

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة سعد دحلب البليدة
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA



FACULTE DE TECHNOLOGIE
DEPARTEMENT DE CHIMIE INDUSTRIELLE

MEMOIRE DE MASTER

OPTION : PROCÉDES DE TRAITEMENT DES EFFLUENTS ET PROTECTION DE
L'ENVIRONNEMENT

**Étude de la biodégradabilité du xylène
par les Streptomycètes libres et
immobilisées**

PRESENTE PAR :

- *Melle. CHIKHI Sara*

PROMOTEUR :

- *Mr. BADIS ABDELMALEK* Professeur, USD-BLIDA

CO-PROMOTRICE :

- *Melle. FERADJI F/Z* Attachée de recherche, CNRDPA

2011-2012

REMERCIEMENT

En premier lieu, je remercierai Dieu « الله » pour sa clémence et qui m'a donné le courage, la volonté et la santé pour réaliser ce modeste travail.

C'est un plaisir autant qu'un devoir d'exprimer mes gratitudes à tous les personnes ayant contribué, chacun à sa manière, pour le bon déroulement de ma formation.

Mes vifs remerciements à mon promoteur Mr. BADIS Abdelmalek d'avoir accepté de m'encadrer pour la réalisation de ce projet et de proposer ce sujet d'une valeur scientifique.

Des remerciements infinis vont à Melle FERADJI Fatma-Zohra pour son aide, sa gentillesse et sa disponibilité.

Je témoigne ma gratitude à l'ensemble de l'équipe de laboratoire de CNRDPA et à leur tête Mr. Le directeur qui m'ont facilité la tâche expérimentale.

Sincères remerciements à Mr. LEZHARI pour son soutien et sa gentillesse.

J'exprime également mes chaleureux remerciements à tous mes enseignants de département de chimie industrielle.

DEDICACE

Tous en remerciant Dieu de m'avoir donné la santé et le courage de finir ce travail, je dédie le fruit de ce dernier à :

Mes très chères parents que dieu me les garde :

A la lumière de mon chemin MAMAN pour sa gentillesse son affection, sa douceur et surtout ces encouragements.

Mon cher PAPA pour son encouragement sa patience, son aide continuel sur le long chemin de mes études.

Mon cher petit frère ADEM.

Le bijou de ma vie mes grands parents que j'estime beaucoup et je leur souhaite longue vie pleine de bonheur et de santé.

A mes tantes : SAMIRA, BAYA, SOUAD et leurs maris et enfants.

A tous mes oncles : MUSTAPHA, NORDINE, ZOHIR, YUCEF YAHYIA, et leur femmes et enfants.

A tous mes cousins et cousines.

A toutes les familles CHIKHI et YACINI.

A mes chères amies et sœurs : NORA, RYM, HIBA, SOUMIA, SAMAH, SALMA, NABILA, et YASMINE.

L'enge de mes études MANEL et MERIEME.

Surtouts l'ensemble du groupe E4 pour leur aide, amitié et TWAYECHES

A tous ceux qui mon aidés à réaliser ce modeste travail.

A tous ceux qui mon enseigné de 1995 à 2012.

ملخص

هذه الدراسة تركز على الإزالة البيولوجية للـ xylène بواسطة التفكيك الحيوي باستعمال السلالة AB1 الحرة و مثبتة والتي عزلت من تربة سهل المتيجة. كما أظهرت دراسة حركية إزالة الكزيلين أحسن المعدلات في الوسط الحاوي على مصدر الكربون بنسبة 300mg.l^{-1} و 200mg.l^{-1} . النسبة المئوية للتحلل البيولوجي يتفاوت ما بين 80 إلى 99%. كما أظهرت أطياف الكروماتوغرافيا الغازية تغييرا في هيكل الكزيلين أثناء عملية التحضين مؤكدا بذلك نمط الهجوم الميكروبي وتوليد نواتج التحلل البيولوجي لتي تم الكشف عنها. بطريقة مماثلة أظهرت السلالة AB1 في شكلها المثبت ارتفاع معدل الإزالة (70, 90%) على التوالي في تغليف حبات الجينات الصوديوم أو عن طريق الحجز على دعم مسبق التشكيل ملوثة بالكزيلين

الكلمات المفتاحية : الكزيلين، التحليل البيولوجي، *Streptomyces*، التثبيت

Résumé

Cette présente étude est axée sur l'élimination du xylène par la biodégradation libre et immobilisée par la souche de *Streptomyces* AB1, isolée à partir du sol de la plaine de la Mitidja.

Le suivi de la cinétique d'élimination de xylène a révélé des meilleurs taux dans le milieu renfermant le xylène comme seule source de carbone [200mg.l^{-1} et 300mg.l^{-1}]. Le pourcentage de biodégradation varie entre 80 à 99%. Les spectres CPG ont révélé une modification de la structure du xylène pendant l'incubation témoignant ainsi le mode d'attaque microbien et la génération de métabolites de biodégradation qui ont été détecté.

D'une manière similaire la souche AB1 a montré des taux d'élimination élevés sous forme immobilisée (90%, 70%) respectivement soit encapsulée dans des billes d'alginate de sodium ou par attachement à un support préformé contaminé par le xylène.

Mots clés : Xylène, Biodégradation, *Streptomyces*, Immobilisation.

Abstract :

This present study focuses on the elimination of xylene by free and immobilized *Streptomyces* AB1 isolated from soil of Mitidja plain. The monitoring of the elimination kinetics of xylene showed the highest rates in the medium containing xylene as alone carbon source [300mg.l^{-1} and 200mg.l^{-1}].

The percentage of biodegradation varies between 80 to 99%. GC spectra showed a change in the structure of xylene during incubation thus testifying microbial attack mode and generation of biodegradation metabolites which were detected.

In a similar way the AB1 strain showed high removal rate in immobilized form (90%, 70%), respectively on encapsulated in sodium alginate beads or by attachment to a preformed support contaminated with xylene.

Keywords: Xylene, Biodegradation, *Streptomyces*, Immobilization.

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs₀ : Absorbance initiale.

Abs_t : Absorbance à temps t.

BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène.

CNRDPA : Centre National de Recherche et Développement de la Pêche et de l'Aquaculture.

COV : Composés Organiques Volatiles.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

D : Dégradation.

EMT : Eléments Métalliques Traces.

HA : Hydrocarbure Aromatique.

HMA : Hydrocarbures Monoaromatiques.

HC : hydrocarbure.

ISP9 : International Streptomycètes Project.

MM : Milieu minimum de dégradation.

m-xylène : méta xylène.

O-Xylène : Ortho xylène.

p-xylène : para xylène.

pH : Potentiel d'hydrogène.

%R : Pourcentage de réduction.

TB : Témoin biologique.

TC : Témoin chimique.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure et isomères du xylène.....	1
Figure 2 : schéma représentatif du devenir des hydrocarbures dans l'environnement.....	4
Figure 3 : Schéma de principe du traitement biologique d'effluents et mécanismes principaux d'élimination des substances prioritaires dans un réacteur biologique conventionnel.....	9
Figure 4 : Technique d'immobilisation des cellules bactériennes.....	13
Figure 5 : Présentation schématique de la dégradation aérobie du benzène.....	15
Figure 6 : Voie métabolique proposée par Gibson et al, pour l'oxydation de p-xylène par <i>P. putida</i> 39/D.....	16
Figure 7 : Voies métaboliques proposées par Davey et Gibson, pour l'oxydation de p- et m-xylène par <i>Pseudomonas Pxy</i>	17
Figure 8 : Étapes initiales proposées par Baggi <i>et al</i> pour le métabolisme de l'o-xylène par <i>P. stutzeri</i> . I, o-xylène.....	18
Figure 9 : (a) Thalle de la souche. (b) Observation microscopique à 100 fois. (c) <i>Streptomyces</i> dans l'atlas des actinomycètes 1997.....	21
Figure 10 : Etapes de préparation de l'inoculum bactérien.....	22
Figure 11 : Repiquage sur ISP9 idéal solide après 6 jours d'incubation.....	23
Figure 12 : Diagramme de complexations des ions de calcium sur l'alginate	27
Figure 13: Etapes de préparation des billes d'alginate, (A) : stérilisation du matériel, (B) : introduction goutte à goutte dans CaCl ₂ , (C) : formation de billes, (D) : filtration et lavage des billes.....	28
Figure 14 : Différents échantillons préparés.....	29
Figure 15 : Croissance bactérienne sur milieu d'ISP9 solide après 2 jours d'incubation.....	32
Figure 16: Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 6,2 et concentration initiale du xylène égale 100mg/l.....	33
Figure 17: Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 7,2 et concentration initiale du xylène égale 100mg/l	34

Figure 18 : Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 6,2 et concentration initiale du xylène égale 200mg/l.....	36
Figure 19 : Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 7,2 et concentration initiale du xylène égale 200mg/l.....	36
Figure 20 : Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 6,2 et concentration initiale du xylène égale 300mg/l.....	37
Figure 21 : Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 7,2 et concentration initiale du xylène égale 300mg/l.....	37
Figure 22 : l'Effet de la conentration du xyléne et du pH sur l'activité de dégradation de la souche AB1 pendant 3 jours d'incubation.....	39
Figure 23 : Cinétique de dégradation à 200 mg.l ⁻¹ du xylène par AB1.....	40
Figure 24 : Cinétique de dégradation à 300 mg.l ⁻¹ du xylène par AB1.....	40
Figure 25 : Chromatogrammes CPG issus de la biodégradation du xylène (200mg/l).....	42
Figure 26 : Chromatogrammes CPG issus de la biodégradation du xylène (300mg/l).	42
Figure 27 : Photo réelle de billes obtenues.....	43
Figure 28 : Photo prise sous microscope de bielles d'alginate avec la souche AB1.....	43
Figure 29 : Pourcentage de réduction sur billes d'alginate (dans milieu ISP9) 200mg/l de xylène.....	44
Figure 30 : Pourcentage de réduction sur billes d'alginate (dans milieu ISP9) 100 mg.l ⁻¹ de xylène.....	46
Figure 31 : Pourcentage de réduction sur billes d'alginate (dans l'eau) 100mg/l de xylène.....	46
Figure 32 : Etude comparatif de biodégradation du xylène par des souches libres et immobilisées.....	48
Figure 33 : Croissance bactérienne après 3 jours d'incubation, (A) : sur boites d'ISP9 ; (B) : sur boites de xylène.....	49
Figure 34 : Suivie par dénombrement de la croissance bactérienne sur boites de xylène.....	49

Figure 35 : Vue sous microscope optique du sol A : avant incubation, B : après incubation.....**50**

Figure 36 : Pourcentage de réduction du xylène dans différents échantillons : TB : Témoin Biologique ; TC : Témoin Chimique ; R : Pourcentage de réduction.....**50**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques du xylène.....	2
Tableau 2: les différents procédés applicable aux traitements des COV.....	Annexe II
Tableau 3: Avantages et inconvénients des cellules immobilisées.....	14
Tableau 4: Avantages et inconvénients des cellules libres.....	14
Tableau 5 : suivie des nouveaux pics apparus l'ord de l'incubation par CPG.....	41

TABLE DES MATIERES

PARTIE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : XYLENE

I.1. Caractéristique physicochimique.....	1
I.2. Comportement et devenir du xylène dans l'environnement.....	2
I.2.1. Dans l'atmosphère.....	2
I.2.2. Dans les eaux.....	3
I.2.3. Dans les sols.....	3
I.3. Sources des xylènes et leur utilisation.....	4
I.4. Toxicités des xylènes.....	5
I.4.1. Toxicités humaines.....	5
I.4.2. Toxicités fauniques et végétales.....	6

CHAPITRE II : BIODEGRADATION

II.1. Critères de choix d'un procédé.....	8
II.2. La biodégradation.....	9
II.3. Facteurs influençant la biodégradation.....	10
II.3.1. Conditions physico-chimiques.....	10
II.3.2. Conditions nutritives.....	11
II.4. Biodégradation par des cellules immobilisées.....	11
II.4.1. Techniques d'immobilisation cellulaire.....	11
II.5. Avantages et inconvénients des cellules libres et immobilisées.....	13
II.6. La biodégradation du xylène.....	15
II.6.1. Paramètres de dégradation du xylène.....	16

PARTIE II PARTIE EXPERIMENTALE

CHPAITRE III : MATERIELS ET METHODES

III.1.Méthodologie.....	20
III.2. Suivie de la biodégradabilité du xylène.....	22
III.2.1. Vérification de la tolérance des <i>Streptomycètes</i> et l'effet du xylène sur leur croissance.....	22
III.2.2. Optimisation de quelques paramètres de dégradation.....	23
III.3. Suivi de la cinétique d'utilisation du substrat.....	25
III.4. Immobilisation dans des matrices poreuses « billes d'alginate de sodium ».....	26
III.5. Immobilisation par l'attachement à un support « Application sur sol contaminé ».....	29

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Suivie de la biodégradabilité du xylène.....	32
IV.1.1. Vérification de la tolérance des <i>Streptomycètes</i> et l'effet du xylène sur leur croissance	32
IV.1. 2. Optimisation des conditions de dégradation (concentration du xylène et le pH)	33
IV.2. Suivi de la cinétique d'utilisation du substrat.....	39
IV.3. Immobilisation dans des matrices poreuses « billes d'alginate de sodium ».....	43
IV.4. Immobilisation par l'attachement à un support « Application sur sol contaminé »	49
CONCLUSION.....	53
GLOSSAIRE.....	55

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION GENERALE

L'environnement est constamment pollué par un large éventail de produits chimiques dangereux à différentes structures et à différents niveaux de toxicité, libérés principalement par les activités industrielles et de pratiques agricoles [1].

Le développement explosif de l'industrie a produit une grande variété de composés chimiques qui comprennent les pesticides, les carburants, les composés aromatiques, des colorants et d'autres produits signalés nocifs [2]. Bien que ces composés ont contribué à moderniser les modes de vie, plusieurs d'entre eux peuvent s'accumuler dans les sols, l'eau et l'air. Parmi ces composés, ceux résultant de la pétrochimie et de l'énergie appelés hydrocarbures aromatiques monocyclique tels que les xylènes, posent d'importants problèmes. En raison de leur faible solubilité dans l'eau, toxicité aiguë et la génotoxicité, les xylènes sont classés comme polluants prioritaires par l'Agence européenne pour l'environnement [3].

Un des grands défis actuels est de réduire les émissions organiques d'effluents industriels. La bioremédiation, technique qui utilise la capacité microbienne à dégrader des substances chimiques, relativement peu coûteuse et à faible niveau technologique, est devenue actuellement les procédés les plus recommandés contrairement à d'autres techniques qui exigeraient des coûts élevés et présentent des capacités de réduction limitées et le plus souvent conduisent à une pollution secondaire [4, 5].

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur la dégradation des Xylènes [6,7], par différentes souches microbiennes (*Alcaligenes xylooxidans*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus sp.* et d'autres espèces) [8, 9,10 et 11]. D'autre part, très peu d'études font part d'une biodégradation possible des xylènes par les Actinomycètes (groupe des Streptomycètes), malgré leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs, parmi lesquelles les peroxydases et les biosurfactants [12].

Ce travail de recherche s'intègre dans le cadre des activités de recherche du Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA). Il s'intéresse plus spécifiquement à la biodégradation des hydrocarbures cas du xylène par une souche de *Streptomycètes* isolée localement à partir du sol de surface de la Mitidja. Cette souche a montré une grande capacité de dégradation des HAP et surtout de produire des biosurfactants (travaux de thèse de doctorat en cours). Les deux volets expérimentaux

s'appuient sur les activités d'élimination du xylène en mode libre dans un milieu liquide contenant le substrat soluble, d'une part et, en mode immobilisé d'où le substrat est lié à un support de fixation afin d'investir dans les applications futures en biotraitement [13, 14].

La démarche scientifique adoptée pour la réalisation de ce projet s'articule sur deux grands volets :

- Une synthèse bibliographique porte sur l'état de l'art et les nouveautés concernant la biodégradation des HAM et très particulièrement d'actualiser les données théoriques sur les propriétés, l'introduction, la transformation, le devenir et la toxicité du xylène. Ainsi que, la biodégradation du xylène.
- Une partie expérimentale porte sur la biodégradation du xylène par les *Streptomycètes*, optimisation de quelques paramètres de contrôles tels que : le pH et la concentration du xylène comme seule source de carbone et d'énergie et la mise en évidence des produits générés lors de l'incubation. Parallèlement, une partie de l'étude a été consacrée à l'immobilisation des souches de *Streptomycètes* par deux techniques, encapsulation dans les billes d'alginate du sodium et l'attachement sur un support solide. Ceci a comme objectif de comparer la dégradation du xylène en mode libre et en mode fixé afin de trouver des applications de l'élimination du xylène en utilisant les biofilms.

Enfin, en guise de conclusion générale, nous synthétisons les principaux résultats obtenus, leur implication en termes de protection de l'environnement et nous ouvrirons les perspectives pour les recherches futures.

Chapitre I :

Xylène

XYLENE

Généralité :

Le xylène, encore appelé diméthylbenzène, peut exister sous différentes formes [15] :

1. Le « mixed-xylènes », composé du mélange d'isomères à 80-85 % et d'éthylbenzène à 15-20 % ;
2. Mélange d'isomères, composé des trois isomères du xylène : ortho-, méta- et paraxylène ;
3. On peut également trouver un produit de qualité semblable mais dont une grande partie de l'isomère ortho a été éliminé et qui est désigné en général « à faible teneur en ortho » ;
4. Les isomères du xylène sont aussi vendus séparément sous forme de produits de qualité diverse (recherche, pure, commerciale et technique).

I.1. Caractéristiques physicochimiques

Le xylène appartient à la famille des hydrocarbures monoaromatiques (HMA) dont ils ont certaines propriétés physiques semblables. Ils sont composés uniquement de carbone et d'hydrogène et renferment un noyau de benzène [16]. Tandis que le xylène contient deux groupes méthyles liés à un cycle benzénique ($C_6H_4(CH_3)_2$), selon la position des radicaux, trois isomères existent, à savoir : l'*ortho*- ou *o*-xylène (1,2-diméthylbenzène); le *méta*- ou *m*-xylène (1,3-diméthylbenzène) et le *para*- ou *p*-xylène (1,4-diméthylbenzène) (figure 1).

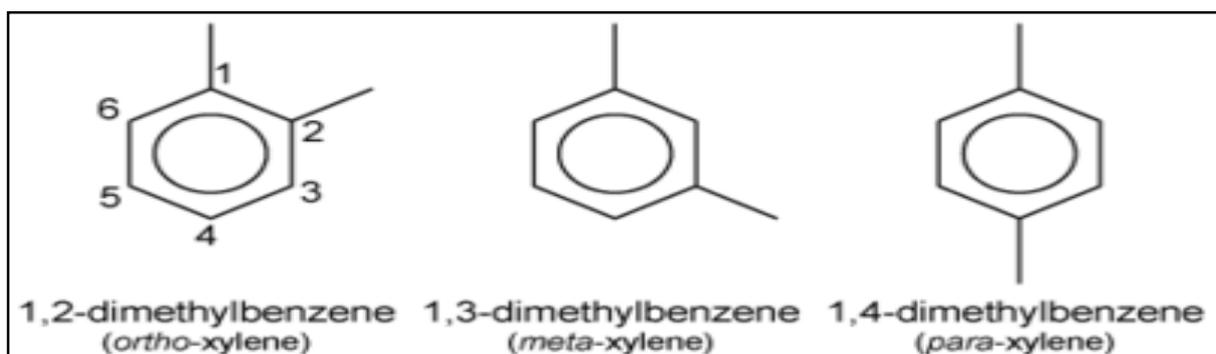


Figure 1: Structure et isomères du xylène [17].

Les HMA ont une faible solubilité dans l'eau et une grande solubilité dans les huiles et dans la plupart des solvants organiques [18]. Ils sont facilement accessibles aux microorganismes sous forme solubilisée [19].

Le tableau suivant résume tous les caractéristiques physico-chimiques des xylènes [20].

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des xylènes.

	Mixed-xylènes	o-xylène	p-xylène
État physique	Liquide		
Couleur	Incolore		
Odeur	Aromatique		
Seuil olfactif	-	5,4 ppm	0,7 ppm
Poids moléculaire	106 g/mol		
Point de fusion	< - 35°C	environ – 25 °C	environ 13 °C
T° d'ébullition initiale	> 139°C	> 144,4 °C	> 138 °C
T° d'ébullition finale	< 141°C	-	-
T° critique	350°C à 3 600 kPa	357,4°C à 3730 kPa	343,5°C à 3 510 kPa
Masse volumique à 15°C	860 à 880 kg/m ³	882 à 885 kg/m ³	860 à 880 kg/m ³
Solubilité dans l'eau à 20°C	175 à 200 mg/l	175 mg/l	200 mg/l
pH	Sans objet		
Viscosité à 20°C	< 0,9 mm ² /s	< 0,9 mm ² /s	< 0,62 mm ² /s

Le xylène technique est un mélange liquide des trois isomères, de composition voisine de méta- (60 %), ortho- (10-25 %) et para- (10-25 %) [17]. Il est volatil, incolore, transparent ainsi qu'il a une odeur aromatique marquée.

I.2. Comportement et devenir du xylène dans l'environnement

Il y a trois voies principales de transport du xylène dans l'environnement :

I.2.1. Dans l'atmosphère

D'une manière générale, la plus grande partie (99,68 %) des xylènes libérés dans l'environnement se retrouve dans l'atmosphère [21]. Une fois libérés dans l'atmosphère, les xylènes subissent assez rapidement une photo-oxydation par réaction avec les radicaux OH°

en présence de dioxyde d'azote pour donner des tolylaldéhydes, l'aldéhyde pyruvique, des méthylbenzylnitrates, des diméthylphénols et des nitroxylènes, eux-mêmes dégradés en d'autres composés [22]. On dit que, ensemble avec les NO_x (NO₂, NO₃) et les BTEX sont des précurseurs de l'ozone photochimique [23].

Selon divers calculs, la durée de vie des xylènes dans la troposphère varie de 0,5 à 1,5 jour [24]. En se basant sur des données de concentration de radicaux hydroxyles dans l'air, (Brice et Derwent) [25] ; qui ont calculé des demi-vies atmosphériques de 2,6 h, 1,5 h et 2,4 h respectivement pour les *o*, *m* et *p*-xylènes [21].

I.2.2. Dans les eaux

Les xylènes se volatilisent rapidement dans les eaux de surface [23]. Dans l'eau stagnante d'un mètre de profondeur, leur demi-vie est 5,6 h et serait plus courte dans les eaux agitées [27]. Les taux de volatilisation dans les lacs sont de huit jours, et de deux jours dans les rivières [23], et 36 minutes à 47 jours dans les ruisseaux, cours d'eau et les rivières [28], la variation des données s'expliquent par les différences dans les conditions telles que la profondeur et le débit.

Aucune donnée n'est disponible sur le devenir des xylènes sous la glace. De plus, après certaines études, l'*o*-xylène s'est avéré être moins biodégradable que le *m*-xylène ou le *p*-xylène [21].

I.2.3. Dans les sols

Le taux de volatilisation des xylènes incorporés au sol diminue rapidement en fonction de la profondeur du sol [22]. Ils se lient facilement à certains sols, ils se convertissent en dioxyde de carbone et en eau quand ils sont biodégradables par les microorganismes du sol [24].

Pour les trois isomères du xylène, leur demi-vie depuis la surface du sol est de moins d'une minute à 2,2 jours [27, 28]. Malgré leur solubilité modérée dans l'eau, les xylènes peuvent filtrer au travers des sols jusqu'aux eaux souterraines [22]. Leur déplacement serait ralenti par les matières organiques [29], l'argile [30] et une humidité élevée [31]. Toutefois, il semblerait que les xylènes traversent les sols argileux [32]. Selon des données limitées, les isomères ne subiraient pas d'hydrolyse, de photolyse ou d'oxydations marquées dans le sol [27].

I.3. Sources des xylènes et leur utilisation

La présence des xylènes dans l'environnement peut s'expliquer par des sources naturelles et anthropiques. Dans les sources naturelles, on peut inclure les émissions à la suite des feux de forêts et des éruptions volcaniques [21]. Les sources anthropiques d'émission sont d'origine pétrochimique ou pétrolière. Ils sont tous utilisés comme solvants et comme matières premières pour la synthèse de nombreux produits chimiques. C'est l'un des 30 composés chimiques les plus produits aux USA (environ 450 000 tonnes par an) [17].

L'exposition, essentiellement atmosphérique, résulte principalement du trafic automobile et des stations-services, raffineries et industries utilisant le xylène comme solvant ou comme intermédiaire chimique [22]. L'isomère méta et para du xylène représentent de 1,3 à 5,6 % des hydrocarbures rejetés dans les fumées d'échappement des moteurs à essence.

Les xylènes sont produits à partir de matières premières brutes issues du pétrole par reformage catalytique ou par craquage pyrolytiques [21]. Le xylène est un solvant utilisé dans la fabrication des peintures, vernis, colles, encres d'imprimerie, insecticides, matières colorantes, caoutchouc et produits pharmaceutiques [21, 24] et [33]. Il est aussi la matière première pour la fabrication de l'acide benzoïque.

Les pulvérisations agricoles (insecticides et herbicides), les aérosols domestiques (spécialement les peintures et anti-rouilles contenant du xylène), la combustion du bois et la fumée de tabac sont également à l'origine de la présence de xylène dans l'atmosphère interne [21].

Les xylènes se retrouvent dans l'eau à cause des rejets d'effluents industriels et urbains [22]. Les xylènes peuvent pénétrer dans le sol et dans l'eau *via* des déversements de pétrole et d'autres produits chimiques [24].

Les concentrations de xylènes les plus élevées dans les eaux souterraines ont été observées près de sites d'élimination, soit des sites de décharges ($< 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ à 123 mg.L^{-1} d'*o*-xylène et $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ à 191 mg.L^{-1} de *m*- et de *p*-xylènes confondus) [34] ; des anciens puits d'injection profond utilisés pour l'élimination de déchets industriels liquides (325 à 374 mg.L^{-1} de xylènes aux profondeurs de 61 à 192 m) [35] ; et un bassin d'élimination encore exploité pour éliminer des produits chimiques industriels (jusqu'à 1700 mg.L^{-1} d'*o*-xylène ainsi que $3\ 100 \text{ mg.L}^{-1}$ de *m*- et de *p*-xylènes) [24, 35].

I.4. Toxicités des xylènes

I.4.1. Toxicités humaines

La toxicité aiguë des xylènes est commune à celle de la plupart des hydrocarbures liquides. L'intoxication par ingestion entraîne des troubles digestifs (douleurs abdominales, nausées puis vomissements suivis de diarrhées), une dépression du système nerveux central (syndrome ébrié puis troubles de la conscience) et une pneumopathie d'inhalation [21].

Des céphalées et une asthénie apparaissent à des concentrations de l'ordre de 200 mg.m^{-3} , puis une sensation de vertiges et une confusion accompagnées de nausées suivent et, enfin, un coma survient lors d'exposition à de très fortes concentrations [21].

Selon certaines études, une irritation des voies respiratoires peut apparaître lors de l'exposition pendant 15 minutes à 100 mg.m^{-3} et une irritation oculaire modérée est observée à 200 mg.m^{-3} [21]. Les projections oculaires sont responsables d'irritation cornéo-conjonctivale dont la gravité dépend de la quantité et du temps de contact [21].

Des effets transitoires tels que le déséquilibre du corps au niveau musculaire et la baisse du temps de réaction commandé par le cerveau ont été observés chez des volontaires exposés à des concentrations de 200 mg.m^{-3} pour des durées d'expositions variables (de 20 min à 8 h) [21].

Les xylènes ont une action desséchante et dégraissante sur la peau en contact et sont responsables de dermatoses d'irritations chroniques (peau sèche et squameuse).

I.4.2. Toxicités fauniques et végétales

Des études sur des animaux ont montré que des concentrations de xylène élevées entraînent une augmentation du nombre d'animaux mort-nés, ainsi que des retards de croissance et de développement. Dans beaucoup de cas, ces mêmes concentrations ont également des effets négatifs sur la santé des mères. L'effet d'expositions de la mère à de faibles concentrations de xylène sur le fœtus n'est pas connu à l'heure actuelle [17].

Une étude des microbes dans le sol a montré que l'exposition aux xylènes n'avait pas d'effet toxique [16].

Le xylène est considéré comme une substance toxique, bioaccumulable et nocive pour l'environnement. La valeur limite de concentration dans des rejets ne doit pas dépasser $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ [20]. Étant des COV, leurs utilisations sont soumises à une directive qui vise à réduire les émissions de COV. La valeur limite de concentration ne doit pas dépasser les 150 mg.m^{-3} [36].

Chapitre II :
Biodégradation

LA BIODEGRADATION

Les caractéristiques du xylène et sa toxicité cités au « chapitre I » ont poussé les états à chercher individuellement et en commun à réduire ou enrayer toute pollution causée par cet élément.

Sous l'influence des différentes législations, des actions de réduction des effluents ont été menées par les industriels depuis plusieurs années. Elles auraient permis de réduire de 20 % des émissions industrielles entre 2000 et 2003 [20].

Les rejets gazeux représentent la très grande majorité des rejets de xylène. Il existe, pour traiter ces rejets différents procédés [37] (voir Tableau 2 **Annexe I**).

II.1. Critères de choix d'un procédé

Avant de s'attaquer à l'élimination des polluants un diagnostic complet est nécessaire [36] : type de polluant, débit, concentration, température ..., l'ensemble de ces paramètres entrera dans le choix de la solution à savoir le degré de protection de l'environnement visé, le coût d'investissement et d'exploitation.

A ce propos il ne faut pas oublier que dans le choix d'un système de traitement, il faut s'appliquer à protéger l'environnement dans son ensemble (air, eau, sol). Il faut par ailleurs éviter les transferts de pollutions et le déplacement des problèmes.

Dison d'emblée que la technologie du traitement des pollutions est en mesure de satisfaire toutes les normes de qualité ou de stabiliser la situation actuelle. En fait techniquement tout est possible à condition d'y mettre le prix [36].

La lutte contre la pollution n'est donc pas seulement un combat pour la qualité de la vie mais un investissement économique rentable pour la collectivité, si l'on veut conserver la même qualité de l'environnement.

Donc la biodégradation présente alors d'avantage une meilleure méthode de dépollution par des coûts faibles voir négligeable, de plus qu'elle permet d'éviter tout transfert de pollution. Les scientifiques du domaine cherchent à renforcer cette méthode en optimisant l'ensemble des paramètres influassent.

II.2. La biodégradation

La performance des méthodes biologiques pour le traitement d'une grande variété de composés organiques et inorganiques est prouvée depuis déjà plusieurs années. Leur développement et leur utilisation à l'échelle industrielle croît de façon exponentielle [38].

Comparées aux technologies physico-chimiques, où le contaminant est quelques fois tout simplement transféré d'une phase à l'autre, les technologies de biotraitement présentent la possibilité de dégrader complètement les contaminants en produits inoffensifs ou moins polluants. De plus, les coûts d'opération du traitement biologique sont généralement bas comparés à ceux des processus physiques et chimiques [39]. (Figure 3)

L'organisation internationale des normes définit la biodégradation comme : « La dégradation résultant de l'action de l'origine naturelle des microorganismes comme les bactéries, les champignons et les algues » [40].

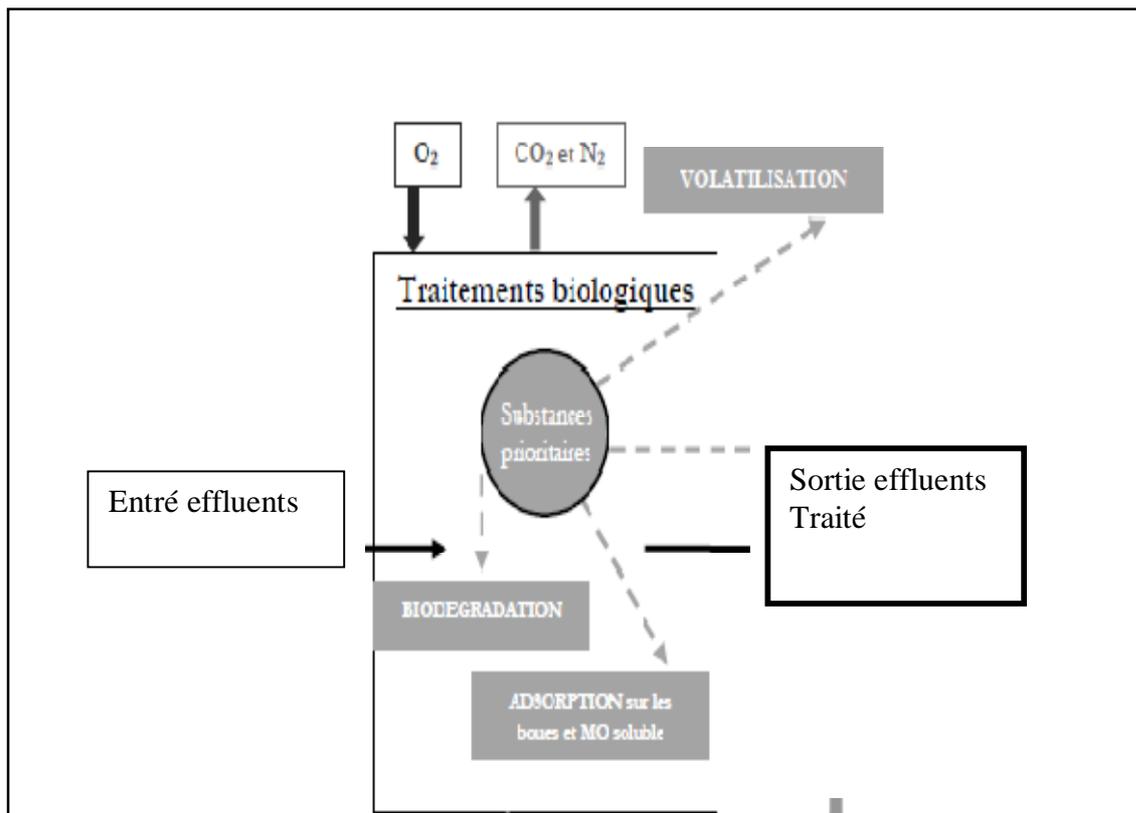


Figure 2 : Schéma de principe du traitement biologique d'effluents et mécanismes principaux d'élimination des substances prioritaires dans un réacteur biologique conventionnel [39].

II .3. Facteurs influençant la biodégradation

Sachant que la biodégradation est présente seulement si la faune microbienne développe alors et comme tout organisme vivant le développement microbien obéit à quelques conditions.

II.3.1. Conditions physico-chimiques

Outre les exigences nutritives, le développement microbien dépend de conditions physico-chimiques, certaines conditions sont obligatoires au développement et la survie des cellules et d'autres sont facultatives [41].

II.3.1.1. pH

Il a un grand incidence sur l'équilibre ionique du milieu donc la perméabilité cellulaire et disponibilité des substrats, il agit encore sur l'activité enzymatique extracellulaire [41].

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 HAM en solutions aqueuses [42].

II.3.1.2. Température

La croissance peut être assimilée à une réaction complexe suivant la loi d'Arrhénius [41] :

$$\ln\mu = \frac{-\Delta H}{RT} \text{ ou encore } \log\mu = \frac{-\Delta H}{2,3 RT}$$

Avec:

ΔH : est l'énergie d'activation de la croissance (variation d'enthalpie);

R: constante des gaz parfaits;

T: température absolue en °K.

Selon S.Amir [43], la température est un facteur important dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques.

II.3.1.3. Action de l'oxygène

L'oxygène présent se limite à la quantité dissoute et qui est faible et rapidement consommée [41]. L'aérobiose est très importante dans l'oxydation des HA et qu'un déficit en oxygène diminuait le taux de biodégradation [43].

II.3.2. Conditions nutritives

Les éléments nécessaires à la croissance sont : le carbone (C), oxygène (O), hydrogène (H), azote (N), en quantité importante. Phosphore (P), Soufre (S), en quantité plus faible et en fin des oligo-éléments en quantités très faibles (Ca, K, Mg, Mn, Fe.....) [41]. Un milieu riche dans lequel des métabolites directement utilisables pour l'anabolisme sont présents et assimilables donnera une croissance plus rapide.

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 HA et il semblerait que l'azote et le phosphore sont des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans le sol selon Mohn Stewart, Walworth *et al.* [42].

I.4. Biodégradation par des cellules immobilisées

L'immobilisation cellulaire consiste à retenir et localiser des cellules microbiennes dans un espace précis du système de fermentation afin d'obtenir de hautes densités de biomasse active [44].

Contrairement aux cellules 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 [45].

II.4.1. Techniques d'immobilisation cellulaire

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

II.4.2.1. Immobilisation dans des réacteurs à membrane

La technologie des réacteurs à membrane consiste à coupler un fermenteur à une unité d'ultrafiltration ou de microfiltration. Les cellules ne sont alors pas immobilisées dans une matrice mais retenues dans le système de fermentation permettant la diffusion de composés solubles de petite taille, selon la porosité de la membrane choisie. Le renouvellement continu du milieu de culture fermenté par addition de milieu frais dans le système permet de diminuer l'inhibition par les produits du métabolisme bactérien [46].

II.4.2.2. L'attachement ou l'adsorption à un support préformé

L'immobilisation cellulaire par adsorption à une matrice préformée ou support solide est basée sur l'affinité des cellules pour certaines surfaces. Cette technique imite l'environnement naturel des bactéries presque toujours associées à des surfaces et se développant en biofilms [47]. L'adsorption est obtenue par la mise en contact du support et des cellules actives pendant une période définie dans le bioréacteur. Un choix judicieux de support inerte ne nécessitant pas d'agent chimique pour l'adsorption permet une immobilisation dans des conditions douces résultant en une viabilité élevée des cellules immobilisées [48].

II.4.2.3. Immobilisation dans des matrices poreuses

Le procédé d'immobilisation cellulaire le plus répandu consiste à inclure une culture bactérienne dans une matrice poreuse par la gélification d'une solution de polymère (κ -carraghénane, gomme de gellan, agarose, gélatine, alginate, chitosane). Comme les matrices d'immobilisation résultent en des limitations de transfert de masse, les billes de gel sont en général préférées aux films grâce à leur géométrie sphérique augmentant la surface [49].

Les billes de gel sont produites en utilisant des méthodes d'extrusion ou d'émulsification suivies d'une étape de durcissement par abaissement de température ou l'ajout d'un agent gélifiant. Dans le cas de la méthode par extrusion, la solution liquide de polymère/culture bactérienne est extrudée par une seringue engendrant des gouttes sphériques qui tombent dans une solution de durcissement. La technique par émulsion fait par contre intervenir la dispersion de cette phase aqueuse de cellules/polymère dans une phase

organique, résultant en une émulsion eau dans huile. Les gouttes aqueuses dispersées sont par la suite durcies par abaissement de température ou par l'ajout d'un agent gélifiant [48] (figure 4).

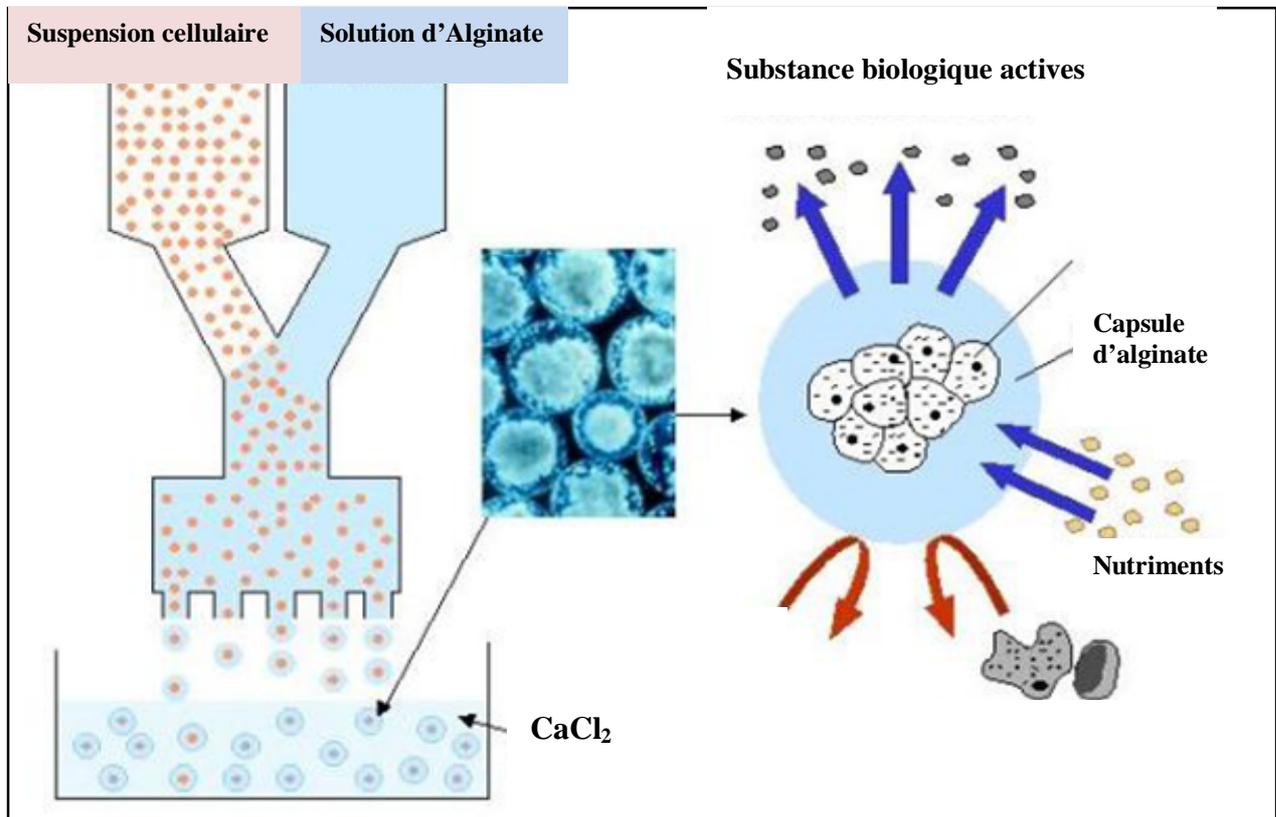


Figure 3 : Technique d'immobilisation des cellules bactériennes [48].

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 [45].

II.5. Avantages et inconvénients des cellules libres et immobilisées

Cette technologie, comparativement aux systèmes à cellules libres, permet d'augmenter la productivité grâce aux opérations en continu, à la haute densité cellulaire maintenue dans les réacteurs et à la réutilisation des biocatalyseurs [46]. De plus,

l'immobilisation cellulaire limite les risques de contamination et augmente la stabilité plasmidique [50].

En générale l'ensemble des avantages et inconvénients des cellules libres et immobilisées sont résumés dans les tableaux 3 et 4 [45, 48].

Tableau 3: Avantages et inconvénients des cellules immobilisées.

Cellules immobilisées	
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • 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 • Protection contre certains effets inhibiteurs 	<ul style="list-style-type: none"> • 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

Tableau 4: Avantages et inconvénients des cellules libres.

Cellules libres	
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Forte prolifération cellulaire. • Contacte direct avec le polluant. 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition par le substrat et la toxicité pour les microorganismes par des contraintes diffusionnelles. • Pas de protection cellulaire contre des conditions environnementales défavorables. • Cout élevé d'application. • Nécessite de suivi des paramètres environnementaux.

II.6. La biodégradation du xylène

Malgré leur solubilité modérée dans l'eau, les xylènes peuvent filtrer au travers des sols. Les microorganismes du sol, des eaux souterraines, des eaux de surface et des sédiments biodégradent les xylènes en conditions aérobies et anaérobies [51], en étant la seule source de carbone et d'énergie pour des cultures bactériennes mixtes [52].

Attaway et Schmidt [53], montrent l'efficacité de dégradation de tous les BTEX par une co-culture de deux souches de *Pseudomonas putida*. L'une dégrade préférentiellement le benzène, le toluène et l'éthylbenzène et l'autre utilise le p-xylène, l'o-xylène mais aussi le toluène comme substrat pour sa croissance. Ces auteurs suggèrent donc que la dégradation des BTEX est améliorée par des cultures bactériennes mixtes.

Des travaux réalisés par Prenafeta *et al.* [54], sur la dégradation des BTEX par un champignon (*Cladophialophora* sp., souche T1) montrent l'aptitude de cet organisme, tout comme celle des bactéries, à dégrader ces molécules, par assimilation et cométabolisme. Le toluène et l'éthylbenzène servent comme source de carbone et d'énergie alors que le xylène est cométabolisé [55].

Les microorganismes réussissent à dégrader les xylènes par oxydation du noyau aromatique et des groupements méthyle et donnent ainsi des produits tels que les diméthylphénols, l'acide méthylsalicilique, les acides toluïques et, quand le noyau aromatique est rompu, des méthylcatéchols [54].

La figure 5 présente les mécanismes de dégradation du Benzène comme exemple d'oxydation du noyau aromatique :

- ✓ Dihydroxylation du cycle aromatique ;
- ✓ Clivage du cycle aromatique dihydroxyle par une oxygénase avant d'être assimilé sous forme de pyruvate et d'acétaldéhyde ou sous la forme de succinate.

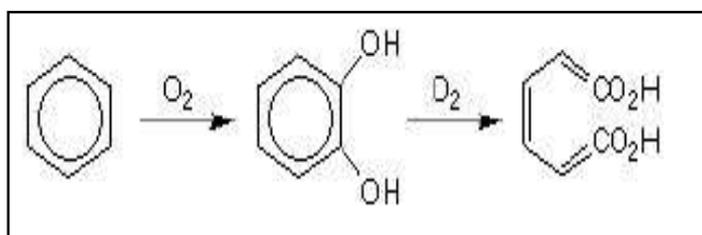


Figure 4 : Présentation schématique de la dégradation aérobie du benzène.

II.6.1. Paramètres de dégradation du xylène

Dans cette section, seules les voies métaboliques pour l'oxydation des 3 isomères du xylène seront décrites.

II.6.1.1. Para- et Méta-xylène

L'oxydation microbienne du xylène débute par le groupement méthyle ou l'anneau aromatique dépendamment de l'organisme employé. D'après Davey et Gibson [56], les réactions initiales du catabolisme de p- et m-xylène par *Pseudomonas Pxy* sont représentées par des oxydations successives d'un groupe méthyle pour former un acide toluïque (**Figure 7**). Par la suite, l'acide toluïque est rapidement oxydé en méthylcatéchole qui serait un substrat pour la fission enzymatique du noyau aromatique. D'autre part, Gibson *et al.* [57], ont proposé une oxydation directe de l'anneau aromatique de p- et m-xylène par *Pseudomonas putida* 39/D à travers leurs intermédiaires *cis*-dihydrodiols (**Figure 6**).

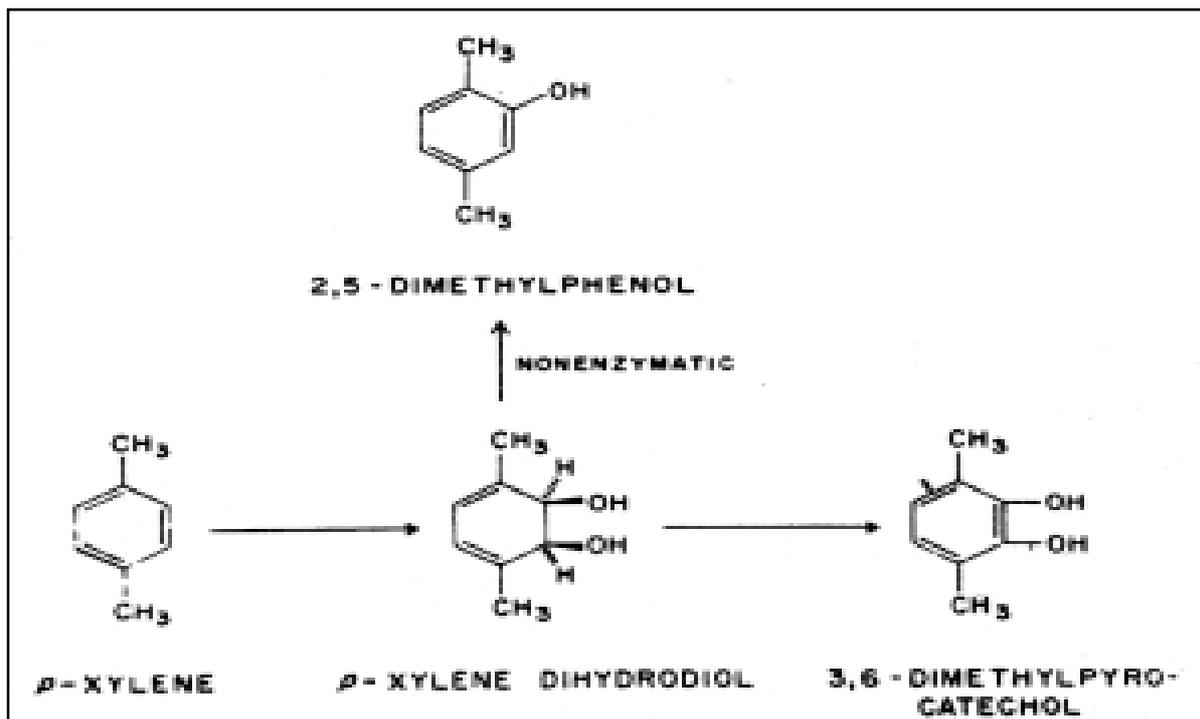


Figure 5 : Voie métabolique proposée par Gibson *et al.*, pour l'oxydation de p-xylène par *P. putida* 39/D [43].

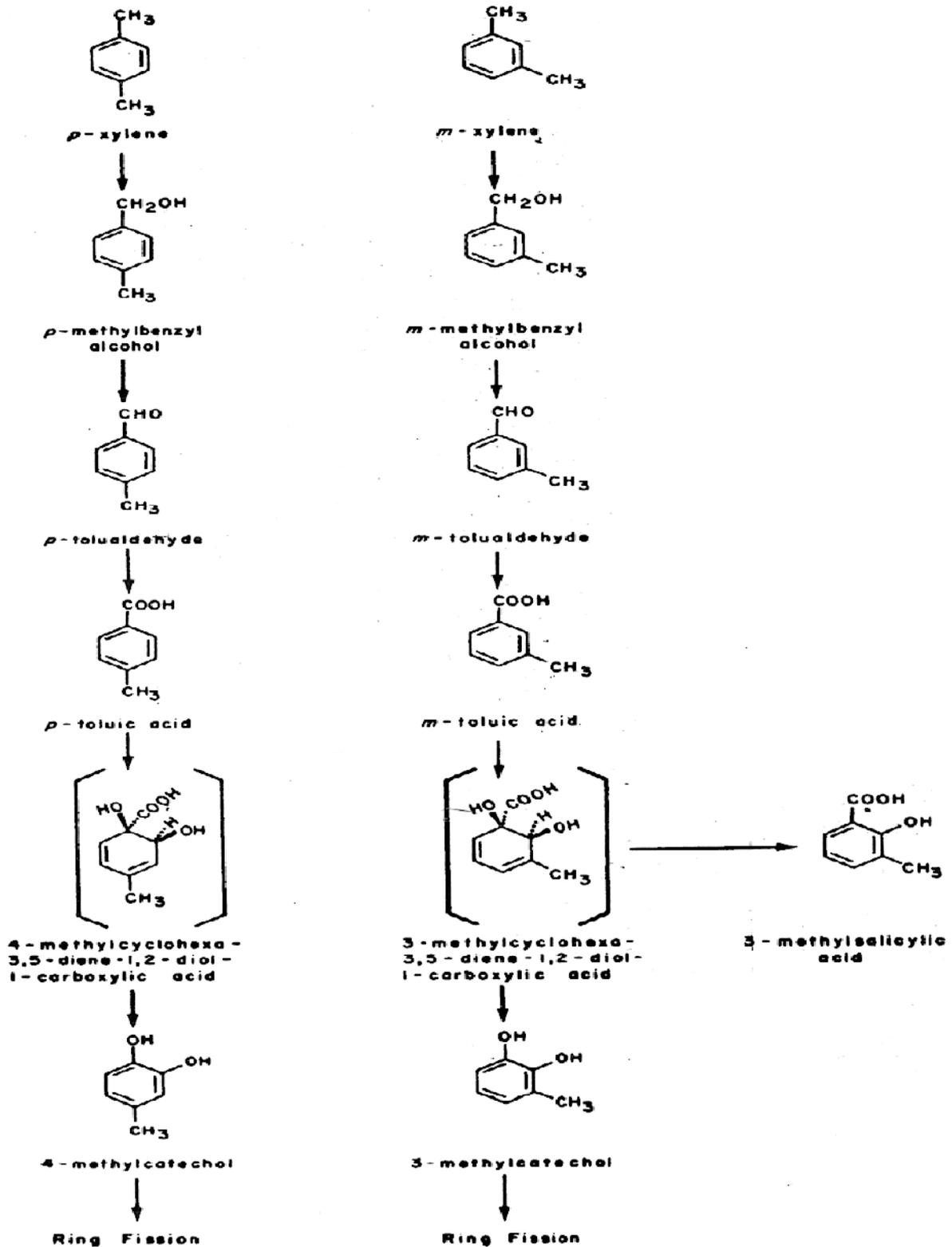


Figure 6 : Voies métaboliques proposées par Davey et Gibson, pour l'oxydation de p- et m-xylène par *Pseudomonas Pxy* [56].

II.6.1.2. Orto-xylène

En ce qui concerne l'orto-xylène [58], rapportait qu'aucun microorganisme capable d'utiliser le p- et le m-xylène n'avait la capacité de croître sur l'o-xylène, ce qui suggère l'importance de la position du groupement méthyle sur l'anneau aromatique [39]. De plus, aucun article n'était jusque là apparu sur l'isolation d'un microorganisme utilisant l'orto-xylène comme substrat de croissance.

Seuls Raymond *et al.* [59], avaient démontré la co-oxydation de l'o-xylène en acide o-toluique par une souche de *Nocardia* isolée sur n-paraffine indiquant ainsi que l'oxydation de l'o-xylène se produit à partir d'un groupement méthyle. C'est en 1987 que l'équipe de Baggi *et al.* [60], publia ses résultats sur l'isolement d'une souche de *Pseudomonas stutzeri* capable de dégrader l'o-xylène en tant que seule source de carbone (**Figure 8**). L'hypothèse suggérée était que les premières étapes de la croissance sur o-xylène impliquent l'oxygénation directe du noyau aromatique.

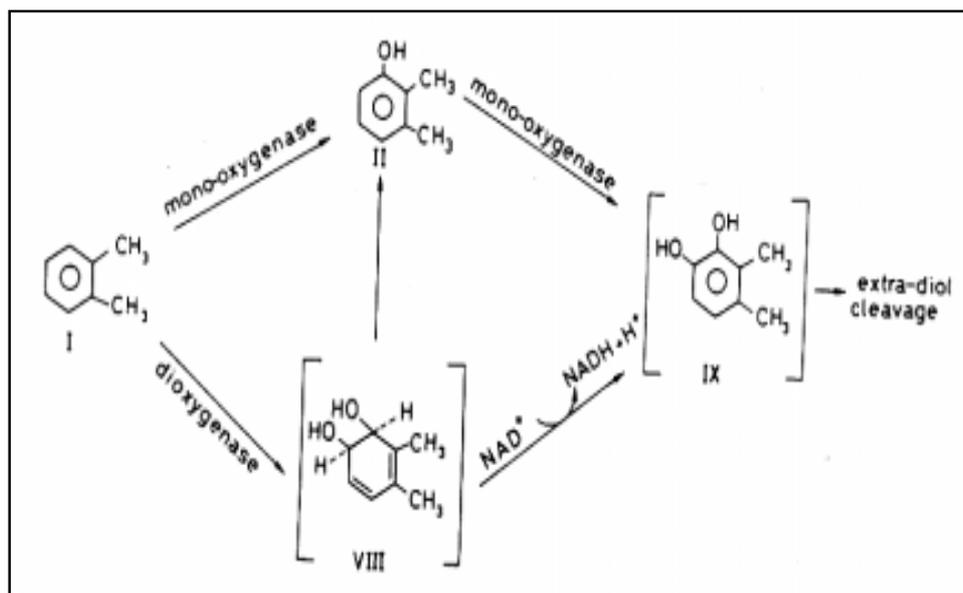


Figure 7 : Étapes initiales proposées par Baggi *et al.* pour le métabolisme de l'o-xylène par *P. stutzeri*. I, o-xylène [60].

Chapitre III :

Matériels et Méthodes

L'expérimentation de notre projet sur « la biodégradation du xylène par les *Streptomyces* » a été réalisée au sein du Laboratoire des écosystèmes aquatiques du CNRDPA de Bou-Ismaïl (wilaya de Tipaza), dont' il s'intègre dans le cadre des activités de recherche sur la biodégradabilité des composés organiques et des hydrocarbures en vue d'une application de biotraitement.

Dans le but d'améliorer nos connaissances sur la biodégradation des hydrocarbures, nous avons entrepris une étude de la dégradation du xylène par des souches de *Streptomyces* (comme seules sources de carbone et d'énergie) reconnus comme toxiques, afin d'avoir une meilleure connaissance de l'influence du pH et de la concentration du xylène sur leur biodégradation, la production des métabolites et l'immobilisation des *Streptomyces*.

III.1. Méthodologie

Cette partie décrit la méthodologie du travail expérimental, elle comprend les étapes suivantes :

- ✓ Suivi de la biodégradabilité du xylène en optimisant quelques paramètres de contrôle;
- ✓ Suivi de la cinétique d'utilisation du substrat;
- ✓ Essais de l'immobilisation des *Streptomyces*.

Dont les protocoles expérimentaux sont détaillés dans la planche ci-après.

III.1.a. Choix de la souche bactérienne:

Nous avons choisi les *Streptomyces* comme agent de biodégradation des hydrocarbures car du xylène vis-à-vis ses caractéristiques :

- ✓ Résistance à la sécheresse et au pH [61].
- ✓ Capacité à se développer sur les substrats les plus divers [62].
- ✓ Synthèse de très nombreux métabolites bioactifs, parmi lesquels les enzymes, qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants [62], qui leur font les candidats appropriés pour la bioremédiation [61].
- ✓ Pour son potentiel de dégradation des hydrocarbures (aromatique polycyclique telle que l'anthracène, dont elle a fait preuve d'élimination de plusieurs composés complexes toxiques [63].

Dans la figure 9 sont présentées les morphologies du genre Streptomycètes. Il est caractérisé par la formation du mycélium et un cycle de reproduction unique chez les procaryotes.

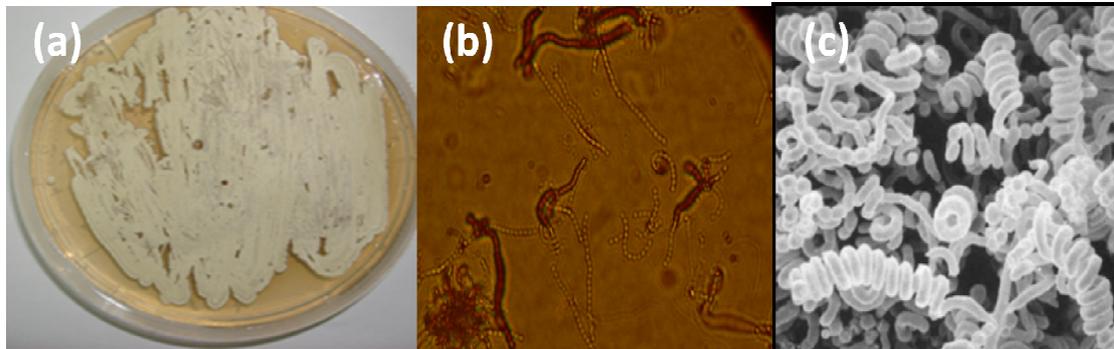


Figure 8 : (a) Thalle de la souche (mycélium aérien). (b) Observation au microscope optique (Gx100). (c) Observation au microscope électronique [62].

Les *Streptomycètes* sont des bactéries saprophytes du sol apparaissant sous forme de filaments ramifiés portant des conidies en chaînes par fois très longues. Elles sont aérobies et à métabolisme fortement oxydatif, leur température optimale est de 25 à 35°C et leur pH optimale 6,2 à 8, les colonies sont de grandes tailles, souvent pigmentées et d'aspect fongique [64]. Elles synthétisent de très nombreux métabolites bioactifs, parmi les enzymes. L'action des enzymes du catabolisme conduit à la dégradation des nutriments et sources d'énergie plus ou moins complexes [62].

III.1.b. Présentation du biotope

L'isolement de souche de streptomycètes a été effectué à partir du sol humide de Boufarik « la Mitidja ». L'échantillonnage a été effectué au mois de novembre 2007 [14]. L'isolement est basé sur la capacité de souche à croître sur les acides humiques en tant que macromolécule poly-aromatique.

III.1.c. Conservation de souches pures et préparation de l'inoculum

Les souches pures ont été repiquées sur milieu ISP9 solide et conservées à 4 °C. La composition de milieu ISP9 (g/l) est détaillée dans l'annexe II.

Afin d'atteindre la phase exponentiel de croissance, la souche a été mise en culture dans un milieu nutritif d'ISP9 pendant 3 jours. Après croissance, l'inoculum formé a été inoculé dans le milieu minimum (MM) contenant différentes concentrations du xylène.



Figure 9 : Etapes de préparation de l'inoculum bactérien. La biomasse apparaît en forme sphérique (indiquée par flèche).

III.2. Suivre de la biodégradabilité du xylène

La littérature montre que plusieurs études ont été réalisées sur la biodégradation du xylène par exemple : Baggi *et al.* [60] ont utilisé la souche *Pseudomonas stutzeri* pour la dégradation de l'o-xylène. Quant à Gardin *et al.* [65], un mélange d'organismes constitué de sept souches de bactéries et de trois souches de levures a été sélectionné pour la dégradation de xylène. En 2005 Marcelo *et al.* [66], Shim et Yang [67] ont étudié la dégradation des BTEX par *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens*. En 2010, Saghafi *et al.* [68] ont étudié la biodégradation du xylène sur un biofilm de *Pseudomonas putida*. Chakraborty *et al.* [69], ont étudié la biodégradation anaérobie du xylène par *Dechloromonas* Strain RCB.

Mais nous n'avons pas trouvé dans la littérature des études sur la dégradation possible du xylène par les *Streptomycètes*, il était donc impératif de ne pas seulement expérimenter cette dégradation, mais aussi de vérifier la tolérance de ces souches et les effets du xylène sur leur croissance.

III.2.1. Vérification de la tolérance des *Streptomycètes* et l'effet du xylène sur leur croissance

Avant la réalisation de nos expériences dans la biodégradation du xylène, nous avons vérifié la tolérance de *Streptomycètes* et l'effet du xylène sur leur croissance par incubation de la souche dans un milieu contenant du sol dont on a introduit une concentration de 300mg.L^{-1}

du xylène, en même temps, une préparation des témoins sans xylène et indispensable pour la confirmation.

Après 6 jours d'incubation un repiquage sur ISP9 solide à été réalisé afin de confirmer la survie des souches ou non (figure 11). Les résultats obtenus sont illustrés par des photos prises le jour même.

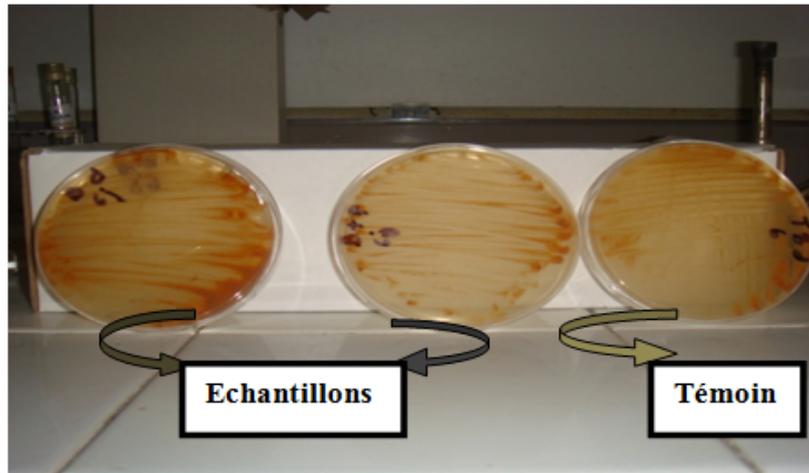


Figure 10 : Repiquage sur ISP9 solide après 6 jours d'incubation. Le xylène représente la seule source de carbone et d'énergie.

III.2.2. Optimisation de quelques paramètres de dégradation

Plusieurs facteurs biotiques influencent la biodégradation ont été étudiés à savoir : la concentration du xylène, et le pH. Toutes les expériences de dégradation ont été réalisées dans des Erlenmeyers 250ml contenant 100 ml de milieu de culture sous agitation, la température est fixée à 30 °C à l'abri de la lumière.

L'analyse quantitative du xylène résiduel est réalisée par CPG et par spectrophotométrie UV-vis (208nm).

Le déroulement des essais réalisés est résumé dans le protocole expérimental suivant :

- Préparer le milieu de culture ISP9 (1% glucose) **annexe II** ;
- Ajuster le pH à 6,2 et 7,2 ;
- Pour chaque pH introduire des concentrations de 100 mg.l⁻¹, 200 mg.l⁻¹ et 300 mg.l⁻¹ du xylène,
- Dans une zone stérile (bec benzène) ajouter 2% d'inoculum dans les Erlenmeyers témoins ;
- Autoclaver le tous ;

- Dans une zone stérile ajouter 2% d'inoculum dans les échantillons (sauf les témoins) ;
- Incuber le tous à 30 °C sous agitation 150 tr.min⁻¹ à l'abri de la lumière ;
- Prélever 10ml de l'échantillon en conditions stériles pour analyse.

La variation du pH de milieu de culture au cours de l'incubation est mesurée à l'aide d'un pH-mètre (de marque HANNA pH 211) **annexe III**, préalablement étalonné.

- **Traitement de l'échantillon :**

Des volumes de 10 ml sont prélevés chaque jours dans des conditions stériles à partir des cultures, puis filtré afin d'élimination de la biomasse.

Une extraction du xylène résiduel est effectuée par extraction liquide /liquide avec un solvant organique d'hexane (50/50%, v/v), puis une agitation par vortex (**annexe III**) de 2 à 5 min.

On laisse reposer l'échantillon jusqu'à que deux phases apparaissent. Récupérer la phase organique et analyser.

- **Estimation de la réduction par Spectroscopie UV-visible :**

Les maxima d'absorption du xylène utilisé sont obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de marque JENWAY (**annexe III**). Les échantillons sont analysés en solution avec une cellule en quartz de 1 cm d'épaisseur. Les spectres ont été tracés de 200 à 800 nm après réalisation d'une ligne de base sur toute la longueur d'onde du spectre à tracer avec la cuve remplie du témoin chimique.

Afin d'estimer l'optimum de la concentration, nous avons mesuré le pourcentage de la réduction (%R) du xylène par l'estimation de l'Absorbance à 208 nm.

Le pourcentage de la réduction du xylène (%R) est déterminé en utilisant la formule suivante :

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

III.3. Suivi de la cinétique d'utilisation du substrat (xylène)

Le même protocole expérimentale de l'optimisation de la biodégradation a été utilisé sauf que dans cette partie les paramètres ont été fixés (l'optimum) à un pH = 6,2 et des concentrations du xylène = 200 mg. L⁻¹ et 300mg. L⁻¹. Les prélèvements étaient chaque heure.

Cette partie du travail nous a permis la mise en évidence des produits générés après dégradation qui sont faites par l'analyse CPG.

- **Analyse des métabolites intermédiaires de la dégradation par CPG**

Cette méthode spectrale permet de suivre les modifications qui se produisent dans le milieu durant le processus de dégradation du xylène en détectant l'apparition ou l'absence des pics.

Les sous produits de la biodégradation sont caractérisés par chromatographie en phase gazeuse en utilisant un appareil de marque SHIMADZU de type GC-17A (**annexe III**), mené d'un détecteur FID et d'un intégrateur. La colonne utilisée est : la colonne capillaire SE 30 (apolaire de type FSCW 0,25 mm×25m, l'épaisseur du film de phase stationnaire déposée est de 0,25 µm. La température de l'injecteur et détecteur est de 250 °C. Le programme du four est augmenté de 60°C à 80°C par 2°C.m⁻¹, et de 10°C.m⁻¹ jusqu'à atteindre 200°C.m⁻¹. Le gaz vecteur est l'azote.

Les résultats sont représentés sous forme de chromatogrammes intégrés qui permettent la détermination de la concentration du xylène résiduelle et la présence des métabolites.

Note : Les mesures ont été réalisées aussi bien avec le test qu'avec les témoins (un témoin chimique sans souche bactérienne et un témoin biologique sans xylène incubés sous les mêmes conditions de celui du test).

III.4. Immobilisation des Streptomycètes dans des matrices poreuses « billes d'alginate de sodium »

Le but principal de cette partie est de piéger les souches bactériennes au sein des billes d'alginate en vue de son immobilisation.

L'étude réalisée par Yesmin Kac *et al.* [70], sur les billes gélifiées à base d'alginate issu de l'immobilisation de *Phanerochaete chrysosporium*, ont montré une haute efficacité pour éliminer les ions Cd^{2+} et Hg^{2+} en solution aqueuse alors que Pan Xiangliang *et al.* [71], ont préféré d'encapsuler le *Pleurotus ostreatus* afin de les utiliser dans l'élimination des ions plomb.

Tandis que Zumriye *et al.* [72], ont étudié la biosorption des molécules aromatiques (phénol) par des souches immobilisées dans un lit en continu fermé.

Cette présente étude à son tour vise à vérifier la dégradation du xylène par des billes d'alginate de sodium, issus de l'immobilisation des Streptomycètes. Afin de réaliser cette encapsulation, on a opté à suivre les étapes suivantes :

A. Préparation de la solution polymère : La poudre de polymère (alginate de sodium) à 1,5% est dispersée dans l'eau non préchauffé sous une forte agitation jusqu'à l'homogénéisation totale (7h).

B. Préparation des billes : La biomasse est introduite dans la solution polymère dans des conditions stériles selon le type de billes désirées (billes seules, billes à biomasse active, billes à biomasse inactive) ; Le protocole utilisé dans cette partie est rapporté selon les étapes suivantes :

- **Billes à biomasse active :** introduire 2% de l'inoculum dans la solution déjà autoclavée;
- **Billes à biomasse inactive :** introduire 2% d'inoculum dans la solution puis autoclaver le tout;
- **Billes seules (sans biomasse) :** ne rien rajouter à la solution, l'autoclaver directement.

Remarque : l'autoclavage ce fait à 121 °C pendant 15 min.

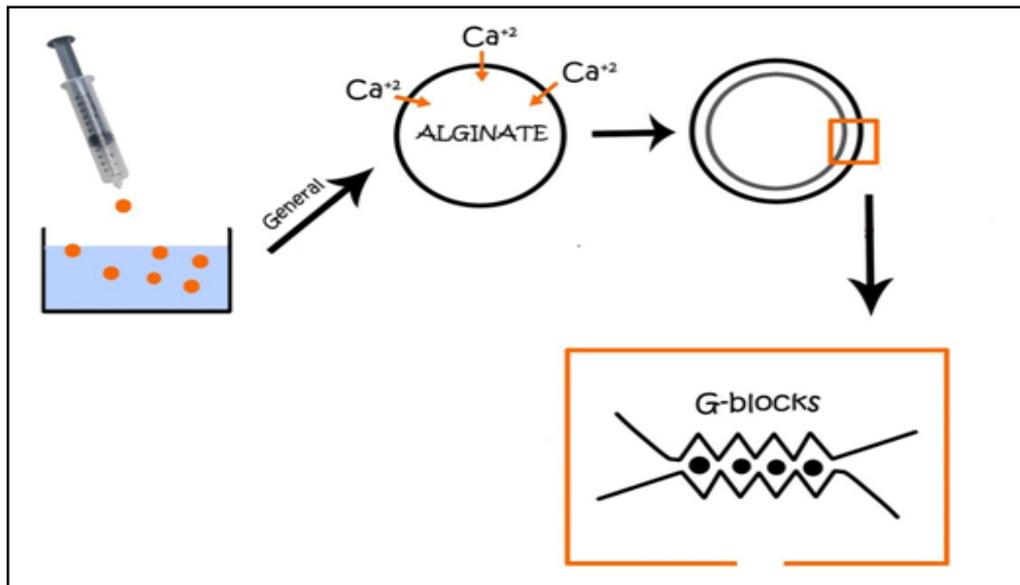


Figure 11 : Diagramme de complexations des ions de calcium sur l'alginate.

Selon le diagramme de complexations dans la figure ci-dessus la solution d'alginate de sodium a été introduite dans une solution de chlorure de calcium CaCl_2 (0,1M) stérile, par l'introduction goutte à goutte à travers une pompe péristaltique avec un débit de $2,27 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ afin d'assurer la complexation et la bonne formation de billes.

La formation des billes se fait lors de contact entre les gouttelettes du gel d'alginate de sodium et le CaCl_2 .

Pour tous types de billes, nous avons choisis comme temps de maturation dans la solution Ca^{2+} un temps de 10h. Celui-ci est jugé largement suffisant pour s'assurer qu'une bonne gélification a eu lieu [73].

Les billes formées sont bien rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile afin d'enlever l'excès des ions Ca^+ et les cellules non capturées.

La figure 14 résume l'ensemble des étapes de préparation des billes d'alginate.

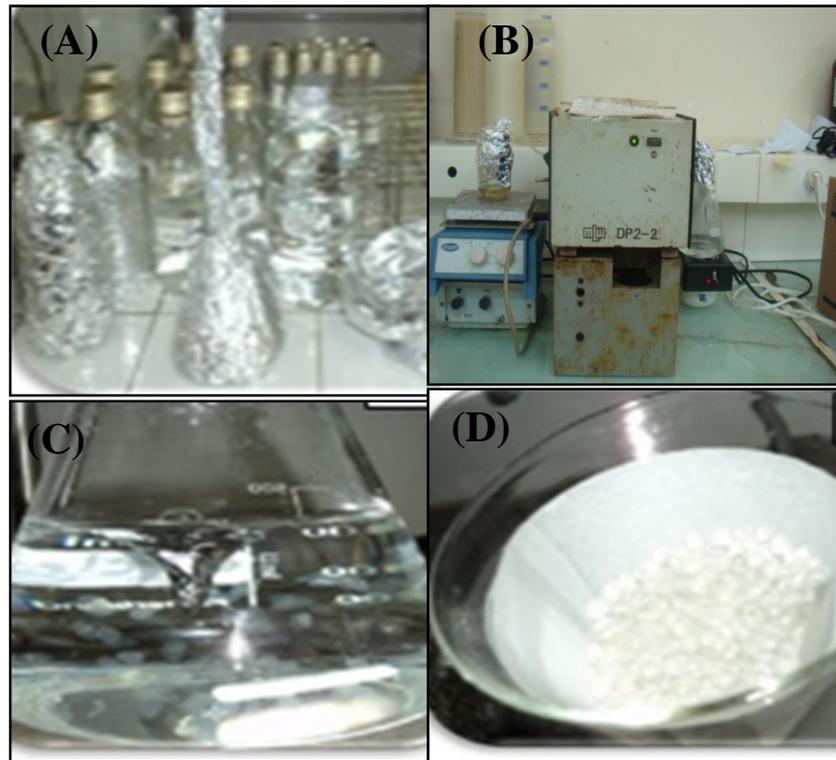


Figure 12: Etapes de préparation des billes d'alginate, (A) : stérilisation du matériel, (B) : introduction goutte à goutte dans CaCl_2 , (C) : formation de billes, (D) : filtration et lavage des billes.

- **Suivie de la dégradation :** Après une bonne gélification des billes, les cultures immobilisées sont introduites dans le milieu de dégradation (ISP9) à 200mg.l^{-1} de xylène.

Comme élément de contrôle on a choisit de limiter la croissance bactérienne, donc on a opté à diminuer la concentration du substrat à 100mg.l^{-1} puis incubé les billes dans un milieu à faible conditions de croissance contenant quelques éléments essentiels (eau + EMT).

Tous milieu est mis sous agitation et incubé à $30\text{ }^\circ\text{C}$, un prélèvement de 10ml d'échantillon est effectué chaque heure, le xylène résiduelle est extrais puis analysé par spectroscopie UV-vis, les résultats de ces essais sont illustrés par des graphes exprimant le pourcentage de réduction de différents type de billes en fonction de temps. Pour mieux visualiser le phénomène une autre culture de billes a été introduite dans le milieu ISP9.

III.5. Immobilisation par l'attachement à un support « Application sur sol contaminé »

Afin d'introduire la souche bactérienne sur un support naturel, on a opté à la cultiver sur un sol contaminé par le xylène (comme seul source de carbone), et pour réaliser cette application on a suivi le protocole ci-après :

- Prendre 2g du sol calciné de la région de la Mitidja;
- Ajouter 50ml et/ou 2ml d'eau distillée;
- Autoclaver le tous à 121°C pendant 20 min;
- Introduire 2% de la culture bactérienne âgée de 5 jours, dans chaque Erlenmeyers;
- Ajouter 200mg.l⁻¹ du xylène stérile ;
- Préparer des témoins biologiques on introduisant 2% de la biomasse dans chaque erlenmeyers (50ml, 2ml) avant l'autoclaver, puis les faire subir un autoclavage à 120 °C, après refroidissement ajouter 200mg.l⁻¹ du xylène stérile ;
- Mètre 2g du sol dans 50ml, 2ml d'eau distillée, autoclaver le tous puis ajouter 200mg.l⁻¹ du xylène, pour l'obtention de témoins chimiques ;
- Incuber le tous à 30°C sous agitation 150 tr.mn⁻¹ ;



Figure 13 : Différents échantillons préparés pour l'application *in situ*.

Analyse des échantillons: Après 3 jours d'incubation sous les mêmes conditions de température et d'agitation, les échantillons ont été analysés par deux méthodes (biologique et spectroscopique) :

- **Méthode de confirmation biologique**

Réaliser un repiquage de chaque échantillon sur milieu ISP9 idéal solide et milieu solide à 100mg.l^{-1} du xylène.

Le suivie de la croissance bactérienne est réalisé par dénombrement effectué chaque jours après l'incubation sur milieu solide à 100mg.l^{-1} du xylène pendant 3 jours.

- **Méthode de confirmation spectroscopique**

Ajouter un pourcentage de (50/50% ; v/v%) d'hexane à la culture des Erlenmeyers, mélanger au vortex pendant 2 à 3 min et récupérer la phase organique, puis analyser par UV-vis à 208 nm.

Chapitre IV :

Résultats et discussion

IV.1. Suivre de la biodégradabilité du xylène

IV.1.1. Vérification de la tolérance des Streptomycètes et l'effet du xylène sur leur croissance

L'influence du xylène sur la croissance des *Streptomycètes* lorsque le solvant est ajouté au milieu de culture est représenté dans la figure 15.

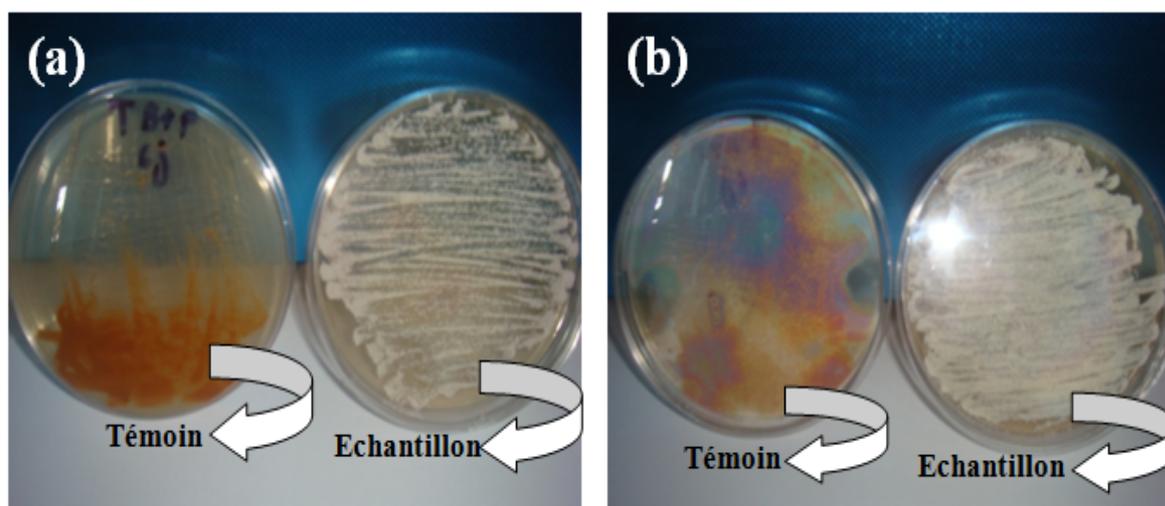


Figure 14 : Croissance bactérienne sur milieu d'ISP9 solide après 2 jours d'incubation :

Les figures ci-dessus montrent une croissance considérable de la souche *Streptomycètes* (AB1) dans un milieu contenant une concentration de 300mg.L^{-1} du xylène, se qui confirme la non mortalité bactérienne. De plus que cette tolérance, la souche bactérienne semble utiliser le xylène comme source de carbone, ce qui a été confirmé par l'absence de croissance dans le milieu sans xylène (absence de source de carbone), tandis que dans le milieu contenant du xylène la souche AB1 montre une résistance même après 6 jours.

Alors cette souche semble être tolérante à ce solvant tel que le xylène, comme le confirme l'étude de Labrecque Marie-Hélène [39], sur deux levures (*Kluyveromyces marxianus* et *Saccharomyces cerevisiae*) qui ont montré une croissance en présence de xylène, même si la concentration de celui-ci atteint 25% (v/v) , tandis que l'étude de Sikkema *et al.* [74] affirme que la plupart des solvants organiques tel que le xylène sont généralement biotoxiques et inhibent la croissance des microorganismes même à de faibles concentrations (0,1% v/v), car ils s'accumulent dans les cellules et affectent leur membrane cellulaire.

IV.1. 2. Optimisation des conditions de dégradation

Dans le but de connaître l'évolution de la réduction du xylène en fonction du pH et la concentration en substrat, on a opté à varier ces derniers.

Selon Guiraud [41], « un développement qui peut avoir lieu à un pH et à une température donnés peut être inhibé lorsque les deux conditions se cumulent ». Pour cela on c'est intéressé à étudier l'interaction entre les différentes concentrations choisies et la variation du pH.

Les résultats obtenus lors de cette variation sont représentés dans les figures 16-21.

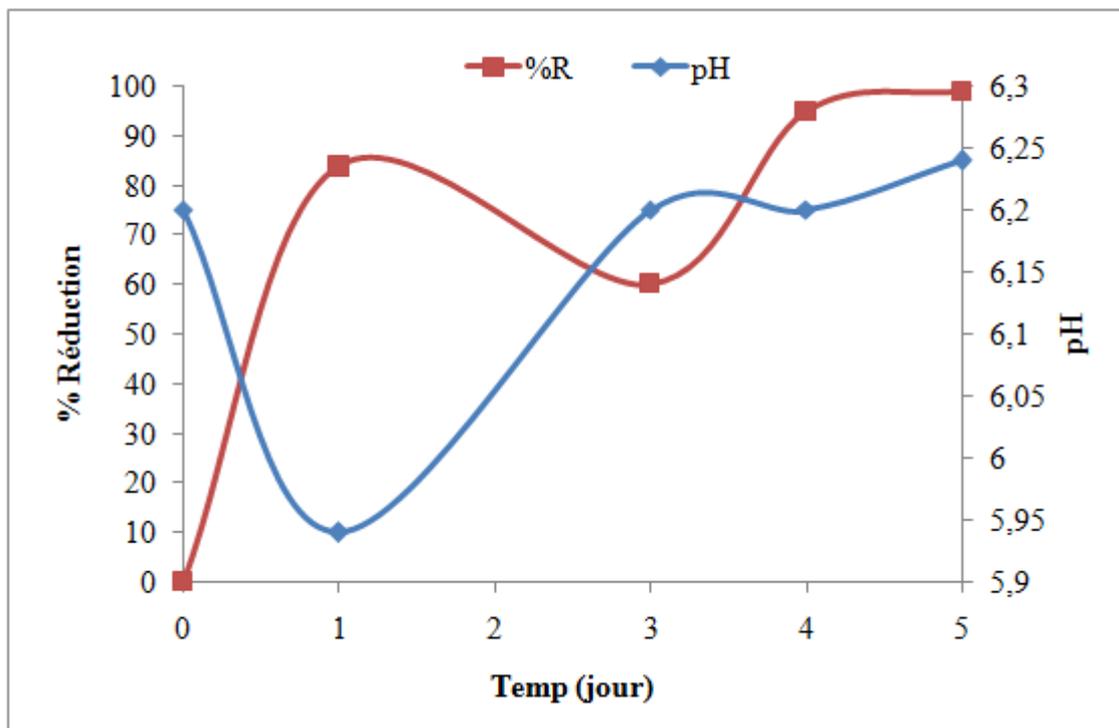


Figure 15: Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 6,2 et la concentration initiale du xylène égale 100mg/l.

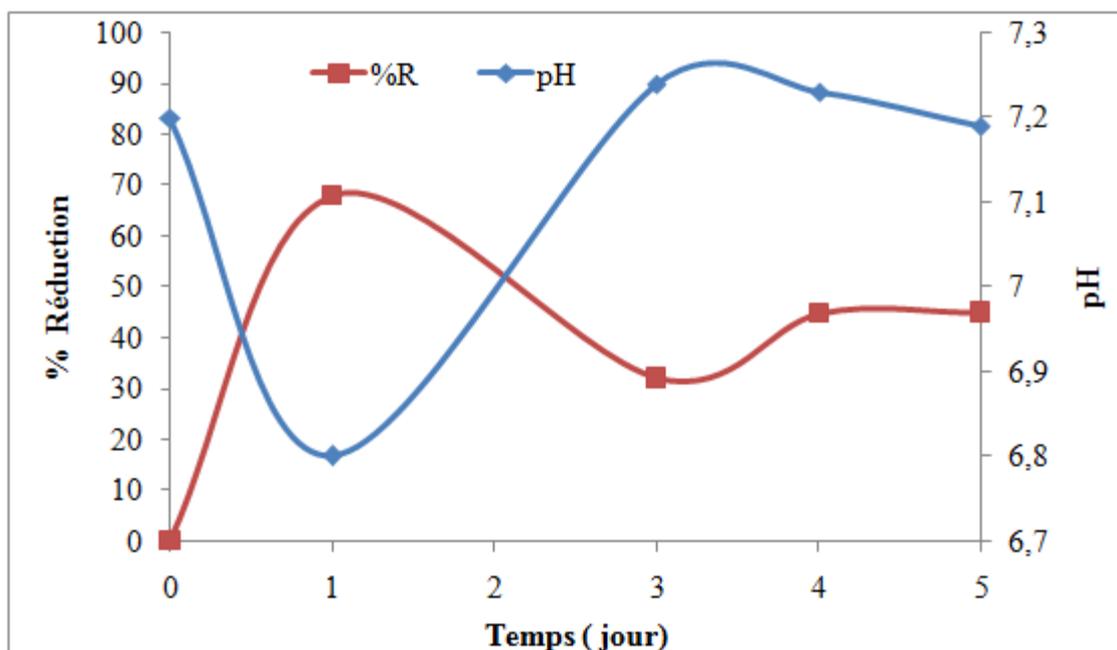


Figure 16: Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 7,2 et concentration initiale du xylène égale 100mg/l.

Les figures 16-21 illustrent les pourcentages de réductions du xylène à différents pH et concentrations.

La réduction de la concentration du xylène commence dès les premières heures d'incubation jusqu'à une élimination complète au bout d'une période moyenne comprise entre 1 à 5 jours.

Par exemple les figures (16 et 17) illustrent le taux de dégradation du xylène par la souche AB1 à une concentration initiale de 100mg.l⁻¹ en variant le pH initial du milieu de culture.

La meilleure dégradation du xylène est obtenue à pH 6,2 avec une élimination élevée et rapide (86%) remarquée au premier jour suivi d'une élimination presque totale (95%) du xylène au bout de moins de 5 jours d'incubation.

Notons aussi que les procédés biologiques sont toutefois très sensibles aux fluctuations de la concentration de la source de carbone et les sous produits de dégradation puisqu'à partir d'une teneur seuil, l'activité microbienne est inhibée [75], de ce fait, les variations de taux de dégradation observées au niveau de la figure 17 peuvent être expliquées par ce phénomène (1 jour de dégradation).

A pH initiale (7,2), le pourcentage de réduction du xylène par la souche AB1 atteint les 70% au premier jour mais cette dégradation ne cesse pas à diminuer jusqu'à atteindre les 36%. La fluctuation dans la biodégradation du xylène par la souche AB1 à pH initial égale 7,2 probablement due à la présence des sous produits comme l'explique Arnaud [76] qu'en présence de l'acide chlorhydrique, (ajustement de pH ajout de HCl), les xylènes peuvent subir une chloration qui fournit des dérivés d'addition comme l'hexachlorocyclohexane utilisé comme insecticide ces derniers ont probablement des effets sur le fonctionnement bactérien ainsi la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique, cette diminution est remarquée par l'abaissement du pourcentage de réduction du xylène à pH initiale 7,2. Ou par les métabolites issues de la dégradation, sachant que ces composés xénobiotiques peuvent provoquer des ralentissements de croissance de la microflore voire une inhibition complète même à des concentrations relativement basses [77]. Les résultats obtenus à des différentes valeurs de pH montrent que la souche dégrade rapidement ce composé dans des conditions du pH égal à 6,2. Delarras [64] confirme que c'est le pH optimal de dégradation de xylène.

On remarque aussi une variation du pH du milieu après incubation cela revient probablement aux métabolites intermédiaires. Un processus microbien fait intervenir la consommation du substrat et la formation de biomasse et de produits, ainsi qu'un dégagement de chaleur [41].

En effet, la consommation du substrat génère des produits, qui leur nature influence sur le milieu de culture, les figures 16 et 17 montrent une diminution du pH pendant la dégradation du substrat ce qui est expliqué par la présence de métabolites légèrement acides (groupe carboxyle) [77]. Effectivement on a constaté qu'après 1 jour d'incubation la valeur de la longueur d'onde maximale (λ max) devenus 318 nm avec une absorbance Abs = 0.109, au lieu de 208 nm de départ, cette valeur probablement présente l'absorbance des sous produits qui ont été générés durant la dégradation du xylène.

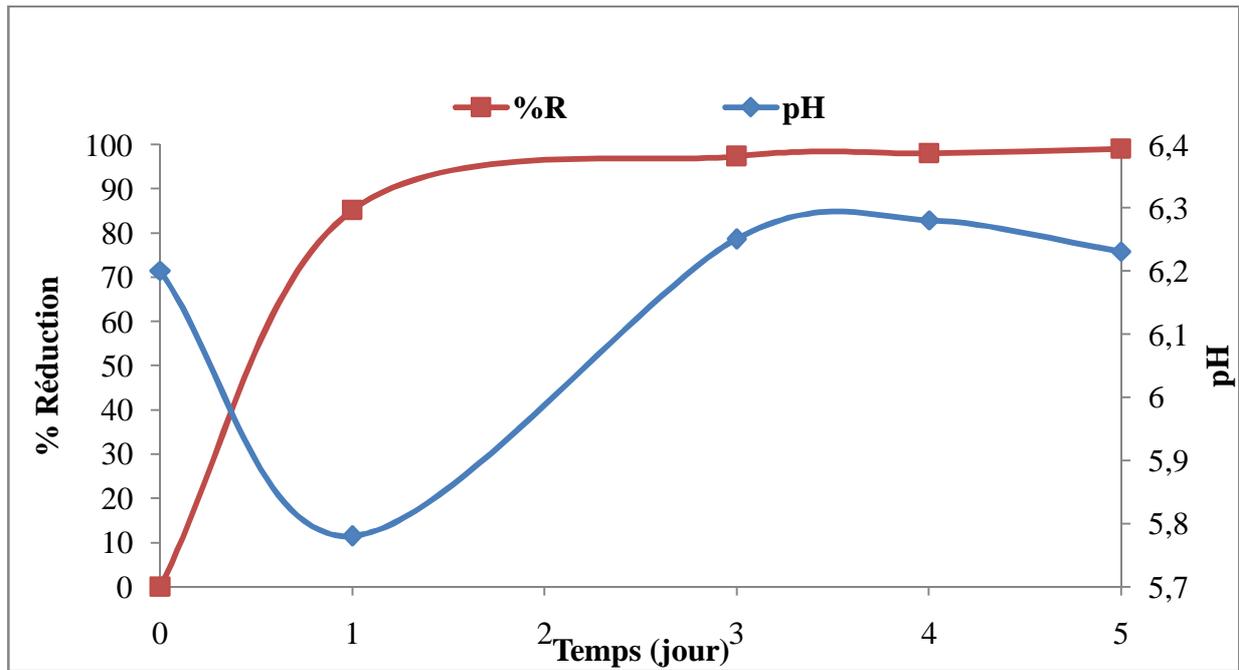


Figure 17 : Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 6,2 et concentration initiale du xylène égale 200mg/l.

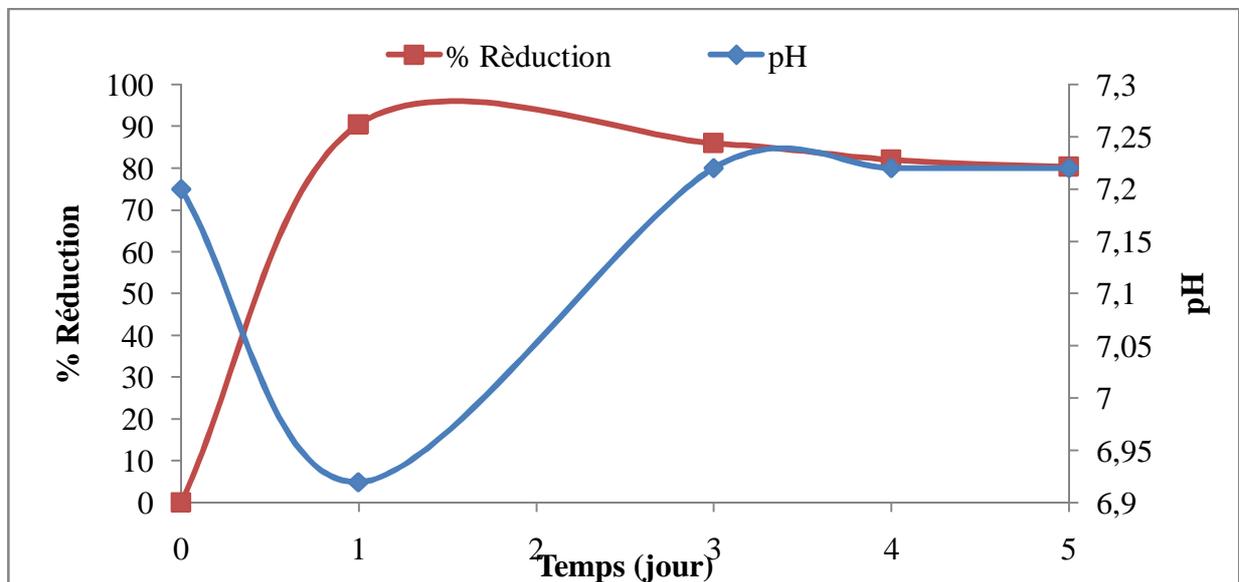


Figure 18 : Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 7,2 et concentration initiale du xylène égale 200mg/l.

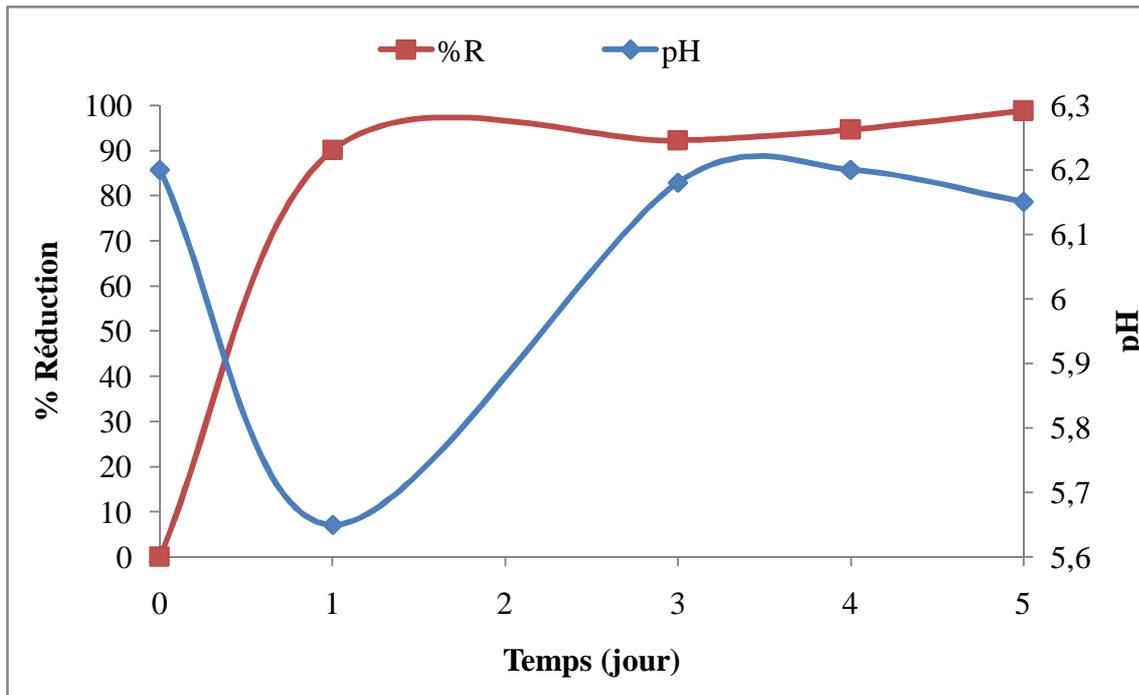


Figure 19 : Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 6,2 et concentration initiale du xylène égale 300mg/l.

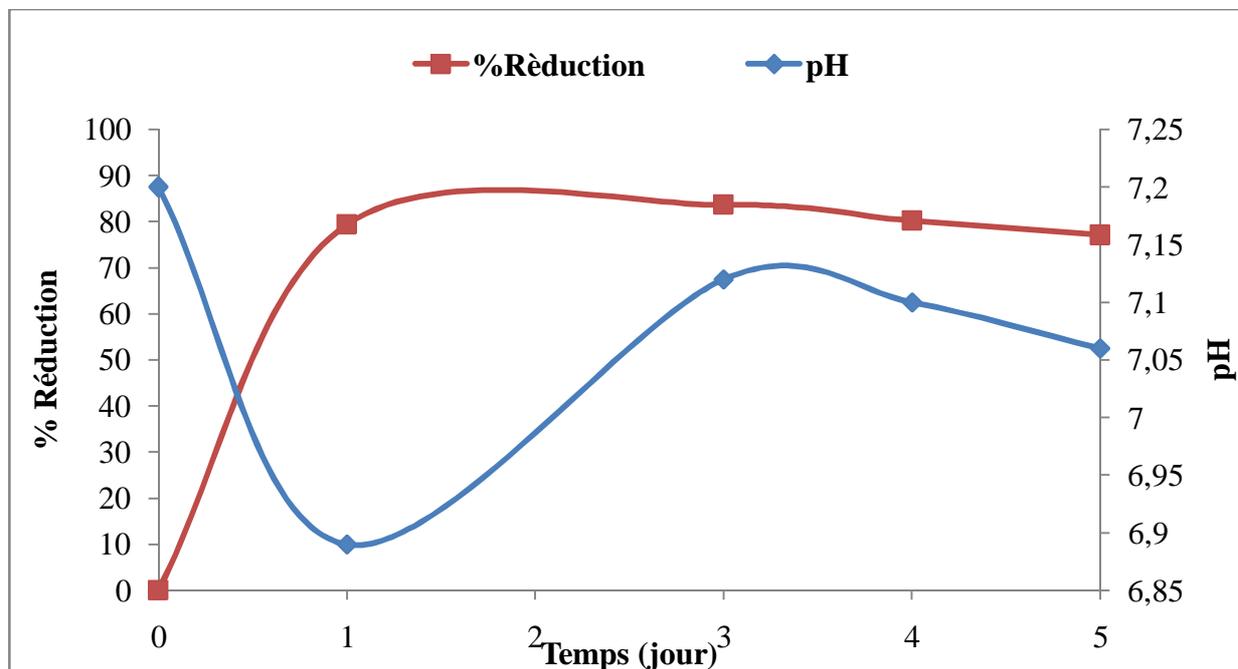


Figure 20 : Variation du pourcentage de la réduction du xylène et du pH en fonction du temps d'incubation : à pH initiale égale 7,2 et concentration initiale du xylène égale 300mg/l.

Pour des concentrations du xylène relativement plus élevés (200 et 300mg.l⁻¹), on remarque que les taux de dégradations sont de l'ordre des 99%, ces pourcentages ont été enregistrés au bout d'un jour pour toutes concentrations et chaque pH. C'est clair que le temps pris par la souche AB1 pour la dégradation du xylène ne dépend pas de sa concentration initiale. Figures (19-22).

Le suivi de changement du pH illustré aux figures (18-21) présente un moyen très efficace pour suivre les voies métaboliques de dégradation.

La diminution du taux de réduction du substrat montre que le pH du milieu a une influence sur la dégradation du xylène dont on remarque qu'à pH = 7,2 le taux de réduction atteint son maximum à 80% suivi d'un déclin qui revient probablement à la formation de quelques dérivés qui inhibent l'activité bactérienne lors de l'ajustement du pH.

Le changement du pH du milieu de culture microbien est lié aux voies métaboliques car un virage vers l'acidité explique la dégradation du substrat par voie fermentative par contre un virage vers l'alcalinité justifié l'alcalinisation du milieu par production des sels d'ammonium suite à une désamination du substrat [77].

Les résultats obtenus nous permettent de conclure que la souche AB1 peut métaboliser le xylène (seule source de carbone et d'énergie) pour croître et se développer à différentes concentrations ce qui vient confirmer la remarque signalé à la première partie du travail, ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Marie-Hélène [39], dont elle confirme que toutes dilutions (100, 1000, 2000 mg.l⁻¹) du xylène n'a pas inhibé la croissance de *K. marxianus* et de *S. cerevisiae*, par contre le pH optimale pour un bon taux de réduction du xylène à été marquer à 6,2 [64].

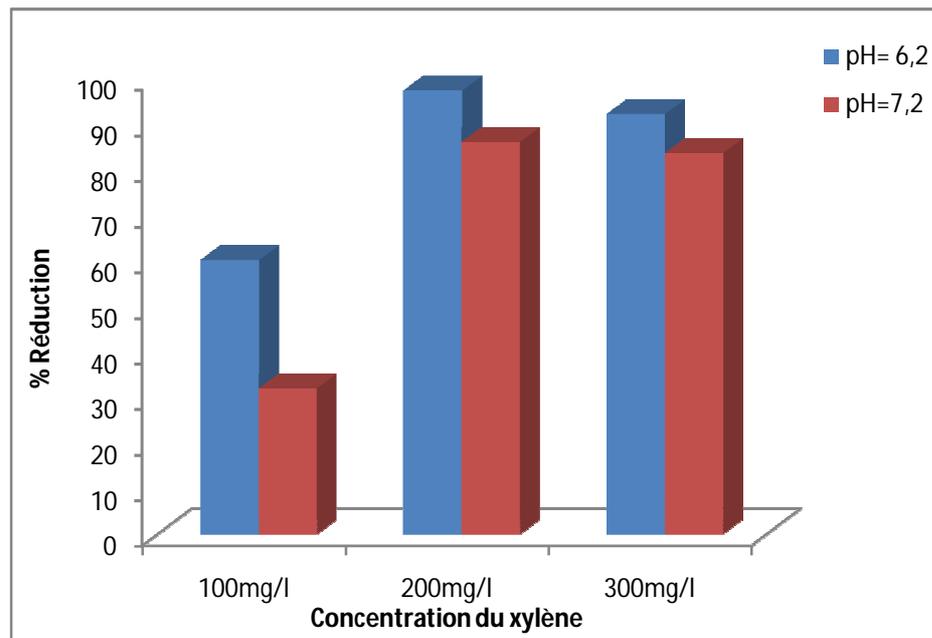


Figure 21 : l'Effet de la concentration du xylène et du pH sur l'activité de dégradation de la souche AB1 pendant 3 jours d'incubation

L'histogramme présenté à la figure 22 résume l'ensemble des résultats obtenus lors de l'optimisation des paramètres (pH et concentration du substrat), d'ont il est facilement remarquable qu'à des concentrations de l'ordre de 200, 300 mg.l^{-1} les taux de rendement toucheraient leurs maximums, comparés a ceux enregistrés dans le cas des 100 mg.l^{-1} , comme il est remarquable qu'à pH=6,2 l'activité de dégradation de la souche et encore plus importante qu'à pH = 7,2.

En guise de conclusion on a optimisé le pH et la concentration du substrat, les plus performants à pH= 6,2 et concentration égale à 200 mg.l^{-1} et 300 mg.l^{-1} .

IV.2. Suivi de la cinétique d'utilisation du substrat

Nos expériences de dégradation ont montré que la souche AB1 est capables de dégrader le xylène, jusqu'à atteindre son épuisement totale, comme elles ont montré une haute résistance à la toxicité du xylène, il a été biodégradé.

La partie suivante vise à confirmer cette biodégradation par l'estimation de la présence des métabolites primaires.

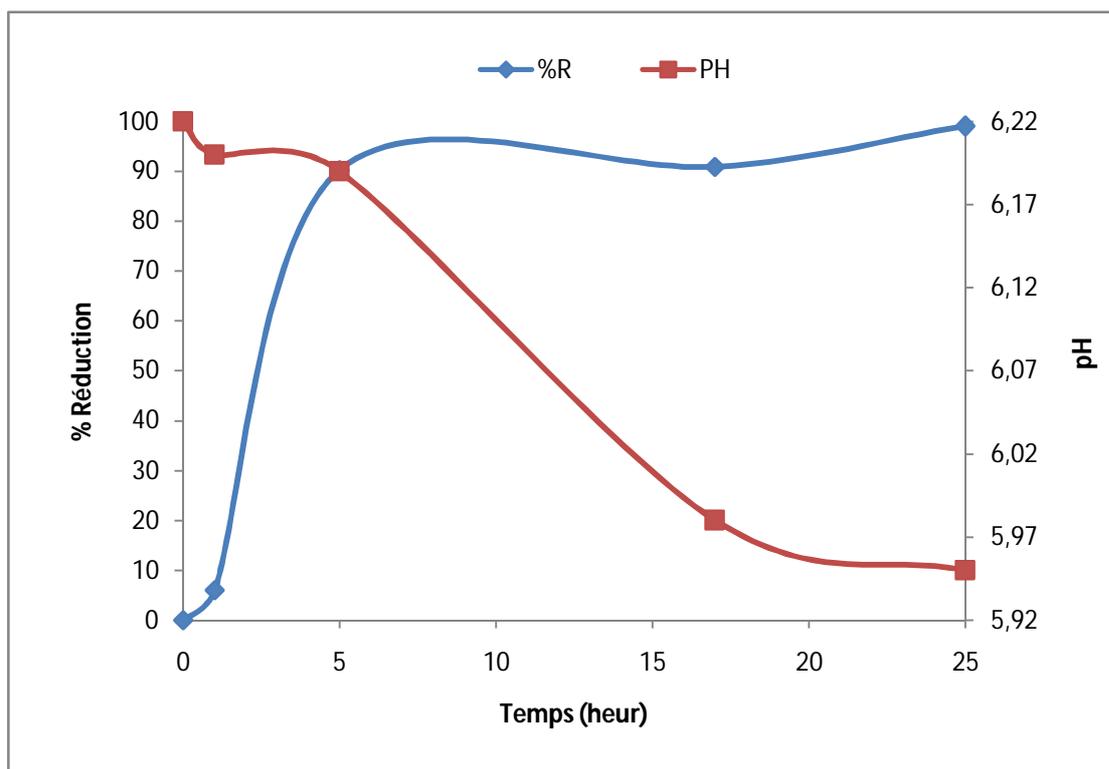


Figure 22 : Cinétique de dégradation à 200 mg.l⁻¹ du xylène par AB1.

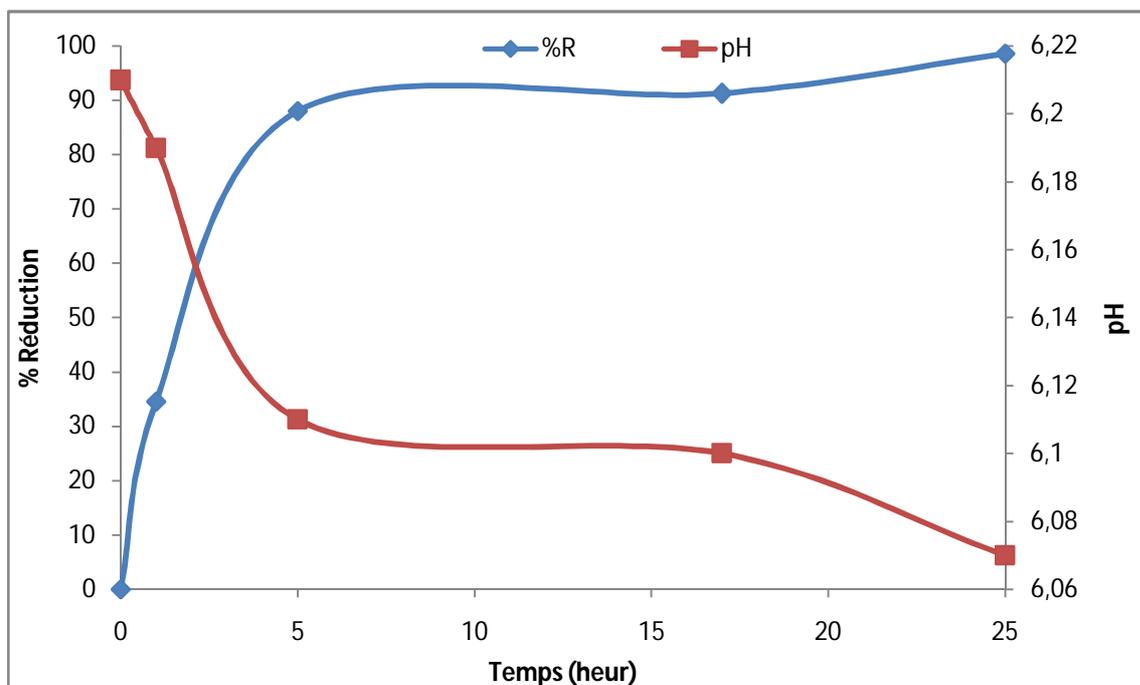


Figure 23 : Cinétique de dégradation à 300 mg.l⁻¹ du xylène par AB1.

Les figures (23 et 24) montrent une capacité de dégradation très importantes, car le taux d'élimination atteint une valeur supérieurs à 96,84% et 99% pour des concentrations 200 mg.L⁻¹ et 300 mg.L⁻¹, respectivement, au bout de 5 h. Ces résultats ont été marqué par des études récentes indiquant des rendements élèves d'élimination des BTEX de la phase liquide dans les systèmes biologiques aérobies avec une biomasse en suspension, jusqu' a 99% et au-delà, avec des vitesses d'élimination proches de 20mg.L⁻¹.h⁻¹ [80] et [81].

Différentes études montrent, pour les substances volatiles, que la biodégradation entre en compétition avec le phénomène de volatilisation [82]. Alors les bilans matières effectués sur des procédés de biodégradation des HAM doivent tenir compte de la part transférée vers la phase gaz [83]. Chiang [84] a montré dans son étude sur la biodégradation du toluène et le xylène que la volatilisation n'est pas le mécanisme majeur responsable d'élimination du xylène, Reardon *et al.* [85], a montré dans son étude de la biodégradation du toluène par la souche *P. putida F1* que la volatilisation des substances est considérée comme inexistante (< 1% en système fermé). Cette conclusion nous permet d'on déduire que les rendements de dégradation obtenus lors de ces expériences reviennent essentiellement au phénomène de biodégradation.

- **Analyse des métabolites intermédiaires de la dégradation par CPG**

La mise en évidence de produits générés de la dégradation du xylène a été détectée par CPG. Le milieu utilisé est celui contenant 200 et 300 mg.l⁻¹ du xylène, notons que les tests de biodégradation ont été assurés en conditions optimales : T° 30 °C et pH 6,2. Les spectres obtenus sont donnés dans les figures 25 et 26.

En comparant les spectres d'un échantillon du xylène issu d'une culture témoin (non ensemencé) avec celle d'un xylène soumis à une activité microbienne par AB1. On a pu obtenir une diminution importante de concentration du xylène et formation des sous produits qui sont résumés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : suivie des nouveaux pics apparus lors de l'incubation détectés par CPG.

Temps d'incubation	2h	4h	5h	21h
Concentration substrat				
200mg.l ⁻¹	2,960	2,998	3,290	2,947
300mg.l ⁻¹	0,767 2,956	1,36	2,950	-

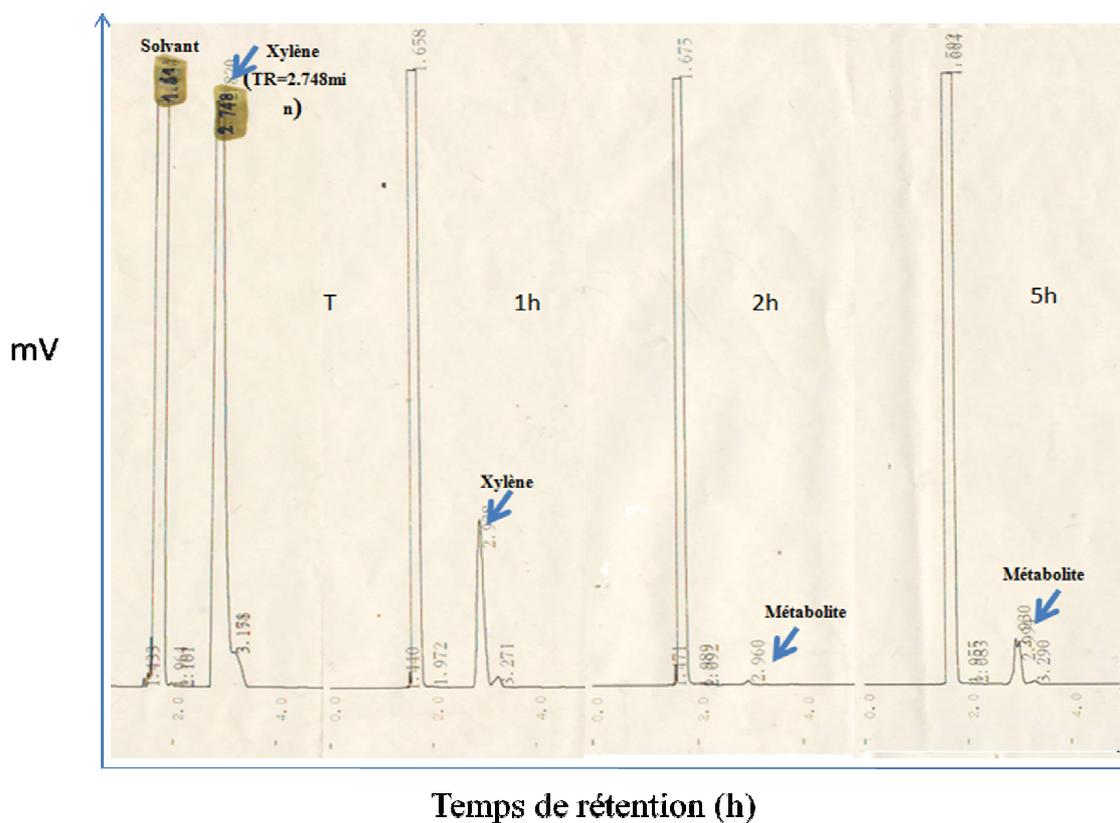


Figure 24 : Chromatogrammes CPG issus de la biodégradation du xylène (200mg/l).

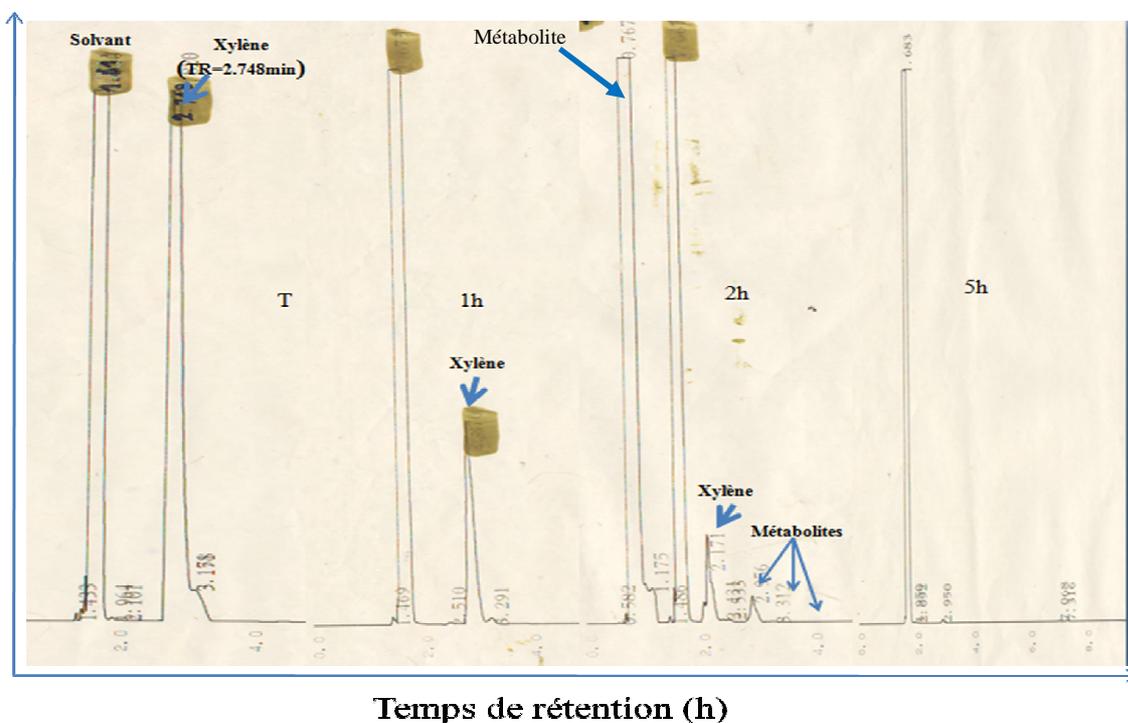


Figure 25 : Chromatogrammes CPG issus de la biodégradation du xylène (300mg/l).

D'après ces figures nous avons remarqué que, au temps zéro, le temps de rétention était à 2,93min avec une surface de pic de 148914 pour une concentration de 200mg.l^{-1} , après 2 h d'incubation à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ et pH 6,2, la surface du pic devient 3107. Après 5 h d'incubation dans les mêmes conditions opératoires la surface est annulée pour les deux concentrations, ce qui signifie que la concentration du xylène dans le milieu de culture est devenue faible ou nulle

IV.3. Immobilisation dans des matrices poreuses « billes d'alginate de sodium »

L'introduction de la solution polymère (alginate de sodium) dans la pompe péristaltique avec un débit de $2,27\text{ ml.min}^{-1}$, nous a permis d'obtenir des billes de 2mm de diamètre. Le choix de ce diamètre s'est basé sur l'étude de Grattepanche [86], qui confirme que 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.



Figure 26 : Photo réelle de billes obtenues par extrusion

La figure 28 montre une vue sous microscope optique (Gx40). D'après cette photo, on remarque une bonne encapsulation de la biomasse dans les billes.



Figure 27 : Photo prise sous microscope optique de billes d'alginate avec la souche AB1

L'introduction de 4mg des billes dans un milieu à 200mg.L⁻¹ du xylène a donné les taux de réduction illustrés dans la figure 29.

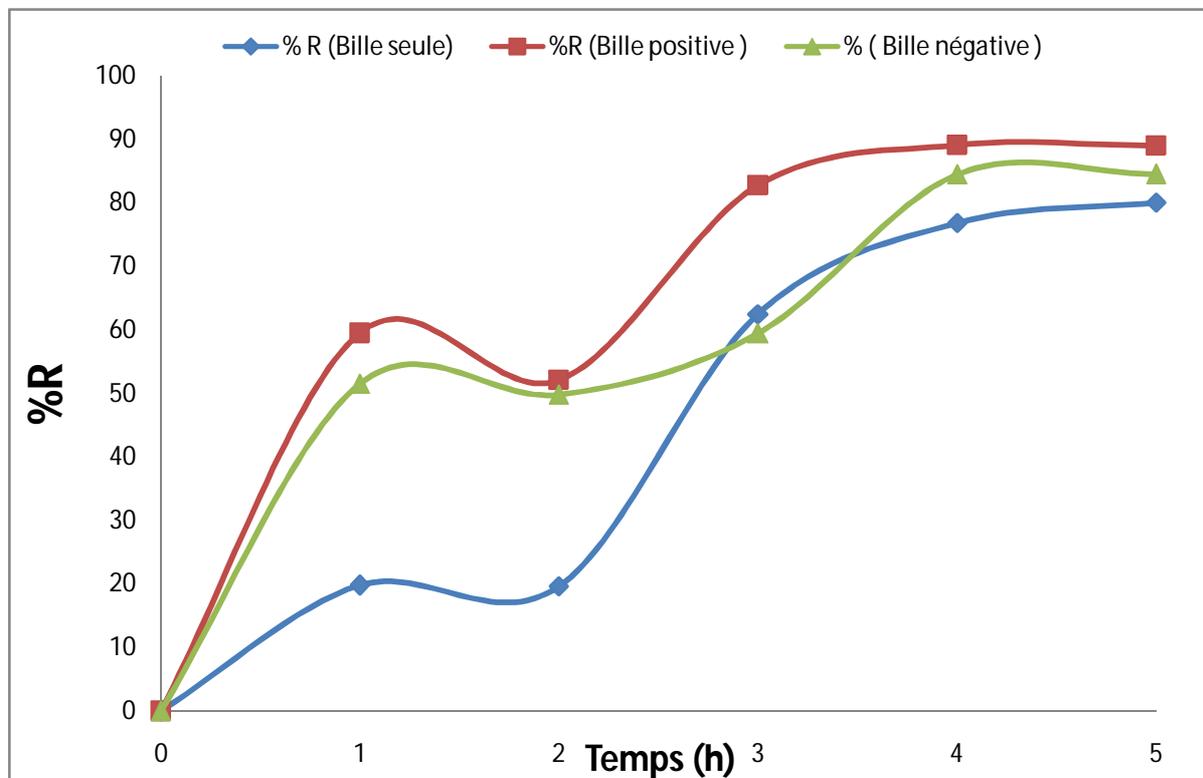


Figure 28 : Pourcentage de réduction sur billes d'alginate (dans milieu ISP9) 200mg/l de xylène.

D'après Daugulis [87], le coefficient de partage octanol/eau, permet de qualifier l'hydrophobicité d'une molécule. Plus il est important, plus la molécule aura tendance à s'adsorber sur une surface solide, cette note a été soulignée dans ces résultats dont on remarque une capacité élevée d'adsorption (70%) pour des billes d'alginate seules, suivie d'une proportion de 80% d'élimination remarquable pour des billes à biomasse inactive, ces pourcentages de réduction sont relativement élevés, par exemple, l'ajout du charbon actif permet de traiter jusqu'à 95% d'un effluent contenant jusqu'à 80 mg.l⁻¹ de benzène [88]. Mais dans tous les procédés avec ajout d'adsorbant, les capacités d'adsorption tendent à diminuer avec le temps, à cause d'une diminution des sites actifs libres. Une fois saturé, l'adsorbant doit être remplacé ou régénéré. La régénération chimique ou thermique est un procédé qui peut être coûteux et limité par des composés adsorbés de façon irréversible [89].

La biorégénération apparaît alors comme une alternative tout aussi efficace et beaucoup moins coûteuse, dans notre cas cette biorégénération est réalisée par l'introduction d'une biomasse active au sein des billes gélifiées, le taux de réduction de cette matrice dans un milieu à 200mg.l^{-1} du xylène est rapporté dans la figure 29. Une augmentation de l'élimination du substrat par des souches vivantes immobilisées dans les billes d'alginate jusqu'à atteindre les 85% après 4 h d'incubation, des floculations d'élimination sont observées à la 2^{ème} h, qui sont probablement dus à la désorption du substrat, la biodégradation de composés dissous dans le milieu peut entraîner une désorption des composés fixés sur l'adsorbant. La libération de sites actifs de l'adsorbant est alors permise par un gradient de concentration favorable [90]. Cette libération permet à son tour la reprise d'adsorption, après 5-6 h d'incubation, l'élimination du xylène a pris ses maximum (90%), au-delà, on remarque l'explosion et la dissolution de billes, celle-ci revient probablement à la croissance bactérienne à l'intérieure des billes, l'étude bibliographique montre que la présence du milieu biologique permet de régénérer l'adsorbant, mais le développement de la biomasse peut limiter l'adsorption par les phénomènes de colonisation et relargage d'adsorbant [91], selon Doleyres [92], 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.

Une petite comparaison des graphes rapportés à la figure 29, nous montre que les pourcentages de réduction des différents types de billes ne se différencient pas trop (80-90%), mais il est clairement remarquable que la vitesse de dégradation n'est pas la même, au premières heures d'incubation des billes à cellules actives a montré une élimination de 60% du xylène, tandis que les billes sans biomasse ne dépassent pas les 20%, on peut alors conclure que la biomasse introduite dans les billes d'alginate accélère la réduction du xylène.

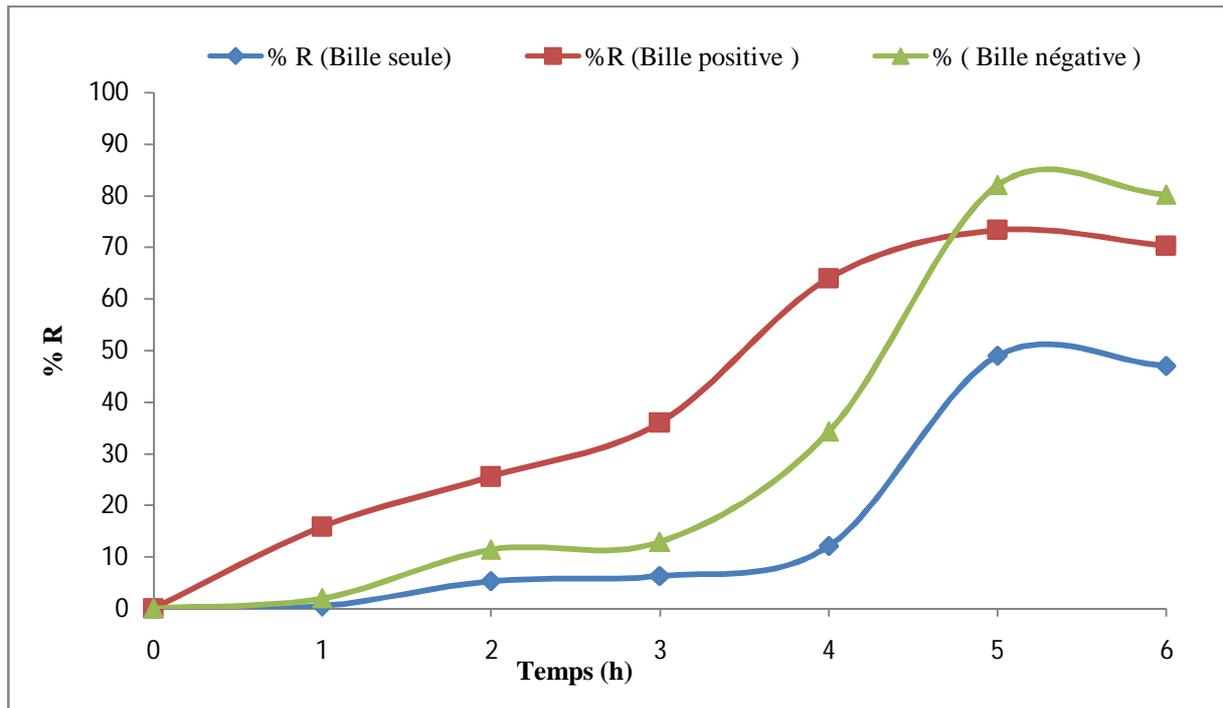


Figure 29 : Pourcentage de réduction sur billes d'alginate (dans milieu ISP9) 100 mg.l⁻¹ de xylène.

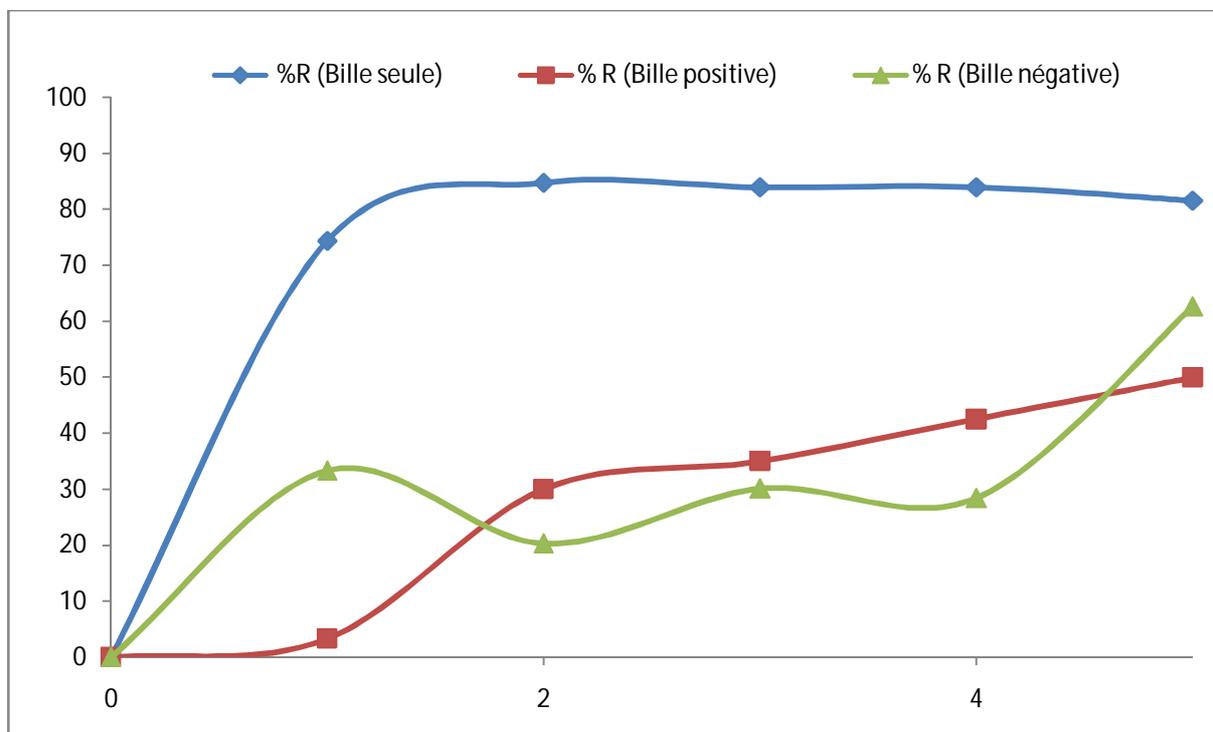


Figure 30 : Pourcentage de réduction sur billes d'alginate (dans l'eau) 100mg/l de xylène.

Les figures ci-dessus (30 et 31) expriment la variation du taux de réduction du xylène à 100mg.l^{-1} par différents types de billes et dans différents milieux (ISP9, Eau).

D'après la figure 30, le taux d'élimination du xylène par les billes sans biomasse est largement faible par rapport à celui des billes avec biomasse (active et inactive), dont on remarque qu'après 4 heures d'incubation le xylène a été réduit de plus que 60% par les billes à biomasse active ou par des cellules immobilisées, et 35% par des billes à biomasse inactive, tandis qu'elle ne représente que moins de 10% de réduction par les billes sans biomasse. Cette diminution revient probablement à une adsorption compétitive des composés du milieu ISP9 cette compétition est confirmée par l'obtention d'une bonne cinétique d'éliminations lors d'introduction des billes dans de l'eau.

En comparant les deux graphes des figures 29 et 30, le pourcentage de la réduction du xylène par les billes à biomasse active a diminué de 90% à 70%, pour les concentrations de 200 et 100mg.l^{-1} respectivement.

Cette diminution pourrait être due à :

- La concentration 100mg/l , est une concentration faible et peut être considérée insuffisante pour pouvoir être "transformée", la substance doit impérativement être accessible aux microorganismes.
- 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 des quantités non homogènes des cultures bactérienne).

L'introduction des billes dans l'eau à 100mg.L^{-1} de xylène a donné les résultats illustrés à la figure 31.

Selon les graphes obtenus on remarque une réduction lente et faible du xylène par les billes à biomasse active, cette diminution est probablement liée à l'activité bactérienne qui s'est affaiblie dans un milieu pauvre (eau) et une concentration du substrat jugée faible.

L'élimination par des billes à biomasse active introduite dans l'eau montre des taux faibles comparés à celle obtenue par des billes sans biomasse, ceci peut être expliqué par l'occupation des sites actifs dans le premier type de billes, tandis qu'ils sont libres dans des billes sans biomasse.

On peut donc conclure que la souche bactérienne croît sur les macrospores de l'adsorbant tout en occupant les sites actifs, alors toutes anomalies ou diminution du fonctionnement bactérien (dégradation) affectent le phénomène d'adsorption chez les billes à biomasse active.

Même après 3 semaines d'incubation des billes dans l'eau à 100mg.L^{-1} de xylène, elles n'ont montré aucun cas d'explosion ou de dissolution.

Par conséquent la croissance bactérienne est jugée d'être responsable de l'explosion de billes et le relargage cellulaire.

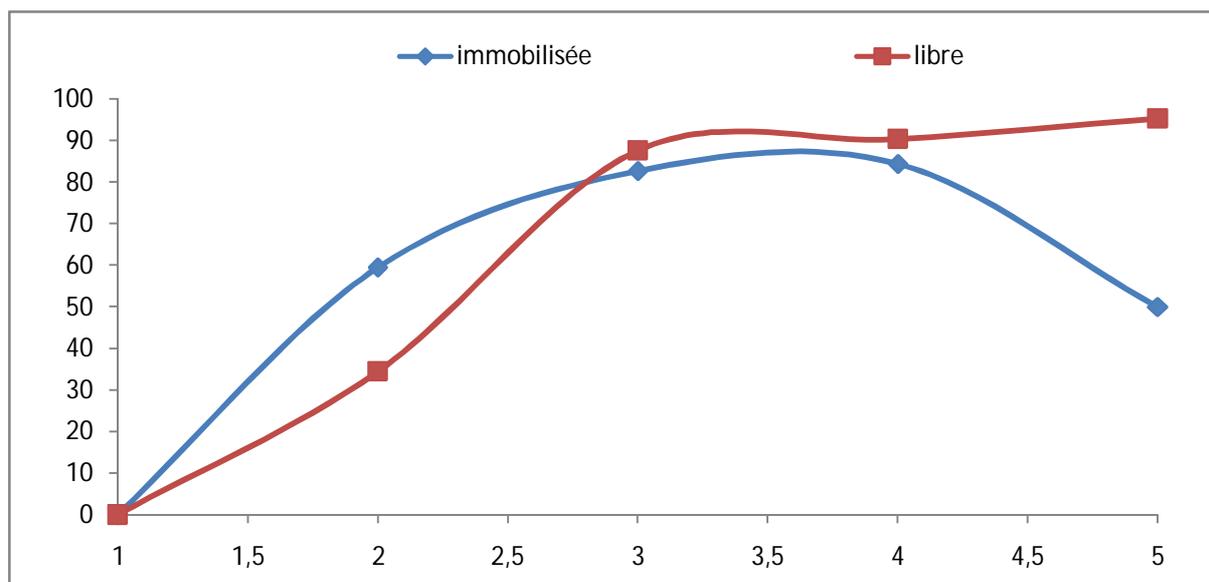


Figure 31 : Etude comparatif de biodégradation du xylène par des souches libres et immobilisées.

La figure 32 exprime le pourcentage de réduction du xylène à 200mg.l^{-1} par des souches libres et immobilisées sur billes d'alginate de sodium.

Les quatre premières heures montrent un taux de dégradation croissant pour les deux formes de billes avec une élimination de plus de 60% par les souches immobilisées au deux premières heures tandis qu'elle n'est qu'à 30% par les cellules libres cette différence revient probablement à la protection des billes aux souches contre certains effets inhibiteurs [50].

Après trois heures d'incubation on remarque des taux d'élimination similaires pour chaque type de souche, alors on peut conclure que l'immobilisation des *Streptomyces* sur billes d'alginate de sodium semble être efficace dont elle montre des taux d'élimination élevés (85% à 90%), mais au-delà de 5h cette encapsulation n'aura plus d'effet alors que les cellules libres continueront leur dégradation pour atteindre les 99,99%, cette diminution a été remarquée

l'heure de l'explosion des billes, qui a entraîné un relargage cellulaire causé principalement par la croissance bactérienne [93].

Le contact direct entre les cellules bactériennes et le substrat favorise sa biodégradation (le substrat devient plus disponible), cette disponibilité à son tour a favorisé l'augmentation des taux de réduction du xylène par les cellules libres, contrairement à celles immobilisées dans des matrices poreuses.

IV.4. Immobilisation par l'attachement à un support « Application sur sol contaminé »

L'incubation sur un sol contaminé par le xylène a donné les résultats suivants :

- **Résultats de la méthode de confirmation biologique**

Une croissance importante sur boîtes d'ISP9_{idéal} repiquées à partir des échantillons de dégradation tandis qu'une absence totale sur boîtes issues du repiquage des témoins (biologiques et chimiques).

Une croissance moins importante sur boîtes de xylène (figure 33), mais le suivi par dénombrement (figure 34), a montré qu'au 1^{er} jour la présence de 650 colonies bactériennes qui devient 756 colonies au bout du 2^{ème} jours prouvant une augmentation de 106 colonies par jour, l'apparition de 81 nouvelles colonies au 3^{ème} jours montre toujours la croissance de nouveaux germes même après trois jours d'incubation et ceci révèle l'adaptation de la microflore tellurique (représentée ici par les spores et cellules végétatives de la souche AB1).

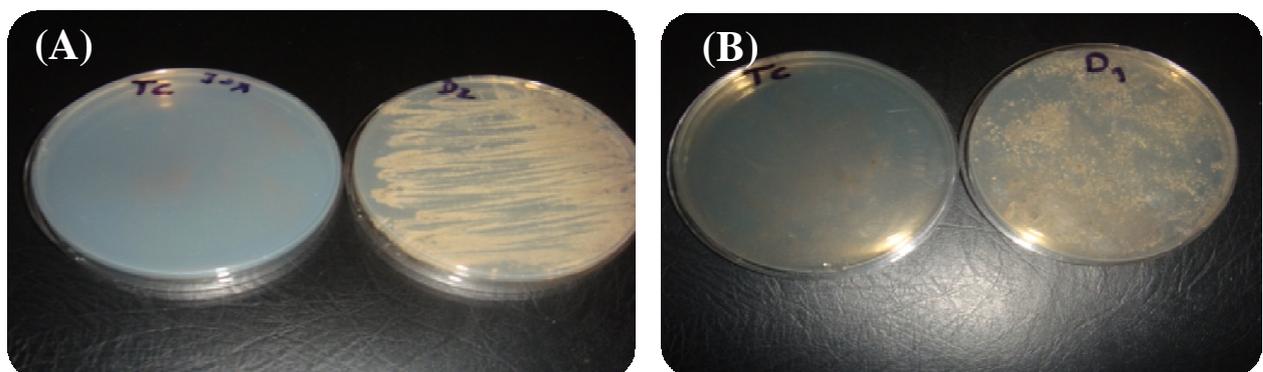


Figure 32 : Croissance bactérienne après 3 jours d'incubation, (A) : sur boîtes d'ISP9 ; (B) : sur boîtes de xylène.

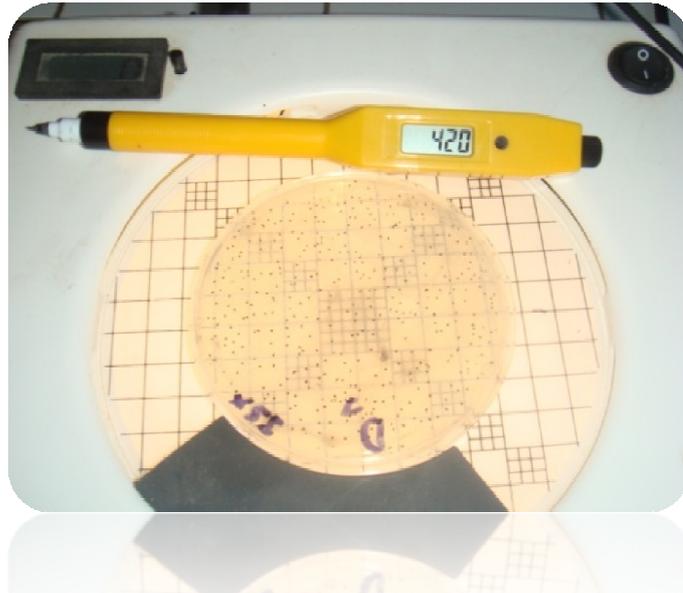


Figure 33 : Suivre par dénombrement de la croissance bactérienne sur boîtes de xylène. L'adsorption de la culture bactérienne sur le sol a été visualisée par microscope optique (Gx100) (figure 35).

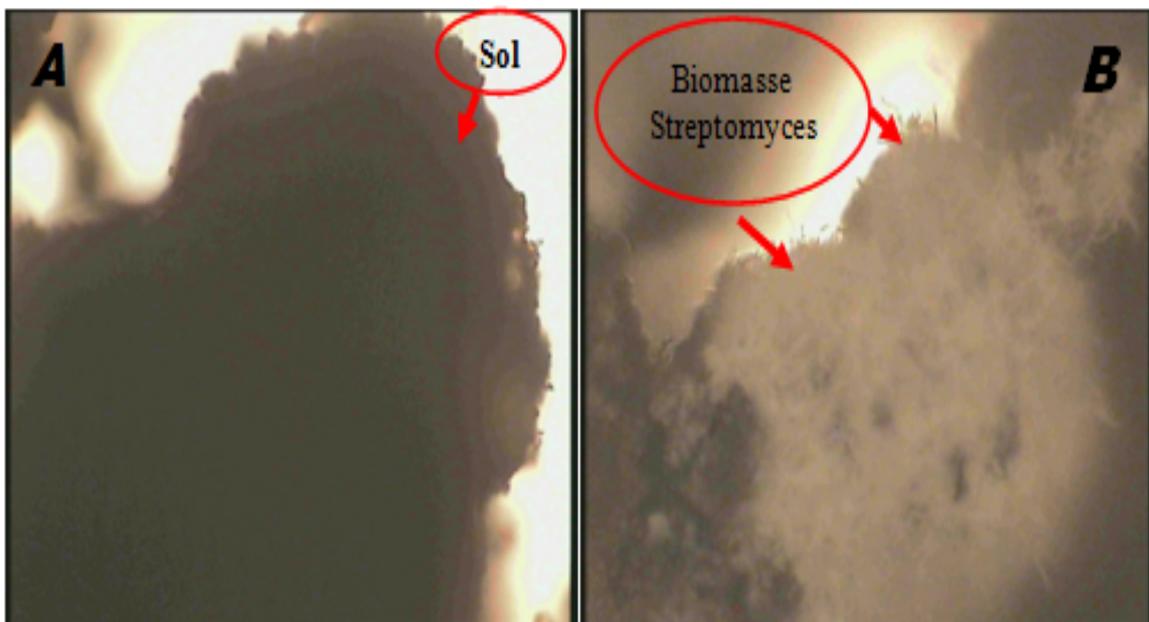


Figure 34 : Vue sous microscope optique (Gx100) du sol A : avant incubation, B : après incubation.

- **Résultats de la méthode de confirmation spectroscopique**

Les résultats d'analyse du xylène résiduel des échantillons par spectroscopie UV-vis sont représentés dans la figure suivante :

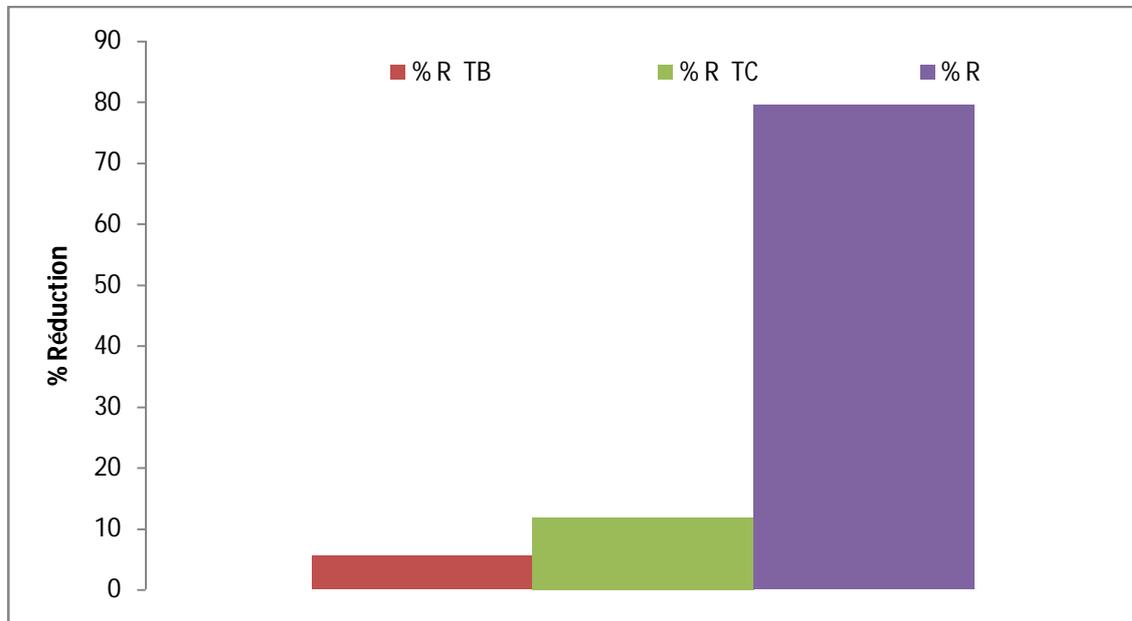


Figure 35 : Pourcentage de réduction du xylène dans différents échantillons : TB : Témoin Biologique ; TC : Témoin Chimique ; R : Pourcentage de réduction.

A une absorbance initiale égale à 0,127, cette dernière n'a été trouvée qu'à 0,026 dans les Erleynes de dégradation, exprimant alors les 79,52% de réduction du xylène. Ce pourcentage d'élimination peut inclure celui de l'adsorption par les grains du sol ou par celle des membranes cellulaires des souches détruites existantes dans le sol [84], cette approche a été dis confirmé par les faibles réductions des teneurs en xylène (11%) dans les témoins chimiques contenant que du sol + xylène.

La concentration initiale du xylène introduite dans les témoins biologique a eu tendance à rester constante même après 3 jours d'incubation, dont on remarque que 5% de cette concentration qui disparaisse, ce qui nous permet d'en déduire que l'adsorption du xylène par le mycélium des souches détruites existantes dans le sol ne présente pas un pourcentage important dans son élimination.

Les résultats obtenus à partir des témoins chimiques et biologiques confirment que les 79% d'élimination du xylène du sol, reviennent principalement à la biodégradation par les *Streptomycètes* vivantes qui sont attachées au sol.

La mise en contact des *Streptomycètes* avec le sol a induit une croissance très importante de cette souche microbienne sur ce support solide, la figure 35 illustre la colonisation totale des cultures bactériennes les pores du sol incubé, sachant que cette adsorption est obtenue sans ajout d'agents chimiques, on peut alors conclure que la souche AB1 éprouve une grande affinité au surfaces du sol de la région de la Mitidja ce qui assure son immobilisation cellulaire par adsorption à une matrice préformée ou support solide [48].

CONCLUSION

CONCLUSION

Bien que l'utilisation des xylènes présente un intérêt pratique et économique considérable, en particulier comme solvant dans différents industries, mais ils présentent certainement une sérieuse source de pollution lors des rejets dans la nature.

L'objectif fixé de notre travail de recherche est de contribuer à la biodégradation du xylène à l'aide des microorganismes appartiennent aux Streptomycètes isolés à partir du sol de la région de la Mitidja.

Cette étude a permis de faire un premier constat de l'influence du xylène sur ce type de microorganismes. L'élément majeur qui ressort de ces expériences est que la souche utilisée est en mesure de croître en présence du xylène, même si la concentration de celui-ci atteint les 300mg.l⁻¹.

Par cette recherche, un intérêt particulier est tirer vis-à-vis la tolérance de ces bactéries face aux solvants organiques toxiques. Il serait donc intéressant de tester une variété de composés sur la souche *Streptomycètes* AB1 pour connaître l'étendue de leur tolérance.

L'étude du potentiel biodégradatif du xylène a été aussi réalisé en étudiant l'influence du pH et la concentration du substrat sur cette dégradation par l'incubation des microorganismes libres dans un milieu contenant le xylène comme seule source de carbone et d'énergie, la durée d'incubation vise à permettre sa dégradation totale.

Il ressort de ces expériences que la souche utilisée est capable de dégrader le xylène. Cette dégradation peut atteindre un pourcentage de 99,95% en moins de 5 heures à 30°C et pH égale 6,2, cette dégradation a été accompagnée par la production de métabolites intermédiaires ce qui confirme l'utilisation de ce solvant comme source de carbone et donc sa destruction totale. Au vu des résultats obtenus nous pouvons donc en conclure que le xylène est facilement biodégradable par la souche AB1.

L'immobilisation des Streptomycètes par différents techniques a permis d'en déduire les points suivants :

- Dans le cas de l'immobilisation dans des matrices poreuses « billes d'alginate de sodium » : En premier lieu l'essai de l'encapsulation des *Streptomycètes* dans des billes d'alginate de sodium a été réalisé avec succès, l'introduction de cette souche bactérienne immobilisée dans un milieu à 200mg.l⁻¹ et 100mg.l⁻¹ de xylène a montré des taux élevés d'élimination respectivement (90%, 70%), mais dans un milieu ISP9 la durée d'incubation ne

peut dépasser les 5 heures, afin d'éviter tous relargage cellulaire et l'explosion des billes, par contre celles introduites dans l'eau résistés au-delà de 3 semaines.

- L'immobilisation par l'attachement à un support solide « sol contaminé » :

L'attachement des cellules bactériennes sur le sol de la région de la Mitidja peut être observé à l'œil nu, dont on remarque une croissance bactérienne très importante sur les grains du sol contenant le xylène comme seul source de carbone et d'énergie. L'analyse spectroscopique du xylène résiduel du sol a confirmé l'élimination de 79% du xylène initiale qui reviennent principalement à la biodégradation par les *Streptomyces* attachées au sol et non pas par adsorption sur les grains du sol ou le mycélium des souches préexistantes dans ce sol.

Cette présente étude permet de retenir les potentialités des souches sélectionnées en tant que fortes dégradatrices des hydrocarbures monoaromatiques et de souligner l'importance du sol Algérien comme un biotope bien adapté pour rechercher les microorganismes ayant une capacité multiple en vue d'une application environnementale fortement souhaitable.

En perspective, il serait souhaitable de compléter cette étude par une approche plus approfondie à savoir :

- L'optimisation d'autres paramètres de traitement (enrichissement par nutriments, salinité du milieu et le volume d'inoculum) ;
- Une analyse qualitative de la dégradation du xylène qui permettrait de mieux comprendre le mécanisme microbien impliqué dans notre étude ;
- Mise en évidence des enzymes responsables à la biodégradation ;
- Caractériser le potentiel de production des biosurfactants, et l'exploiter pour la bioremédiation des sites contaminés ;
- Renforcer l'étude de la dégradation immobilisées par l'optimisation de quelques paramètres ;
- Utiliser cette souche à fort potentiel dégradatif du xylène dans le montage d'un prototype de biofiltre en vue d'une application dans l'élimination des COV.

GLOSSAIRE

A :

Acide succinique : Diacide carboxylique aliphatique, dénommé également acide butane-1,4-dioïque et de formule semi-développée $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$.

Aérobic : Capacité (ou le besoin) d'un organisme ou micro-organisme à se développer dans un milieu saturé en oxygène.

Anabolisme : Ensemble des réactions chimiques des organismes vivants permettant la synthèse de métabolites essentiels par l'alimentation.

Anaérobic : Capacité (ou le besoin) d'un organisme ou micro-organisme à se développer dans un milieu où il n'y a pas présence de dioxygène (O_2).

Anthropique : En écologie, tous ce qui est résultat de l'activité humaine.

Asporulées : Type de reproduction sans spores qui se trouvent dans les sporanges.

Asthénie : Affaiblissement de l'organisme, fatigue physique. Elle peut concerner l'état psychique, la libido ou l'intellect.

B :

Biofilm : Des communautés multicellulaires adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.

Bioréacteur : Fermenteur ou propagateur, est un appareil dans lequel on multiplie des micro-organismes pour la production de biomasse, pour la production d'un métabolite ou encore la bioconversion d'une molécule d'intérêt.

Bioremédiation : Consiste la décontamination des milieux pollués au moyen de techniques issues de la dégradation par activités d'organismes vivants

Biosurfactants : Substances tensio-actifs synthétisées par les cellules vivantes.

C :

Catabolisme : Ensemble des réactions de dégradations moléculaires de l'organisme considéré.

Céphalée : Symptôme subjectif se définissant comme des douleurs locales ressenties au niveau de la boîte crânienne, parfois unilatérales ou généralisées.

Clivage : Aptitude de certains composés à se fracturer selon des surfaces planes dans des directions privilégiées lorsqu'ils sont soumis à un effort mécanique (un choc ou une pression)

Cométabolisme : Cosubstrat permettant la croissance des micro-organismes.

Craquage pyrolytique : Cassure de molécule organique complexe en éléments plus petits, notamment des alcanes, des alcènes, des aldéhydes et des cétones à 500 °C environ.

D :

Dermatose : Toutes affections de la peau, indépendamment de leur cause. Il désigne également les pathologies des muqueuses et des annexes cutanées (les phanères : ongles et cheveux).

E :

Enzyme : une protéine qui joue un rôle de catalyseur biologique (ou *biocatalyseur*), composé qui facilite une réaction biochimique sans en modifier les produits.

F :

Facteurs biotiques : Ils constituent une partie des facteurs écologiques de l'écosystème. Il s'agit des ressources alimentaires, des relations trophiques de coopération, compétition.

Fermentation : Réaction biochimique de conversion de l'énergie contenue dans une source de carbone en une autre forme d'énergie directement utilisable par la cellule en anaérobie.

G :

Génotoxicité : Atteinte de l'intégrité physique cassure chromosomique ou fonctionnelle du génome.

H :

Hydrolyse : Décomposition par l'eau grâce aux ions H_3O^+ et HO^- provenant de la dissociation de l'eau.

I :

Inhibiteur : Composé qui ralentit une réaction chimique ou biochimique.

Isomères : Molécule organique qui possède la même formule brute qu'une autre molécule, mais qui a une formule semi-développée ou une formule développée différente.

M :

Métabolisme : Est l'ensemble des transformations moléculaires et énergétiques qui se déroulent de manière ininterrompue dans la cellule ou l'organisme vivant.

O :

Oxygénases : Enzymes ayant pour fonction d'introduire un dioxygène réduit dans une protéine.

Ozone photochimique : Les oxydes d'azote réagissent dans la troposphère, sous l'effet du rayonnement solaire, pour former de l'ozone photochimique, aux propriétés oxydantes.

P :

Percolation : Processus physique critique qui décrit pour un système, une transition d'un état vers un autre.

Photo oxydation : Oxydation sous l'effet de l'énergie lumineuse (énergie photonique).

Photolyse : Toute réaction chimique dans laquelle un composé chimique est décomposé par la lumière.

Prolifération : Division incontrôlée et excessive de cellules.

Pyruvate : $\text{CH}_3\text{-CO-COO}^-$, un métabolite clé situé au carrefour de plusieurs voies métaboliques majeures des cellules vivantes (cycle de Krebs) dans la mitochondrie

R :

Reformage catalytique : Méthode de raffinage pour convertir les molécules naphthéniques en molécules aromatiques ayant un indice d'octane élevé.

S :

Saprophyte : Tout microorganisme capable de se nourrir de matière organique non-vivante par l'intermédiaire d'une membrane, suite à une réaction enzymatique.

T :

Toxicité aiguë : Toxicité induite par l'administration d'une dose unique et massive de toxique, dose qui risque à 50 % de tuer un être vivant. Parfois notée LD_{50} , de l'anglais *Lethal Dose 50 %*.

Troposphère : Partie de l'atmosphère terrestre située entre la surface du globe et une altitude d'environ 8 à 15 kilomètres.

V:

Voie métabolique : Concept recouvrant un ensemble de réactions biochimiques (anaboliques ou cataboliques) liées par un substrat. C'est un ensemble ordonné d'enzymes et substrats.

X:

Xénobiotique : Substance qui est étrangère à l'organisme vivant possédant des propriétés toxiques, même à très faible concentration (exemple des pesticides).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]: P. E. Douben; "PAHs: An Ecotoxicological Perspective"; John Wiley & Sons Ltd, Sharnbrook, Bedford UK; (2003).
- [2]: M.F. Denissenko, A. Pao, M. Tang, G.P. Pfeifer; "Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots". *Science*; 274, (1996), P: 43 - 432.
- [3]: P. Negrea, F. Sidea, A. Negrea, L. Lupa, M. Ciopec, C. Muntean, "Studies regarding the Benzene, Toluene and o-Xylene Removal from Waste Water", *Chem.Bull. "POLITEHNICA" Univ. Volume 53(67)*; (2008); P: 1-2.
- [4]: S. Silva, G. Matthew, R. Lucia 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); P: 224–229.
- [5]: Chen Lin, Li Gan, Zu-Liang Chen; "Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN)", *Journal of Hazardous Materials*; 182; (2010); P: 771–777.
- [6]: J. Jn-Gyung, P. Chang-Ho; "Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, m-xylene (BTEX), and their mixtures"; *J. Biosci. Bioeng*; (2004); P: 97- 429.
- [7]: A. Machnicka, J. Suschka; "Activity of selected microorganisms and mixtures in BTX biodegradation", *Polish J. Environ. Studies*; 10; (2001); P: 341.
- [8]: L. Jecu, A. Gheorghe, G. Epure, F. Popea, A. Rosu, A. Roseanu; "A biological treatment for the purification of wastewaters containing volatile organic compounds"; *Proceedings of Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering RICCCCE 15th*; Sinaia (Romania); (2007); P: 20-22.
- [9]: S.H. Yeom, A.J. Daugulis; "Benzene degradation in a two-phase partitioning bioreactor by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234"; *Process Biochemistry*; 36; (2001); P: 765-772.
- [10]: K. Reardon, D.C. Mosteller, J.D.B. Roger; "Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1"; *Biotechnol, Bioeng*; 69; (2000); P: 385- 400.
- [11]: M.L. Paje, I. Couperwhite; "Benzene metabolism via the intradiol cleavage in a *Rhodococcus* sp"; *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*; 12; (1996); P: 653-654.

[12] : S. Ferhata, S. Mnif, A. Badisa, K. Eddouaoudaa, R. Alouaoui, A. Boucherit, N. Mhiri, N. Moulai-Mostefa, S. Sayadi.; “Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by Ochrobactrum sp. 1C and Brevibacterium sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils”; International Biodeterioration & Biodegradation; 65; (2011); P: 1182-1188.

[13] : F.Z. Ferradji ; “Optimisation de la biodégradation des acides humiques par des souches microbiennes isolées á partir de différentes niches écologiques de l'Algérie”; Mémoire de Magister en chimie industrielle Spécialité : génie de l'environnement ; Université Saad Dahleb de Blida ; (2008).

[14] : A. Badis, F.Z. Ferradji, A. Boucherit, D. Fodil, H. Boutoumi; “Removal of natural humic acids by decolorizing actinomycetes isolated from different soils (Algeria) for application in water purification”; Desalination; 259; (2010); P: 216–222.

[15] : T. Annabelle ; “Guide pratique : information décision intervention“ ; Centre de Documentation de Recherche et d'Expérimentations sur les Pollutions Accidentelles des Eaux (Cedre) ; (2007).

[16]: M. Warne; “Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health: Toluene, Ethylbenzene and Xylenes (TEX)”; Scientific Supporting Documents; Ecosystem Health : Science-based Solutions, National Guidelines and Standards Office, Water Policy and Coordination Directorate; Environment Canada, Ottawa, Report N°= 1-9; (2005); P: 84.

[17]: <http://en.wikipedia.org/wiki/Xylene>

[18]: C. H. Walker, S. P. Hopkin, R. M. Sibly Et D. B. Peakall; “Principles of Ecotoxicology”; Taylor & Francis Group, Boca Raton FL; (2006); P: 315.

[19]: J-P. Vandecasteele ; “Microbiologie pétrolière - concepts, implications environnementales, applications industrielles“ ; Publications de l'institut français du pétrole ; Paris ; (2005) ; P : 412.

[20]: INERIS (Institut national de l'environnement et des risques) ; Données technico-économiques sur les substances chimiques en France ; Xylène ; (2006) ; P :29.

<http://www.ineris.fr/fr/rapports-d%C3%A9tude/toxicologie-et-environnement/fiches-dedonn%C3%A9es-toxicologiques-et-environnementales>.

[21] : Loi canadienne sur la protection de l'environnement ; Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation – xylène ; Gouvernement Du Canada, Ottawa ; (1993) ; P: 36.
<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl1-lsp1/xylenes/index-fra.php>.

[20] : INRS (Institut national de recherche et de sécurité); Fiche toxicologique FT77 (xylène), Paris ; (2009) ; P : 10.

[23] : H. Khartoum ; “Contribution à l’étude de la pollution de l’air par les composés aromatiques BTEX - Cartographie de la pollution à Alger“; Mémoire de Magister Génie de l’environnement ; Ecole nationale supérieure polytechnique ; Alger ; (2009).

[24] : Environnement Canada ; “Recommandation canadienne pour la qualité des sols“, xylènes ; (2004) ; <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/fr/199/>

[25]: K.A.Brice and R.G. Derwent; “Emission inventory for hydrocarbons in the United Kingdom” ; Atmos. Environ; 12; (1978); P: 2045-2054.

[26]: B.J.F. Finlayson-Pitts And J.N. Jr. PITTS; “Atmospheric chemistry Fundamentals and experimental techniques”; John Wiley; New York; (1986); P: 1098.

[27]: D.Mackay, P.J. Leinonen; “Rate of evaporation of low-solubility contaminants from water bodies to atmosphere”; Environ. Sci. Technol; 9; (1975); P: 1178-1180.

[28]: USEPA (United States Environmental Protection Agency); “Occurrence of synthetic organic chemicals in drinking water, food, and air”; Office of Drinking Water, Washington; (1987); P: 175.

[29]: T. A. Anderson, J. J. Beauchamp, B. T. Walton; “Fate of volatile and semi-volatile organic chemicals in soil , Abiotic versus biotic losses”; J. Environ. Qual; 20; (1991); P: 420-424.

[30]: H.M. Seip, J. Alstad, G.E.Carlberg, K. Martinsen and R. Skaane; “Measurement of mobility of organic compounds in soils”; Sci. Tot. Environ; 50; (1986); P: 87-101.

[31]: R.L.Johnson, J.A. Cherry and J.F. Pankow; “Diffusive contaminant transport in natural clay: a field example and implications for clay-lined waste disposal sites”; Environ. Sci. Technol; 23; (1989); P: 340-349.

[32]: M.W. Aurelius, K.W.Brown; “Fate of spilled xylene as influenced by soil moisture content”; Water Air Soil Pollut; 36;(1987); P: 23-31.

[33]: CSST (Commission de la santé et de la sécurité du travail) ; Service du répertoire toxicologique – Xylène ; Numéro CAS : 1330-20-7, (2007).

http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=92619&nom=Xylene

[34]: J.F. Barker; “Volatile aromatic and chlorinated organic contaminants in groundwater at six Ontario landfills”; Water Pollut. Res. J. Can; 22; (1987); P: 33-48.

[35]: S. Lesage, J.K. Ritch , E.J. Treciokas; “Characterization of groundwater contaminants at Elmira, Ontario, by thermal desorption, solvent extraction GC-MS and HPLC”; Water Pollut. Res. J. Can; 25; (1990); P: 275-292.

- [36]: E. Koller ; “Traitement des pollutions industrielles Eau, Air, Sol, Boues“ ; Dunod, Paris ; (2004) ; P : 259-269.
- [37] : MEDD (Ministère de l’environnement et du développement durable), La réduction des émissions des précurseurs de l’ozone, Paris ; (2003).
- [38]: C.Kennes, F.Thalasso ; “Waste gas biotreatment technology“; *J. Chem. Technol. Biotechnol* ; 72 ;(1998) ; P : 303-319.
- [39] : Marie-Hélène Labrecque; “Étude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène“; *Maîtrise en microbiologie agricole* ; Université Laval ; (2003).
- [40]: A. Samuel, C. Danny; “Landfill Biodegradation An in-depth look at biodegradation in landfill environments”, Bio-Tec Environmental, ENSO Bottles; (2009).
- [41]: Joseph-Pierre Guiraud ; “Microbiologie alimentaire“; Dunod ; Paris ; (1998); P : 13-15.
- [42] : K.A. Djefal ; “Biodégradation des hydrocarbures aromatiques poly cyclique par des souches de *Rhodococcus* libres et immobilisées“ ; thèse de doctorat ; université USTHB ; Alger ; (2008).
- [43] : S. Amir ; “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 ; institut national polytechnique ; Toulouse; (2005).
- [44]: S.F. Karel ; B. Libicki, C.R. Robertson ; “The immobilization of whole cells“; *Chem Eng. Sci*; 40;(1985); P: 1321-1354.
- [45] : I. Arab, H. Messaoudi ; “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“; *PFE Génie de l’environnement*; USDB; Blida ; (2010).
- [46] : Y. Doleyres ; “Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées“; thèse doctorat en sciences et technologie des aliments ; université Laval Québec ;(2003).
- [47]: W.M. Dunne; “Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately”; *Clin. Microbiol Rev*;15; (2002); P:155-66.
- [48] : F. Grattepanche ; “Étude d’un système de pré fermentation continu du lait par une culture mixte immobilisées fonctionnelle“; thèse de doctorat ; université Laval Québec;(2005).
- [49] : S.F. Karel, B. Libicki, C.R. Robertson; “The immobilization of whole cells”; *Chem. Eng. Sci*; 40 ; (1985); P:1321-1354.
- [50]: A.Groboillot, D.K.Boadi, D.Poncelet, R.J.Neufeld; “Immobilization of cells for application in the food industry”; *Crit. Rev. Biotechnol*; 14; (1994); P :75-107.

- [51] : J .Huang, C .Lacroix, H. Daba, R.Simard; “Pediocin 5 production and plasmid stability during continuous free and immobilized cell cultures of *Pediococcus acidilactici*”; *J. Appl. Bacteriol* ; 80; (1996); P: 635-644.
- [52]: E.A. Edwards, L.E.Wills, D.Grbic-Galic, M.Reinhard; “Anaerobic degradation of toluene and xylene - evidence for sulphate as the terminal electron acceptor; dans R.E. Hinchee et R.F. Olfenbittel, éd *In Situ Bioreclamation*”; Boston, Butterworth- Heinemann; (1991); P: 463-471.
- [53]: H.H. Attaway, M.G. Schmidt; “Tandem Biodegradation of BTEX Components by Two *Pseudomonas* sp”; *Current Microbiology*; 45, (2002); P: 30-36.
- [54]: F.X. Prenafeta-Boldu, J. Vervoort, J.T.C. Grotenhuis, J.W. van Groenestijn; “Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp strain T1”; *Applied And Environmental Microbiology* ; 68, (2002); P: 2660-2665
- [55]: J.V Littlejohns, A.J. Daugulis; “Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium”; *Process Biochemistry*; 43, (2008); P: 1068-1076.
- [56]: D.T. Gibson, V. Subramanian; “Microbial degradation of aromatic hydrocarbons”; éd: *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Marcel Dekker; New York; (1984); P:181.
- [57]: J.F. Davey, D.T. Gibson; “Bacterial metabolism of para- and meta-xylene: oxidation of a methyl substituent”; *J. Bacteriol*; 119; (1974); P: 923-929.
- [58]: D.T. Gibson, V. Mahadevan, J.F. Davey; “Bacterial metabolism of para- and meta-xylene: oxidation of the aromatic ring”; *J. Bacteriol*; 119; (1974); P: 930-936.
- [59]: R.L. Raymond, V.W. Jamison, J.O. Hudson; “Microbial hydrocarbon co-oxidation. I. Oxidation of mono- and dicyclic hydrocarbons by soil isolates of the genus”; *Nocardia. Appl. Microbial*; 15; (1967); P: 857-865.
- [60]: G. Baggi, P. Barbieri, E. Galli, S. Tollari; “Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene”; *Appl Environ Microbiol*; 53; (1987); P : 2129-2132.
- [61]: G. Negraia; “ Impact écotoxicologique des hydrocarbures monoaromatiques dans l’environnement au Canada”, *Grade de maîtrise en environnement (M. Env.)* ; Sherbrooke ; Canada ; (2010).

- [62]: C. Priyanka, S. Richa, B. S. Shashi, N. Lata; "Bioremediation of PAH by *Streptomyces* s"; Bull Environ Contam Toxicol; 86; (2011); P: 268–271.
- [63] : F. Zermane; "Étude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques, et des composés organiques de synthèse"; thèse Magistère; Université Mentouri; Constantine; (2008).
- [64] : S. Rebbani ; "Étude de la biodégradabilité de l'anthracène par des souches de *Streptomyces* libres et immobilisées", mémoire de Master, Option : Procédé de traitement des effluents et protection de l'environnement ; USDB; Blida ; (2011).
- [65]: H. Gardin, J.M. Lebeault, A. Pauss; "Biodegradation of xylene and butyl acetate using an aqueous-silicon oil two-phase system"; Biodegradation;10; (1999); P: 193-200.
- [66]: H. Shim, S.T. Yang; "Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor"; J. Biotech;67; (1999); P: 99-112
- [67]: . M. Henrique Otenio, M. T. Lopes da Silva, M. L. Oliveira Marques, J. C. Roseiro ; E. D. Bidoia; "Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putidacmi* 852"; Brazilian Journal of Microbiology; 36; (2005); P: 258-261.
- [68]: S. Saghafi, Z. Bakhshi, D. Najafpour, E. I Kariminezhad, H. Amini Rad; "Biodegradation of Toluene and Xylene in an UAPB Bioreactor with Fixed Film of *Pseudomonas putida*"; American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci; 91; (2010); P: 01-07.
- [79]: R. Chakraborty, S.M. Connor, E. Chan ; J. D. Coates; "Anaerobic Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene Compounds by *Dechloromonas Strain RCB*"; Appl. Environ. Microbiol; 71(12); (2005); P:8649.
- [70]: Y. Kac, I. Arpa, S. Tan, A. denizli, O-mer Genc, Y. Arica; "Comparison of biosorption capacity of alginate and immobile live and heart inactivated *Phanerocheate Chrysosporium*"; Porc. Biochem; 37; (2002); P: 601-610.
- [71]: P. Xiangliang, W. Jianlong, Z.Daoyong; "Biosorption of Pb(II) by *Pleuotus Ostreatus*, immobilised in calcium alginate gel"; Proc. Biochem; 40; (2005); P: 2799-2803.
- [72]: Z. Aksu, F. Gonem; "Biosorption of phenol by immobilized activated sludge in a continuous packed bed: prediction of breakthrough curves"; Proc. Biochem; 39; (2004); P: 599-613.

[73]: M. Lezhari; “Preparation et caractérisation de supports adsorbants innovants à base d’argiles pontées et d’alginate : Application à l’adsorption de composés organiques et métaux lourds“ ; Thèse de Doctorat en Chimie industrielle ; USDB ; Blida ; (2011).

[74] : J. Sikkema, J.A.M. Bont, B. Poolman; “Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons”; *Microbiol Rev*;59; (1995) ; P: 12-22.

[75] : C. Delarras; “Microbiologie pratique pour le laboratoire d’analyses ou de contrôle sanitaire“; édition médicales internationales ; Paris; (2007).

[76] : P. Arnaud ; “Chapitre complémentaire du Cours de Chimie organique”; Dunod; 18e édition; (2009).

[77] : S. Chibi ; “Etude de la biodégradation des composés aromatiques et cycliques par des souches bactériennes isolées à partir du sol contaminé par le pétrole brut de la région de Hassi Messaoud“; Mémoire de Magister en Génie de l’environnement, USDB ; Blida ; (2010).

[78]: 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, LAEPSI / INSA ; Lyon; (2006).

[79] : http://biologie.univmrs.fr/upload/p247/fonction_mb_pl.pdf

[80] : A. Desaunay; “Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d’Hostun“; Thèse Doctorat, Spécialité : Océan, Atmosphère, Hydrologie ; Université de Grenoble ; (2011).

[81]: K. Ohlen, Y.K. Chang, W. Hegemann, C.R. Yin, S.T. Lee; “Enhanced degradation of chlorinated ethylenes in groundwater from a paint contaminated site by two-stage fluidized-bed reactor“; *Chemosphere*; 58; (2005); P: 373-377.

[82]: T.F. Guerin; “A pilot study for the selections of a bioreactor for remediation of groundwater from a coal tar contaminated site”. *Journal Of Hazardous Materials*; 89; (2002); P: 241-252.

[83]: M. Farhadian, D. Duchez, C. Vachelard, C. Larroche; “Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors”; A review. *Water Research*; 42; (2008); P: 1325-1341.

[84]: C.Y. Chiang, J.P.Salanitro, E.Y. Chai, J.D. Colthart, C.L. Klein; “Aerobic biodegradation of Benzen, Toluene, and Xylene in a Sandy Aquifer-Data Analysis and computer Modeling”; Vol.27, N°6; *Ground Water*; (1989).

- [85]: K. Reardon, D.C. Mosteller, J.D.B. Roger; “Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1”; Biotechnol. Bioeng; 69 ; (2000); P: 385- 400.
- [86]: F. Grattepanche; “Etude d’un système de pré fermentation continu du lait par une culture mixte immobilisées fonctionnelle”; thèse de doctorat ; université Laval Quebec ; (2005).
- [87]: A.J. Daugulis, T.B. Janikowski; “Scale-up performance of a partitioning bioreactor for the degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Sphingomonas aromaticivorans*”; Biotechnology Letters; 24; (2002); P: 591-594.
- [88]: M. Farhadian, C. Vachelard, D. Duchez, C. Larroche ; “In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater”; Bioresource Technology; 99; (2008); P: 5296.
- [89]: C.O. Ania, B. Cabal, C. Pevida, A. Arenillas, J.B. Parra, F. Rubiera, J.J. Pis; “Effects of activated carbon properties on the adsorption of naphthalene from aqueous solutions”; Applied Surface Science; 253; (2007); P: 5741-5746.
- [90]: G. Lesage ; “Etude de l’élimination de substances aromatiques dangereuses dans un procédé couplant adsorption et biodégradation“ ; Thèse de doctorat en Génie des Procédés et de l’Environnement; l’université de Toulouse; l’Institut National des Sciences Appliquées ; Toulouse; (2009).
- [91]: O. Aktas, F. Cecen; “Adsorption reversibility and bioregeneration of activated carbon in the treatment of phenol”; Water Science and Technology; 55; (2007); P: 237-244.
- [92] : D. Yann ; “Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées” ; thèse de doctorat; Université Laval; (2003).
- [93] : K.A Stner Matthias, B.J. Maren, 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; 64; N°1; (1998); P: 359–362.

ANNEXES

ANNEXE I

Tableau 2 : les différents procédés applicable aux traitements des COV.

Procédé	Application	Description	Performance du traitement	Cout	
				Installation	Exploitation
Séparation membranaire	Solvants et vapeurs d'hydrocarbures	Séparation des gaz en fonction de la perméabilité avec possibilité de recyclage	> 99,9 % pour COV 90-99 % pour hydrocarbure	300000€ (200 Nm3/h)	60000€/an
Condensation	Recondensation des COV concentrés pour la réutilisation	Condensation et récupération des vapeurs par réduction de la température	Division des concentrations de 500 à 1000	500000€ (1000 Nm3/h) pour une Installation de cryogénéisation	
Adsorption	Récupération des COV pour réutilisation ou abattement de la pollution	Adsorption de surface des gaz sur des solides (charbon actif, zéolites)	COV : 80-95% Toluène : 90%	240 m€ pour 1000 Nm3/h avec régénération des charbons	1000€ par tonne de charbon
Lavage des gaz	Pour solvants solubles (ammonium, SO2) en vue d'une Réutilisation	Les gaz solubles sont transférés dans la phase Aqueuse	COV : 50-95%	Très variable en fonction du traitement : de 600 à 33500\$	
Biofiltration	Pour polluant facilement biodégradable (hydrocarbures...)	Les effluents gazeux passe à travers un lit biologique où les polluants sont détruits	Toluène : 80-95% Hydrocarbure 75-95%	5000-20000€	200€ par m3 de produits filtrant
Lavage des gaz avec action biologique	Pour des mélanges de produits facilement biodégradables et solubles (peu efficace sur les hydrocarbures)	Les gaz solubles sont transférés dans une phase aqueuse contenant des microorganismes capables de traiter les polluants	COV : 80-90%	5000-15000€	
Lavage des gaz avec lit bactérien	Surtout des produits solubles (acides et alcool)	Comme précédemment à la différence que les micro-organismes sont fixés sur un support	COV : 80-95%	5000-20000€	
Oxydation Thermique	Tout gaz combustibles	Les effluents gazeux sont brûlés en présence d'air ou d'oxygène et transformés en eau et CO2. Pour les composés halogénés des conditions d'utilisations particulières sont nécessaires	COV: > 95%	Entre 10000 et 50000€ selon les Technologies	>25000€ pour les combustion simple sans récupération de chaleur

<p>Oxydation Catalytique</p>	<p>Tout type de gaz, même moins combustibles que dans la technique d'oxydation thermique simple</p>	<p>Les effluents gazeux une fois chauffés passe à travers un catalyseur afin d'accélérer la réaction d'oxydation ou de détruire des composés plus faiblement combustibles</p>	<p>COV: > 95%</p>	<p>10000-80000€</p>	<p>3000-21000€ pour la technique non régénératrice</p>
<p>Torchage</p>	<p>Essentiellement dans le secteur pétrolier et pétrochimique</p>	<p>Consiste à brûler à haute température des gaz Combustibles</p>	<p>COV : >98%</p>	<p>8300-560000€ en fonction des dimensions de la torchère</p>	<p>Jusqu'à 36000€</p>

ANNEXE II :***Produits et milieux utilisés***

Produit	Marque	Caractéristiques
Alginate	FluKa	Alginic acid Sodium salt from brown algae.
Hexane	PRS Quimicasa Panreac	Alkanes mixture C_6H_{14} M = 86,18 essay (GC).
Xylène	SIGMA-ALDRICH	$\geq 98.5\%$ xylenes + ethylbenzene basis C_8H_{10} M = 106

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
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (Riedel-de Haen)	5.65 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1g
1 ml de solution des éléments traces.	

Solution des éléments traces (EMT) dans 1 litre d'eau distillée :

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.64 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.11 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.79 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.15 g

ANNEXE III
Matériels Utilisés



Spectrophotomètre Jenway 6405 UV/VIS



pH mètre



Balance



Agitateur vibrant (Vortex)



Incubateur agitateur



CPG SHIMADZU de type GC-17A

Microscope optique

