

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة سعد دحلب البليدة
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA



FACULTE DES SCIENCES DE L'INGENIEUR
DEPARTEMENT DE CHIMIE INDUSTRIELLE

MEMOIRE DEMASTER II

OPTION : Procédé de traitement des effluents et protection de l'environnement

Étude de la biodégradabilité de l'anthracène par des souches de *Streptomyces* libres et immobilisées

PAR

M^{elle} REBBANI SOUMIA

Devant le jury composé de :

Mr BOUZID.B

Mm LARIBI.H

Mr BENMAAMER

Mr BADIS.A

M^{elle} FERRADJI F.Z

M.C.A-USDB

M.A.A

M.C.A

MC-USDB

AR-CNRDPA

Président

Examinatrice

Examineur

Promoteur

CO-Promotrice

Blida, Octobre 2011

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie « الله » le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et surtout la santé pour réaliser ce modeste travail.

D'abord, Je remercie ma mère et mon entourage familial affectif dont le soutien m'a permis de mener bien ce travail.

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon promoteur Dr **BADIS Abdelmalek**, maître de conférences à l'USDB. Je lui exprime ma profonde gratitude, pour sa confiance et ses encouragements qui m'ont permis de réaliser ce travail.*

*Toute ma gratitude et mon estime à ma Co-promotrice, Mademoiselle **FERRADJI Fatma Zohra** attaché de recherche au CNRDPA pour ses conseils et astuces qui ont permis de faciliter mon travail, ainsi que pour le temps qu'elle m'a consacré et sa disponibilité permanente «**Merci pour ta gentillesse** ».*
J'adresse mes remerciements aux membres de jury d'avoir aimablement accepté d'examiner ce modeste travail.

*Je remercie particulièrement Mr **KOURDALI Sid Ali**, doctorant et attaché de recherche au CNRDPA pour ses conseils, ses encouragements, ainsi pour tout l'aide et le soutien de tous les instants difficile que j'ai passé. Qu'il trouve ici l'expression de ma très vive reconnaissance.*

« Merci pour tout »

*Je remercie tout les enseignants de mon cursus universitaire qui ont contribué à ma formation, et tous les enseignants de département de chimie industrielle en particulier Mr **BOUZID .B.***

*J'exprime mes remerciements à mes collègues de laboratoire et mes amis avec qui j'ai passé de très bons moments et qui m'ont aidé à réaliser ce travail : **Boudjemaa kamel, Bounakous Nabila, Saadi saadi zhira.** Je tiens à remercier également toute l'équipe de laboratoire de **CNRDPA**.*

Merci à tous ayant participé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail

Dédicace

À mon défunt PAPA, « رحمه الله » qui m'a toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite.

À ma très chère MAMAN, que dieu me la garde, pour sa gentillesse, son affection, ces encouragements et sa patience et surtout pour ses sacrifices, et parce qu'elle m'a donné la force et la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés

À mes sœurs : Fadela et Rima, ainsi à leurs époux et leurs enfants.

À mes petites sœurs : HANAN, AHLAM, et SOUHILA

Pour leurs aides et encouragements, ainsi pour leur soutien moral.

À toute ma famille « REBBANI »

À ma cousine ASMA et sa famille

À mes amies : Asma, Meriem, Khadidja, Samah, Soumia, Lydia Baya, Salima et Nabila

Et à tous mes collègues de master II « PTEPE »

ملخص

يرتكز هذا العمل على التفكيك البيولوجي للأنتراسان بواسطة سلالات بكتيرية *Streptomyces* sp. AB1 و *Streptomyces* sp. AM2 و *Streptomyces* sp. AH4 و التي عزلت من تربة سهل المتيجة. هذه البكتيريا لها قدرة على تحليل الجزيئات الضخمة. أظهرت تجارب تأثير الحرارة (20, 30, 40°م) و تأثير التركيز (0,0225, 0,05 و 0,5 مغ/لتر) على أن معدل تحلل anthracène يكون أفضل في الوسط ذي التركيز 0,05 مغ/لتر وحرارة 30°م. أثبتت نتائج التحلل التي تم رصدها بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة (CLHP) مع السلالة (AH4) وجود مواد استقلابية في وسط النمو و أن تغير درجة حموضة الوسط تتراوح ما بين 7,09 و 7,29. كما أثبتت تجربة السلالات المثبتة على مادة ألجينات الصوديوم أن فعالية التفكيك أقل منها في الحالة الحرة.

كلمات البحث: التحلل البيولوجي, السلالة البكتيرية, التثبيت, هيدروكربون متعدد الحلقات.

RESUME

Cette présente étude est axée sur la biodégradation des Hydrocarbures Poly Aromatiques (cas de l'anthracène) par les souches *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2, isolées à partir de différents sols de la plaine de la Mitidja. Ces souches sont connues par leur aptitude à dégrader des macromolécules telles que les acides humiques.

Le suivi de la cinétique d'élimination de l'anthracène par les Streptomycètes sous l'effet de la température ($T^{\circ}\text{C} = 20, 30 \text{ et } 40$) et la concentration de l'anthracène ($0.0225, 0.05 \text{ et } 0.5 \text{ mg l}^{-1}$), ont révélé des meilleurs taux d'élimination à la concentration de 0.05 mg l^{-1} à 30°C . Des métabolites de biodégradation ont été détectés par CLHP dans le milieu de culture incubé avec AH4 (souche plus performante). A cet effet, les résultats obtenus révèlent des variations du pH proches de la neutralité (7,09 à 7,29). Par ailleurs, des essais de la biodégradation de l'anthracène par des cellules immobilisée sur l'alginate du sodium sont apparues moins efficace que AH4 a l'état libre.

Mots clés: hydrocarbures poly-aromatiques, souches bactériennes, biodégradation, immobilisation.

ABSTRACT

This present study was centered on the biodegradability of the Poly Aromatic Hydrocarbons (case of anthracene) by using bacterial strains: *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 and *Streptomyces* sp. AM2 which were isolated from different soils surface at Mitidja plain. These strains have an aptitude to degrade macromolecules such as the humic acids. The kinetic of elimination of anthracene by the *Streptomyces* under the effect of the temperature ($T^{\circ}\text{C} = 20, 30 \text{ and } 40$) and the concentration of the anthracene ($0.0225, 0.05 \text{ and } 0.5 \text{ mg L}^{-1}$), revealed better elimination rates at 0.05 mg L^{-1} and 30°C . Metabolites of biodegradation were detected by HPLC in the culture medium incubated with AH4 (most powerful strain). To this end, the results obtained reveal pH variations closes to neutrality (7.09 to 7.29). In addition, biodegradation test by alginate immobilized cells appeared less effective than free AH4.

Key words: Poly Aromatic Hydrocarbons, bacterial strains, biodegradation, immobilization.

Liste des abréviations

ANT : Anthracène.

HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques .

HPLC : chromatographie liquide à haute performance.

Imm : cellules immobilisées

ISP9 : international streptomyces project.

Lbr : cellules libres.

pH : potentiel d'hydrogène.

GLOSSAIRE

A

Abiotique : qualifie un milieu où les organismes vivants ne peuvent exister.

Anthropique : en écologie, tout ce qui est résultat de l'activité humaine.

B

Bioaccumulation : Désigne la capacité des organismes à absorber et concentrer certaines substances chimiques dans tout ou partie de leur organisme.

Bioconcentration : désigne la tendance d'une substance à s'accumuler dans un organisme vivant à un niveau supérieur à celui du milieu environnant par captation directe à partir de ce milieu.

Biotransformation : est donc un processus qui permet la conversion de la molécule mère en métabolites et ultérieurement en dérivés conjugués.

bio film : est une communauté multicellulaire plus ou moins complexe et symbiotique de micro-organismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.

Biodisponibilité : désigne la capacité d'une substance chimique à interagir avec les organismes vivants.

Biodégradabilité : fait de pouvoir se décomposer par des organismes vivants en composés inorganiques.

Biosurfactant : Désigne un composé actif biologique qui favorise l'humidification, la solubilisation et l'émulsion de composés organiques.

C

Catabolisme: Les bactéries tirent l'énergie de la dégradation des composés organiques pour assurer les fonctions cellulaires.

Catalyseur: Molécule qui, en petite quantité, accélère la vitesse d'une réaction et qui revient à sa forme initiale à la fin de la réaction. Les enzymes sont des catalyseurs biologiques.

Cytochrome : Protéine colorée (= chromoprotéine) à laquelle est liée une molécule d'hème (molécule organique contenant un ion ferreux) et transportant des électrons.

E

Énergie libre d'activation : est la quantité d'énergie nécessaire pour lancer un processus chimique, le plus souvent une réaction.

Emulsion : suspension de gouttelettes d'un liquide dans un autre au sein duquel le premier est insoluble.

Ecosystème : ensemble constitué d'un air géographique bien délimitée caractérisée par des conditions écologiques particulières (température, salinité...). Dans ce cadre physique (biotope) vit un ensemble d'êtres (biocénose).

G

Génotoxiques : Agents (d'origine physique ou chimique, ex: rayonnement ultraviolet...) provoquant l'apparition de lésions dans l'ADN, qui peuvent éventuellement conduire à des mutations.

H

Hydrocarbure : composé de carbone et d'hydrogène, notamment le pétrole.

I

L'immobilisation des cellules : C'est la fixation des bactéries sur un support pour accroître la stabilité d'un système microbien.

M

Mésophiles : microorganismes qui peuvent vivre à une température comprise entre 20 et 40°C

Métabolisme : Phase au cours de laquelle des molécules relativement grosses et complexes sont dégradées en molécules plus petites et plus simples.

O

Oxydation : c'est une réaction au cours de la quelles un atome ou une molécule fixe se l'oxygène.

P

Persistence des HAP dans l'environnement : ce sont des molécules résistantes aux dégradations biologiques naturelles. Ces molécules se dégradent de 50 % sur une durée de 7 à 8 ans.

S

Saprophyte : ou les micro-organismes peuvent vivre (sol, eau, organisme vivant).

T

Thermophiles : les microorganismes qui peuvent vivre à une température supérieur à 45 °C

X

Xénobiotiques: Substance possédant des propriétés toxiques, même à très faible concentration (exemple des pesticides).

Liste des figures

Liste des figures	Titre	Page
Figure 1	Processus physico-chimiques et biologiques intervenant dans l'évolution d'une nappe de pétrole en milieu marin	07
Figure 2	La voie aérobie de dégradation bactérienne de l'anthracène par <i>Pseudomonas</i> .	11
Figure 3	<i>Streptomyces</i> dans l'Atlas des actinomycètes 1997	13
Figure 4	Technique d'extraction de l'alginate	18
Figure 5	Mécanisme de formation d'un gel par interaction entre les ions calcium et alginate de sodium	19
Figure 6	La structure chimique de l'anthracène : (a) la structure plane et (b) structure dans l'espace	21
Figure 7	Les étapes de la réalisation de la biodégradation immobilisée	25
Figure 8	La croissance des souches sur le milieu ISP9 solide idéal	27
Figure 9	La croissance des souches sur le milieu ISP9 solide à base de l'anthracène	28
Figure 10	La croissance des streptomyces sur milieu liquide ISP9 à base de l'anthracène	29
Figure 11	L'influence de la température sur la biodégradation de l'anthracène	30
Figure 12	Influence de la concentration et des souches	31
Figure 13	La cinétique de la dégradation de l'anthracène (0,05mg/l) par la souche AH4 à 30°C sous l'agitation (150rpm)	33
Figure 14	La variation du pH de milieu de culture de la souche AH4 à 0,005mg/l et 30 °C	34
Figure 15	Chromatogramme obtenus par HPLC pour la souche AH4 à 30°C.	36

Figure 16 La cinétique de la dégradation de l'anthracène (0.05mg/l) par la souche AH4 libre et immobilisée. 37

Liste des tableaux

		page
Tableau 1	Les avantages et les inconvénients des cellules libres	15
Tableau 2	Les avantages et les inconvénients des cellules immobilisées	16
Tableau 3	Variation des paramètres.	23
Tableau 4	propriétés de l'anthracène	47

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
---------------------	-----------

.....

CHAPITRE I : HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES ET POLLUTION

I.1. Hydrocarbures polycycliques aromatiques.....	03
I.1.1 Définition et caractérisation	03
I.1.2. Origines.....	03
I.1.3.Toxicité.....	04
I.1.4. Devenir des hydrocarbures en milieu marin	05

Chapitre II: BIO-ELIMINATION DES HYDROCARBURES

II.1. biodégradation des HAP	08
II.1.1. Principe de la biodégradation	08
II.1.2. Facteurs physicochimiques affectant la biodégradation.....	09
II.1.3. Mécanismes de la biodégradation les HAP	10
II.1.4. agent de la biodégradation	12
II.2. Les actinomycètes.....	12
II.2.1. Classification des espèces : Exemple du genre Streptomyces.....	12
II.2.3. Les actinomycètes : producteurs d'enzymes de biodégradation	14
II.3 Biodégradation par des cellules immobilisées	14
II.3.2.Techniques d'immobilisation cellulaire.....	15
II.3.3. le choix de support d'immobilisation.....	15
II.3.1 avantages et inconvénients des cellules libres et immobilisées.....	18

Chapitre III : MATERIEL ET METHODES

III.1. Isolement des actinomycètes	20
III.1.1. Purification.....	20
III.1.2. Conservation des souches isolées	21
III.2. Biodégradation de l'anthracène par des souches libres.....	21
III.2.1. Le choix de l'hydrocarbure Poly Aromatique (Anthracène).....	21
III.2.2. Préadaptation des souches sur l'anthracène	21
III.2.3. Etude de la biodégradabilité de l'anthracène	22
III.2.4. Etude des conditions optimales (température, concentration de l'anthracène et de la souche)	22
III.2.5. Mise en œuvre de la biodégradation.....	23
III.2.6. Mise en évidence des métabolites de la biodégradabilité de l'ANT ...	23

III.3. Biodégradation de l'anthracène par des souches immobilisées	24
III.3.1. préparation des cellules immobilisées	24
III.3.2 suivi de la dégradation	26

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Biodégradation de l'anthracène par des souches libres	27
.....	
IV.1.1. Préadaptation des souches sur l'anthracène.....	27
IV.1.2. Optimisation des paramètres de la biodégradation	29
IV.1.2.1. Influence de la température	29
IV.1.2.2. Influence de la concentration et des souches	31
IV.1.3. Mise en œuvre de la biodégradation	32
IV.1.3.1. Cinétique de la dégradation	32
IV.1.3.2. La variation du pH	34
IV.4. Génération des métabolites de dégradation.....	35
IV.2. Biodégradation par des cellules immobilisées	37
IV.2.1. cinétique de la biodégradation	37
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	40
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES.....	42
ANNEXE.....	46

INTRODUCTION

Les émissions de polluants dans les écosystèmes par des processus anthropiques n'ont cessé d'augmenter depuis la révolution industrielle, en raison des besoins énergétiques croissants de l'homme [1].

Parmi ces polluants, les Hydrocarbures (hydrocarbures aliphatiques ou poly aromatiques) sont maintenant quotidiennement présents dans notre proche environnement. L'attention particulière qu'on leur accorde provient de leur action cancérogène reconnue sur certains animaux et soupçonnée chez l'homme [2] **à l'exemple de phénol, cyclohexane pyrene etc. .**

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux, dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérogènes, génotoxiques, etc. [3]. Ils représentent une menace pour la santé publique et l'écosystème [4].

Quelques HAPs (Naphtalène, Anthracène, Acénaphène, Pyrène, etc.) sont classés comme polluants prioritaires par la plupart des agences de protection de l'environnement et en particulier, celle des Etats-Unis et ceci en raison de leur persistance dans l'environnement [5].

Plusieurs techniques physico-chimiques de traitement des eaux ont été développées et appliquées avec succès dans le but de réduire les polluants souvent rencontrés dans l'eau tels que les HAP [6, 7]. Néanmoins, l'application de telles techniques exigeraient des coûts élevés et présenteraient des capacités de réduction limitées et le plus souvent conduisent à une pollution secondaire [6, 7]. Par voie de conséquence, la biodégradation par les microorganismes et en particulier par les bactéries est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement marin, signalons que la dépollution des HAP composé s ne se limite pas aux bactéries mais aussi par les champignons, levures et aussi les micro-algues [8].

Par ailleurs, la biodégradation des HAP par les différents microorganismes a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques. Plusieurs bactéries et champignons sont connus pour dégrader des HAP [6, 7]. Mais peu d'études ont rapporté la biodégradation des HAP par l'emploi des Actinomycètes (surtout le groupe des *Streptomyces*), malgré que différentes espèces d'actinomycètes présentent des capacités de biodégradation des molécules organiques aussi variées que récalcitrantes (non biodégradables) [9].

Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à évaluer l'aptitude de la biodégradation des composés organiques tels que l'anthracène par trois souches de *Streptomyces* isolées localement connues initialement, selon des travaux antérieurs, par une forte aptitude à dégrader les acides humiques.

En deuxième lieu nous avons consacré une partie importante du travail pour la mise en évidence de la modification structurale de l'anthracène après subir une biodégradation en étudiant aussi l'influence de quelques paramètres (température et concentration de polluant) sur la biodégradation. A la lumière de nos résultats préliminaires nous avons sélectionné une souche à fort potentiel à dégrader l'anthracène pour l'utiliser dans un procédé de « bio immobilisation ».

Chapitre I:

**HYDROCARBURES AROMATIQUES
POLYCYLIQUES**

La pollution (accidentelle et chronique) de l'environnement peut influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème [10].

Les hydrocarbures occupent au sein des préoccupations environnementales, une place particulière. Cet intérêt est dû à leur rémanence dans l'environnement et à leur toxicité (mutagène et cancérigène). Ces composés sont produits en quantité importante par l'activité humaine, et notamment dans les processus de pyrolyse et de combustion [10].

I. Hydrocarbures polycycliques aromatiques :

I.1 Définition et caractérisation :

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des composés organiques constitués de plusieurs cycles aromatiques (2 à 10) non substitués et condensés. Ce sont des molécules planes dont la structure se rapproche de celle en feuillet de graphite pour les hauts poids moléculaires [11].

La condensation de plusieurs cycles benzéniques implique qu'il existe une liaison commune entre chaque cycle et que le rapport H/C de la molécule diminue avec le poids moléculaire. Les HAP sont donc des molécules neutres et très réduites et sont peu volatils et se présentent à l'état pur sous forme de solide ou de liquide plus ou moins visqueux [12].

Les caractéristiques communes de ces composés sont : Points de fusion et d'ébullition élevés, solubilité faible dans l'eau et diminue lorsque le poids moléculaire augmente [12,13].

Les HAPs présentent également des coefficients de partage **octanol / eau** très élevés, ces composés sont donc lipophiles et solubles dans de nombreux solvants organiques. Ainsi, ils sont potentiellement bio-accumulés et concentrés dans les sédiments et les sols [12 ,14,15].

La persistance des HAP augmente avec le nombre de cycles de la molécule. En revanche, les composés de poids moléculaires élevés sont très persistants et par conséquent bioaccumulables [12].

I.2. Origines :

Les HAPs sont formés principalement lors de la combustion incomplète de la matière organique, récente ou fossile. Les HAP résultants de combustion sont dits d'origine "pyrolytique". L'activité industrielle contribue largement à la production de ces composés, en particulier l'industrie du charbon (cokeries, usines à gaz), ainsi que les émissions des véhicules et le chauffage résidentiel [16].

Les HAPs peuvent avoir également une origine pétrolière. La formation du pétrole par catagenèse se produit à des températures relativement basses (50-150°C) [16].

Ainsi l'enfouissement dans les bassins sédimentaires de la matière organique et sa lente maturation conduisent à la formation de mélanges de Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques complexes où prédominent les dérivés alkylés.

Il faut cependant garder à l'esprit que l'alimentation (cuisson des graisses) et le tabagisme sont parmi les premières sources d'exposition humaine suivis par la pollution atmosphérique liée au transport automobile et un dérivé du goudron de houille composé d'environ 85 % de Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques [17].

I.3.Toxicité :

Les produits pétroliers rejetés dans l'environnement ont des répercussions sur les plantes, animaux et êtres humains. Les conséquences de la contamination dépendent des organismes eux-mêmes et de la structure chimique des hydrocarbures [8 ,16].

Certaines espèces éprouvent des changements de comportement à peine perceptibles ou des problèmes de santé à court terme. Certaines d'entre elles éprouvent des effets toxiques instantanés et aigus parfois mortels, tandis que chez d'autres espèces, les répercussions se manifestent lentement à long terme [8 ,16].

Face à ces polluants, les organismes susceptibles d'être contaminés doivent être considérés en fonction de leur capacité de réponse spécifique. Les bactéries, nourriture de nombreuses espèces aquatiques, peuvent être des vecteurs de contamination par lesquels les hydrocarbures peuvent entrer dans la chaîne alimentaire [8 ,16].

Les HAPs présentent un risque toxicologique important même à faibles concentrations, notamment par leurs propriétés cancérigènes et/ou mutagènes [3 ,18].

Les premières observations de toxicité ont été rapportées par Pott (1775) à propos de cancers de la peau, des ramoneurs de cheminées [18]. Le pouvoir cancérigène des produits de pyrolyse (goudrons, suies) a été reconnu, suite au développement de l'utilisation du charbon [3 ,18].

En raison de leur caractère lipophile, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques s'accumulent dans les organismes vivants, préférentiellement dans les tissus lipidiques [11].

La plupart des organismes ont la capacité de métaboliser les HAP par action de l'enzyme cytochrome P450. La remobilisation des HAP métabolisés permet leur excrétion de l'organisme mais aussi les rendent toxiques [11].

En effet, les HAPs deviennent toxiques principalement lorsque les métabolites hydrophiles se fixent sur les structures cellulaires (protéines, ADN). La modification de l'ADN induit alors des effets cancérigènes et mutagènes. D'autre part, les HAP sont photodégradables, ce qui peut aussi induire une phototoxicité [3, 11,18].

Les HAPs sont absorbés par l'homme par [8, 19] :

- Les voies respiratoires via l'inhalation de particules atmosphériques contaminées ou de fumées de cigarettes.
- Le système digestif via l'ingestion de produits alimentaires contaminés, notamment les produits grillés ou fumés.
- La peau.

Les HAPs présentent un risque certain pour les écosystèmes, notamment pour les espèces aquatiques. Ils ont un taux de dissolution très faible et forment donc un film à la surface ou une émulsion dans l'eau [19], occasionnant une double nuisance :

- Leur faible tension superficielle entraîne une modification des échanges gazeux, une diminution de la quantité d'oxygène dissous et une réduction de la photosynthèse.
- Ils se fixent sur les branchies et les systèmes respiratoires des organismes aquatiques gênant leur respiration, ce qui conduit à une diminution du pouvoir auto-épurateur des cours d'eau [8].

I.4. Devenir des hydrocarbures en milieu marin :

Du fait de la très faible solubilité des hydrocarbures dans l'eau, les hydrocarbures rejetés dans les océans s'étalent à la surface avant de subir une série de modifications suite à l'action de facteurs abiotiques et biologiques (Figure 1). L'action simultanée de ces différents facteurs aboutira à l'élimination de cette pollution [8, 14].

Le processus physico-chimiques et biologiques intervenant dans l'évolution d'une nappe de pétrole en milieu marin selon les étapes en dessous:

- **Evaporation:** Ce phénomène touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, température,...). Les hydrocarbures les plus légers, ayant de 4 à 12 atomes de carbone ($T_{eb} < 270\text{ °C}$), qui représentent généralement près de 50 % des hydrocarbures totaux d'un brut moyen, sont éliminés rapidement dès les premiers jours, pouvant conduire à une pollution de l'atmosphère [8].
- **Solubilisation:** La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. Il est à noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement, ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore [8].
- **Emulsification:** Deux types d'émulsions peuvent se former : eau-dans-huile appelée "mousse Chocolat" et huile-dans-eau. Les émulsions eau-dans-huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement

dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages, alors que les émulsions huile dans- eau facilitent l'élimination des hydrocarbures [8].

- **Sédimentation:** La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer. La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradable par voie naturelle [8].
- **Photo-oxydation:** La photo-oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau ou l'air (oxygène) et la lumière (radiations solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures. L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés. Ainsi, la photo-oxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les *n*-alcane [8].

La photo-oxydation conduit à la formation de composés solubles dans l'eau (acides, alcools, cétones, peroxydes et sulfoxides) et certains travaux de recherche ont montré leur toxicité pour les communautés microbiennes alors que beaucoup de chercheurs ont montré l'existence d'interactions entre la photo-oxydation et la biodégradation pour l'élimination des alkyl benzènes et de l'anthracène. L'action simultanée de ces deux phénomènes permet une élimination plus rapide de ces deux familles de composés [8].

- **Biodégradation:** La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement marin. Les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries. L'importance de la biodégradation dans l'élimination du pétrole, les voies métaboliques d'oxydation des hydrocarbures par les bactéries et les paramètres qui peuvent influencer la biodégradation seront traitées dans le deuxième chapitre [8].

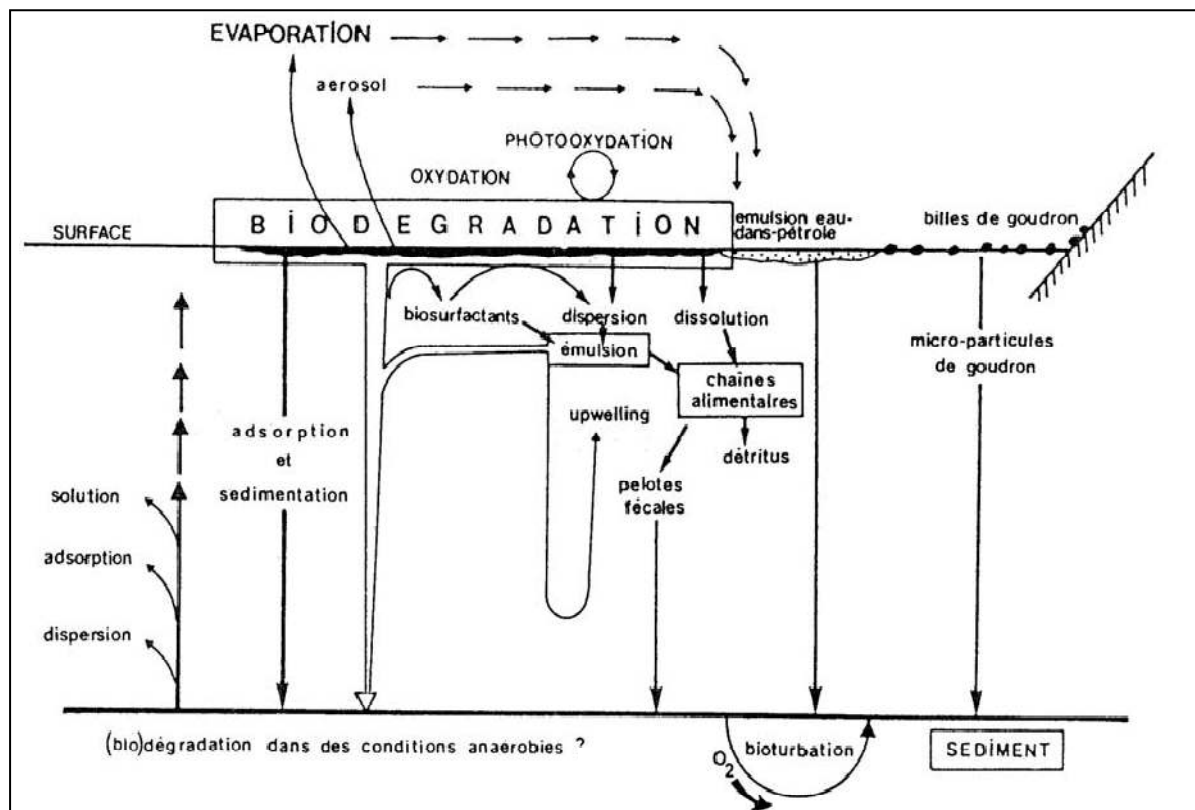


Figure 1 : Processus physico-chimiques et biologiques intervenant dans l'évolution d'une nappe de pétrole en milieu marin [8].

Chapitre II:

**BIOELIMINATION DES
HYDROCARBURES**

Le choix d'une méthode de dépollution repose sur de nombreux paramètres : type de polluants et variabilité de leur comportement (volatilité, adsorbabilité, polarité ...), diversité des conditions locales (nature du sol, de la nappe, accessibilité, disponibilité de surfaces utilisables à proximité, zone urbaine ou non), pollution récente ou ancienne, étendue ou non, avec en plus, les exigences économiques et administratives à prendre en compte [20].

La dépollution peut être mise en œuvre à travers des procédés :

- **Physiques** qui consistent à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, vers des points de récupération [20].
- **Thermiques** qui consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire le polluant et le détruire [20].
- **Chimiques** qui font appel à un principe réactionnel (action d'un solvant, oxydation...) pour transformer le polluant en un composé moins toxique et inerte vis-à-vis de l'environnement [20].
- **Biologiques** qui favorisent la décomposition des produits, c'est la biodégradation [20].

II.1. Biodégradation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques :

Le terme biodégradation implique la rupture de liaisons covalentes entre les atomes des molécules organiques par des agents biologiques [21].

- Si la biodégradation du substrat organique est totale, c'est à dire la formation uniquement de produits inorganiques tels H_2O , CO_2 , CH_4 , H_2 , on parle de la minéralisation [21].

- Si cette minéralisation n'est pas atteinte, on parlera de biodégradation partielle. Le terme biotransformation sera ici réservé aux changements de forme des molécules non biodégradables comme certaines espèces métalliques. L'élément considéré pourra être bio-oxydé ou bio-réduit [21].

II.1.1. Principe de la biodégradation :

L'étude de l'oxydation des hydrocarbures se base sur l'analyse des milieux de culture des microorganismes dont la croissance dépend de la nature de l'hydrocarbure utilisé comme source de carbone ainsi que des capacités métaboliques des cellules [8].

La transformation des substances organiques par voie biochimique est particulièrement importante par le fait que les organismes vivants disposent de protéines spécifiques, les enzymes, qui agissent comme catalyseurs en abaissant l'énergie libre d'activation d'une réaction thermodynamiquement possible. Cette action de catalyse enzymatique détermine la cinétique de la réaction de biotransformation d'une substance organique [22].

La voie de dégradation la plus directe (voie métabolique) est l'utilisation par le microorganisme de la substance organique comme source d'énergie et de carbone [22].

Le processus de dégradation intégral conduit au recyclage du carbone, de son état organique et à son état minéral (CO_2). Cette bioconversion est accomplie à travers une série plus au moins complexe de réactions d'oxydation enzymatique, avec de l'oxygène comme accepteur final d'électrons (métabolisme aérobie) ou avec d'autres accepteurs tels que les ions sulfate (SO_4^{2-}) ou nitrate (NO_3^-) (métabolisme anaérobie) [22].

Les microorganismes capables d'utiliser les hydrocarbures pétroliers en tant que donneurs d'électrons apparaissent dès que la pollution est introduite dans le milieu. L'efficacité de la microflore se traduit par la présence de microorganismes ayant un métabolisme spécifique, l'existence de cométabolisme et des interactions positives entre souches (synergie ou coopération) [23].

II.1.2. Facteurs physicochimiques affectant la biodégradation :

Il existe plusieurs facteurs abiotiques affectant la biodégradation des hydrocarbures :

- **Température** : Selon Hogan cité dans le mémoire de AMIR S [24] la température est un facteur important dans la biodégradation des HAPs. La solubilité des HAP augmente en fonction de l'augmentation de la température de 5 à 45 °C [21]. Les dérivés les plus légers disparaissent pour des températures de l'ordre de 35 à 55 °C. Les dérivés lourds ont besoin d'une période de 20 jours pour se dissiper à l'exception du chrysène qui disparaît très rapidement à 60°C.
- **Aération** : D'après Quantin et al cité dans le mémoire de AMIR S [24] l'aérobiose est très importante dans l'oxydation des HAPs et qu'un déficit en oxygène diminuait le taux de biodégradation des HAP.
- **pH** : Son influence a été très peu étudiée, mais il semble ne jouer qu'un rôle relativement mineur en milieu marin. Contrairement à la plupart des écosystèmes aquatiques, les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11 [8]. Les valeurs extrêmes de pH pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures [24].

Plusieurs chercheurs ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques. Quelques chercheurs conseillent un pH initial égal à 7 pour la dégradation des HAP en solutions aqueuses. En revanche, d'autres études montrent de meilleurs résultats au pH acide 2 à 3 qu'à un pH proche de la neutralité. Alors que dans d'autres études, les auteurs travaillent sans ajuster le pH et obtiennent une bonne minéralisation des HAP [24].

- **Éléments nutritifs:** Les rejets des hydrocarbures dans les environnements aquatiques, qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduisent généralement à des rapports carbone /azote, et carbone /phosphore très élevés défavorables pour la croissance microbienne. Quelques chercheurs considèrent qu'un rapport C : N : P de 100 :5 :1,7 est favorable à la biodégradation de produits de pétrole dont les HAP et il semblerait que l'azote et le phosphore sont des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans le sol selon Mohn , Stewart (2000) et Walworth et al(2003) [20].
- **Salinité:** Certaines études ont montré que les taux de biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité augmente (3,3 à 28,4 %). Cette étude suggère une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes aux salinités extrêmes [20].

II.1.3. Mécanismes de la biodégradation des HAPs:

La biodégradation met en jeu des processus d'oxydation qui aboutissent à la formation d'hydrocarbures de poids moléculaire inférieur (appelé bioconversion), mais aussi à la formation de gaz carbonique, d'eau et de biomasse lorsque la réaction est complète (certains hydrocarbures restent cependant réfractaires) [25].

En aérobiose, la plupart des voies cataboliques des hydrocarbures aromatiques convergent vers des intermédiaires hydroxylés tels que les catéchols ou leurs dérivés (Protocatéchuategentisate) [25].

Les enzymes qui catalysent ces transformations sont des monooxygénases et des dioxygénases. D'autres dioxygénases vont agir ensuite pour réaliser l'ouverture du cycle aromatique de ces intermédiaires selon un clivage en position ortho ou méta [25].

Ainsi, les enzymes de dioxygénases impliquées dans le catabolisme des hydrocarbures aromatiques par des microorganismes illustrent bien leur nature, leur capacité à s'adapter à différentes sources de carbone [25].

Certains auteurs suggèrent que la biodégradation peut être augmentée par une production de biosurfactants. Ceux-ci peuvent en effet, augmenter les cinétiques de transfert des HAP, en augmentant la concentration du HAP dissous dans la phase aqueuse (par formation de micelle) ou l'aire interfaciale (par diminution des tensions de surfaces), quelque soit leur forme pure, soit dissous dans un solvant ou sous forme de cristaux [25].

Les réactions chimiques de biodégradation des hydrocarbures catalysées par les enzymes bactériens sont complexes et dépendent des conditions physico-chimiques du milieu, de la nature du substrat hydrocarboné et de la souche bactérienne [12].

Suivant le type du microorganisme et celui de l'hydrocarbure aromatique mis en œuvre, des composés intermédiaires très divers peuvent être obtenus.

De façon générale, peu de données sont disponibles concernant le devenir des HAP après biodégradation en termes de CO₂, de métabolites et de biomasse [25].

La figure 2 explique une voie de dégradation bactérienne aérobie de l'anthracène par *Pseudomonas* [25].

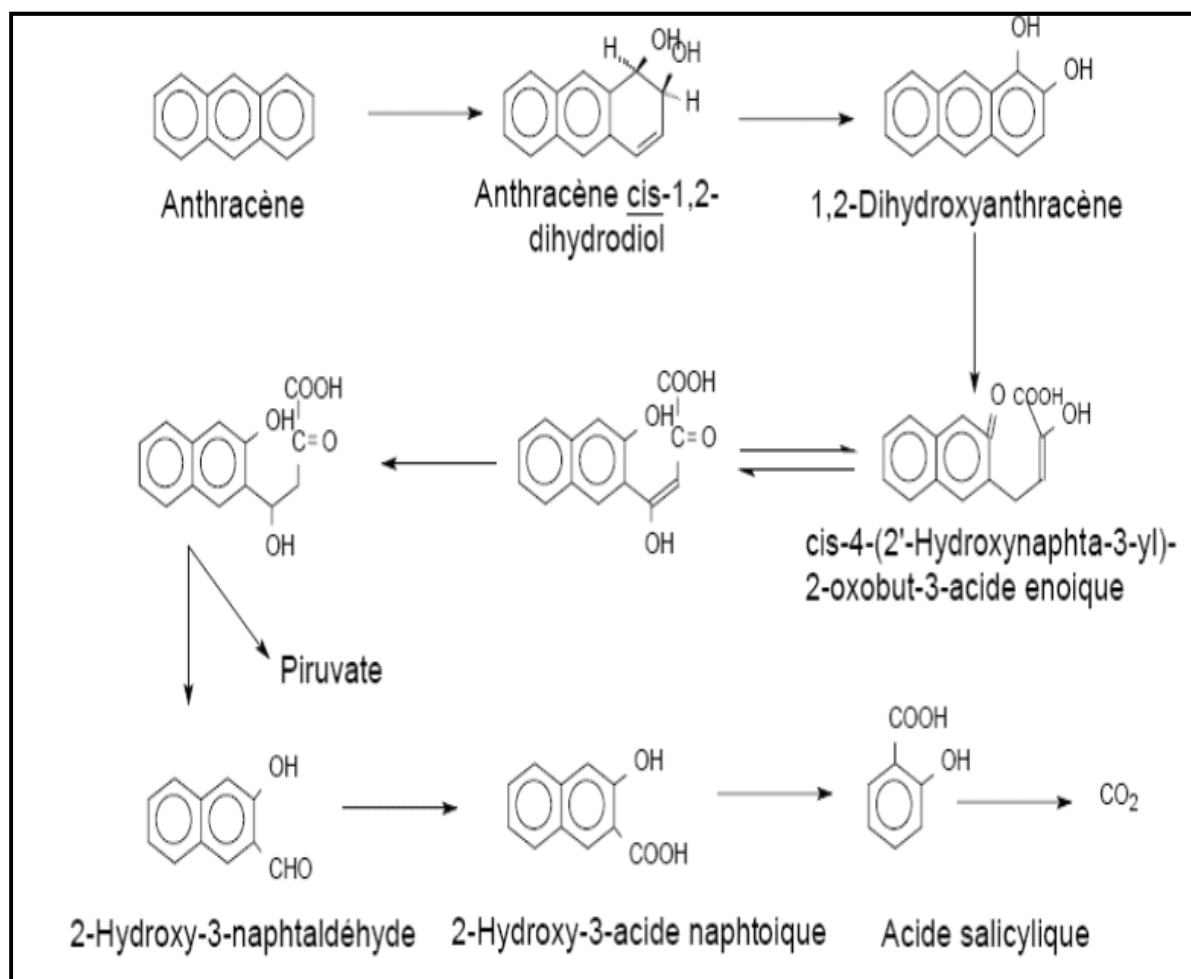


Figure 2 : La voie aérobie de dégradation bactérienne de l'anthracène par *Pseudomonas* [25].

II.1.4. Agents microbiens responsables de la Biodégradation des HAPs :

II.1.4.1. Par les champignons :

Certains champignons produisent des cytochromes P450 monooxygénases qui leur permettent de transformer un certain nombre de molécules y compris les HAPs. Ces monooxygénases transforment directement les HAPs par incorporation d'une molécule d'oxygène en formant un trans-dihydrodiol-HAP. Les principales espèces impliquées sont : *Cunninghamella elegans*, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Trametes versicolor* et *Pleurotus ostreatus* [12].

II.1.4.2. Par les bactéries :

La dégradation microbienne s'effectue par une attaque successive des anneaux aromatiques [20]. Les enzymes responsables sont les dioxygénases, qui sont classées selon le mode de fission du noyau aromatique qu'elle catalyse : intradiol dioxygénase lorsque la fission se fait en ortho (clivage entre les carbones porteurs des groupements hydroxyles) ou extradiol dioxygénase pour une fission en méta (clivage entre les deux carbones adjacents au diol) [16].

En se basant sur la fréquence d'isolement, les genres bactériens prédominants sont : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligènes*, *Vibro*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacteria*, et *Nocardia* « *Mycobacterium* sp, *Staphylococcus* [8,12,20] .

II.2. Les actinomycètes :

Les actinomycètes possèdent de caractéristiques à savoir :

- Résistance à la sécheresse et au pH [26].
- Production des enzymes extracellulaires qui leur font les candidats appropriés pour le bioremédiation [26].

Les *Streptomyces* c'est le groupe d'actinomycètes le plus abondant dans le sol et bien connu par une grande capacité de produire de petites molécules biologiquement actives [25,27].

II.2.1. Classification des espèces du genre *Streptomyces* :

La clé de la détermination des espèces de *Streptomyces* la plus employée est celle du Bergey's Manual, elle fait largement appel aux travaux de l'«International Streptomyces Project » [9].

Cette clé se fonde sur les caractères principaux suivants :

- La couleur du mycélium aérien sporulé avec 7 classes de couleur : blanc, gris, jaune, rouge, bleu, vert et violet.
- La forme des chaînes de spores.
- La Série *Rectus Flexibilis* lorsque les chaînes sont droites ou flexueuses.
- La Série *Spira* lorsque les chaînes sont hélicoïdales (figure 3).
- La production de pigments mélanoides bruns à noirs.
- L'ornementation de la surface des spores : lisse, verruqueuse, ou chevelue.
- La capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer : D-glucose, Dxylose, L-arabinose, L-rhamnose, D-fructose, D-galactose, Raffinose, D-mannitol, inositol et saccharose.

Toutefois, la description d'une souche peut nécessiter l'étude d'autres caractères. Une panoplie d'environ 120 caractères morphologiques et biochimiques supplémentaires est alors à la disposition des taxonomistes. 75 de ces caractères correspondent à la recherche de l'utilisation de nombreuses sources de carbone et d'azote. La plupart des autres caractères traduisent le degré de développement et la morphologie des souches sur divers milieux complexes ou synthétiques.

Rappelons enfin que ces méthodes de classification évoluent rapidement et qu'au niveau subgénérique la taxonomie numérique devrait permettre une définition plus cohérente des espèces appartenant à divers genres d'actinomycètes dont en particulier le genre *Streptomyces*.

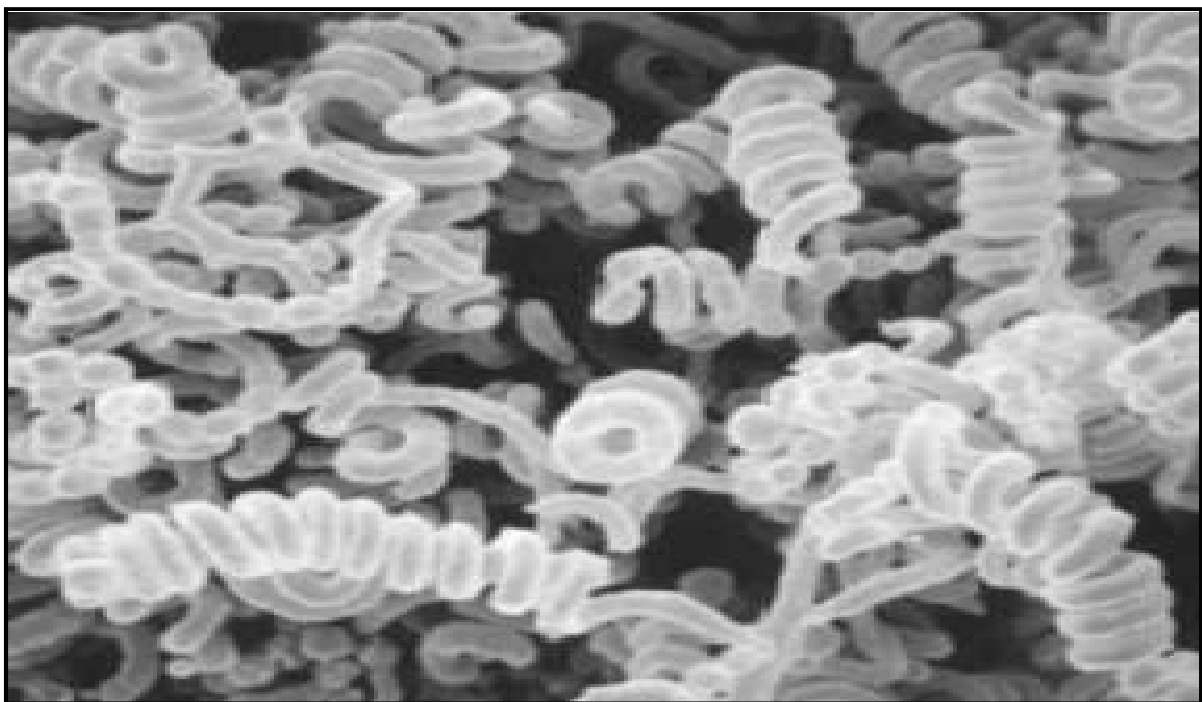


Figure 3 : *Streptomyces* dans l'Atlas des actinomycètes 1997 [9].

II.2.2. Les actinomycètes : producteurs d'enzymes de biodégradation :

Deux des propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs, parmi lesquels les enzymes, qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants des actinomycètes. L'action des enzymes du catabolisme conduit à la dégradation des nutriments et sources d'énergie plus ou moins complexes [9].

II.2.2.1 Enzymes de biodégradation des composés organiques naturels :

Les actinomycètes sont des microorganismes saprophytes, qui jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique naturel et donc un rôle dans le recyclage des biopolymères complexes comme la cellulose, la lignocellulose, la pectine, le xylane et les protéines par la production d'enzymes extracellulaires qui sont d'une importance majeure dans l'industrie [9].

La dégradation de ces bio-polymères par les enzymes peut être le résultat d'un mécanisme radicalaire (oxydation biologique) ou d'un changement chimique (hydrolyse biologique) [9].

II.2.2.2. Enzymes de biodégradation des composés organiques de synthèse :

Les capacités biodégradatrices des actinomycètes ne se limitent pas seulement aux composés organiques naturels mais concernent également des substrats organiques plus difficiles à dégrader car ils sont peu solubles dans l'eau. Il s'agit des hydrocarbures (chaînes hydrocarbonées), de phénols et d'autres composés récalcitrants [9].

Le principal mécanisme enzymatique pour l'assimilation et/ou la détoxification de substrats organiques peu dégradables est l'oxydation enzymatique par les mono-oxygénases ou dioxygénases : il y a formation de groupes polaires qui permettent d'augmenter la solubilité de nombreux substrats organiques peu soluble dans l'eau (hydrocarbures ou hydrocarbures aromatiques polycycliques) et de faciliter ainsi leur assimilation. C'est également, le mécanisme de biodégradation des composés nitro-aromatiques et des substrats organochlorés tels que les chloro-bi-phényle (PCB) [9].

II.3. Biodégradation par des cellules immobilisées :

Contrairement aux cellules planctoniques cultivées dans un milieu liquide, l'immobilisation cellulaire correspond à un état dans lequel les cellules ne peuvent pas se déplacer librement sous l'effet d'un mouvement Brownien ou par sédimentation [28].

Cette définition générale englobe la formation naturelle de bio films et d'agrégats par certains microorganismes et les procédés qui consistent à retenir ou à inclure volontairement dans une matrice des cellules bactériennes [28].

L'immobilisation permet de retenir les cellules microbiennes dans un système de fermentation et d'obtenir des hautes densités de biomasse. Cette technique comporte de nombreux avantages, mais aussi des inconvénients, comparés à des procédés utilisant des cellules libres [28].

II.3.1. Techniques d'immobilisation cellulaire :

En fonction de l'application et des caractéristiques des cellules à immobiliser, différentes techniques ont été développées.

II.3.1.1. L'attachement ou l'adsorption sur un support préformé :

L'immobilisation par adsorption ou adhésion sur un support préformé est basée sur la faculté des cellules à coloniser des surfaces solides et à s'y développer. La colonisation s'effectuant dans des conditions douces par mise en contact des cellules et du support, la viabilité est élevée [29].

II.3.1.2. La rétention derrière des membranes ou bioréacteurs à membrane :

Ces systèmes sont intéressants pour la production de biomasse puisqu'ils permettent d'obtenir des concentrations cellulaires 7 à 10 fois plus élevées qu'en fermentation batch. Cependant, le pompage du milieu fermenté dans le système de filtration causerait un stress pour les cellules se traduisant par une perte d'activité [29].

II.3.1.3. L'inclusion dans une matrice de polymères :

Ce procédé consiste à inclure des cellules bactériennes dans une matrice poreuse de polymères formée après gélification [29].

II.3.2. Le choix de support d'immobilisation :

Il existe différentes exigences concernant la nature du support, il ne doit pas être toxique et doit montrer des propriétés physiques et chimiques favorisant l'immobilisation [20].

Un choix judicieux de support inerte et non toxique ne nécessitant pas d'agent chimique pour l'adsorption permet une immobilisation dans des conditions douces résultant en une viabilité élevée des cellules immobilisées.

La matrice d'immobilisation idéale doit favoriser l'adhésion des substances bioactives, empêcher les bactéries de se déloger, et permettre le flux d'échange avec l'environnement et de passage de nutriment, de l'oxygène ainsi les sous produit [20].

II.3.2.1. Alginate de sodium :

II.3.2.1.1. Origine :

Les alginates sont une famille de polymères extraits d'algues brunes (classe des *Phaeophyceae*). Les variétés d'algues brunes communément utilisées pour l'extraction d'alginate sont les variétés *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* et *Ascophyllum nodosum*. Leur préparation pour un usage alimentaire inclut un contrôle des ions qu'ils contiennent. Dans le milieu naturel, il s'agit d'un mélange des ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} [30].

La figure 4 montre les étapes de l'extraction de l'alginate.

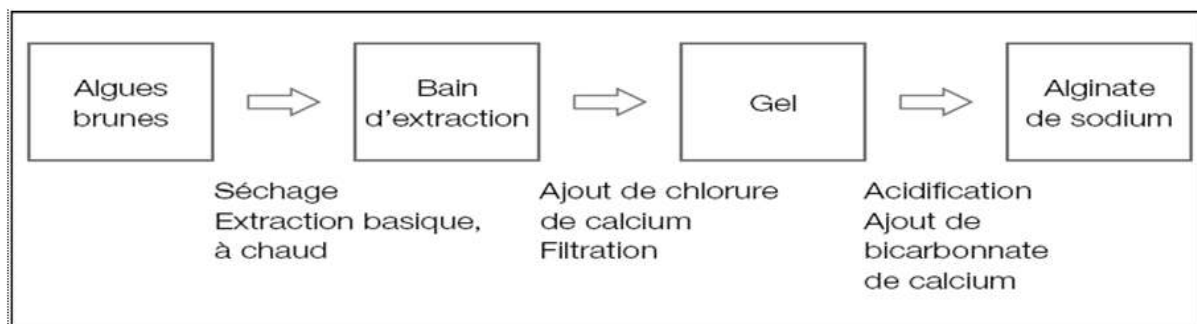


Figure 4 : Technique d'extraction de l'alginate [28].

II.3.2.1.2. Nature chimique :

L'alginate de sodium est un polymère (longues molécules formées en attachant un grand nombre d'une ou plusieurs petites molécules l'une après l'autre) constitué de deux types de carbohydrates : M et G sur le schéma ci-dessous (figure 5) (c'est à dire des sucres, au sens où la chimie l'entend, qui n'est pas juste celui du sucre de table) [31].

Ce polymère est accompagné d'ions sodium. Lorsque les ions calcium sont ajoutés, les molécules de polymère vont s'enrouler autour des ions calciums, pour former un gel (figure 5) [31].

La taille des billes influence également l'activité de la biomasse immobilisée. Des billes d'un plus petit diamètre améliorent les transferts de masse d'où une plus grande biomasse et une plus forte productivité mais leur structure se dégrade facilement sous l'action du développement cellulaire au centre des billes et elles ne facilitent pas leur séparation du milieu de culture. Un diamètre compris entre 1 à 2 mm représente un compromis sélectionné par plusieurs auteurs [30].

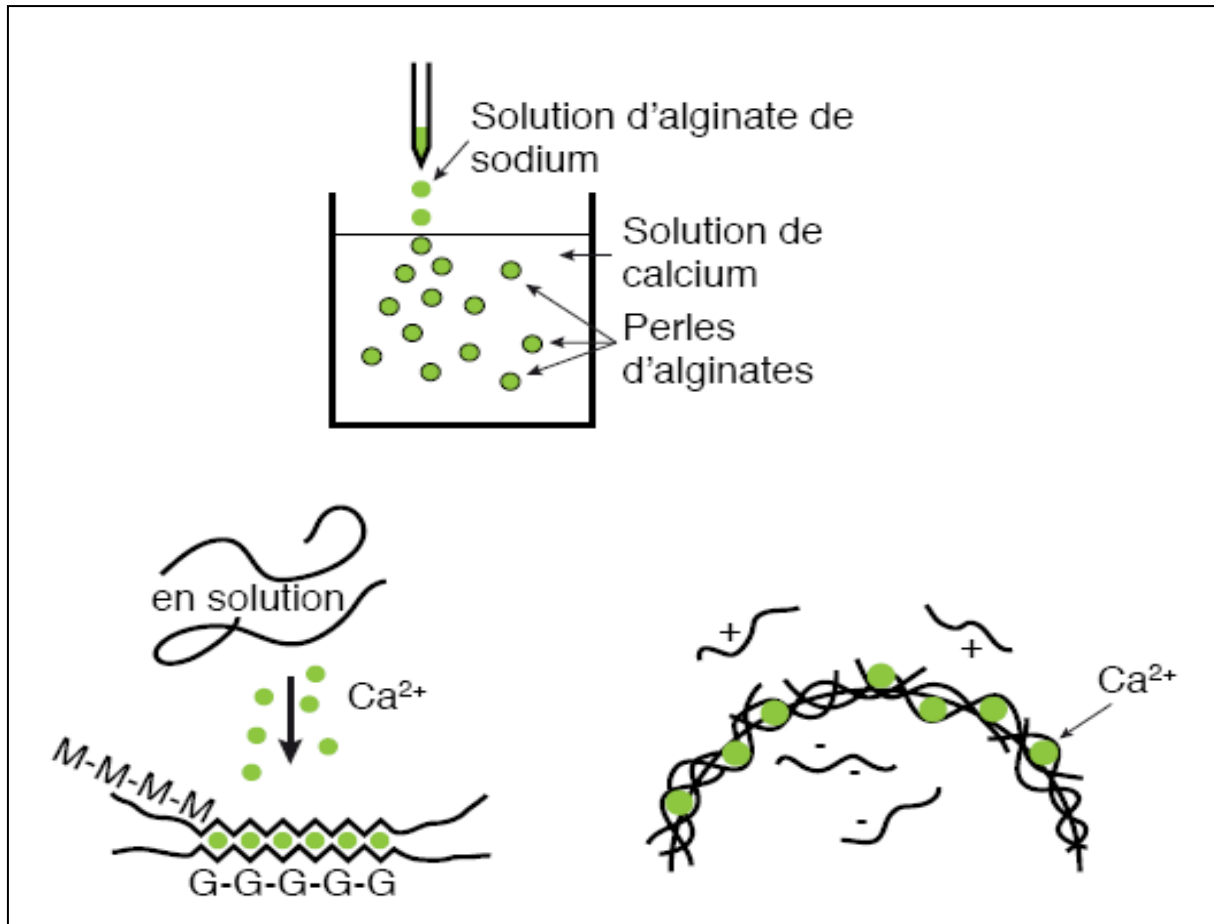


Figure 5 : Mécanisme de formation d'un gel par interaction entre les ions calcium et alginate de sodium [31].

II.3.3. Avantages et inconvénients des cellules libres et immobilisées :

Avantages et inconvénients des cellules libres et immobilisées sont représentés dans le tableau 1 et 2 [28 ,29].

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des cellules libres.

Cellules libres	
Avantages	Inconvénients
• Forte prolifération cellulaire. • Contacte direct avec le polluant.	• Inhibition par le substrat et la toxicité pour les micro-organismes par des contraintes diffusionnelles. • Pas de protection cellulaire contre des conditions environnementales défavorables. • Cout élevé d'application. • Nécessite de suivi des paramètres environnementaux. • Problèmes de la concentration des micro-organismes.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des cellules immobilisées.

Cellules immobilisées	
Avantages	Inconvénients
• Productivité augmentée à cause d'une densité de biomasse plus élevée. • Lavage de la biomasse du réacteur empêché pendant la fermentation continue, même avec un taux de dilution élevé. • Stabilité biologique et physique des cellules plus élevée en raison de la protection par le support. • Découplage de la croissance et de la production de métabolites. • Coût réduit pour le traitement en aval du milieu • Rendements plus élevés pour la production de métabolites secondaires • Rétention élevée des plasmides chez les cellules qui en possèdent • Protection contre certains effets inhibiteurs dans le milieu • Susceptibilité diminuée contre l'attaque des phages et des contaminants	• Cellules peuvent se séparer du support et ainsi contaminer le produit • Stabilité mécanique et chimique de certains supports peut être insuffisante (cisaillement, dissolution, décomposition par le produit) • Prolifération cellulaire peut détruire la matrice du support et les cellules se libèrent par la suite • Limitations de diffusion peuvent restreindre la bioconversion • Nécessite d'ajouter une étape de production des cultures immobilisées au procédé • Nécessite d'entreposer les cellules ou de prévenir leur mortalité lors des périodes d'arrêt de production • Complexité de l'assainissement du bioréacteur si des contaminations se produisent.

Chapitre III

MATERIEL ET METHODE

Cette étude a été réalisée au laboratoire de l'écosystème aquatique d'analyses physicochimiques et bactériologiques au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) de Bou-Ismaïl (wilaya de Tipaza).

Elle a pour but de contribuer à évaluer l'aptitude de la biodégradation des *Streptomyces*, connues par leur multiple potentiel de production enzymatique (kératinase et peroxydases) vis-à-vis des hydrocarbures en vue d'une application en biodépollution des sites contaminés [32,33].

III.1. Isolement des actinomycètes :

Les actinomycètes ont été isolés à partir du sol de la surface (10 – 20 cm) de trois échantillons appartenant aux différents types du sol de la Mitidja (vertisols à Meftah, sols humides à Boufarik et sols rouges méditerranéens à Hadjout).

Ces souches ont été identifiées par les méthodes de biotypage (API ZYM) et de séquençage de l'ARN 16S. Ces souches appartiennent aux espèces *Streptomyces sp* souche AB1, *Streptomyces sp* souche AH4 et *Streptomyces sp* souche AM2 [1,3].

III.1.1. isolement :

L'étape de la purification des cultures, nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes souches obtenues après trois jours d'incubation. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé ensuite purifié par repiquage dans le milieu ISP9, sa composition (g/l) est la suivante :

Glucose (SIGMA 99,5%)	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (E.MERCK)	2.64g
KH ₂ PO ₄ (Panreac)	2.38 g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O (Riedel-de Haen)	5.65 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1g
1 ml de solution des éléments traces.	

Préparation de la solution des éléments traces préparée dans 1 litre d'eau distillée :

CuSO ₄ 5H ₂ O	0.64 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.11 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.79 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.15 g

III.1.2. Conservation des souches isolées :

Les souches isolées sont conservées à 4°C dans des boîtes de Pétri contenant le milieu ISP9 pour une durée de 3 à 5 semaines.

III.2. Biodégradation de l'anthracène par des souches libres :

Pour étudier la capacité de la dégradation de l'anthracène par les *Streptomyces* (AB1, AH4 et AM2), et pour connaître les conditions optimales qui permettent un taux de dégradation élevé, nous avons varié quelques paramètres tels que : la température, la concentration de l'anthracène et la souche.

III.2.1. Le choix de l'hydrocarbure « Poly Aromatique » (Anthracène) :

L'anthracène est un HAP à trois cycles benzéniques (figure 6). Dans les conditions ambiantes habituelles, il est solide cristallisé sous forme de feuillets, appelé aussi : paranaphtalène anthracine.

Il est fabriqué à partir de la distillation des goudrons de charbon qui permet d'obtenir de l'huile d'anthracène riche en anthracène dans la fraction correspondant à des températures d'ébullition comprises entre 300 et 360 °C [20]. L'utilisation large de l'anthracène dans l'industrie, et de la multiplicité de ses sources anthropiques ainsi de leur toxicité, rend l'anthracène très rejeté dans l'environnement, à cet effet nous avons choisi l'anthracène comme le modèle de la dégradation par les microorganismes, les propriétés de l'anthracène sont représentées dans le tableau 4 dans l'annexe .

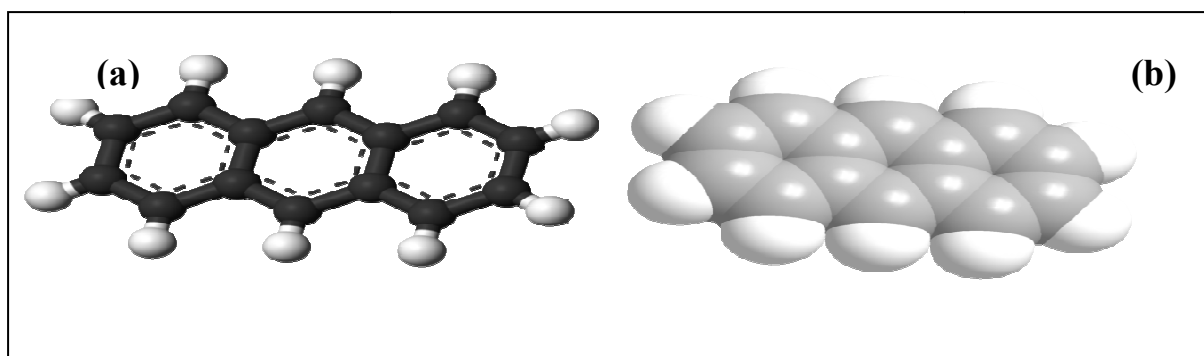


Figure 6 : la structure chimique de l'anthracène : (a) la structure plane et (b) structure dans l'espace.

III.2.2. Pr ad aptation des souches sur l'anthracène :

Nous avons préparé au préalable une pré culture, en utilisant deux sources de carbones: le glucose et l'anthracène, ceci permettre une pr ad aptation de la souche au substrat à dégrader (réduire la phase de latence) et l'obtention de maximum de biomasse.

La culture est r alis e sur un milieu ISP9 (liquide et solide) :

- Les souches sont ensemenc es dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu ISP9 liquide au quel nous avons ajouté le glucose (1g/l) et l'anthracène (100mg/l). Les pré cultures sont alors incub es   30  C pendant 72 heures, à l'obscurité et sous une agitation (**150 rpm/min**).
- Les souches sont aussi ensemences sur milieu ISP9 solide cou  dans des biotes de Pétri et incub es   30  C pendant 72 heures.

L'augmentation de la biomasse microbienne accompagnant la croissance de la population de microorganisme entraîne le trouble du milieu de culture qui peut être observ e sur le milieu solide et liquide

III.2.3. Etude de la biodégradabilité de l'anthracène :

L'étude de la capacité de la dégradation de l'anthracène par les *Streptomyces* sont r alis es par leur mise en culture sur le milieu ISP9 liquide pauvre en substrat conventionnel tel que le glucose (1% = 0.1g/l) avec l'anthracène comme la seule source de carbone et d'énergie.

III.2.4. Etude des conditions optimales (température, concentration de l'anthracène et de la souche) :

Les souches (AB1, AH4 et AM2) pré adapt es sont inocul es dans des Erlenmeyers de 250 ml, remplis de 100 ml de milieu ISP9 pauvre en glucose (0,1 g/l) stérile plus l'anthracène de différentes concentrations : 0,0225 mg/l, 0,05 mg/l, 0,5 mg/l (voir tableau 3) qui est déjà dissouts dans le diméthyle formamide (DMF) avant l'ajouter dans le milieu.

Le pH est ajusté à 7,2 par l'ajout de quelques gouttes de NaOH.

L'incubation est faite sous agitation rotative en raison de 150 tr/min et ceci à différentes températures (20, 30, et 40  C) (voir tableau 2).

Afin d'estimer l'optimum de la température, de la concentration, et la sélection de la souche, nous avons mesuré le pourcentage de la réduction (**%R**) de l'anthracène par l'estimation de l'Absorbance à 254 nm et le pH. Les prélèvements sont effectués stérilement chaque 4 jour tout au long de la croissance.

La variation du pH de milieu de culture au cours de l'incubation est mesur e à l'aide d'un pH-mètre (de marque HANNA pH 211) préalablement étalonné.

Le pourcentage de la réduction de l'ANT (**%R**) a été mesuré par l'absorbance à une longueur d'onde de 254 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV – visible (de marque JENWAY) en utilisant la formule suivante :

$$R \% = \frac{(Abs_0 - Abs_f)}{Abs_0} \cdot 100$$

Tableau 3 : variation des paramètres

	AB1			AH4			AM2		
Concentration (mg.l ⁻¹)				Température °C					
0,0225	20	30	40	20	30	40	20	30	40
0,05	20	30	40	20	30	40	20	30	40
0,5	20	30	40	20	30	40	20	30	40

Cette partie nous permettra d'appliquer la biodégradation de l'anthracène dans les conditions optimales de température et de concentration en utilisant la souche la plus performante.

III.2.5. Mise en œuvre de la biodégradation :

Cette étape concerne la culture de la souche AH4 en présence de l'anthracène comme la seule source de carbone et d'énergie.

De la même façon que précédemment une préculture précède la culture bactérienne, où deux sources de carbone ont été utilisées : le glucose et l'anthracène. Les précultures sont alors incubées à 30 °C pendant 72 h à l'obscurité et sous une agitation de 150 rpm.

La biomasse de la préculture est ajoutée au milieu de culture pauvre contenant l'anthracène à une concentration de 0,05 mg/l, incubé à 30 °C à l'obscurité et sous une agitation continue de 150 rpm.

Des prélèvements de 15 ml des cultures sont prises chaque jour dans des conditions stériles, utilisés pour la mesure du pH et de l'absorbance afin de suivre la cinétique de la biodégradation, et pour qu'on peut calculer le taux de réduction du substrat (anthracène).

III.2.6. Mise en évidence des métabolites de la biodégradabilité de l'anthracène :

Les analyses par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) ont été faite uniquement pour les prélèvements d'une souche la plus performante. Afin de la mise en évidence des produits générés après dégradation

Les produits générés de dégradation formés dans le milieu sont détectés par CLHP que sont basées sur la séparation analytique des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Une colonne analytique a phase inverse de type RP-C18, de dimensions 4,6×125 mm et de porosité 5µm est utilisée. La solution à analyser dont le volume d'injection est fixée à 20 µl. L'éluant est constitué d'acétonitrile et de l'eau bi-distillée a 0,65/ 0,35 (V/V). Le débit d'éluant est fixé à 0,9 ml.min⁻¹. La détection des produits en sortie de colonne est réalisée à l'aide d'un détecteur UV-visible.

- Traitement de l'échantillon :

Des volumes de 15 ml des cultures des souches sont prélevés dans des conditions stériles à partir des cultures, puis filtré sous vide sur un filtre wattman de porosité (0,45 µm) pour une élimination complète de la biomasse.

Une extraction des HAP résiduels est effectuée par extraction liquide /liquide avec un solvant organique le hexane (50/50%, V/V), avec une agitation par vortex de 2 à 5 minute. On laisse reposer l'échantillon pendant 24 h, en suite la phase organique est récupérée puis analysée par chromatographie avec des conditions bien précises.

III.3. Biodégradation de l'anthracène par des souches immobilisées :

III.3.1. préparation des cellules immobilisées :

Le protocole utilisé dans cette partie est rapporté selon les étapes ci-dessous (figure7) [34] :

1. Stériliser tout le matériel.
2. Préparation de gel d'alginate de sodium 3% [34].
3. Préparation de la solution de CaCl₂ (0,2M) [30].
4. On rajoute 1ml de préculture qui contient 0,05 mg d'anthracène à l'alginate stérile avec agitation dans des conditions stériles.
5. Le mélange est extrudé goutte à goutte à travers une ampoule graduée stérile dans un erlenmyer contenant la solution de CaCl₂ (0,2M) stérile, l'agitation se fait au fur et à mesure (figure (b)).
6. La formation des billes se fait lors de contacte entre les gouttelettes du gel d'alginate de sodium et le CaCl₂ (figure (c)).

7. Les billes formées munies de la bactérie AH4 doivent être bien rincées plusieurs fois avec le NaCl (0,9) pour enlever l'excès des ions Ca^+ et les cellules non capturées (figure (d)).
8. Peser 4g des billes et les mettre dans les flacons contenant le milieu de dégradation qui est le l'eau distillée stérile avec l'anthracène (figure (f)).
9. Incuber à 30°C plus agitation.



Figure 7 : les étapes de la réalisation de la biodégradation immobilisée.

III.3.2 suivi de la dégradation :

Nous avons suivi la dégradation de l'anthracène par des cellules immobilisées en fonction de temps, en mesurant l'absorbance du milieu de culture (à 254 nm) chaque jour.

CHAPITRE IV :

RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Biodégradation de l'anthracène par des souches libres :

IV.1.1. Préadaptation des souches sur l'anthracène :

D'après les figures 8, 9 et 10, nous pouvons évaluer la croissance des *Streptomyces* (AB1, AH4 et AM2) sur deux milieux :

1. Premièrement :

Milieu ISP9 idéal riche en source du glucose : Après trois jours d'incubation à 30 °C, nous avons constaté une bonne croissance des souches sur le milieu ISP9 solide idéal dont les colonies ont une couleur blanche crème (figure 8).

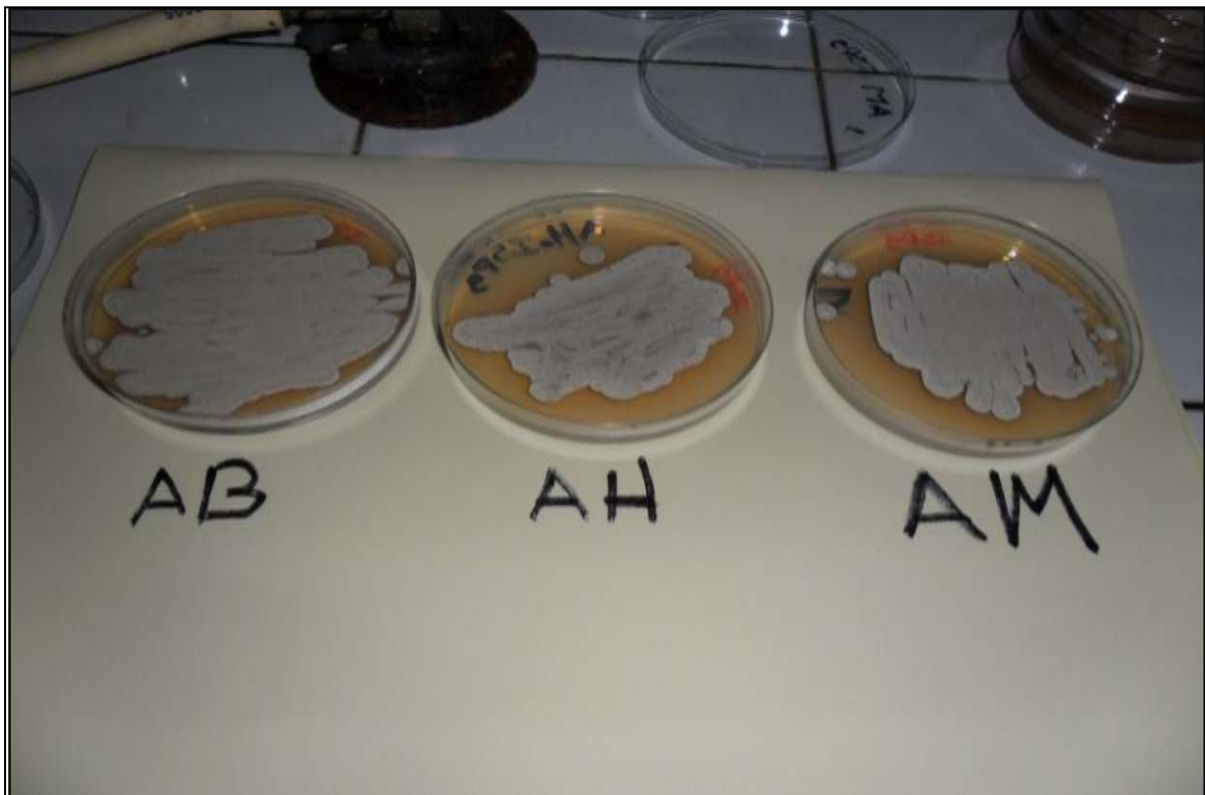


Figure 8 : la croissance des souches sur le milieu ISP9 solide idéal (riche en glucose)

2. Deuxièmement :

Le milieu pauvre en source du glucose additionné de 100 mg/l de l'anthracène comme seule source de carbone et d'énergie. Une faible croissance a été observée sur milieu ISP9 solide à base de l'anthracène (figure 9), nous avons constaté une zone d'inhibition de la croissance des souches AB1, AH4 et AM2

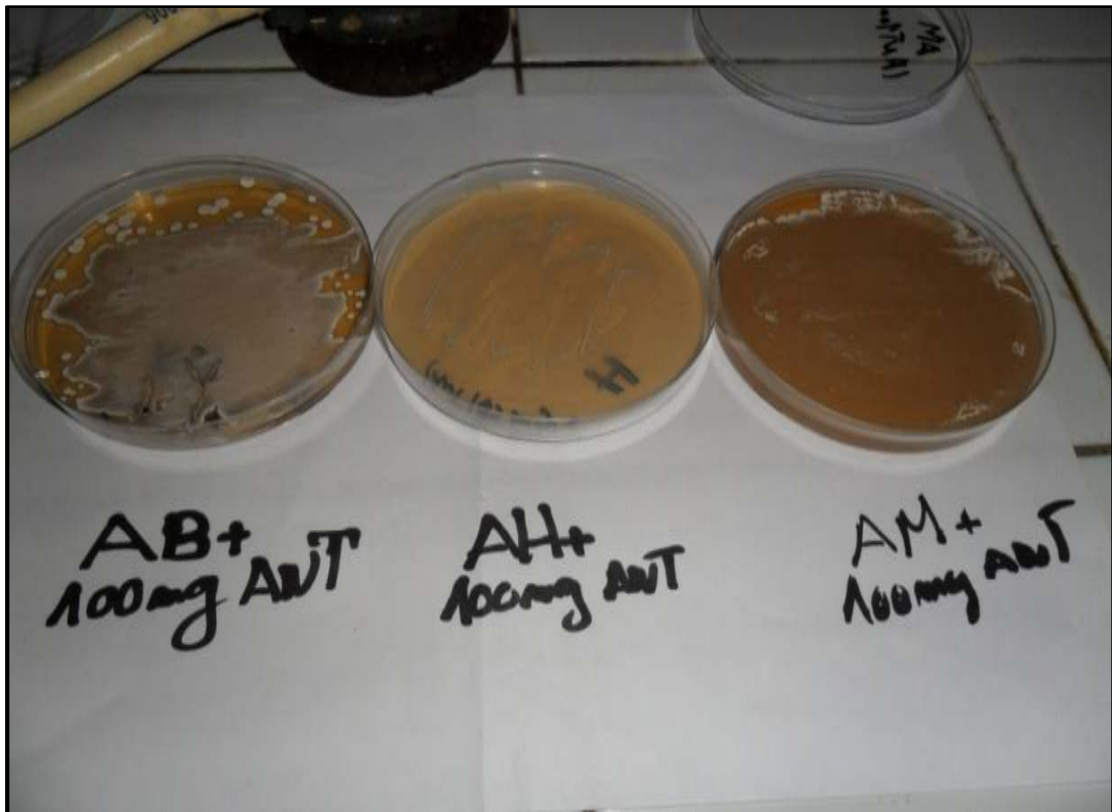


Figure 9 : la croissance des souches sur le milieu ISP9 solide à base de l'anthracène

La faible croissance sur milieu solide peut être due à l'hétérogénéité de la distribution de l'anthracène et des microorganismes dans le milieu qui constitue un frein pour la croissance car la distribution des polluants dans le milieu est un facteur limitant.

Si les polluants ne sont pas distribués de manière uniforme, certaines zones peuvent exhiber des concentrations trop élevées et inhibitrices et d'autres des concentrations trop faibles pour que les polluants soient biodisponibles et les cinétiques de biodégradation suffisantes [21]. Aussi peut être à cause de faible interaction car le contact polluant-organisme ou polluant-molécule biologique est impératif pour que la biotransformation ait lieu.

Par contre, la figure (10) montre la croissance des *Streptomyces* sur milieu liquide ISP9 à base de l'anthracène (1 g/l du glucose et 100 mg/l anthracène), on a obtenue une bonne croissance sous une agitation continue qui assure l'homogénéité et la distribution de l'anthracène et la souche dans le milieu, donc une forte interaction entre la source du carbone et les microorganismes [21].

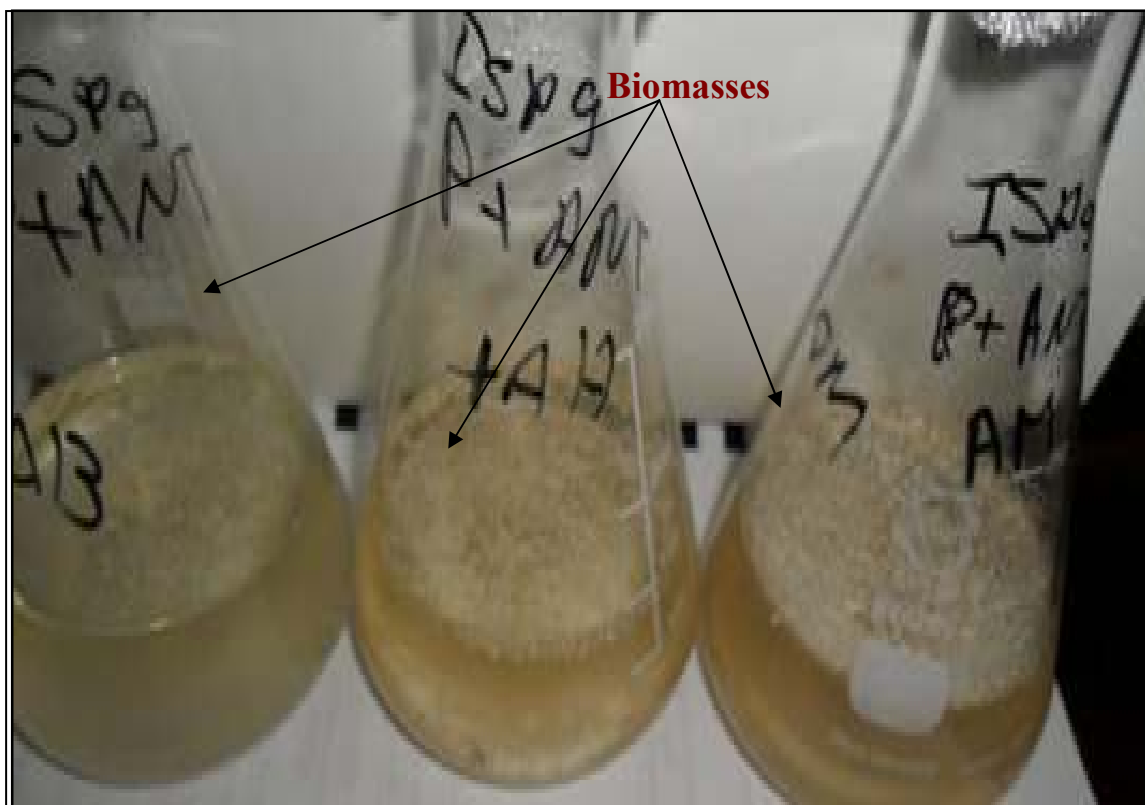


Figure 10 : La croissance des *Streptomyces* sur milieu liquide ISP9 à base de l'anthracène.

IV.1.2. Optimisation des paramètres de la biodégradation

Pour bien comprendre les effets des paramètres physiques sur le mécanisme de la biodégradation par les trois souches sélectionnées, nous avons enrichi notre travail par des variations de quelques paramètres qui sont élucidés dans des autres études précédentes tels que la température et la concentration d'HAP qui est un facteur limitant pour la croissance bactérienne. Durant tout le travail le pH du milieu de culture avant l'ensemencement est ajusté à 7,2.

IV.1.2.1. Influence de la température

Les résultats de l'influence de la température sur le comportement des souches et la capacité de la dégradation de l'anthracène sont représentés graphiquement sur la figure 11.

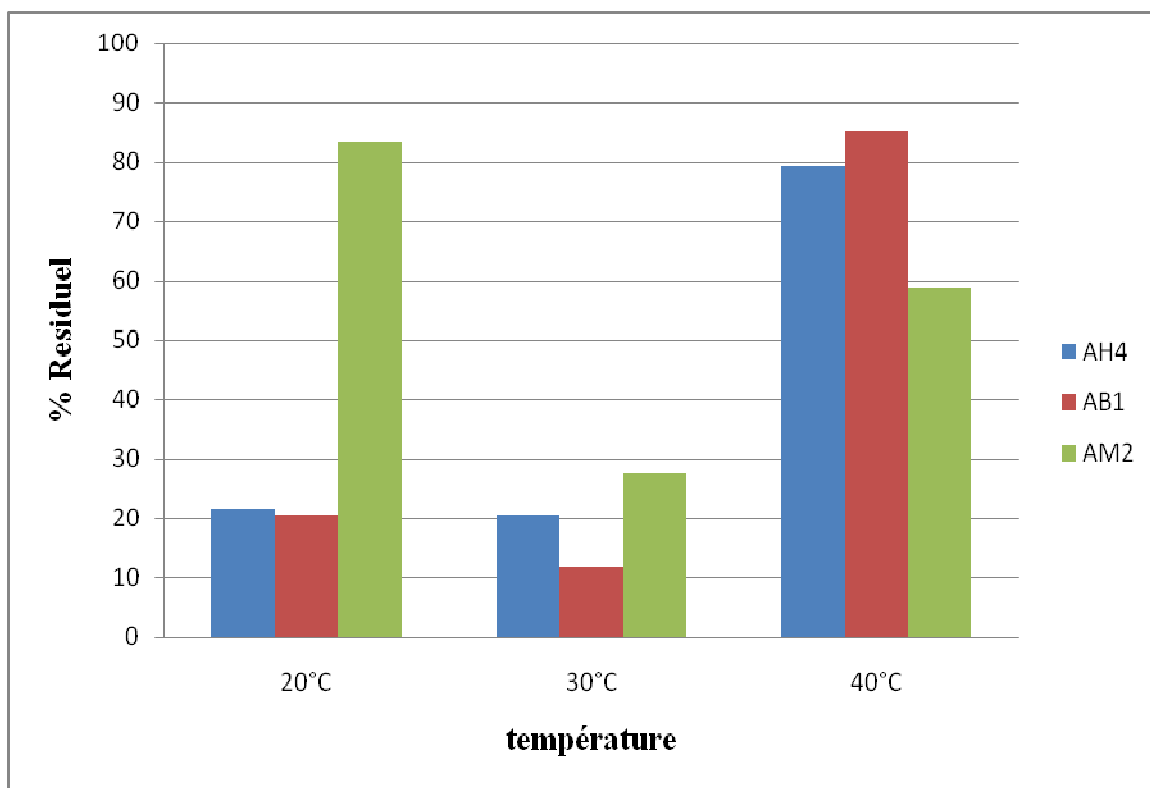


Figure 11: l'influence de la température sur la biodégradation de l'anthracène par des souches libre.

Après 8 jours d'incubation à des températures différentes il apparait que la température 30 °C est la plus favorable pour les trois souches AB1, AH4 et AM2 ou l'anthracène résiduel est 12, 20,5 et 27,5 % respectivement, et c'est presque les mêmes pourcentages pour les deux souches AB1 et AH4 à 20 °C, mais la quantité de l'anthracène restante par la souche AM2 et à la température 40 °C est très grande.

Donc, la température joue un rôle important voire majeur sur certaines propriétés des HAP comme leur solubilité et leur volatilité [21]. Elle influence la biodégradation par l'augmentation de l'activité microbienne et la solubilité de HAP et par conséquent la disponibilité biologique de HAP [35].

D'après Soltani [8], la diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de la biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. L'augmentation de la température permet en général une augmentation de la vitesse des réactions enzymatiques jusqu'à une température optimale. Plus la température augmente, plus la solubilité et la volatilité augmentent [8, 21,36].

Nos résultats sont en accord avec ceux signalés dans plusieurs travaux [8, 37,38], le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 20 et 40 °C. Au delà de la température optimale de croissance et de biodégradation on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique.

IV.1.2.2. Influence de la concentration du substrat et la sélection de la souche :

L'expérience a été faite pour les trois souches en variant la concentration de l'anthracène 0,0225, 0,05 et 0,5 mg/l sous l'effet des souches.

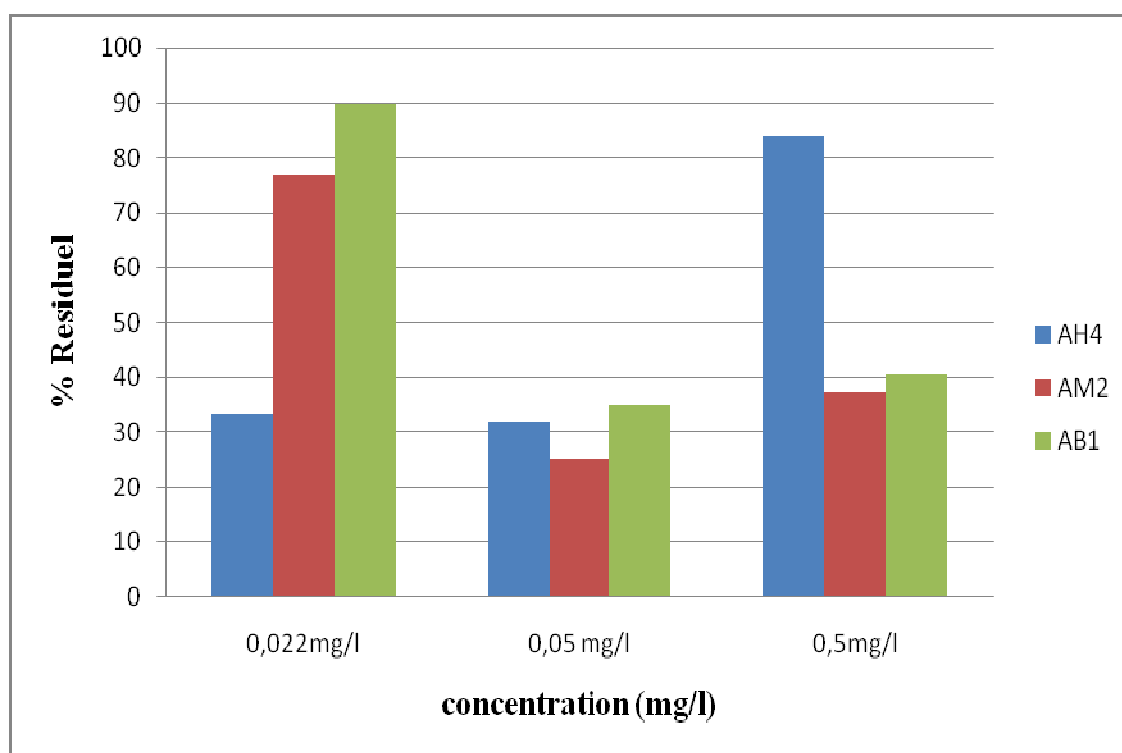


Figure 12 : Influence de la concentration de l'anthracène.

D'après la figure 12 qui représente l'effet de la concentration de l'anthracène et des souches au bout de 8^{ème} jour d'incubation.

Une bonne activité de la dégradation a été remarquée chez AH4 où l'anthracène résiduel estimé à 0,0225 mg/l et 0,05 mg/l atteint 33% et 32 % (au bout de 8 jours d'incubation) respectivement, et chez la souche AB1 qui est très important aussi à 0,05 mg/l et 0,5 mg/l (35% et 40% de l'anthracène résiduel, respectivement).

L'élimination de l'anthracène par la souche AM2 était importante arrivant autour de 25% et 37% dans les deux concentrations de l'anthracène 0,05 et 0,5 mg/l.

D'après ces résultats, nous avons conclus que :

1. Les trois souches peuvent dégrader le plus rapidement la concentration 0,05 mg/l et la quantité restante est inférieure à la moitié de la quantité initiale, donc l'anthracène disparaît plus rapidement pour la concentration de 0,05 mg/l qui représente la concentration de la solubilité, où la totalité du substrat est dissoute, donc la concentration est suffisante pour rendre le polluant disponible aux microorganismes, ceci permet une bonne élimination.
2. Par contre la concentration 0,0225 mg/l, c'est une concentration faible et peut être considérée insuffisante pour pouvoir être "transformée", la substance doit impérativement être accessible aux microorganismes.

Donc de faibles concentrations en polluants réduisent leur biodisponibilité d'où la vitesse de biodégradation baisse avec la concentration en polluants [21, 36, 38].

3. Pour la concentration 0,5 mg/l, nous observons que l'élimination de l'anthracène est bonne avec AM2 et AB1. Mais une faible dégradation chez la souche AH4, et cela peut être due à la concentration forte de l'anthracène qui peut engendrer des problèmes de toxicité, sachant que les composés xénobiotiques peuvent provoquer des ralentissements de croissance de la microflore voire une inhibition complète même à des concentrations relativement basses [21].

Le pourcentage et la rapidité de la réduction ainsi que l'origine de la souche ont permis sélectionner une souche performante qui dégrade efficacement l'anthracène. Donc, la souche AH4 a été sélectionnée pour la poursuite de l'étude qui porte sur le mode d'utilisation de l'anthracène (à 0,05 mg/l) comme étant une source de carbone.

IV.1.3. Mise en œuvre de la biodégradation :

Nous avons appliqué la biodégradation de l'anthracène dans les conditions optimales de température (30 °C) et de concentration (0,05 mg.l⁻¹) en utilisant la souche AH4, et nous avons suivi la cinétique de dégradation et le pH du milieu.

IV.1.3.1. Cinétique de la dégradation :

La cinétique de la dégradation de l'anthracène par la souche AH4 représente sur la figure 13 suivante :

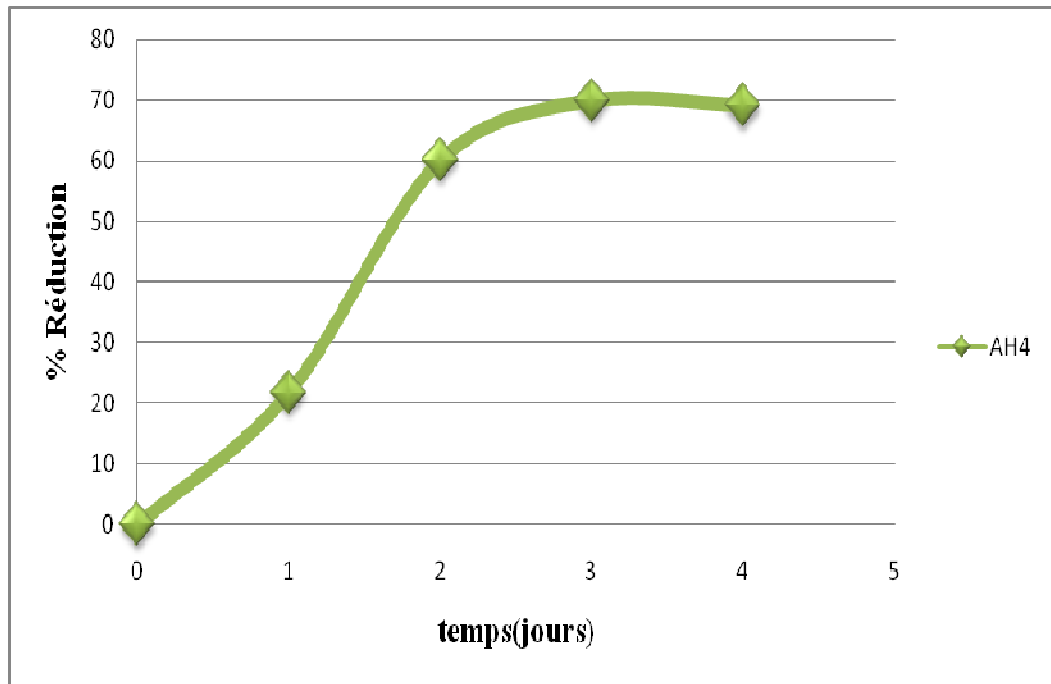


Figure 13 : La cinétique de la dégradation de l’anthracène (0,05mg/l) par la souche AH4 à 30 °C sous l’agitation (150 rpm)

La courbe de la cinétique de la biodégradation de l'anthracène montre une faible vitesse d'élimination de l'anthracène dans le premier jour d'incubation poursuit jusqu'au deuxième jour où nous avons estimé un bon démarrage de dégradation. Le pourcentage de réduction n'a pas dépassé le 20% au premier jour (phase de latence) et 60% au deuxième jour.

Par ailleurs, nous constatons une augmentation progressive à partir du troisième jour jusqu'à la fin de l'incubation, il atteint 70%. La souche a une forte activité, qu'elles alternent leur aptitude à la biodégradation de l'anthracène comme seule source de carbone et d'énergie.

Nous pouvons dire que la limite de la dégradation de l'anthracène par la souche AH4 est due au contact direct du substrat avec les cellules bactérienne peut causer dans un premier temps une diminution de l'activité bactérienne [20,28].

En raison de la toxicité de l'anthracène pour les microorganismes, et parce qu'il n'est pas le nutriment essentiel pour leur croissance, donc les microorganismes exigent une période de latence dans l'environnement contaminé par l'HAP [37].

IV.1.3.2. Variation du pH :

La figure 14 ci-dessous représente la variation du pH de milieu de dégradation de l'anthracène par la souche AH4.

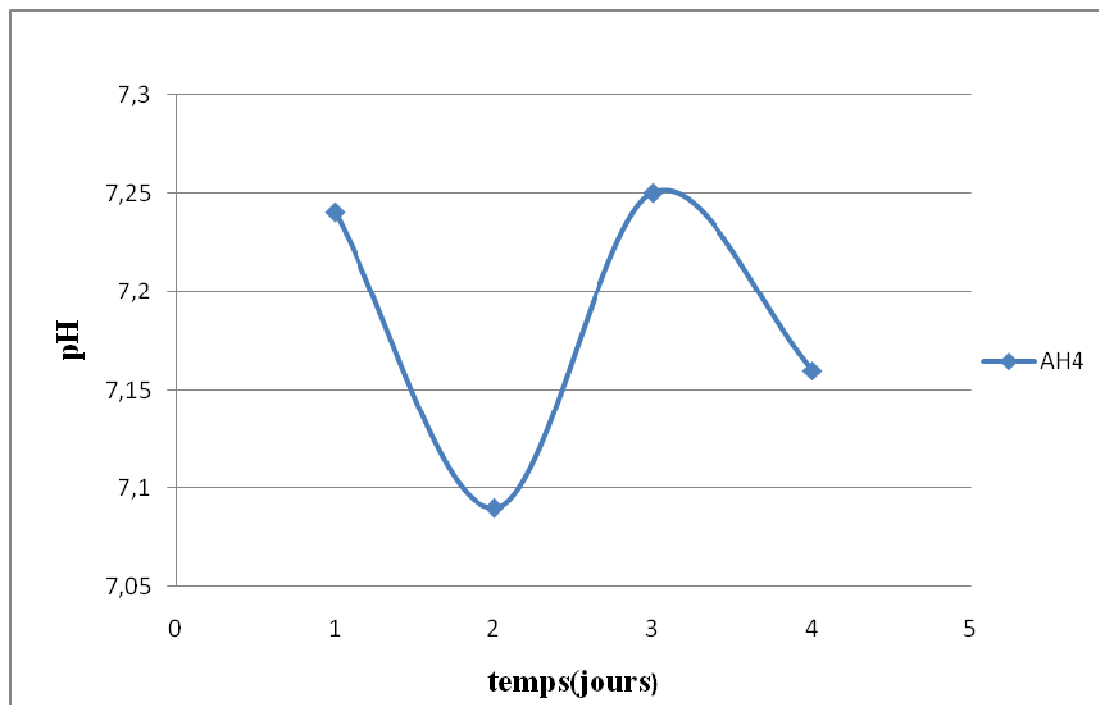


Figure 14: La variation du pH de milieu de culture de la souche AH4 à 0,005 mg/l d'anthracène et à 30 °C

D'après la figure 14, on observe que le changement de pH est dans la gamme de 7,09 à 7,25. Ce changement de pH peut être expliqué que la souche avait utilisé le substrat (anthracène) et avait rapporté quelques produits ayant un caractère alcalin [20,37].

Selon Ballerin cité dans le mémoire de Souad chibi [39], le pH du milieu peut affecter l'activité microbienne. La plupart des microorganismes sont capables de se développer dans un intervalle de pH allant de 5 à 9, avec un optimum se situant aux alentours de 7 [21].

Et d'après Dibble et Bartha [40] et Hambrick et al. [41] qui ont trouvé une dégradation plus élevée des HC dans des conditions légèrement basiques. En résumé, les valeurs de pH que nous avons relevé restent bien incluses dans cet intervalle donné.

Les *Streptomyces* possèdent de caractéristiques résistantes, elles peuvent survivre et croître sur pH neutre et peu alcalin [9,26].

IV.4. Génération des métabolites de dégradation :

La mise en évidence de produits générés lors de la dégradation de l'anthracène a été détectée par CLHP. Le milieu utilisé pour l'analyse était à la fin du quatrième jour d'incubation. Les spectres obtenus sont donnés dans les figures 15.

En comparant les spectres d'un échantillon de l'anthracène issu d'une culture témoin (non ensemencé) avec celle contenant l'anthracène en présence de la souche AH4. Nous pouvons obtenir une diminution importante de la concentration de l'anthracène et la formation des sous produits.

Au temps zéro, le temps de rétention a été 4,189 min pour l'échantillon qui contient que l'anthracène et le solvant (hexane : $t_R=1,118$) sans les souches, après 4 jour d'incubation à 30°C, on a remarqué que la surface de pic de l'anthracène est s'annulée, ce qui signifie que la concentration du l'anthracène dans le milieu de culture est devenue faible ou indétectable, avec l'apparition des nouveaux pics ($tr_1= 2,824$, $tr_2= 3,8$) qui représentent les sous produit de biodégradation.

Les deux analyses faites par UV-visible et HPLC ont révélé la diminution de la concentration de l'anthracène en présence de la souche bactérienne. La bonne croissance de la souche testée liée à la diminution de la concentration du l'anthracène a confirmé la dégradation de ce dernier.

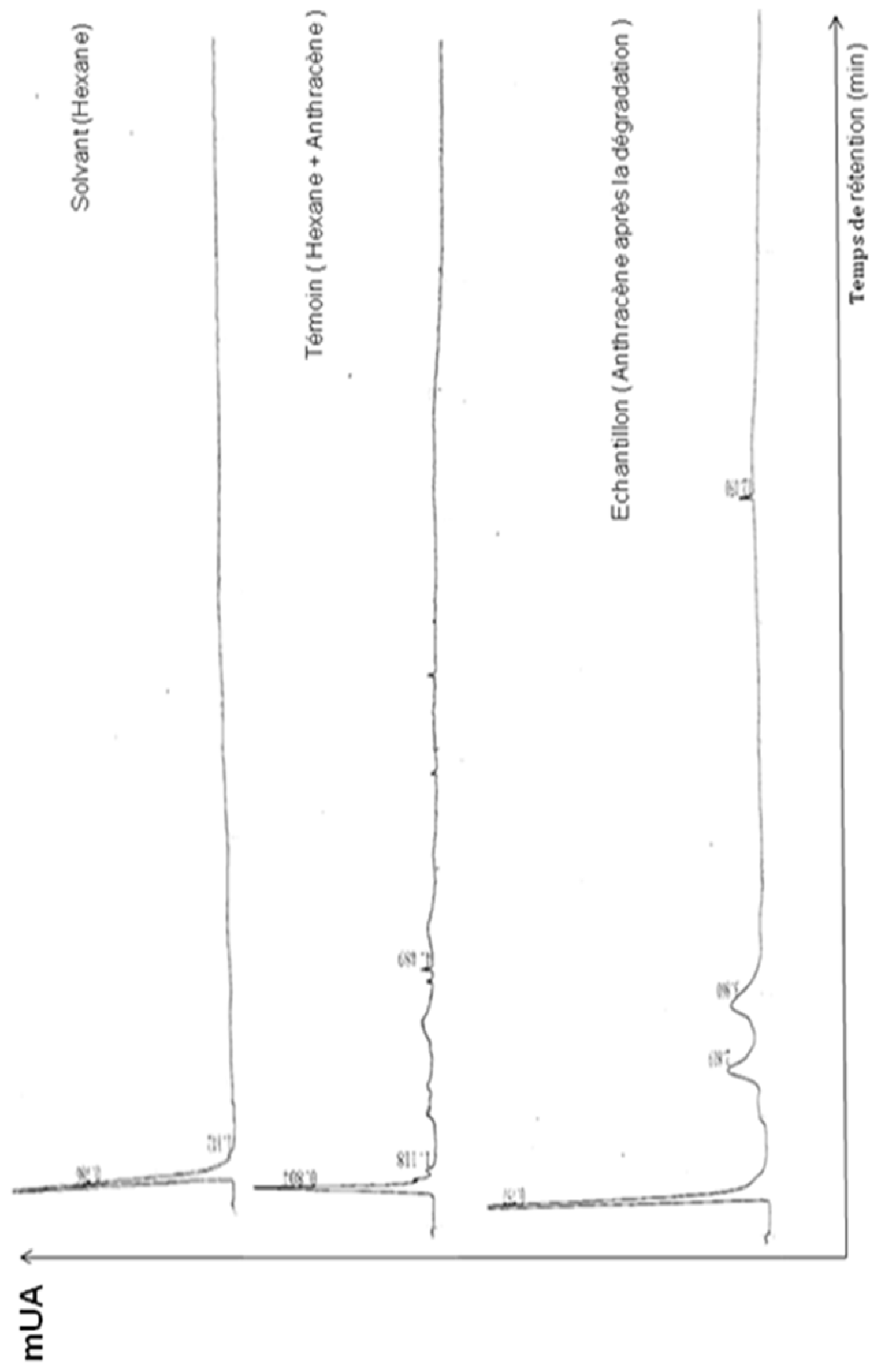


Figure 15 : chromatogramme obtenu par HPLC pour la souche AH4 à 30° C.

IV.2. Biodégradation par des cellules immobilisées :

IV.2.1. Cinétique de la biodégradation :

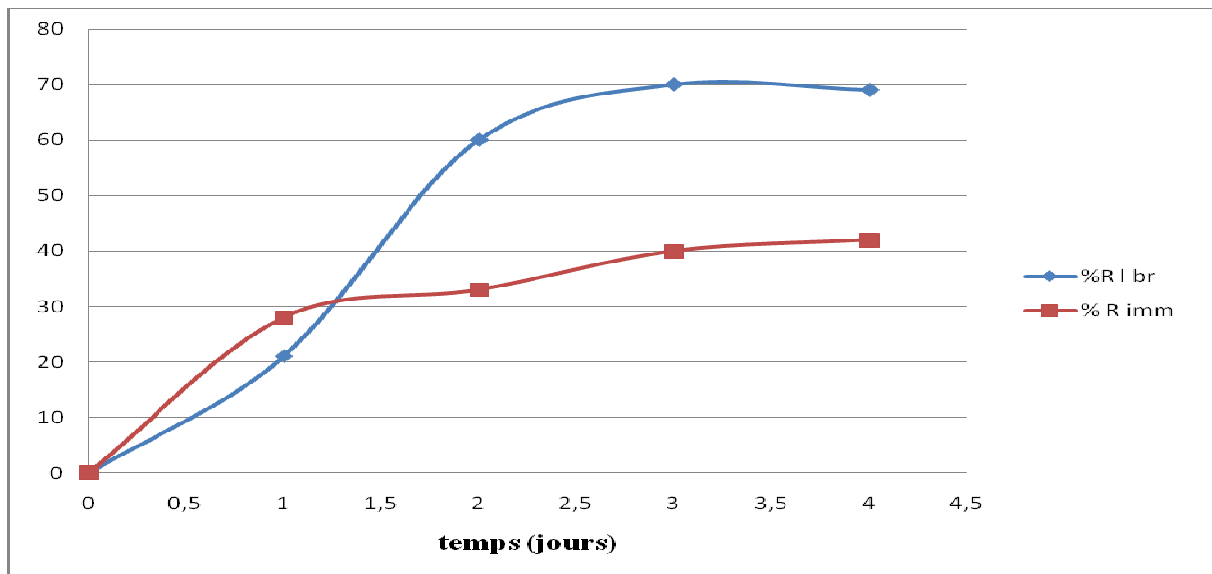


Figure 16 : La cinétique de la dégradation de l'anthracène (0.05mg/l) par la souche AH4 libre et immobilisée

En comparant les deux courbes (figure 16), nous pouvons dire que le phénomène de dégradation de l'anthracène par les cellules immobilisées est faible par rapport à celui des cellules libres. La souche AH4 à l'état libre est apte à dégrader l'anthracène jusqu'à 70% du substrat initial contrairement aux cellules immobilisées qui n'ont pas dépassé 42 % de réduction.

Une faible dégradation de l'anthracène par des cellules immobilisée peut être due :

- Les capsules d'alginate ne contiennent pas la même quantité des cellules, (cela veut dire, qu'il existe dans le milieu des capsules qui contiennent que d'alginate donc des billes désactivées et elle ne dégrade pas le substrat).
ou parce que la taille des billes n'est pas optimisée, car la taille des billes influence également l'activité de la biomasse immobilisée. Des billes d'un plus petit diamètre améliorent les transferts de masse d'où une plus grande biomasse et une plus forte productivité, tel qu'un diamètre compris entre 1 à 2 mm représentent un compromis sélectionné par plusieurs auteurs [29].
- Pendant l'expérience on a remarqué l'ouverture de quelques billes d'alginate, selon Arnaud et al[29,42] le relargage cellulaire des billes de gel s'effectue spontanément sous l'influence de la croissance bactérienne à la périphérie des billes et des forces de cisaillement dues à l'agitation mécanique en réduisant l'épaisseur de la couche périphérique du gel contenant la biomasse active, et aux collisions entre les billes.
- Tous les facteurs tels que le pH, la température, le milieu de culture susceptibles d'influencer la croissance des cellules agissent également de façon indirecte sur le

relargage cellulaire [29,42,43]. Pour les cellules libres, on a observé une bonne dégradation du l'antracène jusqu'à le 4^{ème} jour d'incubation, le contact direct entre les cellules bactériennes et le substrat favorise sa biodégradation (le substrat devient plus disponible) malgré qu'on a observé une période de latence et une biodégradation relativement faible, qui est causée par la diminution de l'activité bactérienne qui peut être due à la toxicité de l'antracène ainsi de ses métabolites [37].

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Dans le cadre de ce présent travail, nous avons essayé d'apporter notre contribution sur l'étude de la biodégradabilité des Hydrocarbures Polycyclique Aromatiques. Cette investigation correspond à un sujet relativement récent car peu d'informations sont disponibles dans la littérature à propos des microorganismes locaux d'intérêt industriel et environnemental, en particulier ce qui est en relation avec leurs activités vis-à-vis la dégradation des Hydrocarbures Poly Aromatiques.

Afin de mener à bien nos travaux, nous avons réalisé une étude préliminaire concernant d'une part, l'aptitude des souches de *Streptomyces* à dégrader l'anthracène, en étudiant l'influence de la température et de la concentration de l'anthracène sur la croissance microbienne.

Et d'autre part, nous avons mesuré la capacité de ces microorganismes à dégrader l'anthracène par des cellules libres et immobilisées sur l'alginate du sodium. L'ensemble des recherches entreprises nous a permis de conclure sur les quatre principaux points suivants :

- 1) Les cellules libres des *Streptomyces* ont montré une capacité importante de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques tels que l'anthracène.
- 2) L'étude de l'influence de température et de la concentration de l'anthracène a montré une influence notable sur la biodégradation avec des optimums à 30 °C pour la température, et la concentration du l'anthracène est de 0,05 mg/l, donc nous avons marqué un taux de biodégradation élevé (70%).
- 3) Le suivi de l'évolution du pH du milieu de culture au cours de la dégradation, montre que le milieu est légèrement basique. Ce résultat nous a permis de suggérer qu'il y a une production des sous produits ayant des caractères alcalins;
- 4) De plus les résultats de dégradation, par les cellules libres et immobilisées, montrent que l'anthracène est un polluant moyennement dégradé par les cellules immobilisées avec un taux de dégradation de 40% (pendant 4 jours d'incubation).

D'après ce résultat, on peut dire que les souches de *Streptomyces* ont la capacité de dégrader l'anthracène mais meilleure en présence des cellules libres;

Le travail présenté ici a évidemment une durée limitée et est loin de venir au bout des problèmes envisagés. Sa prolongation devrait nous semble t'il porter sur les points suivants :

- Avoir un taux de dégradation élevé par des cellules immobilisées en optimisant quelques paramètres (force d'agitation, pH, les diamètres des billes ...).
- L'optimisation des paramètres de traitement (l'ajout de surfactant, enrichissement par nutriments comme azote, phosphore....).
- Les modifications de la structure ainsi que la génération de métabolites devraient être approfondies par d'autres techniques analytiques (GC-MS, RMN), afin d'avoir une

idée sur les détails structuraux, les processus et les mécanismes de la biodégradation de l'anthracène.

- Etudier les mécanismes réactionnels de la biodégradation et déterminer les enzymes responsables de ce phénomène.
- Réfléchir sur les dispositifs d'application à grande échelle. Pour cela, la conception d'un procédé immobilisation serait bien adéquate.

Annexe et Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]: Denissenko M.F., Pao A., Tang M., Pfeifer G.P. «Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53». *Science*, **274**,(1996), pp 430-432 .
- [2]: Didier .G « étude approfondie de l'influence de la nature chimique fine des polluants hydrocarbures sur le calcul du risque sanitaire » thèse de fin d'étude, (2010), école des hautes études en santé publique (EHESP).
- [3]: Che O.J., Woojun P., William C. G., Eugene L.M. «*Polaromonas naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalene-contaminated sediment». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 54, (2004), pp 93–97.
- [4]: Shiaris M., « Seasonal Biotransformation of Naphthalene, Phenanthrene, and Benzo[a]pyrene in Surficial Estuarine Sediments» *applied and environmental microbiology*,55, (1989), pp 1391-1399.
- [5]: Zhang X.X., Cheng S.-P., ZHU C.J., SUN S.L. «Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors». *PEDOSPHERE*, 16(5): (2006); 555-565.
- [6]: Isis S. Silva, Matthew G., Lucia R. Durrant: «Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under micro aerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi», *International Biodeterioration & Biodegradation* 63,(2009), 224–229.
- [7]: Chen Lin, Li Gan, Zu-Liang Chen: « Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN) », *Journal of Hazardous Materials* 182, (2010), 771–777.
- [8]: Soltani M. « Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone », thèse de doctorat, (2004), université pierre & marie curie.
- [9]: Zermane F. «étude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques, et des composés organiques de synthèse », thèse magistère, (2008), Université Mentouri Constantine.
- [10]: Bordjiba O., Bekhouche F. , Hassaine A. , Djenidi R. «Impact de la Pollution Par Les Hydrocarbures Sur la Qualité des Eaux Usées Dans la Région de Skikda (Nord-Est Algérien) » *European Journal of Scientific Research* , Vol.26 No.1 (2009), pp.87-97.

[11]: Gourlay C. « Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : influence de la matière organiques naturelle anthropique », thèse de doctorat, (2004), école nationale du génie rural, des eaux et des forêts.

[12]: Arodí B.M. « Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage ozonation-digestion anaérobie », thèse de doctorat, (2005), Université MONTPELLIER II.

[13]: Olivier M. « Evaluation de l'exposition des organismes aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans le milieu marin par le dosage des métabolites de HAP » UNIVERSITE BORDEAUX I, 2004.

[14]: Stauffert M., Cravo-Laureau C., Jézéquel R., Goñi-Urriz M., Huang L., Cagnon C., Cuny P., Gilbert F., Militon C., Amouroux D., Mahdaoui F., Bouyssiére B., Stora G., Merlin F. X., Duran R., « Dégradation d'Hydrocarbures dans les Vasières (DHYVA) : Rôle des mécanismes bactériens et effet de la bioturbation dans la biodisponibilité des polluants organiques ».

[15]: Thomas S. poeton, H. David ,Stensel M and Stuart E. Strand « biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by marine bacteria: effect of solid phase on degradation kinetics» elsevier science, wat. res. vol. 33, No. 3, (1999) pp. 868±880.

[16]: Sylvain Kouny « Caracterisation d'arene dioxygénase impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez Mycobacterium SP.6PY1 », thèse de doctorat, (2005), Université Joseph Fourier – Grenoble I science et géographie.

[17]: Jong-Su S., Young-Soo K. and Qing X. Li «Bacterial Degradation of Aromatic Compounds» nt. J. Environ. Res . Public Health 6, (2009), pp 278- 309.

[18]: Brazillet C., Jérémie D., Guillaume P., « Caractérisation des déchets » rapport (2001), institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS).

[19]: Heidi J. Christopher « biodegradation of 2,4-dinitrotoluene in the waste streams of a munitions plant » these de master, (1998) université de verginia.

[20]: DJEFAL K. A. , « biodégradation des hydrocarbures aromatiques poly cyclique par des souches de rhodococcus libres et immobilisées », thèse de doctorat, (2008), université USTHB.

[21]: H. Benbeelkacem - V. Desjardin - G. Ducom- R. Gourdon, « Association de bioprocédés à d'autre procédés dans le traitement ex situ de déchets et sols pollués » rapport final, (2006), LAEPSI / INSA de LYON.

[22]: M. Marchand & R. Kantin « contaminants chimiques en milieu aquatiques », 2eme partie OCEANIS VOL 22-3 (1996).

[23]: A. Saada, C. Nowak et N. Coquereau « Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures » Rapport intermédiaire, Résultat de la phase1, rapport BRGM/RP, 53739-FR,107,(2005).

[24]: AMIR S., « Contribution à la valorisation de boues de stations d'épuration par compostage, devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost », thèse de doctorat,(2005), institut national polytechnique de Toulouse.

[25]: akmouci-toumi S., « contribution à l'étude des boues de forage : isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil » thèse de magister,(2009), université de Boumerdes.

[26]: Priyanka C., Richa S., Shashi B. S., Lata N., « Bioremediation of PAH by Streptomyces sp» Bull Environ Contam Toxicol 86, (2011), pp 268–271.

[27]: AI Haixin, ZHOU Jiti, LV H., WANG J., GUO J., LIU G., QU Y.« Location and PCR analysis of catabolic genes in a novel Streptomyces sp. DUT AHX capable of degrading nitrobenzene», Journal of Environmental Sciences 20,(2008), pp 865–870.

[28]: ARAB I., MESSAOUDI H., « contrôle de qualité de l'eau de mer de la baie de Bou-Ismaïl (W.Tipaza) et étude de la biodégradabilité d'un dérivé pétrolier (phénole) par des souches immobilisées », thèse d'ingénieur, (2010), université de Blida.

[29]: Franck Grattepanche « Etude d'un système de pré fermentation continu du lait par une culture mixte immobilisées fonctionnelle », thèse de doctorat,(2005), université Laval Quebec.

[30]: Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de LB. Rhamnosus RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum

[31] : cuisine innovation, science et technologie au service de la création culinaire.

[32]: A. Badis, F. Z. Ferradji, A. Boucherit, D. Fodil and H. Boutoumi « Characterization and biodegradation of soil humic acids and preliminary identification of decolorizing actinomycetes at Mitidja plain soils (Algeria) », African Journal of Microbiology Research Vol. 3(13), (2009), pp. 997-1007.

[33]: B. Jaouadi, Badis A., D. Fodil, FZ. Ferradji, H. Rekik, N. Zraï, S. Bejar, «Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from Streptomyces sp. strain AB1 with high stability in organic solvent», Bioresource Technology (2010).

[34]: M. Abou Seoud and R. Maachi, «Biodegradation of Naphthalene by Free and Alginate Entrapped *Pseudomonas* sp»

[35]: Rodrigo J.S. Jacques, Eder C. Santos, Fatima M. Bento, Maria C. R. Peralba, Pedro A. Selbach, Enilson L. S. Sa, Flavio A.O. Camaargo « anthracene biodegradation by *pseudomonas* isolated from petrochemical sludge landfarming site », *international biodeterioration & biodegradation* 56,(2005), pp 143 – 150.

[36]: F. Montondon; A. Picot, « connaissance générale sur la toxicochimie :application à une famille de polluant :hydrocarbure », *etude N 02-0125/1A*, 2005.

[37]: Jin-Shao Yea,b, Hua Yina,b, Jing Qianga, Hui Penga,b, Hua-Ming Qina,b, Na Zhanga,b, Bao-Yan Hea,b « Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus* 2011 » *Journal of Hazardous Materials* 185,(2011),pp 174-181.

[38]: M.-J. Jourdain, A.-M. Charissou « Etat des connaissances sur le devenir de polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitement identification des composés métabolites et des cinétiques», (2007), 148 p, n°05-0513/1A.

[39]: Souad chibi « etude de la biodegradation des composés aromatiques et cyclique par des souches bactériennes isolées à partir du sol contaminé par le pétrole brut de la région de HASSI MESSAOUD », *thèse de magister*(2010), université de Blida.

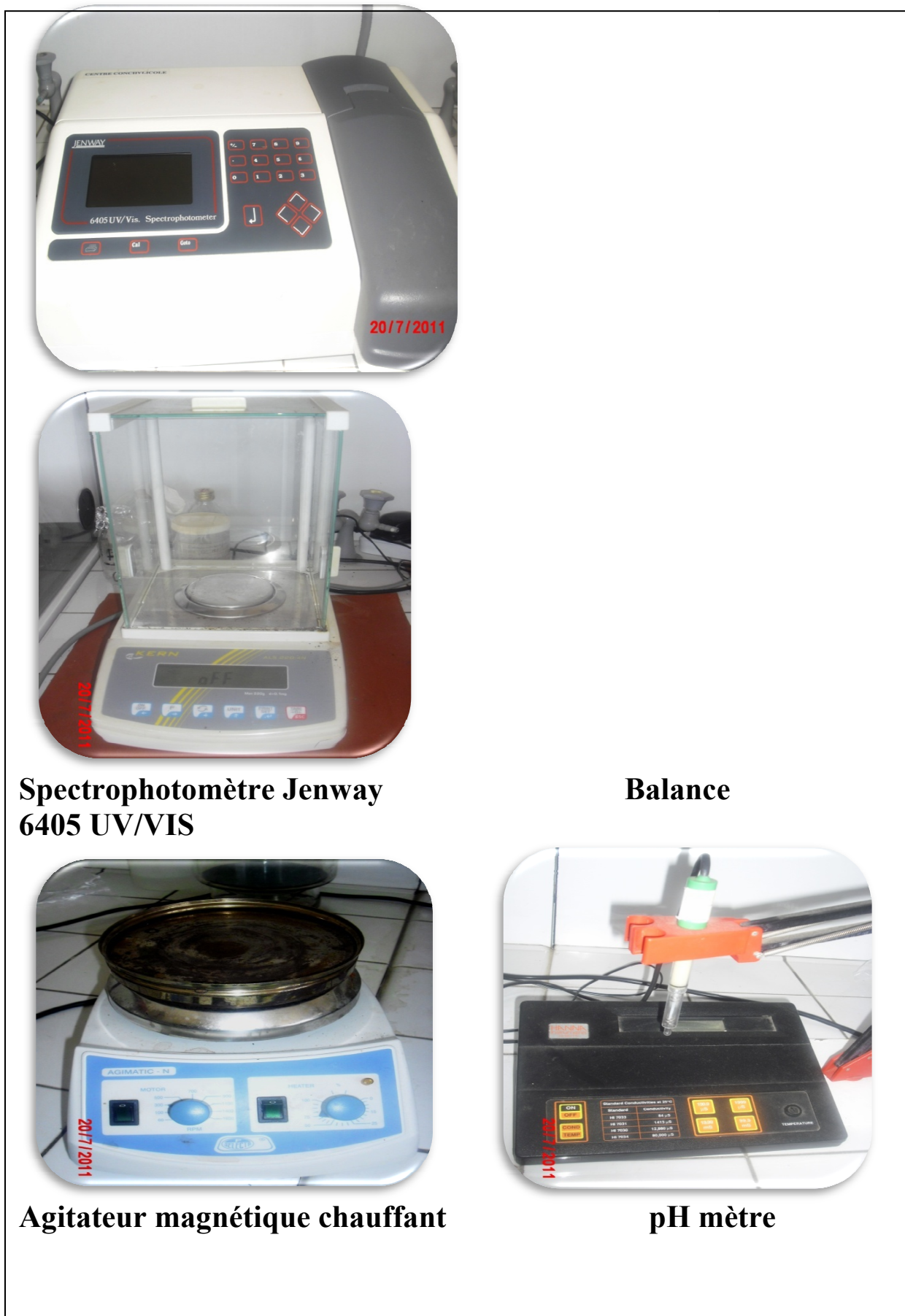
[40]: J. T. DIBBLE f AND R. BARTHA « Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge », *Applied and environmental microbiology*, Apr.(1979), pp729-739.

[41]: Hambric G.A, Delaune R.D. Patrick, W.H.Jr. «effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbons degradation», *Applied Environmental Microbiology* 40, (1980), pp 365-369 .

[42]: Doleyres, Yann « Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées », *thèse de doctorat*, (2003), Université Laval

[43]: Matthias KA Stner , Maren B. –J., B. Mahro « Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil», *Applied and environmental microbiology*, Vol. 64, No. 1, (1998), pp. 359–362.

Matériels utilisés





Agitateur vibrant (vortex)



bain marie agité

Tableau 4 : propriétés de l'anthracène

Propriétés chimiques	
<u>Formule brute</u>	$C_{14}H_{10}$ [Isomères]
<u>Masse molaire</u>	$178,2292 \pm 0,0119 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ C 94,34 %, H 5,66 %
<u>Susceptibilité magnétique</u>	$\chi_M 130,3 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$
Propriétés physiques	
<u>T° fusion</u>	217,5 °C
<u>T° ébullition</u>	340 °C
<u>Solubilité</u>	0,00013 g·l ⁻¹ (eau, 20 °C)
<u>Masse volumique</u>	1,24 g·cm ⁻³ (solide, 20 °C)
<u>T° d'auto-inflammation</u>	538 °C
<u>Point d'éclair</u>	121 °C
<u>Limites d'explosivité dans l'air</u>	0.6 - ? Vol. %
<u>Pression de vapeur saturante</u>	à 25 °C : 0,08 Pa