

**EVOLUTION DE LA TOXICITE  
DU PENTACHLOROPHENOL EN COURS DE DEGRADATION  
PAR DES DEUTEROMYCETES ISOLES DU SOL**

A.M.TOÉ<sup>1</sup>, J.-L.BENOIT-GUYOD<sup>2</sup>, F. SEIGLE-MURANDI<sup>2</sup>, R. STEIMAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institut de Recherches en Sciences de la Santé (IRSS) –Direction Régionale de l’Ouest. BP 545 Bobo-Dioulasso. BURKINA FASO. Phone and Fax (226) 20 97 48 68.  
E-Mail : [toeadaama@hotmail.com](mailto:toeadaama@hotmail.com)*

<sup>2</sup> *Équipe Perturbations Environnementales et Xénobiotiques (PEX) Laboratoire d’Écologie Alpine (LECA), UMR CNRS 5553 Université Joseph Fourier-Grenoble 1  
BP 53, F- 38041 GRENOBLE cedex 09*

( Reçu le 04/11/2004 – Accepté le 23/09/2005)

---

**Summary:** *The study of the global toxicity of the growth medium containing of the PCP (mg. L<sup>-1</sup>) in the presence of various strains of micromycetes is carried out thanks to the test of Artemia salina.*

*The disappearance of the PCP operated with efficient strains of deuteromycetes comes along with a very strong decline of the toxicity of the growth medium. This favourable evolution of the global toxicity of the growth medium shows a situation of beneficial biodegradation which ends in a detoxification of the starting material.*

*The very strong fall of the toxicity of the growth medium in the presence of the efficient strains, militates in favour of their choice for future trials of traitability of the PCP.*

**Keywords :** *Pentachlorophenol. Deuteromycetes. Biodegradation. Toxicity. Artemia salina*

---

## I - INTRODUCTION

Le pentachlorophénol (PCP) (Fig.1) a été largement utilisé comme pesticide dans l’industrie du bois et en agriculture ce qui a conduit à son accumulation dans l’environnement<sup>[1, 2]</sup> du fait de sa biodégradation

lente<sup>[3]</sup>. Cette accumulation a engendré divers problèmes toxicologiques et écotoxicologiques. Le PCP est classé en substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets cancérogènes possibles<sup>[4, 5]</sup>. En outre l'embryo-toxicité et la fœto-toxicité du PCP chez le rat ont été confirmées dans plusieurs études<sup>[5, 6, 7]</sup>.

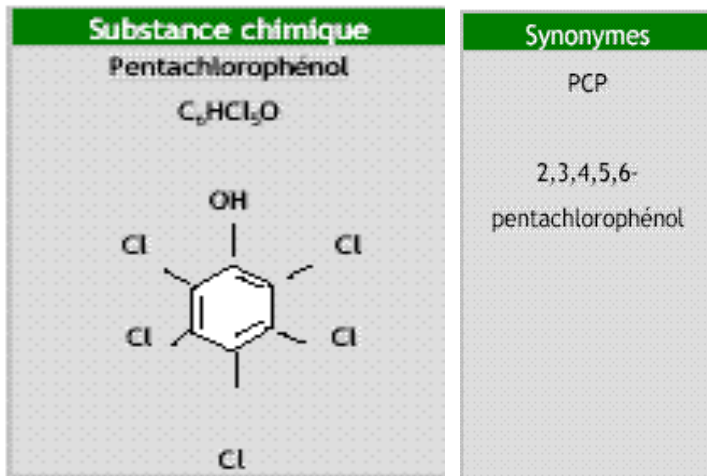
Par ailleurs ; la bioconcentration du pentachlorophénol dans les organismes aquatiques est élevée. Des facteurs de bioconcentration de 100 à 1 000 ont été rapportés par plusieurs auteurs<sup>[8, 9, 10, 11]</sup>.

Du fait de ces graves effets néfastes sur la santé et l'environnement, le PCP est considéré comme un produit chimique hautement dangereux. Il fait partie de la liste des listes<sup>[12]</sup> (Conventions de Rotterdam et de Stockholm, liste des 12 salopards de PAN (Pesticide Action Network).

Le PCP est néanmoins susceptible d'être biodégradé par les micromycètes<sup>[13, 14]</sup> et des bactéries<sup>[15, 16]</sup>. Mais toute biodégradation n'est pas forcément bénéfique. De nombreux exemples de bioactivation, où les métabolites obtenus sont plus persistants, plus biodisponibles et plus dangereux que les substances qui leur ont donné naissance existent. Nous citerons seulement comme exemples, l'époxydation de l'aldrine en dieldrine produit plus persistant<sup>[17]</sup> et la transformation du parathion en paraoxon qui par fixation covalente à la cholinestérase provoque une paralysie neuromusculaire<sup>[18]</sup>.

Dans nos travaux antérieurs nous avons mis en évidence de nombreux exemples de biodégradation du PCP par les micromycètes<sup>[19]</sup>. Nous étudions ici la toxicité globale de ces milieux de culture afin de vérifier si la biodégradation opérée est susceptible de donner naissance à des métabolites plus hydrosolubles, plus polaires et moins toxiques que la molécule mère pour d'éventuelles dépollutions *in situ*.

**FIGURE 1 : Le pentachlorophénol**



## 2.1 Microorganismes

Huit souches appartenant à la collection Mycologique de la Pharmacie de Grenoble (CMPG) sont utilisées dans l'étude. Elles étaient isolées du sol. Les stocks de micro-organismes sont maintenus sur du milieu à l'extrait de malt (1,5%). Ces 8 souches (tableau I) de deutéromycètes ont été sélectionnées selon leur performance à faire disparaître le PCP du milieu de culture lors du screening<sup>[19]</sup>.

**TABLEAU I: Micromycètes utilisés avec leur taux de disparition du PCP obtenu lors du screening**

souche utilisée	taux de disparition lors du screening	aptitude à la biodégradation
<i>Calcarisporium arbuscula</i>	90	performante
<i>Oidiodendron echinulatum</i>	90	performante
<i>Penicillium cyaneum</i>	89	performante
<i>Epicoccum purpurascens</i>	88	performante
<i>Botrytis cinera</i>	54	moyenne
<i>Phoma glomerata</i>	45	moyenne
<i>Fusarium solani</i>	9	médiocre
<i>Trichosporon beigelii</i>	5	médiocre

## 2.2 - Equipement et produits chimiques utilisés

Système de Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) Shimadzu équipé d'une pompe LCA, d'un injecteur automatique (Shimadzu SIL-9A) et d'un détecteur UV (SPD6A). La colonne, diamètre intérieur de 4 mm x 300 m de longueur, est remplie de  $\mu$ Bondapack C<sub>18</sub>. L'intégrateur est un Shimadzu CR 3A, Chromatopac.

Le PCP est fourni par JANSSEN (BEERSE, BELGIQUE). Les autres produits chimiques sont fournis par PROLABO (PARIS). La qualité de chaque composé est contrôlée par CLHP avant utilisation.

## 2.3 - Conditions de culture

Les souches sélectionnées après la culture sur milieu solide sont cultivées en milieu<sup>[20]</sup> liquide à pH 4,5 avec du glucose à 5 g. L<sup>-1</sup>. Les cultures sont conduites dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Après stérilisation, le milieu est inoculé avec le mycélium et les spores en ensemencement massif. Les cultures sont incubées avec une agitation à 180 rpm pendant 2 jours, de sorte à permettre à la biomasse de pousser et d'atteindre 4g.L<sup>-1</sup>± 10% de poids sec. A ce stade, il ne reste plus de glucose dans le milieu. L'ajout du PCP au milieu de culture a lieu aux temps T = 0h, T = 48h,

T = 120 h et ce, à 6 concentrations 10 ; 5 ; 2.5 ; 1.25 ; 0.62 ; 0.31 mg. L<sup>-1</sup>. La consommation du PCP est évaluée après 8 jours de culture. Cette étude comprend aussi des témoins au temps T<sub>0</sub> et des témoins de photodégradation (T<sub>ph</sub>). La température est de +24°C, l'intensité lumineuse de 1200 lux avec une photopériode de 12h par jour. Chaque essai est réalisé en triple exemplaire.

## **2.4 - Matériel biologique pour l'évaluation de la toxicité et conditions de réalisation**

Le choix du matériel biologique s'est porté sur *Artemia salina*, petit crustacé phyllopode de la sous-classe des Branchiopodes, de l'ordre des Anostracés, appelée plus communément " crevette des salines " (Fig.2). Il s'agit du test mis au point par PERSOONE *et al.* <sup>[21]</sup> et standardisé par CALLEJA & PERSOONE<sup>[22]</sup>.

**FIGURE 2 : Différents stades d'*Artemia salina***



Artémies juvéniles

Male adulte

Femelle adulte

L'élevage se fait à partir de cystes homogènes, fournis par l'Artemia Reference Center de l'Université de Gand en Belgique et depuis par Creasel Ltd. Fazentenpark 9, 9800 Deinze, Belgique.

Le milieu d'élevage utilisé est de l'eau de mer reconstituée par dilution à 35‰ du mélange "Instant Océan" (Aquarium Systems) avec de l'eau de distribution de Meylan. Pour chaque essai, environ 200 mg

de cystes sont rehydratés dans une fiole cylindroconique contenant 200 ml de milieu salin.

Un éclairage latéral (lumière du jour SYLVANIA HF 8 W GROLUX-intensité minimale de 500 lux) est maintenu à température ambiante, le milieu est sous aération douce. Après 24 heures, les nauplii sont transférés dans une autre fiole comprenant 200 ml de milieu avec aération. Les nauplii seront utilisés 24 heures plus tard pour le test de toxicité proprement dit. Durant cette phase, ils passent du stade I au stade II.

Le PCP est utilisé à 6 concentrations: 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,62 ; 0,31 mg. L<sup>-1</sup>. Pour chaque concentration 2 lots de 10 nauplii sont placés chacun dans 10 ml de solution toxique, dans une boîte de Pétri. Après 24 heures, le nombre de larves vivantes est déterminé par comptage dans chaque boîte. Par simple soustraction nous obtenons le nombre de larves mortes qui est ensuite utilisé pour la détermination de la CI<sub>50</sub> sur *A. salina* grâce à un logiciel qui permet une analyse Probit au seuil P 0,05. La CI<sub>50</sub> ainsi obtenue permet d'évaluer la toxicité globale de la solution au cours de la dégradation du PCP par les micromycètes. La CI<sub>50</sub> est exprimée en mg de PCP présent au temps T=0h par litre de milieu.

### **III - RESULTATS ET DISCUSSION**

Au seuil de probabilité indiqué ci-dessus, on constate tout d'abord que la toxicité du milieu contenant du PCP sans champignon n'évolue pas de façon significative entre T=0h et T=120 h dans les conditions où est faite la culture (Tableau II).

En ce qui concerne les milieux avec champignon, on constate que parmi les 4 souches essayées possédant un fort pouvoir dégradant, 3 ne semblent pas former de composés de dégradation intermédiaires

toxiques à partir du PCP : il s'agit de *Calcarisporium arbuscula*, *Oidiodendron echinulatum* et *Epicoccum purpurascens*. Par contre, on peut observer qu'avec *Penicillium cyaneum*, la forte  $CI_{50}$  obtenue à  $T=0h$  a fortement diminué à  $T=120 h$  (diminution de 45 %) indiquant une augmentation de la toxicité. Malgré cette augmentation de la toxicité, la  $CI_{50}$  à  $T=120 h$  est 3 fois plus élevée que celle du témoin PCP.

**TABLEAU II : Évolution de la toxicité sur *Artemia salina* des milieux de culture contenant du PCP ( $mg. L^{-1}$ ) en présence de différentes souches de micromycètes :  $CI_{50}$  obtenus aux temps  $T=0h$  ;  $T=48h$  ;  $T=120 h$**

			PCP : $CI_{50}$	PCP : $CI_{50}$	PCP : $CI_{50}$
			( $mg. L^{-1}$ )	( $mg. L^{-1}$ )	( $mg. L^{-1}$ )
			T=0h	T=48h	T=120h
Témoin	PCP	(sans champignon)	1,35	1,26	1,31
		<i>Calcarisporium arbuscula</i>	3,53	3,75	5,02
		<i>Oidiodendron echinulatum</i>	2,27	4,95	8,79
		<i>Penicillium cyaneum</i>	7,2	4,9	3,92
		<i>Epicoccum purpurascens</i>	2,06	3,95	3,87
		<i>Botrytis cinerea</i>	2,96	3,35	3,87
		<i>Phoma glomerata</i>	4,69	4,41	5,7
		<i>Fusarium solani</i>	1,76	2,46	3,97
		<i>Trichosporon beigelii</i>	1,12	1,28	2,82

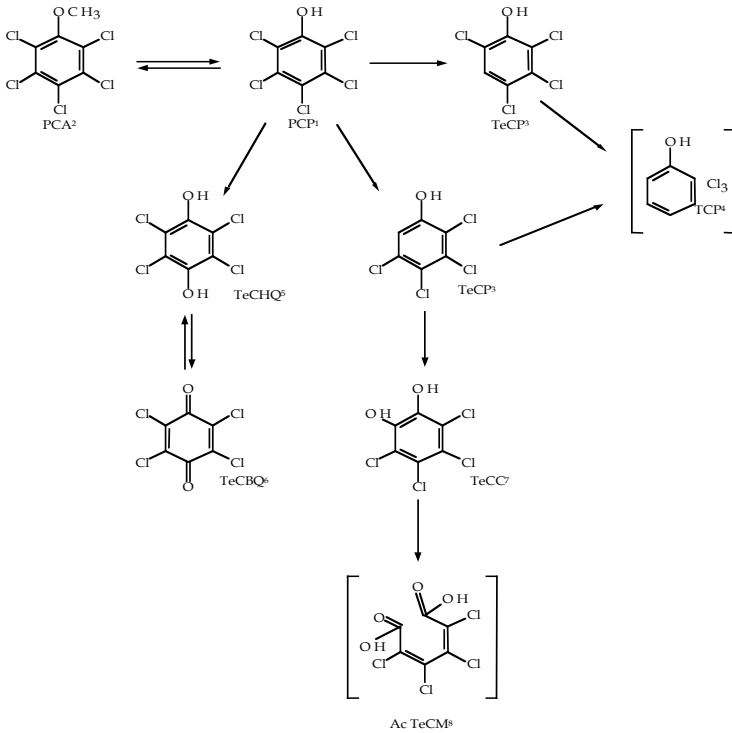
Avec les 2 souches possédant un pouvoir de dégradation moyen, leur présence, se traduit par une diminution de la toxicité du milieu de culture. Les  $CI_{50}$  obtenues sont 3 à 4 fois plus élevées que celle du témoin à  $T=120 h$ . Il s'agit de *B. cinera* et de *P. glomerata*.

Pour les 2 souches possédant un faible pouvoir de dégradation (*Fusarium solani* et *Trichosporon beigelii*) leur présence permet d'obtenir une diminution de la toxicité du milieu. Les  $CI_{50}$  obtenues sont 2 à 3 fois plus élevées que celle du témoin à T=120h. Parmi les 8 souches utilisées, 7 d'entre elles entraînent une forte diminution de la toxicité. 4 sont des souches performantes dans la disparition du PCP, 2 des souches moyennement performantes et une souche médiocre. Parmi les souches performantes, l'augmentation de la toxicité de T=0h à T=120 h avec *P. cyaneum* même si elle n'est pas préoccupante (comparée au témoin) suscite tout de même des interrogations. Elle peut être due à l'apparition de métabolites plus toxiques que le PCP ou à l'excrétion de mycotoxines. Nous ne nous sommes pas intéressés à l'étude individuelle de la toxicité des différents métabolites car différents auteurs l'ont déjà fait<sup>[23, 24]</sup> et d'autres ont même étudié les différentes voies de métabolisation du PCP par les micromycètes (Figure 3)<sup>[25, 26]</sup>. Par contre nous avons suivi l'apparition des produits sur le chromatogramme. Les produits de dégradation restent d'un niveau très faible (3 à 4 %). La plupart des composés sont plus polaires que le PCP et ont les mêmes temps de rétention que les tétrachlorodiphénols et l'acide tétrachloromuconique. Bien que la méthylation soit la 1<sup>re</sup> réaction invoquée dans le métabolisme du PCP par les micromycètes, nous n'avons trouvé que des traces de PCA (0,5 %).

Dans le cas de l'augmentation de la toxicité de T=0h à T=120 h avec *P. cyaneum* nous n'avons décelé aucune apparition de nouveaux produits du T=0 h à T=120 h ce qui nous permettait d'exclure une augmentation de la toxicité due à des métabolites de haute toxicité. Nous nous sommes par la suite intéressés à une possible production de mycotoxines.



**FIGURE 3 :: Voies de dégradation du PCP par les micromycètes<sup>[25, 26]</sup>**



- |                             |                               |
|-----------------------------|-------------------------------|
| 1= pentachlorophénol (PCP)  | 5= tétrachlorohydroquinone    |
| 2= pentachloroanisol (PCA)  | 6= tétrachlorobenzoquinone    |
| 3= tétrachlorophénol (TeCP) | 7= tétrachlorocatécol         |
| 4= trichlorophénol (TCP)    | 8= acide tétrachloromuconique |

**TABLEAU III :** Evolution de la toxicité de milieu de culture de *P. cyaneum* en l'absence de PCP.

<b>Temps</b>	<b>CI<sub>50</sub></b>
T=0h	12,86
T=48h	12,56
T=120h	7,52

L'évaluation de la toxicité du milieu de culture en présence de *P. cyaneum* en l'absence de PCP (Tableau III) montre une nette augmentation de la toxicité du milieu sans PCP de T=48 h à T=120 h ce qui milite bien en faveur d'une possible production de mycotoxines. Les travaux de STEIMAN *et al* <sup>[27]</sup> montrent que certaines souches de *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines comme la patuline. Il serait intéressant de déterminer la nature des mycotoxines produites par *P. cyaneum*.

#### IV – CONCLUSION

La disparition du PCP opérée par les souches performantes de deutéromycètes s'accompagne d'une très forte baisse de la toxicité du milieu de culture. Cette évaluation de la toxicité globale du milieu de culture grâce au "test *Artemia*" traduit une situation de biodégradation bénéfique qui aboutit à une détoxification du produit de départ. Bien que nous n'ayons pas noté de risques de bioactivation, les possibilités de production de mycotoxines par certaines souches restent probables. Malgré les résultats intéressants obtenus, le "test *Artemia*" bien que standardisé reste largement encore considéré comme un test de screening malgré le nouvel essor que connaît son utilisation grâce aux récentes améliorations telles que :

- Les possibilités de l'utiliser comme un test de toxicité au premier niveau de la chaîne alimentaire dans les essais de biomagnification<sup>[28]</sup>.

- Les possibilités de le conduire dans un milieu autre que l'eau de mer, par exemple dans certains milieux destinés aux cultures cellulaires<sup>[29]</sup>.

Dans la mesure du possible, il nous paraît utile de confirmer les résultats que nous avons obtenus par des tests de toxicité normalisés tels que ceux utilisant le guppy (*Lebistes reticulatus*) ou la daphnie (*Daphnia magna*). L'évaluation de la toxicité des xénobiotiques par ces tests normalisés est souvent limitée par leur prix, leur complexité et leur durée, alors que le potentiel de toxicité de nombreux xénobiotiques n'est pas connu et que plus de 10.000 produits sont proposés chaque année pour une introduction sur le marché. Un test alternatif comme celui que nous avons utilisé pourrait connaître certainement un bel essor.

La très forte chute de la toxicité du milieu de culture en présence des souches performantes, milite en faveur de leur choix pour des essais futurs de traitabilité du PCP.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] - **CROSBY, D.G.** Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Appl. Chem.*, (1981), **53**, 1051-1080.
- [2] - **PIGNATELLO, J.J. ; MARTINSON, M.M. ; STEIERT, J.G. ; CARLSON, R.E. ; CRAWFORD, R.L.** Biodegradation and photolysis of pentachlorophenol in artificial fresh water streams. *Appl. Environ. Microbiol.*, (1983), 46, (5), 1024-1031.
- [3] - **ROCHKIND, M.L. ; BLACKBURN, J.W. ; SAYLER, G.S.** Microbial decomposition of chlorinated aromatic compounds. EPA/600/2-86/090, 1986.
- [4] - **IARC - IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Occupational exposures in insecticide application.** (1991) 53, 371.
- [5] - **OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES -** Commission Directive 93/72/EC, 19th time Council directive 67/548EEC. European Commission. 1993 Brussels, Belgium.
- [6] - **SCHWETZ B.A., QUAST I.F., KEELER P.A. and HUMISTON C.G. -** Results of two-year toxicity and reproduction studies on pentachlorophenol in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, (1978) **28**, 1, 301-309.
- [7] - **WELSH J.J., COLLINS T.F., BLACK T.N., GRAHAM S.L. and O'DONNELL M.W., Jr. -** Teratogenic potential of purified pentachlorophenol and pentachloroanisole in subchronically exposed Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol*, (1987) **25**, 2, 163-172.

- [8] - **PARRISH P.R., DYAR E.E., ENOS J.M. and WILSON W.G.** - Chronic Toxicity of Chlordane, Trifluralin, and Pentachlorophenol to Sheepshead Minnows (*Cyprinodon Variegatus*) US EPA Office of Research and Development. Washington. EPA-600/3-78-010, 1978.
- [9] - **LU W.J. and METCALF R.L.** - Environmental fate and biodegradability of benzene derivatives as studied in a model aquatic ecosystem. *Environ Health Perspect*, (1975) **10**, 269-284.
- [10] - **DEVILLERS J., BINTEIN S. and DOMINE D.** - Comparison of BCF models based on log P. *Chemosphere*, (1996) **33**, 6, 1047-1065.
- [11] - **BUDE J., LAY J.P. and PARLAR H.** - Influences of selected parameter bioconcentration of 14C-2,5,4-trichlorophenyl and pentachlorophenyl. *Chim Acta Turc*, (1985) **13**, 235-252.
- [12] - **PAN-UK.** The List of Lists. Briefing paper, briefing 3 Novembre, 2001, Londres, 13pp.
- [13] - **MESPLONT, M.** Dégénération du pentachlorophénol par les Micromycètes, Thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble, 1989, 175 pp.
- [14] - **SEIGLE-MURANDI, F.; TOE A.; BENOIT-GUYOD, J.-L.; STEIMAN, R.; KADRI M.** Depletion of pentachlorophenol by Deuteromycetes isolated from soil. *Chemosphere*, (1995) Vol. **31**, N° 2, pp 2677-2686.
- [15] - **TARTAKOVSKY B, LEVESQUE M, DUMORTIER R, BEAUDET R, GUIOT SR.** Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl. Environ. Microbiol.* (1999) **65**:4357-4362.

- [16] - **BEAUDET R, LEVESQUE MJ, VILLEMUR R, LANTHIER M, CHENIER M, LEPINE F, BISAILLON JG.** Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1. *Appl Microbiol Biotechnol* (1998) 50(1): 135-141.
- [17] - LU, F. C. Toxicologie. Masson 1992, 361 pp.
- [18] - **ALLOWAY, B. J.; AYRES, D.C.** Chemical principles of environmental pollution. Chapman and Hall, London, 1993 , 291pp.
- [19] - **TOE, A.M.** Dégradation du Pentachlorophénol par les micromycètes. Etude particulière des Deutéromycètes. Thèse de l'Université Joseph Fourier , Grenoble, 1994 , 156 pp.
- [20] - **GALZY, P.; SLONIMKI, P.** Variation physiologique de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. C.R Acad. Sciences, (1957), 245D, 2423-2426
- [21] - **PERSOONE, G.; SORGELOOS, P. ; ROELS, O. ; JASPERS, E.** The brine shrimp : *Artemia*, Universa Press, Wetteren, Belgique, 1980, 1-345.
- [22] - **CALLEJA, M.C.; PERSOONE, G.** Cyst-Based Toxicity Tests. IV. The Potential of Ecotoxicological Tests for the Prediction of Acute Toxicity in Man as Evaluated one the First Ten Chemicals of the MEIC programme. ATLA, (1992), 20 , 396-405.
- [23] **ANDRÉ, C.** Etude d'une série de chlorophénols, toxicité aquatique et dégradation par l'ozone. Thèse de Doctorat. Université Scientifique et Médicale de Grenoble. 1983 , 127 pp.
- [24] - **DETOC, S.** Etude des produits de dégradation du Pentachlorophénol. Thèse de l'Université Joseph Fourier , Grenoble, 1988 , 210 pp.

- [25] - **KAUFMAN, D.D.** Degradation of pentachlorophenol in soil and by soil microorganisms. In " Pentachlorophenol, *Chem. Pharmacol. Environ. Toxicol.* " Environ. Sci. Res. Ranga RAO, 1978 , 12 , 27-40, Plenum Press, New York.
- [26] - **ENGELHARDT, G.; WALLNOFER., P.R.; MUECKE, W.; RENNER, G.** Transformations of pentachlorophenol. Part II: Transformations under environmental conditions. *Toxicol. Environ. Chem.* (1986), 11, (3) , 233-252.
- [27] - **STEIMAN, R. ; SEIGLE-MURANDI, F. ; SAGE, L. ; KRIVOBOK, S.** Production of patulin by Micromycetes. *Mycopathologia*, (1989), 105, 129-133.
- [28] - **SPRANG, P.V.; LEGER P.; SORGELOOS, P.** A new test system for the evaluation of toxic levels of liposoluble products in the aquatic food chain using *Artemia* and *Mysidopsis bahia* have experimental animals. *Aquatic Toxicology*, (1991) , **19** , 319-328.
- [29] - **LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P.** The Use of *Artemia salina* in *Toxicity Testing*. *ATLA*, (1992) , **20** , 297-301.