique. Cette étude a permis de démontrer que les étapes de préparation de la boue activée n'ont pas d'incidence sur sa diversité et les familles majoritairement représentatives qui le constituent.

Sa composition bactérienne après 28 jours dans le milieu minéral n'est, par contre, pas prédictible. En conséquence, l'amélioration des connaissances sur cet inoculum ne donne pas de solution pour limiter son impact sur la variabilité des résultats du test de biodégradabilité facile. Pour s'affranchir de cette variabilité et après avoir envisagé différentes alternatives comme la pré-adaptation, le préconditionnement et les inocula multibactériens commercialisés, nous avons décidé d'utiliser des souches bactériennes isolées. Parmi un panel de 48 souches représentatives de la boue activée, nous avons sélectionné les deux souches candidates possédant le meilleur profil de capacité de biodégradation des deux substances modèles. Cette approche a permis d'obtenir une meilleure biodégradabilité de nos substances modèles qu'avec la boue activée, mais n'a pas réduit la variabilité du test provenant de l'inoculum. La boue activée reste donc l'inoculum le plus adapté pour évaluer la biodégradabilité facile des substances chimiques peu hydrosolubles.

Confrontés à cette variabilité due à l'inoculum microbien et au nombre important de MAB à étudier, nous avons élaboré une stratégie d'évaluation de la biodégradabilité facile adaptée aux substances faiblement hydrosolubles. Cette stratégie commence par un test de criblage qui permet d'évaluer un grand nombre de méthodes améliorant la biodisponibilité en s'appuyant sur un appareillage de grande capacité (95 flacons de 150 mL), le Respicond VI®. Afin de comparer les résultats de ces tests, nous avons développé un outil mathématique, le ratio R_{MAB} qui permet de comparer les paramètres de biodégradation d'une substance testée avec MAB et par addition directe en prenant en compte trois critères : le début de la biodégradation (BT), le pourcentage de biodégradation à la fin de l'intervalle des 10 jours (Biod10) et le pourcentage de biodégradation à la fin de l'essai (BiodF). Ce ratio R_{MAB} a été associé à une note statistique afin de sélectionner les MAB les plus performantes. Un test de confirmation, réalisé selon la ligne directrice OCDE 301B, finalise cette stratégie et permet de déterminer le potentiel réel de biodégradabilité facile dans des conditions optimisées. Cette stratégie a été éprouvée sur nos 2 substances modèles avec 13 MAB déjà décrites. Lors des essais de confirmation et avec ces MAB, les meilleurs résultats de biodégradabilité facile obtenus pour nos deux substances modèles ont été de 39% pour le MGZ et de 46% pour IN à 28 jours.

Or, notre objectif était également de rechercher la non persistance de ces deux substances modèles, c'est-à-dire le franchissement du seuil de 60% de biodégradabilité à 28 jours, comme prédit par des modélisations mathématiques. Nous avons ainsi développé ou adapté 11 méthodes de préparation des échantillons novatrices pour améliorer la biodisponibilité de ces substances. En comparant toutes les méthodes déjà décrites et novatrices, le solide a trouvé sa biodisponibilité fortement améliorée avec l'huile minérale (R_{MAB} = 1,26), l'acide humique (R_{MAB} = 1,33) et l'association huile de silicone et tensio-actif (R_{MAB} = 1,32). Pour le liquide, on retrouve, pour les meilleures MAB, l'huile minérale (R_{MAB} = 1,34), le gel de silice (R_{MAB} = 1,27) et l'association huile de silicone et tensio-actif (R_{MAB} = 1,28). Les résultats de biodégradabilité obtenus lors des essais de confirmation ont atteint,

pour le solide MGZ, 51% à 28 jours avec l'association huile de silicone et traitement aux ultrasons et 51% à 28 jours pour le liquide IN associé à la méthode huile de silicone et tensio-actif. L'expérimentation de l'ensemble de ces méthodes nous a permis de rendre compte de leur applicabilité et de leur capacité à rendre une substance, qu'elle soit solide ou liquide, plus accessible aux microorganismes. Nous avons aussi souhaité nous assurer que les MAB n'avaient pas d'impact sur l'inoculum. Les analyses métagénomiques réalisées ont montré que l'influence des MAB sur la composition de l'inoculum était limitée et non reproductible. Ainsi, les MAB n'ont pas un effet spécifique de sélection sur la composition bactérienne de l'inoculum. Fort de l'ensemble de ces éléments, cette stratégie d'évaluation a été déployée chez L'Oréal à des fins de criblage interne.

Cette étude globale de comparaison des méthodes d'amélioration de la biodisponibilité a été proposée pour contribuer à la révision de la norme ISO 10634 « Lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux ». Les propositions avancées ont été de restructurer le document, d'éliminer les additifs chimiques de type tensio-actif et solvant précédemment proposés et non adaptés car facilement biodégradable ou toxique, de proposer de nouvelles méthodes déjà éprouvées comme l'huile de silicone, l'huile minérale et la combinaison huile de silicone avec traitement aux ultrasons, ainsi que de nouvelles méthodes à explorer comme l'émulsion Pickering et l'utilisation de biotensioactif. La norme ISO 10634 mise à jour devrait paraitre fin 2018.

2. Perspectives

Lors de l'élaboration de la stratégie d'évaluation de la biodégradabilité facile pour les substances peu hydrosolubles, les MAB ont été étudiées dans des conditions d'essai relativement proches de celles décrites dans les normes expérimentales et la littérature scientifique. Ceci ne veut pas dire pour autant que les concentrations utilisées pour certains additifs chimiques, comme le tensio-actif, aient été optimales. Ainsi, l'exploration plus avant de méthodes pouvant conduire à la création d'une émulsion optimisée nécessiterait un ajustement des concentrations de l'additif chimique et de la substance à tester dans le milieu minéral (diagramme ternaire). Pour la nouvelle méthode physique, l'évaluation de la mise en dispersion de la substance à tester dans un milieu prétraité par champs électromagnétiques est une voie qui a permis d'obtenir des résultats prometteurs en criblage pour les deux substances modèles de cette étude avec une biodégradabilité facile à 50% pour MGZ et 66% pour IN à 28 jours. Une confirmation de l'intérêt de cette méthode présenterait donc un intérêt, même si son application à un grand nombre de substances ne paraît pas envisageable compte tenu de son coût. Enfin, le système de flacon d'essai avec mélangeurs statiques offre une nouvelle piste d'amélioration de la biodisponibilité sans ajout de substance chimique ni traitement appliqué sur le mélange réactionnel.

La connaissance de l'impact des MAB sur l'inoculum serait aussi à approfondir. En effet, après avoir étudiée l'influence des MAB sur la composition de l'inoculum en fin de test, il serait intéressant de comprendre l'évolution de l'inoculum lors de la phase de dégradation de la substance. Par l'intermédiaire de nouvelles voies d'exploration (métabolomique, métaprotéomique) (Kowalczyk et al., 2015), il serait possible d'identifier les modes d'action mis en jeu par les bactéries pour métaboliser la substance testée. Les données générées par ces études permettraient notamment d'améliorer les modèles mathématiques de prédiction de la biodégradabilité.

On note également que lorsque la substance est soluble dans l'eau, son accessibilité aux bactéries est immédiate et le processus de métabolisation s'effectue rapidement. Mais lorsque la substance est peu hydrosoluble, sa biodisponibilité est réduite, impliquant une adaptation métabolique de l'inoculum qui augmente le temps de démarrage du processus de biodégradation. La pertinence du paramètre « intervalle de 10 jours » pour statuer de la biodégradabilité facile des substances peu hydrosolubles est ainsi remise en cause car la faible biodisponibilité de la substance peut induire une biodégradation avec une cinétique plus lente. Ce paramètre, qui a déjà été supprimé pour statuer sur la biodégradabilité facile des mélanges chimiquement homogènes, tels les tensio-

actifs, est donc également discutable pour les substances peu hydrosolubles (Painter, 1995; Richterich and Steber, 2001; Richterich K., Berger H., 1998).

De plus, la question de l'adaptabilité métabolique de l'inoculum vis-à-vis d'une substance testée plus difficilement accessible soulève également la question de la répartition du carbone de la substance dans le flacon d'essai lors de la biodégradation. Ainsi, la réalisation d'un bilan carbone complet lors du test de biodégradabilité permettrait de mettre en évidence, d'une part la partie minéralisée de la substance et d'autre part les parties adsorbées sur l'inoculum ou sur le flacon, intégrée à la biomasse ou toujours solubilisée dans le milieu d'essai. L'intégralité du carbone de la substance serait ainsi tracée et son devenir dans l'environnement pourrait être mieux estimé, répondant ainsi à l'évaluation des substances difficiles à tester comme les peu hydrosolubles et les mélanges.

Enfin, la connaissance de la biodégradabilité des substances peu hydrosolubles est fortement liée à la biodisponibilité. La présence de ces substances à des concentrations de l'ordre du ppb dans le milieu naturel aquatique aboutit, dans la plupart des cas, à une dilution permettant une meilleure solubilisation ou dispersion de la substance. En conséquence, pour définir le réel potentiel de dégradation rapide dans la nature des substances peu hydrosolubles, le test de biodégradabilité facile pourrait être adapté. Nous avons ainsi identifié deux possibilités d'adaptation : tester à des concentrations de l'ordre du ppb, proches des concentrations du milieu naturel ou rendre la substance biodisponible. La première possibilité nécessite typiquement un radiomarquage ^{14}C pour la mesure du CO_2, et n'est ni généralisable à l'ensemble des substances organiques, ni envisageable en routine. La deuxième possibilité, l'augmentation de la biodisponibilité de la substance à tester par des MAB est donc la plus pertinente : sans mimer l'environnement, les MAB permettent de s'approcher de la biodisponibilité environnementale de la substance. Cela aboutissant à la détermination de la biodégradabilité dans des conditions plus réalistes des substances peu hydrosolubles.

La stratégie innovante décrite dans ce manuscrit permet d'améliorer la prédiction de la biodégradabilité en milieu naturel de substances chimiques organiques faiblement hydrosolubles. Cette connaissance plus précise de la biodégradabilité est un élément essentiel pour le développement de nouveaux produits plus respectueux de l'environnement en s'inscrivant dans une démarche de développement durable.

Bibliographie

Abdel-mawgoud, A.M., 2010. Rhamnolipids : diversity of structures , microbial origins and roles. Appl Microbiol Biotechnol 86, 1323–1336. doi:10.1007/s00253-010-2498-2

Abrusci, C., Palomar, J., Pablos, J.L., Catalina, F., 2011. Green Chemistry Efficient biodegradation of common ionic liquids by Sphingomonas paucimobilis bacterium † 709–717. doi:10.1039/c0gc00766h

AFNOR, 2004. NF EN ISO 14852 Évaluation de la biodégradabilité aérobie ultime des matériaux plastiques en milieu aqueux - Méthode par analyse du dioxyde de carbone libéré.

AFNOR, 2000. NF EN 13432 Exigences relatives aux emballages valorisables par compostage et biodégradation - Programme d'essai et critères d'évaluation de l'acceptation finale des emballages.

AFNOR, 1997. NF EN 1484 - Analyse de l'eau - Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (TOC) et carbone organique dissous (COD). AFNOR Norm.

Aissaoui, S., Sifour, M., Sghaier, H., Jamoussi, B., 2017. Microbial Removal of Sulfamethoxazole by Pure Bacterial Cultures Isolated from the Environment 8, 2147–2153.

Aldric, J., 2009. Mise au point d'un réacteur biphasique eau/huile de silicone destiné au traitement des composés organiques volatils hydrophobes au sein des effluents gazeux. Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.

Alizadeh Kaloorazi, N., Fekri Sabet Choobari, M., 2013. Biosurfactants: Properties and Applications. J. Biol. Today's World 2, 235–241.

Alkhatib, M.F., Alam, Z., Shabana, H.F.M., 2015. Isolation of bacterial strain for biodegradation of fats , oil and grease 19, 138–143.

Al-tahhan, R. a, Sandrin, T.R., Bodour, A. a, Maier, R.M., 2000. Rhamnolipid-Induced Removal of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on Cell Surface Properties and Interaction with Hydrophobic Substrates. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3262–3268. doi:10.1128/AEM.66.8.3262-3268.2000.Updated

Angelova, B., Schmauder, H., 1999. Lipophilic compounds in biotechnology-interactions with cells and technical problems. J Biotechnol. 67, 13–32.

Aronstein, B., Alexander, M., 1992. Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sands and soil slurries. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1227–1233.

Auffret, M., Labbé, D., Thouand, G., Greer, C.W., Fayolle-Guichard, F., 2009. Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by Rhodococcus aetherivorans and Rhodococcus wratislaviensis. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7774–7782. doi:10.1128/AEM.01117-09

Augustin, J., 2005. Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. Université Paris XII Val de Marne.

Baleux, B., Got, P ., Bibent, B., 1991. Etude des possibilités de caractérisation des inocula utilisés pour la réalisation biodegradation. Rapp. Final Ministère l'Environnement.

Benbelkacem, R., Desjardin, V., Ducom, G., Gourdon, R., 2006. Association de bioprocédés à d'autres procédés dans le traitement ex situ de déchets et sols pollués.

Ben-Naim, A., 1980. Hydrophobic Interactions. Plenum Press, New York.

Blok, J., 2001. A single model for mass transfer and growth for biodegradation rates in activated sludge. Ecotoxicol. Environ. Saf. 48, 148–60. doi:10.1006/eesa.2000.1964

Blok, J., Booy, M., 1984. Biodegradability test results related to quality and quantity of the inoculum. Ecotoxicol. Environ. Saf. 8, 410–22.

Boatman, R.J., Cunningham, S.L., Ziegler, D.A., 1986. A method for measuring the biodegradation of organic chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 5, 233–243. doi:10.1002/etc.5620050302

Boethling, R.S., 1984. Biodegradation testing of insoluble chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 3, 1–7.

Boudreau, N., Daugulis, A., 2006. Transient Performance of Two-Phase Partitioning Bioreactors Treating a Toluene Contaminated Gas Stream. Wiley Intersci. doi:10.1002/bit.20876

Bramwell, DAP, Laha, S., 2000. Effect of surfactant addition on the biomineralization and microbial toxicity of phenanthrene. Biodegradation 11, 263–277.

Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. Chemosphere 82, 1518–1532. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.018

Buitron, G., Koefoed, A., Capdeville, B., 1993. Control of Phenol Biodegradation by Using CO_2 Evolution Rate as an Activity Indicator. Environ. Technol. doi:10.1080/09593339309385284

Busch, K. W. and Busch, M.A., 1997. Laborator studies on magnetic water treatment and their relationship to a possible mechanism for scale reduction. Desalination 109, 131–148.

Carmichael, L.M., Christman, R.F., Pfaender, F.K., 1997. Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. Environ. Sci. Technol. 31, 126–132. doi:10.1021/es9602105

CE Commission Européenne, 2013. Mise en place du marché unique des produits verts - Faciliter l'amélioration de l'information relative à la performance environnementale des produits et des organisations. Commun. LA Comm. AU Parlem. Eur. AU Cons. 1–14.

Chain, P., Lamertin, J., Whittaker, M., 2003. Complete Genome Sequence of the Ammonia-Oxidizing Bacterium and Obligate Chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. J. Bacteriol. 185, 2759–2773. doi:10.1128/JB.185.9.2759

Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł., Czaczyk, K., 2012. Why do microorganisms produce rhamnolipids? World J. Microbiol. Biotechnol. 28, 401–419. doi:10.1007/s11274-011-0854-8

Congiu, E., Parsons, J.R., Ortega-Calvo, J.-J., 2015. Dual partitioning and attachment effects of rhamnolipid on pyrene biodegradation under bioavailability restrictions. Environ. Pollut. 205, 378–384. doi:10.1016/j.envpol.2015.07.013

Connaughton, D.F., Stedinger, J.R., Lion, L.W., Shuler, M.L., 1993. Description of time-varying desorption kinetics: release of naphthalene from contaminated soils. Environ. Sci. Technol. 27, 2397–2403. doi:10.1021/es00048a013

Contador, L., 2006. Etude de la structure chimique et microbiologique de l'interface air-mer en Baie de Guanabara (Rio de Janeiro, Bresil). Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.

Cosmetics Europe, 2012. Cosmetics Europe SPERC fact sheet - Wide Dispersive Use of Cosmetic Products 1–7.

Dailey, R., Daniel, M., Leber, a P., 2013. Biodegradability of the antioxidant diaryl-p-phenylene diamine using a modified inherent biodegradation method at an environmentally relevant concentration. Chemosphere 93, 1023–8. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.05.072

Darracq, G., Couvert, A., Couriol, C., Thomas, D., Amrane, A., Dumont, E., Andres, Y., Le Cloirec, P., 2012. Optimization of the volume fraction of the NAPL, silicone oil, and biodegradation kinetics of toluene and DMDS in a TPPB. Int. Biodeterior. Biodegrad. 71, 9–14. doi:10.1016/j.ibiod.2012.03.004

De Morsier, A., Blok, J., Gerike, P., Reynolds, L., Wellens, H., 1987. Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere 16, 833–847.

De Wilde B, 2005. International and national norms on biodegradability and certification procedures., in: Rapra Technology Ltd. (Ed.), Handbook of Biodegradable Polymers. Shewsbury.

Delaunay, S., Kaboré, A.., Cregut, M., Huang Bao Truc, K., Guedon, E., 2015. Anaerobic Production of Organic Acids and Alcohols with *Corynebacterium glutamicum*, in: New Trends in Corynebacterium Glutamicum: Beyond the Amino Acids. Nova Science Publishers, p. 26.

Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 47–64.

Díaz-Cruz M. S., B.D., 2015. Personal Care Products in the Aquatic Environment, Springer.

Dlugonski, J., 2016. Microbial biodegradation From Omics to function and Application. Caister Academic Press. doi:https://doi.org/10.21775/9781910190456

Doumeix, O., 2011. Opérations unitaires en génie biologique - Tome 1 Les émulsions.

Dumont, E., Andrès, Y., Le Cloirec, P., 2006. Mass transfer coefficients of styrene and oxygen into silicone oil emulsions in a bubble reactor. Chem. Eng. Sci. 61, 5612–5619. doi:10.1016/j.ces.2006.04.026

Esfandyari, Y., Mahdavi, Y., Seyedsalehi, M., Hoseini, M., Safari, G.H., Ghozikali, M.G., Kamani, H., Jaafari, J., 2015. Degradation and biodegradability improvement of the olive mill wastewater by peroxi-electrocoagulation/electrooxidation-electroflotation process with bipolar aluminum electrodes. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 6288–6297. doi:10.1007/s11356-014-3832-5

European Chemicals Agency (ECHA), 2017. Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R . 7b : Endpoint specific guidance. doi:10.2823/84188

European Chemicals Agency (ECHA), 2014a. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7b: Endpoint specific guidance.

European Chemicals Agency (ECHA), 2014b. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R11 : PBT/vPvB assessment. ECHA.

European Chemicals Agency (ECHA), 2012. Guidance on information requirements and chemical safety assessment Chapter R.16: Environmental Exposure Estimation.

Falissard, B., 2005. Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie, MASSON. ed.

Fang, J., Lee, D., 2001. Micromixing efficiency in static mixer. Chem. Eng. Sci. 56, 3797–3802.

Fitzmaurice, G.D., Gray, N.F., 1989. Evaluation of manufactured inocula for use in the BOD test. Water Res. 23, 655–657. doi:10.1016/0043-1354(89)90032-8

Fogel, S., Lancione, R., Sewall, A., Boethling, R.S., 1985. Application of biodegradability screening tests to insoluble chemicals: hexadecane. Chemospherre 14, 375–382.

Forney, L.J., Liu, W.T., Guckert, J.B., Kumagai, Y., Namkung, E., Nishihara, T., Larson, R.J., 2001. Structure of microbial communities in activated sludge: potential implications for assessing the biodegradability of chemicals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 49, 40–53. doi:10.1006/eesa.2001.2034

Gao, H., Xu, L., Cao, Y., Ma, J., Jia, L., 2013. Effects of hydroxypropyl-β-cyclodextrin and β-cyclodextrin on the distribution and biodegradation of phenanthrene in NAPL-water system. Int. Biodeterior. Biodegradation 83, 105–111.

García-Junco, M., De Olmedo, E., Ortega-Calvo, J.J., 2001. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium Pseudomonas aeruginosa 19SJ. Environ. Microbiol. 3, 561–569. doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00223.

Gerike, P., 1984. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere 13, 169–190. doi:10.1016/0045-6535(84)90018-3

Glöckner, F.O., Babenzien, H., Amann, R., 1998. Phylogeny and Identification In Situ of *Nevskia ramosa*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1895–1901.

Godon J.-J., Zumstein E., Dabert P., Habouzit F., Moletta R., 1997. Microbial SSU rDNA diversity in an anaerobic digestor. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2802–2813.

Goodhead, A.K., Head, I.M., Snape, J.R., Davenport, R.J., 2014. Standard inocula preparations reduce the bacterial diversity and reliability of regulatory biodegradation tests. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 9511–9521. doi:10.1007/s11356-013-2064-4

Gourlay-Francé, C., Delmas, F., Mazzella, N., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2010. Que sait-on de la biodisponibilité des contaminants dissous dans le milieu aquatique ? Sci. Eaux Territ. 1, 6–11.

Gouvernement du Canada, 1999. Les produits chimiques et notre environnement [WWW Document].

Grady, C.J., Daigger, G., Love, N., Filipe, C., Grady, L.C., 2011. Biological Wastewater Treatment. IWA Publishing: London, UK.

Handley, J.W., Mead, C., Rausina, G. a, Waid, L.J., Gee, J.C., Herron, S.J., 2002. The use of inert carriers in regulatory biodegradation tests of low density poorly water-soluble substances. Chemosphere 48, 529–34.

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

Hauss, D.J., 2007. Oral lipid-based formulations. Adv. Drug Deliv. Rev. 59, 667–676.

Hill, M.O., 1973. Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. Ecology 54, 427–432.

Hirayama, T., Kato, I., 1982. Novel methyl rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa. FEBS Lett. 139, 81–85.

Ingerslev, F., Toräng, L., Nyholm, N., 2000. Importance of the Test Volume on the Lag Phase in Biodegradation Studies. Environ. Toxicol. Chem. doi:10.1897/1551-5028(2000)019<2443:IOTTVO>2.3.CO;2

International Standard Organization (ISO), 1995. lignes directrices pour la préparation et le traitement des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité en milieu aqueux. ISO.

ISO, 2006. ISO 14442 - Water quality – Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and wastewater.

Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., Suzuki, T., 1971. Rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa grown on n-paraffin. J. Antibiot. 12, 855–859.

Janbandhu, A., Fulekar, M.H., 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. J. Hazard. Mater. 333–340.

Janus, L., 2003. Utilisations de molécules cages pour la dépollution et l'analyse chimique 138.

Johnsen AR, K.U., 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl Microbiol Biotechnol 63, 452–459.

Jorand, F, Guicherd, P., Urbain, V., Manem, J., Block, J.C., 1994. Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory grown bacteria. wat. sci. tech. 30, 211–218.

Ju, F., Zhang, T., 2014. Bacterial assembly and temporal dynamics in activated sludge of a full-scale municipal wastewater treatment plant. ISME J. 9, 683–695. doi:10.1038/ismej.2014.162

Junghanns J., Müller R.H., 2008. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. Int. J. Nanomedicine 295– 309.

Kalashnikova, I., Bizot, H., Bertoncini, P., Cathala, B., Capron, I., 2013. Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. Soft Matter 9, 952–959. doi:10.1039/C2SM26472B

Khan, E., Sy-Savane, O., Jittawattanarat, R., 2005. Application of commercial biochemical oxygen demand inocula for biodegradable dissolved organic carbon determination. Water Res. 39, 4824–4834. doi:10.1016/j.watres.2005.09.036

Kim, I.S., J-S, P., K-W, K., 2001. Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil-slurry. Appl. Geochem. 16, 1419–1428.

Kowalczyk, A., Martin, T.J., Price, O.R., Snape, J.R., van Egmond, R.A., Finnegan, C.J., Schäfer, H., Davenport, R.J., Bending, G.D., 2015. Refinement of biodegradation tests methodologies and the proposed utility of new microbial ecology techniques. Ecotoxicol. Environ. Saf. 111C, 9–22. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.021

Kuenemann, P., de Morsier, A., Vasseur, P., 1992. Interest of carbon-balance in ready biodegradability testing. Chemosphere 24, 63–69. doi:10.1016/0045-6535(92)90567-B

Laha, S., Luthy, R.G., 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. Biotechnol. Bioeng. 40, 1367–1380.

Lata, M., 2013. Biodegradation of phenol by bacterial strain isolated from paper sludge 1–44.

Le Parlement Européen Et Le Conseil De L'Union Européenne, 2009. Journal officiel de l'Union européenne L 342/59 RÈGLEMENT (CE) N 2009, 75.

Le Parlement Européen et le Conseil de l'Union Européenne, 2000. Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.

Léglize, P., 2004. Etudes des interactions Bactéries - Phénanthrène - Charbon Actif en vue de l'élaboration d'une Barrière Perméable Réactive. Nancy I.

Li, J., Bai, R., 2005. Effect of a commercial alcohol ethoxylate surfactant (C11-15E7) on biodegradation of phenanthrene in a saline water medium by Neptunomonas naphthovorans. Biodegradation 16, 57–65.

Li, J.-L., Chen, B.-H., 2009. Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Materials (Basel). 2, 76–94. doi:10.3390/ma2010076

Li, X., 2014. Intérêt de la réduction de taille des principes actifs peu hydrosolubles : étude bibliographique et expérimentale. UNIVERSITE DE LORRAINE.

Liu, Y., Liu, Q.S., Tay, J.H., 2005. Initial conditions-dependent growth kinetics in microbial batch culture. Process Biochem. 40, 155–160. doi:10.1016/j.procbio.2003.11.052

Mackay, D., Barnthouse, L., 2010. Integrated risk assessment of household chemicals and consumer products: addressing concern about triclosan. Integr. Environ. Assess. Manag. 6, 390–392.

Marcoux, J., Déziel, E., Villemur, R., Lépine, F., Bisaillon, J.G., Beaudet, R., 2000. Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons' degradation in a two-liquid-phase bioreactor. J. Appl. Microbiol. 88, 655–662. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01011.x

Mead, C., 2014. Improving biodegradability of low solubility chemicals : what can we do? SETAC Eur. 24th Annu. Meet. Bâle, Suisse, poster, WE072.

Mohanty, S., Mukherji, S., 2013. Surfactant aided biodegradation of NAPLs by Burkholderia multivorans: Comparison between Triton X-100 and rhamnolipid JBR-515. Colloids Surfaces B Biointerfaces 102, 644–652. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.08.064

Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Eng. Geol. 60, 371–380.

Muñoz, R., Arriaga, S., Hernández, S., Guieysse, B., Revah, S., 2006. Enhanced hexane biodegradation in a two phase partitioning bioreactor: Overcoming pollutant transport limitations. Process Biochem. 41, 1614–1619. doi:10.1016/j.procbio.2006.03.007

Neu, T.R., 1996. Significance of bacteria surface-active compounds in interaction of bacteria with surfaces. Microbiol. Rev. 60, 151–166.

Noordman, W.H., Janssen, D.B., 2002. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by Pseudomonas aeruginosa. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4502–8. doi:10.1128/AEM.68.9.4502

Nordgren, A., 1988. Apparatus for the continuous log term monitoring of soil respiration rate in large numbers of samples. Soil Biol. Biochem. 20, 955–957.

Nyholm, N., 1990. Biodegradability testing of poorly soluble compounds by means of manometric respirometry. Chemosphere 21, 1477–1487. doi:10.1016/0045-6535(90)90053-V

Nyholm, N., Lindgaard-J??rgensen, P., Hansen, N., 1984. Biodegradation of 4-nitrophenol in standardized aquatic degradation tests. Ecotoxicol. Environ. Saf. 8, 451–470. doi:10.1016/0147-6513(84)90066-6

OECD, 2000. OECD series on testing and assessment number 23 guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. ENV/JM/MONO(2000)6. Décembre 2000. 53p.

OECD/OCDE, 2013. Ligne directrice de L'OCDE pour les essais de produits chimiques OCDE 301 Biodégradabilité facile. Juillet 2013. 63p.

OECD/OCDE, 2006a. Ligne directrice de l'ocde pour les essais de produits chimiques OCDE 310

Biodégradabilité facile - dégagement de CO_2 dans des flacons hermétiquement clos (essai de l'espace libre au-dessus du liquide). Mars 2006. 20p.

OECD/OCDE, 2006b. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals OECD 310 Ready Biodegradability - CO_2 in sealed vessels (Headspace Test). Mars 2006. 18 p.

Owsianiak, M., Chrzanowski, Ł., Szulc, A., Staniewski, J., Olszanowski, A., Olejnik-Schmidt, A.K., Heipieper, H.J., 2009. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: Effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. Bioresour. Technol. 100, 1497–1500. doi:10.1016/j.biortech.2008.08.028

Painter, H. a, King, E.F., 1985. A respirometric method for the assessment of ready biodegradability: results of a ring test. Ecotoxicol. Environ. Saf. 9, 6–16.

Painter, H.A., 1995. OECD series on the test guidelines programme number 2 detailed review paper on biodegradability testing environment monograph No 98, organisation for economic co-operation and development. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

Paixao, S.M., Baeta-Hall, L., Anselmo, A., 2000. Evaluation of two commercial microbial inocula as seed in a 5-day biochemical oxygen demand test. Water Environ. Res. 72, 282–284.

Paixao, S.M., Saagua M.C., Tenreiro, R., Anselmo, A.M., 2005. 2005 Paixao - BIodegradability testing using standardized microbial communities as inoculum.pdf. Environ. Toxicol. 131 – 140.

Peck, A.M., 2006. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. Anal. Bioanal. Chem. 386, 907–939.

Peuker, W., Schwarzer, G.C., Stenger, F., 2004. Control of aggregation in production and handling of nanoparticles. Chemical Engineering and Processing. Process Intensif. 44, 245–252.

Pickering, S.U., 1907. Emulsions. J. Chem. Soc. Trans. 2001 – 2021. doi:10.1039/CT9079102001

Pitter, P., 1976. Determination of biological degradability of organic-substances. Water Res. 10, 231–235. doi:10.1016/0043-1354(76)90132-9

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41. doi:https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie. Lavoisier.

Ramsden, W., 1903. Separation of Solids in the Surface-Layers of Solutions and "Suspensions" (Observations on Surface-Membranes, bubbles, emulsions, and mechanical coagulation). Preliminary Account. Proc. R. Soc. Lond. 156–164.

Rapp, P., Gabriel-Jürgens, L., 2003. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants. Microbiology 149, 2879–90.

Richterich, K., Steber, J., 2001. The time-window--an inadequate criterion for the ready biodegradability assessment of technical surfactants. Chemosphere 44, 1649–54.

Richterich K., Berger H., S.J., 1998. The two-phase closed bottle test - A suitable method for the determination of ready biodegradability of poorly soluble compounds. Chemosphere 37, 319–326. doi:10.1016/S0045-6535(98)00049-6

Rodrigues, A., Nogueira, R., Melo, L.F., Brito, A.G., 2013. Effect of low concentrations of synthetic surfactants on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) biodegradation. Int. Biodeterior. Biodegradation 83, 48–55. doi:10.1016/j.ibiod.2013.04.001

Ruffo, C., Galli, E., Arpino, A., 1984. Comparison of methods for the biodegradability evaluation of soluble and insoluble organochemicals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 8, 275–279. doi:10.1016/0147-6513(84)90030-7

Sae Houer, P., 2010. Conception et caractérisation biologique de systèmes lipidiques destinés à une administration par voie orale. Ec. Dr. Sci. Chim. Thesis, 1–157.

Sapriel, J., 1994. Ultrasons. E1910, traité Electronique. Tech. l'Ingénieur.

Sauceau M, Rodier E, F.J., 2011. Procédé continu d'obtention de formulations solides : dispersion d'une charge dans une matrice polymère par extrusion, in: 2ème Rencontre Plateforme GALA, Communication Orale.

Sigoillot, J.-C., Nguyen, M.-H., 1990. Isolation and characterization of surfactant degrading bacteria in a marine environment. FEMS Microbiol. Ecol. 6. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb03925.x

Singh G, Chandoha-Lee C, Zhang W, Renneckar S, Vikesland PJ, P.A., 2016. Biodegradation of nanocrystalline cellulose by two environmentally-relevant consortia. Water Res. doi:10.1016/j.watres.2016.07.073

Smith, K.E.C., Thullner, M., Wick, L.Y., Harms, H., 2009. Sorption to humic acids enhances polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradatiom. Environ. Sci. Technol. 43, 7205–7211.

Struijs, J., Berg, R. Van Der, 1995. Standardized biodegradability tests: extrapolation to aerobic enviroments. Water Resour. 29, 255–262. doi:10.1016/0043-1354(94)00124-P

Struijs, J., Stoltenkamp-Wouterse, M.J., Dekkers, a L., 1995. A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6, 319–27.

Stucki, G., Alexander, M., 1987. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 53, 292–297.

Sturm, R.N., 1973. Biodegradability of nonionic surfactants: Screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J. Am. Oil Chem. Soc. 50, 159–167. doi:10.1007/BF02640470

Sugahara, K., Inoko, A., 1981. Composition analysis of humus and characterization of humic acid obtained from city refuse compost. Soil Sci. Plant Nutr. doi:10.1080/00380768.1981.10431273

Suzuki, T., Tanaka, H., Itoh, S., 1974. Sucrose lipids of Arthrobacter, Corynebacteria and Nocardia grown on sucrose. Agric. Biol. Chem. 38, 557–563.

Sweetlove, C., 2014. Ready biodegradability of poorly water-soluble substances: Evaluation of

Bioavailability Improvement Methods (BIM) for Anthraquinone and Isodecyl neopentanoate in OECD 301 B test. SETAC Eur. 24th Annu. Meet. Bâle, Suisse, poster, TU230.

Sweetlove, C., Cheneble, J.C., Barthel, Y., Boualam, M., L'Haridon, J., Thouand, G., 2016. Evaluating the ready biodegradability of two poorly water-soluble substances: comparative approach of bioavailability improvement methods (BIMs). Env. Sci Pollut Res Int. doi:10.1007/s11356-016-6899-3

Tabka, H., Seignez, C., Adler, N., Pulgarin, C., Péringer, P., 1993. Inoculum standarization for biodegradability tests. Biotechnol. Tech. 7, 217–222. doi:10.1007/BF02566151

Ternes, T.A., Joss, A., Siegrist, H., 2004. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. Environ. Sci. Technol. 38, 392–399.

Thomas, J.M., Yordy, J.R., Amador, J. a., Alexander, M., 1986. Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 52, 290–296.

Thouand, G., 1993a. Maitrise des inocula bactériens utilisés dans les essais de biodégradabilité aérobie. Nancy 1.

Thouand, G., 1993b. Maitrise des inocula bactériens utilisés dans les essais de biodégradabilité aérobie. Nancy I.

Thouand, G., Bauda, P., Oudot, J., Kirsch, G., Sutton, C., Vidalie, J.F., 1999. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. Can. J. Microbiol. 45, 106–115. doi:10.1139/w98-210

Thouand, G., Capdeville, B., Block, J.C., 1996. Preadapted inocula for limiting the risk of errors in biodegradability tests. Ecotoxicol. Environ. Saf. 33, 261–7. doi:10.1006/eesa.1996.0033

Thouand, G., Durand, M.J., Maul, A., Gancet, C., Blok, H., 2011. New concepts in the evaluation of biodegradation/persistence of chemical substances using a microbial inoculum. Front. Microbiol. 2, 1–6. doi:10.3389/fmicb.2011.00164

Thouand, G., Friant, F., Bois, F., Cartier, a, Maul, a, Block, J.C., 1995. Bacterial inoculum density and probability of para-nitrophenol biodegradability test response. Ecotoxicol. doi:10.1006/eesa.1995.1031

Tiruta-Barna LR, 1995. Thermodynamique des mélanges composé organique - solvant supercritique. Application à la décontamination des sols pollués. INSA de Lyon.

Tulp, M.T.M., Schmitz, R., Hutzinger, O., 1978. THE BACTERIAL METABOLISM OF 4,4 ' - DICHLOROBIPHENYL, AND ITS SUPPRESSION BY ALTERNATIVE CARBON SOURCES. Chemosphere 103–108.

Union Européenne, 2009. Règlement n° 1005/2009 du 16/09/09 relatif à des substances qui appauvrissent la couche d'ozone (refonte).

Vallée, P., 2005. EP1744990 - Method for electromagnetic treatment of water conferring a biological

activity thereon. PCT/FR2005/001080.

Vallée, P., 2004. Etude de l'effet de champs électromagnétiques basse fréquence sur les propriétés physico-chimiques de l'eau. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).

Vallée, P., Lafait, J., Legrand, L., Mentré, P., Monod, M.-O., Thomas, Y., 2005. Effects of pulsed low-frequency electromagnetic fields on water characterized by light scattering techniques: role of bubbles. Langmuir 21, 2293–9. doi:10.1021/la047916u

van Ginkel, C.G., Gancet, C., Hirschen, M., Galobardes, M., Lemaire, P., Rosenblom, J., 2008. Improving ready biodegradability testing of fatty amine derivatives. Chemosphere 73, 506–10. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.037

van Ginkel, C.G., Haan, a, Luijten, M.L., Stroo, C. a, 1995. Influence of the size and source of the inoculum on biodegradation curves in closed-bottle tests. Ecotoxicol. Environ. Saf.

Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2006. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. Biotechnol. Adv. 24, 604–620. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.08.001

Van Lier JB, Tilche A, Ahring BK, Macarie H, Moletta R, Dohanyos M, Hulshoff Pol LW, Lens P, V.W., 2001. New perspectives in anaerobic digestion. Water Sci. Technol. 43, 1–18.

Vázquez-Rodríguez, G. a, Beltrán-Hernández, R.I., Coronel-Olivares, C., Rols, J.-L., 2011. Standardization of activated sludge for biodegradation tests. Anal. Bioanal. Chem. 401, 1127–37. doi:10.1007/s00216-011-5212-z

Vázquez-Rodríguez, G. a, Garabétian, F., Rols, J.-L., 2007. Inocula from activated sludge for ready biodegradability testing: homogenization by preconditioning. Chemosphere 68, 1447–54. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.03.073

Vázquez-Rodríguez, G. a., Calmon, A., Silvestre, F., Goma, G., Rols, J.-L., 2006. Effect of the inoculation level in aerobic biodegradability tests of polymeric materials. Int. Biodeterior. Biodegradation 58, 44–47. doi:10.1016/j.ibiod.2006.04.006

Verstichel, S., De Wilde, B., Fenyvesi, E., Szejtli, J., 2004. Investigation of the Aerobic Biodegradability of Several Types of Cyclodextrins in a Laboratory-Controlled Composting Test. J. Polym. Environ. 12, 47–55. doi:10.1023/B:JOOE.0000010050.52967.94

Waggy, G., Conway, R., Hansen, L., Blessing, L., 1994. Comparison of 20-d BOD and OECD closed-bottle biodegradation tests. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1277–1280. doi:10.1002/etc.5620130809

Ward, O.P., 2010. Biosurfactants. Adv. Exp. Med. Biol. 672, 65–74. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9

Wonnacott, T.H., Wonnacott, R.J., 1995. Statistique - 4ème édition, Economica. ed.

Xia, S., Duan, L., Song, Y., Li, J., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., Alvarez-Cohen, L., Moreno-Andrade, I., Huang, C.-L., Hermanowicz, S.W., 2010. Bacterial community structure in geographically distributed biological wastewater treatment reactors. Environ. Sci. Technol. 44, 7391–7396.

doi:10.1021/es101554m

Yu, K., Zhang, T., 2012. Metagenomic and Metatranscriptomic Analysis of Microbial Community Structure and Gene Expression of Activated Sludge. PLoS One 7, e38183. doi:10.1371/journal.pone.0038183

Zhang, T., Shao, M.-F., Ye, L., 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. ISME J. 6, 1137–1147. doi:10.1038/ismej.2011.188

Zhang, Y., Miller, R.M., 1995. Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n -Alkanes. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2247–2251.

Zhang, Y., Miller, R.M., 1994. Effect of a Pseudomonas rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2101–6.

Annexes

Annexe I : Avantages et inconvénients des méthodes d'amélioration de la biodisponibilité

1. Avantages et inconvénients théoriques des MAB

Parmi les techniques chimiques, l'utilisation de solvants volatils non biodégradables, éliminés par évaporation avant l'essai constitue une approche méthodologique bien identifiée, permettant d'améliorer la biodisponibilité des composés peu hydrosolubles en vue de l'évaluation de leur biodégradabilité. Cependant, assurer de l'évaporation complète de ce solvant n'est pas chose aisée et la perturbation générée (témoin inoculum à forte valeur de respiration, possibilité de co-métabolisation) peut impacter les résultats. Ainsi cette piste ne sera pas explorée. La mise en solution préalable du composé à tester dans une huile minérale ou de silicone non biodégradable (PDMS), solvant à la fois non toxique et ne présentant aucune biodégradabilité intrinsèque, augmente également la biodisponibilité et la biodégradabilité des composés faiblement hydrosolubles. L'utilisation de molécules cages (cyclodextrines, zéolithes, éthers couronnes, …) et d'agents tensio-actifs, d'origine biologique (bio-tensioactifs ou biosurfactants) ou non, largement mise en œuvre et décrites dans le cadre de la dépollution des milieux naturels (sols, aquifères, eau, …), présente généralement un effet positif sur la dispersion et la biodisponibilité des composés organiques faiblement hydrosolubles. Il faut noter que l'utilisation de composés chimiques (solvants, tensioactifs, molécules cages, polymères…), potentiellement biodégradables et/ou inhibiteurs, peut interférer avec la méthode de mesure de biodégradabilité. L'emploi de solvants et de techniques de dispersion ou d'émulsion peuvent ainsi être des sources d'erreurs lors de l'évaluation de la biodégradabilité des composés d'intérêt. La substance testée doit être la seule source de carbone assimilable par les bactéries. Si l'adjuvant est facilement biodégradable, son apport peut être considéré comme acteur d'une cométabolisation. Son action n'étant plus de rendre la substance testée biodisponible mais de rendre possible la métabolisation de cette substance par les micro-organismes. Il ne sera donc plus considéré comme améliorant la biodisponibilité et ne sera pas compatible avec la réalisation d'essai de biodégradabilité facile.

Plusieurs techniques physiques de fragmentation des solides (broyage, homogénéisation à haute pression, fluides supercritiques), de dispersion (dispersion solide, ultrasons, extrusion,), ou de fixation sur support solide, utilisées dans le cadre d'applications industrielles (industrie pharmaceutique, plastiques, agroalimentaire, dépollution, chimie analytique) peuvent être appliquées à la préparation des composés organiques peu solubles dans l'eau en vue d'augmenter leur biodisponibilité. Les techniques physiques de fragmentation et de dispersion permettent une

augmentation de la biodisponibilité du composé chimique par augmentation de la surface de contact du solide fragmenté. L'utilisation de support solide inerte (fibre de verre, gel de silice, verre ou téflon) pour accroitre la biodisponibilité des composés peu solubles dans l'eau est décrite dans la norme ISO 10634 et l'utilisation de phases solides extractives pour la fixation de composés peu hydrosolubles, couplée à la leur biodégradation par un biofilm microbien, peut également être envisagée dans le cadre d'essai de biodégradabilité au sens large. La phase solide extractive choisie en fonction de ses propriétés vis-à-vis du composé chimique d'intérêt devra cependant être non toxique vis-à-vis des micro-organismes et interagir le moins possible avec les composants du milieu. Ces techniques physiques, peuvent être couplées à l'utilisation de solvants ou dispersants chimiques, efficaces pour certains composés faiblement solubles.

Notons que l'utilisation des techniques physiques de préparation, peut entrainer dans certains cas, une altération, une dénaturation ou une oxydation partielle ou totale des composés organiques, représentant une source d'erreurs incompatible avec une mesure ultérieure fiable de leur biodégradabilité. Dans tous les cas, les impacts de ces techniques de préparation sur le composé chimique testé et sur la qualité de la mesure, doivent être évalués dans le cadre d'études préliminaires et lors de la mesure de biodégradabilité par l'ajout d'un témoin.

Sur la base de cette synthèse, les méthodes intégrant les molécules cages, l'homogénéisation à haute pression, l'extrusion et la solubilisation par fluide supercritique qui nécessitent du matériel spécifique ne seront pas évaluées.

L'analyse bibliographique des MAB appliquées aux tests de biodégradabilité facile est présentée ci-après.

2. Les MAB déjà appliquées aux tests de biodégradabilité

Les travaux portant sur la problématique de la biodégradabilité des substances peu hydrosolubles ont démarrés en 1984 (Boethling, 1984; Gerike, 1984). Boethling présente dans une « letter to the editor » différentes méthodes adaptées aux tests de biodégradabilité et pouvant améliorer la biodisponibilité : dispersion par ultrasons, utilisation de solvant non biodégradable, d'émulsifiant, d'agent stabilisant inerte ou d'huile minérale. Gerike présente une évaluation de quatre méthodes plus technique, réalisée avec six substances chimiques. Il montre d'une part le faible attrait des essais de biodégradabilité utilisant la mesure du carbone organique dissous (COD), la complexité à évaporer totalement les solvants organiques, le faible potentiel de certains émulsifiants et d'autre part l'intérêt de la mesure du CO_2, de l'agitation dans les flacons et de l'utilisation des ultrasons pour disperser une substance peu hydrosoluble.

De nombreux scientifiques ont ensuite évalués des méthodes améliorant la biodisponibilité appliquées au test de biodégradabilité. Les résultats de ces travaux sont synthétisés dans le tableau 31 :

Tableau 31 : Effets des méthodes d'amélioration de la biodisponibilité déjà décrites dans la littérature

Méthodes d'amélioration de la biodisponibilité	Effet	Auteur, date
Solvant	positif	(Tulp et al., 1978; Boethling, 1984; Thomas et al., 1986; De Morsier, A., 1987; International Standard Organization (ISO), 1995)
	neutre	-
	négatif	(Gerike, 1984; Marcoux et al., 2000; Handley et al., 2002)
Huile de silicone	positif	(Marcoux et al., 2000; Muñoz et al., 2006; van Ginkel et al., 2008; Darracq et al., 2012)
	neutre	(Congiu et al., 2015)
	négatif	-
Huile minérale	positif	(Auffret et al., 2009; Boethling, 1984; Sweetlove et al., 2016)
	neutre	-
	négatif	(Marcoux et al., 2000)
Tensio-actif	positif	(Boethling, 1984; De Morsier, A., 1987; International Standard Organization (ISO), 1995; Kim et al., 2001; Li and Chen, 2009; Marcoux et al., 2000; Mohanty and Mukherji, 2013; Rodrigues et al., 2013)
	neutre	(Gerike, 1984)
	négatif	(Bramwell, DAP and Laha, 2000; Laha and Luthy, 1992; Li and Chen, 2009; Marcoux et al., 2000; Nyholm, 1990; Rodrigues et al., 2013)
Rhamnolipide	positif	(Congiu et al., 2015; Owsianiak et al., 2009)
	neutre	-
	négatif	(Marcoux et al., 2000; Mohanty and Mukherji, 2013; Owsianiak et al., 2009)
Acide humique	positif	(van Ginkel et al., 2008; Smith et al., 2009)
	neutre	-
	négatif	-
Dispersion par agitateur mécanique	positif	(Tulp et al., 1978; Boethling, 1984; Gerike, 1984; Thomas et al., 1986; De Morsier, A., 1987; International Standard Organization (ISO), 1995; Handley et al., 2002)
	neutre	-
	négatif	-
Broyage	positif	(International Standard Organization (ISO), 1995)
	neutre	-
	négatif	-
Dispersion aux ultrasons	positif	(Boethling, 1984; Gerike, 1984; De Morsier, A., 1987; Nyholms, 1990; International Standard Organization (ISO), 1995)
	neutre	-
	négatif	(De Morsier, 1987; Nyholm, 1990)

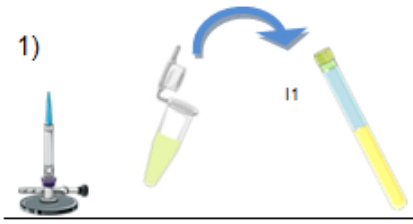
Support inerte (filtre en fibre de verre)	positif	(De Morsier, A., 1987; International Standard Organization (ISO), 1995)
	neutre	-
	négatif	(De Morsier, 1987; Nyholm, 1990)
Support inerte (gel de silice)	positif	(Handley et al., 2002; van Ginkel et al., 2008)
	neutre	-
	négatif	-
Adsorption sur support inerte (Gel de silice avec solvant)	positif	(Nyholm, 1990; International Standard Organization (ISO), 1995)
	neutre	-
	négatif	(Handley et al., 2002; Sweetlove et al., 2016)
Electro-oxydation	positif	(Esfandyari et al., 2015)
	neutre	-
	négatif	-
Dispersion aux ultrasons + tensio-actif	positif	(De Morsier, A., 1987)
	neutre	-
	négatif	-
Gel de silice + tensio-actif	positif	(Dailey et al., 2013)
	neutre	-
	négatif	-
solvant + Rhamnolipide	positif	(Congiu et al., 2015)
	neutre	-
	négatif	-
solvant + Rhamnolipide + huile de silicone	positif	-
	neutre	(Congiu et al., 2015)
	négatif	-

Afin de simplifier ce tableau, les molécules testées ne sont pas présentées. La nature et la structure des molécules évaluées vont fortement impacter le type de méthode permettant l'amélioration de leur dispersion. Ainsi, les effets positifs et négatifs observés pour une même méthode ne rendent pas forcément compte de conclusions contradictoires.

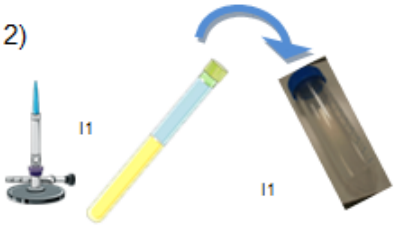
Au vu des éléments avancés dans la littérature sur l'application des solvants : choix difficile du solvant adapté, sa complexité à évaporer et à interpréter les résultats (Gerike, 1984; Marcoux et al., 2000; Sweetlove et al., 2016; Handley et al., 2002), les méthodes associant des solvants ne seront pas évaluées. De même, l'électro-oxydation qui nécessite du matériel spécifique ne sera pas évaluée.

Peu de méthodes ont pu être comparées entre elles lors d'un même test et l'inoculum utilisé pour chaque test est différent et induit, de fait, une variabilité non négligeable sur les résultats de biodégradabilité obtenus. On peut également noter qu'il n'existe pas de méthode universelle applicable à toutes les molécules chimiques.

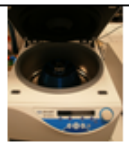
Annexe II : Mode opératoire de la détermination de l'hydrophobie des souches bactériennes

1) 

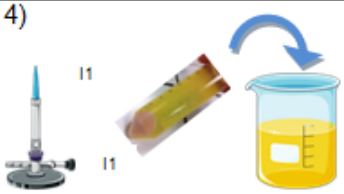
Reprendre la culture bactérienne (tube Eppendorf®) après décongélation dans 10 mL de milieu LB (tube en verre stérile) et incuber à 28°C pendant 24 h (ou plus si nécessaire).

2) 

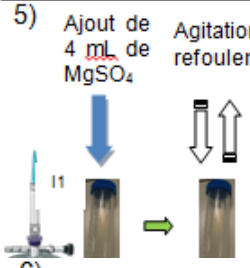
Transférer les 10 mL de **solution mère** (à partir du tube en verre stérile) dans un Falcon® de 15 mL

3) 

Centrifuger à 6000 g pendant 6 minutes à 4°C

4) 

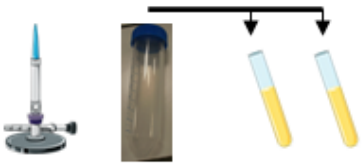
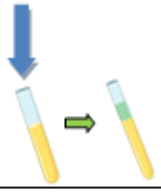
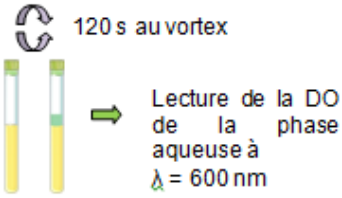
Eliminer le surnageant au maximum (Attention à ne pas perdre le culot) en transvasant la partie liquide dans une poubelle à liquide de paillasse.
Si besoin, pipeter le reste de surnageant afin d'éliminer au maximum la contamination en carbone
Faire une lecture au spectrophotomètre à λ = 600 nm de cette **solution lavée** (fréquemment à diluer au 1/10e)

5) 

Reprendre avec :
- 4 mL de solution de $MgSO_4$ (10^{-2} M) à la pipette plastique stérile dans le Falcon®
- Remettre complètement en suspension le culot avec une pipette plastique stérile de 10 mL par agitation / refoulement (ne pas projeter d'air sur le culot).

6) 

Diluer dans un nouveau tube Falcon de 15 mL avec une solution de $MgSO_4$ (10^{-2} M) pour obtenir au moins 7 mL de solution bactérienne (**solution Essai**) à DO = 0,3.

7)	Répartir 5 mL en 2 x 2,5 mL dans 2 tubes en verre avec bouchon 	Placer 2,5 mL de cette **solution Essai** dans deux tubes en verre (1 tube Essai Hydrophobicité – EH et un tube Témoin –T) et mesurer l'absorbance avec 1 mL de cette solution à λ = 600 nm (**Abs_i**).
8)	1mL d'octane 	En condition stérile (sous hotte à flux laminaire car l'octane est inflammable), ajouter 1 mL de n-octane dans le tube EH.
9)		Passer les deux tubes (EH et T) au vortex pendant 120 s Laisser reposer les tubes pendant 5 minutes Mesurer l'absorbance à λ = 600 nm des tubes essai EH (**Abs_e**) et témoin (**Abs_t**).

Annexe III : Répertoire des souches bactériennes sélectionnées

Phylum	Classe	Ordre	Genre/espèce	Numéro de collection
Protéobactéries	**α-Protéobactéries**	Rhizobiales	*Agrobacterium tumefaciens*	DSM 7215
			Bosea vestrisii	DSM 21229
			Xanthobacter autotrophicus	ATCC BAA 1158
		Rhodobacterales	*Paracoccus denitrificans*	DSM 1404
			Paracoccus denitrificans	DSM 65
		Sphingomonadales	*Sphingobium yanoikuyae*	DSM 6900
			Sphingomonas wittichii	DSM 6014
	β-Proteobactéries	Burkholderiales	*Alcaligenes aquatilis faecalis*	DSM 30030
			Comamonas denitrificans	DSM 17887
			Comamonas testosteroni	DSM 38
			Cupriavidus necator	DSM 428
			Delftia acidovorans	DSM 14801
			Variovorax paradoxus	DSM 645
		Rhodocyclales	*Thauera linaloolentis*	DSM 12138 *
			Zoogloea resiniphila	DSM 14766
		Nitrosomonadales	*Nitrosomonas europae*	ATCC 19718
	γ-Protéobactéries	Alteromonadales	*Alteromonas macleodii*	CIP 103198
		Enterobactériales	*Budvicia aquatica*	DSM 5075 *
			Enterobacter aerogenes	DSM 30053
			Enterobacter helveticus	DSM 18396
			Escherichia coli	ATCC 700926
			Proteus mirabilis	CIP A235
			Proteus vulgaris	DSM 13387
		Pseudomonadales	*Acinetobacter towneri*	DSM 14962
			Pseudomonas aeruginosa	DSM 11634
			Pseudomonas aeruginosa	DSM 6279
			Pseudomonas fluorescens	DSM 50090
			Pseudomonas putida	DSM 84 *
			Pseudomonas putida	DSM 50026
			Pseudomonas putida	DSM 1868
			Pseudomonas sp.	DSM 12800

Phylum	Classe	Ordre	Genre/espèce	Numéro de collection
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Xanthomonadales	*Stenotrophomonas koreensis*	CIP 109170 / CIP15906
Firmicutes	**Bacilli**	Bacillales	*Bacillus coagulans*	LMG 6938 *
			Bacillus funiculus	DSM 15141
			Bacillus mycoides	DSM 299
			Bacillus subtilis	LMG 7135
			Bacillus subtilis	DSM 10
			Staphylococcus auricularis	DSM 20609
			Staphylococcus epidermidis	DSM 20044
Bacteroidetes	**Bacteroidetes**	Flavobacteriales	*Flavobacterium sp.*	LMG 4034
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Arthrobacter albidus*	DSM 20128
			Arthrobacter aurescens	DSM 20116
			Arthrobacter globiformis	LMG 3813
			Arthrobacter sp.	DSM 20407
			Corynebacterium pseudodiphthericum	CIPA 105
			Dietzia maris	DSM 20307
			Micrococcus lylae	LMG 20181
			Micrococcus sp.	DSM 1057
			Mycobacterium vanbaalenii	DSM 7251
			Nocardia farcinica	DSM 43665
			Rhodococcus erythropolis	DSM 43066 *
			Rhodococcus erythropolis	DSM 16550
			Rhodococcus rhodocrous	DSM 6427

* Pour des raisons techniques (problème de culture), les souches (DSM 12138, DSM 5075, DSM 84, LMG 6938 et DSM 43066) n'ont pas été utilisées pour les tests de biodégradabilité permettant de sélectionner les substances modèles.

Annexe IV : Préparation des microorganismes et de la microplaque en vue de la détermination des dégradeurs de 9 substances chimiques (système PreSens®)

1. Culture des microorganismes

1.1. La pré-culture des cellules bactériennes

La première étape de préparation est la mise en pré-culture des souches permettant d'obtenir une biomasse suffisante pour les analyses. Pour cela, les bactéries préalablement stockées dans un congélateur à -80°C sont réchauffées lentement sur un lit de glace pendant environ 30 minutes afin d'initier une décongélation lente et ainsi limiter les chocs thermiques. Une fois les cellules décongelées, celles-ci sont mises en culture dans un milieu riche de type LB (Luria Bertani) et sont incubées de : une nuit (16h) à deux jours (48h) à 28°C, sous agitation à 250 rpm (rotation par minute).

1.2. La préparation des inocula

Une fois que les cellules microbiennes atteignent une densité optique (DO) proche d'1 unité d'absorbance (λ = 620 nm), elles sont versées dans un récipient Falcon® de 50 mL (figure 56).



Figure 56 : Première étape de la préparation des inocula[19]

[19] *Les figures de matériel de laboratoire proviennent du site libre de droits* *http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint*

Elles sont ensuite lavées à l'aide d'une solution de $MgSO_4$ à 10^{-2} M à 4°C. Pour ce faire, les cellules sont culottées par une centrifugation à 6000 g pendant 6 min à 4°C, puis le surnageant contenant les résidus cellulaires ainsi que le carbone contaminant du milieu de culture sont éliminés (figure 57).



Figure 57 : deuxième étape de la préparation des inocula[20]

Le culot à sec est re-suspendu à 3 reprises dans du $MgSO_4$ à 10^{-2} M à 4°C pour éliminer toutes traces de carbone contaminant car la seule source de carbone disponible pour les bactéries doit être la substance chimique à tester (figure 58).

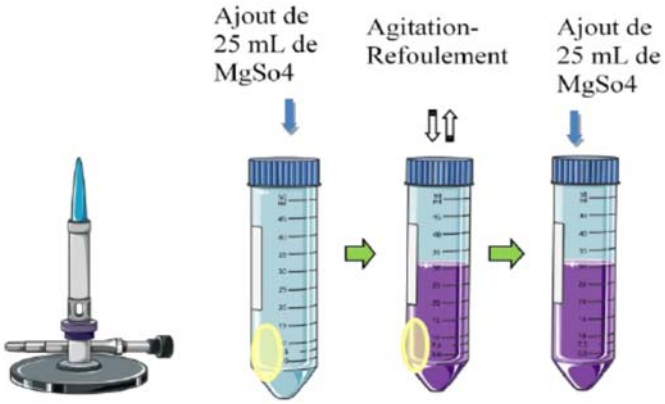


Figure 58 : Troisième étape de la préparation des inocula[18]

A l'issue de ces lavages, le culot bactérien est re-suspendu une dernière fois dans 10 mL de $MgSO_4$ (solution mère) et la densité cellulaire est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la densité optique de 620 nm. Pour cela des cuves à spectrophotomètre sont préparées pour réaliser un témoin à partir de la solution de lavage et une solution diluée au $1/10^e$ et au $1/100^e$ de la solution mère bactérienne. La lecture de la DO se fait à partir d'un spectrophotomètre à cuve.

[20] *Les figures de matériel de laboratoire proviennent du site libre de droits* http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint

2. Préparation des microplaques de criblage

Afin d'apporter une densité cellulaire constante pour chaque souche pour les différents essais de biodégradation, la détermination volume de solution mère à inoculer est réalisée avec le calcul suivant (équation 12) :

Équation 12 : $$Vd = \frac{Cf\ x\ Vf}{Ci} = \frac{0{,}05\ x\ 2750}{DO}$$

Avec : Vd = volume à déposer en µL
Vf = volume final de milieu d'essai dans le puits (2750 µl)
Ci = concentration initiale, déterminé par la densité optique (DO) obtenue lors de la lecture par spectrophotomètre
Cf = concentration finale en bactérie souhaitée dans le puits (0,05 de DO).

Le volume de milieu d'essai (V_{ME}) est calculé de la façon suivante :

Équation 13 : V_{ME} = Vf - Vd = 2750 –Vd

Avec : V_{ME} = volume milieu essai en µL
Vf = volume final de milieu d'essai dans le puits (2750 µl)
Vd = volume à déposer en µL

Enfin la dernière étape, consiste à déposer sur une plaque PreSens® OxoDishOD24, notre solution bactérienne (volumes d'inocula calculés précédemment), notre milieu d'essai STURM modifié puis la substance à tester, pour un volume final de 2,75 mL. Chaque mesure de biodégradation est réalisée en double. Un témoin négatif (souche seule) ne contenant pas de source de carbone sera réalisé pour d'une part évaluer la contamination du carbone résiduel provenant de mauvaises étapes de lavages des culots bactériens et d'autre part mesurer la quantité d'oxygène consommée servant d'indicateur quant à la charge de carbone endogène présente et respirée par le témoin inoculum. Chaque substance est apportée en excès du fait de la difficulté d'apporter une faible concentration d'une substance peu hydrosoluble dans un faible volume (2,75 mL). Toutefois, cette addition est réalisée de la façon la plus reproductible possible. Le milieu d'essai est composé d'un milieu Sturm modifié plus complexe et dont la composition est détaillée dans le chapitre *Matériels et Méthodes*. Ce milieu a été adapté par le laboratoire à partir du milieu STURM afin de répondre au mieux aux besoins de culture axénique. En effet, ce milieu synthétique ne contient pas ou peu de carbone et permet via l'addition de sels, d'oligoéléments mais également de vitamines d'assurer la croissance de cellules bactériennes requérant certains métaux ou possédant des auxotrophies.

Annexe V : Mode opératoire de préparation des souches isolées en vue de réaliser un test de biodégradabilité facile avec Respicond VI®

Afin de réaliser les essais de biodégradabilité avec des souches isolées, le milieu préparé est un milieu Sturm (OCDE 301) modifié par ajout des solutions permettant une meilleure croissance bactérienne.

1. Préparation des souches

Jour 1

- Préparer le nombre de bouteilles en verre de 500 mL prévues préalablement stérilisées en ajoutant environ 450 mL de milieu de culture LB.
- Stériliser les bouteilles contenant le milieu LB par 20 minutes d'autoclave à 120°C.
- Laisser refroidir les bouteilles.
- Décongeler les souches sélectionnées contenues dans des tubes Eppendorf® sur un lit de glace (environ 30 minutes).
- Une fois les souches décongelées, prélever à l'aide d'une pipette de 2 mL **en condition stérile**, l'intégralité du contenu du tube Eppendorf® (entre 750 µL et 1500 µL) puis inoculer dans une à deux bouteilles en verre contenant le milieu de culture LB.
- Placer les bouteilles en verre dans une enceinte thermostatée à 28°C sous agitation.

Jour 2

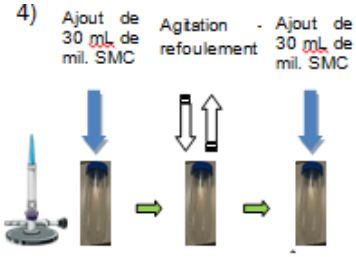
Effectuer une vérification visuelle sur la culture présente dans l'erlenmeyer.

- Si le milieu de culture reste translucide, la croissance bactérienne n'a pas encore atteint un niveau suffisant pour réaliser les tests. Dans ce cas, incuber à nouveau 24 h.
- Si le milieu de culture est opaque, elle peut être utilisée afin de lancer des essais.

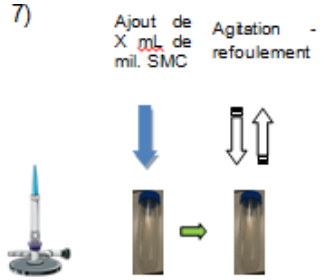
2. Lavage des souches

Cette étape de lavage a pour but d'éliminer le carbone présent dans le milieu de culture. Les tests de biodégradation effectués avec ces souches doivent être réalisés dans un milieu d'essai dépourvu de carbone, la seule source de carbone disponible pour les bactéries devant être la substance chimique à tester.

Comme pour les étapes précédentes, le lavage des souches est réalisé **en condition stérile** (au bec Bunsen).

1) 	Transférer l'inoculum bactérien des bouteilles en verre dans des flacons plastiques coniques stériles de 250 mL Peser les flacons coniques afin de répartir les masses de manière équilibrée dans la centrifugeuse (différence inférieure à 0,1 g recommandée entre 2 flacons opposés).
2) 	Centrifuger à 4500 g pendant 12 minutes à 4°C
3) 	Eliminer le surnageant au maximum (Attention à ne pas perdre le culot) en transvasant la partie liquide dans une poubelle à liquide de paillasse. Si besoin, pipeter le reste de surnageant afin d'éliminer au maximum la contamination en carbone
4) 	Reprise avec : - 30 mL de milieu SMC à la pipette plastique stérile dans le flacon conique contenant le culot de la souche - Remettre complètement en suspension le culot avec une pipette plastique stérile de 50 mL par agitation / refoulement (ne pas projeter d'air sur le culot). - Ajouter 200 mL de milieu SMC à la pipette plastique stérile - A cette étape, lorsque plusieurs bouteilles de 450 mL d'une même souche ont été réalisées, il est possible de reprendre le culot avec la solution bactérienne de cette même souche à la place du milieu SMC. Dans ce cas, la concentration en bactérie dans le flacon sera plus importante (concentration du culot) mais ces étapes de centrifugation avec la solution bactérienne ne sont pas considérée comme des lavages mais des phases de concentration.
5) 	Centrifuger à 4500 g pendant 12 minutes à 4°C (L'accélération et le temps peuvent être augmentés si besoin)
6) REPETER 2 FOIS CETTE OPERATION DE LAVAGE (étapes 3 à 5) soit 2 lavages minimum. Un lavage supplémentaire peut être nécessaire.	

7)



Reprendre le dernier culot avec un volume faible (par exemple 10 ou 15 mL) de milieu SMC (solution bactérienne mère) afin d'obtenir la concentration finale souhaitée

8) Mélanger l'ensemble des flacons coniques contenant la même souche bactérienne en solution.

* : *illustration provenant de Servier Medical Art®*

3. Mesure de la concentration bactérienne pour les essais

Préparer en condition stérile dans 2 cuves à spectrophotomètre :

- Un témoin avec 900 µL de milieu SMC
- Une cuve essai avec 900 µL de milieu SMC et 100 µL de solution bactérienne mère

  (Si la DO obtenue est supérieure à 1, réaliser une nouvelle mesure avec une dilution plus importante, ex : 1/100)

Mesure de la DO à 620 nm

$DO_{d1/10} = 0,X \quad => \quad DO_{d1} = X$

Calcul du volume de culture bactérienne à placer dans chaque flacon :

- Le volume final (Vf) d'un flacon Respicond VI®est de 150 mL
- La concentration finale (Cf) en bactérie est de 0,05 de DO
- La concentration initiale (Ci) en bactérie correspond à la DO_{d1} mesurée
- Le volume à déposer (Vd) est à calculer :

Équation 14 : Ci x Vd = Cf x Vf

$$\mathbf{Vd} = \frac{Cf\ x\ Vf}{Ci} = \frac{0,05\ x\ 150}{X} = \mathbf{Vd\ mL}$$

Volume à déposer par flacon : **Vd** mL (ou 10 x Vd mL si dilution au 1/10e).
Le volume de milieu d'essai (V_{ME}) à déposer par flacon pour la souche bactérienne utilisée sera donc :

Équation 15 : $V_{ME} = Vf - Vd$

$$V_{ME} = 150 - Vd\ mL$$

4. Préparation de la souchothèque congelée

- Placer 750 µL de solution de conservation au glycérol dans chaque flacon conique type Eppendorf® de 1,5 mL stérile (par exemple 20 par souches).
- Déposer ensuite dans chaque flacon conique 750 µL de souche bactérienne pure contenue dans le milieu LB (à partir des bouteilles en verre initialement utilisées pour la culture) prélevés en condition stérile.
- Fermer les flacons, annoter au feutre le numéro de la souche sur la paroi et congeler à -80°C.

La culture et le lavage des souches sont réalisés en condition stérile, mais l'inoculation des flacons utilisés pour le test de biodégradabilité ne l'est pas. Il ne s'agit donc pas de tests biodégradabilité avec une souche pure mais plutôt de tests de biodégradabilité avec une souche majoritaire comme inoculum.

Annexe VI : Protocole de lancement du Respicond VI®[21]

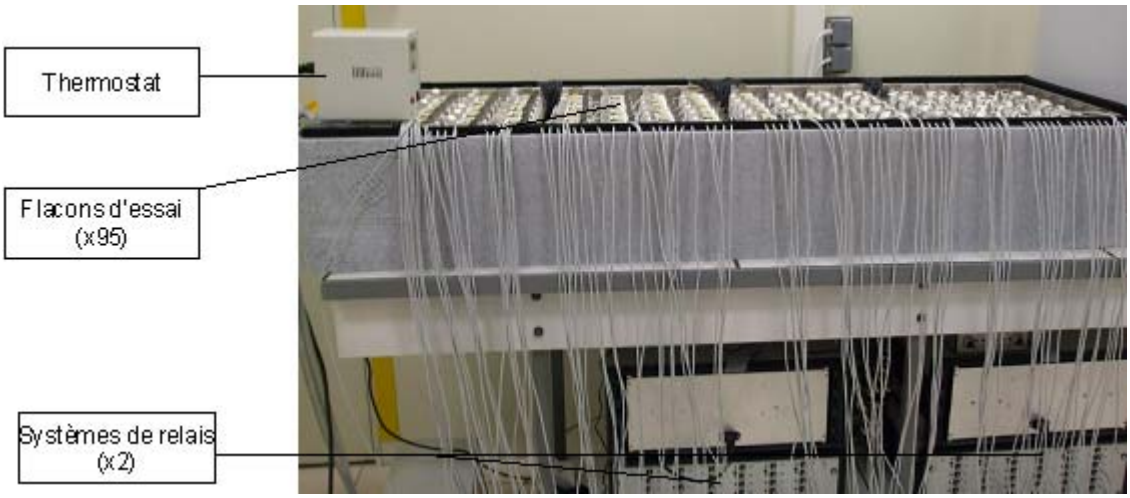
1. Principe

Le fonctionnement du respiromètre automatique Respicond VI® est basé sur la mesure de la conductance dans une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) absorbant le dioxyde de carbone (CO_2) dégagé par les micro-organismes lors de la dégradation de molécules organiques. La mobilité des ions hydroxydes étant supérieure à celle des ions carbonates, l'absorption du CO_2 dégagé a pour effet de diminuer la conductance dans l'électrolyte. La conductance (mS) est mesurée par un conductimètre (KEITHLEY 2000 multimeter), enregistrée sur un ordinateur et exploitée via le logiciel « Respiro 0809 ». Après intégration de cette mesure, le logiciel « Respiro 0809 » permet aussi de visualiser le CO_2 dégagé accumulé et la vitesse de CO_2 dégagé par heure.

NB : la molarité initiale de la solution de KOH peut être définie suivant la valeur de dégagement théorique de CO_2 de la substance d'essai mise en expérimentation.

2. Vue générale

Le respiromètre automatique Respicond VI® est doté de 95 postes permettant de suivre le dégagement de CO_2 produit lors de la dégradation de molécules carbonées dans un milieu minéral en présence de micro-organismes. Les flacons d'essai posés sur des agitateurs magnétiques sont immergés dans un bain thermostaté à 22 °C +/- 2°C. Chaque flacon d'essai est relié indépendamment à un système de relais relié au conductimètre.



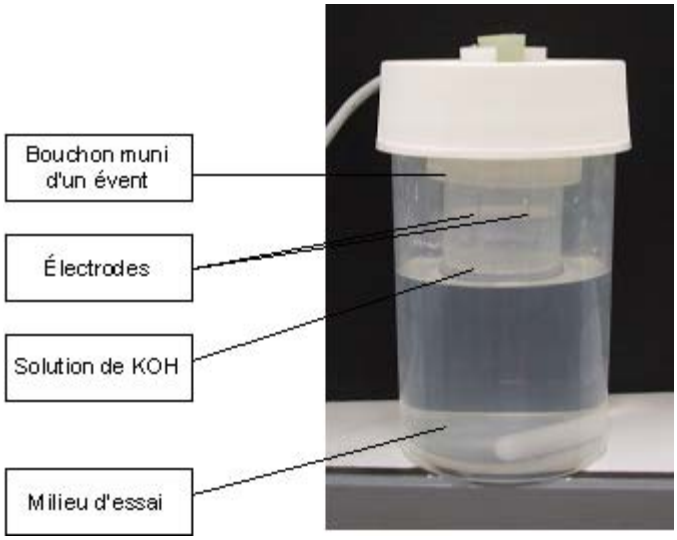
[21] *Protocole fourni par Eurofins Expertises Environnementales*

2.1. Dispositif d'essai

Chaque dispositif d'essai est composé d'un flacon en polypropylène de 250 mL fermé par un bouchon à vis dans lequel est inséré un flacon de 30 mL contenant deux électrodes plongées dans 10 mL de la solution de KOH permettant de mesurer la conductance.

L'échange d'air entre le milieu d'essai et l'électrolyte se fait par un évent situé dans le bouchon du flacon de 30 mL.

Chaque flacon contient 150 mL de milieu d'essai.



2.2. Configuration de test

La série analytique comprend 5 répliques pour chaque témoin et essais.

Par défaut : les essais de biodégradabilité sur produits et substance modèles sont réalisés à une concentration correspondant à une teneur en carbone organique égale à 20 mg/L.

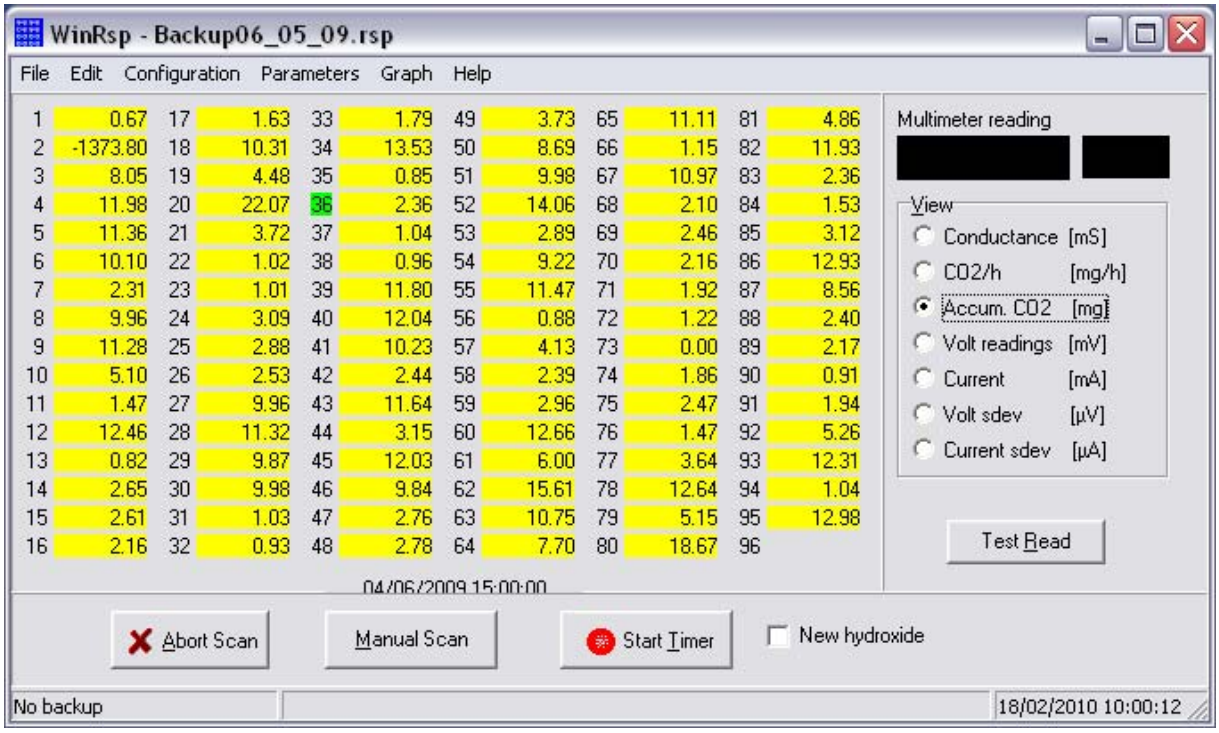
3. Lancement du test

3.1. Solution de KOH

Pour les concentrations en carbone organique testées lors d'un test de biodégradabilité OCDE 301 B (soit 20 mg de C /L), la molarité de la solution de KOH conseillée par le constructeur est de 0,2 M (soit 13,0 g/L). Les flacons contenant les électrodes doivent être remplis avec 10 mL de cette solution la veille d'une série analytique. A la fin d'une série d'essai, les flacons sont vidés par aspiration à l'aide d'une trompe à vide. Lors de la manipulation de la solution, l'opérateur doit porter gants et lunettes protectrices.

3.2. Mise en fonction du respiromètre RESPICOND VI®

- Cliquer sur l'icône « Respiro »
- Cliquer sur « File / new »
- Nommer la série : par défaut, la date des tests
- Cliquer sur « Configuration / Select Vessels » (cocher les flacons d'essai en expérimentation)
- Cliquer sur « New Hydroxyde »
- Cliquer sur « Start timer » puis « Manual Scan »
- Les données sont enregistrées par défaut toutes les heures : cette option est conservée pour pouvoir supprimer une éventuelle mesure aberrante.
- Capture d'écran du logiciel « Respiro » :



4. Récupération des données

Les données sont enregistrées sur une clé USB et sur le disque dur externe dédié à l'ordinateur relié au respiromètre Respicond VI®.

- Pour arrêter les essais, cliquer sur « Stop Timer »
- Transférer la clé USB sur un ordinateur possédant l'application Respiro
- Récupérer les données : « File / Open »
- Enregistrer les données : « File / Export »



- Cliquer sur « Accum CO2 (mg) »
- Enregistrer le fichier
- Remplacer l'extension du fichier du format text. en format Excel.

Les données peuvent être traitées. Bien que les mesures soient effectuées toutes les heures par le respiromètre, seule une valeur par jour est prise en compte (toujours la même pour un même test) pour le traitement des données : copier la feuille Excel et supprimer les lignes non prises en compte.

5. Exemple de plan de Respicond®

Avant de démarrer les essais, un plan est rédigé (exemple de l'essai RT17) :

1	7	13	19	25	31	37	43	49	55	61	67	73	79	85	91
T-	T-ANa	T-P+SO	T-SO+US	T-Rhm R	T-P	MGZ AD lot 1	MGZ lot 1 SO+US	MGZ lot 1 Rhm R		MGZ lot 2 P+SO	MGZ lot 2 Sg50	IN AD	IN P+SO	IN Rhm R	MGZ lot 1 P
T-	T-ANa	T-P+SO	T-SO+US	T-Sg 50	T-P	MGZ AD lot 1	MGZ lot 1 SO+US	MGZ lot 1 Rhm R	MGZ lot 2 AD	MGZ lot 2 P+SO	MGZ lot 2 Sg50	IN AD	IN P+SO	IN Sg 50	MGZ lot 1 P
T-	T-ANa	T-P+SO	T-Rhm R	T-Sg 50	T-P	MGZ AD lot 1	MGZ lot 1 SO+US		MGZ lot 2 AD	MGZ lot 2 P+SO	MGZ lot 2 Sg50	IN AD	IN Rhm R	IN Sg 50	MGZ lot 1 P
T-	T-ANa	T-SO+US	T-Rhm R	T-Sg 50	T-P	MGZ AD lot 1	MGZ lot 1 Rhm R		MGZ lot 2 AD	MGZ lot 2 P+SO	MGZ lot 2 Sg50	IN P+SO	IN Rhm R	IN Sg 50	MGZ lot 1 P
T-	T-P+SO	T-SO+US	T-Rhm R	T-Sg 50	T-P	MGZ lot 1 SO+US	MGZ lot 1 Rhm R		MGZ lot 2 AD	MGZ lot 2 P+SO	IN AD	IN P+SO	IN Rhm R	IN Sg 50	MGZ lot 1 P
T-ANa	T-P+SO	T-SO+US	T-Rhm R	T-Sg 50	MGZ AD lot 1	MGZ lot 1 SO+US	MGZ lot 1 Rhm R		MGZ lot 2 AD	MGZ lot 2 Sg50	IN AD	IN P+SO	IN Rhm R	IN Sg 50	

Avec :

Isodécyl Néopentanoate lot 2
Mexanyl GZ lot 1
Mexanyl GZ lot 2
Acétate de sodium

Légende	
T-	Témoin
AD	Addition Directe
P+SO1	Pluronic à 10 mg/L et huile de silicone à 1 mL/L
SO+US	Huile de silicone à 1 mL/L + ultrasons 10 min
HA	Humic acid à 10 mg/L
Sg 50	Silica gel à 50 mg/L

Annexe VII : Données brutes des résultats du test de criblage Respicond®

Le logiciel du Respicond VI® fournit les données brutes en mg de CO_2 pour chaque heure des 28 jours d'essai pour les 95 flacons (tableau 32) sous un format Excel. Ces données sont ensuite traduites du flacon à son identification. Une donnée par jour est conservée afin de simplifier l'exploitation avec 28 données par flacon au lieu de 672 (tableau 33). Ces données de mg de CO_2 par jour sont transposées (tableau 34), découpées pour chaque condition (tableau 35) et transformées en mg CO_2 cumulé corrigé après soustraction du témoin inoculum ou additif correspondant (tableau 36). Ces valeurs de mg de CO_2 sont ensuite converties en pourcentage de biodégradation pour la substance testée (tableau 37).

Tableau 32 : Données de mg de CO_2 par heure pour chaque flacon

Time	Vessel1	Vessel2	…	Vessel94	Vessel95
07/10/2015 12:47	0	0	…	0	0
07/10/2015 14:00	0	0	…	0,00178315	0,06562717
07/10/2015 15:00	0,01436643	0,06729342	…	0	0,09730678
07/10/2015 16:00	0,05699958	0,06622954	…	0,0172989	0,09521835
07/10/2015 17:00	0,03235477	0,08515634	…	0,08659247	0,1744054
…	…	…	…	…	…
04/11/2015 07:00	2,85231638	4,50790405	…	6,42291784	8,6161232
04/11/2015 08:00	2,9061017	4,51193094	…	6,44861174	8,60259914

Tableau 33 : Données de mg de CO_2 par jour pour chaque flacon

Time (days)	Vessel1	Vessel2	…	Vessel94	Vessel95
0	T-AD-1	T-AD-2	…	MGZ Lot 1 P-4	MGZ Lot 1 P-5
1	0,06599356	0,16923165	…	0,23474982	0,26226932
2	0,16738275	0,38420454	…	0,50134981	0,42319861
…	…	…	…	…	…
27	2,9111228	4,5591135	…	6,37025213	8,46519947
28	2,9061017	4,51193094	…	6,44861174	8,60259914

Tableau 34 : Données de mg de CO_2 par jour pour chaque type de condition

Type de condition	Day 1	Day 2	…	Day 27	Day 28
T-AD-1	0,06599356	0,16738275	…	0,48846322	0,72435015
T-AD-2	0,16923165	0,38420454	…	1,02976382	1,38269246
…	…	…	…	…	…
MGZ Lot 1 P-4	0,23474982	0,50134981	…	6,37025213	6,44861174
MGZ Lot 1 P-5	0,26226932	0,42319861	…	8,46519947	8,60259914

Tableau 35 : Données de mg de CO_2 par jour pour les 5 répliques d'une condition (exemple de l'acétate de sodium – Témoin positif)

Time (days)	*1*	*2*	…	*27*	*28*
T-Ana-1	0,5	1,4	…	11,9	11,9
T-Ana-2	0,7	2,1	…	13,5	13,4
T-Ana-3	0,6	1,9	…	13,2	13,1
T-Ana-4	0,3	1,4	…	12,7	12,6
T-Ana-5	0,4	1,4	…	13,6	13,6

Tableau 36 : Données de mg de CO_2 cumulé corrigé par jour pour les 5 répliques d'une condition (exemple de l'acétate de sodium – Témoin positif)

Time (days)	*1*	*2*	…	*27*	*28*
T-Ana-1	0,4	1,2	…	7,7	7,7
T-Ana-2	0,6	1,9	…	9,3	9,2
T-Ana-3	0,5	1,7	…	9,1	9,0
T-Ana-4	0,2	1,2	…	8,5	8,5
T-Ana-5	0,3	1,2	…	9,4	9,4

Tableau 37 : Données en pourcentage de biodégradation par jour pour les 5 répliques d'une condition (exemple de l'acétate de sodium – Témoin positif)

Time (days)	*0*	*1*	…	*27*	*28*
T-Ana-1	0	3	…	70	70
T-Ana-2	0	5	…	85	84
T-Ana-3	0	4	…	82	82
T-Ana-4	0	2	…	78	77
T-Ana-5	0	3	…	86	86

Annexe VIII : Résultats obtenus avec le système PreSens® sur 9 substances chimiques avec 48 souches bactériennes

Le choix des substances modèles est conditionné par l'obtention d'au moins un candidat bactérien spécifique à la dégradation de la substance sélectionnée. La méthode de screening exploitant le système PreSens® a été utilisée pour réaliser ce criblage (Tableau 38).

Nom des substances :

S1 : Isodecyl neopentanoate	S4 : Homosalate	S7 : Pigment blue 15
S2 : N-Dodecane	S5 : Ascorbyl palmitate	S8 : Vitamin E acetate
S3 : Acetyl tributyl citrate	S6 : 2-oleamido-1.3-octadecandiol	S9 : Tribehenin

L'intensité du signal est mise en évidence par un marquage jaune pour les dégradeurs potentiels et orange pour les dégradeurs spécifiques.

Tableau 38 : Mesure de l'O_2 consommée par les 48 souches bactériennes en présence des 9 substances présélectionnées (résultats de l'essai de criblage PreSens®)

N° de collection	Nom des bactéries	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
ATCC BAA 1158	*Xanthobacter autotrophicus*	3,17	0,38	0,08	4,45	52,99	10,19	0,08	0,53	1,74
DSM 645	*Variovorax paradoxus*	-4,40	-3,81	0,90	-0,67	-0,45	-5,22	-2,46	-1,64	-4,55
DSM 20044	*Staphylococcus epidermidis*	-1,09	-0,07	-0,51	0,00	53,46	-0,66	-1,75	-0,36	-3,13
DSM 1404	*Paracoccus denitrificans*	4,54	73,71	4,04	4,11	71,28	-1,13	1,11	0,35	-1,77
DSM 65	*Paracoccus denitrificans*	0,41	1,10	2,75	1,03	0,28	-1,58	-1,86	-0,62	-2,54
DSM 30030	*Alcaligenes aquatilis faecalis*	-1,66	0,14	13,27	1,51	15,65	-2,91	-2,21	-0,97	-4,64
LMG 4034	*Flavobacterium sp.*	-2,84	-1,35	6,12	-1,70	6,85	-2,53	-2,84	-0,50	-2,32
DSM 7215	*Rhizobium radiobacter*	-2,62	-1,35	7,30	-0,84	0,77	-2,31	-3,05	-1,91	-3,97
CIP A105	*Corynebacterium pseudodiphthericum*	68,28	85,87	0,74	-1,11	84,21	23,15	-4,58	-2,51	-8,19
CIP 109170	*Stenotrophomonas koreensis*	-0,58	1,91	5,36	-2,50	11,42	-5,07	3,66	-1,62	2,25
LMG 7135	*Bacillus subtilis*	75,83	88,17	5,81	-0,90	60,41	26,17	-0,15	-1,96	-4,37
DSM 16550	*Rhodococcus erythropolis*	89,16	88,92	21,65	33,76	5,37	0,91	7,04	-0,15	2,12
DSM 13387	*Proteus vulgaris*	50,65	86,50	5,72	-0,64	38,43	24,82	0,00	-0,50	-0,92
DSM 21229	*Bosea vestrisii*	-4,01	-1,48	0,65	-2,00	10,66	-4,15	-2,08	-0,30	-4,45
DSM 11634	*Pseudomonas aeruginosa*	95,48	89,51	2,05	1,21	57,35	18,86	-2,27	-0,76	-4,77
CIP 103198	*Alteromonas macleodii*	81,57	71,97	4,64	0,50	40,62	22,42	1,76	2,57	-3,92
DSM 14801	*Delftia acidovorans*	37,73	91,75	5,48	1,80	54,27	20,84	1,09	-0,78	-4,38
DSM 50026	*Pseudomonas putida*	-6,42	-5,14	-3,40	-4,53	23,97	9,69	-2,27	-0,45	-4,15
LMG 20181	*Micrococcus lylae*	77,99	89,11	4,90	3,41	2,00	-2,43	-2,50	0,86	-0,21
DSM 12800	*Pseudomonas sp.*	-1,05	0,84	1,83	0,35	1,12	-1,19	-0,07	2,15	-0,83

N° de collection	Nom des bactéries	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
DSM 30053	*Enterobacter aerogenes*	-1,67	-0,29	1,23	-0,58	-0,87	-0,14	2,83	0,57	0,00
DSM 20407	*Arthrobacter sp.*	-0,49	1,48	3,04	4,55	8,40	1,00	0,43	0,07	-1,85
DSM 20128	*Arthrobacter albidus*	-1,06	-4,11	3,34	3,63	36,34	-3,96	0,83	-2,72	-4,43
DSM 50090	*Pseudomonas fluorescens*	-2,69	-0,62	3,31	-1,45	51,56	-3,51	-2,69	-1,93	-3,72
DSM 43665	*Nocardia farcinica*	9,24	86,72	3,13	1,57	60,12	0,14	-1,78	-1,35	-1,42
DSM 6014	*Sphingomonas wittichii*	-2,48	-5,50	-1,63	14,37	15,03	-3,95	-1,47	-1,16	-1,70
DSM 20307	*Dietzia maris*	3,81	0,73	1,61	0,15	3,24	-1,98	1,51	-0,73	-3,30
LMG 3813	*Arthrobacter globiformis*	-0,51	-0,79	5,20	0,22	4,98	3,67	-2,24	-0,65	-3,03
ATCC 19718	*Nitrosomonas europaea*	16,57	88,84	3,64	2,82	53,41	61,34	1,63	0,07	0,37
DSM 18396	*Enterobacter helveticus*	1,39	1,46	4,31	0,00	9,08	1,92	3,76	0,29	-1,99
DSM 7251	*Mycobacterium vanbaalenii*	-5,35	41,62	-1,60	-7,35	22,27	-5,43	-5,59	-3,75	-7,91
DSM 428	*Cupriavidus necator*	-0,29	-0,36	8,50	6,42	24,17	7,42	7,20	0,65	0,07
ATCC 700926	*Escherichia coli*	1,33	1,26	6,42	3,77	49,21	-1,95	0,07	0,35	-1,81
DSM 1868	*Pseudomonas putida*	-1,21	0,53	9,75	-0,76	25,83	-1,81	-2,34	-2,72	-2,72
DSM 17887	*Comamonas denitrificans*	-0,62	1,11	3,68	6,06	2,29	-0,62	0,28	-2,64	-1,18
DSM 38	*Comamonas testosteroni*	7,35	43,50	1,99	-0,74	67,90	0,88	-2,51	0,22	17,76
DSM 6279	*Pseudomonas aeruginosa*	14,82	20,94	6,46	1,55	22,98	0,83	0,49	0,07	-2,29
CIP A235	*Proteus mirabilis*	66,87	80,25	1,21	-0,86	12,18	14,02	-2,92	-1,21	-2,00
DSM 14962	*Acinobacter towneri*	0,22	-1,44	1,62	-1,90	1,29	-0,53	-0,83	-0,61	1,85
DSM 20116	*Arthrobacter aurescens*	-1,07	0,93	8,47	1,22	1,08	-2,08	-1,29	-1,00	-0,63
DSM 15141	*Bacillus funiculus*	2,39	-2,16	1,73	3,65	0,87	-1,37	0,87	-0,87	-3,39
DSM 299	*Bacillus mycoides*	22,45	89,74	2,65	0,21	41,11	14,24	0,93	-1,65	-3,44
DSM 10	*Bacillus subtilis*	-1,18	-0,74	10,21	0,88	17,76	-2,28	0,88	-0,22	-2,35
DSM 1057	*Micrococcus sp.*	28,11	74,92	-2,61	2,95	72,92	16,27	-0,28	-2,33	-4,65
DSM 6900	*Sphingobium yanoikuyae*	43,40	70,31	1,34	-0,37	26,38	24,43	-3,20	-0,22	-4,99
DSM 20609	*Staphylococcus auricularis*	60,60	84,53	3,38	-0,41	5,21	3,23	-1,68	-1,68	-2,00
DSM 6427	*Rhodococcus rhodochrous*	73,22	90,42	1,31	-1,10	24,69	16,25	-0,22	-1,17	-3,07
DSM 14766	*Zoogloea resiniphila*	1,78	0,35	1,46	7,17	3,62	3,68	0,89	-2,02	-0,96

Les substances S2 et S5 se sont révélées facilement biodégradables et ont été retirées de la sélection.

Annexe IX : Analyse du néopentanoate d'isodecyle et du mexanyl GZ dans un milieu d'essai suite à des traitements dispersifs

1. Présentation de l'analyse

Les informations de cette annexe font partie d'un rapport interne L'Oréal rédigé par Alexandre GUEPET (pôle d'analyse structurale, L'Oréal), qui a également réalisé les expériences associées.

L'amélioration de la biodégradabilité de substances faiblement solubles a été observée lors d'un traitement préalable des solutions de milieu d'essai avec des ultrasons ou des ondes électromagnétiques permettant de mieux les disperser.

Cette étude a pour but de montrer que ces traitements physiques ne modifient pas la teneur ni la nature chimique des deux substances modèles : le MGZ et l'IN.

Des solutions de concentration voisine de 20mg de carbone par litre de milieu d'essai ont été préparées et traitées dans le laboratoire Eurofins Expertise Environnementale (Maxéville) en vue de réaliser un test de biodégradabilité facile (Méthode OCDE 301B).

Les échantillons fournis pour chacune des substances correspondent à :

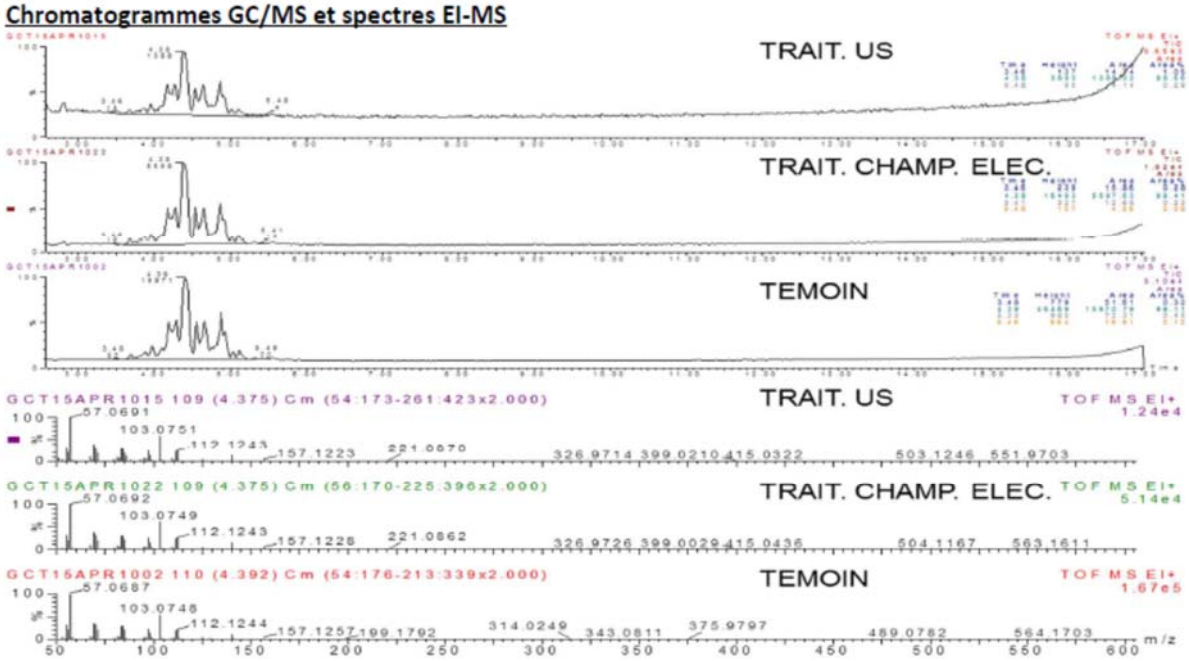
- trois flacons contenant 150 mL des solutions traitées 30 min aux ultrasons et trois flacons de solutions non traitées qui serviront de témoins à l'étude.

- deux flacons contenant 50 mL de solutions traitées par des ondes électromagnétiques magnétiques.

Au regard de la complexité des solutions (milieu d'essai contenant divers sels minéraux) et de la nature du contenant pouvant adsorber ces MPs hydrophobes, une extraction liquide/liquide du volume total de chacun des flacons fournis a été réalisée en utilisant 3 fois 50 mL de dichlorométhane. L'analyse des phases organiques ont été réalisées par GC/MS dans le cas de l'IN et par HPLC/MS dans le cas du MGZ afin de vérifier l'intégrité des structures et de vérifier, si possible, la concentration solubilisée dans le milieu.

2. Résultats du Néopentanoate d'isodécyle (IN) après traitements aux ultrasons et aux ondes électromagnétiques

Chromatogrammes GC/MS et spectres EI-MS



Les spectres EI correspondent à la moyenne des spectres des différents isomères élués entre 3.5 et 8.5 min.

Tableau récapitulatif *(les valeurs numériques correspondent aux aires des pics chromatographiques des MPs).*

	NEOPENTANOATE D'ISODECYLE - GC/MS			
Temoin	Echantillon	1	2	3
	Aire relative	4398	5621	3418
	Moyenne	4479		

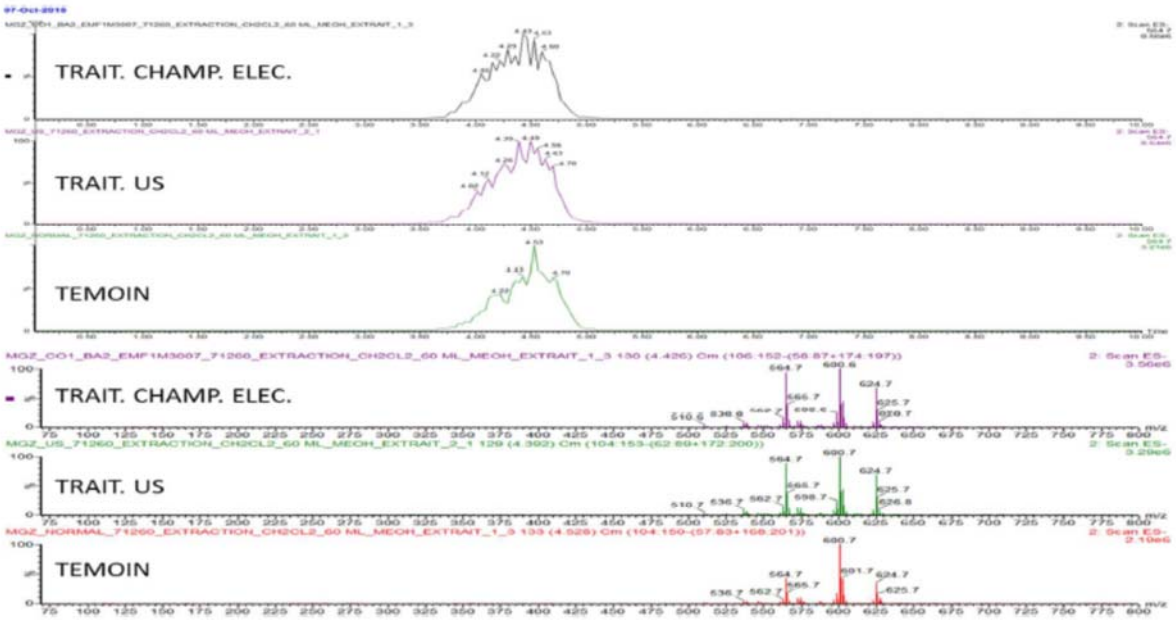
Ultrasons	Echantillon	1	2	3
	Aire relative	2906	1595	1298
	Moyenne	1933		

Electromagetique	Traitement	Electromagnetique 1		Electromagnetique 2		Electromagnetique 3	
	Echantillon	A1	A2	B1	B2	C1	C2
	Aire relative	7141	3905	6150	5921	8421	8424
	Moyenne	5523		6036		8423	
	Moyenne	6660					

Ces résultats ont été confirmés par une analyse GC/FID des mêmes extraits.

3. Résultats du Mexanyl GZ (MGZ) après traitements aux ultrasons et aux ondes électromagnétiques

Analyse LC/MS. Courant d'ion spécifique du Mexanyl GZ m/z 564.7 et spectres MS



L'ion m/z 564.7 correspond à l'ion déprotoné $[M-H]^-$ du Mexanyl GZ et les ions m/z 600.7 et 624.7 aux adduits $[M+Cl]^-$ et $[M+CH3COO]^-$.

Tableau récapitulatif *(les valeurs numériques correspondent aux aires des pics chromatographiques des MPs).*

	MGZ - HPLC/MS					
Temoin	Echantillon	1		2		3
	Aire relative	1475079		2871125		3107338
	Moyenne	2484514				

Ultrasons	Echantillon	1		2		3
	Aire relative	4867304		4946715		4873489
	Moyenne	4895836				

Electromagetique	Traitement	Electromagnetique 1		Electromagnetique 2		Electromagnetique 3	
	Echantillon	A1	A2	B1	B2	C1	C2
	Aire relative	5775312	5467003	2991588	5635993	3339580	6565172
	Moyenne	5621158		4313791		4952376	
	Moyenne	4962441					

4. Conclusion

Les analyses des extraits au dichlorométhane des différents échantillons montrent que les profils des signaux relatifs à ces 2 substances et les spectres de masse correspondants ne varient pas avec les traitements. Il est par contre difficile de tirer des conclusions des intensités d'aires de ces signaux. On note en effet une diminution par un facteur 1.5 de l'aire du signal d'IN avec le traitement aux ultrasons par rapport à l'aire de la solution non traitée ; cette aire est supérieure avec le traitement par des ondes électromagnétiques. On observe par contre une augmentation par un facteur 2 de l'aire du signal du MGZ avec les traitements aux ultra-sons et aux ondes électromagnétiques par rapport à la solution non traitée. Cette variabilité des résultats est très probablement à mettre au compte de l'hétérogénéité des prélèvements lors du flaconnage.

Annexe X : Résultats détaillés de l'analyse portant sur l'hydrophobie des bactéries

L'analyse de l'hydrophobie des bactéries a permis de mesurer les indices d'adhésion à l'octane et de floculation pour l'ensemble des 48 souches bactériennes. Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 39. Les résultats de l'indice d'adhésion à l'octane (A) sont matérialisés en bleu pour une bactérie hydrophile, jaune pour une bactérie hydrophobe et blanche pour une bactérie neutre.

Tableau 39 : Indices d'adhésion à l'Octane (A) et de floculation (F) des 48 souches bactériennes pré-sélectionnées

Phylum	Classe	Ordre	Genre/espèce	Numéro de collection	A	F
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Corynebacterium pseudodiphthericum*	CIPA 105	-9,0	6,1
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Arthrobacter globiformis*	LMG 3813	2,1	-5,4
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Nocardia farcinica*	DSM 43665	4,8	3,5
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Rhodococcus rhodocrous*	DSM 6427	6,2	1,0
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Arthrobacter aurescens*	DSM 20116	7,9	-10,0
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Rhodococcus erythropolis*	DSM 43066	35,0	73,9
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Arthrobacter albidus*	DSM 20128	72,1	61,9
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Dietzia maris*	DSM 20307	80,2	33,3
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Micrococcus sp.*	DSM 1057	83,9	87,8
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Micrococcus lylae*	LMG 20181	88,8	4,4
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Arthrobacter sp.*	DSM 20407	90,2	-15,4
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Mycobacterium vanbaalenii*	DSM 7251	91,3	8,3
Actinobactéries	**Actinobacteria**	Actinomycetales	*Rhodococcus erythropolis*	DSM 16550	91,4	6,2
Bacteroidetes	**Bacteroidetes**	Flavobacteriales	*Flavobacterium sp.*	LMG 4034	19,2	24,8
Firmicutes	**Bacilli**	Bacillales	*Staphylococcus epidermidis*	DSM 20044	-26,2	4,8
Firmicutes	**Bacilli**	Bacillales	*Bacillus subtilis*	LMG 7135	0,0	12,4
Firmicutes	**Bacilli**	Bacillales	*Bacillus subtilis*	DSM 10	4,2	4,7
Firmicutes	**Bacilli**	Bacillales	*Bacillus funiculus*	DSM 15141	8,6	-9,0
Firmicutes	**Bacilli**	Bacillales	*Bacillus coagulans*	LMG 6938	56,1	20,9
Firmicutes	**Bacilli**	Bacillales	*Bacillus mycoides*	DSM 299	62,7	-12,4
Firmicutes	**Bacilli**	Bacillales	*Staphylococcus auricularis*	DSM 20609	92,4	-2,1
Protéobactéries	**α-Protéobactéries**	Rhizobiales	*Rhizobium radiobacter*	DSM 7215	36,9	-2,9
Protéobactéries	**α-Protéobactéries**	Rhizobiales	*Xanthobacter autotrophicus*	ATCC BAA 1158	96,1	16,1
Protéobactéries	**α-Protéobactéries**	Rhizobiales	*Bosea vestrisii*	DSM 21229	96,7	24,5
Protéobactéries	**α-Protéobactéries**	Rhodobacterales	*Paracoccus denitrificans*	DSM 65	-18,3	-0,3
Protéobactéries	**α-Protéobactéries**	Rhodobacterales	*Paracoccus denitrificans*	DSM 1404	-4,4	-4,3
Protéobactéries	**α-Protéobactéries**	Sphingomonadales	*Sphingomonas wittichii*	DSM 6014	-9,9	49,3

Phylum	**Classe**	Ordre	*Genre/espèce*	Numéro de collection	A	F
Protéobactéries	α-Protéobactéries	Sphingomonadales	Sphingobium yanoikuyae	DSM 6900	80,5	5,1
Protéobactéries	**β-Proteobactéries**	Burkholderiales	*Variovorax paradoxus*	DSM 645	27,0	-11,5
Protéobactéries	**β-Proteobactéries**	Burkholderiales	*Comamonas testosteroni*	DSM 38	66,6	-9,7
Protéobactéries	**β-Proteobactéries**	Burkholderiales	*Delftia acidovorans*	DSM 14801	71,1	8,6
Protéobactéries	**β-Proteobactéries**	Burkholderiales	*Comamonas denitrificans*	DSM 17887	72,0	46,6
Protéobactéries	**β-Proteobactéries**	Burkholderiales	*Cupriavidus necator*	DSM 428	89,5	6,2
Protéobactéries	**β-Proteobactéries**	Burkholderiales	*Alcaligenes aquatilis faecalis*	DSM 30030	91,8	11,3
Protéobactéries	**β-Proteobactéries**	Nitrosomonadales	*Nitrosomonas europaea*	ATCC 19718	11,3	11,0
Protéobactéries	**β-Proteobactéries**	Rhodocyclales	*Zoogloea resiniphila*	DSM 14766	-6,8	5,5
Protéobactéries	**β-Proteobactéries**	Rhodocyclales	*Thauera linaloolentis*	DSM 12138	1,3	-5,8
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Alteromonadales	*Alteromonas macleodii*	CIP 103198	1,8	26,2
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Enterobactériales	*Proteus vulgaris*	DSM 13387	-12,6	-1,3
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Enterobactériales	*Proteus mirabilis*	CIP A235	34,3	-1,0
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Enterobactériales	*Escherichia coli*	ATCC 700926	43,9	3,9
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Enterobactériales	*Enterobacter helveticus*	DSM 18396	45,2	8,5
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Enterobactériales	*Enterobacter aerogenes*	DSM 30053	61,1	37,5
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Enterobactériales	*Budvicia aquatica*	DSM 5075	95,7	0,7
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Pseudomonadales	*Pseudomonas putida*	DSM 50026	1,4	2,0
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Pseudomonadales	*Pseudomonas putida*	DSM 84	4,7	26,9
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Pseudomonadales	*Pseudomonas aeruginosa*	DSM 6279	8,9	3,0
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Pseudomonadales	*Acinetobacter towneri*	DSM 14962	15,6	-1,6
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Pseudomonadales	*Pseudomonas fluorescens*	DSM 50090	19,0	26,4
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Pseudomonadales	*Pseudomonas aeruginosa*	DSM 11634	22,0	9,2
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Pseudomonadales	*Pseudomonas putida*	DSM 1868	72,1	33,4
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Pseudomonadales	*Pseudomonas sp.*	DSM 12800	93,0	34,3
Protéobactéries	**γ-Protéobactéries**	Xanthomonadales	*Stenotrophomonas koreensis*	CIP 109170 / CIP15906	-10,5	-1,6

Annexe XI : Mesures de la biodégradabilité du MGZ et de l'IN selon la phase de croissance de l'inoculum (souches bactériennes isolées)

Les courbes de biodégradabilité facile des substances Mexanyl GZ (MGZ) et Isodecyl Neopentanoate (IN) avec, comme inoculum, les souches CIPA105 et ATCC19718 en phases de croissance exponentielle et stationnaire sont présentées dans les figures 59 à 66 ci-dessous.

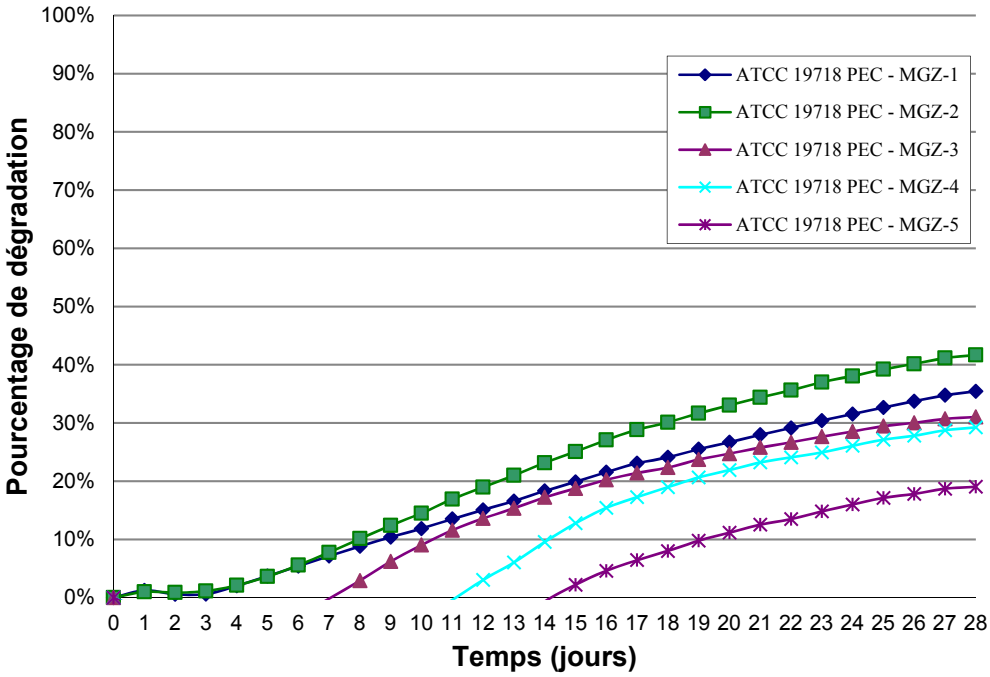


Figure 59 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de MGZ avec la souche ATCC19718 en phase exponentielle de croissance

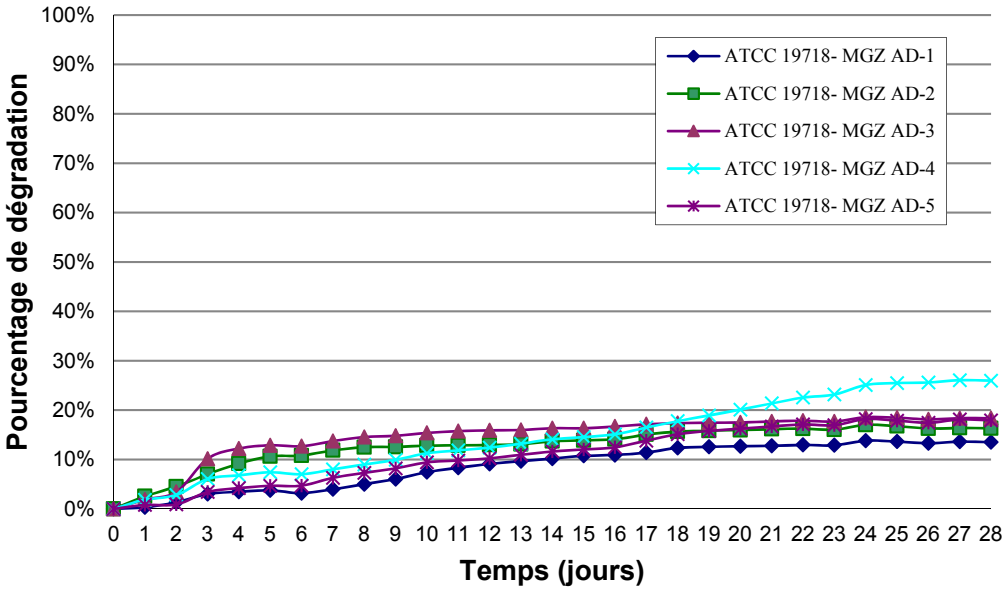


Figure 60 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de MGZ avec la souche ATCC19718 en phase stationnaire de croissance

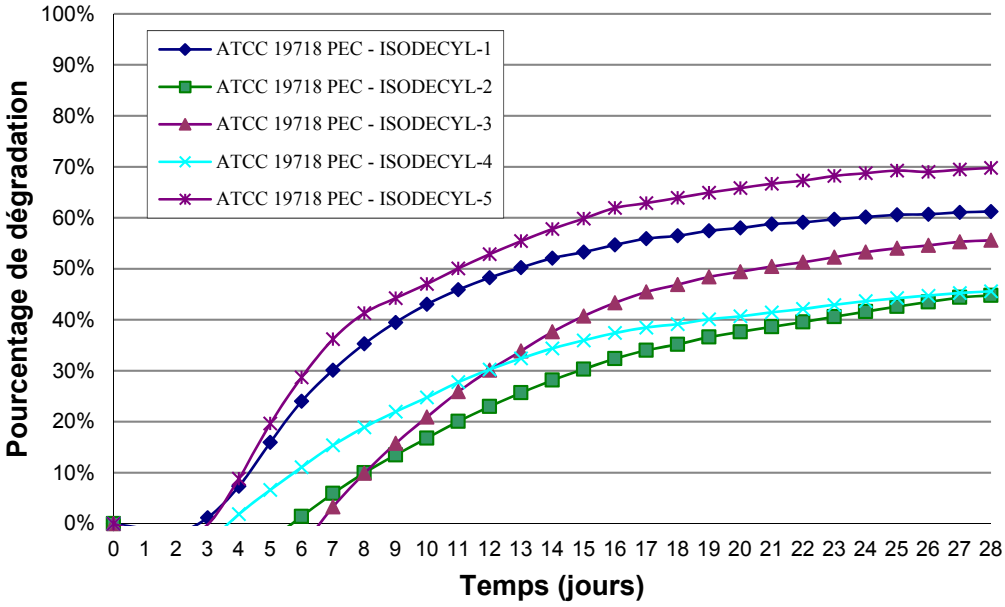


Figure 61 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de l'IN avec la souche ATCC19718 en phase exponentielle de croissance

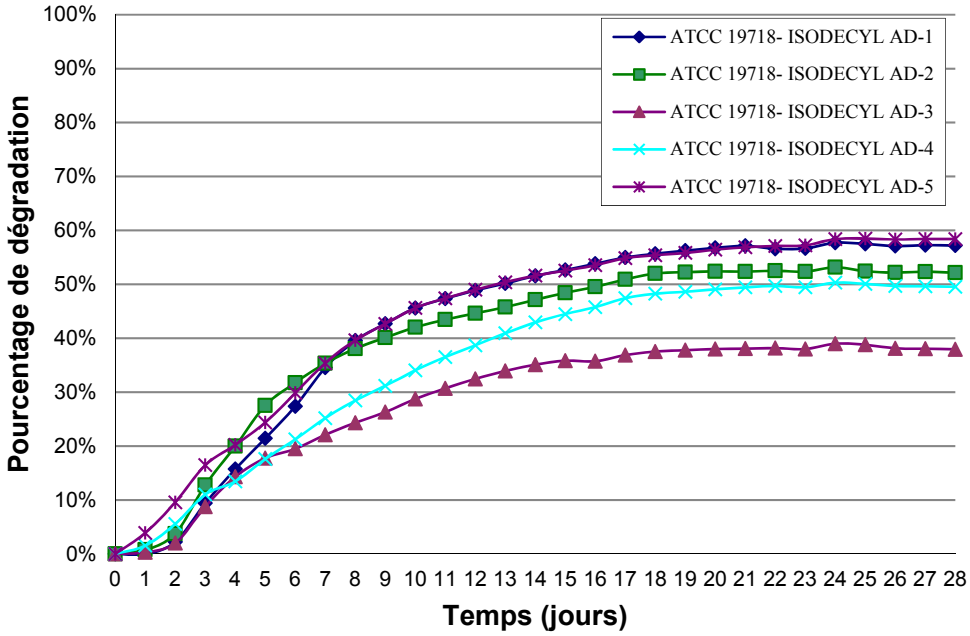


Figure 62 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de l'IN avec la souche ATCC19718 en phase stationnaire de croissance

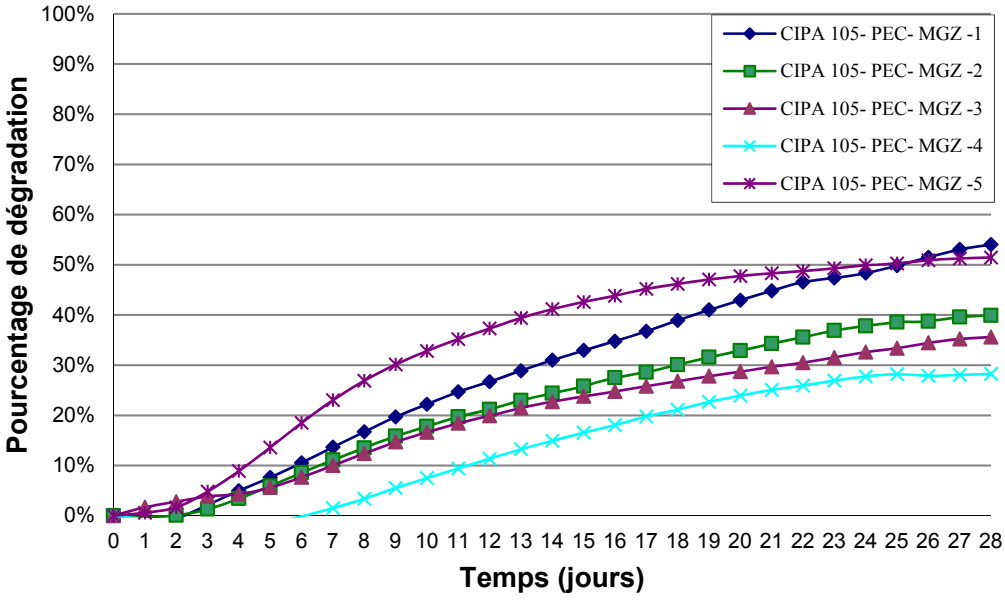


Figure 63 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de MGZ avec la souche CIPA105 en phase exponentielle de croissance

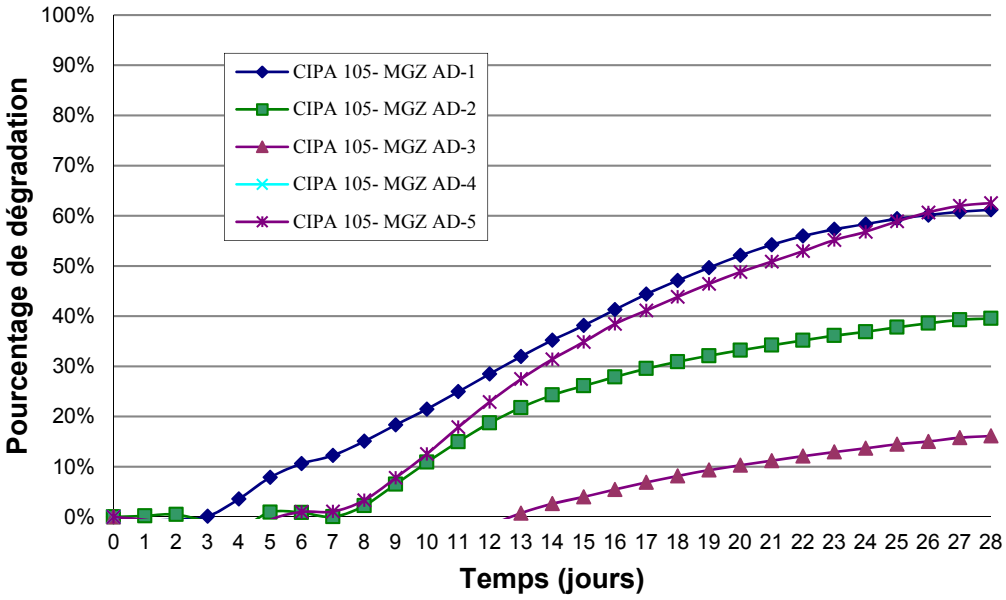


Figure 64 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de MGZ avec la souche CIPA105 en phase stationnaire de croissance

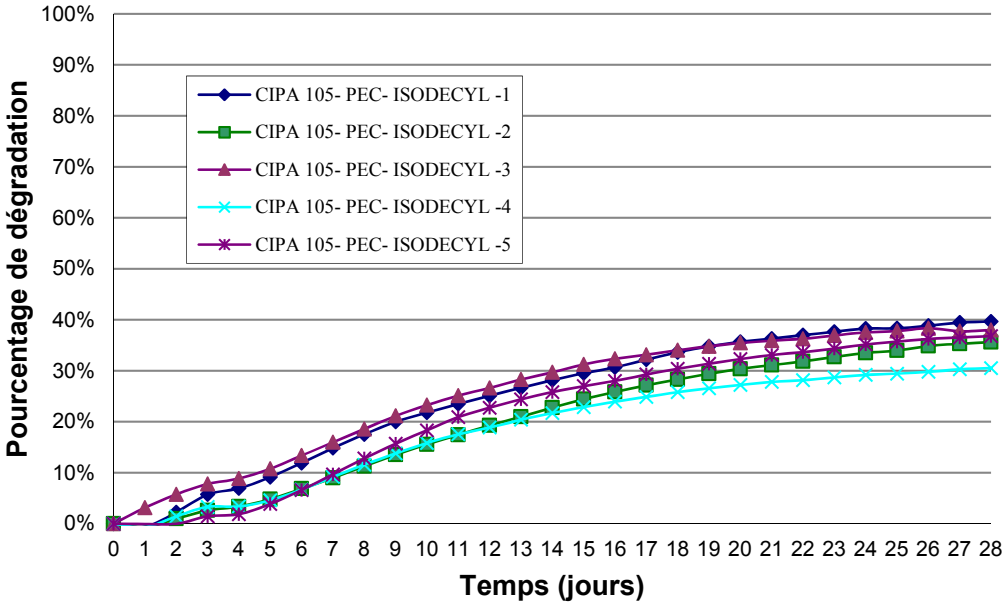


Figure 65 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de l'IN avec la souche CIPA105 en phase exponentielle de croissance

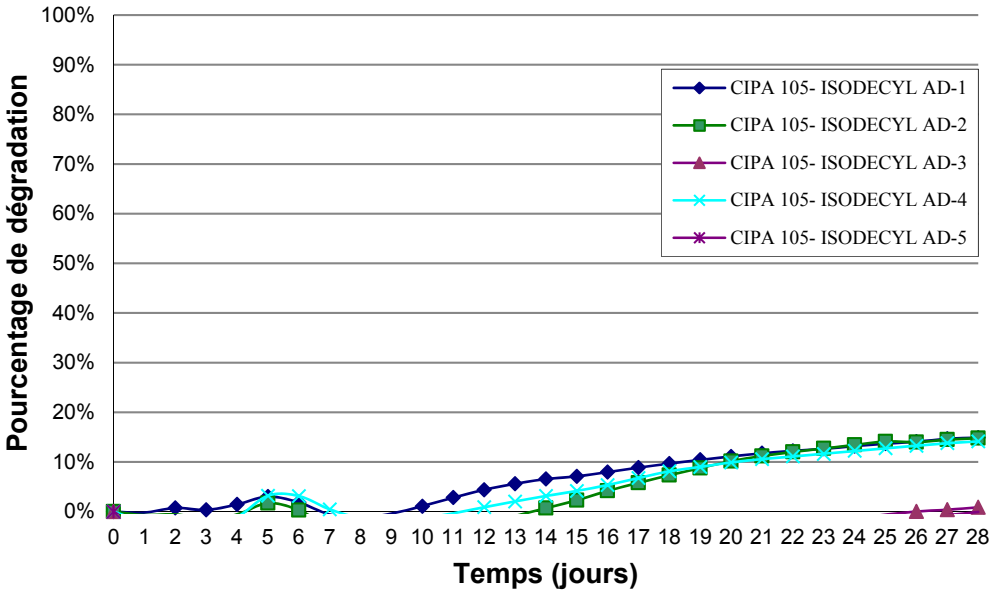


Figure 66 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de l'IN avec la souche CIPA105 en phase stationnaire de croissance

Annexe XII : Sources secondaires de variabilité du test de biodégradabilité facile

1. Variabilité du résultat de biodégradabilité due au milieu d'essai et au flacon d'essai de criblage

Bien qu'il n'y ait pas eu d'étude spécifique réalisée sur le flacon d'essai utilisé pour les tests de criblage, l'ensemble des essais a été réalisé avec le même lot de flacon en polypropylène / Nalgene® chimiquement inerte. Toutefois, le matériau constituant ce flacon ne préserve pas des phénomènes d'adsorbabilité que peuvent présenter certaines substances. Nos substances modèles n'étant pas adsorbables sur ces flacons, nous n'avons pas rencontré de difficulté particulière avec ces récipients utilisés avec l'appareil Respicond VI®.

Le milieu Sturm ne contient pas de carbone disponible et se trouve être reproductible de par sa composition et l'utilisation des mêmes réactifs de préparation (eau, sels minéraux) pour l'ensemble de nos essais.

Ces deux paramètres ont été considérés comme des facteurs négligeables sur la reproductibilité des essais.

2. Variabilité du résultat de biodégradabilité due à la pesée de la substance

Une mesure du carbone organique dissous a été réalisée selon la norme (AFNOR, 1997) sur 3 flacons par substance pour déterminer la fraction solubilisée des substances modèles MGZ et IN dans le milieu Sturm après 24 h d'agitation et après 28 jours (tableau 40).

Tableau 40 : Résultats des concentrations de MGZ et IN en mg de substance.L^{-1} après 24h et 28 jours d'agitation dans le milieu minéral basée sur l'analyse du carbone organique total

	MGZ (24 h)	IN (24 h)	MGZ (28 jours)	IN (28 jours)
Concentration en substance solubilisée dans le milieu Sturm (mg.L^{-1})	0	0,1	3,25	2,45
	0,01	0,05	4,75	2,95
	0,1	0,02	3,65	3,25
Médiane	0,01	0,05	3,65	2,95
Ecart absolu médian (MAD)	0,01	0,03	0,40	0,30

Les concentrations en MGZ et IN solubilisées sont calculées en défalquant la teneur en carbone résiduel présente dans le milieu Sturm. La limite de quantification de la méthode est de 0,2 mg de

carbone.L^{-1}. Les concentrations solubilisées pour les deux substances après 24h, sont très faibles avec 0,01 mg.L^{-1} pour MGZ et 0,05 mg.L^{-1} pour IN. La variabilité relative pour ces mesures, faites avec 3 répliques, est élevée mais est associée à des concentrations de substances très faibles. Après 28 jours, la fraction solubilisée passe à 3,65 mg.L^{-1} pour MGZ avec un MAD équivalent à 11% de variabilité et 2,95 mg.L^{-1} pour IN avec un MAD équivalent à 10% de variabilité.

Les solubilités de 3,65 mg.L^{-1} (19,4% de la concentration initiale) pour MGZ et 2,95 mg.L^{-1} (15,5% de la concentration initiale) pour IN atteintes après 28 jours d'agitation correspondent aux fractions finales disponibles dans le flacon d'essai sans action des microorganismes. La variabilité portant sur la solubilisation à 28 jours de MGZ et d'IN se limite à respectivement 11% et 10%. Cette variabilité est acceptable pour évaluer la biodégradabilité facile de ces substances peu hydrosolubles.

Annexe XIII : Analyse des résultats des témoins et des essais par addition directe

1. Témoins inoculum

Pour chaque essai, un témoin inoculum, constitué uniquement de l'inoculum et du milieu minéral, a été réalisé. Ce témoin a pour objectif de mesurer la respiration de base de l'inoculum sans substance à tester ni MAB. Le résultat en mg de CO_2 obtenu pour les essais de criblage RT (tableau 41) et standard ST (tableau 42) sera retranché au résultat obtenu pour les essais réalisés avec substance à tester.

Tableau 41: Résultats de respiration des témoins inoculum en mg de $C0_2$ cumulé à 28 jours en test de criblage RT avec l'automate Respicond VI®

Essai (RT)	2	3	4	5	6	7	9	11	12	14	15	16	17	18	19	20
réplique 1	3,0	7,5	4,8	6,6	8,2	3,9	10,2	4,4	5,0	2,0	4,7	5,5	2,9	3,2	5,1	4,2
réplique 2	4,4	2,4	2,5	7,0	5,5	4,2	4,1	5,1	5,6	3,4	5,0	7,6	4,5	3,9	4,9	5,0
réplique 3	4,0	2,6	2,7	6,9	4,9	4,1	4,1	4,8	6,1	3,6	4,2	15,4	4,1	4,4	8,2	4,8
réplique 4	4,0	4,7	3,1	6,5	4,9	4,9	3,7	4,7	4,8	3,3	5,2	6,0	3,8	6,8	5,1	5,5
réplique 5	*	3,4	3,6	6,5	4,1	4,7	3,9	4,9	4,7	4,4	4,9	6,1	4,5	4,3	9,9	3,8
Médiane	**4,0**	**3,4**	**3,1**	**6,6**	**4,9**	**4,2**	**4,1**	**4,8**	**5,0**	**3,4**	**4,9**	**6,1**	**4,1**	**4,3**	**5,1**	**4,8**
MAD	0,2	1,0	0,5	0,2	0,6	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,6	0,3	0,4	0,2	0,6
Médiane en $mg.L^{-1}$	**27**	**23**	**21**	**44**	**33**	**28**	**27**	**32**	**34**	**23**	**33**	**41**	**28**	**29**	**34**	**32**

** Essai RT2 réalisé avec 4 répliques.*

Tableau 42: Résultats de respiration des témoins inoculum en mg de $C0_2$ cumulé.L^{-1} à 28 jours en test standard (ST)

Essai (ST)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
réplique 1	15,8	22,7	27,3	25,3	14,1	9,2	10,1	16,1	31,2	27,1
réplique 2	15,2	18,5	26,8	22,4	13,6	11,3	9,9	16,7	31,5	24,6
Médiane	**15,5**	**20,6**	**27,1**	**23,9**	**13,9**	**10,3**	**10,0**	**16,4**	**31,4**	**25,9**
MAD	0,3	2.1	0,5	2,9	0,2	1,1	0,1	0,3	0,2	1,2

Pour les essais de criblage, on peut remarquer que certaines valeurs (grisées) peuvent sembler aberrantes au vu des résultats de l'essai. Ces valeurs ont été conservées et intégrées au calcul de la médiane (valeur de référence) qui est peu influencée par les valeurs extrêmes. Le MAD, révélateur de la dispersion des données, tient compte de ces valeurs. Le résultat médian des essais de criblage et standard est de 30,3 et 19,5 mg de $CO_2.L^{-1}$ respectivement. L'ensemble des données obtenues sont en accord avec les recommandations de la ligne directrice OCDE 301B (OECD/OCDE, 2013).

2. Témoins positifs

Les résultats de biodégradabilité obtenue par la substance de référence (acétate de sodium) à 14 jours de test (tableau 43) sont tous en accord avec le critère de validité des essais (> 60% de biodégradation à 14 jours).

Tableau 43 : Résultats de biodégradation en % des témoins positifs à 14 jours pour les tests de criblage (RT) et standard (ST)

Essai	RT12	RT14	RT15	RT16	RT17	RT18	RT19	RT20	-	-
Médiane (%)	84,0	89,0	64,0	70,0	71,0	75,0	65,0	73,0	-	-
Essai	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10
Médiane (%)	86,0	81,0	77,0	78,0	70,0	76,0	76,0	74,0	86,0	75,0

3. Témoins additifs chimiques

La biodégradabilité des additifs chimiques a été mesurée aux concentrations utilisées lors de la réalisation des témoins MAB comprenant le milieu minéral, l'inoculum et le ou les additifs chimiques sans substance à tester (tableau 44). On peut noter une forte variabilité pour ces résultats notamment lors des essais de criblage car les additifs sont utilisés à des concentrations inférieures à celles recommandées dans la ligne directrice OCDE 301 B (10 mg de carbone.L^{-1}). La CNC étant à une concentration en carbone particulièrement faible, un essai à 20 mg de carbone.L^{-1} a été réalisé et révèle une biodégradabilité de 87% à 28 jours. Ainsi, la CNC et les rhamnolipides E et R sont facilement biodégradables dans nos conditions d'essai et peuvent être considérés comme acteur d'une cométabolisation. Le tensioactif Pluronic PE 9400® et l'acide humique présentent une biodégradabilité dépassant parfois le seuil de 10% et peuvent, en fonction des essais, être considérés comme élément perturbateur pour interpréter les résultats. Il convient de vérifier, pour chaque essai, l'impact de ces additifs sur le test. L'huile de silicone et l'huile minérale possèdent toujours une biodégradabilité acceptable et inférieure à 10%. Le gel de silice ne contient pas de carbone.

Tableau 44 : Résultats finaux de biodégradation en % des additifs chimiques pour les tests de criblage (RT) et standard (ST)

% de biodégradation	Test de criblage (Respicond VI®)				Test de confirmation (Standard)			
Additif	**nb d'essai**	**médiane**	**min**	**max**	**nb d'essai**	**médiane**	**min**	**max**
Pluronic PE9400®	3	17	-7	29	1	16	16	16
Acide humique	2	17	-5	39	1	7	7	7
Huile de silicone AR20®	9	0	0	1	5	0	0	0
Rhamnolipide E	3	108	99	120	Non testé			
Rhamnolipide R	2	101	92	110	Non testé			
HMN	7	0	-16	9	5	5	-28	9
CNC	4	186,5	-157	488	Non testé			
gel de silice	Sans objet, ne contient pas de carbone							

4. Essais par addition directe

Pour chaque test, un témoin a été réalisé avec la méthode de référence : ajout de la substance à tester par addition directe (AD) dans le flacon d'essai avec le milieu minéral et l'inoculum. Les résultats obtenus pour ce témoin « AD » de biodégradation sont utilisés comme référence pour évaluer les MAB testées lors de ce même test pour les essais de criblage (tableau 45) et les essais standard (tableau 46).

Tableau 45 : Résultats des essais de criblage pour MGZ et IN en addition directe

MEXANYL GZ - MGZ

n° lot	n° essai	Résultats médians			
		début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
1	*3**	*28*	*6*	*6*	*1*
1	*4**	*16*	*14*	*15*	*1*
2	*7*	*10*	*24*	*35*	*1*
2	*9*	*13*	*13*	*16*	*1*
2	*11*	*5*	*29*	*46*	*1*
2	14 MTB1[22]	15	18	20	1
2	14 MTB2[21]	7	35	51	1
2	15	6	29	44	1
1	16	28	10	10	1
1	17	23	11	11	1
2	17	13	24	29	1
2	19	28	6	6	1
1	20	28	3	3	1
2	20	14	12	11	1

ISODECYL NEOPENTANOATE - IN

n° lot	n° essai	Résultats médians			
		début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
1	*A*	*7*	*27*	*36*	*1*
1	*B*	*9*	*33*	*48*	*1*
2	*4**	*7*	*22*	*31*	*1*
2	*7*	*7*	*29*	*37*	*1*
2	*9*	*4*	*40*	*59*	*1*
2	12	9	19	27	1
2	14 MTB1[21]	2	35	66	1
2	14 MTB2[21]	6	25	32	1
2	15	9	37	47	1
2	16	16	17	18	1
2	17	6	24	32	1
2	18	6	24	34	1
2	20	6	27	27	1

** Les essais 3 et 4 ont été réalisés avec différents inocula (boue activée, souches bactériennes isolées)* ***sans témoin additifs chimiques (témoin MAB).*** *Le calcul de la biodégradabilité réalisée avec une MAB a été réalisé en défalquant le résultat du témoin inoculum sans MAB du test. Ainsi, pour les essais 3 et 4, le témoin inoculum sans MAB a été utilisé pour réaliser les calculs. Les résultats de ces essais n'ont donc été utilisés qu'à titre informatif et sont matérialisés dans les tableaux de résultats par un*.*

[22] *Témoin réalisé dans du milieu traité par champs électromagnétiques (MTB avec, comme inoculum, une boue activée de Maxéville (1) et de Lorient (2)*

Tableau 46 : Résultats des essais standard pour MGZ et IN en addition directe

MEXANYL GZ - MGZ

n° lot	n° essai	Résultats médians			
		début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
2	5	8	19	21	1
1	6	6	16	24	1
2	7	11	20	28	1
1	8	11	23	29	1
1	9	10	22	29	1
1	10	4	20	43	1

ISODECYL NEOPENTANOATE - IN

n° lot	n° essai	Résultats médians			
		début f10j (j)	F10j (%)	28j (%)	R_{MAB}
1	1	7	24	29	1
1	2	7	24	32	1
1	3	7	21	29	1
2	4	7	27	34	1
2	8	7	24	35	1
2	10	7	25	34	1

Deux lots de MGZ avec des caractéristiques similaires (bulletins d'analyse) ont été utilisés pour réaliser les essais. Un test standard de type OCDE 301 F, effectué sur un automate CES® a montré l'absence de différence de biodégradabilité entre les 2 lots de MGZ (15% pour le lot 1 et 11% pour le lot 2) pour un même inoculum.

Les deux bulletins d'analyse pour IN ne présentent pas de différence significative de caractéristiques (bulletins d'analyse). Les lots d'IN n'ayant pas été utilisés au cours des mêmes études, il n'y a pas eu de corrélation de réaliser par un test comparant les deux lots avec un même inoculum. Les essais A et B de l'Isodécyl Néopentanoate ont été réalisés au cours d'une étude préliminaire sur le lot 1. Les nouveaux essais ont tous été réalisés sur un second lot (lot 2). Les résultats de biodégradabilité obtenus ne montrent pas de différence significative de biodégradation avec une moyenne pour les essais de criblage et de confirmation de 42% et 30% pour le lot 1, et de 35% et 34% pour le lot 2 respectivement.

Aucune variabilité spécifique au changement de lot n'a été notée pour MGZ et IN. En conséquence, le changement de lot est considéré comme n'ayant pas d'incidence sur les résultats de biodégradabilité.

VI. Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Répartition et déplacements des polluants dans les différents compartiments de l'environnement (European Chemicals Agency (ECHA), 2012) – Chap. R16 13
Figure 2 : De la Persistance au test de biodégradabilité facile aérobie 17
Figure 3 : Station d'épuration de Maxéville (54) 24
Figure 4 : principe de l'utilisation du solvant volatil 27
Figure 5 : Principe de l'utilisation d'une huile 28
Figure 6 : Principe de l'utilisation d'un tensioactif 29
Figure 7 : Principe de l'utilisation de l'acide humique 31
Figure 8 : Principe de l'utilisation d'un agitateur mécanique 32
Figure 9 : Principe des phases de compression et de décompression d'un bain à ultrasons 33
Figure 10 : Principe de l'utilisation du gel de silice 34
Figure 11 : Absorption du substrat par une cellule bactérienne via des micelles figure inspirée de la publication (Li and Chen, 2009) 35
Figure 12 : Description de l'émulsion Pickering avec Cellulose Nano Cristalline comme support 36
Figure 13 : Images (microscopie électronique à transmission) de cellulose nanocristalline obtenues à partir de CCN (a), BCN (b) et ClaCN (c)*. (Kalashnikova et al., 2013) 37
Figure 14 : Images montrant la distribution de gouttelettes une semaine après préparation d'une émulsion Pickering d'hexadécane dans l'eau par différentes sources de cellulose nanocristalline et à différentes concentrations : 1.5 g/L; 2 g/L and 5 g/L for CCN (haut), BCN (milieu) and ClaCN (bas)*. Barre d'échelle : 10 mm. (Kalashnikova et al., 2013) 37
Figure 15 : Principe de l'utilisation des ondes électromagnétiques 40
Figure 16 : Objectif de l'étude 41
Figure 17 : Démarche de sélection des substances modèles 42
Figure 18 : Présentation schématique de la technologie de séquençage Illumina : préparation de la bibliothèque, amplification et procédé de séquençage (Dlugonski, 2016) 47
Figure 19 : Mode opératoire simplifié du test de détermination de l'hydrophobie des bactéries 50
Figure 20 : Phases de croissance bactérienne inspirée de (Augustin, 2005) 51
Figure 21 : microplaque Oxodish OD24 pour lecteur PreSens® 52
Figure 22 : Microplaque Oxodish OD24 posées sur un Lecteur Sensor Dish Reader (PreSens®) ... 53
Figure 23 : Transfert de l'oxygène dans un puits 53
Figure 24 : Différence entre les aires du témoin inoculum et de l'essai 54

Figure 25 : Flacon d'essai Respicond VI® 56
Figure 26 : Exemple de représentation graphique de 5 répliques d'acétate de sodium testé en addition directe avec le Respicond VI® 58
Figure 27 : Montage du réacteur associé à un système de mélange couplant pompe et mélangeur statique 67
Figure 28 : Observation microscopique (x100) d'une émulsion formée après 18h de mélange 69
Figure 29 : Exemple de courbe de biodégradation avec les 3 paramètres TB, Biod10d et BiodF identifiés 73
Figure 30 : Log Poe de 11 substances chimiques comparés à l'hydrophobie de 48 souches bactériennes 77
Figure 31 : Mesure de la croissance des bactéries ATCC19718 et CIPA105 par DO à λ=620 nm dans le milieu LB à 28°C sous agitation 81
Figure 32 : Boîtes à moustache de l'impact des phases de croissance exponentielle et stationnaire des souches ATCC19718 et CIPA105 sur la biodégradabilité facile de MGZ et d'IN 83
Figure 33 : Exemple de trois essais de criblage de biodégradabilité facile du MGZ en addition directe sur appareil Respicond VI®. *Pour les 3 essais : MGZ (lot 2) à 20 mg de carbone.L^{-1}, inoculum boue activée à 30 mg de matières sèches.L^{-1}. Les résultats présentés sont basés sur les médianes de chaque essai, les barres d'erreur représentent les écarts absolus médians (MAD).* 84
Figure 34 : Profils théoriques des inocula boue activée et souche isolée selon cinq paramètres 86
Figure 35 : Répartition des phyla des 6 boues activées brutes (BB) provenant de la station d'épuration de Maxéville et utilisées dans les essais de criblage E1, E2, E3, E4, E5 et E6 87
Figure 36 : Carte thermique (heat map) des 20 familles majoritaires des inocula dans différentes conditions regroupées par test 90
Figure 37 : Boxplot des indices de diversité de Shannon index pour les 6 expériences de biodégradabilité sur MGZ et IN (E1 à E6) pour les conditions (A) boue brute, (B) boue lavée et (C) témoin inoculum à J0 91
Figure 38 : Résultats des essais de criblage de biodégradabilité facile de MGZ et d'IN en addition directe (i.e. substance seule) avec 3 inocula : Boue activée (BA / AS en anglais) à 10^5 microorganismes.mL^{-1} et 2 souches pures ATCC19718 et CIPA105 à 10^7 bactéries.mL^{-1} en phase de croissance stationnaire au démarrage du test 92
Figure 39 : Profils observés des inocula boue activée, souches isolées ATCC19718 et CIP A105 selon cinq paramètres 93
Figure 40 : Stratégie d'évaluation simplifiée (MAB : Méthode d'amélioration de la biodisponibilité, R_{MAB} : ratio MAB) 95
Figure 41 : Exemple de structure de rhamnolipide 110
Figure 42 : Aspect des rhamnolipides E et R 111

Figure 43 : Résultats du test de criblage de biodégradabilité facile avec l'appareil Respicond VI® des rhamnolipides E (Rhm E) et R (Rhm R) testés à 10 mg de rhamnolipide.L^{-1} 112

Figure 44 : Résultats médians de biodégradation du MGZ avec l'appareil Respicond VI® associés à différentes méthodes : addition directe (MGZ – AD), dispersion avec un tensio-actif Pluronic 9400® (MGZ TA) et dispersion avec le biosurfactant Rhamnolipide R (MGZ Rhm R). L'erreur type (MAD) est matérialisée par des barres verticales. 113

Figure 45 : Présentation de la cellulose nanocristalline 114

Figure 46 : Cinq répliques de la biodégradation de la cellulose nanocristalline à 20 mg de carbone. L^{-1} lors d'un essai de criblage sur appareil Respicond VI® 115

Figure 47 : Résultats médians de biodégradation de MGZ avec l'appareil Respicond VI® associés à différentes méthodes : addition directe (MGZ – AD), dispersion par émulsion pickering avec cellulose nanocristalline et dispersion mécanique (MGZ – CNC/DM) ou par ultrasons (MGZ – CNC/US) et dispersion avec du gel de silice (MGZ – Sg50). L'erreur type (MAD) est matérialisée par des barres verticales 116

Figure 48 : Résultats médians de biodégradation du MGZ et de l'IN avec l'appareil Respicond VI® *en addition directe dans le milieu fraichement préparé (MGZ AD), en addition directe dans du milieu préalablement traité par EMF (MGZ Mtb).* L'erreur type (MAD) est matérialisée par des barres verticales 118

Figure 49 : Production d'une émulsion via le système de mélange 120

Figure 50 : Suivi de l'homogénéité et de la répartition de l'émulsion 121

Figure 51 : Graphique représentant la distribution de la taille des gouttes formées avec le système à faible débit 122

Figure 52 : Graphique de distribution de la taille des gouttes formées avec le système à fort débit (A) et photo du montage (B) avec l'huile alimentaire colorée au Nile Red, a été diluée au 1000ème 123

Figure 53 : Résultats médians de biodégradation de MGZ (A) et d'IN (B) avec l'appareil Respicond VI® associés à différentes méthodes : traitement aux ultrasons (US en bleu), dispersion avec de l'huile de silicone (HS en rouge) et association d'huile de silicone et de traitement aux ultrasons (HS US). L'erreur type (MAD) est matérialisée par des barres verticales. 125

Figure 54 : Variabilité des résultats de biodégradabilité facile à 28 jours pour les essais de criblage sur MGZ et IN pour chaque méthode d'amélioration de la biodisponibilité sur la base de l'écart absolue médian (MAD) 127

Figure 55 : Boites à moustache présentant les résultats médians des indices de diversité de Shannon et des biodégradabilités des 6 essais réalisés sur MGZ et IN par addition directe et avec différentes méthodes d'amélioration de la biodisponibilité 129

Figure 56 : Première étape de la préparation des inocula 170

Figure 57 : deuxième étape de la préparation des inocula 171

Figure 58 : Troisième étape de la préparation des inocula[18] 171
Figure 59 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de MGZ avec la souche ATCC19718 en phase exponentielle de croissance 192
Figure 60 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de MGZ avec la souche ATCC19718 en phase stationnaire de croissance 193
Figure 61 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de l'IN avec la souche ATCC19718 en phase exponentielle de croissance 193
Figure 62 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de l'IN avec la souche ATCC19718 en phase stationnaire de croissance 194
Figure 63 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de MGZ avec la souche CIPA105 en phase exponentielle de croissance 194
Figure 64 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de MGZ avec la souche CIPA105 en phase stationnaire de croissance 195
Figure 65 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de l'IN avec la souche CIPA105 en phase exponentielle de croissance 195
Figure 66 : Cinq répliques de la biodégradabilité facile de l'IN avec la souche CIPA105 en phase stationnaire de croissance 196

Tableaux

Tableau 1 : Critères de persistance selon l'annexe XIII de REACH et tests de simulation associés (European Chemicals Agency (ECHA), 2014b) 15

Tableau 2 : Interprétation des résultats de l'indice d'adhésion à l'octane des bactéries 50

Tableau 3 : Exploitation des résultats du système Présens® 55

Tableau 4 : Respiromètres compatibles avec les essais de biodégradabilité facile 55

Tableau 5 : Exemple de résultats en pourcentage de biodégradation obtenus pour 5 répliques d'acétate de sodium testé en addition directe avec le Respicond VI® (le tableau sur 28 jours est ici coupé en deux pour faciliter la lecture) 58

Tableau 6 : Conditions d'essai du test de biodégradabilité OCDE 301 B 60

Tableau 7 : Liste des MAB expérimentées 63

Tableau 8 : Teneur en carbone des additifs chimiques dans les flacons de test 64

Tableau 9 : Mélangeurs statiques utilisés pour accroitre la biodisponibilité des substances chimiques peu hydrosolubles 68

Tableau 10 : Interprétation, seuils et notes statistiques attribués au test de contraste 71

Tableau 11 : Interprétation, seuils et notes statistiques attribués à la taille d'effet 71

Tableau 12 : Note statistique et classement attribués aux résultats obtenus avec les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité lors des essais de criblage Respicond VI® 71

Tableau 13 : Note statistique et classement attribués aux résultats obtenus avec les méthodes d'amélioration de la biodisponibilité lors des essais de confirmation 72

Tableau 14 : Substances chimiques présélectionnées d'après les données fournisseurs et littérature 74

Tableau 15 : Nombre et type de dégradeurs pour 9 substances chimiques 75

Tableau 16 : Substances modèles 76

Tableau 17 : Relation entre le log Poe, l'hydrosolubilité des substances chimiques et l'hydrophobie des dégradeurs spécifiques parmi 48 souches bactériennes 77

Tableau 18 : Dix biodégradeurs spécifiques communs aux deux substances modèles détectés avec le système Presens® 79

Tableau 19 : Résultats médian de biodégradabilité facile du MGZ et de l'IN avec 10 souches bactériennes isolées selon le test de criblage Respicond VI® 80

Tableau 20 : souches bactériennes sélectionnées 80

Tableau 21 : Résultats de biodégradabilité facile des substances modèles en fonction de la phase de croissance des souches utilisées comme inoculum 82

Tableau 22 : Notations des cinq paramètres d'évaluation de l'inoculum 85

Tableau 23 : Caractéristiques de la station d'épuration aux jours de prélèvement (informations Véolia© station d'épuration de Maxéville) 88
Tableau 24 : Résultats des tests de criblage (Respicond VI®) réalisés sur MGZ et IN avec des méthodes améliorant la biodisponibilité déjà décrites 107
Tableau 25 : Résultats des tests de confirmation (OCDE 301B) réalisés sur MGZ et IN avec des méthodes améliorant la biodisponibilité déjà décrites 108
Tableau 26 : Résultats des tests de criblage (Respicond VI®) de la biodégradabilité de MGZ et d'IN associés aux rhamnolipides E et R 112
Tableau 27 : Résultats des tests de criblage (Respicond VI®) de la biodégradabilité facile de MGZ et d'IN dispersés par émulsion Pickering 115
Tableau 28 : Résultats des tests de criblage (Respicond VI®) réalisés sur MGZ et IN avec association de méthodes améliorant la biodisponibilité 124
Tableau 29 : Résultats des tests de confirmation réalisés sur MGZ et IN avec association de méthodes améliorant la biodisponibilité 126
Tableau 30 : Résumé des résultats des MAB pour les substances MGZ et IN 139
Tableau 31 : Effets des méthodes d'amélioration de la biodisponibilité déjà décrites dans la littérature 164
Tableau 32 : Données de mg de CO_2 par heure pour chaque flacon 182
Tableau 33 : Données de mg de CO_2 par jour pour chaque flacon 182
Tableau 34 : Données de mg de CO_2 par jour pour chaque type de condition 182
Tableau 35 : Données de mg de CO_2 par jour pour les 5 répliques d'une condition (exemple de l'acétate de sodium – Témoin positif) 183
Tableau 36 : Données de mg de CO_2 cumulé corrigé par jour pour les 5 répliques d'une condition (exemple de l'acétate de sodium – Témoin positif) 183
Tableau 37 : Données en pourcentage de biodégradation par jour pour les 5 répliques d'une condition (exemple de l'acétate de sodium – Témoin positif) 183
Tableau 38 : Mesure de l'O_2 consommée par les 48 souches bactériennes en présence des 9 substances présélectionnées (résultats de l'essai de criblage PreSens®) 184
Tableau 39 : Indices d'adhésion à l'Octane (A) et de floculation (F) des 48 souches bactériennes pré-sélectionnées 190
Tableau 40 : Résultats des concentrations de MGZ et IN en mg de substance.L^{-1} après 24h et 28 jours d'agitation dans le milieu minéral basée sur l'analyse du carbone organique total 197
Tableau 41: Résultats de respiration des témoins inoculum en mg de $C0_2$ cumulé à 28 jours en test de criblage RT avec l'automate Respicond VI® 199
Tableau 42: Résultats de respiration des témoins inoculum en mg de $C0_2$ cumulé.L^{-1} à 28 jours en test standard (ST) 199

Tableau 43 : Résultats de biodégradation en % des témoins positifs à 14 jours pour les tests de criblage (RT) et standard (ST)..... 200

Tableau 44 : Résultats finaux de biodégradation en % des additifs chimiques pour les tests de criblage (RT) et standard (ST) 201

Tableau 45 : Résultats des essais de criblage pour MGZ et IN en addition directe 202

Tableau 46 : Résultats des essais standard pour MGZ et IN en addition directe 203

Thèse de Doctorat

Cyril SWEETLOVE

Développement de techniques permettant d'améliorer la prédiction de la biodégradabilité en milieu naturel de produits organiques faiblement hydrosolubles dans des tests de laboratoire

Development of methods to improve the biodegradability prediction in natural environment of poorly water-soluble organic substances in laboratory tests

Résumé

L'évaluation des impacts d'une substance chimique pour l'environnement s'appuie notamment sur des tests de biodégradabilité facile conçus pour mettre en évidence leur biodégradation rapide dans la plupart des milieux environnementaux. Toutefois, lorsque ces tests sont appliqués aux substances faiblement hydrosolubles, des difficultés sont rencontrées, souvent liées à leur biodisponibilité limitée vis-à-vis des micro-organismes induisant une variabilité accrue, que nous avons étudiée. Une stratégie innovante a donc été établie afin d'améliorer la prédiction de la biodégradabilité en milieu naturel de ces substances. Elle a permis de comparer 25 méthodes d'amélioration de la biodisponibilité (MAB) et d'initier la refonte de la norme internationale ISO 10634. Cette connaissance plus précise de la biodégradabilité est un élément essentiel pour le développement de nouveaux produits plus respectueux de l'environnement, s'inscrivant complètement dans une démarche de développement durable.

Mots clés

Biodégradabilité, substance faiblement hydrosoluble, biodisponibilité, métagénomique, ISO 10634.

Abstract

The assessment of the environmental impacts of an environmental substance is based on ready biodegradability tests, demonstrating a rapid biodegradation in most environmental media. However, when these tests are applied to poorly water-soluble substances, difficulties are encountered, often related to their limited bioavailability towards the microorganisms inducing increased variability that we have studied. An innovative strategy has therefore been established in order to improve the prediction of the biodegradability in the natural environment of these substances. It has compared 25 methods of improving bioavailability (MAB) and initiated the revision of the international standard ISO 10634. This more precise knowledge of biodegradability is an essential element for the development of new products that are more environmentally friendly, fully in line with a sustainable development approach

Key Words

Biodegradability, poorly water-soluble substances, bioavailability, metagenomics, ISO 10634.