

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA

Faculté des Sciences de l'Ingénieur
Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

Option : Génie de l'Environnement

« ETUDE DE LA BIODEGRADABILITE D'UN HYDROCARBURE AROMATIQUE POLYCYCLIQUE "NAPHTALENE" ET OPTIMISATION DE LA PERFORMANCE BACTERIENNE EN MILIEU PCN »

Fatma Zahra MESBAIAH

Devant le Jury composé de

| | | |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------|
| NACEUR MOHAMED WAHIB | Professeur, USDB | <i>Président</i> |
| LOUNICI HAKIM | Professeur, UMM de Tizi-Ouzou | <i>Examineur</i> |
| BOUGHEDAOU MENOUER | Maître de conférences, USDB | <i>Examineur</i> |
| BADIS ABDELMALEK | Maître de conférences, USDB | <i>Rapporteur</i> |
| EDDEOUA OUDA KAMEL | Maître assistant A, USDB | <i>invité</i> |

Blida, Avril 2011

RESUME

Le naphthalène, polluant organique fortement détecté dans les eaux marines vu sa large utilisation et ses propriétés (solubilité, coefficient de partage octanol/ eau K_{OW}) présente un risque sanitaire par sa consommation directe ou par la chaîne trophique (bioaccumulation), il est classé comme une substance toxique et mutagène. A cet effet, la présente étude traite une voie d'élimination microbienne en utilisant une souche K1C à fort potentiel de dégradation, elle est isolée à partir d'un sol de Hassi Messaoud anciennement contaminé par le pétrole brut.

Les résultats préliminaires obtenus ont révélé l'utilisation du naphthalène par cette souche comme seule source de carbone et d'énergie avec une concentration de 0.5 g l^{-1} au bout d'une semaine d'incubation. En outre, la culture bactérienne tolère des concentrations supérieures à 3 g l^{-1} .

Par ailleurs, les conditions optimales d'une bonne dégradation du naphthalène sont : pH 7, 2% de la salinité et 5% d'inocula tandis que la présence d'une deuxième source de carbone ralentit la cinétique de la dégradation. Par contre, l'ajout de Tween 80 inhibe la dégradation comparativement aux autres tensio-actifs (SDS, CTAB).

La souche K1C dégrade le naphthalène par des enzymes extracellulaire et le test d'émulsification montre que la bactérie produit un biosurfactant.

Les analyses par FTIR ainsi que le suivi du changement du pH de milieu de culture montrent que le mécanisme de dégradation du naphthalène ressemble à ceux trouvés par plusieurs auteurs en produisant l'acide salicylique et le catéchol qui ont été proposés comme métabolites de ce type de dégradation.

Mots clés : Biodégradation – Hydrocarbures aromatiques polycycliques – Naphthalène – Souches bactériennes – Dépollution.

ABSTRACT

Naphthalene, organic pollutant responded in marine waters having regard to its widespread use and its properties (Solubility, K_{OW}), presents a health risk by its direct consumption or through the trophic chain (Bioaccumulation), it is classified as a toxic and mutagenic substance. To this end, this study treat elimination using microbial K1C a strain with high potential for degradation, it is isolated from Hassi Messaoud soil previously contaminated by crude oil. Preliminary results showed the use of naphthalene by this strain as the only source of carbon and energy with a concentration of 0.5 g l^{-1} after one week of incubation. In addition, bacterial culture tolerates concentrations above 3 g l^{-1} .

Moreover, the optimal conditions for good degradation of naphthalene are pH = 7, salinity of 2% and 5 % inoculation while the presence of a second source of carbon slowed the kinetics of degradation. For cons, the addition of Tween 80 inhibits degradation compared to other surfactants (SDS, CTAB).

K1C strain degrades naphthalene by enzymes extracellular and the test shows that the emulsification bacterium produces a biosurfactant.

FTIR analysis and pH monitoring of culture medium show that the mechanism degradation of naphthalene is the same as those found by several authors producing salicylic acid and catechol that have been proposed as metabolites of this type of degradation.

Keywords: Biodegradation - Aromatic Hydrocarbons polycyclic – naphthalene- Bacterial Strains - Depollution.

المخلص

النفثالين، من الملوثات العضوية الموجودة بكثرة في مياه البحار نظرا لاستخداماته الواسعة وخصائصه الكيميائية (الذوبانية وKow)، يشكل النفثالين خطرا على الصحة سواء بالتعرض المباشر او من خلال التراكم البيولوجي في السلسلة الغذائية ولهذا فهو يصنف من المواد السامة والمسببة للنتشوهات الخلقية. ولهذا فان هذه الدراسة تهدف الى القضاء عليه من خلال التفكيك الميكروبي بواسطة سلالة بكتيرية فائقة القدرة معزولة سابقا من تربة ملوثة بالنفط الخام بحاسي مسعود.

أظهرت الدراسات الأولية ان هذه البكتيريا قادرة على استعمال النفثالين كمصدر وحيد للكربون والطاقة بتركيز 0.5 غ/ل غير أنها تستطيع ان تفكك هذا الأخير بتركيز تفوق 3 غ/ل.

الشروط المثالية للتفكيك هي pH=7، نسبة الملوحة 2%، البكتيريا المضافة 5%، في حين ان اضافة مصدر ثاني للكربون يبطأ من سرعة التفكيك. اضافة tween80 تثبط التفكيك مقارنة مع غيره من مساعدات الذوبانية ك: CTAB ; SDS.

يتم التفكيك بافراز البكتيريا لانزيمات خارج الخلية ويظهر اختبار الاستحلاب أن بكتيريا تنتج biosurfactant اظهر تحليل FTIR و تتبع تغير pH بان آلية التفكيك تشبه تلك التي عثر عليها من قبل و تم اقتراح حمض الساليسيليك والكاتيكول كنواتج للتفكيك

كلمات البحث : التحلل البيولوجي—الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات، النفثالين، سلالات بكتيرية -- -- إزالة التلوث .

DEDICACES

Le premier mérite revient à mes chers parents pour leur grande patience,
compréhension et soutien.

A ma très chère sœur Asma et mes chers frères Mohamed Hussein Eddine et
Ahmed Dhiaa Eddine pour leur encouragement.

A mon grand père qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Que le
dieu nous le garde.

A toute ma famille

A toutes mes amies

Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le bon dieu de m'avoir aidé à réaliser ce mémoire.

Je remercie Mr BADIS ; maitre de conférences de USDB de m'avoir fait confiance, Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour ses encouragements, sa disponibilité, sa patience sa gentillesse et ces qualités scientifiques et humaines.

Je tiens a remercie Mr EDOUAOUDA pour sa participation dans la direction de ce mémoire ; merci infiniment pour votre aide précieuse et pour vos conseils éclairés.

Je remercie l'ensemble du jury ; Messieurs M.W. NACEUR ; professeur de USDB, H. LOUNICI ; professeur de UMM de Tizi-Ouzou et M. BOUGHEDAOUI ; maitre de conférences de USDB pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements vont également à tous les techniciens du département de chimie industrielle pour leur aide et compréhension.

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Résumé..... | 02 |
| Introduction..... | 09 |
| CHAPITRE1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 11 |
| 1.1 Généralités sur les HAP..... | 11 |
| 1.2 Naphtalène..... | 14 |
| 1.3 Décontamination des milieux pollués par le naphtalène..... | 18 |
| 1.4 Biodégradation du naphtalène..... | 26 |
| CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES..... | 39 |
| 2.1 Caractéristiques géoclimatiques du site d'étude..... | 39 |
| 2.2 Échantillonnage et caractérisation du sol..... | 40 |
| 2.3 principaux paramètres analysés..... | 40 |
| 2.4 Isolement des souches bactériennes aérobies..... | 42 |
| 2.5 Préparation de la solution du naphtalène..... | 44 |
| 2.6 Sélection de la souche performante..... | 44 |
| 2.7 Étude des facteurs affectant la biodégradation..... | 44 |
| 2.8 Paramètres d'évaluation analytiques..... | 46 |
| 2.9 Test d'émulsification..... | 47 |
| 2.10 Mise en évidence du changement de la structure du naphtalène..... | 47 |
| 2.11 Caractérisation micromorphologique et biochimique de la souche performante..... | 48 |
| CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSION..... | 49 |
| 3.1 Caractérisation physico-chimiques de biotope étudié..... | 49 |
| 3.2 Isolement des souches bactériennes dégradatrices du pétrole..... | 49 |
| 3.3 Croissance de la flore bactérienne sur le milieu à base du pétrole brut..... | 50 |
| 3.4 Sélection de la souche performante..... | 51 |
| 3.5 Caractérisation préliminaire de la souche performante..... | 52 |
| 3.6 Suivi de la masse microbienne et de pH..... | 53 |
| 3.7 Facteurs affectant la biodégradation..... | 55 |
| 3.8 Test d'émulsification E ₂₄ | 64 |
| 3.9 Mécanisme de la biodégradation..... | 65 |
| CONCLUSION..... | 68 |
| Références..... | 70 |
| Annexes | |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Les structures moléculaires des 16 HAP prioritaires dans la liste de l'EPA..... | 13 |
| Figure 2 : Présence du naphthalène dans l'environnement..... | 17 |
| Figure 3 : Mode d'action de l'ozone en milieu aqueux..... | 21 |
| Figure 4 : Voie catabolique proposée pour la biodégradation du naphthalène par le genre <i>Pseudomonas</i> | 27 |
| Figure 5 : Mécanisme proposé pour la biodégradation du naphthalène par <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> | 29 |
| Figure 6 : Activation de la réaction de dégradation anaérobie du naphthalène par l'addition de CO ₂ | 30 |
| Figure 7 : Voie réductrice proposée de la biodégradation du naphthalène..... | 31 |
| Figure 8 : Dégradation du naphthalène en conditions méthanogènes..... | 33 |
| Figure 9 : Formation d'une micelle dans la solution de surfactant..... | 35 |
| Figure 10 : Sols contaminés par le pétrole brut (Hassi Messaoud)..... | 39 |
| Figure 11 : Adaptation de la flore bactérienne contenue dans le sol contaminé à la dégradation du pétrole brut..... | 43 |
| Figure 12 : Croissance des bactéries sur le pétrole brut avec l'apparition des halos claires signifiant la consommation du pétrole..... | 50 |
| Figure 13 : Différentes formes de bactéries aérobies capables de croître sur un milieu à base du pétrole brut..... | 50 |
| Figure 14 : Les cinétiques de croissance de certaines souches mésophiles sur le pétrole brut (3% v/v)..... | 51 |
| Figure 15 : Les cinétiques de croissance de certaines souches thermophiles sur le pétrole brut (3 % v/v)..... | 51 |
| Figure 16 : Variation de la concentration de naphthalène en fonction du temps en présence des souches sélectionnées..... | 52 |
| Figure 17 : observations microscopiques de la souche K1C..... | 52 |
| Figure 18 : Variation de la masse microbienne en fonction du temps en présence du naphthalène comme la seule source de carbone et d'énergie..... | 54 |
| Figure 19 : Variation de la turbidité du milieu en fonction du temps en présence du naphthalène comme la seule source de carbone et d'énergie..... | 54 |
| Figure 20 : Variation de pH du milieu de culture en fonction du temps pendant la dégradation..... | 55 |
| Figure 21 : pourcentages de dégradation sous l'effet de différentes concentrations initiales du naphthalène..... | 55 |
| Figure 22 : Effet de la variation du pH en fonction de temps sur la dégradation du naphthalène en présence de la souche K1C..... | 57 |
| Figure 23 : Pourcentages de la dégradation du naphthalène en différentes concentrations de NaCl..... | 58 |
| Figure 24 : Pourcentages de la dégradation du naphthalène en fonction du temps à différents rapport C/N..... | 59 |
| Figure 25 : Pourcentages de dégradation du naphthalène à différents volumes d'inoculum en fonction du temps d'incubation..... | 60 |
| Figure 26 : Effet de co-substrat sur la dégradation du naphthalène par la souche K1C..... | 61 |
| Figure 27 : Pourcentages de dégradation du naphthalène par la souche K1C en présence de différents surfactants..... | 62 |
| Figure 28 : Tolérance de la souche K1C vis-à-vis des concentrations élevées du naphthalène | 63 |
| Figure 29 : Résultats de test d'émulsification produit par la souche K1C..... | 65 |
| Figure 30 : Spectre infrarouge de la biodégradation du naphthalène par K1C en fonction | |

| | |
|--|----|
| du temps d'incubation..... | 65 |
| Figure 31 : Mécanisme proposé pour la biodégradation du naphthalène par la souche K1C..... | 67 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : polluants chimiques prioritaires..... | 11 |
| Tableau 2 : Concentrations d'hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) dans les sédiments portuaires en Algérie..... | 12 |
| Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques de naphthalène..... | 14 |
| Tableau 4 : Dispersion du naphthalène dans les milieux naturels..... | 16 |
| Tableau 5 : Conditions et constantes de réactions à partir de l'ozonation du Naphthalène dans l'eau..... | 22 |
| Tableau 6 : Principales souches bactériennes aérobies participant à la dégradation du naphthalène..... | 27 |
| Tableau 7 : principaux sous produits de la dégradation du naphthalène par différentes bactéries..... | 29 |
| Tableau 8 : Caractérisation physico-chimiques du sol contaminé..... | 49 |
| Tableau 9: Résultats des tests biochimiques de la souche K1C..... | 53 |

INTRODUCTION

La pollution de l'environnement par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représente un défi majeur auquel doivent inéluctablement faire face les scientifiques et les gestionnaires de l'environnement [1]. Le naphthalène (le premier des HAP) identifié comme substance dangereuse prioritaire. Il est composé de deux cycles benzénique et généralement utilisé comme modèle représentatif des HAP. Il présente la plus forte solubilité dans l'eau ce qui favorise la contamination des eaux souterraines par ce dernier. Il est fréquemment détecté dans les sols et les milieux aquatiques [2]. Compte tenu de sa structure chimique, le naphthalène est réputé très stable et donc sa élimination pose des problèmes, les voies chimiques et physiques restent très limités du fait de leur coût ou de leur impact sur l'environnement. Par voie de conséquence, les recherches actuelles s'orienteront vers l'élimination des HAP par les bioprocédés d'où l'intérêt de ces nouvelles technique réside surtout dans son aspect non polluant, et l'absence de sous produits chimiques [3].

La biodégradation du naphthalène par les bactéries est largement étudiée, de nombreuses espèces sont connues comme étant des excellentes utilisatrices du naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie (*Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Rhodococcus*,...) [4]. Cependant, malgré que les conditions de milieu (tels que la température et la salinité, la présence d'une autre source de carbone, la concentration du naphthalène et sa biodisponibilité) sont des facteurs très importants qui peuvent affecter la biodégradation aérobie du naphthalène, leurs effets sont souvent étudiés séparément, et donc très peu d'études ayant traitées la même souche bactérienne en présence du même substrat dans plusieurs conditions [5]. Ainsi, les mécanismes de dégradation du naphthalène et l'identification de ses métabolites sont bien établis pour les souches mésophiles, sont méconnus pour les souches thermophiles qui dépendent surtout de l'espèce utilisée [6].

L'objet de ce présent travail est d'étudier la biodégradation du naphthalène par une souche bactérienne thermophile isolé à partir d'un sol contaminé par le pétrole dans la région du Hassi Messaoud. Cette souche, parmi d'autres, ayant déjà montrés des aptitudes à dégrader le pétrole, le benzène et le phénol. Les facteurs physico-chimiques (température, pH et salinité) et les paramètres de culture (concentration du naphthalène, volume d'inocula, ajout de surfactant et présence d'autres substrats) seront optimisés pour mieux maitriser la performance bactérienne en milieu pauvre en carbone et l'azote (PCN).

Ce manuscrit s'articule autour de trois parties :

- La première partie est une recherche bibliographique permettant de consolider les connaissances de bases et le contexte de l'étude. A cet effet, de nombreux points de la thématique des hydrocarbures aromatiques polycycliques en particulier le naphthalène, propriétés et toxicité, les techniques d'élimination et plus précisément le processus de sa biodégradation dans des conditions bien déterminées et les mécanismes proposés ainsi que les facteurs qui affectent sa biodégradation ont été abordés.
- Seront présentés dans la deuxième partie du mémoire les principaux matériels et méthodes utilisés pour concrétiser l'expérimentation.
- La troisième partie présentera les résultats obtenus ainsi que les interprétations et discussions par rapport aux travaux réalisés dans le domaine.

Enfin, en guise de conclusion générale nous proposerons une synthèse des résultats obtenus, et dégagerons les perspectives de la poursuite de ce travail de recherche.

CHAPITRE 1

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Généralités sur les HAP :

Le développement industriel, l'urbanisation, l'agriculture et autres activités humaines ont conduit à l'aggravation des problèmes de la pollution et par voie de conséquence il existe aujourd'hui de nombreux contaminants anthropogène dans l'air, le sol et les systèmes aquatiques qui sont toxiques et présentent une menace substantive pour la santé humaine et la qualité environnementale.

AEE et EPA ont classé les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) comme polluants prioritaires à cause de leur caractère cancérigène et mutagène (Tableau1) [7].

Tableau 1 : Polluants chimiques prioritaires selon EPA [7]

| Familles chimiques | Exemples |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Hydrocarbures aliphatiques halogénés | Solvants chlorés |
| Hydrocarbures mono-aromatiques | BTX (benzène, toluène, xylènes) |
| Dérivés aromatiques chlorés | Chlorobenzènes, nitrobenzènes |
| Hydrocarbures poly-aromatiques | Naphtalène, phénanthrène |
| Phénols et dérivés | Chlorophénols, nitrophénols |
| Organochlorés | Insecticides chlorés, PCB |
| Ethers halogénés | Ethers halogénés aliphatiques |
| Esters phthaléiques | Phthalates |
| amines | nitrosamines |

Les HAP se trouvent dans les trois compartiments de l'ensemble des écosystèmes. La pollution par les hydrocarbures et les dérivés pétroliers est une chose très courante le long du littoral algérien, compte tenu des voies du trafic maritime pétrolier passent près de la côte algérienne. Environ de 150 millions de tonnes d'hydrocarbures y sont transportés chaque année (sur les 500 millions de tonnes/an d'hydrocarbures transportées au total en mer Méditerranée), ce qui correspond au transit de 1800 pétroliers par an. En outre, plus de 50 millions de tonnes d'hydrocarbures empruntent chaque année les terminaux pétroliers des principaux ports algériens, avec d'importantes fuites d'exploitation en mer (10000 tonnes/an).[8] Les opérations de déballastage sont également responsables du

déversement de quelque 12000 tonnes supplémentaires d'hydrocarbures par an dans les eaux côtières du fait que les installations de réception disponibles ne peuvent pas répondre aux quantités de ballast. De plus, une pollution par les hydrocarbures est imputable aux rejets d'eaux usées industrielles et urbaines, de boues toxiques provenant de raffineries de pétrole à Alger, Oran et Skikda et de la production de gaz naturel. En raison de la présence d'activités pétrolières en Algérie, les sédiments portuaires et côtiers présentent de fortes concentrations en hydrocarbures pétroliers totaux ainsi qu'en HAP (Tableau 2).

Tableau 2 : Concentrations d'hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) dans les sédiments portuaires en Algérie [8].

| PORTS | HPT EN MG/KG P.S. |
|-----------------------|--------------------------|
| Oran | 1500 - 17000 |
| Arzew | 930 - 8600 |
| Béthioua | 670 - 940 |
| Mostaganem | 1600 - 8800 |
| Ténès | 680 - 990 |
| Alger | 1900 - 31000 |
| Bejaïa | 140 - 260 |
| Jijel | 180 - 430 |
| Ancien port de Skikda | 450 - 2000 |
| Annaba | 130 - 6200 |

Les HAP sont définis comme étant des composés aromatiques hétérocycliques constitués d'atomes de carbones et d'hydrogènes. Ils possèdent des noyaux aromatiques accolés (2 à 10), ils diffèrent par le nombre de noyaux accolés ainsi que par leur agencement. Ce sont des molécules planes dont la structure se rapproche de celle en feuillet du graphite pour les hauts poids moléculaires, la condensation de plusieurs cycles benzéniques implique qu'il existe une liaison commune entre chaque cycle et que le rapport H/C de la molécule diminue avec le poids moléculaire [9,10]. Les structures de 16 HAP considérés comme polluants prioritaires par l'agence américaine de la protection de l'environnement (EPA) sont présentés dans la figure 1.

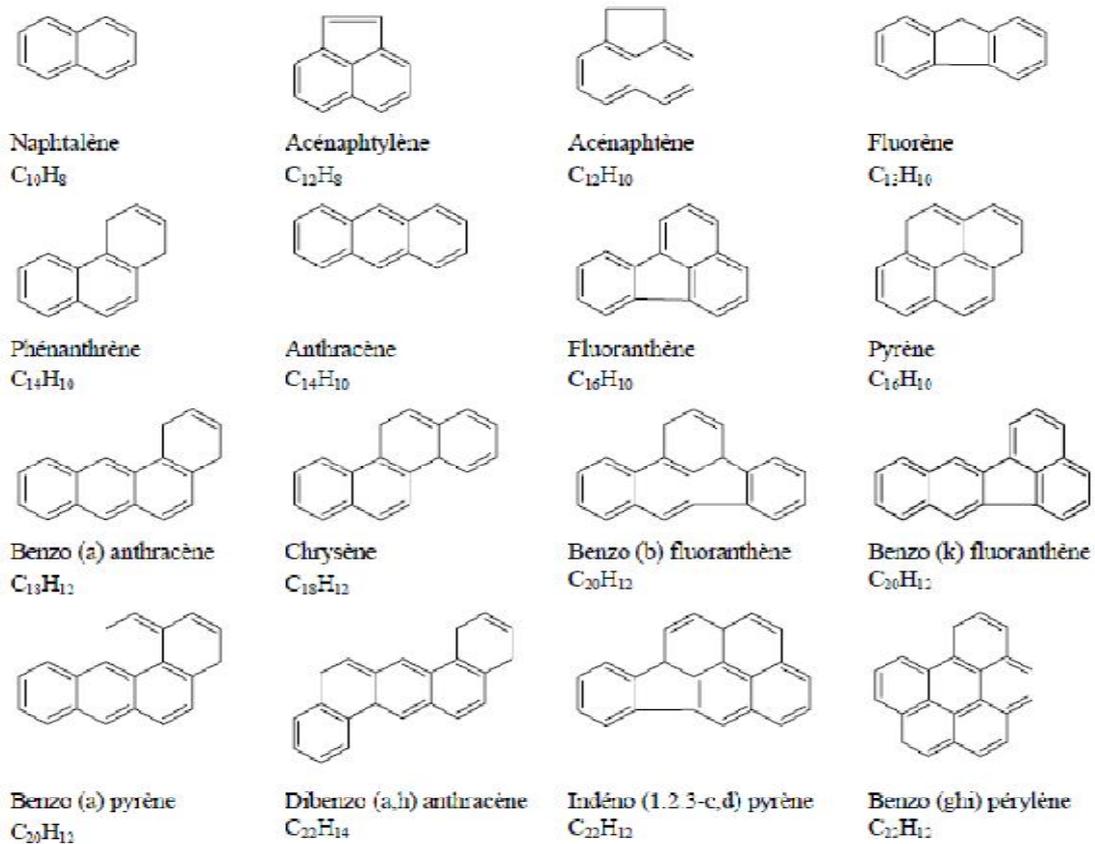


Figure 1 : Les structures moléculaires des 16 HAP prioritaires de l'EPA.[3]

Les HAP sont classés en deux groupes selon le nombre de cycles benzéniques qui les composent :

- Les HAP légers (2 à 3 cycles).
- Les HAP lourds (4 cycles ou plus).

Parmi ces composés, le naphthalène (premier des HAP) est composé de deux cycles benzénique, il est identifié comme substance dangereuse prioritaire. Il est généralement utilisé comme modèle représentatif des HAP [11].

1.2 Le naphthalène

1.2.1 Identification et propriétés :

Le naphthalène est l'un des hydrocarbures aromatiques polycycliques les plus retrouvés dans l'environnement, il est composé de deux cycles accolés de benzène, sa formule brute est $C_{10}H_8$, il se trouve sous forme solide cristallisé dans les conditions ambiantes habituelles, cristaux lamellaires brillants de couleur blanche et une odeur caractéristique qui est perçue par l'odorat humain à partir de 0.04 ppm. Il est connu aussi sous les noms suivants : camphre de goudron, naphthaline et naphène [12]. Comme tous les HAP, le naphthalène se caractérise par un point de fusion et d'ébullition élevé, une faible solubilité dans l'eau, mais il est soluble dans les solvants organiques comme l'éthanol, éther, benzène, acide acétique, et même dans les huiles. Le tableau 3 ci-dessous regroupe ses caractéristiques principales.

Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques du naphthalène.

| Paramètre | Valeurs |
|------------------------------------|--|
| Facteur de conversion (à 20°C) | 1ppm = 5.24 mg/m ³ ; 1 mg/m ³ = 0.191 pp |
| Masse molaire (g/mol) | 128.2 |
| Point d'ébullition (°C) | 218 |
| Point de fusion °C | 80 |
| Masse volumique g/cm ³ | 1.16 |
| Solubilité (mg/l) dans l'eau | 31.8 à 25°C ; 30 - 34 à 20 – 25 °C |
| Coefficient de partage octanol/eau | 3.37 |

Le naphthalène est l'hydrocarbure le plus volatil, il possède le coefficient de partage $K_{\text{octanol/water}}$ le plus bas (3.37). En effet, la biodégradabilité est fonction de ce coefficient de partage (Log K_{OW}) : plus il est important et moins le composé sera biodégradable et donc le naphthalène est peu persistant à l'inverse des autres composés de poids moléculaires élevés qui sont très persistants et par conséquent bioaccumulables [13, 4].

1.2.2 Production du naphthalène :

Le naphthalène est un constituant du goudron de houille (11 %) et du pétrole brut (1,3 %). Il peut donc être obtenu à partir de ces deux produits par distillation

fractionnée [14]. Depuis 1960, la production à partir du pétrole par désalkylation des méthylnaphtalènes en présence d'hydrogène à haute température et à haute pression est devenue également un procédé de production industriel. Ce mode de production permet d'obtenir du naphthalène pur à 99 %. Aux États-Unis, la plus grande partie du naphthalène est obtenue à partir de pétrole [15]. En Europe, plusieurs entreprises produisent du naphthalène, pour un total d'environ 200 k tonnes par an d'où 25 % de cette production est exportée.

1.2.3 Utilisation :

Au début du XXème siècle, le naphthalène était utilisé en médecine comme antiseptique, expectorant et antiparasites (helminthes). Il était couramment administré pour des maladies gastro-intestinales et, en application cutanée, pour des problèmes de peau [14]. Le naphthalène dans ses différentes qualités constitue l'une des matières premières pour la fabrication et production de divers produits de chimie organique [12,16] :

- fabrication d'anhydride phtalique ;
- production de naphthalène sulfonate ;
- créosotes (et sels) (diluants des produits de protection du bois).
- insecticide et fongicide, notamment répulsif pour les mites (boules de naphthaline) ;
- produits destinés au tannage du cuir.
- plastifiants, teintures, résines ;
- produits pharmaceutiques, désinfectants ;
- colorants, parfums

1.2.4 Rejet de naphthalène dans l'environnement :

Environ 89% du naphthalène présent dans l'environnement provient de combustions incomplètes (pyrolyse), principalement du chauffage domestique au bois, et de la sublimation du naphthalène utilisé comme répulsif pour les mites. Environ 10% des rejets dans l'environnement sont attribuables à la distillation du charbon tandis que les pertes liées à la production de naphthalène représentent moins de 1% [12]. Malgré que la presque totalité du naphthalène libérée (89%) se disperse dans l'air, des quantités non négligeables se retrouvent après dans les sols et les sédiments [17]. Le tableau 4 montre les concentrations du naphthalène dans les différents milieux naturels. Bien que le naphthalène et les autres HAP se

retrouvent principalement dans les eaux de traitement des résidus pétroliers, leur présence dans les ERU (eau résiduaire urbaine) peut être importante. [18]

Tableau 4 : Dispersion du naphtalène dans les milieux naturels.

| Milieux | Concentrations |
|------------|--------------------------|
| Air | $< 1 \mu\text{g m}^{-3}$ |
| Eau de mer | 10 ng L^{-1} |
| Sols | $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ |
| Sédiments | $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ |

1.2.5 Cycle de vie du naphtalène :

Le destin du naphtalène dans l'environnement est principalement commandé comme tous les HAP par leurs propriétés physico- chimiques, la compréhension de leur transport, division et transformation dans l'environnement est d'une importance fondamentale. D'après Chevreuil et *al*, dès l'émission dans l'atmosphère, les HAP se distribuent entre les phases gazeuses et particulaires, ils sont soumis à divers processus de transformation tels que des réactions d'oxydation ou de photolyse et de transfert et d'élimination par l'intermédiaire des pates secs et humides. Une fois déposés ils peuvent être réactivés et transportés par les masses d'air sur longues distances et se retrouver dans des sites éloignés. Le transport atmosphérique constitue donc une source importante d'apport des HAP aux écosystèmes [18]. Bien que les réglementations imposent des faibles concentrations de l'ensemble des HAP dans les eaux urbaines ou industriels, il subsiste des pollutions ponctuelles et diffuses importantes, à cela s'ajoutent les pollutions accidentelles tels que le versement des produits lors d'accidents routier, le mauvais stockage de produits chimiques solubles sans oublier les pollutions par négligence (huile de vidange, batteries) qui peuvent être quantitativement considérables [2]. La figure 2 résume les phénomènes bio-physico-chimiques influençant le devenir de naphtalène dans les différents compartiments de l'environnement.

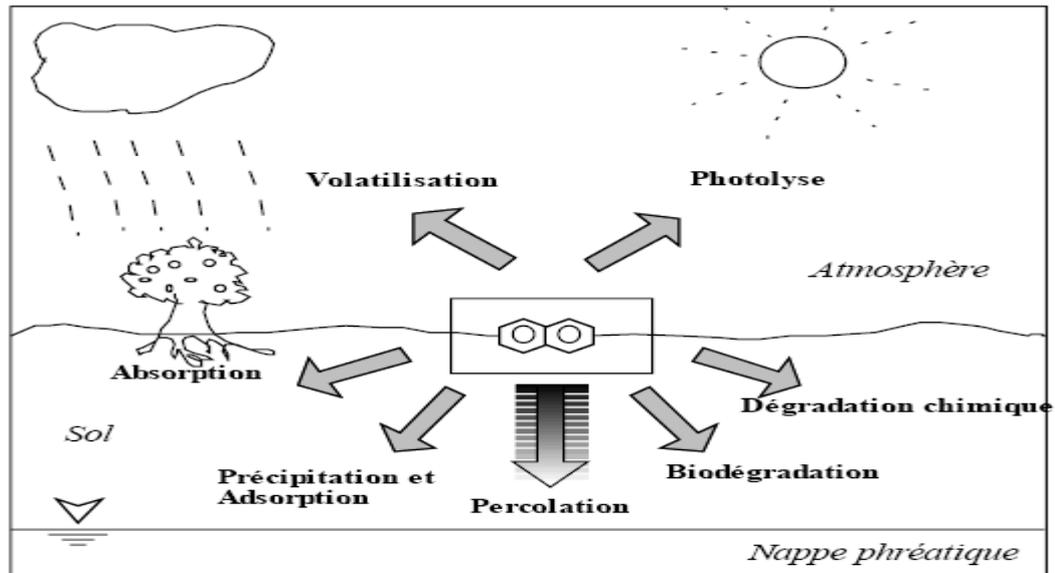


Figure 2. Les phénomènes bio-physico-chimiques influençant le devenir de naphtalène dans l'environnement

De plus le naphtalène est particulièrement mobile dans le sol lixiviable et relativement soluble dans l'eau, ce qui favorise la contamination des nappes phréatique et les barrages.

1.2.6 Toxicité :

Le naphtalène est répartie de façon ubiquitaire dans l'environnement, et malgré qu'il se trouve à des doses relativement faibles, son caractère hydrophobe entraîne sa bioconcentration dans la chaîne alimentaire, des études ont montré que le naphtalène est bioaccumulable chez plusieurs espèces de poissons (*Cyprinus carapia*, *pimephales promelas*) moules (*mytilus edulis*) et huitres (*ostrea edulis*), il semble pouvoir être absorbé par les racines et les feuilles des plantes [19,20]. Le naphtalène a été examiné et n'a pas été classé en tant que substance génotoxique après son examen par l'Union Européenne. Cependant, il a été reconnu comme substance dangereuse prioritaire par la communauté européenne. Les personnes travaillant dans l'industrie du bois, dans des locaux confinés contenant des fourneaux ou utilisant du goudron ou de l'asphalte présentent un risque accru de cancer des poumons, de l'œsophage et de la peau [21]. Pour le naphtalène, la valeur limite moyenne d'exposition indicative fixée par le Ministère du Travail en France est de 50 mg/m³ d'air [22]. Des doses importantes de ce dernier peuvent provoquer des troubles digestifs, des troubles de la conscience qui peut conduire à un coma convulsif. Des anémies

hémolytiques ont été identifiées chez des enfants dont les mères avaient inhalé du naphthalène pendant leur grossesse. L'ingestion accidentelle de 5 grammes d'antimite par un enfant a provoqué sa mort. Les études chez l'animal ont montré que l'ingestion de naphthalène pouvait être létale chez les souris, les rats et les lapins. Ainsi la Dose Létale 50 (DL50) est de 533 mg.kg⁻¹ chez les souris mâles, de 2200 mg.kg⁻¹ chez les rats mâles. Les effets induits par une exposition aiguë, par voie orale, au naphthalène diffèrent en fonction de la sensibilité de l'espèce étudiée [2]. Le naphthalène n'induit pas directement de mutation dans les bactéries et les lignées cellulaires humaines métaboliquement compétentes. L'action du naphthalène sur l'organisme se fait de la même façon que les autres HAP. L'induction du cancer chez les mammifères passe par la participation d'un groupe d'enzymes capables de transformer les composés xénobiotiques en produits solubles dans l'eau. Ces enzymes sont des mono oxygénases qui appartiennent au groupe cytochrome P450. Les HAP sont transformés en HAP diolépoxyde qui sont alors particulièrement réactif avec l'ADN, l'ARN et les protéines cellulaires, créant ainsi de nombreuses mutations irréversibles et induisant la formation de tumeur. Ce système enzymatique est stimulé dans un organisme par exposition aux composés lipophiles persistants. Les expositions répétées à ces composés induisent de grandes quantités d'enzymes [23]. La capacité d'induction de ces enzymes dépend de chaque organisme. Les mammifères par exemple, ont une grande capacité d'adaptation à ces agents mutagènes au contraire aux poissons qui ont une capacité limitée de dégradation.

1.3 La décontamination des milieux pollués par le naphthalène

Différentes solutions ont été proposées pour éliminer les HAP des milieux contaminés vu leur caractère toxique et de leur présence en fortes concentrations dans certains sites pollués.

1.3.1 Elimination par voie physico-chimique

De nombreuses techniques de dépollution des sols par traitement physique existent avec leurs contraintes, leurs spécificités de polluants et des natures des sols [24].

1.3.1.1 L'injection d'air ou de vapeur, ou stripping :

Cette technique permet d'extraire les solvants chlorés ou les produits organiques volatils en injectant de l'air ou de la vapeur sous pression directement dans le sol par des puits d'injection. Les polluants sont ainsi évaporés puis récupérés par des

puits d'extraction. Le stripping a été utilisé pour la décontamination de sols pollués par les HAP [25].

1.3.1.2 La flottation :

La flottation est une technique couvrant une large gamme de polluants dont les HAP. Après avoir excavé le sol, de l'eau et des agents tensioactifs sont ajoutés. L'injection d'air dans ce mélange entraîne l'emprisonnement des polluants qui remontent à la surface et forment une écume flottante qui est aisément récupérée puis traitée [25].

1.3.1.3 Le lavage :

Le lavage est une méthode bon marché et rapide avec un rendement supérieur à 80%. Elle consiste à séparer les polluants du sol par injection d'eau. Elle est, en général, associée à une autre méthode comme un traitement biologique ou une injection d'air ou de vapeur. Cette méthode a déjà été appliquée sur les HAP [25].

1.3.1.4 La désorption thermique :

Elle se fait sur des sols pollués par matières organiques facilement oxydables ; c'est le procédé physique le plus couramment utilisé actuellement pour la dépollution des sols contaminés par des HAP. Après excavation et broyage du sol, celui-ci est tamisé avant de subir le traitement thermique : injection d'oxygène (1000 °C) ou four étanche (600-800 °C). Enfin, les gaz d'extraction sont traités.

1.3.1.5 L'extraction par solvant :

Elle permet d'enlever de nombreux polluants (les polluants doivent être solubles dans le solvant utilisé : alcanes, alcools, cétones). Ils sont introduits dans le sol où ils permettent l'extraction des polluants en les solubilisant [26].

Plusieurs méthodes d'extraction sont possibles : séparation naturelle et stripping, vaporisation (la pression est diminuée jusqu'à atteindre la pression de vapeur saturante) ou la modification de température afin de rendre le solvant non-miscible à l'eau. L'utilisation des solvants présente l'inconvénient de laisser des restes de ces solvants, eux-mêmes toxiques. La plupart de ces procédés mettent en œuvre une technique de désorption par des agents tensioactifs (en l'occurrence des surfactants), suivie d'une étape de flottation de la suspension par injection d'air contrôlée. La flottation génère un concentré de mousse non négligeable et chargés en HAP, lequel doit par la suite être disposé comme matière résiduelle dangereuse dans un site d'enfouissement spécialisé à des coûts importants (soit 300 à 600 \$ tm⁻¹ pour la gestion de ces résidus). Ainsi, le coût de gestion de ces

résidus représente une part importante des coûts de ces technologies de décontamination. Conséquemment, le développement industriel de ces technologies passe nécessairement par une amélioration majeure de l'étape de gestion des HAP suite à leur enlèvement des matrices contaminées

1.3.1.6 Elimination par les méthodes d'oxydation avancée

Le traitement par oxydation avancée est une technique chimique utilisant des réactifs spécifiques en vue de générer des radicaux libres aptes à dégrader les polluants organiques. Les radicaux libres ($\text{OH}\cdot$) sont des espèces hautement actives susceptibles de réagir avec un grand nombre de composés organiques réfractaires. Spécifiquement, ces espèces radicalaires réagissent avec les doubles liaisons -C=C- et attaquent les noyaux aromatiques, soit les composants majeurs des HAP. Les réactifs chimiques sont utilisés comme : $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, UV/O_3 , $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ et $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$, etc. [27]. Le réactif le plus souvent utilisé est le réactif de Fenton qui exploite le peroxyde d'hydrogène et les ions Fe^{2+} , lesquels « ions » peuvent être présents dans l'effluent à traiter sous forme libre ou le plus souvent complexe. Ce réactif est souvent utilisé pour dégrader les composés organiques réfractaires. Les réactions de décomposition avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont amorcées en utilisant des sels métalliques (en particulier des métaux de transition) afin de générer des espèces radicalaires ($\text{OH}\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$, etc) très réactives face aux polluants organiques. En particulier, Goel *et al.* (2003) [28] ont étudié l'efficacité du réactif de Fenton à dégrader le naphthalène présent dans les eaux brutes destinées à la consommation humaine. Les essais ont été effectués à différents pH (4.0 et 7.0) en utilisant l'action combinée du peroxyde/fer ferreux à différentes concentrations de réactifs ou en utilisant l'action seule du peroxyde. Les meilleurs résultats ont été enregistrés grâce à l'action combinée peroxyde/fer ferreux.

Pour des concentrations relativement élevées de H_2O_2 (10 à 12 mg l^{-1}), le peroxyde d'hydrogène en présence de fer ferreux (30 $\text{mg Fe}^{2+} \text{ l}^{-1}$) permettait d'obtenir des taux d'élimination de naphthalène de 99% et 96% à des pH respectifs de 4.0 et 7.0. En comparaison, pour des concentrations relativement faibles de H_2O_2 (2 à 3 mg l^{-1}), des rendements de dégradation de 84 et 68% étaient respectivement enregistrés à pH 4.0 et 7.0 pour une quantité équivalente de Fe^{2+} (30 mg l^{-1}). L'action seule du peroxyde d'hydrogène était quasiment inefficace à oxyder le naphthalène. Nam *et al.* [29] ont observé de meilleurs taux de

dégradation des HAP de faibles masses moléculaires (80% pour les composés à 2 ou 3 cycles contre 20% pour les composés à 4 et 5 cycles).

L'irradiation par les ultra-violet (UV) peut aussi être utilisée en synergie avec le peroxyde d'hydrogène afin d'éliminer les HAP. Une utilisation conjointe des UV/H₂O₂ permet de générer des radicaux libres aptes à oxyder la matière organique. Le procédé UV/H₂O₂ permet de dégrader une plus large variété de polluants que la simple photolyse. A titre d'exemple, la combinaison UV/H₂O₂ s'est avérée plus efficace pour dégrader le benzo(a)pyrène que la simple photolyse dans les mêmes conditions [30]. Toutefois, une complète minéralisation n'a pu être obtenue dans les conditions testées et les sous-produits d'oxydation formés présentaient une certaine mutagénicité et toxicité. L'ozone est un oxydant puissant, instable en milieu aqueux. C'est un composé allotropique (plusieurs formes de résonance), à forte réactivité, possédant les propriétés d'un dipôle. De ce fait, l'ozone a donc une grande capacité d'attaque des composés organiques et des métaux, à l'exception de l'or, du platine et de l'iridium. L'ozone peut réagir selon deux voies : la voie directe et la voie indirecte. Ces deux types de réactions chimiques sont simultanés. Les propriétés physico-chimiques de l'effluent à traiter déterminent une voie préférentielle, mais les deux mécanismes coexistent. La figure 3 montre un mode d'action de l'ozone en milieu aqueux.

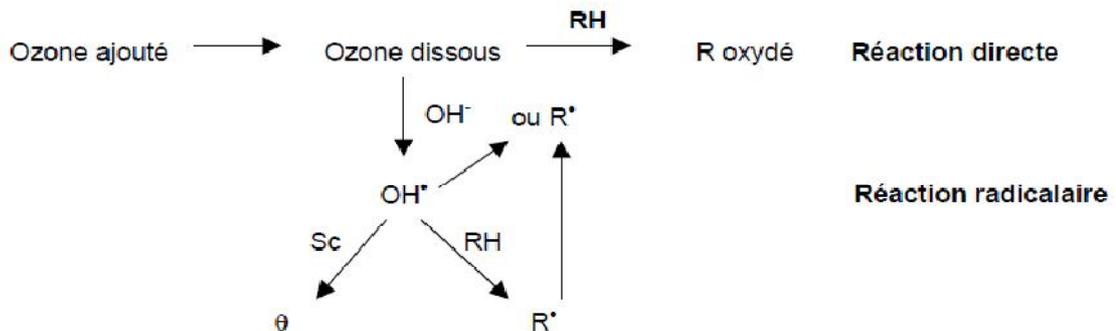


Figure 3 : Mode d'action de l'ozone en milieu aqueux (RH=composé à oxyder, R• = composé radicalaire, Sc: piège à radicaux, θ : piège à radicaux oxydé), d'après Doré [31].

Le tableau 5 montre les conditions et constantes de réactions à partir de l'ozonation de HAP dans l'eau.

Le tableau 5 : les conditions et constantes de réactions à partir de l'ozonation du naphthalène dans l'eau.

| HAP | C_0 (M) | $K(M^{-1}S^{-1})$ | conditions |
|------------|--|-------------------|--|
| Naphtalène | $0.4-0.7 \times 10^{-5}$ | 5.5×10^2 | solution aqueuse, colonne, semi Continu, V=3L, pH =5.6, T=1°C |
| Composé | conditions | | produits intermédiaires |
| Naphtalène | solution aqueuse 3.3 mg O ₃ /l, C ₀ = 1.6×10^{-4} M de naphtalène | | cis et trans 2- formylcinnamaldehyde |

En solution aqueuse, dans la gamme de 1 à 20 °C, des études ont obtenu des résultats différents, à savoir une amélioration de l'efficacité avec l'augmentation de la température. Travaillaient sur des solutions aqueuses sursaturées (2 g/L d'HAP dispersés dans l'eau), Haeseler et al. [32] ont montré que la réactivité était directement liée à la solubilité des HAP (naphtalène > phénanthrène > pyrène).

La dose d'ozone varie avec la concentration des HAP à éliminer, soit un ratio 0.75 mg O₃/mg naphtalène, 0.4mg O₃/mg de pyrène, 1.7mg O₃/mg benzo[a] anthracène.

1.3.1.7 L'ultrason :

Les ultrasons peuvent être utilisés pour la dégradation des HAP en solution. Mais en raison de leur faible solubilité dans l'eau, les essais sont réalisés sur des solutions aqueuses très diluées ou dans des mélanges solvant/eau. Les procédés d'ultrasons passent par trois zones avec différentes réactivités [33]:

1) la première, se trouve dans la bulle de cavitation (phase gazeuse), siège de fortes températures (3000 à 5000 K) et pression (500 à 10000 atm), Dans cette région s'effectue la décomposition thermique de l'eau, avec production d'atomes d'hydrogène et de radicaux hydroxyles hautement réactifs.

2) la deuxième est l'interface gaz-liquide localisée autour de la bulle de cavitation. Cette région contient une concentration significative de radicaux hydroxyles.

3) la troisième est la solution, où se trouve la plus faible réactivité.

La plupart des auteurs attribuent la dégradation des HAP aux mécanismes radicalaires ou aux mécanismes thermiques pour les HAP semi-volatils pouvant

pénétrer dans les bulles de cavitation [21]. Selon Psillakis et al. [34] uniquement les HAP les plus petits (naphtalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène) sont dégradés en 120-180 min sous les conditions de sonication : 80kHz, 130 W/L de densité de puissance, concentration initiale 30µg/L.

1.3.1.8 Le traitement électrochimique :

Plusieurs études ont montré le potentiel de l'électro-oxydation pour dégrader les polluants aromatiques polycycliques présents dans divers types d'effluents industriels comme les textiles, les eaux usées urbaines ou de tannerie ainsi que les eaux usées issues d'industries de production d'huile d'olives ou encore les sols [3]. Stichnothe *et al.* (2002) ont évalué l'efficacité de l'oxydation électrochimique afin de dégrader le tri-butylétain et les HAP présents dans des sédiments. Au total, 16 molécules de HAP ont été suivies. D'une façon générale, la concentration totale de HAP passait d'une valeur initiale de 4.1 mg kg⁻¹ à une valeur finale de 0.53 mg kg⁻¹ soit une réduction de 90% après 120 min de traitement [35].

1.3.2 Elimination par voie biologique

La bioremédiation est la technologie la plus « écologique ». Elle repose sur l'utilisation d'organismes ou micro-organismes afin de dégrader ou d'extraire les polluants du sol.

1.3.2.1 Bioréacteur « Bioslurry » :

Le traitement en réacteur, consiste à créer une boue épaisse en mettant le sol en suspension avec de l'eau et des microorganismes. La biodégradation est alors stimulée par oxygénation et apport de nutriments. Cette technique s'applique particulièrement aux sols difficiles à traiter et aux substances peu biodégradables [36]. En effet, elle permet un contrôle plus efficace des conditions de la biodégradation (homogénéisation, chauffage, apports de nutriments...) ce qui entraîne une biodégradation accrue.

1.3.2.2 Le landfarming

Il repose sur l'épandage de terres contaminées sur des surfaces plus ou moins préparées à l'avance. Le site est contrôlé tant au point de vue de son nivellement qu'au niveau des eaux de ruissellement. Le pH est ajusté et une supplémentation azotée est réalisée afin de stimuler l'activité microbienne. Cette technique

s'emploie principalement *ex situ*, mais également *in situ* sur une épaisseur ne dépassant pas 50 à 60 cm.

1.3.2.3 Bioventing

Le traitement biologique par aération du sol, fournit aux microorganismes présents dans le sol l'oxygène nécessaire à la biodégradation par injection d'air. Il est également possible d'injecter de l'eau oxygénée (H₂O₂) qui est une source d'oxygène pour les bactéries. L'eau oxygénée et des nutriments sont injectés dans le sol, l'eau oxygénée en excès est récupérée par des puits de pompage.[36]

1.3.2.4 La phytoremédiation :

Elle consiste à utiliser des plantes pour le traitement de contaminants de l'environnement. Cette méthode est peu coûteuse et applicable à la restauration des sites et au traitement des eaux contaminées par des composés organiques. Les plantes adsorbent, accumulent ou volatilisent ces composés, elles augmentent également l'activité microbologique de la rhizosphère dans le sol. La rhizosphère est particulièrement impliquée dans la dégradation des HAP [37]. Ce procédé est aussi utilisé pour le sol mais dans ce cas, l'apport de la phytoremédiation devient difficile à étudier du fait des interactions entre sol, plantes, rhizosphère et micro-organismes. Néanmoins, des expériences ont montré une augmentation de la dégradation de pyrène en présence de plantes. Des études récentes, menées au laboratoire, ont montré que les plantes distribuent de l'oxygène au niveau de la rhizosphère, augmentant ainsi l'activité bactérienne de dégradation du pyrène.

1.3.2.5 La biodégradation

La biodégradation des hydrocarbures par les micro-organismes appelés hydrocarbonoclastes a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. L'activité humaine, au travers des multiples sources de pollution et par la mondialisation des déplacements, favorise l'apparition de nouvelles souches aptes à la dégradation des hydrocarbures. La dégradation des HAP de "faible poids moléculaire", de 2 ou 3 noyaux aromatiques, des HAP de "haut poids moléculaire" pour lesquels le nombre de noyaux aromatiques est supérieur ou égal à 4. en effet, les enzymes

impliquées dans la dégradation de ces deux types de HAP sont généralement différentes et peu d'information sont disponibles sur les enzymes de dégradation des HAP de haut poids moléculaire. [11]

1.3.2.5.1 Type de biodégradation:

La biodégradation primaire est définie comme la dégradation partielle de la structure moléculaire de la substance initiale. Cette dégradation peut conduire soit à la perte de propriétés caractéristiques de la substance telles que son activité biologique, soit à l'apparition de sous-produits de transformation parfois plus toxiques que la substance de départ. La biodégradation totale ou ultime est décrite comme la biodégradation complète de la structure moléculaire de la substance, qui conduit à la formation de dioxyde de carbone, de méthane, d'eau, de dérivés minéraux ou de constituants de micro-organismes. La biodégradation est dite facile si la substance se dégrade rapidement dans les conditions environnementales. Les lignes directrices de l'OCDE 301 de A à F disponibles sur le site de l'OCDE décrivent les différents tests standardisés utilisés pour déterminer si la substance est facilement biodégradable. Par opposition, la biodégradabilité est dite intrinsèque si la substance est dégradée dans des conditions optimales (forte quantité de microorganismes). [38]

1.3.2.5.2 Principes de la biodégradation

Le terme biodégradation correspond à l'élimination complète d'une substance organique avec comme produits du métabolisme, des produits simple tel que H₂O, CO₂, CH₄, H₂, acétate et autre produits de fermentation...

Le processus complet de dégradation est également appelé minéralisation, biodégradation ultime. D'autre terme ont été également proposés pour définir d'autres situations mettant en jeu les micro-organismes. La biodégradation acceptable est évoquée lorsque la transformation du composé lui retire ses propriétés toxiques. La voie de dégradation la plus directe (voie métabolique) est l'utilisation par le micro-organisme de la substance organique comme source d'énergie et de carbone. Le métabolisme microbien implique que l'équipement enzymatique des micro-organismes utilise le substrat comme source de carbone et d'énergie et autorise la croissance cellulaire [11]

1.3.2.5.3 Processus de biodégradation

Les différentes phases qui interviennent durant le processus de biodégradation peuvent se résumer en cinq étapes [7]:

- La proximité du substrat. Les micro-organismes doivent être à proximité du substrat à dégrader; le terme "proximité" doit s'entendre comme étant le champ de diffusion du produit ou des enzymes extracellulaires.
- L'adsorption sur les surfaces solides. Le processus d'adsorption des micro-organismes sur le substrat peut être une phase indispensable pour permettre une association et une métabolisation des composés à dégrader.
- Les enzymes extracellulaires. Les polymères insolubles naturels ou de synthèse (ex plastique) récalcitrants à la biodégradation. La réponse biologique à ce problème est la sécrétion d'enzymes extracellulaires, capables de diffuser et de réaliser une hydrolyse partielle pour libérer des produits solubles de plus faible poids moléculaire.
- Le transport du substrat. Les substrats doivent pouvoir être transférés à l'intérieur de la cellule microbienne.
- Le métabolisme intracellulaire. La dégradation des substrats peu inductible, parfois codés dans les plasmides.

1.4 Biodégradation du naphtalène :

1.4.1 La biodégradation microbienne :

1.4.1.1 Biodégradation aérobie :

Le traitement biologique aérobie est le procédé le plus adéquat pour traiter à grande échelle un effluent constitué de composés biodégradables. La dégradation du naphtalène, HAP à 2 cycles accolés, est l'une des plus étudiée. De nombreuses souches ont été identifiées pour leur capacité à croître sur naphtalène comme seule source de carbone. C'est ainsi que des souches de *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas* et *Rhodococcus* ont été isolées.[11,39]

Tableau 6: les Principales souches bactériennes aérobies participant à la dégradation

| Bactéries gram - | Bactéries gram + |
|----------------------------------|---------------------|
| Pseudomonas sp. | Nocardia sp. |
| Acinetobacter sp. | Mycobacterium sp. |
| Alcaligenes sp. | Corynebacterium sp. |
| Flavobacterium/ groupe Cytophage | Arthrobacter sp. |
| Xanthomonas sp. | Bacillus sp. |

Le naphtalène est l'un des HAP les plus simples et les plus facilement biodégradables. Ainsi, les voies métaboliques de dégradation par des souches bactériennes a beaucoup été étudiée, notamment chez les espèces du genre *Pseudomonas*. La voie de dégradation du naphtalène est représentée sur la figure 4

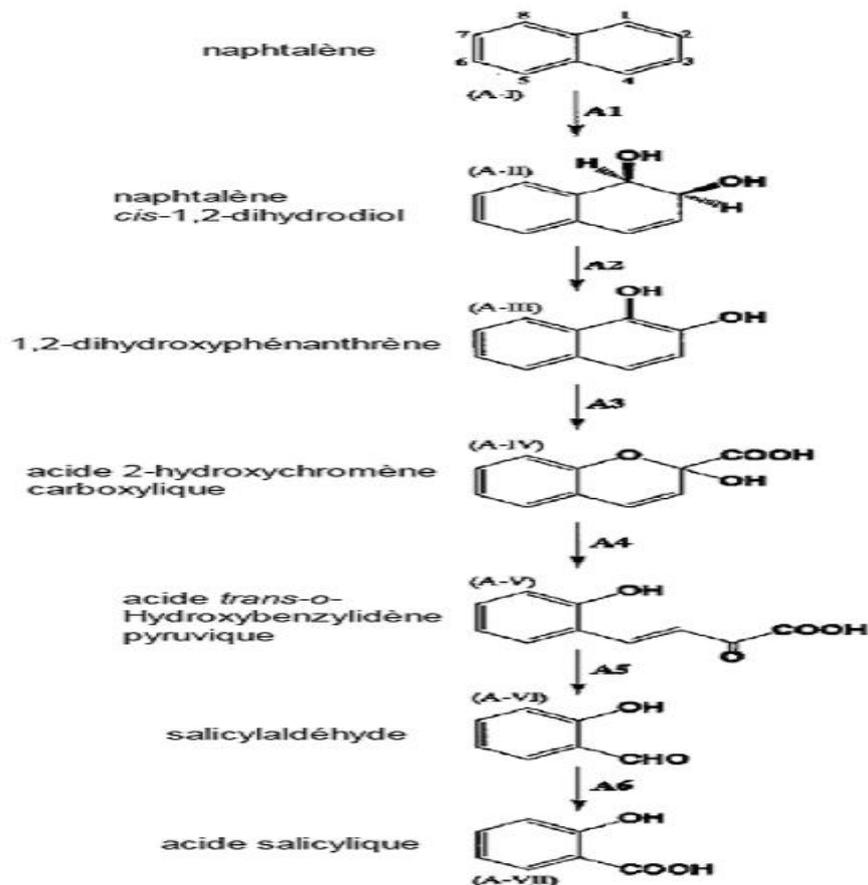


Figure 4 : voies cataboliques proposées pour le naphtalène par des bactéries aérobies du genre *Pseudomonas*. Les enzymes impliquées sont : A1 naphtalène dioxygénase, A2 déshydrogénase, A3 extradiol dioxygénase, A4 isomérase, A5 aldolase, A6 salicylaldehyde déshydrogénase [40]

Le naphthalène est métabolisé en acide salicylique, lequel est converti en catéchol dans la plupart des bactéries. Le catéchol est alors clivé. Deux voies sont possibles : voie *méta* (le catéchol est clivé en acide semialdéhyde 2-hydroxymuconique) ou la voie *ortho* (le catéchol est clivé en acide *cis*, *cis*-muconique). D'autres bactéries convertissent le salicylate en acide gentisique (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) [41]. La première étape de dégradation du naphthalène est catalysée par la naphthalène dioxygénase qui réalise la dihydroxylation de celui-ci pour former du *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalène. Cette enzyme a été purifiée : il s'agit en fait d'un complexe enzymatique constitué d'une NADH-ferrédoxine réductase (RED), d'une ferrédoxine (FER), transférant les électrons de la réductase à une oxygénase terminale (ISP pour Iron Sulfur Protein). La structure tridimensionnelle du naphthalène dioxygénase de *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 a été établie. Il a été montré que la naphthalène dioxygénase possède une spécificité très large : elle est capable d'oxyder le naphthalène, le phénanthrène, l'anthracène, le biphenyle, le dibenzothiophène, le dibenzofurane et l'acridine.[2]. Les gènes codant pour les enzymes de dégradation du naphthalène sont portés sur des plasmides pour certaines bactéries. Ces plasmides, transmissibles entre espèces, expliqueraient la propagation des gènes dans l'environnement. Certaines bactéries présentent une localisation différente de leurs gènes de dégradation du naphthalène : certains gènes sont localisés sur le chromosome alors que d'autres se trouvent sur un plasmide . Le produit de la réaction de transformation du naphthalène par la naphthalène dioxygénase est un dihydrodiol. Une déshydrogénase le convertit en 1,2- dihydroxynaphthalène. Celui-ci est alors le substrat d'une deuxième dioxygénase, pour être transformé en acide 2-hydroxychromène carboxylique lequel est converti en acide *trans*-*o*-hydroxybenzylidène pyruvique par une isomérase avant d'être clivé en salicylaldéhyde et pyruvate par une aldolase. Finalement, le salicylaldéhyde est converti en salicylate par une déshydrogénase.[24]. Un autre mécanisme est proposé pour la biodégradation du naphthalène par *Nocardia otitidiscaviarum*, dans ce dernier l'acide salicylique ne figure pas comme métabolite de dégradation, des tests montre que cette bactérie ne peut croître sur ce dernier. Les analyses permettent d'identifier l'acide benzoïque et *cis*-*cis* acide muconique. [42]

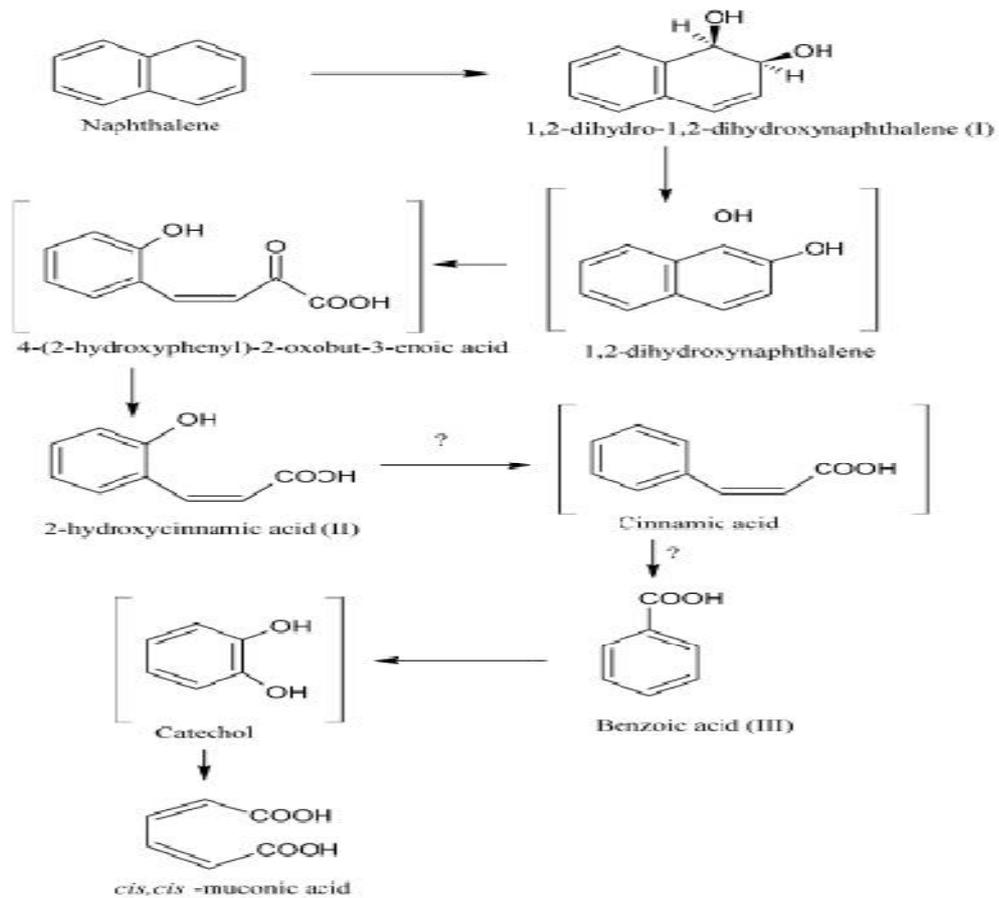


Figure 5: le mécanisme proposé pour la biodégradation du naphthalène par *Nocardia otitidiscaviarum*

Tableau 7: les principaux sous produits de la dégradation du naphthalène par différentes bactéries

| Composé | microorganismes | produits |
|-------------|------------------------------------|---|
| Naphthalène | <i>pseudomonas</i> sp | acide salicylique, catéchol, acide gentisique |
| | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | acide salicylique |
| | <i>Mycobacterium</i> sp | acide salicylique, catéchol |
| | <i>Rhodococcus</i> sp | acide salicylique, acide gentisique |

1.4.1.2 Biodégradation anaérobie :

La biodégradation des HAP par voie anaérobie est moins étudiée. Longtemps considérée comme irréalisable, les récents résultats montrent qu'il y a un potentiel réel des flores anaérobies à dégrader ces composés [43,44]

1.4.1.2.1 Conditions dénitrifiantes

Mihelcic et Luthy, (1988) [45] ont mis en évidence la dégradation du naphthalène et de l'acénaphthène, sous conditions dénitrifiantes en aquifères et sols pollués. La minéralisation a été confirmée par la production de 14 CO₂ à partir de 14C-naphthalène : près de 90% des HAP peuvent être minéralisés en CO₂, mais aucune donnée n'existe sur les intermédiaires [46]. D'autres études plus récentes ont confirmé que les HAP peuvent se dégrader en absence d'oxygène si le nitrate est disponible comme accepteur d'électrons. Ainsi, les conditions de réduction des nitrates paraissent favorables à la dégradation des HAP. [47]

1.4.1.2.2 Conditions sulfato-réductrices

Plus récemment, la dégradation des HAP sous conditions sulfato-réductrice a été démontrée [48]. Ces auteurs ont montré une biodégradation significative du naphthalène, du phénanthrène et du fluoranthène dans le cas de sédiments marins contaminés. Les études de Chang et al. (2001)[49] mettent en évidence le potentiel de dégradation anaérobie du phénanthrène par des bactéries sulfato-réductrices dans des sédiments. Les premiers résultats sur les métabolites de la dégradation du naphthalène furent publiés en 1997[48]. Les auteurs ont travaillé sur la biodégradation du naphthalène et du phénanthrène sous condition sulfato-réductrices. Les intermédiaires identifiés sont : l'acide 2-naphtoïque et l'acide phénantroïque. L'étape initiale de dégradation correspondait à l'incorporation d'un groupe chimique réactif par carboxylation ou par scission d'une molécule d'eau (hydroxylation).

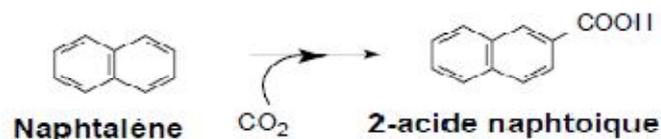


Figure 6 : Activation de la réaction de dégradation anaérobie du naphthalène par l'addition de CO₂ (Meckenstock et al., 2000).[50]

Le cycle non substitué est alors à son tour réduit avec des hydrogénations successives permettant d'obtenir un carboxylate, qui est minéralisé [50,21]. La figure 7 montre la voie réductrice de la biodégradation du naphthalène avec les intermédiaires suivants : l'acide 2-naphtoïque, le 1,2,3,4-tetrahydro-acide-2-naphtoïque, le 5,6,7,8-tetrahydro-2-acide naphtoïque, l'hexahydro-2-acide naphtoïque, l'octahydro-2-acide-naphtoïque, et le decahydro-2-acide naphtoïque.

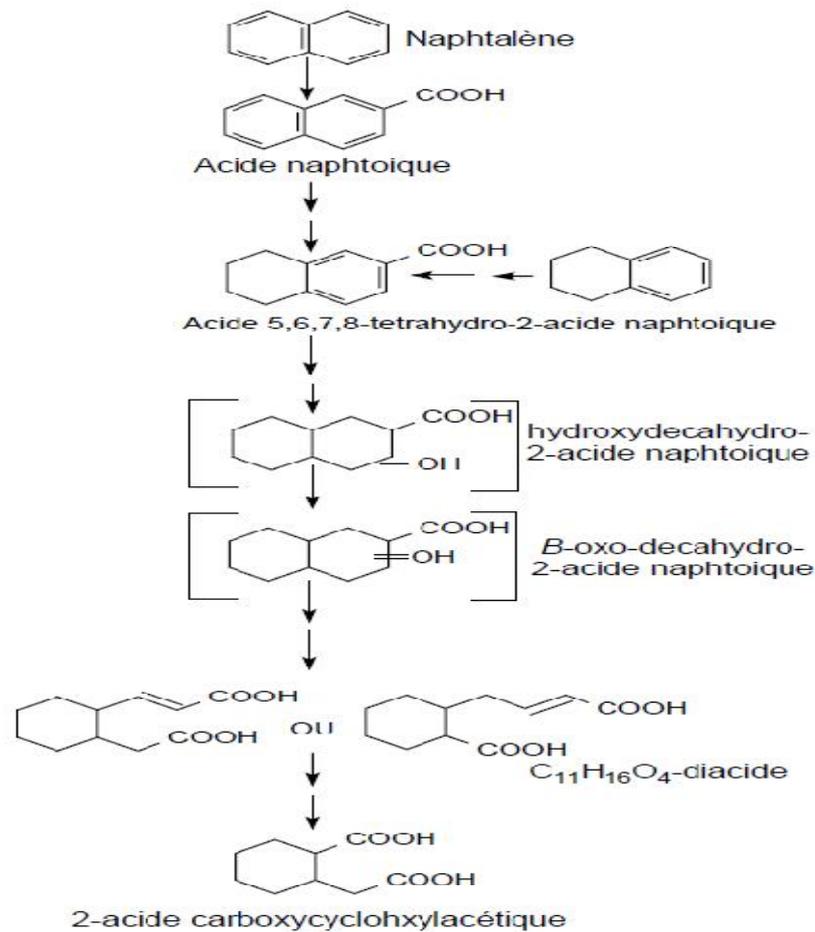


Figure 7 : Voie réductrice de la biodégradation du naphthalène (Annweiler, et al., 2002).[51]

1.4.1.2.3 Conditions méthanogènes

Trably (2003) a mis en évidence le potentiel naturel d'élimination de 13 HAP par des écosystèmes adaptés lors de la digestion anaérobie de boues urbaines naturellement contaminées (pas de dopage des boues) dans des réacteurs continus. Cette disparition semble toutefois fortement liée au taux de réduction des matières sèches laissant supposer que le facteur limitant est la biodisponibilité. Un certain nombre de paramètres fut alors testé afin d'améliorer cette biodisponibilité et donc la biodégradation : augmentation de la température,

ajout de surfactants ou de solvants. La température a un effet positif sur l'augmentation de la biodégradation. Par contre les ajouts de surfactants et de solvant entraînent une altération de la biodégradation par perturbation de la flore impliquée (modification radicale des profils microbiens). [52]

L'identification des souches a révélé la présence de microorganismes proches de ceux impliqués dans la dégradation de diverses molécules aromatiques. Dans le même temps, Chang et al. (2002)[53] démontrent sur des cultures discontinues anaérobies inoculées avec des enrichissements issus de sédiments pollués par des HAP la dégradation de divers HAP, seul ou en mélange, dans des sols. Le consortium utilisé dans cette étude est capable de biodégrader le phénanthrène, l'acénaphthène, l'anthracène, le fluorène et le pyrène avec des rendements de 80 à 100% en 90 jours. Les conditions sulfato-réductrices semblent être plus favorables à la dégradation des HAPs que les conditions méthanogènes. L'ajout de boues semble être aussi favorable à la biodégradation sans qu'il y ait de réelles mesures des pertes abiotiques par simple adsorption des HAP ajoutés sur la matière organique des boues.

Toujours sur des systèmes discontinus simplifiés et dopés, Chang et al. (2003) ont montré la capacité d'écosystèmes anaérobies à dégrader les HAP ajoutés seuls ou en mélange en présence de boues urbaines ou industrielles. Un des résultats intéressants est que les vitesses de dégradation de chaque HAP sont supérieures lorsqu'ils sont ajoutés en mélange, impliquant un effet stimulant du mélange par rapport à la présence d'un seul HAP. [54]

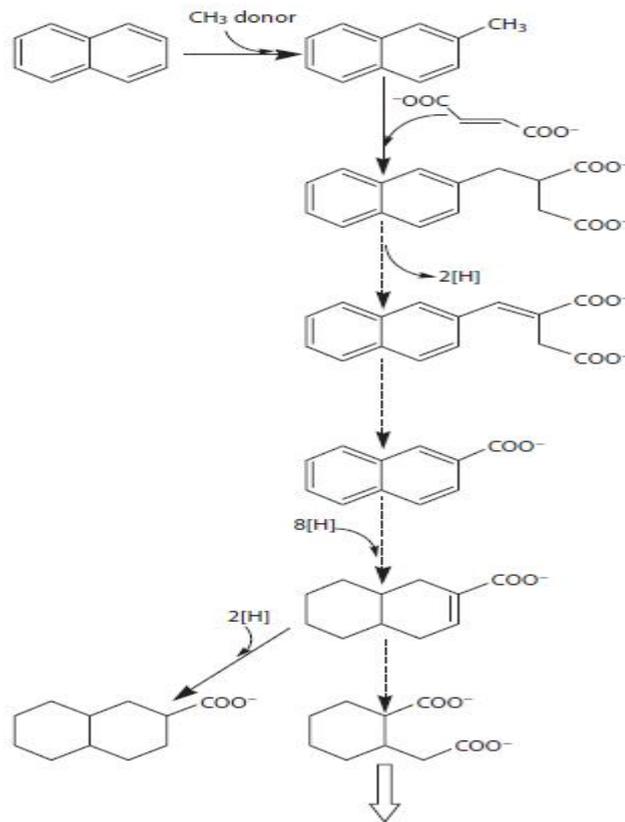


Figure 8 : dégradation du naphthalène en conditions méthanogènes

1.4.2 Biodégradation par les champignons :

Les HAP peuvent être dégradés par certains champignons (*Cunninghamella elegans*, *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*) qui produisent des cytochromes P450 monooxygénases. Ces monooxygénases transforment directement les HAP par incorporation d'une molécule d'oxygène en formant un trans-dihydrodiol-HAP, le phénanthrène est métabolisée par différentes espèces de champignons. Le phénanthrène est métabolisé via la production de trans-1,2-, trans-3,4-, et trans-9,10- dihydrodiols et d'un conjugué glucoside [55]. La production d'enzymes extracellulaires à l'action peu spécifique permet de transformer aussi bien les plus gros HAP que les plus légers, les différences de potentiel de dégradation étant fonction des activités métaboliques bactériennes. En effet, ces champignons ne se développent qu'en présence d'une source de carbone annexe et ne participent le plus souvent qu'à un cométabolisme des HAP [56]. Salicis et al. (1999) et Ravelet et al. (2000) ont récemment montré la capacité de certains

Deutéromycètes des genres *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, et *Rhizopus sp.* d'utiliser le fluoranthène et le pyrène comme seules sources de carbone et d'énergie. [57,58]. Certains champignons dits de la pourriture blanche (*Pycnoporus cinnabarinus*, *Bjerkandera adusta* et *Pleurotus ostreatus*) produisent, les laccases. Sous l'action de l'ensemble de ces enzymes, la transformation initiale des HAP augmente significativement leur biodégradabilité, l'attaque du cycle par les systèmes enzymatiques bactériens étant facilitée par la présence d'un groupe réactif.[21] . Il existe d'autres familles de microorganismes capables de transformer ou dégrader les HAP. Il a notamment été montré que certaines algues unicellulaires pouvaient métaboliser les plus petits HAP (naphtalène). De même, Romero et al. (1998) ont isolé des souches de levure (*Rhodotorula glutinis*) utilisant le phénanthrène comme seule source de carbone et d'énergie. Le rôle de ces microorganismes dans le catabolisme des HAP au sein d'écosystèmes complexes reste encore mal connu [59]

1.4.3 Les facteurs affectant la biodégradation du naphtalène :

1.4.3.1 Les facteurs physiques et chimiques :

1.4.3.1.1 La concentration du substrat :

Différents concentrations du naphtalène allant de 30 mg/l jusqu'au 20g/l sont testées dans la biodégradation microbienne, les basses concentrations sont facilement dégradables et ne présentant aucun effet toxique sur les bactéries alors que les concentrations élevés peuvent inhiber la biodégradation du naphtalène selon l'espèce utilisé. Des études montrent que *Pseudomonas sp.* HOB1 est capable de métabolisé le naphtalène a des concentrations extrêmement élevés 60000 ppm [5]. Généralement, des concentrations autour de 0.5 à 1g/l sont biodégradables par la majorité des espèces bactériennes connus par leur capacité de dégrader le naphtalène [42, 60].

1.4.3.1.2 La biodisponibilité :

Comme tous les hydrocarbures aromatiques polycycliques, la faible solubilité de naphthalène pose un problème réel car la surface de contact à un effet sur le processus de biodégradation, le faible rapport masse/ volume inhibe la croissance bactérienne. La biodisponibilité du naphthalène est dans un facteur limitant dans le processus de sa dégradation car les bactéries ne dégradent généralement que la fraction soluble de ce dernier [61]. Une possibilité pour augmenter la disponibilité de ce composé hydrophobe est l'ajout des agents tensioactifs. Les surfactants sont des molécules amphiphiles qui possèdent une « tête » polaire (hydrophile) et une « queue » apolaire (hydrophobe). Selon la nature du groupement polaire, on distingue les surfactants anioniques, cationiques, non ioniques et amphotère. En raison de leur caractère amphiphile, les molécules de surfactants peuvent se dissoudre dans l'eau sous forme de monomères, s'adsorber à une interface, ou être incorporées avec d'autres molécules de surfactants pour former une micelle.

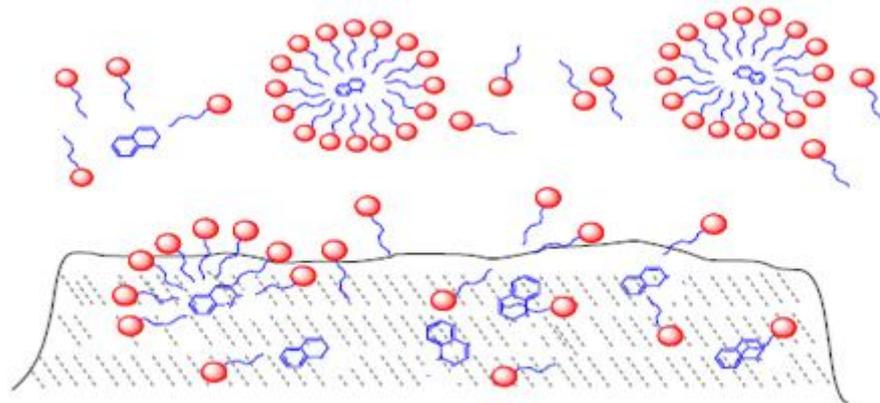


Figure 9: Formation d'une micelle dans la solution de surfactant

L'ajout de surfactants peut donc posséder soit un effet positif, soit négatif, soit nul sur la dégradation des HAP. Différentes études montrent qu'en conditions de laboratoire, les surfactants anioniques (Dowfax, 8390) et non-ioniques (Triton X100, Tergitol NP10, Tyloxapol, Brij 35....) affecteraient l'adhésion des microorganismes aux micelles et inhiberaient leur croissance mais ne présenteraient pas de réelle toxicité, contrairement aux surfactants

cationiques, plus toxiques mais possédant une plus grande efficacité de solubilisation des HAP [3, 62]. Des études menées sur l'effet des surfactants sur la biodégradation du naphthalène montrent que la présence de ses derniers augmente le temps de la biodégradation du naphthalène. Le CTAB et SDBS inhibent la biodégradation du naphthalène par *Pseudomonas* [63,64]. Les études ont rapporté que 96% des bactéries isolées des eaux fraîches sont capables de produire des biosurfactants. Donc La sécrétion du biosurfactant est un processus très important pour que les hydrocarbures soient assimilés par les bactéries et les champignons. [65,66]

1.4.3.1.3 Influence de température :

La température influe sur la biodégradation de naphthalène en modifiant son état physique et l'activité physiologique des microorganismes. La solubilité augmente généralement lorsque la température augmente.[11]. La biodégradation du naphthalène est largement étudiée par des souches mésophiles et surtout par les *Pseudomonas*. L'isolement des bactéries thermophiles tels que (*Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*, *Thermodesulfobacterium*) et d'*Archae* hyper thermophiles (*Thermococcus*, *Archeaoglobus*) dans des puits de pétrole a orienté les études vers l'utilisation des souches thermophiles [67], ces derniers présentent des résultats intéressants pour la dégradation du naphthalène a des taux de dégradation élevés même lorsque la concentration est importante [6,42]

1.4.3.1.4 Influence du l'oxygène

L'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases est inclut dans la première étape dans le métabolisme de dégradation de naphthalène (les HAP en général) soit par les bactéries ou par les champignons dont l'oxygène moléculaire est indispensable [11, 21]. La concentration en oxygène a été identifiée comme un facteur limitant pour la vitesse de la biodégradation du pétrole dans les sols et les eaux souterraines. La dégradation anaérobie des hydrocarbures par les microorganismes peut se produire mais à des vitesses négligeables et son importance écologique est considérée comme de moindre importance. [69]

1.4.3.1.5 Influence du pH et la salinité :

La salinité moyenne des milieux océaniques est de l'ordre de 3,5 % et l'intervalle de variation se situe en général entre les limites de 3,3% et 3,7%. Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des microorganismes hydrocarbonoclastes . Quand la concentration en chlorure de sodium dépasse 1 M, l'élimination du pétrole brut diminue rapidement. Pour ce type de substrat, les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation. Bertrand et al. (1993) [70] ont étudié l'influence de la concentration en chlorure de sodium sur la biodégradation des hydrocarbures par deux communautés microbiennes, ils ont trouvé que la biodégradation est maximale pour une concentration de 0,4 M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci. Ward et Brock (1978) ont montré que la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3,3 à 28,4%, et ils ont attribué ces résultats à une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes [71]. L'influence du pH a été très peu étudiée, mais il ne semble jouer qu'un rôle relativement mineur en milieu marin. Contrairement à la plupart des écosystèmes aquatiques, les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11,0. Des valeurs extrêmes de pH, ce qui est le cas pour quelques types de sols, pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures (naphtalène). La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité (Leahy et Colwell, 1990) ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques. [72]

1.4.3.2 Les facteurs biologiques

Les hydrocarbures sont principalement dégradés dans l'environnement par les champignons et les bactéries hétérotrophes. Chaque espèce microbienne peut métaboliser un nombre limité de substrats hydrocarbonés, de sorte que l'assemblage de populations mixtes permet un éventail étendu de réactions enzymatiques possibles qui se montre capable d'assimiler et de dégrader des

mélanges souvent complexes d'hydrocarbures tels que pétroles bruts ou raffinés. Floodgate établit une liste de 25 genres de bactéries et 27 genres de champignons dégradant les hydrocarbures. Les genres bactériens qui reviennent souvent sont *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Aarthobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*. Parmi les champignons, on relève *Aureibasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *sporobolomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mortierella*. Dans l'environnement marin, les bactéries sont considérées comme les espèces microbiennes dominantes qui contribuent à la dégradation des hydrocarbures. Les champignons sont plus importants dans les milieux aquatiques terrestres (rivières, lacs), sans toutefois que l'on puisse connaître l'importance relative des deux communautés microbiennes, bactéries et champignons dans la dégradation des hydrocarbures. Dans les sols, les deux groupes participent activement au processus de biodégradation [7]. En conclusion, il apparaît que la biodégradation des hydrocarbures est un processus complexe qui dépend de la nature et des quantités d'hydrocarbures présents, des conditions environnementales et de la composition des communautés microbiennes.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

Dans le cadre d'un projet de recherche financé par l'AUF par le montage du pôle d'excellence régional des bioprocédés environnementaux et industriels (Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie) sur la biodégradation des hydrocarbures et la production des biosurfactants, une collection des souches bactériennes a été sélectionnée et mise en place pour l'étude de la biodégradabilité de certains dérivés pétroliers dont le naphtalène qui a fait l'objet de cette présente étude.

Le biotope utilisé pour isoler des souches bactériennes aérobies, est un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud, Sud d'Algérie. Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à différentes profondeurs. La méthode d'adaptation progressive en utilisant le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie a permis d'obtenir des souches a fort potentiel de dégradation.

2-1 Caractéristiques géoclimatiques du site d'étude :

Le choix du Biotope est basé sur une zone polluée anciennement (même actuellement) par le pétrole brut, La zone qui apparait idéal pour cet isolement était la région de Hassi-Messaoud, situé à 870 Km au Sud - Est d'Alger. Une région connue par la production importante du pétrole

La figure 10 montre : Sols sableux contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi Messaoud,



Figure 10: sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud)

2- 2 Echantillonnage et caractérisation du sol :

Dans le cadre de cette étude, la surface ou superficie du bournier retenu est de (50 m × 30 m), donc une superficie égale à 1500 m² ; ce qui entraîne qu'un prélèvement par bournier suffisait.

Deux bourniers fait l'objet de la présente étude, les prélèvements ont été effectués le 13 Mars 2007 à 16h (heure locale) à l'aide d'une spatule désinfectée par l'éthanol à une profondeur de 20 à 50 cm. Pour chaque échantillon, 1Kg de sol prélevé est mis dans un sachet en plastique stérile. La température des échantillons *in situ* est égale à 22 °C. Les échantillons ont été placés dans un frigorifiant (+4 °C) jusqu'à l'arrivée au laboratoire où ils ont été ensuite conservés au réfrigérateur en attendant les analyses.

Le dosage du carbone organique total (COT) et les hydrocarbures totaux (HT) ont été réalisés, respectivement, au sein du laboratoire de géochimie minérale et le laboratoire des méthodes spectrales au niveau du Centre de Recherche et Développement de Boumerdes.

2.3 Les principaux paramètres analysés :

2.3.1 pH : Selon la norme AFNOR X 31-104, la mesure se fait le plus souvent par électrométrie en utilisant un pH-mètre. Le sol est mis en suspension soit dans l'eau distillée (on obtient le pH-eau), soit dans une solution de chlorure de potassium pH-KCl. Le pH-KCl donne des valeurs plus basses, mais moins fluctuantes selon les périodes de l'année comparativement au pH-eau.

2.3.2 Dosage des hydrocarbures totaux par spectrophotométrie infrarouge : Selon AFNOR 90114. L'échantillon doit être homogénéisé avant la pesée et le poids retenu est de l'ordre de 2 g l⁻¹. Les étapes suivies sont successivement :

2.3.2.1 Extraction :

- fixer les cartouches aux adaptateurs.
- peser les échantillons dans les cartouches.

- placer une boule de coton hydrophile au dessus de l'échantillon et mettre en place les cartouches dans l'unité d'extraction.
- mettre sur position Boiling. Les cartouches sont immergées dans le solvant CCl_4 à $160\text{ }^\circ\text{C}$, le temps d'immersion dépend du type de l'échantillon (20-30 min).

2.3.2.2 Récupération du solvant :

- après rinçage de l'échantillon avec CCl_4 , les extraits sont récupérés puis placés sur florisol et Na_2SO_4 . Les volumes recueillis sont mesurés à l'aide d'éprouvettes graduées de 100 ml.

2.3.2.3 Mesure de la concentration en hydrocarbures des extraits :

- l'extrait est introduit dans une cuve en quartz de 1 cm d'épaisseur, puis ensuite analysé par l'appareil IR.
- le logiciel CxHx traitant les analyses donne directement la concentration de l'hydrocarbure recherchée en mg kg^{-1} .

2.3.3 Dosage du carbone organique total : Selon la norme NF ISO 10694: La matière organique présente dans un échantillon de sol est extraite à l'aide d'un solvant organique volatil (CCl_4).

2.3.3.1 Mode opératoire :

- Peser 400 mg de sol ; ajouter 2 mole d'HCl ; attendre 6 à 8 h ; laisser l'échantillon à chaud sur une plaque chauffante à $70\text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à condensation.
- Neutraliser l'échantillon par NaOH à normalité 1,33 jusqu'à l'obtention d'un pH neutre ; ajouter 20 ml d'eau distillée ; filtrer l'échantillon avec une pompe à vide pour avoir un résidu ;
- Doser l'échantillon avec un doseur de carbone.

Lecture : La valeur de COT est exprimée en pourcentage (%) par le doseur de carbone.

2.4 Isolement des souches bactériennes aérobies :

2.4.1 Milieu d'adaptation à base du pétrole brut :

- Le milieu utilisé pour l'isolement des souches aptes à dégrader le pétrole brut est un milieu strictement minéral dont la composition (g l^{-1}) est la suivante : 0,1 extrait de levure, 0,4 NH_4Cl , 0,3 K_2HPO_4 , 10 NaCl , 0,33 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,05 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Le milieu est additionné par 1 ml d'une solution d'éléments traces métalliques qui contient par litre : 0,25 g H_3BO_4 , 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,06 g NaMoO_4 et 0,7 g $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Le pH de la solution est ajusté à 7,1 puis la solution est autoclavée à 121 °C pendant 20 min.
- Une quantité de 3% (v/v) de pétrole brut représente l'unique source de carbone et d'énergie pour la croissance microbienne est ajoutée au milieu minéral.
- Un taux de 2% (p/v) de sol contaminé par le pétrole brut a été ajouté au milieu minéral + pétrole dont le sol contient la flore bactérienne adaptée aux conditions extrêmes à la dégradation des hydrocarbures.

2.4.2 Adaptation de la flore bactérienne dans le milieu à base du pétrole :

La culture bactérienne a été réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture (milieu minéral + 3% (v/v) de pétrole brut + 2% (p/v) de sol contaminé) dit milieu d'adaptation sous une agitation de 180 tr/mn (Cf. Photo de la figure 11). Des repiquages successifs ont été effectués chaque 48h dans un milieu neuf et la croissance bactérienne a été suivie par : observation microscopique à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (Olympus BX50) et la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un Spectrophotomètre (Shimadzu UV-160A) tandis que le suivi de la disparition de la couche huileuse du pétrole durant la période d'incubation était une observation visuelle permettant l'évaluation de la dégradation du pétrole.



Figure 11. Adaptation de la flore bactérienne contenue dans le sol contaminé à la dégradation du pétrole brut

2.4.3 Isolement et purification des souches adaptées

Des dilutions jusqu'à 10^{-9} ont été préparées à partir du milieu d'adaptation pour isoler les souches cultivées à base du pétrole. 0,1 ml de la suspension a été bien étalée sur le milieu solide. Une incubation de 24h était suffisante pour l'apparition des colonies bactériennes. La sélection est basée sur l'halo clair entouré la colonie bactérienne signifiant la consommation du pétrole autour de la colonie. La colonie prélevée est purifiée par repiquage successif selon la méthode de stries afin d'obtenir des souches pures. Le milieu solide utilisé pour la purification des souches adaptées est composé (g l^{-1}) de : 10 peptone et 5 extrait de levure. Après ajustement du pH à 7, 18 g d'Agar a été ajouté, le milieu est stérilisé à 121°C pendant 20 min. Ce milieu a été coulé dans des boîtes de pétri.

2.4.4 Conservation des souches obtenues :

Les souches obtenues sont conservés en les repiquant sur un milieu LB composé (g l^{-1}) de : 5 d'extrait de levure, 10 de peptone et 5 de NaCl et 18 g d'agar. Le repiquage de ces dernières ce fait une fois par mois pour les cultures sur boîte de pétri et une fois chaque trois mois pour les tubes inclinés. La conservation à long terme (à -80°C) est réalisée sur milieu LB liquide additionné avec de 30% du glycérol.

2.5 Préparation de la solution du naphthalène :

La solution mère du naphthalène (20 g l^{-1}) est préparée on le dissout dans l'hexane; lors de l'utilisation, la solution est ajoutée dans les flacons de façon à obtenir la concentration finale désiré qu'on les laisse pendant 3 à 4h dans une chambre stérile à fin d'évaporer le solvant [56].

2.6 Sélection de la souche performante :

Dans le but d'étudier la biodégradabilité du naphthalène, huit (08) souches bactériennes codées comme suit : K1C, K1D, K1F, K1N, K1H, K7D, K7B, K7J qui ont été isolées de l'étape précédente sont utilisées pour sélectionner la souche la plus performante. Les huit souches sont inoculées séparément dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de dégradation. La concentration du naphthalène est de $0,5 \text{ g l}^{-1}$ et les flacons sont incubés à $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 08 jours sans agitation.

Les prélèvements sont effectués chaque deux jours pour quantifier le naphthalène résiduel (selon la technique décrite ci-dessous paragraphe II-7.2). Le témoin chimique est préparé de la même façon sans ajouter la souche bactérienne (inoculum) alors que le témoin biologique se prépare en inoculant la bactérie dans le milieu de dégradation mais sans ajouter le naphthalène.

2.7 Etude des facteurs influencent la biodégradation :

2.7.1 Effet de la concentration initiale du substrat :

La concentration de l'hydrocarbure est un facteur limitant pour sa biodégradation par son effet toxique en cas de dépassement de la concentration optimale.

Dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de dégradation, le naphthalène est ajouté à des concentrations égales à 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 et 0.5 g l^{-1} et les cultures bactériennes sont incubées à $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en mode statique sans agitation. Les prélèvements sont effectués chaque deux jour afin de quantifier le naphthalène résiduel en suivant les mêmes étapes précédentes.

2.7.2 Le pH :

Dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de dégradation le pH de solutions est ajusté à 5, 6.5, 7, 7.5, 8 et 8.5 et 10. La concentration initiale du naphthalène est 0.5 g l^{-1} et le volume de culture bactérienne ajouté est de 2.5 ml. Les cultures sont incubées à température égale à 45 °C en mode statique. Les prélèvements sont effectués chaque deux jour afin de quantifier le naphthalène résiduel.

2.7.3 La salinité :

La salinité de milieu est un facteur limitant dans le processus de biodégradation des hydrocarbures, pour étudier ce paramètre et dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de dégradation, les concentrations en sel ($\text{NaCl}\%$) dans le milieu de dégradation sont 0%, 2%, 3% et 4%. La concentration du substrat est de 0.5 g l^{-1} . Les prélèvements sont effectués chaque deux jour afin de quantifier le naphthalène résiduel. Les cultures sont incubées à température égale à 45 °C en mode statique.

2.7.4 Effet de la concentration de la source d'azote :

Afin d'étudier l'effet de la concentration d'azote dans le milieu sur la biodégradation du naphthalène, différentes concentrations de NH_4Cl : 0, 0.1, 0.5 et 1 g l^{-1} sont ajoutés au milieu de dégradation où la concentration du naphthalène est de 0.5 g l^{-1} . Les prélèvements sont effectués chaque deux jour afin de quantifier le naphthalène résiduel. Les cultures sont incubées à température égale à 45 °C en mode statique.

2.7.5 Le volume d'inoculum :

Pour voir si la cinétique de la biodégradation dépend du volume d'inoculum, nous avons inoculé des différents volumes de cultures bactériennes de 5, 10 et 15% séparément dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de dégradation où la concentration du naphthalène est toujours 0.5 g l^{-1} . Les cultures sont incubées à une température de 45°C en mode statique et la quantification du naphthalène résiduel se fait chaque 02 jour.

2.7.6 Effet de co-substrat :

Dans les expériences précédentes le naphthalène était la seule source de carbone dans le milieu, l'ajout du glucose à différentes concentrations (0, 0.1, 0.5 et 2 g l^{-1}), l'ajout de 0.2 g l^{-1} d'acide salicylique, 0.2 g l^{-1} d'acide benzoïque et 0.2 g l^{-1} de

naphtol respectivement dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de dégradation a pour but d'identifier l'effet de cette deuxième source de carbone sur la dégradation du naphtalène dont la concentration est toujours 0.5 g l^{-1} . Les prélèvements sont effectués chaque deux jour afin de quantifier le naphtalène résiduel et les cultures sont incubées à température égale à $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en mode statique.

2.7.7 Effet du tensio-actif :

La biodisponibilité de l'hydrocarbure est un facteur très important lors de sa biodégradation, l'ajout des surfactants est l'un des solutions possibles pour solubiliser le naphtalène. A fin de connaitre si l'ajout de surfactant a un effet positif ou non sur le processus de la dégradation, trois surfactants ont été utilisés dans cette étude à savoir : CTAB à 0.02% (p/v), SDS à 0.02% (p/v) et Tween 80 (1 ml) qui sont ajoutés à 50 ml de milieu de dégradation qui contient 0.5 g l^{-1} du naphtalène avec comparaison avec un milieu qui contient que de naphtalène comme témoin. Les prélèvements sont effectués chaque deux jour afin de quantifier le naphtalène résiduel et les cultures sont incubées à température égale à $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en mode statique.

2.7.8 Tolérance de la souche bactérienne :

La résistance de la bactérie à des concentrations très élevées de l'hydrocarbure est un caractère très important surtout dans le cas d'une contamination accidentelle d'où les concentrations sont relativement importantes est qui devienne toxique pour la majorité des organismes vivants. L'examen de la résistance de notre souche et même sa capacité de dégrader des concentrations plus ou moins importantes est effectué en ajoutant le naphtalène à des concentrations de 0.5 , 1 , 2 , et 3 g l^{-1} en respectant les mêmes conditions de culture.

2.8 Paramètres d'évaluation analytiques

2.8 .1 Suivi de la masse microbienne :

Généralement la dégradation du substrat est accompagnée par une augmentation de la masse microbienne, cette dernière est suivie par la mesure de la turbidité du milieu (TURBIDITY model 2100 A) et par la pesé de la masse séchée après

filtration lors de la biodégradation du naphthalène. Les cultures sont incubées à 45°C pendant 10 jours et le pH du milieu est mesuré avant chaque prélèvement.

2.8.2 Détermination de la concentration résiduelle du naphthalène :

La quantification de naphthalène est effectuée par UV-VIS (Shimadzu UV-1700A) à une longueur d'onde égale à 266 nm, avec une cellule en quartz de 10 mm. La longueur d'onde est fixée après un balayage de quatre solutions de naphthalène avec différents solvants à savoir : le méthanol, l'hexane, l'acétone-hexane et le milieu minéral utilisé dans la dégradation. Ces analyses sont confirmées par CPG après extraction avec le même volume d'hexane, l'échantillon subit en suite une agitation pendant 5 min pour dissoudre le naphthalène dans l'hexane, centrifugé à 6000 tr/min pendant 10 min. La courbe d'étalonnage est préparée par des solutions de naphthalène dans l'hexane.

2.9 Test d'émulsification :

Ce test a été permis de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (gasoil ou huile) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger 2 ml du milieu de culture avec 2 ml de gasoil ou d'huile dans des tubes stériles. Les tubes sont agités pendant 3 min. Puis après homogénéisation des deux phases, on calcule l'index d'émulsion, en les comparant au témoin qui est constitué du milieu de culture aseptique et de gasoil et soumis aux mêmes conditions. Les tubes sont laissés au repos pendant 24h à température ambiante.[73]

Le calcul d' E_{24} est refait une deuxième fois pour vérifier la stabilité de l'émulsion. E_{24} est le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange, multiplié par 100 selon la formule suivante :

$$E_{24} = (he / ht) \times 100$$

Avec: he : hauteur d'émulsion. et **ht** : hauteur totale du mélange.

2.10 Mise en évidence du changement de la structure du naphthalène par IRTF :

La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est très largement utilisée pour étudier la dégradation des composés organiques. Elle permet de caractériser les fonctions chimiques de produits organiques. Une molécule soumise à des radiations dans l'infrarouge peut absorber certaines d'entre elles à

des longueurs d'onde qui correspondent aux fréquences de vibration des groupements chimiques constitutifs. Cette méthode spectrale permet de suivre les modifications qui se produisent dans le milieu durant le processus de dégradation du naphthalène en détectant l'apparition ou l'absence des groupements fonctionnels. Les échantillons sont préparés par micropastillage de 1 ou 2 mm dans du bromure de potassium (KBr) à une concentration d'environ 0,004% (1 mg échantillon / 250 mg KBr) en masse et soumis à une pression de 20 bar/cm². La pastille ainsi formée est analysée à l'aide d'un appareil de type SHIMADZU de type FTIR 9800. Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés entre 400 et 4000 cm⁻¹ et enregistrés par un logiciel Huper tous les 8cm⁻¹. Le spectre obtenu représente $Abs = f(\tau)$ avec : Abs = Absorbance, nombre d'onde = $1/\lambda$ exprimé en cm⁻¹.

2.11 Caractérisation micromorphologique et biochimique de la souche bactérienne étudiée

L'examen microscopique a été réalisé :

- A l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) de marque ESEM XC30FEG qui permet un grossissement jusqu'à 2000 fois, piloté par un ordinateur, ce qui donne une information sur l'aspect et la forme de la souche bactérienne étudiée.
- A l'aide d'un microscope optique à un agrandissement de X40 qui permet la détermination de la forme, la sporulation et la mobilité du germe.

La détermination de certains caractères biochimiques de la souche étudiée a été effectuée par les tests biochimiques de la galerie API E20.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3. 1 Caractérisation physico-chimique de biotopes étudiés

Dans le but de connaître les caractéristiques de l'échantillon du sol contaminé par le pétrole brut, plusieurs paramètres physico-chimiques ont été déterminés qui sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Caractérisation physico-chimiques du sol contaminé

| Echantillon | | Bourbier 01 | Bourbier 02 |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| Paramètres | | | |
| DCO (g/l) | Soluble | 1,194 | 1,083 |
| | Totale | 3,806 | 2,537 |
| C (mg/l) | Inorganique | 8,652 | 4,984 |
| | Total | 33,41 | 44,21 |
| TPH (g/kg du sol) | | 59,07 | 16,37 |
| Conductivité (ms) | | 17,32 | 13,95 |
| Salinité (g/l) | | 14,72 | 11,86 |
| pH | | 7,50 | 7,25 |

D'après ces résultats (tableau 8), nous constatons que l'échantillon n°1 est le plus chargé en hydrocarbures totaux (59,07 g/kg du sol) par rapport au deuxième échantillon (n°2).

3. 2 Morphologie des souches bactériennes aérobies isolées à partir des sols contaminés par le pétrole brut

L'isolement des souches bactériennes a été réalisé à 45 °C en utilisant un milieu d'adaptation (milieu minéral + 3% (v/v) de pétrole brut + 2% (p/v) de sol contaminé), le pétrole brut a été utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. La figure 12 montre une richesse en colonies obtenues après plusieurs

étapes d'adaptation notons aussi l'apparition d'un halo clair autour de la colonie signifiant la dégradation du pétrole.

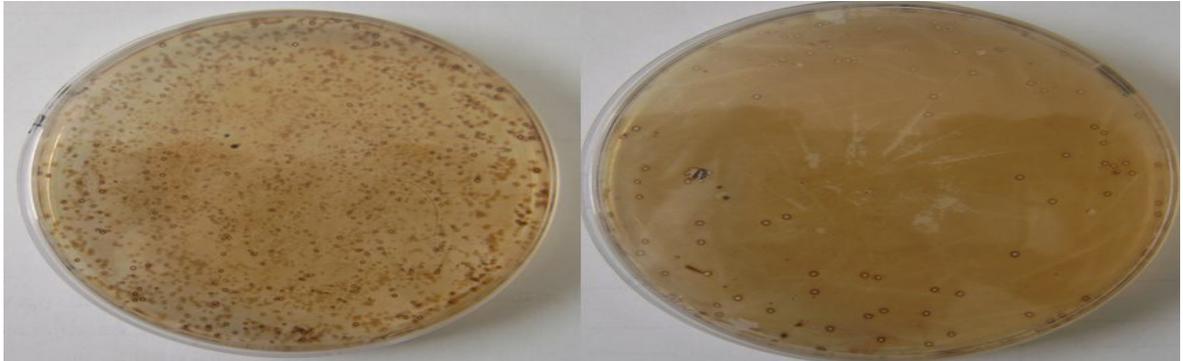


Figure 12 : Croissance des bactéries sur le pétrole brut avec l'apparition des halos claires signifiant la consommation du pétrole.

Ainsi que l'observation microscopique a donné plusieurs formes de bactéries : bacilles et coques qui se présentent sous forme simple, double ou chaînettes (figure 13).

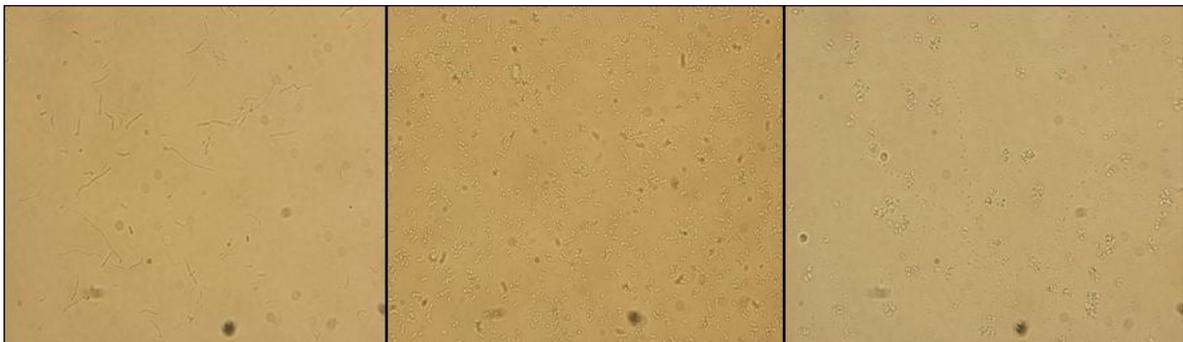


Figure 13. Différentes formes de bactéries aérobies capables de croître sur un milieu à base du pétrole brut.

3. 3 Croissance de la flore bactérienne sur le milieu à base du pétrole brut :

Les figures 14 et 15 montrent la croissance des souches mésophiles et thermophiles sur le milieu à base du pétrole brut.

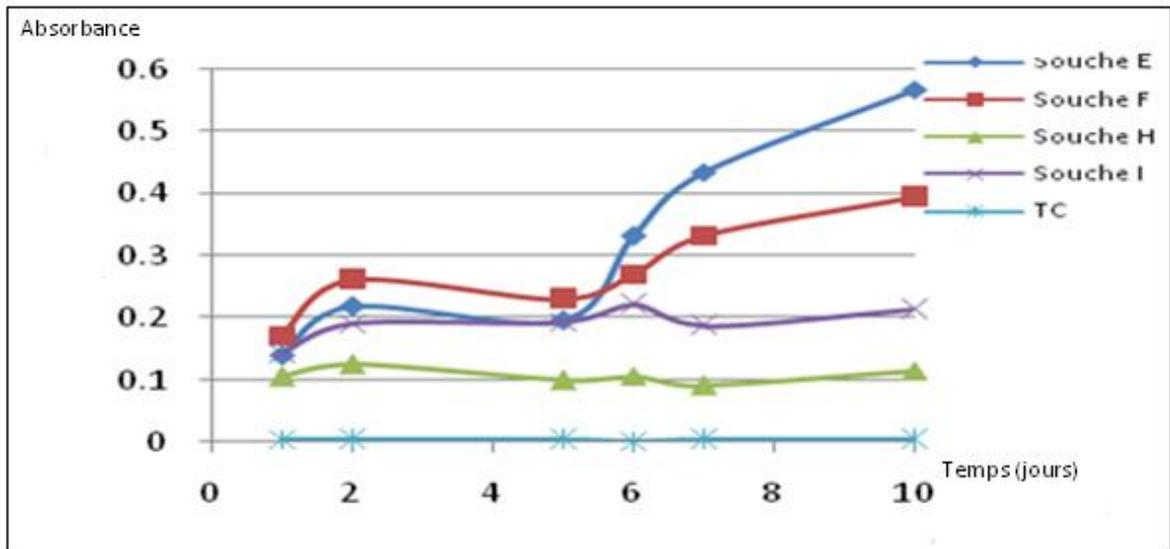


Figure 14. Les cinétiques de croissance de certaines souches mésophiles sur le pétrole brut (3% v/v).

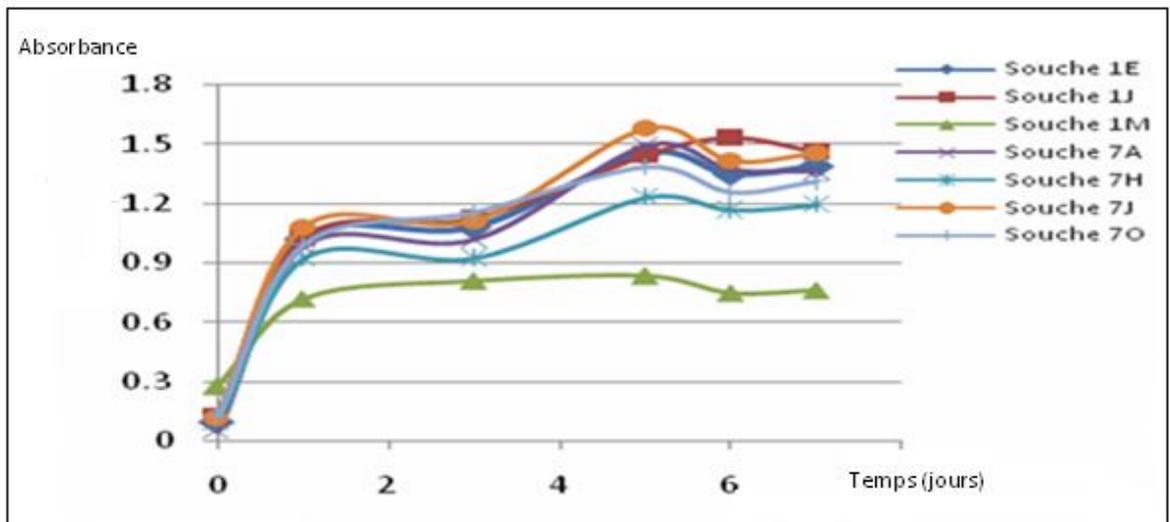


Figure 15. Les cinétiques de croissance de certaines souches thermophiles sur le pétrole brut (3 % v/v).

3. 4 Sélection de la souche performante :

Au total, huit souches thermophiles (K1C, K1D, K1F, K1N, K1H, K7D, K7B et K7J) ont été choisies pour la sélection de la souche performante dont le naphtalène ($0,5 \text{ g l}^{-1}$) représente la seule source de carbone et d'énergie dans le milieu de culture. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 16.

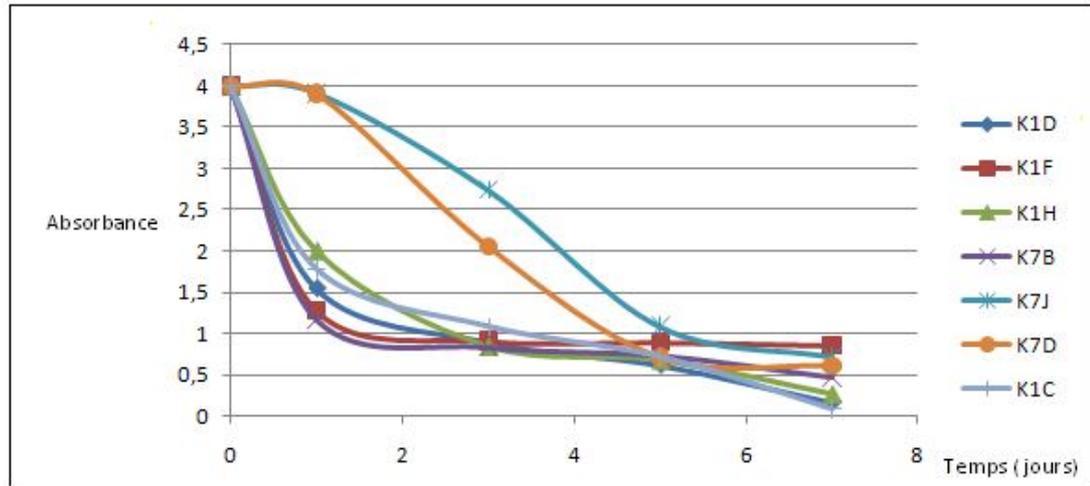


Figure 16. Variation de la concentration de naphthalène en fonction du temps en présence des souches sélectionnées.

Les résultats obtenus révèlent que la concentration résiduelle du naphthalène dans le milieu diminue de façon significative en fonction du temps pour les huit souches. La réduction du naphthalène est observée dès le premier jour pour les souches K1C, K1D, K1F, K1H et K7B alors que cette dernière est retardée pour les souches K1N, K7D et K7J. Au bout de 5^{ème} jour, le taux d'élimination du naphthalène est presque la même, une réduction de 99,97% est atteinte à la fin du cycle pour la souche K1C. Ce rendement très intéressant nous a conduit à sélectionner la souche K1C comme souche performante et d'utiliser cette souche pour la poursuite de travail qui porte sur l'étude de l'effet des facteurs principaux affectant la biodégradation du naphthalène ainsi que la caractérisation de cette souche.

3.5 Caractérisation préliminaire de la souche :

Les observations microscopiques sont visualisées sur la figure 17 (a et b).

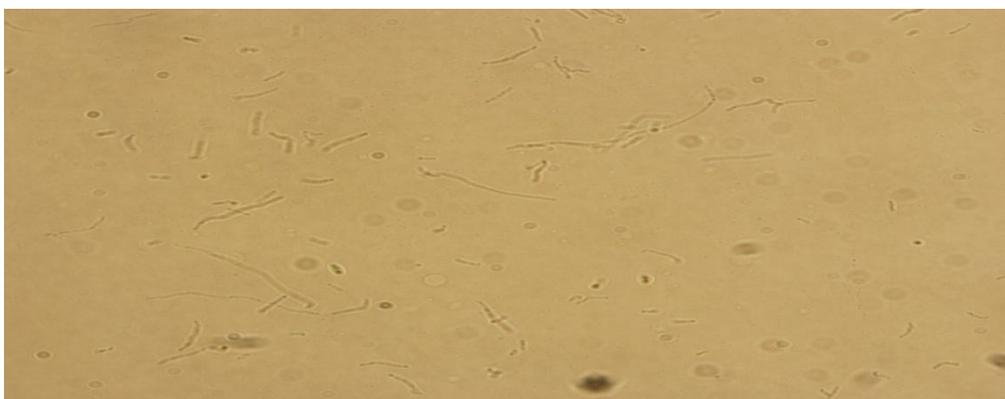


Figure 17a. Observation par microscopie optique de la souche K1C (x40)

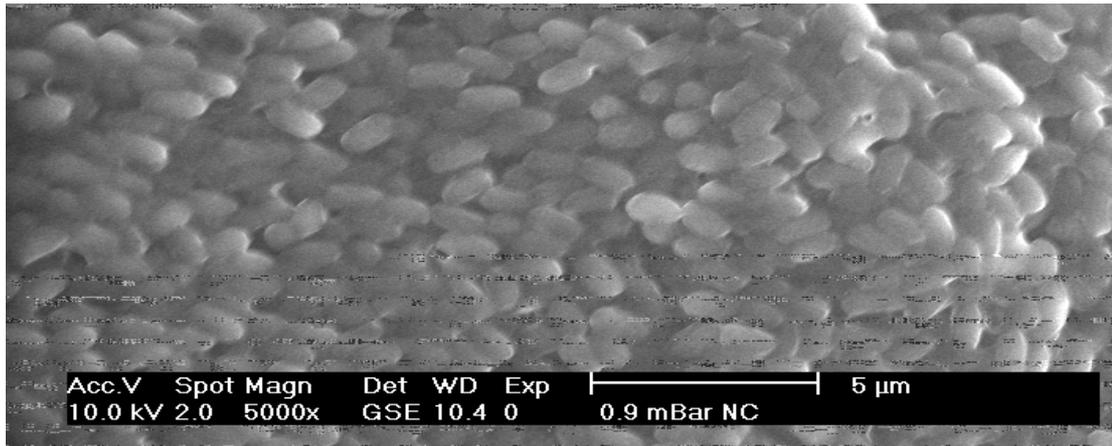


Figure 17b. Observation microscopique (MEB) de la souche K1C

La souche K1C a une forme de bacille, Gram+, aérobic stricte elle à une tendance à former une pellicule à la surface de milieu. En présence des conditions défavorables du milieu de culture elle produise des endospores.

Tab 9: Les résultats de la lecture de la galerie API 20 E

| | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H ₂ S | URE | TDA | IND | VP | GEL |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|----|-----|
| K1C | + | + | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA | OX | |
| | + | - | - | - | - | - | - | +/- | - | - | |

Le traitement de l'ensemble des caractères a permis de rattacher cette souche au genre *Bacillus* tandis que l'identification au stade de l'espèce nécessitera une caractérisation plus approfondie demandera un séquençage du gène de l'ADN correspondant à l'ARN 16S.

3.6 Suivi de la masse microbienne et de pH :

Les résultats obtenus indiquent qu'il y a une activité microbienne en utilisant le naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie, cela traduit par l'augmentation de la masse microbienne pendant le cycle de dégradation. Cette augmentation de la masse microbienne est accompagnée par un accroissement de la turbidité de milieu. Les deux figures (18 et 19) montrent les variations de la turbidité de milieu et de la masse microbienne sèche durant le processus de dégradation du naphthalène.

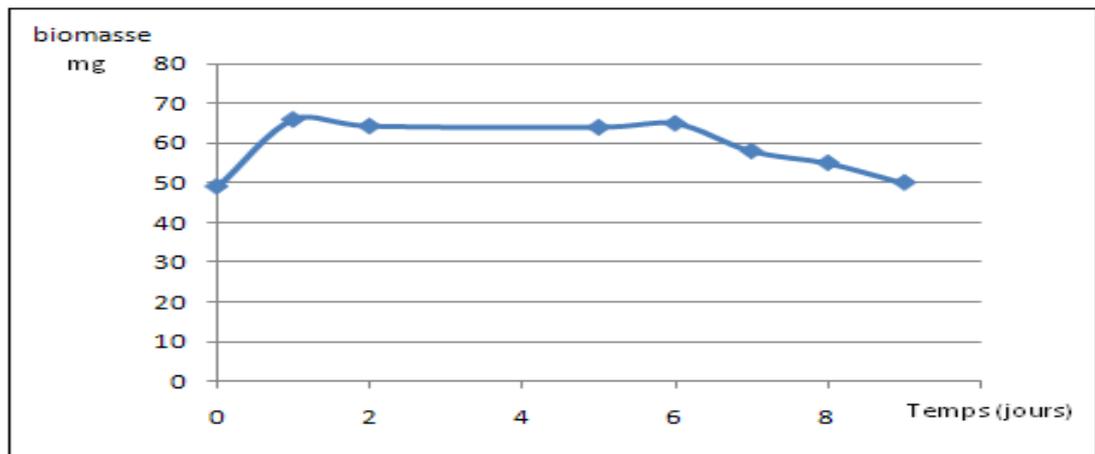


Figure 18. Variation de la masse microbienne en fonction du temps en présence du naphthalène comme la seule source de carbone et d'énergie

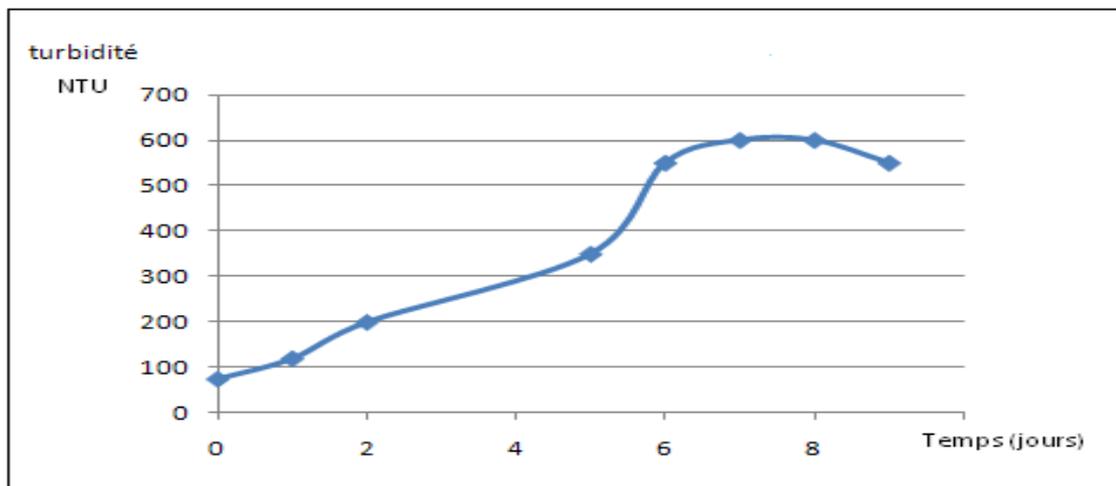


Figure 19. Variation de la turbidité du milieu en fonction du temps en présence du naphthalène comme la seule source de carbone et d'énergie.

Au cours de la dégradation, le pH augmente jusqu'à une valeur égale à 8,4 puis il se stabilise autour de cette valeur. A la fin du cycle, on observe une légère diminution du pH comme le montre la figure 20.

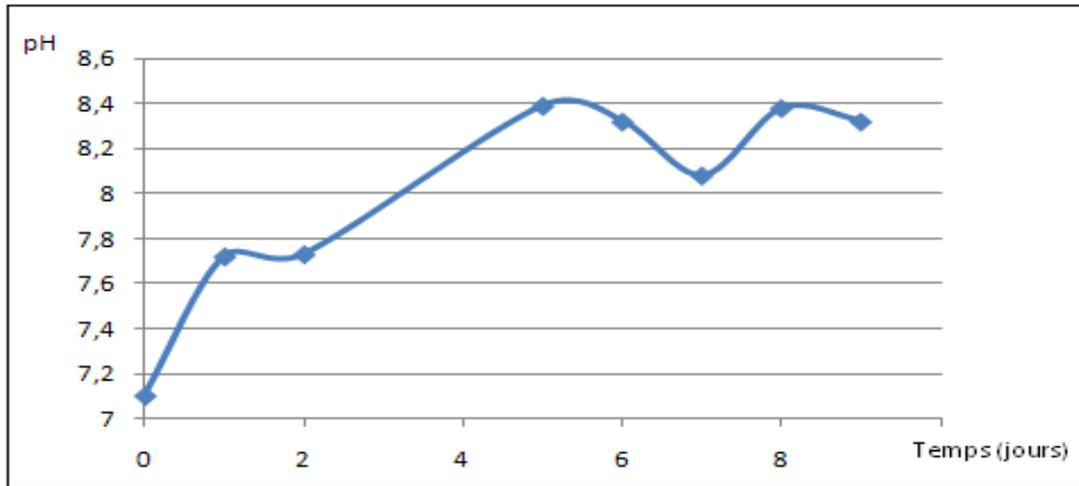


Figure 20. Variation de pH du milieu de culture en fonction du temps pendant la dégradation.

Les variations du pH étaient dans le domaine de l'alcalinité qui est justifié par le fait que cette souche semble être une bactérie alcalinisante. Ce type de microorganismes dégradent la source de carbone par voie oxydative libérant dans le milieu surtout le CO_2 qui traduit une acidité du milieu mais ce n'est pas le cas. L'alcalinisation du milieu est due à la désamination de la source d'azote qui favorise la libération des groupements NH_4^+ donnant ainsi un pH basique.

3.7 Facteurs affectant la biodégradation

3.7.1 Effet de la concentration initiale du substrat

Afin d'étudier le comportement de la souche K1C en face de la quantité du polluant, des concentrations différentes du substrat, inférieures à $0,5 \text{ g l}^{-1}$, ont été testées. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 21.

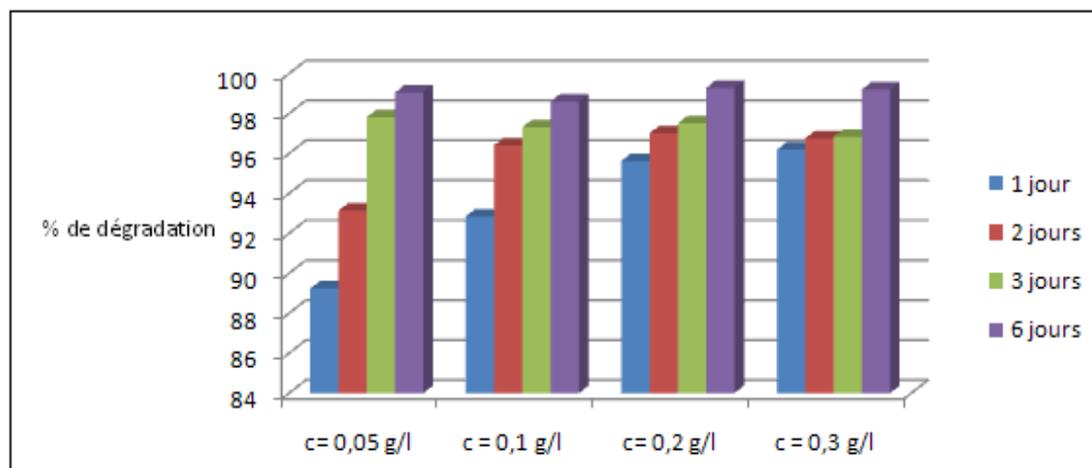


Figure 21. Les pourcentages de dégradation sous l'effet de différentes concentrations initiales du naphthalène.

Il est à noter qu'une concentration de $0,05 \text{ g l}^{-1}$ est inférieure à celle de la solubilité du naphthalène à $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Cette faible concentration rend le contact entre la souche et le substrat difficile (en mode statique). Durant les deux premiers jours de dégradation, l'efficacité de dégradation est proportionnelle à la quantité du substrat ; plus la quantité élevée plus le taux d'élimination est augmenté. Après le deuxième jour de dégradation, les concentrations de naphthalène évoluent de la même manière quelque soit la concentration initiale du substrat. Le taux de dégradation est moins important après le 1^{er} jour lorsque la concentration initiale égale à $0,05 \text{ g l}^{-1}$, à partir du 3^{eme} jour les taux de dégradation sont proches pour les quatre concentrations et donc on peut dire que la souche K1C comporte de la même façon pour les concentrations $0,1$, $0,2$ et $0,3 \text{ g l}^{-1}$. Des études rapportent que les concentrations élevées des HAP ont un effet positif sur la croissance des bactéries car ces derniers sont la seule source de carbone, par contre les faibles concentrations est un facteur limitant pour la croissance bactérienne. Nozila (2009) rapporte que une concentration de $0,1 \text{ g l}^{-1}$ a été dégradée totalement après 6 jours d'incubation (même pour $0,5 \text{ g l}^{-1}$) alors seulement 30% du naphthalène a été dégradée lorsque $C_0 = 1$ et 5 ppm. Après 15 jours, 82% seulement de naphthalène à été éliminée pour ces concentrations (température 30°C).[74]. Chen Lin (2010) rapporte que la concentration restante du naphthalène est seulement $0,92 \text{ mg l}^{-1}$ en 3 jours lorsque la concentration initiale du naphthalène est de 100 mg l^{-1} , lorsque la concentration augmente de 100 à 450 mg l^{-1} ; le pourcentage d'élimination diminue de 99% à 63% après 3 jours ; la présence d'une concentration moyenne du naphthalène dans le milieu provoque une force motrice importante pour réduire la concentration du substrat, de le solubilisé pour l'utiliser comme source de carbone nécessaire pour la croissance bactérienne.[75]

3.7.2 Effet de pH du milieu :

Généralement les bactéries hétérotrophes sont neutrophiles, les valeurs choisies sont 5, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 et 11. Le comportement de la souche K1C vis-à-vis la variation de pH du milieu est illustrée dans la figure 22.

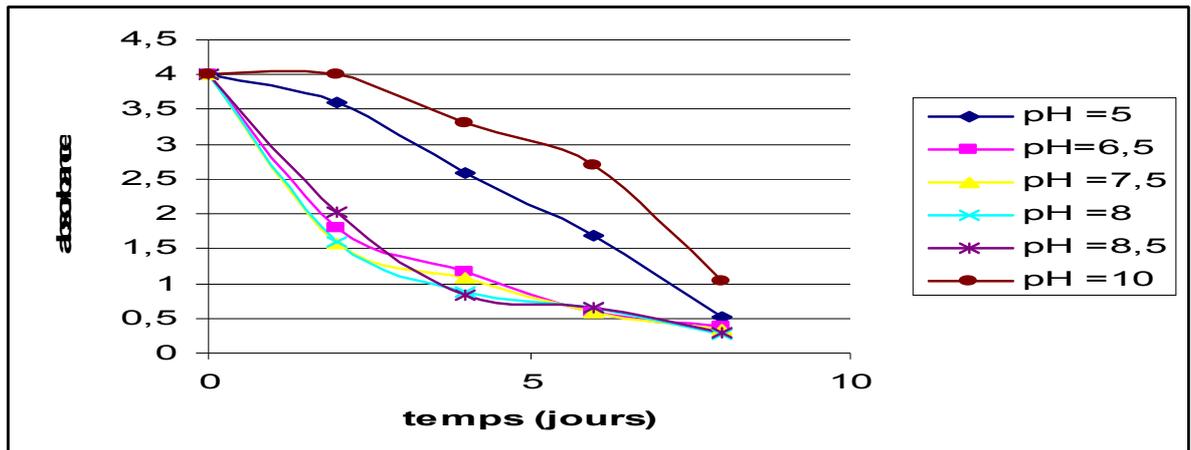


Figure 22. Effet de la variation du pH en fonction de temps sur la dégradation du naphthalène en présence de la souche K1C.

Le comportement de la souche est presque le même pour les cinq valeurs du pH ce qui montre que la biodégradation du naphthalène par la souche K1C suit la même cinétique dans la gamme de 6,5 à 8,5 incluant généralement les pH des milieux aquatiques [11]. Parmi les facteurs qui affectent la biodégradation des HAP ; le pH est un paramètre très important ; le changement du pH de milieu peut altérer les charges électriques dans les groupements chimiques des enzymes. Le processus de transport et la solubilité des nutriments. La dégradation du naphthalène est dans la gamme de pH allant de 5 à 11 ; la plus faible concentration du naphthalène est observé à pH = 7.0, plus de 90% de naphthalène est dégradé lorsque le pH de milieu est dans l'entourage de 6.5 – 8.5. La dégradation diminue lorsque le pH est inférieur à 6 ou supérieur à 8.5. Le pourcentage de réduction le plus élevé est révélé lorsque le pH de milieu est de 7 (99.53%) ce qui confirme que la croissance des bactéries hétérotrophes étant favorisée par un pH proche de la neutralité ou légèrement basique [74,75], la dégradation de naphthalène par notre souche est inhibé lorsque le milieu est basique. Ces résultats coïncident avec plusieurs travaux, qui montrent que la croissance bactérienne est très favorable dans l'intervalle de pH [6-8] ; il est remarqué que les milieux acides ou alcalins affectent l'activité bactérienne et donc la dégradation de naphthalène. Des valeurs suffisamment extrêmes (cas des sols ou quelques effluents) peuvent inhiber la biodégradation.

3.7.3 Effet de la salinité

La salinité est aussi l'un des paramètres importants influençant le processus de biodégradation des hydrocarbures, les résultats expérimentaux de la figure 23 montrent que la souche bactérienne K1C supporte une concentration en sel égale à 40 g l^{-1} . Il est à noter que 5% de NaCl (50,000 ppm), proche à la salinité de l'eau de mer, est la limite supérieure de la tolérance des microorganismes des sols et des eaux douces [7].

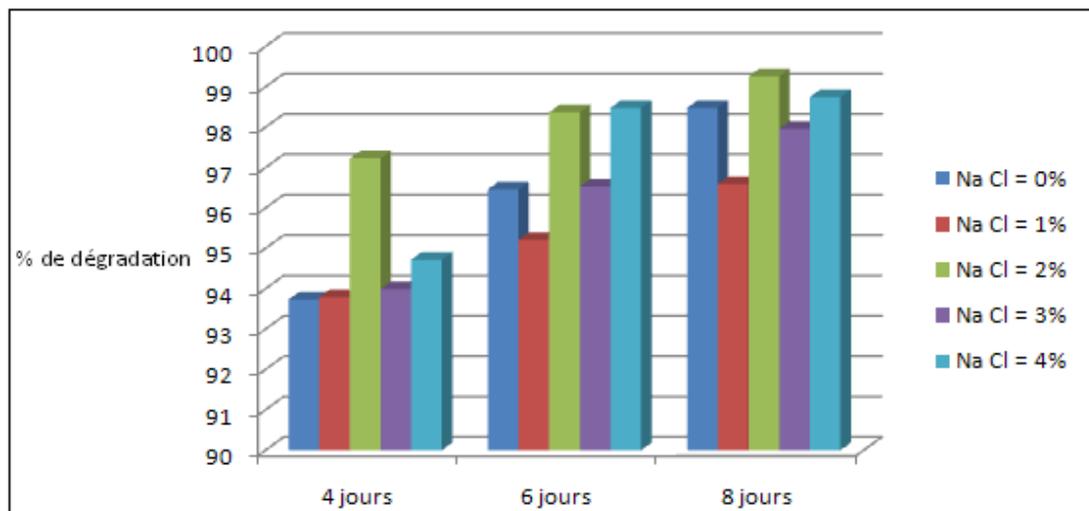


Figure 23. Les pourcentages de la dégradation du naphthalène en différentes concentrations de NaCl.

Généralement, l'augmentation de la concentration du sel au delà de 4% est accompagnée par une diminution de la réduction des hydrocarbures mais l'effet de la salinité ne suit pas une loi précise [76], dans notre cas le pourcentage de dégradation à 0% de NaCl est supérieur à celui de 1%, ce dernier est inférieur à celui de 2%. Dariush Minai-Tehrani [77] a rapporté que la salinité optimale de dégradation dépend de l'hydrocarbure à dégrader ; la biodégradation de pétrole brute est élevée en absence de sel alors que la dégradation du mélange d'hydrocarbures est optimale à 1%. La réduction du phénanthrène, anthracène et pyrène est élevée à 1% de NaCl, contrairement aux fluoranthène et chrysène où elle est optimale à 0% de NaCl.

3.7.4 Effet de la concentration de la source d'azote :

La présence des nutriments a été classée comme l'un des facteurs très importants qui affecte la biodégradation du naphthalène. La figure 24 présente les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de la concentration d'azote.

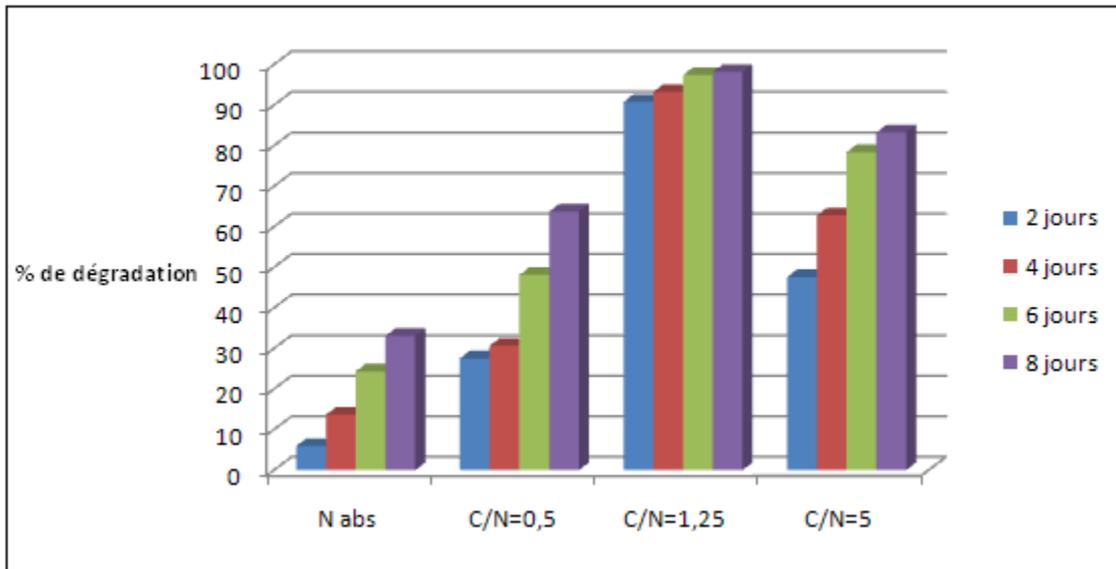


Figure 24. Les pourcentages de la dégradation du naphtalène en fonction du temps à différents rapport C/N.

Ces résultats montrent bien que la présence d'azote dans le milieu joue un rôle très important dans le processus de biodégradation du naphtalène. Les nutriments disponibles peuvent être diminués rapidement durant le métabolisme microbien ; l'azote sous la forme de NH_4Cl est très important pour la croissance des cellules et sa biodisponibilité qu'influe sur la biodégradation du naphtalène seulement 33.12% de ce dernier a été dégradé après 08 jours en absence d'azote, le rendement d'élimination le plus élevé est révélé lorsque le rapport C/N= 1.25 (98.20%) ceci indique que ce rapport est optimal pour une bonne dégradation de naphtalène. Sachant que la concentration d'azote est en fonction de la concentration de substrat (le naphtalène). Des études antérieures montrent que la diminution d'azote est accompagnée par une diminution de la biodégradation. C'est pourquoi que toutes les expériences qui ont suivi la biodégradation de naphtalène complétant l'eau de mer avec des sources d'azote et de phosphore [75,78].

3.7.5 Effet du volume d'inoculum :

Dans le but d'évaluer l'effet de la concentration d'inoculum sur la dégradation du naphtalène, différents volumes d'inoculum ont été testés. La figure 25 a permis de mettre en évidence la relation entre la concentration d'inoculum et le taux de la biodégradation.

Nous remarquons que les concentrations résiduelles du naphthalène sont identiques pour les volumes d'inoculum de 10 et 15% par rapport à celle de 5%.

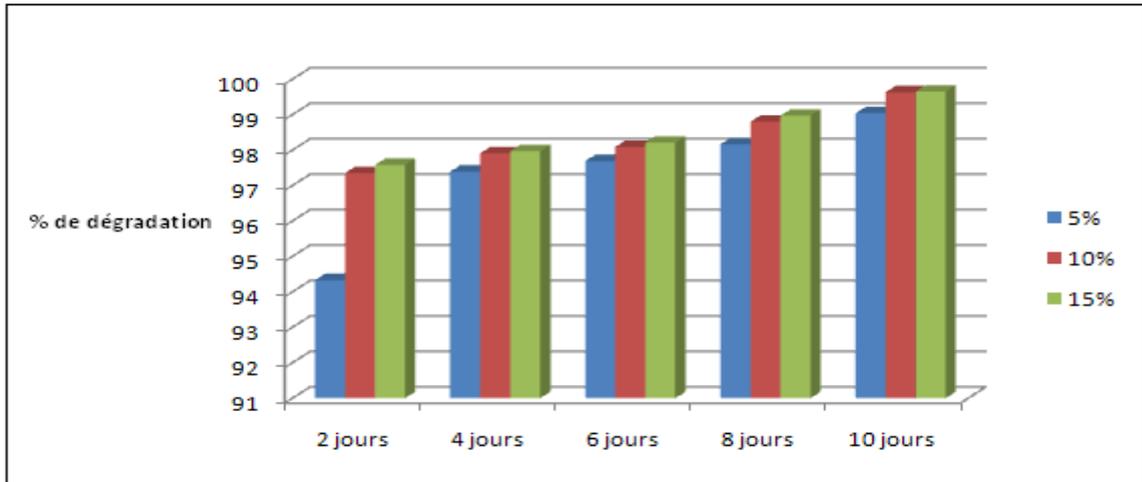
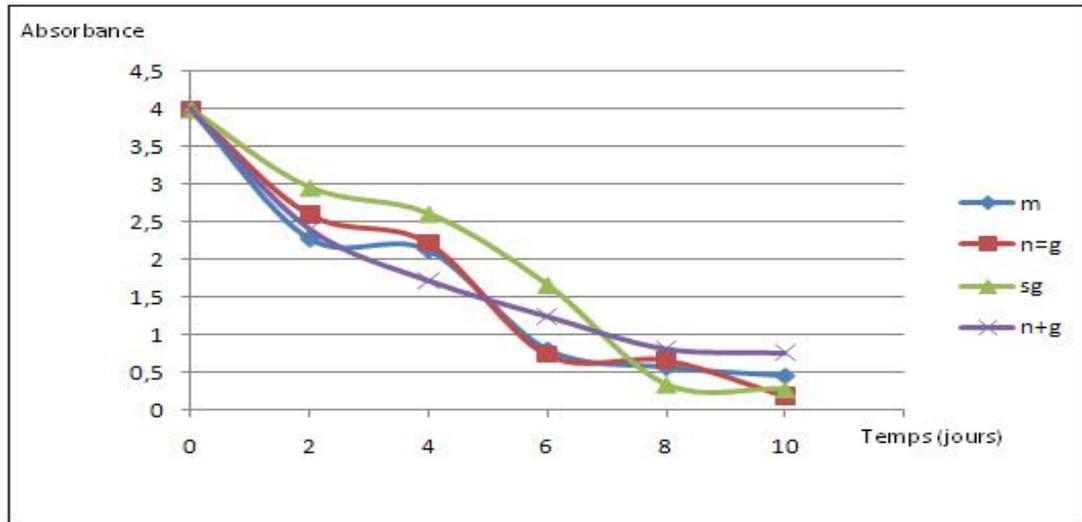


Figure 25. Les pourcentages de dégradation du naphthalène à différents volumes d'inoculum en fonction du temps d'incubation (jours).

Les taux de dégradation pour les trois inocula sont presque identiques puisque après le 2^{ème} jour la masse microbienne trouvée dans le milieu est la même car après 48h la croissance bactérienne est en phase exponentielle ou la masse microbienne est distribué uniformément dans le milieu (10^{10} UFC/ml), alors la dégradation de naphthalène par la souche K1C se fait de la même façon dans les trois flacons. Le pourcentage de dégradation augmente avec l'augmentation de la concentration d'inoculum et stabilise finalement – équilibre chimique - dans cette phase l'activité enzymatique est maximale [74]. La concentration résiduelle du naphthalène diminue rapidement lorsque la concentration d'inoculum varie de 5% à 10% plus de 97% du naphthalène est dégradé après 2 jours lorsque l'inoculum est de 10% ; le même pourcentage est maintenu lorsque l'inoculum est de 15%. Le taux de dégradation est presque le même pour les trois concentrations après le 2^{ème} jour. Ceci indique que le temps nécessaire pour la multiplication de petite population active est suffisant pour dégrader le naphthalène. Des résultats similaires montrant la relation entre la biodégradation de chlorpyrifos et la densité d'inoculum en utilisant l'espèce *Bacillus pumilus* [75].

3.7.6 Effet de l'ajout de co-substrat en présence du naphthalène :

L'incorporation d'autres sources de carbone dans le milieu peut affecter la cinétique de la dégradation du naphthalène, les effets de l'ajout de glucose et l'acide salicylique sont donnés dans les figures 26a et 26b.



Figures 26a. Effet de l'ajout de co-substrat sur la dégradation du naphthalène en fonction du temps. m : milieu ; n : naphthalène ; g : glucose ; sg : sans glucose.

Ces résultats montrent que la concentration du naphthalène diminue en fonction du temps malgré le milieu contient une deuxième source de carbone (glucose ou acide salicylique), mais avec des vitesses de dégradation différentes ce que signifie que la bactérie K1C utilise le naphthalène en parallèle avec le glucose ou l'acide salicylique, l'acide benzoïque et le naphtol.

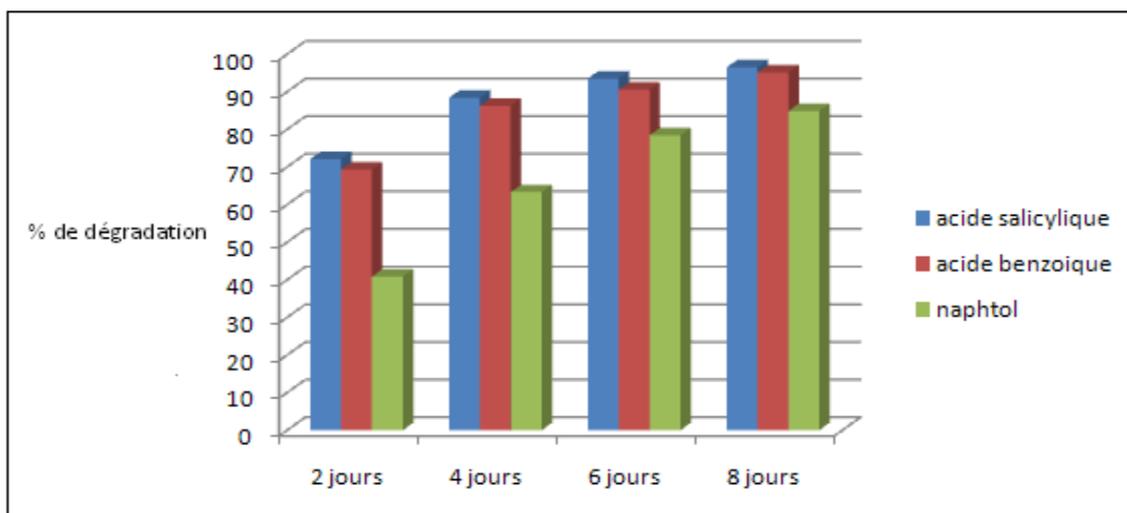


Figure 26b : Effet de co-substrat sur la dégradation du naphthalène par la souche K1C

La présence de glucose dans le milieu affecte le taux de dégradation dans les premiers jours, cette légère diminution des taux de dégradation peut être due à la consommation du glucose qui est facilement biodégradable. Le naphthalène est donc utilisé comme source de carbone secondaire se qui justifie l'augmentation remarquable des taux de dégradation au cours de l'expérience. Le taux de dégradation du naphthalène reste toujours inférieur par rapport au contrôle lorsque l'acide salicylique est présent dans le milieu car la dégradation du ce dernier est lente par rapport au glucose est donc le naphthalène se dégrade toujours en parallèle avec la deuxième source de carbone [79, 80, 81]. On conclut que la présence d'une deuxième source de carbone ralentit la biodégradation du naphthalène.

3.7.7 Effet de l'ajout d'un surfactant :

Les hydrocarbures sont généralement des composés insolubles ou peu solubles, dans notre cas la solubilité de naphthalène dans l'eau est de l'ordre de 30 mg l^{-1} à $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, les surfactants sont des agents qui augmentent la solubilité en formant des liaisons entre l'eau et le naphthalène. Afin d'étudier l'effet de surfactant sur la biodégradation du naphthalène, trois types de surfactants ont été choisis pour cette série d'expériences à savoir le Tween 80, SDS et CTAB. Les résultats obtenus (figure 27) montrent que les concentrations résiduelles du naphthalène diminuent d'une façon différente dans chaque flacon en présence d'un surfactant particulier. La faible concentration résiduelle du naphthalène est obtenue en présence de SDS. En revanche, le faible taux de dégradation du naphthalène est observé par l'ajout de Tween 80.

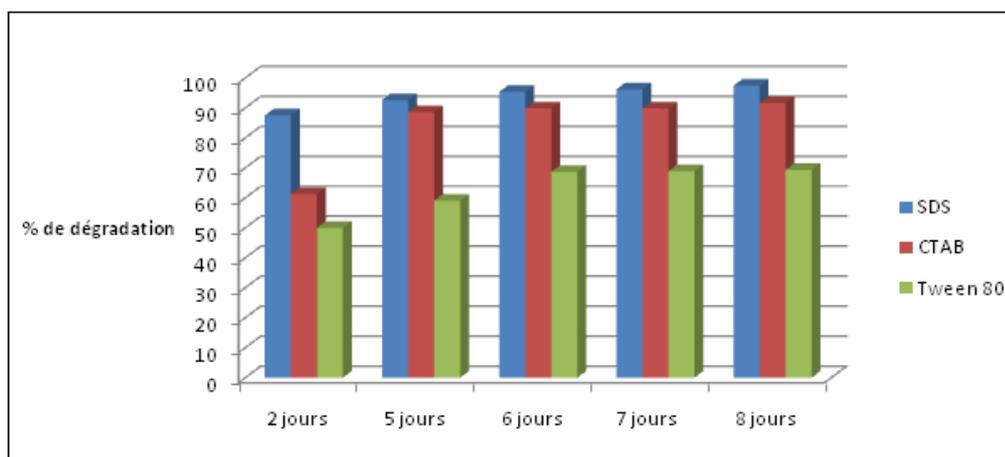


Figure 27. Les pourcentages de dégradation du naphthalène par la souche K1C en présence de différents surfactants.

On observe que l'ajout de surfactant n'augmente pas le taux de dégradation du naphthalène par la souche K1C par contre il diminue ce dernier on le compare avec le contrôle. Cependant, l'ajout de Tween 80 ralentit la dégradation du naphthalène d'une façon remarquable où le taux de dégradation est de 69,34% après 8 jours par rapport aux SDS et CTAB où les taux arrivent à 97,41% et à 91.59% respectivement. De nombreuses études qui traitent l'effet de surfactant sur la biodégradation des HAP montrent que le taux de dégradation est en fonction du type de surfactant ajouté et l'hydrocarbure utilisé comme substrat [82,83]. Gang Chen [62] a rapporté que le taux de dégradation du naphthalène n'a pas changé en présence de SDS, par contre ce dernier diminue en présence du T-maz-80 et CA-620 et la dégradation est inhibée par la présence du SDBS. Pour le phénanthrène le taux de dégradation est diminué en présence de SDS et inhibé par la présence de SDBS, CA-620 et T-maz-80. La diminution des taux de dégradation peut être due à l'utilisation de tensio-actif comme une source de carbone et d'énergie par la souche K1C, cette hypothèse est rapportée par des études qui ont montré que les bactéries utilisent le tensio-actif comme source de carbone [5]. Généralement, les bactéries dégradent les hydrocarbures produisent des biotensio-actifs et l'addition d'un autre tensio-actif inhibe la production de ce biotensio-actif.

3.7.8 Tolérance de la souche K1C aux fortes concentrations

Lorsque la concentration du naphthalène est trop élevée dans le milieu, la masse microbienne sera inhibée, le but de cette expérience est de savoir si la souche K1C résiste à des concentrations supérieures à $0,5 \text{ g l}^{-1}$. Les résultats obtenus sont indiqués sur la figure 28.

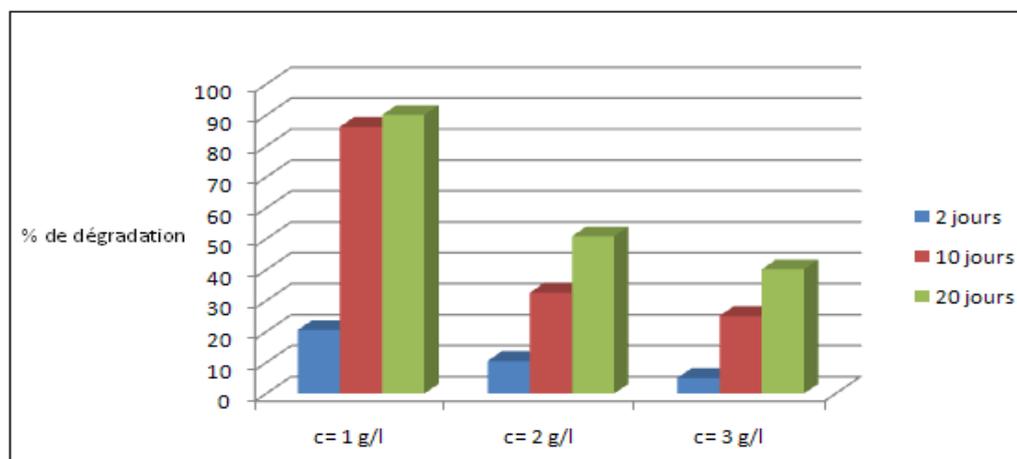


Figure 28. Tolérance de la souche K1C vis-à-vis des concentrations élevées du naphthalène.

Le taux de dégradation diminue en fonction de la concentration initiale du substrat, la souche K1C est capable de dégrader des concentrations très importantes du naphthalène qui arrivent à 3 g l^{-1} mais avec des taux moins importants que si la concentration est de 0.5 g l^{-1} . Des concentrations très élevées peuvent être toxiques pour les bactéries et inhibent le processus de dégradation, des études ont montré que certaines espèces comme *Nocardia*, *Pseudomonas* et *Bacillus* sont capables de dégrader des concentrations importantes du naphthalène peuvent arriver jusqu'à 6 g l^{-1} [5, 78, 84]. Puisque la souche K1C dégrade une concentration de 3 g l^{-1} de naphthalène, donc le milieu n'est pas toxique et possible que la souche peut supporter des concentrations plus élevées [85].

3.8 Test d'émulsification et détermination de E_{24} :

La biodégradation des HAP dans les milieux aqueux peut être favorisée par l'addition du tensio-actif chimique qui réduit la tension superficielle et augmente la fraction soluble des HAP; ces tensio-actifs peuvent être plus ou moins toxiques pour la faune et la flore aquatique ; mais des études ont montré que quelques bactéries sont capables de produire un biotensio-actif qui est facilement biodégradable et ne présente aucun risque pour l'environnement (exemple: *Bacillus firmus*, *Bacillus Subtilis*). Les résultats trouvés dans notre cas montrent que la souche K1C produise un biotensio-actif avec $E_{24} = 45\%$, la culture de K1C forme une phase émulsifiante avec le pétrole, l'huile et le gasoil (CF. Photos de la figure 32).

Cooper et Goldenberg [86] rapportent que deux espèces de genre *Bacillus* spp ont une capacité émulsifiante de 60%, alors que Kosaric [87] rapporte que la capacité émulsifiante de *Nocardia* sp est de 46%. La forte capacité d'émulsification est révélée chez *B. pumilus* (100%) après trois jours de stockage, elle forme une émulsion très stable du pétrole dans l'eau [88, 89]. Des souches de *Pseudomonas* isolées du même site (Hassi Massoud) montrent une capacité émulsifiante de 33,33 % et 37,5 % (travaux en cours).

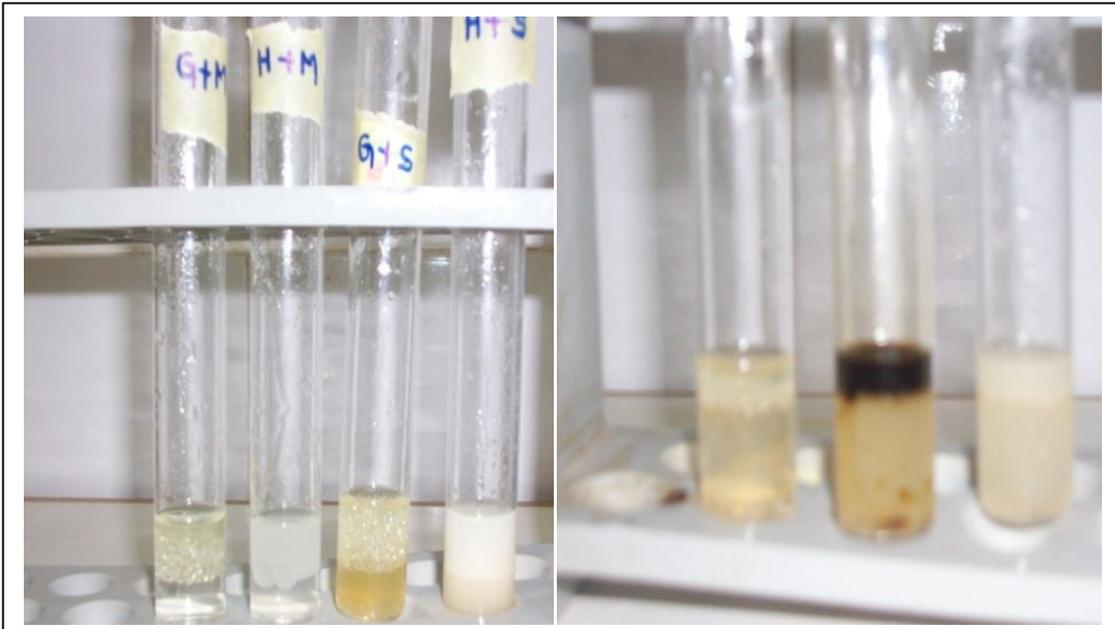


Figure 29. Résultats de test d'émulsification produit par la souche K1C

3.9 Mise en évidence du changement de la structure du naphthalène et proposition de la voie la biodégradation :

Plusieurs études sur la biodégradation du naphthalène, proposent le mécanisme de dégradation de ce dernier en identifiant les métabolites intermédiaires [42, 90, 91]. L'analyse par IR a permis d'obtenir des spectres qui montrent des changements fonctionnels durant le processus de biodégradation du naphthalène par la souche K1C. L'ensemble de résultats de l'analyse par IF sont représentés sur les figures 30a -30b -30c.

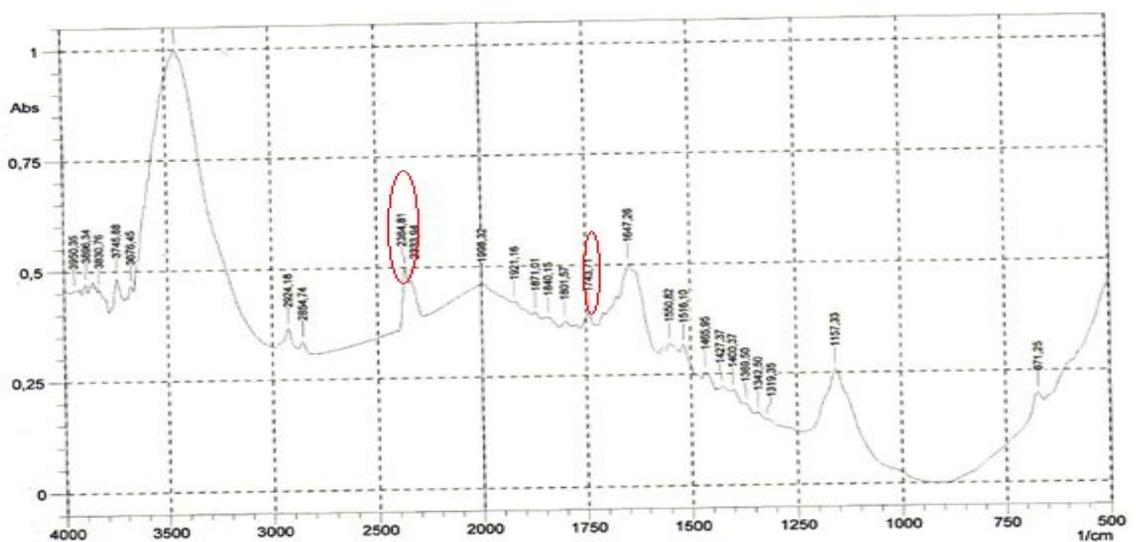


Figure 30a. Spectre infrarouge de la biodégradation du naphthalène par K1C après 1 jour d'incubation.

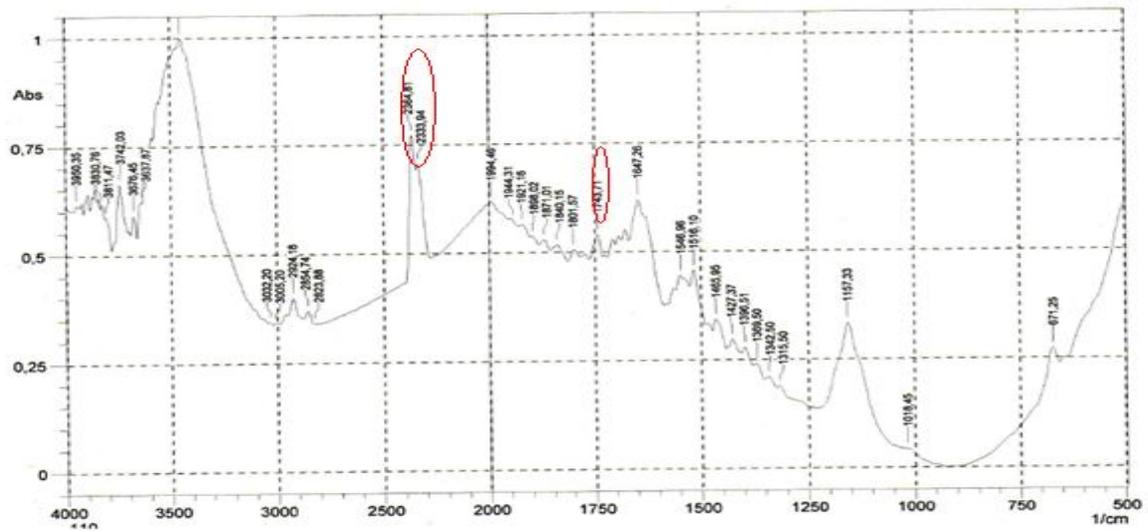


Figure 30b. Spectre infrarouge de la biodégradation du naphtalène par K1C après 10 jours d'incubation.

Après une journée d'incubation, le spectre IR nous a permis de distinguer un groupement fonctionnel particulier à 1743.71 cm^{-1} relatif à la présence d'un groupement carbonyle (C=O) et un autre double pic indiquant l'apparition d'une chélation à 2364.81 et 2333.94 cm^{-1} . L'intensité de ces deux pics augmente (devient très importante après 10 jours). Mais après 30 jours, ces pics relatives au chélation disparaissent indiquant une décarboxylation ($-\text{CO}_2$) et la formation d'après le spectre et la littérature de la molécule catéchol.

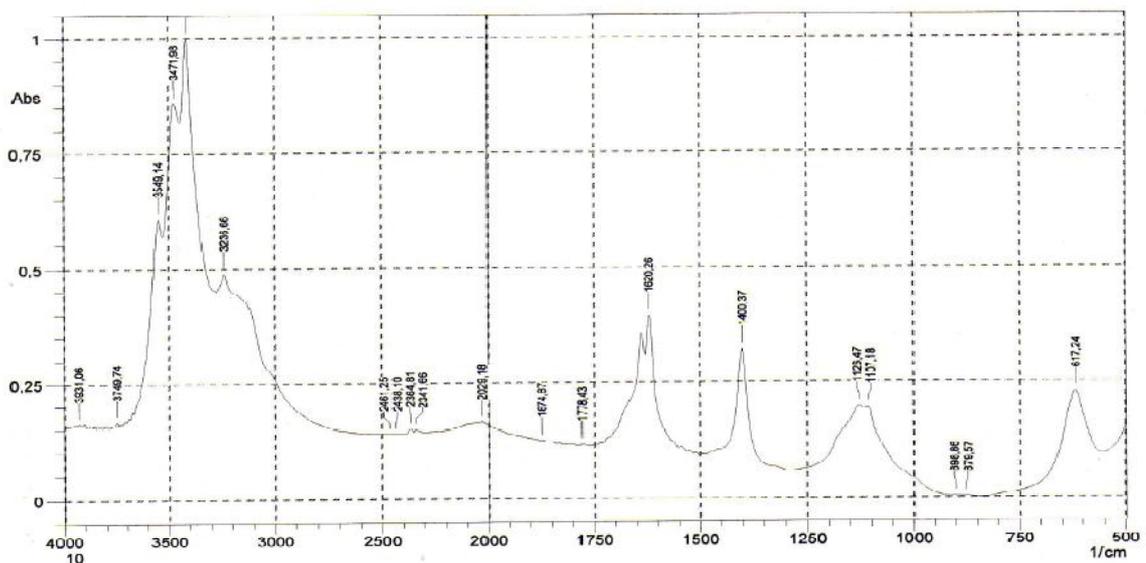


Figure 30c. Spectre infrarouge de la biodégradation du naphtalène par K1C après 30 jours d'incubation.

Alors et selon nos résultats, on peut proposer le mécanisme suivant comme le mécanisme de biodégradation du naphthalène par la souche K1C (figure 31).

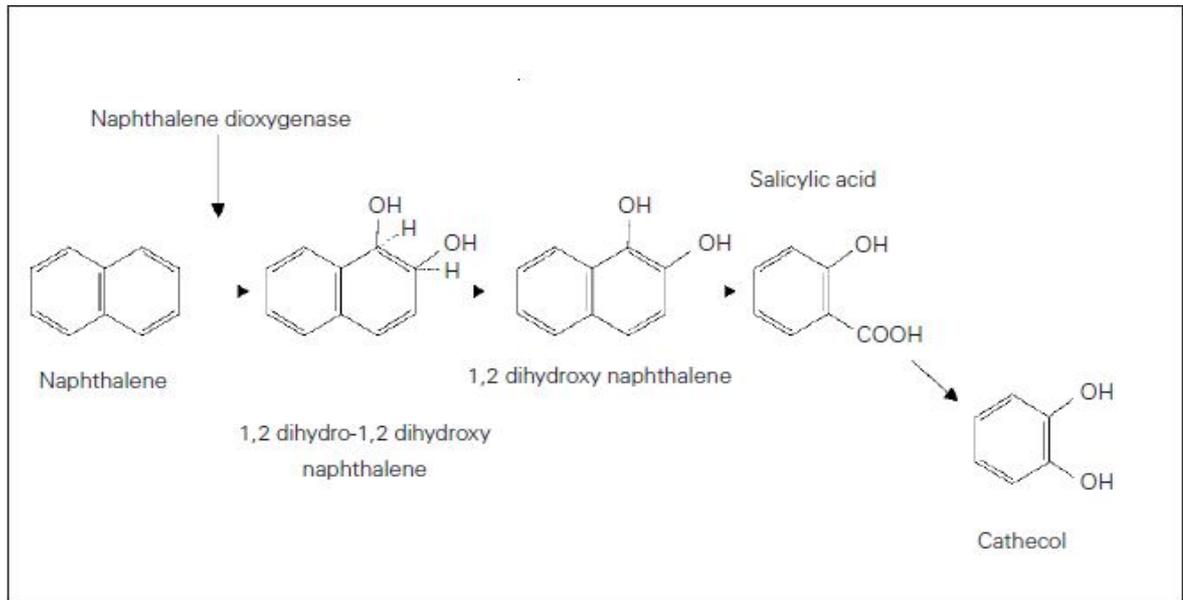


Figure 31. Mécanisme proposé pour la biodégradation du naphthalène par la souche K1C

CONCLUSION

Dans le cadre de ce présent travail, nous avons essayé d'apporter notre contribution à l'étude de la biodégradabilité du naphthalène comme modèle des hydrocarbures aromatiques polycycliques par des souches thermophiles isolées localement. La dégradation de ce composé par des souches mésophiles est largement étudié mais celle par des souches thermophiles reste toujours insuffisante pour établir un mécanisme de référence. Les essais montrent que le naphthalène à une concentration de 0.5g/l est complètement dégradé par cette souche thermophile au bout de 10 jours d'incubation à 45°C et à pH neutre. L'influence des paramètres physico-chimiques sur la biodégradation du naphthalène a été étudiée et les résultats trouvés montrent que le pH=7 et la salinité de 2% sont les conditions optimales pour la dégradation de ce composé par la bactérie K1C. La présence d'une autre source de carbone dans le milieu affecte le taux de dégradation de naphthalène, ce qui justifie le temps de séjour élevé pour la dégradation du naphthalène dans le milieu naturel où il se trouve souvent en présence d'autres composés, l'accumulation de sous produits comme l'acide salicylique dans notre cas rend la dégradation des haute concentrations du substrat très lente. Généralement les bactéries dégradant le naphthalène en produisent un biosurfactant. La capacité émulsifiante de la bactérie K1C est de 45%, l'ajout d'un autre tensio-actif au milieu inhibe cette production et affecte le taux de dégradation, certaines études montre que ces surfactants peuvent être utilisées comme une deuxième source de carbone [5]. Et donc il apparait nettement que la biodégradation des hydrocarbures est un processus complexe qui dépend de la nature et des quantités d'hydrocarbure en présence, des conditions environnementales et de la composition des communautés microbiennes.

Ce travail présenté ici est réalisé en une durée limitée et il est loin de venir au bout des problèmes envisagés. D'autres travaux devraient porter sur les points suivants :

- Etudier les mécanismes réactionnels de la biodégradation et déterminer les enzymes responsables de ce phénomène.

- Application à grande échelle par l'utilisation des enzymes purifiées en mode immobilisé.
- Elargir l'étude sur la biodégradabilité d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (pure ou mixte).
- Identification complète de la souche KIC par les outils de la biologie moléculaire.

REFERENCES

- 1: Anne Bado-Nilles "Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins" thèse de doctorat, université de la rochelle 2008
- 2 : Charlotte VALAT, "le développement d'outils biologiques pour le diagnostic environnemental" thèse de doctorat, université de Jean Monnet de Saint-Etienne. 2005
- 3 : Lan Huong Tran " Destruction par voie électrochimiques d'hydrocarbures aromatiques polycycliques contenus dans des matrices fortement contaminées" thèse de doctorat, université du Québec 2009
- 4 : RECORD. "Etat des connaissances sur le devenir de polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements : Identification des composés « métabolites » et des cinétiques", 2007, 148 p, n°05-0513/1A
- 5 : Hilor Pathak, Datasha Kantharia, Ankita Malpani, Datta Madamwar "Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1: *In vitro* studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms "Journal of Hazardous Materials 166 (2009) 1466–1473
- 6 : Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W., Michaelis, W.," Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus Thermoleovorans*". Appl. Environ. Microbiol. 66, (2000). 518–523
- 7 :Michel Marchand, Roger Kantin, "contaminants chimiques en milieux aquatiques "volume 22 n°3 1996
- 8 : Agence européenne pour l'environnement," Problèmes prioritaires pour l'environnement méditerranéen" rapport n°4 2006
- 9: Pascale HENNER, Michel SCHIAVON, Jean-Louis MOREL ,Eric LICHTFOUSE "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) occurrence and remediation methods "Analisis 25, 9-10 (1997) M56-M59
- 10: Kristine H, Wammer , Datherine A, Peter S "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation Rates: A Structure-Based Study"Environ. Sci. Technol. 2005, 39, 2571-2578
- 11: Soltani Mohamed " Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone" thèse de doctorat, université de Paris 6. 2004
- 12 : Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé 'Naphtalène ' Canada 2009
- 13 : Chrystèle tissier, Claire morvan, Gilles bocquené, Hubert grossel, Alice james et Michel marchand "Les substances prioritaires de la directive cadre sur l'eau " (DCE), 2005
- 14 : EPA,"Health Effects Support Document for Naphthalene,2003.
- 15 : El-Masri, H., Mumtaz, M., Todd, G.D., McClure, P., Singh, M. Draft "Toxicological Profile for Naphthalene, 1-Methylnaphthalene, and 2 Methylnaphthalene, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry" (ATSDR). (2003).
- 16 : INERIS – "Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques "2005

- 17: Sophie GABET "Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique " thèse de doctorat, université de Limoges 2004
- 18 : Chevreuil, M., Blanchard, M., Teil, M.J. et Chesterikoff, A. "Polychlorobiphenyl behaviour in the water/sediment system of the Seine river," France. *Water Res.* (1998). 32(4): 1204-1212
- 19 : Veith G.D., De Foe D.L. et Bergstedt B.V. (1979) " Measuring and estimating the bioconcentration factors of chemicals in fish." *J Fish Res Board Can*, 36, 1040-1048.
- 20 : Riley R.T., Mix M.C., Schaffer R.L. et Bunting D.L. (1981) " Uptake and accumulation of naphthalene by the oyster *Ostrea edulis*, in a flow-through system". *Marine Biol*, 61, 267-276
- 21 : Arodí Bernal-martinez "Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage ozonation – digestion anaérobie" Thèse de doctorat, Université Montpellier II, Montpellier, France 2005
- 22 : INRS. Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en france. <http://www.inrs.fr>. (19 avril 2005).
- 23 : Robert Lawerys ' Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles' 5^{ème} édition 2007 Elsevier Masson
- 24 :Sylvain Kuony " caractérisation d'arène dioxygénases impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez *Mycobacterium sp.* 6py1 " thèse de doctorat, université de Joseph Fourier- Grenoble I 2002
- 25 :Costes, J.-M. et V. Druelle (1997). "Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement: la réhabilitation des anciens site industriels." *Revue de l'Institut Français du Pétrole* 52(4): 425-440
- 26 : Chu, W. et C. Y. Kwan (2003). "Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system." *Chemosphere* 53(1): 9-15.
- 27 : Trapido, M; Veressinina, Y. et Munter, R. (1995). "Ozonation and Advanced Oxidation Processes of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous Solution-A Kinetic Study". *Environ. Technol.* 16:729-740
- 28 : Goel, R; Tokutomi, T; Yasui, H. et Noike, T "Optimal process configuration for anaerobic digestion with ozonation." . (2003b).*Water Sci. Technol.* 48(4):85-96
- 29 : Nam, K; Rodriguez, W. et Kukor, J.J. "Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction". (2001). *Chemosphere.* 45:11-20.
- 30 : Miller S.J. et Olejnik, D. "Ozonation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Solution". (2004). *Ozone Sci. Eng.* 26:453-464
- 31 : Doré, M; Merlet,N; Legube, B. et Croue, J. "Interactions between ozone, halogens and Organic Compounds". (1988). *Ozone Sci. Eng.* 10:133-172
- 32 : Haeseler, F; Stieber, M; Werner, P. et Frimmel, H.F." Ecotoxicological Aspects of Chemical Pre-Oxidation Combined with Subsequent Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." (1993). *Contam. Soil.* 1337-1344.
- 33 : Laughrey, Z; Bear, E; Jones, R. et Tarr A.M. "Aqueous sonolytic decomposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of additional dissolved species. *Ultrason*". (2001). *Sonochem.* 8:353-357.
- 34 : Psillakis, E; Ntekos, A; Mantzavinos, D; Nikolopoulos, E. et Kalogerakis, N. "Solid phase microextraction to monitor the sonochemical degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in water". (2003). *J. Environ. Monit.* 5:135-140

- 35 : Stichnothe, H., Keller, A., Thiming, J., Lohmann, N., et Calmano, W. "Reduction of tributyltin (TBT) and other organic pollutants of concern in contaminated sediments by means of an electrochemical oxidation".(2002). *Acta Hydrochimica Hydrobiologica*, 30(2-3), 87-93
- 36 : Ballerini, D., C. Gatellier et T. Vogel "Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués." (1998). Rapport pour l'ADEME: p 248
- 37: Newman, L. A. et C. M. Reynolds "Phytodegradation of organic compounds." (2004). *Curr Opin Biotechnol* 15(3): 225-230.
- 38 : Jukka Kurola "Microbial activities in boreal soils: Biodegradation of organic contaminants at low temperature and ammonia oxidation" Academic Dissertation in Environmental Ecology 2006
- 39: Bernal-Martinez, A. 2005. "Élimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage ozonation – digestion anaérobie." Thèse de doctorat, Université Montpellier II, Montpellier, France, 231 pages.
- 40 : KAY L. shuttleworth et CARL E. cerniglia ; " Environmental Aspects of PAH Biodegradation" *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol. 54, 1995
- 41: Claudia Alquati et al "Diversity of naphthalene-degrading bacteria from a petroleum contaminated soil" *annals of microbiology*, 55(4) 237-242 (2005)
- 42: Majid Zeinali, Manouchehr Vossoughi, Sussan K. Ardestani, "Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism" *Chemosphere* 72 (2008) 905–909
- 43 : Julia Foght "Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects" *journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008
- 44 : Karthikeyan et. Bhandari "Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms : a review " Volume 3, *Journal of Hazardous Substance Research* 2001
- 45: Milhelcic, J.R et R.G. Luthy." Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems." *Applied and Environmental Microbiology* 54(5), 1188-1198. 1988.
- 46 : Holliger, C. et A.J.B. Zehnder. 1996. "Anaerobic biodegradation of hydrocarbons". *Current Opinion in Biotechnology* 7(3), 326-330.
- 47: Mikael Eriksson, Erik Sodersten, Zhongtang Yu, Gunnel Dalhammar, et William W. Mohn, "Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils" *Applied and environmental microbiology* Jan. 2003, p. 275–284 Vol. 69, No. 1
- 48 : Zhang, X. et L.Y. Young. "Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia". *Applied and Environmental Microbiology* 63(12), 4759-4764. 1997.
- 49 : Chang, B.V; Chang, J.S. and Yuan, S.Y. "Anaerobic degradation of phenanthrene in river sediment under nitrate-reducing conditions". (2001). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67:898-905.
- 50 : Meckenstock, R.U; Annweiler, E; Michaelis, W; Richnow, H.H. et Schink, B. "Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture". (2000). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2743-2747.
- 51 : Annweiler, E; Michaelis, W. et Meckenstock, R.U. "Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2 methyl naphthalene, and tetraline indicate a new metabolic pathway". (2002). *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 852-858.

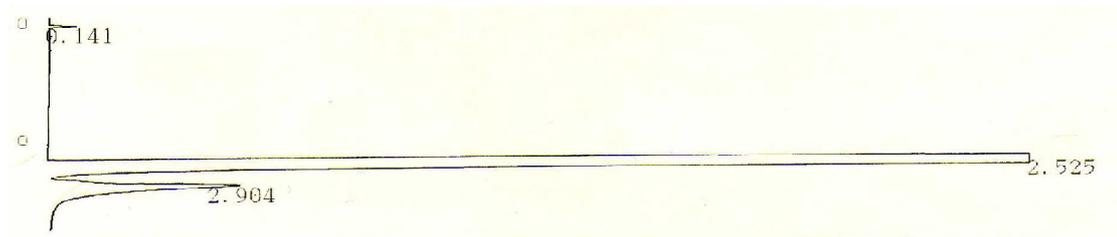
- 52 : Trably, E., D. Patureau et J.P. Delgenes. "Enhancement of polycyclic aromatic hydrocarbons removal during anaerobic treatment of urban sludge". 2003. *Water Science and Technology* 48(4), 53-60.
- 53 : Chang, B.V; Shiung, C.L et Yuan, S.Y "Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil." . *Chemosphere*. 48:717-724. (2002).
- 54 : Chang, B.V; Chang, S.W. et Yuan, S.Y. "Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge." (2003). *Adv. Environ Res.* 7:623-628.
- 55 : Chiara Mollea, Francesca Bosco, Bernardo Ruggeri, "Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies" *Chemosphere* 60 (2005) 636–643. 2005
- 56: Isis S. Silva a, Matthew Grossman b, Lucia R. Durrant "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi' a *International Biodeterioration & Biodegradation* 63 (2009) 224–229
- 57 : Salicis, F; Krivobok, S; Jack M. and Benoît-Guyod, J. "Biodegradation of fluoranthene by soil fungi". (1999). *Chemosphere*. 38(13):3031-3039.
- 58 : Ravelet, C; Krivobok, S; Sage, L. et Steiman R. "Biodegradation of pyrene by sediment fungi"(2000).. *Chemosphere*. 40:557-563.
- 59 : Romero, M.C; Cazau, M.C; Giorgeri, S. and Arambarri, A.M. 'Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream"(1998).. *Environ Pollut.* 101:355-359.
- 60 : MICHAEL A. heitkamp, James p. freeman, et Carl e. cerniglia 'Naphthalene Biodegradation in Environmental Microcosms: Estimates of Degradation Rates and Characterization of Metabolites", Jan. 1987 *applied and environmental microbiology*, p. 129-136
- 61: K Jagajjanani Rao , "solubilisation and biodegradation of naphthalene in presence of sapindus mukorossi- sentetic mixed surfactants systems , thèse de master , national institute of technology Rourkela India 2009
- 62 : Gang Chen, Keith A. Strevett et Br. Angela Vanegas "Naphthalene, phenanthrene and surfactant biodegradation" *Biodegradation* 12: 433–442, 2001
- 63: Zhongbao liu, Annette m. Jacobson, et Richard g. luthy "Biodegradation of Naphthalene in Aqueous Nonionic Surfactant Systems" *Applied and environmental microbiology*, Jan. 1995, p. 145–151
- 64 : S.Y. Yuan a, S.H. Wei b, B.V. Chang b, 'Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture" *Chemosphere* 41 (2000) 1463-1468
- 65 : Randhir S. Makkar¹ et Swaranjit S. Cameotra "Structural Characterization of a Biosurfactant Produced by *Bacillus subtilis* at 45°C" *Journal of Surfactants and Detergents* 367–372 (July 1999)
- 66: Frank volkering, Anton m. breure, JOHAN G. Van andel, wim h. rulkens "Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons" *Applied and environmental microbiology*, May 1995, p. 1699–1705
- 67: A. Mutzel á U. M. Reinscheid á G. Antranikian R. MuÈller " Isolation and characterization of a thermophilic bacillus strain, that degrades phenol and cresols as sole carbon source at 70 °C " *Appl Microbiol Biotechnol* (1996) 46: 593-596
- 68: JOSEPH G. Leahy et Rita r. colwell " Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment" *Microbiological reviews*, Sept. 1990, p. 305-315 Vol. 54, No. 3
- 69 : J.A. Field " Limits of anaerobic biodegradation " *Water Science and Technology* Vol 45 No 10 pp 9–18 IWA Publishing 2002

- 70: Bertrand, J.C., Bianchi, M., Al Mallah, M., Acquaviva, M. et Mille, G., "Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration". 1993. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 168, 125-138
- 71: Ward, D.M. et Brock, T.D.,. "Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments" 1978 *Applied and Environmental Microbiology* 35, 353-359.
- 72: Leahy, J.G. et Colwell, R.R.,. "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment." 1990 *Microbiological Reviews* 54, 305-315.
- 73: Akmouci-Toumi Sihem " *Contribution à l'étude des boues de forage : Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil.*" Mémoire de magister Université M'hamed Bougera Boumerdes.2009
- 74: Norzila Othman, Noor Hana Hussain, Ahmad Tarmizi Abd Karim, Suhaimi Abdul-Talib "Isolation and Optimization of Naphthalene Degradative Bacteria" *International Conference on Sustainable Infrastructure and Built Environment in Developing Countries November, 2-3, 2009*
- 75: Chen Lin, Li Gan, Zu-Liang Chen" Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN) " *Journal of Hazardous Materials* 182 (2010) 771–777
- 76: Julia Foght . Kevin Biggar . Selma Guigard . Kathy Semple" Identification of the effects of salt on the natural attenuation of petroleum hydrocarbons" 2005
- 77: Dariush Minai-Tehrani, Saeed Minoui Ali Herfatmanesh "Effect of Salinity on Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) of Heavy Crude Oil in Soil" *Bull Environ Contam Toxicol* (2009) 82:179–184
- 78: L. Feijoo-Siota a; F. Rosa-Dos-Santos a; T. de Miguel a; T. G. Villa" Biodegradation of Naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* in Marine Environments: Testing Cells Entrapment in Calcium Alginate for Use in Water Detoxification " *Bioremediation Journal*, 12: 4, 185 — 192 2009
- 79: Kangtaek Lee, Jin-Won Park, Ik-Sung Ahn "Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7" *Journal of Hazardous Materials B105* (2003) 157–167
- 80: Saumyen Guha, Catherine A. Peters, Peter R. Jaffe" Multisubstrate Biodegradation Kinetics of Naphthalene, Phenanthrene, and Pyrene Mixtures" *Biotechnol Bioeng* 65: 491–499, 1999.
- 81: William T. Stringfellow, Michael d. aitken "Competitive Metabolism of Naphthalene, Methyl-naphthalenes, and Fluorene by Phenanthrene-Degrading *Pseudomonads* ' *Applied and environmental microbiology*, Jan. 1995, p. 357–362
- 82: Kyung-Hee Shin, Ju-Yong Kim, etKyoung-Woong Kim ' Effect of Biosurfactant Addition on the Biodegradation of Phenanthrene in Soil-water System Environ". *Eng. Res. Vol. 13, No. 1, pp. 8~13, 2008*
- 83: Frank volkering, Anton m. breure, Johan g. van andel, Wim h. rulkens "Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons" *Applied and environmental microbiology*, May 1995, p. 1699–1705 Vol. 61, No. 5
- 84: Mahmoud Abou Seoud , Rachida Maachi " Biodegradation of Naphthalene by Free and Alginate Entrapped *Pseudomonas* sp." 2003 Verlag der Zeitschrift für Naturforschung
- [85]: Reda, A. Bayoumi "Bacterial Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Heavy Oil Contaminated Soil " *Journal of Applied Sciences Research*, 5(2): 197-211, 2009

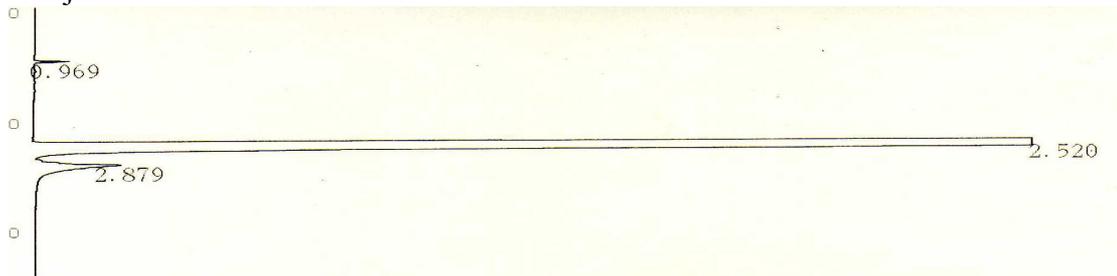
- 86: Cooper, D.G., Goldenberg, B.G.,. 'Surface-active agents from two *Bacillus* species'. 1987 Appl. Environ. Microbiol. 53, 224–229
- 87 : Kosaric, N., Choi, H.Y., Blaszczyk, R., 1990. "Biosurfactant production from *Nocardia*" SFC-D. Tenside Surf. Detergent 5, 294–296.
- 88 : C. Calvo□, F.L. Toledo, J. González-López "Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge" Journal of Biotechnology 109 (2004) 255–262
- 89: Nelly Christovaa,, Borjana Tulevaa, et Boryana Nikolova-Damyanoab Z. "Enhanced Hydrocarbon Biodegradation by a Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain " Naturforsch. (2004);
- 90: Ingrid Kelley, James P. Freeman, Carl E. Cerniglia "Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. " *Biodegradation* 1: 283-290, 1990
- 91: Graham M. Pumphrey, Eugene L. " Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2 Madsen " Microbiology (2007), 153, 3730–3738

APPENDICE 1

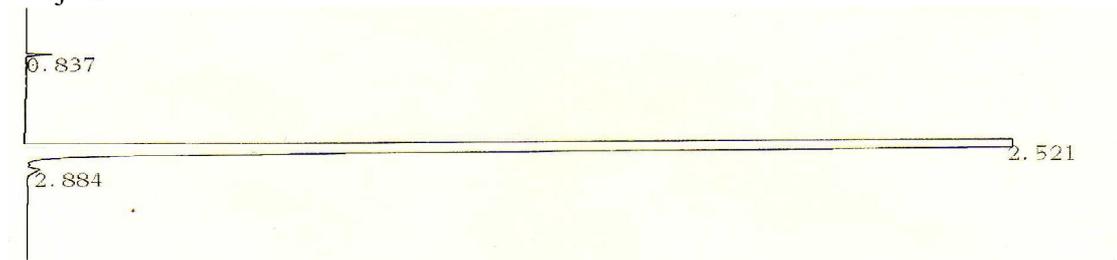
Variation de la concentration de naphthalène résiduelle dans le milieu analysé par CPG



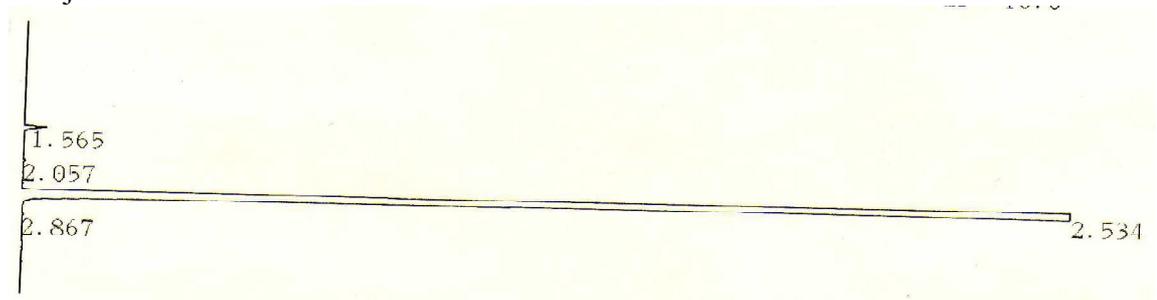
t= 0 jour



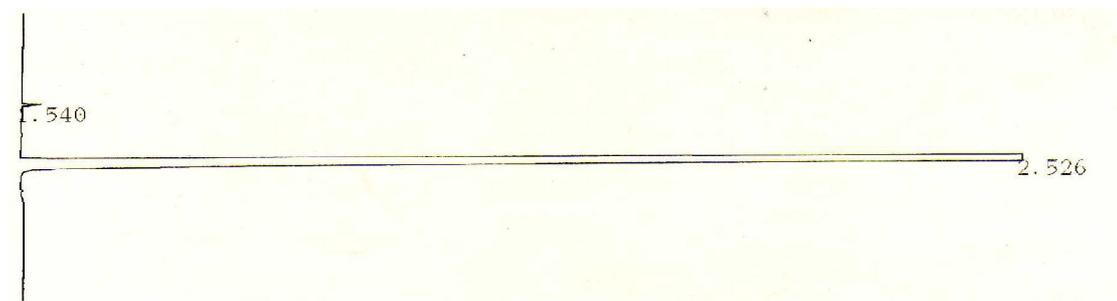
t= 1jour



t= 2 jours



t=4 jours



t=6jours

