

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE et POPULAIRE

MINISTERE de L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
et de la RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENNE
USTHB / ALGER

FACULTE DE GENIE MECANIQUE ET DE GENIE DES PROCÉDES



THESE

Présentée pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT d'ETAT

EN : CHIMIE INDUSTRIELLE

Spécialité : Génie des Procédés

Par

ABOUSEOUD MAHMOUD

SUJET

**Contribution à l'étude de la biodégradation du naphthalène par
cellules libres et immobilisées de *Pseudomonas sp.***

Soutenue publiquement le 17 Juin 2007 , devant le jury composé de :

M. LEBAILI S.	Professeur-USTHB.....	Président
Mme MAACHI R.	Professeur-USTHB.....	Rapporteur
M. BAKOUR R.	Professeur-USTHB.....	Examineur
M. AIT-AMAR H.	Professeur-USTHB.....	Examineur
M. AMRANE A.	Professeur-U.RENNES1....	Examineur
Mlle. BENSMAILI A.	Professeur-USTHB.....	Examineur

Dedicaces

A

MA MERE, LA LUMIERE DE MA VIE

MON PERE, QUI M'A APPRIS LE SENS DE LA VIE

MON FILS FOUAD ET MON EPOUSE, LE BONHEUR DE MA VIE

A MA SŒUR ET A MON FRERE

A TOUTE MA FAMILLE

REMERCIEMENTS

*Je tiens en premier lieu à remercier le **Professeur MAACHI Rachida**, directrice de thèse et Doyenne de la faculté de Génie Mécanique et de Génie des Procédés de l'USTHB, pour l'ensemble des connaissances qu'elle m'a transmises, pour sa disponibilité, ces encouragements ainsi que pour les compétences qu'elle m'a permis d'acquérir.*

Mes remerciements s'adressent également aux directions du centre universitaire Yahia Fares de Médéa et du complexe d'Antibiotiques de Médéa, qui m'ont accueilli au sein de leurs laboratoires.

*Je remercie aussi **Monsieur LEBAILI Soltane** Professeur à l'USTHB qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.*

*Je remercie également **M. BAKOUR M., M. AIT-AMAR H., Mlle BENSMAILI A.**, Professeurs à l'USTHB, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.*

*Je remercie spécialement **M. AMRANE A.**, Professeur de l'université de Rennes1 qui m'a aussi fait l'honneur de juger ce travail et qui m'a permis d'avancer dans mes travaux de recherche, en m'accueillant au sein de son laboratoire.*

J'adresse mes remerciements à ma petite sœur Abouseoud Hanane, pour son aide dans la mise en oeuvre de techniques de biochimie et de microbiologie, pour ses petits conseils toujours utiles ainsi que sa gentillesse.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des ingénieurs et techniciens des laboratoires du Centre Universitaire Yahia Fares de Médéa et de SAIDAL, ainsi que l'ensemble du corps administratif de la Faculté de Génie des procédés et génie Mécanique de l'USTHB

Je remercie enfin mon entourage familial et affectif dont le soutien m'a permis de mener ce travail à son terme.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	i
TABLE DES MATIERES.....	ii
NOMENCLATURE	v
ABREVIATIONS.....	vi

INTRODUCTION GENERALE.....	1
----------------------------	---

PARTIE A ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A.1. BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES.....	5
A.I.1. Introduction.....	5
A.I.2. Mécanismes de dégradation.....	6
A.I.3. Types de biodégradation	7
<i>A.I.3.1. Biodégradation gratuite.....</i>	<i>7</i>
<i>A.I.3.2. Cométabolisme.....</i>	<i>8</i>
A.I.4. Processus de biodégradation des Hydrocarbures.....	8
A.I.5. Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation des hydrocarbures.....	9
<i>A.I.5.1. Etat physique et concentration des hydrocarbures</i>	<i>9</i>
<i>A.I.5.2. Influence de la température.....</i>	<i>9</i>
<i>A.I.5.3. Influence de l'oxygène.....</i>	<i>10</i>
<i>A.I.5.4. Influences des éléments nutritifs.....</i>	<i>11</i>
<i>A.I.5.5. Effet de la salinité et du pH</i>	<i>11</i>
A.II. LE NAPHTALENE ET LA FAMILLE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP)	12
A.II.1. Structures et propriétés.....	12
A.II.2. Présence dans l'environnement.....	14
A.II.3. Toxicité	15
A.II.4. Bio-accumulation et métabolisme.....	16
<i>A.II.4.1 Organismes aquatiques.....</i>	<i>17</i>
<i>A.II.4.2. Organismes terrestres y compris les végétaux.....</i>	<i>17</i>
A.II.5. Devenir dans l'organisme.....	17
<i>A.II.5.1. Etudes chez l'homme.....</i>	<i>17</i>
<i>A.II.5.2. Etudes chez l'animal.....</i>	<i>18</i>
A.II.6. Valeurs sanitaires et environnementales.....	19
<i>A.II.6.1. Etiquetage – Milieu de travail.....</i>	<i>19</i>
<i>A.II.6.2. Valeurs utilisées pour les populations en milieu de travail..</i>	<i>19</i>
<i>A.II.6.3. Valeurs utilisées pour la population générale.....</i>	<i>19</i>
A.II.7. Principales méthodes d'analyse des HPAs.....	20

A.III. TECHNIQUES DE DEPOLLUTION.....	20
A.III.1. Procédés physiques.....	20
A.III.2. Procédés chimiques.....	21
A.III. 3. Bioremédiation.....	21
A.IV. BIODEGRADATION DU NAPHTALENE ET DES HPAS.....	22
A.IV.1. Mécanismes de biodégradation oxydative (aérobie) du naphtalène et des HPAs par les bactéries.....	23
<i>A.IV.1.1. Mécanisme de biodégradation de naphthalène.....</i>	<i>24</i>
<i>A.IV.1.2. Mécanisme de biodégradation du phénantrène.....</i>	<i>27</i>
<i>A.IV.1.3. Dégradation des HAPs à 4 noyaux aromatiques ou plus...29</i>	
A.IV.2. Biodégradation anaérobie des HAPs.....	30
<i>A.IV.2.1 Conditions dénitrifiantes.....</i>	<i>30</i>
<i>A.IV.2.2 Conditions sulfato-réductrices.....</i>	<i>30</i>
A.IV.3. Les dioxygénases, enzymes clés de la biodégradation aérobie du naphtalène.....	32
A.V. GENERALITES SUR L'IMMOBILISATION DES CELLULES	
Introduction.....	33
A.V.1. Définition	33
A.V.2. Applications industrielles	34
A.V.3. Avantages et problèmes de l'immobilisation	34
A.V.4. Méthodes d'immobilisation.....	36
<i>A.V.4.1. Méthodes par confinement (inclusion).....</i>	<i>38</i>
<i>A.V.4.2 Méthodes avec mise en jeu de liaisons.....</i>	<i>39</i>
A.V.5. Choix de la méthode d'immobilisation.....	40
A.V.6. Supports d'immobilisation.....	41
A.V.7. Choix du support.....	41
A.V.8. Analyse des cellules immobilisées.....	42
A.V.9. Réacteurs à cellules immobilisées.....	42
A.V.10. Les limitations diffusionnelles.....	44
A.V.11. Evaluation des paramètres cinétiques.....	45
A.V.12. Vitesse de réaction au niveau d'une particule.....	46
A.V.13. Applications environnementales de la technologie des cellules Immobilisées.....	49

PARTIE B

MATERIEL ET METHODES

B.1. ISOLEMENT ET ADAPTATION DES MICROORGANISMES.....	51
B.2. DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE DES PSEUDOMONAS	55

B.2.1	Mesure de la concentration en biomasse	55
B.2.2.	Analyse du naphthalène.....	56
B.2.3.	Résultats & Discussion.....	58
	- <i>Effet de la température</i>	58
	- <i>Effet du pH</i>	58
	- <i>Effet de la concentration en naphthalène</i>	59
	- <i>Effet de la nature de la source d'azote</i>	60
B.3.	MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME NAPHTALENE-DIOXYGENASE (NDO)ET DE LA PRODUCTION D'ACIDE SALICYLIQUE	
B.3.1.	Mise en évidence de la NDO.....	61
B.3.2.	Mise en évidence de la production d'acide salicylique lors de la biodégradation du naphthalène	63
B.4.	ETUDE DE LA CINETIQUE DE BIODEGRADATION DU NAPHTALENE PAR CELLULES LIBRES DE PSEUDOMONAS sp.....	65
B.4.1.	Cultures d'enrichissement.....	65
	<i>Résultats et Discussion</i>	67
B.4.2.	Détermination des paramètres cinétiques de la croissance des <i>Pseudomonas sp.</i> et de la biodégradation du naphthalène	68
	a. <i>Vitesse spécifique de croissance μ</i>	68
	b. <i>Rendement en biomasse $Y_{X/S}$</i>	69
	c. <i>Temps de doublement t_d</i>	70
	d. <i>Vitesse de biodégradation V</i>	71
B.4.3.	Modélisation	72
B.4.4.	Simulation	75
B.5.	ETUDE COMPARATIVE DE LA BIODEGRADATION DU NAPHTALENE PAR CELLULES LIBRES ET IMMOBILISEES DE <i>PSEUDOMONAS sp.</i>	77
B.5.1.	Cultures d'enrichissement.....	77
B.5.2.	Essais en batch	78
B.5.3.	Résultats et discussion	81
	<i>B.5.3.1. Cinétique de biodégradation du naphthalène par cellules libres et immobilisées</i>	81
	<i>B.5.3.2. Modélisation</i>	84
B.6.	ESTIMATION DES PARAMETRES CINETIQUES.....	84
B.6.1.	Facteur d'Efficacité η	84
B.6.2.	Coefficient de Diffusion Effective.....	86
B.6.3.	Profil de concentration.....	87
	CONCLUSION.....	90
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	93
	LISTE DE PUBLICATIONS ET DE COMMUNICATIONS INTERNATIONALES	

NOMENCLATURE

- D_{eff} , D_i : diffusivité effective ou coefficient de diffusion effective ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
- $J(S)$: flux de transfert de matière ($\text{mg cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)
- k : constante de vitesse (h^{-1})
- K_i : constante d'inhibition du modèle de Haldane (mg l^{-1})
- K_s : constante d'affinité ou de Monod (mg l^{-1})
- R : vitesse de biodégradation ($\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$)
- Re : nombre de Reynolds
- R_{max} : vitesse maximale de biodégradation ($\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$)
- r : position radiale à l'intérieur de la particule (cm)
- r_p : rayon de la particule (cm)
- S : concentration en substrat (mg l^{-1})
- Sc : nombre de Schmidt
- Sh : nombre de Sherwood
- S_0 : concentration initiale (mg l^{-1})
- S_s : concentration à la surface de la particule (mg l^{-1})
- t : temps (h)
- t_d : temps de doublement (h)
- t_0 : temps initial (h)
- V_{max} : vitesse maximale de la réaction de biodégradation ($\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$)
- V_0 : vitesse initiale de biodégradation ($\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$)
- X : biomasse (mg l^{-1})
- $Y_{X/S}$: rendement en biomasse (mg biomasse sèche/mg naphtalène consommé)
- η : facteur d'efficacité
- μ : vitesse spécifique de croissance (h^{-1})
- μ_{max} : vitesse spécifique maximale de croissance (h^{-1})
- Φ : Module de THIELE

ABBREVIATIONS

ATSDR: AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY

D.O. : DENSITE OPTIQUE

DHHS : U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

DMF : DIMETHYL FORMAMIDE

EPA : ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY

HAP : HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYNUCLEAIRES

HPA : HYDROCARBURES POLYAROMATIQUES

ICT OU TCI : TECHNOLOGIE DES CELLULES IMMOBILISEES

NAD : NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE

NADH : FORME REDUITE DE NAD

NDO : NAPHTALENE DIOXYGENASE

UV : ULTRAVIOLET

INTRODUCTION GENERALE

Les hydrocarbures aromatiques polynucléaires (HAP), appelés encore hydrocarbures polyaromatiques (HPA), sont considérés comme des polluants potentiels dans la nature en raison de leur toxicité élevée et de leur résistance à la biodégradation [Atlas et Cerniglia, 1995]. Le naphthalène est classé comme un composé toxique à haut risque selon la norme internationale de l'agence EPA (Environmental Protection Agency)[EPA, 1986, 1993, 1994; DHHS, 1993; Vandermuulen, 1981]. Malgré sa solubilité individuelle limitée dans l'eau (30 mg/L à 25°C), il est souvent présent dissous, à des concentrations élevées, dans des mélanges complexes tels que les fractions pétrolières, les créosotes et les effluents des industries pharmaceutiques [Grund *et al.*, 1992]. L'exposition systématique au naphthalène et ses dérivées peut causer plusieurs maladies et déséquilibres du métabolisme humain [ATSDR, 1990; Amooore et Hautala, 1983; Vandermuulen, 1981]. Le naphthalène rentre en contact avec l'environnement suite aux émissions dans l'atmosphère de rejets de fuel et de gas-oil où il peut subir une dégradation photochimique (temps de demi-réaction 3 à 8 heures), ou bien s'introduit dans les sols et les eaux à partir des réservoirs de stockage ou durant le transport du composé pur ou de mélanges complexes où son temps de séjour peut varier selon qu'il subisse une transformation physico-chimique telle que l'évaporation ou l'adsorption, une réaction photochimique ou une transformation biologique (biodégradation). Le taux de disparition dépend des conditions locales mais en général le temps de demi-réaction peut s'étendre entre quelques jours et quelques mois, ce qui nécessite une solution radicale pour le traitement des sites contaminés et des effluents industriels.

La méthode de traitement biologique s'avère être la solution optimale pour le problème de dégradation du naphthalène. Plusieurs travaux ont été présentés rendant compte de l'utilisation du naphthalène comme source d'énergie et de carbone par différents types de microorganismes [Kuhm *et al.*, 1981; Atlas et Cerniglia, 1995]. Pour la plupart de ces microorganismes, il existe un seuil d'inhibition au-dessus duquel la vitesse de réaction et le rendement de bioconversion deviennent faibles. Pour rendre le processus plus efficace, il est nécessaire d'envisager un traitement en continu et d'augmenter la concentration en biomasse afin de garantir un taux de conversion élevé; ceci est rendu possible grâce à l'immobilisation des bactéries sur des supports poreux naturels ou synthétiques, qui seront utilisées dans différentes configurations de bioréacteurs continus agités, en lit fixe ou en lits fluidisés de faible volume, et d'autre part limite l'exposition des microorganismes piégés dans les pores

aux concentrations élevées en substrat susceptibles d'être inhibitrice ou toxiques [Calegari et Francotte, 1986; Webb *et al.* 1986; Willaert *et al.*, 1996]. Plusieurs méthodes pour d'immobilisation des bactéries sont rapportées [Klein et Wagner, 1986] ; l'inclusion dans les gels de polymères durant la polymérisation est la plus pratiquée. Les polymères naturels tels que les polysaccharides et l'alginate de calcium en particulier représentent plusieurs avantages (la porosité élevée, une méthode d'immobilisation assez simple et rapide, une bonne stabilité chimique et mécanique, et un faible coût [Fukui et Tanaka, 1982].

Concrètement, l'étude a fait l'objet de deux Parties. Dans un premier temps, une étude bibliographique est présentée faisant le point sur les connaissances relatives aux éléments de base de notre étude, c'est à dire la notion de biodégradation, les mécanismes de biodégradation et les facteurs influençant le processus. Les composés polyaromatiques sont ensuite examinés du point de vue de leurs persistance dans l'environnement et les risques engendrés par cette présence, en insistant sur le composé modèle qui est le naphthalène. Les travaux de recherche sur les mécanismes de dégradation des HPA et principalement du naphthalène, par différentes souches bactériennes dans des conditions aérobies et anaérobies, sont ensuite présentés. Enfin une partie importante de l'étude bibliographique a été consacrée pour présenter la technologie d'immobilisation des cellules. Les différentes méthodes d'immobilisation des cellules avec une vue d'ensemble des techniques envisageables, est introduite avec ses avantages, ses limites, son impact sur la cinétique de réaction, en concluent avec des exemples d'application de cette technologie dans le domaine de l'environnement.

La deuxième partie, principalement expérimentale, porte sur la biodégradation du naphthalène par cellules libres et immobilisées d'une souche bactérienne appartenant à l'espèce *Pseudomonas*. Tout d'abord on procède à l'isolement et à la caractérisation d'une souche de *Pseudomonas sp.* ayant prouvé sa capacité à utiliser le naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie. Les caractères morphologiques et biochimiques sont établis . Ensuite, l'étude traite de l'approche méthodologique suivante :

Une souche possède ses caractères propres liés à son patrimoine génétique et à ses systèmes de régulation. Il s'agit de la placer dans des conditions tels qu'elle puisse s'exprimer totalement ou du moins qu'elle puisse exprimer le maximum de ses potentialités, étant entendu que l'exploitation industrielle a ses contraintes propres.

En effet, pour passer au stade de l'exploitation dans le domaine de biorémediation par exemple, il faut tenir compte de la teneur en substrat résiduel et des conditions du milieu. Ces facteurs ont un impact direct sur le rendement effectif et sur le coût de la dépollution.

Une bactérie,ensemencée dans un milieu de culture, doit, pour se multiplier, y trouver des aliments et des conditions de milieu (pH, température, etc.) favorables. Si les caractéristiques physico-chimiques du milieu sont maintenues constantes, la croissance s'arrête lorsque l'un des aliments aura été consommé totalement. Mais cette croissance est plus ou moins rapide, et la vitesse de réaction est directement liée à celle du processus le plus lent. La nature de l'étape limitante est très variée :

- Elle peut être d'ordre physiologique: synthèse des enzymes, transfert de substrat de l'extérieur à l'intérieur des cellules, puis des produits à l'extérieur, excrétion d'exoenzymes nécessaires à l'assimilation du substrat, excrétion de composés tensioactifs assurant le transfert de substrat, inhibition par: excès du substrat, par accumulation intracellulaire de métabolites, ou par les métabolites excrétés dans le milieu de culture.
- Elle peut aussi dépendre des facteurs environnementaux et de mise en œuvre : pH, température, force ionique, processus diffusionnels par exemple.

Tout processus dans lequel interviennent les microorganismes peut être caractérisé par trois types de réactions :

- réactions de synthèse de biomasse (croissance);
- réactions de synthèse de métabolites ;
- réactions de maintenance consistant en une consommation de substrat, indépendamment de la croissance et de la production de métabolites;

Il est donc indispensable de connaître la contribution de chaque type de réaction au processus global et les facteurs qui les contrôlent afin de mieux les maîtriser. Ceci n'est possible que par l'analyse cinétique dont les résultats permettront d'identifier et quantifier les étapes limitantes, de rechercher ensuite les moyens de lever ces limitations avant de pouvoir déterminer les conditions d'une mise en œuvre rationnelle.

Les facteurs à optimiser sont : la température, le pH, la concentration initiale en naphtalène et la nature de la source d'azote. La voie métabolique de biodégradation du naphtalène étant identifiée par la mise en évidence de la production de l'acide salicylique et la mesure de l'activité enzymatique de l'enzyme « naphtalène-dioxygénase ». Les cinétiques de croissance bactérienne et de biodégradation du naphtalène sont établies aux conditions optimales à différentes concentrations initiales en substrat. Les paramètres de ces deux cinétiques tels que les vitesses spécifiques de croissance et de biodégradation , le temps de doublement et le rendement en biomasse seront déduits à partir des résultats expérimentaux. La modélisation des données expérimentales décrivant la croissance bactérienne en fonction

de la concentration de naphthalène est étudiée. Le modèle d'inhibition de HALDANE est testé. Les paramètres du modèle sont estimés à partir des données expérimentales . La simulation de la cinétique de dégradation permet ensuite de vérifier la validité des données calculées à partir du modèle par rapport aux données expérimentales .

La deuxième partie consiste en une étude comparative de la biodégradation du naphthalène par des cellules libres et immobilisées dans l'alginate de calcium. Elle a été réalisée dans des cultures en batch à différentes concentrations initiales dans le domaine d'inhibition à 30°C et pH 7.0 . Les cellules bactériennes de *Pseudomonas sp.* sont immobilisées par la méthode d'inclusion dans des billes de gel préformé d'alginate de calcium. Les résultats montrent l'intérêt et les limites que peut apporter l'immobilisation dans le processus aux concentrations élevées en naphthalène du point de vue rendement et vitesse de biodégradation .

Un modèle statistique relatif à la cinétique de biodégradation est proposé pour le calcul du facteur d'efficacité et du module de THIELE, qui sont les deux grandeurs présentant une estimation quantitative de la contribution des contraintes de diffusion du naphthalène dans le support sur la cinétique de conversion et le rendement global .

PARTIE A

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A.I. BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES

A.I.1. Introduction

La pollution par les hydrocarbures en milieu marin et terrestre, qu'elle soit chronique ou accidentelle, pose d'importants problèmes d'élimination. Les voies d'élimination chimique et physique de leur élimination ont leurs limites du fait de leur coût ou de leur impact secondaire sur l'environnement. La voie biologique est actuellement en plein essor et suscite de très nombreux travaux de par le monde.

La dégradation d'un hydrocarbure par des micro-organismes est considéré comme la voie la plus efficace de transformation de ce polluant.

Nous sommes intéressés à ce problème au plan fondamental comme industrielle. Ces dernières années, la recherche de micro-organismes utilisant des hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie s'est considérablement amplifiée avec plus ou moins de succès.

Sur le plan technique, un des problèmes fréquemment soulevé était celui de la croissance des micro-organismes sur les hydrocarbures.

Les composés organiques sont souvent classés comme biodégradables, persistants ou récalcitrants. Le terme biodégradation signifie tout simplement la transformation biologique d'un composé organique en une autre forme [Grady, 1985]. Ce procédé peut donc convertir un composé inoffensif en un composé toxique, changer une substance immédiatement métabolisable en substance difficile à détruire, ou altérer la toxicité du composé. Cependant, lorsqu'on dit qu'un composé est biodégradable cela signifie habituellement qu'il peut être minéralisé (conversion en dioxyde de carbone, eau et différentes formes inorganiques). La biodégradation primaire, quant à elle, est utilisée pour indiquer une simple transformation, alors que le terme de biodégradation partielle signifie n'importe quelle transformation entre la biodégradation primaire et la minéralisation [Harder, 1981]. La transformation la plus avantageuse serait la dégradation totale du composé toxique accompagnée par sa conversion en sous produit valorisable [FEMS Symposium, 1980].

La Figure A.I. représente schématiquement les transformations globales du carbone constituant les hydrocarbures, sous l'action des bactéries,.

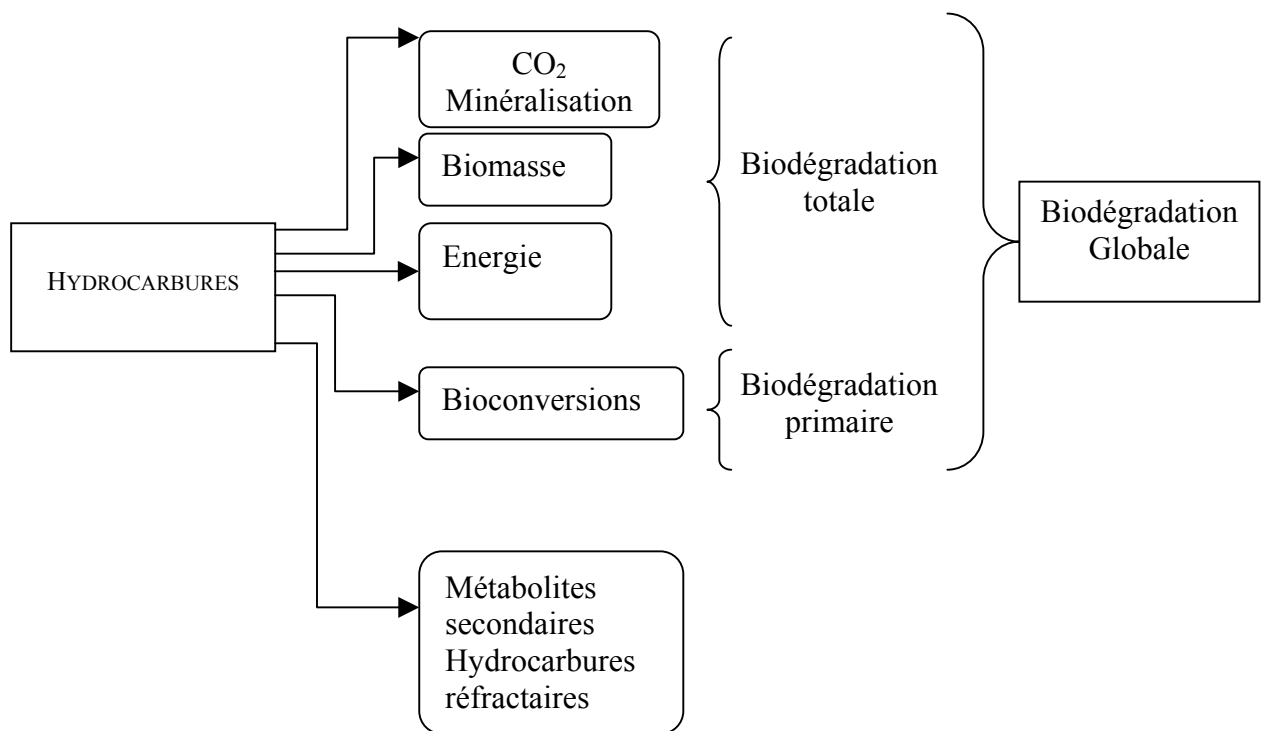


Figure A.I. : Schéma de Transformation des hydrocarbures sous l'action des bactéries.

A.I.2. Mécanismes de dégradation

Les microorganismes peuvent seulement assurer des transformations pour lesquelles ils ont une « programmation » génétique. Les microorganismes ne peuvent pas tout faire car l'environnement demeure un facteur déterminant dans la réaction pouvant être effectuée par un organisme apte à le faire. Par conséquent, il n'est pas certain qu'un composé soit dégradé dans un environnement particulier. D'abord, un organisme susceptible de dégrader doit être présent ; ensuite une opportunité doit exister pour que les enzymes nécessaires soient synthétisées et enfin, les conditions environnementales doivent être appropriées pour que les réactions enzymatiques s'effectuent à une vitesse significative [Grady, 1985].

La littérature concernant l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes indique que la croissance cellulaire dépend des processus de transfert des hydrocarbures à la surface cellulaire et de leur passage à travers l'enveloppe cellulaire jusqu'au cytoplasme.

Trois modes de transfert des hydrocarbures sont généralement considérés [Hommel, 1994 ; Goswani et Singh, 1991 ; Husain et al., 1997] :

- 1- L'interaction des cellules avec les hydrocarbures dissous dans la phase aqueuse par les facteurs de solubilisation extracellulaires.

2- L'interaction des cellules avec les hydrocarbures émulsifiés par les agents actifs de surface appelés biosurfactants.

3- Le contact direct des cellules avec les hydrocarbures.

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter. En se basant sur la fréquence d'isolement, les genres bactériens prédominants sont : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligènes*, *Vibro*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacteria*, et *Nocardia* [Leahy et Colwell, 1990 ; Floodgate, 1995]. Ces organismes dégradant les hydrocarbures sont ubiquistes [Atlas, 1995 a, b ; Olivera et al., 1997], ils ont même été rencontrés dans des écosystèmes extrêmes comme les régions polaires [Whyte et al., 1995 ; Aislabie et al., 1998], les déserts [Al-Hadrami et al., 1995] ou les sources chaudes [Zarilla et Perry, 1984].

A.I.3. Types de biodégradation

Ils existent deux types de mécanismes ou métabolismes de dégradation : la biodégradation gratuite (gratuitous biodegradation) et le cométabolisme :

A.I.3.1 – Biodégradation gratuite

En général, le composé chimique supporte la croissance et sert comme source de carbone et d'énergie aux microorganismes [FEMS Symposium, 1980]. Le succès de ce type de métabolisme dépend entre autre de la capacité du composé à induire la synthèse de l'enzyme requise. On met souvent l'emphase sur la spécificité des enzymes comme catalyseurs. Cependant, il n'est pas rare pour les enzymes de se lier à des substrats contenant des groupements fonctionnels xénobiotiques (Composé étranger à la biosphère, fabriqué par l'homme) analogues aux substrats naturels. Cela dépend du degré de similitude de la structure du composé xénobiotique avec le substrat naturel [Alexander, 1973]. Si le composé xénobiotique est incapable d'induire l'enzyme nécessaire, alors la biodégradation se produira seulement en présence de l'inducteur naturel. Cela peut limiter les applications de la capacité enzymatique. Pour que les microorganismes d'une seule espèce effectuent continuellement la biodégradation gratuite du composé organique en tant que seule source de carbone et d'énergie, ils doivent être absolument en mesure de soutirer cette énergie. S'ils en sont incapables, ils ne pourront pas maintenir leur intégrité cellulaire ce qui entraîne la mort éventuelle de la culture.

Dans cette situation, la seule façon pour que les microorganismes puissent dégrader constamment le composé xénobiotique est l'utilisation d'une source additionnelle de carbone ajoutée au milieu ou l'action d'autres organismes dans une communauté mixte [Grady, 1985].

A.I.3.2 Cométabolisme

Le cométabolisme est défini comme étant la transformation d'un substrat ne servant pas à la division cellulaire et celle en présence obligatoire d'un substrat de croissance ou d'un autre composé assimilable [Dalton et Stirling, 1982]. Cet aspect de présence obligatoire d'un substrat pour la croissance a été ajouté par Dalton et Stirling (1982) pour faire une distinction entre le cométabolisme et la biodégradation gratuite. Le composé chimique, bien que métabolisé ne sert pas de nutriments aux microorganismes. McClure [FEMS Symposium, 1980] suggère que la présence d'un substrat facilement assimilable peut permettre à un organisme de dégrader un composé récalcitrant en fournissant l'énergie ou en réduisant l'activité enzymatique nécessaire. Le cométabolisme demeure, toutefois, un phénomène complexe.

A.I.4. Processus de biodégradation des Hydrocarbures

L'étude de l'oxydation des hydrocarbures se base sur l'analyse des milieux de culture des microorganismes dont la croissance dépend de la nature du composé utilisé comme source de carbone ainsi que des capacités métaboliques des cellules. Les produits détectés peuvent directement provenir du substrat, mais leur accumulation ultérieure peut être due au fait qu'ils sont faiblement métabolisés ou non métabolisés. Plusieurs produits d'oxydation peuvent être de nature transitoire et n'apparaissent jamais en quantités détectables. Les informations obtenues par l'analyse cellulaire et des milieux de cultures permettent d'établir la voie métabolique de dégradation des hydrocarbures. La confirmation de ces mécanismes nécessite des vérifications enzymologiques. Quand la dégradation suit des chemins alternatifs, ceux-ci doivent être vérifiés par inhibition sélective de chacun d'entre eux.

A.I.5. Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques. Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend

de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales. Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont : la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité, les éléments nutritifs, l'osmose et la pression hydrostatique [Leahy et Colwell, 1990 ; Atlas, 1981].

A.I.5.1. Etat physique et concentration des hydrocarbures ou du pétrole.

Les hydrocarbures de faibles poids moléculaires sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et donc de leur concentration très élevée dans les phases aqueuses. Ratledge (1978) rapporte que les *n*-alcane de courtes chaînes (< C₉) sont très toxiques pour les microorganismes alors que ceux plus longs que le *n*-nonane, les alcènes > C₁₂, les alkyle-bromés > C₁₀, et les alcanols > C₁₄ ne sont toxiques pour aucun microorganisme. Broderick et Cooney (1982), ont montré que la dégradation des *n*-alcane longs (>C₁₂), pour lesquels les solubilités sont inférieures à 0,01 mg/L s'effectue à des vitesses supérieures à celles de dissolution des hydrocarbures et sont fonction de la surface des hydrocarbures disponibles pour l'émulsification et leur fixation par les cellules.

A.I.5.2. Influence de la température

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent, la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes [Atlas, 1981 ; Leahy et Colwell, 1990]. A basse température, la viscosité du pétrole augmente, la volatilité des composés toxiques pour les microorganismes, cas des alcane de faibles poids moléculaires est réduite et leur solubilité dans l'eau augmente par diminution de leur volatilité, ce qui entraîne un ralentissement du métabolisme des microorganismes [Atlas et Bartha, 1972 ; Atlas, 1975]. Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation [Song et al., 1990]. Si l'oxydation des hydrocarbures a été observée à des températures inférieures à 0°C [Rike et al., 2003] ou élevées 70-80°C [Annweiler et al, 2000], le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40°C (Atlas, 1981).

Au delà de la température optimale de croissance et de biodégradation, on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique. Rling et al. (2003) mentionnent une inhibition totale de la biodégradation au-delà de 80-90°C, malgré l'isolement de bactéries thermophiles (*Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*), et d'*Archae* hyperthermophiles (*Thermococcus*, *Archeaoglobus*) dans des puits de pétrole où la température peut atteindre 100°C.

A.I.5.3. Influence de l'oxygène

L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques par les bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable [Leahy et Colwell, 1990 ; Atlas, 1981]. Les conditions aérobies sont, par la suite, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement. Le problème de la limitation de l'oxygène moléculaire dans les couches superficielles des colonnes d'eau est inexistant. En effet la concentration en oxygène est suffisamment élevée pour assurer l'activité des microorganismes hydrocarbonoclastes. Théoriquement, 3,5 g d'oxygène sont nécessaires pour l'oxydation complète de 1 g de pétrole ; Zobell (1969), a calculé que la quantité d'oxygène dissoute dans 320 m³ d'eau de mer est nécessaire pour l'oxydation de 1 L de pétrole brut.

Dans un site très pollué, on aboutit fréquemment à un ralentissement de la biodégradation par suite d'une carence en oxygène. Marin et al. (1996), en étudiant les facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus*, ont constaté une augmentation de la dégradation des hydrocarbures totaux et des *n*-alcanes de 10 % après un apport supplémentaire d'oxygène par agitation. Les sédiments aquatiques, sont par contre généralement anoxiques, à l'exception de la fine couche superficielle [Leahy et Colwell, 1990].

Bertrand et al. (1986) ont étudié, dans des systèmes à flux continu, l'évolution des différents hydrocarbures en fonction de la concentration en oxygène. Ils ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures a lieu essentiellement dans la partie superficielle des sédiments (0-1 cm), où la concentration en oxygène est de 8 ppm, alors qu'elle est plus faible en profondeur. Par contre, aucune dégradation n'a été observée dans des conditions anaérobies (0,2-0,3 ppm), en dépit d'une activité sulfato-réductrice très élevée dans les sédiments.

La concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitante de la vitesse de la biodégradation du pétrole dans les sols [Hurst et al., 1996] et les eaux souterraines [Boyd et

al., 2001]. 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.

A.I.5.4. Influences des éléments nutritifs

Le rejet des hydrocarbures dans les environnements aquatiques, qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables à la croissance microbienne [Leahy et Colwell, 1990]. Le pétrole, lui-même, contient de tels nutriments en petites quantités, mais ils sont toujours présents sous forme de composés hétérocycliques (exemple : dérivés de la pyridine et du pyrrole pour l'azote) ou organométalliques complexes ; ils ne sont donc pas utilisables par les microorganismes . Les sources d'azote et de phosphore sont toujours faibles, surtout pendant les périodes de forte activité des organismes photosynthétiques.

L'azote et le phosphore sont aussi des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sols [Mohn et Stewart, 2000].

A.I.5.5. Effet de la salinité et du pH

La salinité moyenne des milieux océaniques est de l'ordre de 3,5 % et l'intervalle de variation se situe en général dans les limites de 3,3 et 3,7%. Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des microorganismes hydrocarbonoclastes [Bertrand et Mille, 1989]. 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 [Tagger et al., 1976 ; Bertrand et al., 1990]. Bertrand et al. (1993) ont étudié l'influence de la concentration en chlorure de sodium sur la biodégradation des hydrocarbures par deux communautés microbiennes, et 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 biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3,3 à 28,4%, et attribuent ces résultats à une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes.

L'effet de la concentration en NaCl sur la biodégradation dépend de la nature du substrat utilisé comme source de carbone [Bertrand et al., 1993]. Fernandez et al. (1996) ont montré que la souche *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bactérie marine halotolérante dégrade

l'eicosane, avec un taux de biodégradation de 90% pour des concentrations en chlorure de sodium comprises entre 0,2 et 2,5 M.

L'influence du pH a été très peu étudiée, mais 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, cas pour quelques types de sols, pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité [Leahy et Colwell, 1990]. Dibble et Bartha (1979) et Hambrick et al. (1980) ont montré que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des milieux légèrement basiques.

Il est à noter que, le pH des milieux marins n'atteint jamais des valeurs extrêmes pour inhiber la biodégradation.

A.II. LE NAPHTALENE ET LA FAMILLE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP)

A.II.1. Structures et propriétés

Les HAP sont des molécules composées d'au moins deux noyaux aromatiques accolés. Ils diffèrent par le nombre de noyaux accolés ainsi que par leur agencement. Les structures de 16 HAP considérés comme polluants prioritaires par l'agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA) sont présentées en figure A.II.1. Les HAP sont très stables, peu volatils et hydrophobes. Les caractéristiques physicochimiques de certains HAP sont détaillées au Tableau A.II.1. Ces propriétés les rendent relativement résistants à la biodégradation. De fait, ils persistent dans l'environnement, faisant courir un risque sanitaire. En effet, des études ont montré que certains HAP sont génotoxiques, mutagènes et cancérigènes [Randerath *et al.*, 1999].

Tableau A.II.1 – Propriétés physico-chimiques des HAP selon Bouchez (1995)

HAP	Masse molaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Solubilité (mg/L)	Log K_{ow} ^a
Naphtalène	128,2	80	218	32	3,35
Acénaphthylène	152,2	82	270	3,93	
Acénaphthène	154,2	93	279	3,42	3,92
Fluorène	166,2	116	294	1,9	4,18
Phénanthrène	178,2	100	338	1	4,52
Anthracène	178,2	216	340	0,07	5,54
Fluoranthène	202	107	383	0,27	5,22
Pyrène	202	150	393	0,16	5,18
Chrysène	228,2	254	441	0,006	5,79
Benz[a]anthracène	228,2	156	435	0,0057	
Benzo[a]pyrène	252	179	496	0,0038	5,98

^a Log Kow est le logarithme décimal du coefficient de partition Kow d'un composé dans un système standard octanol/eau.

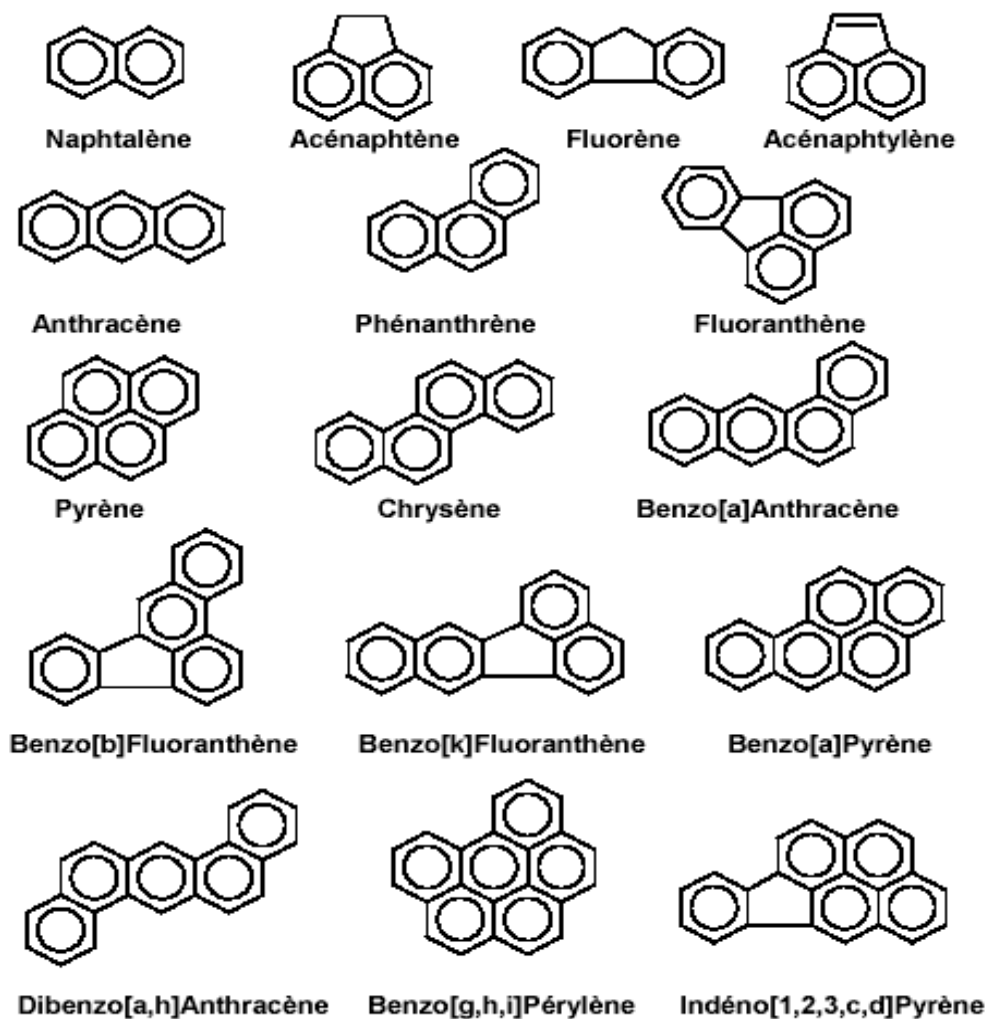


Figure A.II-1 : Structure et nomenclature des HAP, illustrées pour les seize HAP prioritaires de la liste de l'EPA

Le naphthalène se présente sous la forme de cristaux blancs , d'aiguilles ou de poudre à forte odeur de goudron.[EOHS, 1983]

Le naphthalène peut être produit à partir de goudron de houille ou de pétrole. La distillation du goudron est le moyen de production le plus répandu. La fraction la plus riche en naphthalène est refroidie et le naphthalène cristallisé recueilli est raffiné par distillation, lavage ou sublimation. Depuis 1960, la production à partir du pétrole par désalkylation des méthyl-naphthalènes en présence d'hydrogène à haute température et pression s'est également développée [Kirk Othmer , 1978].

Le naphthalène est principalement utilisé comme intermédiaire dans la fabrication d'anhydride phtalique (plus de 60 % de la production) servant à produire des phtalates, plastifiants, résines, teintures, répulsifs pour insectes, etc.. Il est également utilisé dans la fabrication de produits destinés au tannage du cuir et entre dans la composition d'agents tensio-actifs (sulfonates de naphthalène et dérivés utilisés comme dispersants ou agents mouillants en peinture, teinture et formulation de papier d'emballage). Le naphthalène est également utilisé comme répulsif pour les mites.[Kirk Othmer , 1978]

A.II.2. Présence dans l'environnement

Les HAP sont répartis de façon ubiquitaire dans l'environnement. Leur origine principale est l'utilisation et le transport des combustibles fossiles. Ainsi, la combustion incomplète de la matière organique fossile (charbon, pétrole et dérivés) ou plus récente (bois), ou pyrolyse, est une source majeure de HAP [Jouanneau *et al.*, 1999]. A cela s'ajoute une production de HAP d'origine naturelle (incendies de forêts, volcans,...). Les HAP omniprésents dans l'environnement sont associés à des particules émises dans l'atmosphère, lesquelles se déposent en provoquant une dispersion de la pollution. Ils sont également transportés par les eaux pluviales et fluviales et se retrouvent ainsi dans les boues de stations d'épuration. Les sols d'anciennes usines à gaz et de cokeries présentent une pollution aiguë par les HAP et se répartie de façon hétérogène entre des goudrons, des agrégats et des HAP adsorbés aux particules de sol (Tableau A.II.2).

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 production et à la distillation du charbon tandis que les pertes liées à la production de naphthalène représentent

moins de 1 %. La fumée de tabac libère également des petites quantités de naphthalène. La presque totalité du naphthalène ainsi libéré se disperse dans l'air. [EPA1986,1993,1994 ; DHHS 1993]. Le naphthalène rentre en contact avec l'environnement suite aux émissions dans l'atmosphère de rejets de fuel et de gas-oil où il peut subir une dégradation photochimique (temps de demi-réaction 3 à 8 heures), ou bien s'introduit dans les sols et les eaux à partir des réservoirs de stockage ou durant le transport du composé pur ou de mélanges complexes où son temps de séjour peut varier selon qu'il subisse une transformation physico-chimique telle que l'évaporation ou l'adsorption, une réaction photochimique ou une transformation biologique (biodégradation). Le taux de disparition dépend des conditions locales mais en général, le temps de demi-réaction peut s'étendre entre quelques jours et quelques mois, ce qui nécessite une solution radicale pour le traitement des sites contaminés et des effluents industriels. La méthode de traitement biologique de dégradation s'avère être la solution optimale pour le problème de dégradation naphthalène et plusieurs recherches ont été présentées sur l'utilisation du naphthalène comme source d'énergie et de carbone aux différents types de microorganismes [Kuhm *et al.* 1981 ; Grund *et al.* 1992 ; Atlas et Cerniglia 1995].

A.II.3. Toxicité

Les HAP se trouvent dans l'environnement à des doses relativement faibles, mais leur caractère hydrophobe entraîne leur bioconcentration dans la chaîne alimentaire.

Certains ont été reconnus comme cancérigènes (benzo(a)pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène...). Chez l'homme, les HAP deviennent toxiques après oxydation enzymatique, provoquant la formation de métabolites électrophiles solubles.

Le benzo(a)pyrène (BaP) est certainement le plus connu et le plus étudié des HAP quant à sa cancérogénicité.

Certains de ses dérivés seraient impliqués dans le développement de cancers du poumon chez l'homme [Denissenko *et al.*, 1996]. Des études font état d'une plus grande mutagénicité de mélanges de HAP lorsque la proportion en BaP est plus importante [Randerath *et al.*, 1999].

Tableau A.II.2 – Composition en HAP des sols de sites industriels contaminés, d’après Wilson et Jones (1993)

	Concentration (mg/kg) dans des échantillons provenant des sites :		
	Cokerie (1)	Cokerie (2)	Usine à gaz
Naphtalène	56	59	
Acénaphtylène		187	
Acénaphène		29	2
Fluorène	7	245	225
Phénanthrène	27	277	379
Anthracène	6	130	156
Fluoranthène	34		2174
Pyrène	28	285	491
Chrysène	11	135	345
Benzo[a]pyrène	14		92
Benz[a]anthracène	16	100	317
Benzo[b,k]fluoranthène			498
Dibenzo[ah]anthracène	2		2451
Indéno[1,2,3-cd]pyrène			207

Selon [Boffeta et al., 1997 ; Wornat et al., 2001] les HAPs sont absorbés par l’homme par :

- les voies respiratoires via l’inhalation de particules atmosphériques contaminées ou de fumées de cigarettes. Le taux d’absorption par les poumons dépend du type d’HAPs, de la taille et de la composition des particules sur lesquelles ils sont adsorbés.
- le système digestif via l’ingestion de produits alimentaires contaminés, notamment les produits grillés ou fumés. Le poisson fumé peut contenir jusqu’à 80µg d’HAPs par kilogramme.
- la peau : 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 [Boffetta et al.,1997 ; Partanen et Boffetta, 1994 ; Wornat et al., 2001].

A.II.4. Bio-accumulation et métabolisme

Le naphtalène est classé comme un composé toxique à haut risque suivant la norme internationale de l’agence EPA (environmental protection agency) [EPA1986,1993,1994 ; DHHS 1993 ;Vandermuulen 1981]. Malgré sa solubilité individuelle limitée dans l’eau (30 mg/L à 25°C), il est souvent présent dissous à des concentrations supérieures à la norme

dans des mélanges complexes tels que les fractions pétrolières, les créosotes et les effluents des industries pharmaceutiques [Grund *et al.* 1992].

De nombreux essais d'adsorption/désorption sur les sédiments ont été rapportés dans la littérature. Avec la méthode d'estimation proposée par la Commission Européenne (CE, 1996), une valeur du coefficient de partage carbone organique/eau (K_{oc}) de l'ordre de 1320 L/kg est calculée.

A.II.4.1 Organismes aquatiques

De nombreux résultats d'essais sont disponibles, dont notamment ceux concernant les:

- Poissons : *Cyprinus carpio* (56 j, Méthode OCDE 305 C) [CITI, 1992]
- Mollusques : *Mytilus edulis* (8 heures) [Hansen *et al.*, 1978]

A.II.4.2. Organismes terrestres y compris les végétaux

Le naphthalène peut être prélevé par les parties supérieures des plantes depuis la phase gazeuse de l'air (éventuellement suite à une volatilisation depuis le sol). De plus, étant donné son faible poids moléculaire (par rapport aux autres HAPs), il est assez disponible dans le sol pour être transféré et adsorbé dans la cuticules des racines, une fraction pouvant ensuite migrer vers la partie intérieure des racines [Kipopoulou, 1999].

Aucune donnée précise sur la bio-accumulation dans les végétaux n'a été trouvée dans la littérature pour permettre d'estimer les facteurs de bioconcentration.

L'exposition systématique au naphthalène et ses dérivées peut causer plusieurs maladies et déséquilibres du métabolisme humain [ATSDR 1990 ; Amore et Hautala 1983, Vandermulen 1981].

L'ensemble des informations et des données toxicologiques citées ci-dessous proviennent de diverses monographies publiées par des organismes reconnus pour la qualité scientifique de leurs documents (ATSDR, 1995 ; US EPA, 1998). Les références bibliographiques aux auteurs sont données pour permettre un accès direct à l'information scientifique mais n'ont pas fait l'objet d'un nouvel examen critique par les rédacteurs de la fiche.

A.II.5. Devenir dans l'organisme

A.II.5.1. Etudes chez l'homme

Chez l'homme, l'absorption du naphthalène a été très peu étudiée. Compte tenu

des effets observés lors de l'exposition, il a été admis que le naphthalène pouvait être absorbé à travers le tractus gastro-intestinal, le tractus respiratoire et la peau [US EPA,1998 ; ATSDR, 1995]. La toxicité rapportée chez des nouveau-nés (probablement exposés par voie cutanée même si une participation de la voie respiratoire ne peut être exclue) par contact avec des draps traités au naphthalène renforce cette hypothèse [Dawson *et al.*, 1958 ; Schafer 1951]. Chez l'homme, les deux métabolites principaux stables du naphthalène sont le 1-naphtol et le 1,2-dihydro naphthalène diol [Tingle *et al.*, 1993]. Le naphthalène peut être méthylé pour former le 1-méthylnaphatlène et le 2-méthylnaphatlène. Le premier composé pourrait être moins toxique que le naphthalène.

La majorité du naphthalène absorbé semble être éliminée sous forme de divers métabolites dans les urines. La toxicité du naphthalène dépend du taux de glutathion réduit capable de se conjuguer avec les métabolites du naphthalène. Ainsi, Owa [1989] a montré que l'exposition au naphthalène était corrélée au développement d'un ictère néo-natal (en cas d'exposition au naphthalène) uniquement chez les enfants déficients en enzyme glucos-6-phosphate déshydrogénase G6PD.

Les populations sensibles au naphthalène sont les enfants et les populations d'origine africaine et asiatique [Shannon et Buchaman, 1982]. Ces dernières présentent souvent une déficience pour l'enzyme G6PD .

A.II.5.2. Etudes chez l'animal

Des études menées chez le rat ont montré que le naphthalène était rapidement absorbé dans l'organisme et que les métabolites majeurs du naphthalène étaient le 1,2-dihydrodiol naphthalène et le 1-naphtol [Bock *et al.*, 1979]. Chez le rat l'absorption percutanée du naphthalène a été bien montrée et la demi-vie de ce composé est de 2,1 heures [Turkall *et al.*, 1994]. Une fois absorbé, le naphthalène ou ses métabolites sont distribués, par le sang, dans l'organisme. Il semble que la toxicité du naphthalène soit liée à la formation de quinones par la voie du 1-naphtol plutôt qu'au 1,2-oxyde de naphthalène. Les tissus peuvent avoir une sensibilité variable aux métabolites du naphthalène ; la toxicité peut ne se manifester qu'à partir d'une certaine concentration en métabolites [Xu *et al.*, 1992a].

La majorité du naphthalène absorbé est éliminée sous forme de divers métabolites dans les urines. Il existe des différences entre les espèces.

A.II.6. Valeurs sanitaires et environnementales

A.II.6.1. Etiquetage – Milieu de travail

A noter que la Directive 2001/59/CE de la Commission Européenne du 06 Août 2001 (JOL 225/1 du 21/08/2001) portant 28^e adaptation au progrès technique de la Directive 67/548/CEE relative à la classification, l’emballage et l’étiquetage des substances chimiques rapporte une révision de la classification du naphthalène qui est la suivante :

Symbole : Xn, N (Composé nocif, dangereux pour l’environnement)

Risque R : 22 – 50/53

Disposition sécuritaire S : (2) – 36/37 – 60 – 61

A.II.6.2. Valeurs utilisées pour les populations en milieu de travail –

France : Notes documentaires INRS ND 2098-174-99 "Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France" et ND 2154-184-01 "Indices biologiques d'exposition".

a. **Air** : La valeur limite moyenne d’exposition indicative fixée par le Ministère du Travail en France dans l’air des locaux de travail est de 10 ppm (50 mg/m³) pour le naphthalène (Sutherland et al., 1995).

b. **Sol** : Il n'existe actuellement aucune réglementation française concernant la pollution des sols. Les professionnels se basent sur des prescriptions de la circulaire de décembre 1994 du ministère de la Santé, de l'aménagement du territoire et de l'Environnement. La teneur de base utilisée pour le calcul de la valeur d'intervention est de 0.015mg/kg.

A.II.6.3. Valeurs utilisées pour la population générale

a. Qualité des eaux de consommation

UE : Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Pour l’ensemble des hydrocarbures aromatiques polycycliques la concentration admissible est de 0,1 µg/L

b. Qualité de l’air

Directives de l’OMS (2000) : L’OMS a fixé un risque unitaire pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques de $9 \cdot 10^{-2}$ µg de benzo(a)pyrène par m³. Le cancer du poumon est reconnu comme point d’impact.

A.II.7. Principales méthodes d'analyse des HPA

Les principales méthodes normalisées pour la détection et l'analyse des HPA, notamment le naphthalène sont données sur le tableau A.II.7.

Tableau A.II.7 : Principales méthodes normalisées pour l'analyse de naphthalène et des HPA dans l'environnement

Méthode d'analyse	Application	Appareillage	Limite de Détection
NF ISO 17993 (2002)	Eau	HPLC /fluorescence	0,005 µg/L
NF-X-31-426 (1999)	Sol	CPG/FID	0,1 mg/kg
NF ISO 13877 (1999)	Sol	HPLC/UV	0,1 mg/kg
NF X 43-041 (1998)	Air	CPG/SM	quelques ng/m ³
NIOSH 5506(1998)	Air	HPLC/UV	0.5µg/L
US EPA 8100 (1986)	Eau/Sol	CPG/FID	quelques ppb
US EPA 8310 (1986)	Eau /Déchets	HPLC/UV et ou fluorescence	18 µg/L
US EPA 610 (1986)	Eau	HPLC /UV	1.8 µg/L

A.III. TECHNIQUES DE DEPOLLUTION

Du fait de leur caractère toxique et de leur présence en fortes concentrations dans certains sites pollués, il est important d'éliminer les HAP des milieux contaminés. Différentes solutions ont été proposées à cet effet. Certaines des méthodes présentées ici sont détaillées dans l'étude relatives aux techniques de traitement par voie biologique des sols pollués (Ballerini *et al.*, 1998).

A.III.1. Procédés physiques

De nombreuses techniques de dépollution des sols par traitement physique existent malgré leurs contraintes, leurs spécificités de polluants et de sols.

L'injection d'air ou de vapeur, ou *stripping*, 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 [Costes et Druelle, 1997].

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 [Costes et Druelle, 1997].

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 tel un traitement biologique ou une injection d'air ou de vapeur. Cette méthode a déjà été utilisée sur les HAP [Costes et Druelle, 1997].

La *désorption thermique* se fait sur des sols pollués par des 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 un traitement thermique : injection d'oxygène (1000°C) ou four étanche (600-800°C). Enfin, les gaz d'extraction sont traités.

A.III.2. Procédés chimiques

Ces procédés sont généralement couplés à des procédés physiques. L'*extraction par solvant* 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 [Chu et Kwan, 2003]. 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.

Les procédés chimiques doivent être rigoureusement testés afin de déterminer la quantité de réactif à utiliser, et éviter qu'il se trouve en défaut ou en excès. Il est primordial de bien connaître les propriétés des sols afin d'éviter les risques de réactions secondaires qui mèneraient à la formation de nouveaux polluants.

A.III. 3. Bioremédiation

C'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.

Le traitement en réacteur, ou *bioslurry*, 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 [Ballerini *et al.*, 1998]. En effet, elle

permet un contrôle plus efficace des conditions de la biodégradation (homogénéisation, chauffage, apports de nutriments...) ce qui entraîne une biodégradation accrue.

Le *landfarming* [Harmsen, 1991] 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. Le traitement biologique par aération du sol ou *bioventing*, fournit aux microorganismes présents dans le sol l'oxygène nécessaire à la biodégradation par injection d'air [Ballerini *et al.*, 1998]. 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.

La *phytoremédiation* 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 microbiologique de la rhizosphère dans le sol. La rhizosphère est particulièrement impliquée dans la dégradation des HAP [Newman et Reynolds, 2004]. Dans ce cas, l'apport de la phytoremédiation devient difficile à étudier du fait des interactions entre sol, plantes, rhizosphère et micro-organismes.

A.IV. BIODEGRADATION DU NAPHTALENE ET DES HPA

Les résultats des essais standards pour déterminer la biodégradabilité inhérente ont été négatifs (2 % de dégradation après 28 j, méthode OCDE 302 C) [CITI, 1992]. Cependant, de nombreux essais non normalisés suggèrent que la substance est rapidement dégradée dans des conditions aérobies et dénitrifiantes, en particulier lorsque des micro-organismes adaptés sont utilisés, avec les concentrations de naphthalène tombant à des concentrations non mesurables après 8 à 12 jours dans certains essais [Delfino et Miles, 1985 ; Nielsen et Christensen, 1994 ; Bauer et Capone, 1985]. Dans l'eau de surface, une demi-vie de 150 jours est proposée par la Commission Européenne [CE, 1996].

D'autres essais menés en bioréacteur démontrent la possibilité de la dégradation biologique par des bactéries indigènes [Lauzon F, 1997].

La plupart des expériences ont été réalisées avec des cultures pures issues d'enrichissement à partir de sols, de sédiments ou d'eaux naturelles. Les références de quelques travaux de recherches de biodégradation de HPA effectuées sur différentes souches bactériennes, principalement les *Pseudomonas*, isolées sont illustrés au tableau A.IV.

Tableau A. IV. Principales souches bactériennes aérobies participant à la dégradation des HAPs.

Composé	Microorganisme	Référence
Naphtalène	<i>Pseudomonas sp.</i>	Eaton & Chapman (1992)
	<i>Mycobacterium sp</i>	Kelley et al.(1990)
	<i>Rhodococcus sp.</i>	Grund et al. (1992)
Fluorène	<i>Pseudomonas sp.</i>	Selifonov et al. (1993)
Anthracene	<i>Rhodococcus sp.</i>	Walter et al. (1991)
Phenanthrène	<i>Pseudomonas sp.</i>	Mueller et al. (1990)
Floranthène	<i>Pseudomonas Paucimobilis</i>	

A.IV.1. Mécanismes de biodégradation oxydative (Aérobie) du naphtalène et des HPA par les bactéries

Certaines bactéries sont capables d'utiliser les HAP comme unique source de carbone et d'énergie [Churchill *et al.*, 1999, Dean-Ross et Cerniglia, 1996, Demanèche *et al.*, 2004]. L'étude de la biodégradation des HAP par des souches bactériennes isolées à partir de sols contaminés a permis d'établir des voies métaboliques de dégradation, d'analyser l'organisation et la régulation des gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans la dégradation [Armengaud *et al.*, 1998, 2000] ainsi que d'identifier et caractériser ces enzymes [Carredano *et al.*, 2000, Ensley et Gibson, 1983]. Ces informations sont essentielles avant de se pencher sur ce qui se passe dans les sols contaminés.

On distingue la dégradation des HAP de « faible poids moléculaire », avec 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'informations sont disponibles sur les enzymes de dégradation des HAP de haut poids moléculaire. De plus, les bactéries isolées pour leur aptitude à dégrader les HAP de faible poids moléculaire sont souvent incapables de dégrader les HAP de plus de 3 noyaux aromatiques et réciproquement. La biodégradation des HAP est aussi affectée par leur solubilité [Whitman *et al.*, 1998].

A.IV.1.1. Mécanisme de biodégradation de naphthalène

La structure et les propriétés physico-chimiques du naphthalène composé à deux cycles aromatiques fusionnés et confèrent à celui-ci une position modèle pour la compréhension et l'étude des propriétés écologiques des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA).

Ainsi, les voies métaboliques de dégradation par des souches de *Pseudomonas sp.* ont été les premières ayant été étudiées et sont donc très connues [Sutherland et al., 1995]. Les figures V.1.1 a et b montrent les voies métaboliques de dégradation du naphthalène par *Acinetobacter calcoaceticus* et *Pseudomonas sp.*. La première étape de la dégradation aérobie fait intervenir une dioxygénase qui oxyde l'un des cycles benzéniques pour former un cis-dihydrodiol [Cerniglia, 1992]. Les dihydrodiols sont ensuite transformés en biphenols, lesquels sont attaqués par d'autres dioxygénases ; C'est ainsi que tous les cycles sont dissociés et dégradés les uns après les autres pour conduire à des intermédiaires à simple cycle, comme l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide phthalique ou le catéchol .

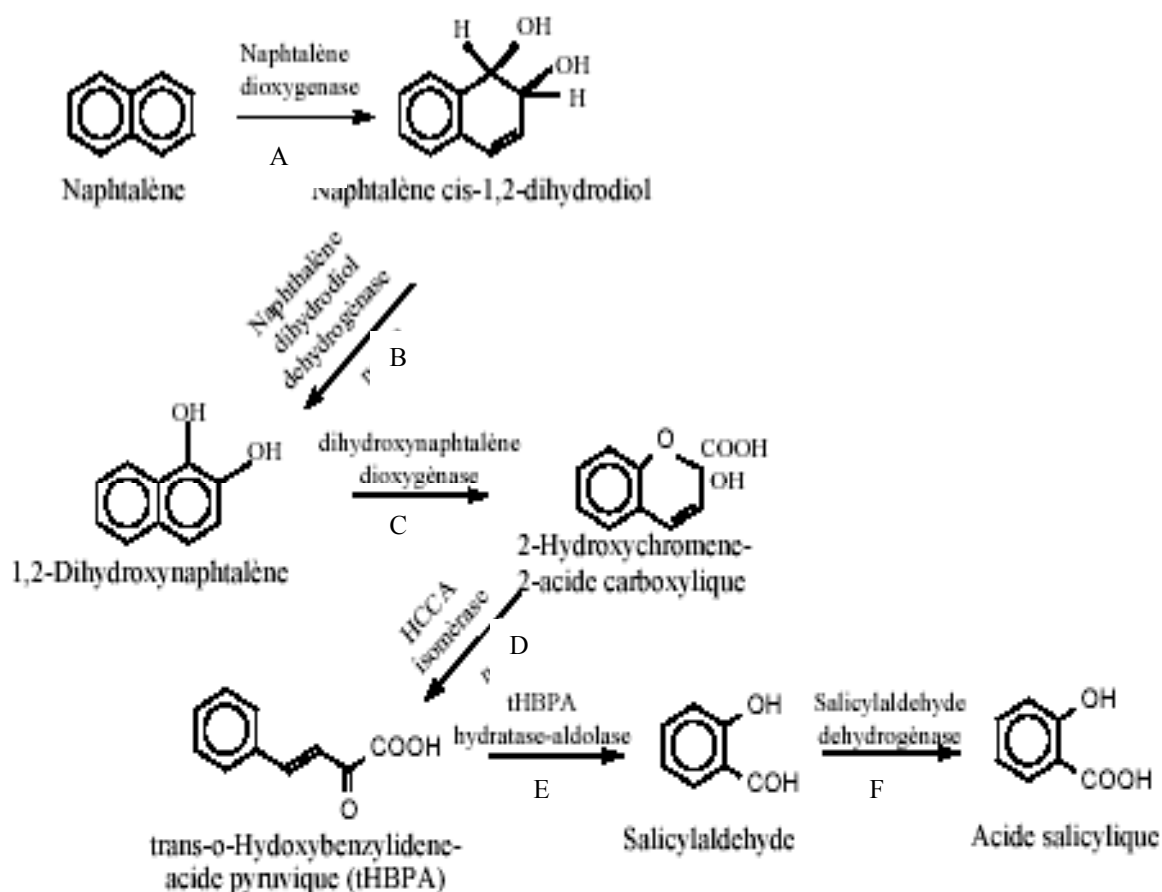


Figure A.IV.1.1.a : La voie métabolique de dégradation du naphthalène par *Pseudomonas sp* et *Acinetobacter calcoaceticus* (Sutherland et al., 1995).

La dégradation du naphthalène, HAP à 2 cycles accolés, est l'une des plus étudiée. De nombreuses souches ont été identifiées pour leur capacité à croître sur naphthalène comme seule source de carbone. C'est ainsi que des souches de *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas* et *Rhodococcus* ont été isolées [Grund *et al.*, 1992]. La voie de dégradation du naphthalène a beaucoup été étudiée, notamment chez les espèces du genre *Pseudomonas* [Yen et Serdar, 1988]. Le naphthalène est métabolisé en acide salicylique, lequel est converti en catéchol pour la plupart des bactéries. Le catéchol est alors clivé. Deux voies sont possibles : **Voie méta** (le catéchol est clivé en acide semialdéhyde 2-hydroxyomuconique) ou la **voie ortho** (le catéchol est clivé en acide cis, cis-omuconique). D'autres bactéries convertissent le salicylate en acide gentisique (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) [Grund *et al.*, 1992].

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 [Ensley et Gibson, 1983]. La structure tridimensionnelle de la naphthalène dioxygénase de *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 a été établie (Kauppi *et al.*, 1998). 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 [Resnick et Gibson, 1996]. 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 catéchol via l'intermédiaire le salicylate (par une déshydrogénase), qui sera ensuite métabolisé en composés alimentant le cycle acide tricarboxylique (TCA) (figure A.IV.1.1.c), l'un des cycles vitaux de la bactérie.

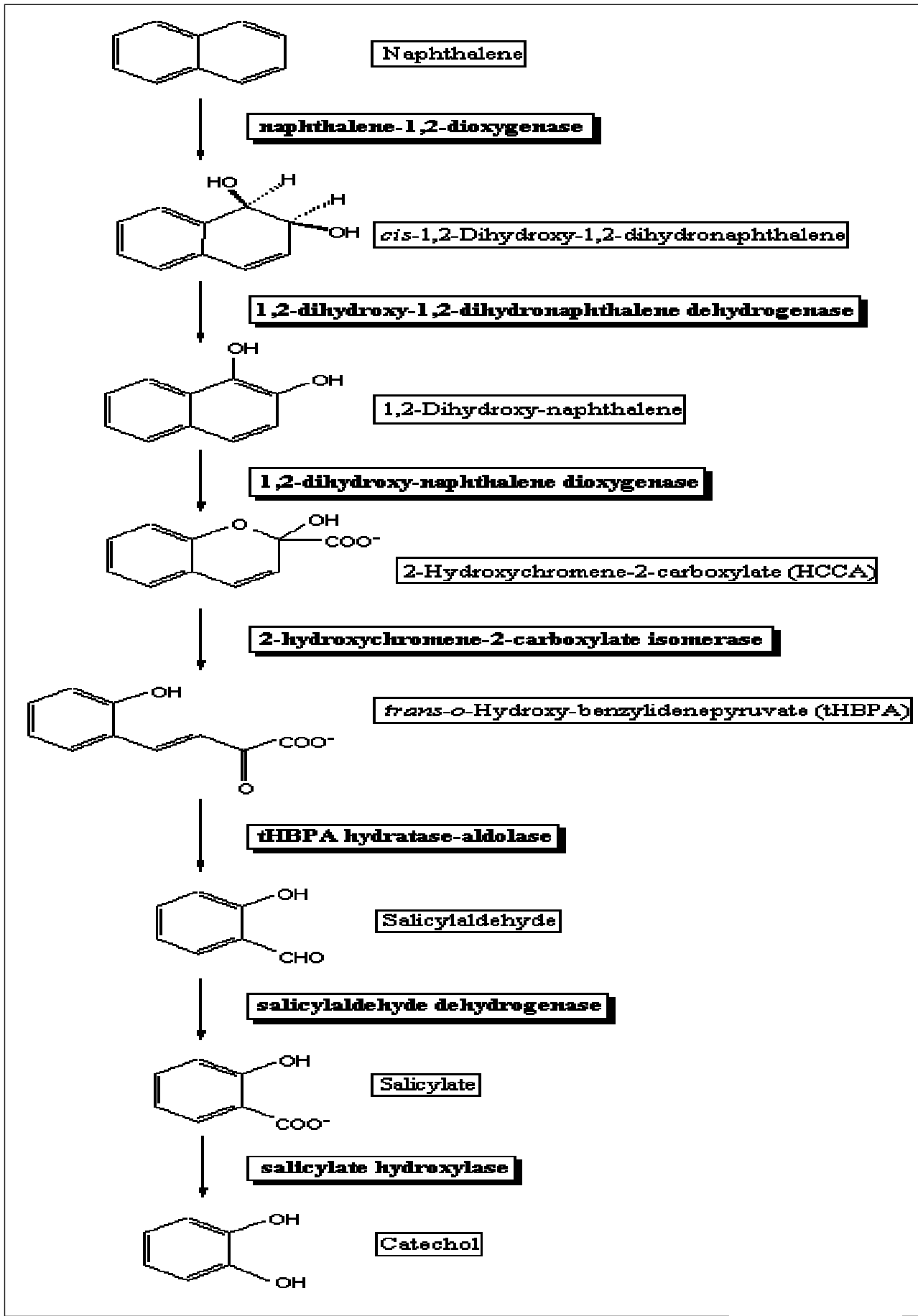


Figure A.IV.1.1. b : Chemin métabolique de la biodégradation aérobie du naphthalène par *Pseudomonas* sp. [Eaton et Chapman, 1992]

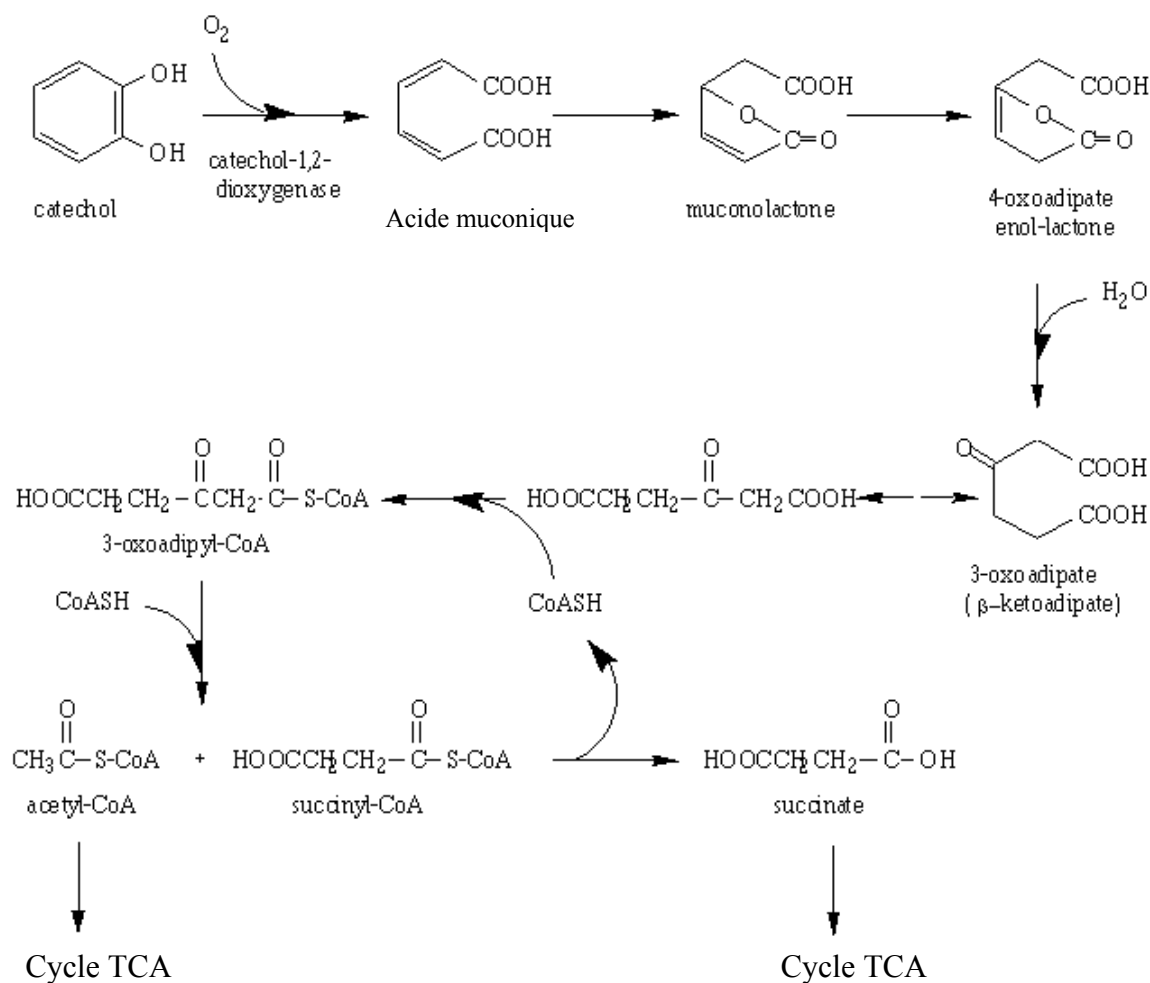


Figure A.IV.1.1.c : Chemin de métabolisme du catéchol issu de la dégradation aérobie du naphthalène par *Pseudomonas* sp.

A.IV.1.2. Mécanisme de biodégradation du phénanthrène

De nombreuses espèces Gram- et Gram+ ont été décrites pour leur aptitude à croître sur phénanthrène [Kang *et al.*, 2003, Moody *et al.*, 2001]. Les nombreuses bactéries capables de dégrader le naphthalène sont également capables de dégrader le phénanthrène, et dans ce cas les mêmes enzymes catalysent l'oxydation des deux substrats [Parales *et al.*, 2000].

La voie métabolique de dégradation du phénanthrène est présentée en figure A.IV.1.2.a.

Deux voies sont possibles pour la dégradation du phénanthrène, selon les bactéries :

Dans une première, l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque est oxydé en 1,2-dihydroxynaphtalène. Cette voie, propre aux bactéries Gram(-) comme celles du genre *Pseudomonas*, rejoint la voie de dégradation du naphthalène.

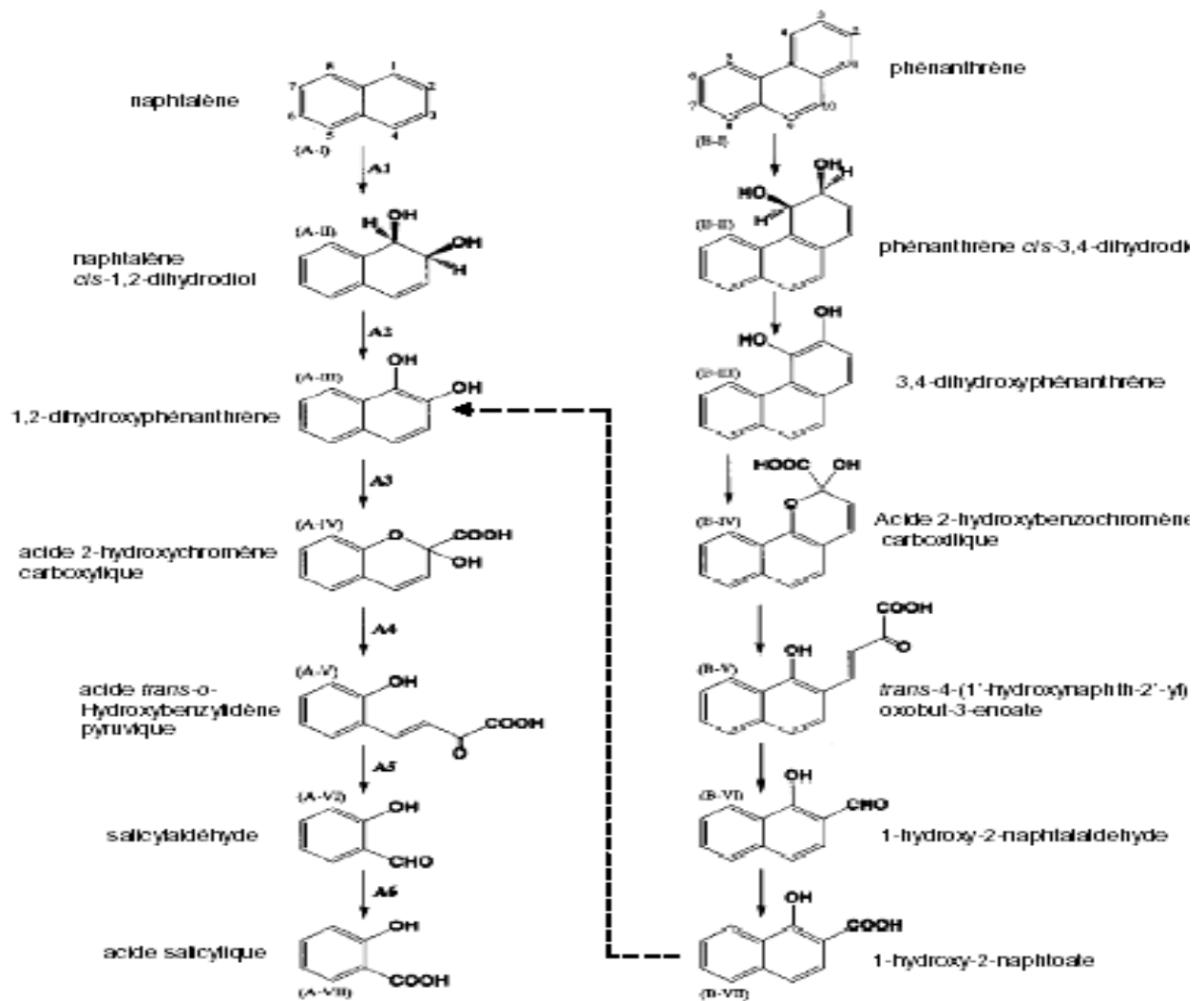


Figure A.IV.1.2.a – voies cataboliques proposées pour le naphthalène et le phénanthrène par des bactéries aérobies du genre *Pseudomonas*. Les enzymes impliquées sont :A1 naphthalène dioxygénase, A2 déshydrogénase, A3 extradiol dioxygénase, A4 isomérase, A5 aldolase, A6 salicylaldéhyde déshydrogénase. Les mêmes enzymes catalysent les réactions homologues de la voie de dégradation du phénanthrène. Le 1-hydroxy-2-naphtoate rejoint la voie du naphthalène par l'action d'une hydroxylase.

Dans l'autre voie de dégradation du phénanthrène, l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque est oxydé en acide 2'-carboxybenzalpyruvique par une dioxygénase [Moody *et al.*,2001]. Cette voie est observée chez des bactéries Gram+ telles que *Mycobacterium*, *Nocardioïdes* ou *Aeromonas* [Moody *et al.*, 2001]. L'acide 2'-carboxybenzalpyruvique est transformé en 2-carboxybenzaldéhyde et pyruvate par une 2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase. Une deshydrogénase forme alors du phthalate à partir de ce dernier intermédiaire. La voie de dégradation du phthalate conduit alors à la transformation de celui-ci en 3,4-dihydroxybenzoate (figure IV.1.2.b) [Barnsley, 1983].

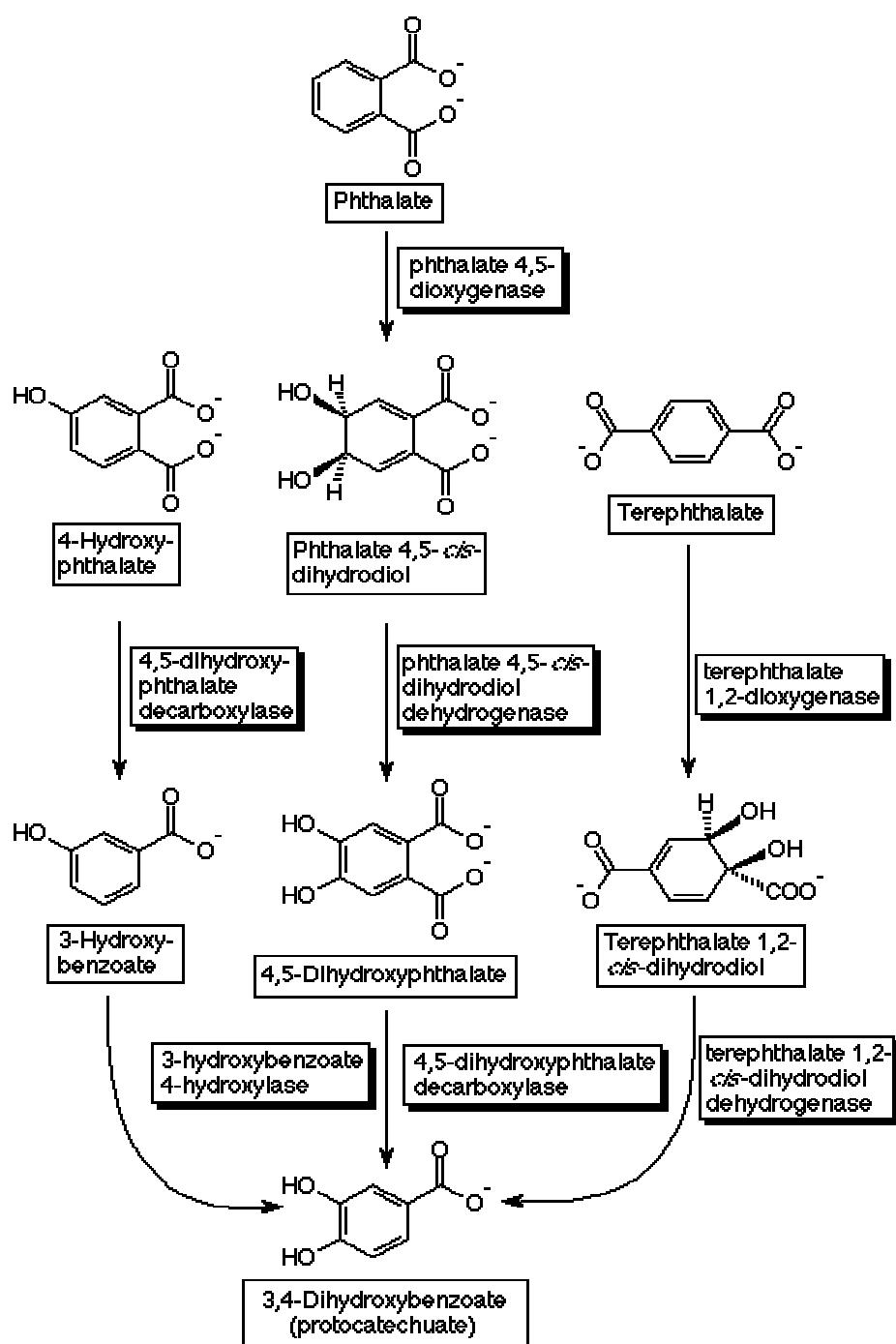


Figure A.IV.1.2.b : Voie de dégradation du phthalate chez les bactéries du genre *Pseudomonas*

A.IV.1.3. Dégradation des HAP à 4 noyaux aromatiques ou plus : cas du pyrène

Alors que les HAP de 2 à 3 noyaux aromatiques sont relativement bien dégradés par des bactéries, les HAP de haut poids moléculaire sont beaucoup plus récalcitrants à la biodégradation [Cerniglia, 1992, Wilson et Jones, 1993]. La plupart des bactéries identifiées pour leur capacité de dégradation du pyrène sont des actinomycètes des genres

Mycobacterium [Boldrin *et al.*, 1993, Schneider *et al.*, 1996], *Rhodococcus* [Bouchez *et al.*, 1995]. Des espèces Gram – ont également été identifiées, comme *Pseudomonas fluorescens* [Boonchan *et al.*, 1998].

A.IV.2. Biodégradation anaérobie des HAPs

La biodégradation des HAPs 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.

A.IV.2.1 Conditions dénitrifiantes

Mihelcic et Luthy, [1988] ont mis en évidence la dégradation du naphthalène et de l'acénaphthène, sous des conditions dénitrifiantes en aquifères et sols pollués. La minéralisation a été confirmée par la production de CO₂ à partir de C-naphthalène par analyse du carbone C14 : près de 90% des HAPs peuvent être minéralisés en CO₂, mais aucune donnée n'existe sur les intermédiaires [Holliger et Zehnder, 1996]. Des études plus récentes ont confirmé que les HAPs peuvent se dégrader en absence d'oxygène, si les nitrates sont disponibles comme accepteur d'électrons [Coates *et al.*, 1996 ; Coates *et al.*, 1997 ; Rockne et Strand, 1998 ; Rockne et Strand, 2001]. Ainsi, les conditions de réduction des nitrates paraissent favorables à la dégradation des HAPs.

A.IV.2.2 Conditions sulfato-réductrices

Plus récemment, la dégradation des HAPs sous conditions sulfato-réductrices a été démontrée [Bedessem *et al.*, 1997 ; Coates *et al.*, 1996, 1997 ; Zhang et Young, 1997]. Ces auteurs ont montré une biodégradation significative du naphthalène, du phénanthrène et du fluoranthène dans le cas des sédiments marins contaminés. Les études de Chang *et al.* [2001] 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 [Zhang et Young, 1997]. Les auteurs ont travaillé sur la biodégradation du naphthalène et du phénanthrène sous des conditions sulfato-réductrices.

Les intermédiaires identifiés sont : l'acide 2-naphtoique et l'acide phénantroïque. L'étape initiale de dégradation correspondant à l'incorporation d'un groupe chimique réactif par carboxylation (figure IV.2.2.a) ou par scission d'une molécule d'eau (hydroxylation).

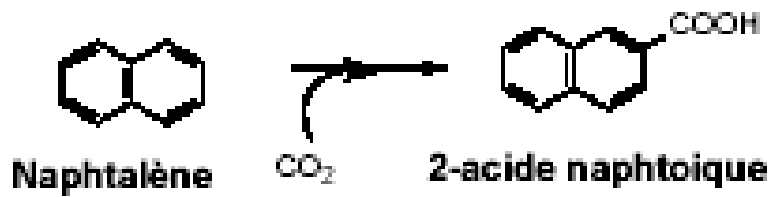


Figure A.IV.2.2.a : Activation de la réaction de dégradation anaérobie du naphtalène par l'addition du CO_2 (Meckenstock et al., 2000).

Le cycle non substitué est alors à son tour réduit avec des hydrogénations successives permettant d'obtenir un carboxylate, qui est minéralisé [Zhang et al., 2000 ; Meckenstock et al., 2000 ; Annweiler et al., 2000 ; Morasch et al., 2000]. La figure V.2.2.b montre la voie réductrice de la biodégradation du naphtalène avec les intermédiaires suivants : l'acide 2-naphtoiue, le 1,2,3,4-tetrahydro-acide-2-naphtoiue, le 5,6,7,8-tetrahydro-2-acide naphtoiue, l'hexahydro-2-acide naphtoiue, l'octahydro-2-acide-naphtoiue et le decahydro-2-acide naphtoiue.

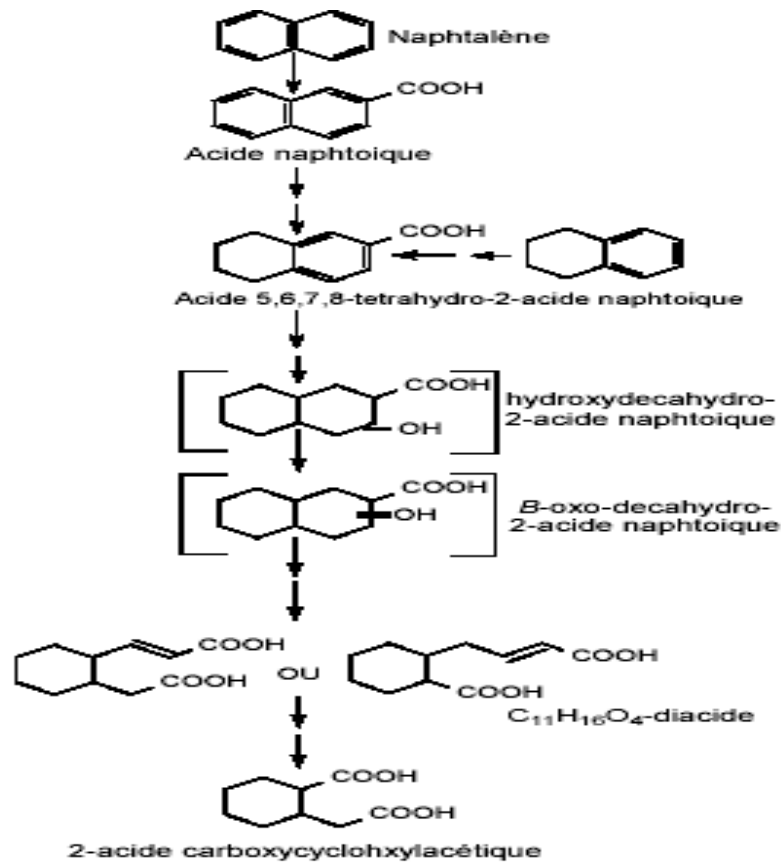


Figure A.IV.2.2.b. : Voie réductrice proposée de la biodégradation anaérobie du naphtalène [Annweiler et al.,2002].

Les connaissances acquises sur la biodégradation anaérobie des HAPs ont montré que les microorganismes de dégradation peuvent utiliser le naphthalène et le phénanthrène comme seule source de carbone sous conditions sulfato-réductrices ou nitrate-réductrices. Le cas des HAPs, avec trois ou plusieurs cycles, est moins clair, soit ils sont utilisés comme seule source de croissance, soit ils sont cométabolisés [Meckenstock et al., 2004].

A.IV.3. Les dioxygénases, enzyme clé de la biodégradation aérobie du naphthalène

L'enzyme Naphtalene-dioxygenase est le promoteur du mécanisme initiant le métabolisme de dégradation de naphthalène. Le chemin métabolique du naphthalène par certains microorganismes, notamment les *Pseudomonas sp.*, les composés clés dans le chemin métabolique sont l'acide salicylique et le catéchol [Shamsuzzaman et Barnsley, 1974]. Cet enzyme est induite par le naphthalène, l'acide salicylique et le catéchol [Barnsley 1976].

La dégradation est rendue possible par deux étapes clés qui consistent en l'incorporation d'oxygène dans le noyau aromatique, permettant (i) l'activation et (ii) la fission du cycle aromatique. Ces deux opérations sont catalysées par des enzymes de type dioxygénase. Il existe deux type de dioxygénases : (i) celles qui hydroxylent le noyau aromatique et (ii) celles qui clivent le noyau aromatique [Butler et Mason, 1997].

i. Les dioxygénases qui hydroxylent le noyau aromatique

Ce type d'enzyme est également appelé hydroxylase. Il a été décrit pour la première fois par Gibson dans le cas de l'oxydation du benzène par *Pseudomonas putida* [Gibson *et al.*, 1968].

ii. Les dioxygénases qui clivent le noyau aromatique

Ces enzymes sont classées selon le mode de fission du noyau aromatique qu'elles catalysent : intradiol dioxygénase lorsque la fission se fait en *ortho* (clivage entre les carbones porteurs des groupements hydroxyles) ou extradiol dioxygénase pour une fission en *meta* (clivage entre les deux carbones adjacents au diol) (figure A.IV.3).

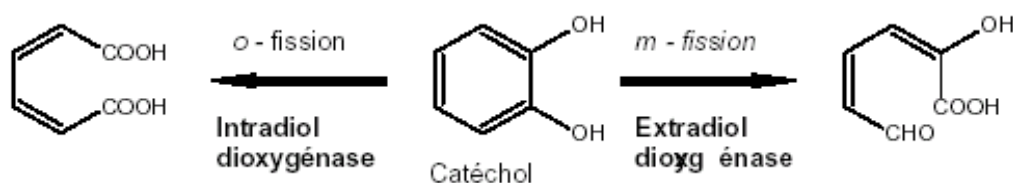


Figure A.IV.3 : Les deux modes de clivage du noyau aromatique par les catéchol dioxygénases : *o*-fission pour fission en *ortho* ; *m*-fission pour fission en *meta*

A.V. GENERALITES SUR L'IMMOBILISATION DES CELLULES

Introduction

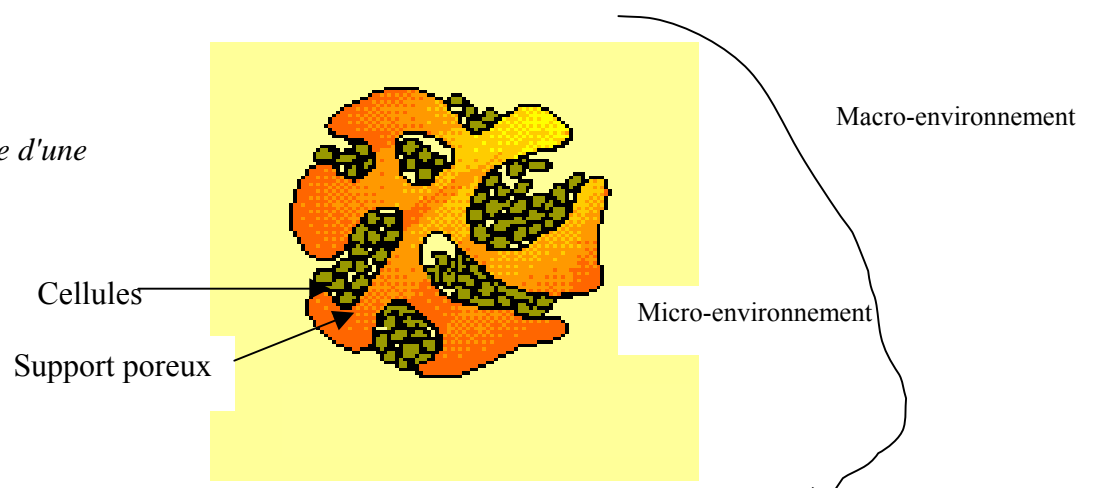
Au cours des vingt dernières années, de nouvelles technologies mettant en œuvre l'immobilisation d'enzymes et de cellules vivantes ont été développées dans les différents secteurs des bio-industries [Durand et Monsan, 1974 ; Chibata 1978 ; Fukui et Tanaka 1982]. Ce sont d'abord les enzymes qui ont été immobilisées dans des supports pour transformer des biomolécules. La technologie des cellules immobilisées (ICT) n'est pas récente. C'est un procédé traditionnel utilisé, par exemple, dans la production du vinaigre par des bactéries acétiques, immobilisées sur des copeaux de bois [Ramakrishna et Prakasham, 1999] ou dans la production du Kéfir avec des levures co-immobilisées avec des bactéries lactiques [Champagne *et al.*, 1994]. Ensuite plusieurs procédés de fermentation et de bioconversion sont maintenant effectués dans des réacteurs à microorganismes fixés.

A.V.1 Définition

L'immobilisation est un procédé de fixation d'une enzyme ou d'une cellule dans une phase distincte de celle où se trouve le substrat. L'immobilisation cellulaire consiste à retenir et localiser des cellules microbiennes dans un espace précis du système de fermentation afin d'obtenir de hautes densités de biomasse active [Karel *et al.*, 1985].

L'enzyme ou la cellule est immobilisée à la surface ou à l'intérieur d'un polymère ou d'une matrice qui peut être sous forme de particules, film ou membrane. Elle peut être piégée dans le polymère, ou adsorbée à la surface ; elle peut aussi faire partie d'une structure membranaire . Les cellules immobilisées ne sont pas totalement immobiles. Un équilibre dynamique est établi entre le matériel biologique encapsulé et le nouveau micro-environnement créé (figure A.V.1) [Willaert *et al.*, 1996]

Figure (A.V.1): Structure d'une cellule immobilisée.



A.V.2 Applications industrielles

Les principales applications industrielles des techniques à enzymes et cellules fixées sont indiquées dans le tableau A.V.2 :

Tableau A.V.2 : Applications industrielles des enzymes et des cellules immobilisées.

Enzyme immobilisées	Micro-organismes immobilisés	Cellule animale immobilisées
<ul style="list-style-type: none"> – Isomérisation du glucose. – Production d'acide 6-aminopénicillanique. – Hydrolyse du lactose. – Synthèse d'acides aminés : lysine, alanine. – Séparation des formes D et L d'acides aminés. – Hydrolyse de polysaccharides et de protéines. – Production d'acrylamides 	<ul style="list-style-type: none"> – Traitement des eaux et d'effluents, fibres bactériens, dénitrification, méthanisation. – Synthèse d'acides aminés : aspartate, alanine, phényl-alanine, tryptophane. – Production d'éthanol. – Synthèse d'hydroxyphénylglycine. – Isomérisation du glucose. 	<ul style="list-style-type: none"> – Production de vaccin. – Production d'anticorps monoclonaux. – Production d'hormones.

A.V.3 Avantages et inconvénients de l'immobilisation

L'essor de ces nouvelles techniques de biocatalyseurs fixés est évidemment lié aux avantages qu'elles amènent par rapport aux techniques à cellules libres (Tableau A.V.3) L'immobilisation des cellules de microorganismes dans un réacteur permet de les réutiliser aussi longtemps qu'elles conservent leur activité. Un second avantage majeur de ces techniques est d'augmenter, de façon considérable, la productivité des bioréacteurs. En effet, dans ces réacteurs, il est généralement possible d'atteindre des concentrations de cellules très élevées, avec pour conséquences des volumes de réacteurs ou des temps de séjour fortement réduits. Un troisième intérêt de la fixation des cellules est la possibilité de stabiliser l'activité du biocatalyseur [D'Angio et al., 1994; Huang et al., 1996]. Ainsi la fixation peut accroître la résistance de ce biocatalyseur à la dénaturation thermique ou aux solvants organiques. D'autre part, les limitations diffusionnelles créées par l'inclusion de cellules dans des gels ou des polymères permet la protection des cellules contre les concentrations inhibitrices de certains substrats dans le milieu, lorsque celles-ci sont élevées, et la durée de vie de fermenteurs sera donc plus longue. Certains réacteurs à cellules fixées peuvent fonctionner en continu pendant plusieurs mois [Hamilton et al., 1985]. L'immobilisation ou la fixation de cellules facilite aussi la mise en continu de procédés de fermentation ou de cultures cellulaires, en particulier dans le cas de l'utilisation de cellules non proliférantes. Si en fermentation classique on veut

utiliser des cellules pour la production en continu de métabolites, à cause de la sortie continue des cellules dans l'effluent il est indispensable de maintenir une croissance cellulaire minimale à l'intérieur du réacteur. Or les conditions optimales de production de métabolites sont rarement compatibles avec une croissance cellulaire, ce qui peut rendre très problématique l'obtention d'une productivité et d'une stabilité convenable pour la fermentation continue. En revanche, avec un procédé à cellules immobilisées, il est possible de complètement dissocier les processus de croissance et d'excrétion de métabolites. Après une première phase de production intense des cellules on peut optimiser le milieu pour favoriser la production en continu de métabolites, tout en ralentissant fortement ou même en arrêtant la croissance cellulaire.

Un dernier avantage potentiel de l'immobilisation de biocatalyseurs concerne la pureté des produits. La fixation sur un support laisse un produit sans contenu résiduel. Avec l'immobilisation de cellules, le milieu de fermentation sortant du réacteur ne contient généralement que des quantités réduites de cellules, et les étapes en aval de séparation sont plus aisées.

Si l'immobilisation des biocatalyseurs est susceptible d'apporter de nombreuses améliorations par rapport aux procédés biotechnologiques plus traditionnels, elle peut aussi introduire des contraintes supplémentaires (tableau V.3) :

- 1- Un premier problème est celui de la stérilité. Or, dans un environnement industriel le maintien de la stérilité de réacteurs à cellules immobilisées pendant des périodes prolongées de fonctionnement en continu ne peut être facilement assuré.
- 2- L'utilisation de supports solides ou membranes pour l'immobilisation introduit de nouvelles résistances dans le transfert des nutriments et des produits. Ce problème est particulièrement aigu avec les procédés aérobies pour lesquels la diffusion de l'oxygène devient rapidement limitante, avec pour conséquence des chutes de productivité et de rendement.
- 3- Une baisse ou une modification des activités du biocatalyseur, avec éventuellement des modifications dans la qualité des produits.
- 4- L'emprisonnement du gaz carbonique dégagé par les cellules dans le garnissage du réacteur peut aussi en réduire la productivité.

Tableau V.3 : Avantages et inconvénients des procédés à cellules immobilisées

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

A.V.4. Méthodes d'immobilisation

A l'échelle de l'installation pilote du laboratoire ou de l'unité industrielle, plusieurs méthodes d'immobilisation sont actuellement utilisées pour la mise en œuvre de cellules ou d'enzymes immobilisées. Deux grands groupes de méthodes d'immobilisation sont utilisables (voir figure A.V.4.) :

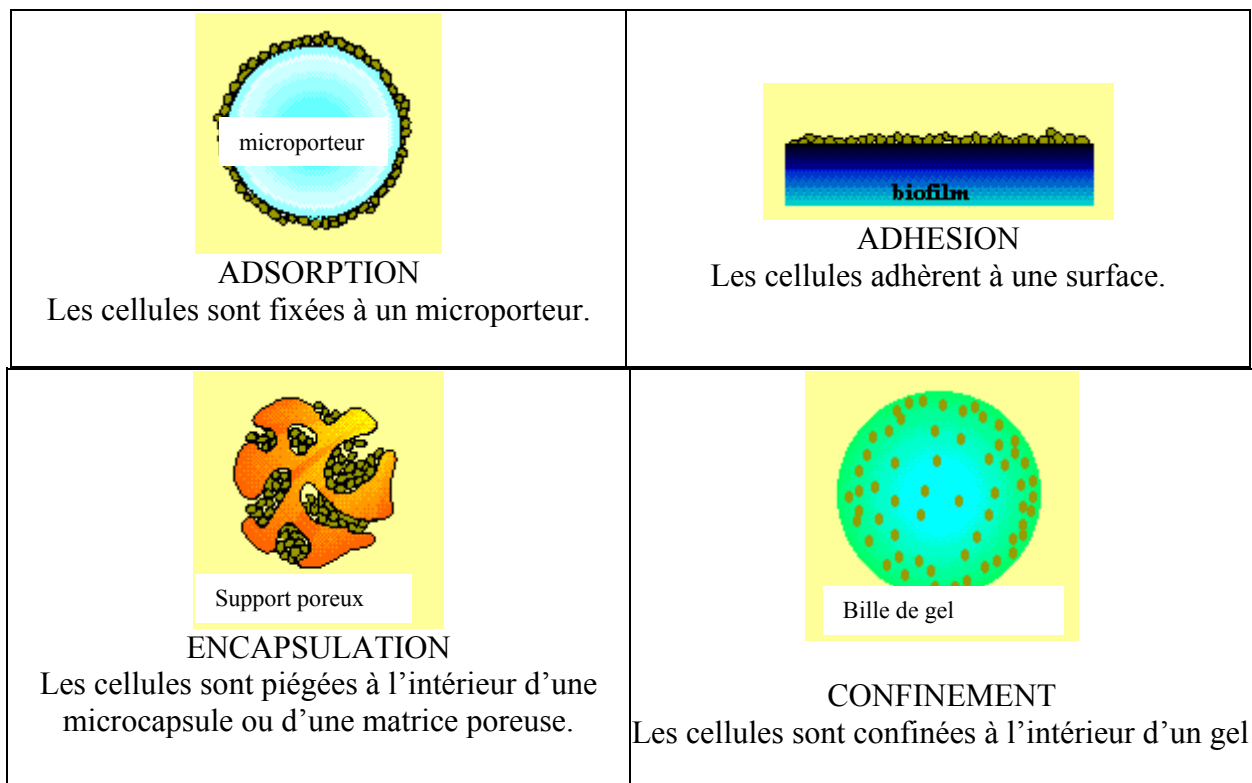
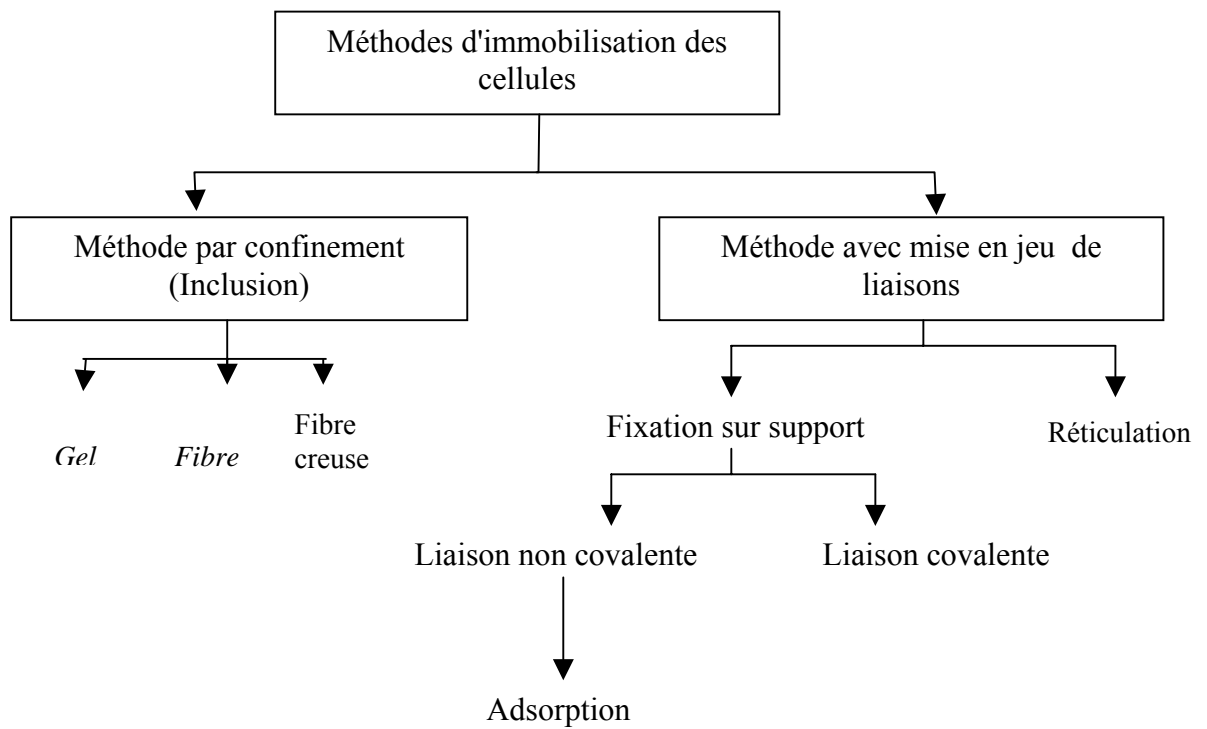


Figure (A.V.4) : Différentes Méthodes d'immobilisation.

A.V.4.1. Méthodes par confinement (inclusion)

L'immobilisation des cellules par inclusion consiste à retenir une cellule à l'intérieur d'une trame solide (gel, fibres, fibres creuses). Différentes techniques peuvent être utilisées :

a) Confinement dans un gel

C'est la méthode la plus utilisée. Plusieurs gels sont utilisables mais le plus employé est le gel polyacrylamide, d'autres gels naturels sont aussi utilisés comme les polysaccharides naturels extraits d'algues tels que κ -carageenan et les alginates. La simplicité de mise en œuvre de ces polysaccharides rend leur utilisation fréquente. Le support est formé lors du contact entre le mélange (suspension cellulaire – polysaccharide ou monomère) avec une solution saline (en général de cations mono ou divalents tels que CaCl_2 ou KCl), (figure A.V.4.1)

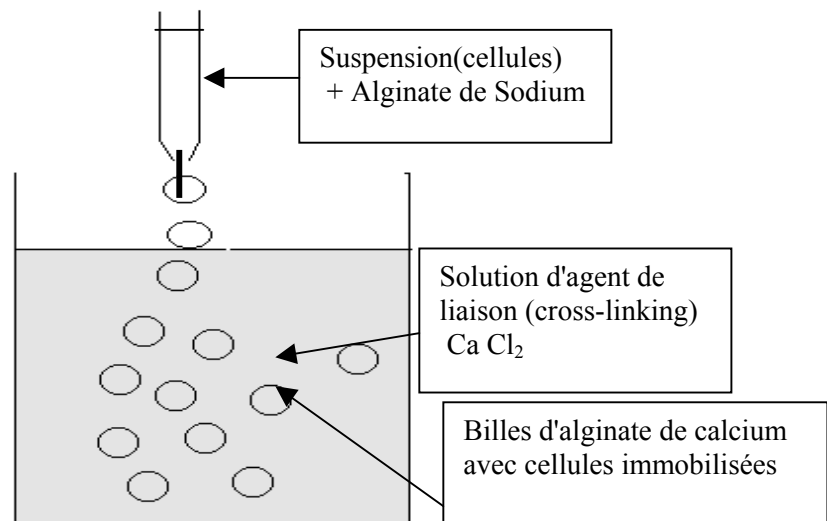


Figure (V.4.1): immobilisation de cellules dans l'alginate de calcium

b) Confinement dans des fibres

La cellule est immobilisée sous forme d'émulsion emprisonnée dans des fibres creuses ou des fibres obtenues par coagulation d'un polymère en solution.

Les supports polymériques les plus utilisés sont :

- Les polyacétates de cellulose en solution dans le chlorure de méthylène avec comme agent coagulant le toluène.
- La nitrocellulose, en général dans un mélange d'acétate de butyle et de toluène avec comme agent coagulant l'éther de pétrole.

- L'ethylcellulose en solution dans le toluène avec comme agent coagulant l'éther de pétrole, etc.

A.V.4.2 Méthodes avec mise en jeu de liaisons

A l'opposé des méthodes par confinement, l'immobilisation est due ici à la formation de liaisons fixant les molécules d'enzymes ou de cellules :

- Soit à un support insoluble.
- Soit à d'autres molécules d'enzymes ou de cellules, de manière à former un réseau insoluble.

Deux types de méthodes sont distingués :

- Les méthodes avec fixation sur support.
- Les méthodes par réticulation.

A.V.4.2.a . Méthodes avec fixation sur support

Les liaisons créées entre la cellules et l'enzyme peuvent être covalentes ou non covalentes :

1) Fixation non covalente sur support (fixation par adsorption)

Ce type de fixation est également improprement appelé « fixation par adsorption » dans des ouvrages s'inspirant de la technologie anglo-saxonne ; le terme « adsorption » est alors employé dans un sens élargi. Il s'agit alors de la fixation de l'enzyme sur la surface d'un support insoluble par l'établissement d'interactions faiblement énergétiques telles que les:

- Interactions Van der Waals.
- Interactions hydrophobes.
- Liaisons hydrogène.
- Liaisons ioniques.

La fixation peut être réalisée sur support plein ou sur support poreux, il y a alors un problème de diffusion de la cellule ou de l'enzyme à l'intérieur du support lors de l'immobilisation et de diffusion de substrat jusqu'à la cellule ou l'enzyme lors de l'utilisation.

2) Fixation par liaison covalente sur support

La mise en place d'une liaison covalente est réalisé entre la protéine enzymatiques ou cellulaire et le support insoluble ou non, dans des conditions compatibles avec la conservation de l'activité cellulaire ou enzymatique. La plupart des très nombreux supports utilisés ne

présentent pas de groupements fonctionnels suffisamment réactifs pour former une liaison covalente.

Il faut activer les groupements existants. De plus on cherche parfois à fixer la cellule ou l'enzyme à une certaine distance du support grâce à un bras constitué d'une chaîne hydrocarbonée de quelques atomes de carbone. L'immobilisation est plus délicate que pour les autres méthodes du fait d'un plus grand nombre d'étapes et de l'emploi de réactifs chimiques forcément toujours dénaturants.

A.V.4.2.b. Méthode par réticulation

Il est possible d'immobiliser les molécules de cellules ou d'enzymes sans utiliser de support solide pré existant. Cette méthode est basée sur la formation de liaisons covalentes entre les molécules de cellule ou d'enzyme, au moyen de réactifs bi- ou multi-fonctionnels. Un réseau se forme aboutissant à des agrégats tridimensionnels complètement insolubles sans avoir recours à un support extérieur. On ajoute une quantité appropriée d'agent réticulant à une solution contenant des cellules ou enzymes dans des conditions optimales déterminées pour chaque système par essai et erreur et permettant d'obtenir un maximum d'insolubilité associé à un maximum de rétention d'activité. La réticulation peut également être réalisée en présence d'une protéine interne, sorte d'excipient jouant un rôle protecteur.

A.V.5. Choix de la méthode d'immobilisation

Le choix d'une méthode d'immobilisation est une tâche délicate, il n'existe pas de méthode universelle, car le choix dépendra de plusieurs facteurs tel que (tableau V.5) :

1. Des exigences vis-à-vis des propriétés de la cellule ou de l'enzyme (activité, stabilité).
2. De la faisabilité et de l'efficacité (forces des liaisons).
3. Des considérations économiques : prix de revient de l'immobilisation, possibilité de régénérer le support, valeur économique du produit obtenu.

Tableau (A.V.5) : Comparaison des diverses méthodes d'immobilisation selon divers critères.

Caractéristiques	Confinement	Fixation sur support Mise en jeu des liaisons		
		Liaison non covalente	Liaison covalente	Réticulant
Préparation	Difficile	Simple	difficile	Moyenne
Force de liaison	moyenne	Faible à moyenne	forte	Forte
Activité de la cellule	faible	Elevée	élevée	Faible
Régénération	difficile	Possible	impossible	Impossible
Coût	moyen	Faible à moyen	élevé	Moyen
Stabilité	Grande	Faible à moyen	Grande	Grande

A.V.6 Supports d'immobilisation

On distingue deux classes de supports utilisés :

- Les supports organiques synthétiques ou naturels

Exemple: Agarose, Charbon actif, Cellulose et ses dérivés, Collagène, Polymère acryliques, Copolymère, polyamide, polyuréthane.

- Les supports minéraux

Exemple: Silice et verre poreux, Oxydes métalliques(Oxyde de Titans, de Nickel, de Fer...).

A.V.7. Choix du support

Il existe des exigences concernant la nature du support :

- Il ne doit pas être toxique, ni pour l'homme ni pour les micro-organismes.
- Un pourcentage de viabilité et d'activité des cellules doit être supérieur à 80%.
- Le support doit montrer des propriétés physiques et chimiques stables favorisant l'immobilisation. Un support préformé est caractérisé par sa densité, sa taille et sa forme, sa résistance à la friction.
- Sa capacité de rétention des cellules doit être élevée .
- Il doit être stérilisable avec une stabilité mécanique et chimique élevée.
- La méthode d'immobilisation doit être simple dans sa mise en œuvre.
- La forme et la taille de particules d'immobilisation doivent être flexibles.
- La résistance à la diffusion des éléments nutritifs doit être minimale.

A.V.8. Analyse des cellules immobilisées

Des techniques d'analyse du système à cellules immobilisées, idéalement non destructives, sont nécessaires. Il y a actuellement plusieurs techniques biophysiques disponibles et l'instrumentation pour diverses techniques spectroscopique s'améliore constamment. Les mesures d'intérêt dans l'examen des systèmes avec cellules immobilisées sont, par exemple, la concentration des cellules immobilisées pour le suivi des cinétiques de croissance, de consommation de substrat et de formation de produit.

Une caractérisation morphologique et physiologique des cellules immobilisées, de même que leur environnement direct, est aussi d'un grand intérêt. Les méthodes comme la microscopie optique et électronique, le marquage avec des radio-isotopes et l'autoradiographie, la microfluorimétrie, la spectroscopie infra rouge (I-R) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) peuvent être utilisées pour étudier des cellules immobilisées [Doleyres,2003].

A.V.9 Réacteurs à cellules immobilisées

A l'échelle de l'installation pilote de laboratoire ou de l'unité industrielle, plusieurs types de réacteurs sont actuellement utilisés pour la mise en œuvre de cellules immobilisées. Il n'existe pas de réacteurs universel optimal pour toutes les applications. La technique d'immobilisation et le type de réacteur à retenir dépendent de la nature de catalyseurs et du secteur d'application. Interviennent aussi: les contraintes de stérilité ou de qualité des produits et les caractéristiques des matières premières à traiter. C'est finalement la cinétique de la réaction enzymatique ou cellulaire qui détermine la configuration optimale du réacteur à utiliser. La figure A.V.9. illustre schématiquement les différentes configurations de réacteurs à cellules immobilisées [Scriban, 1984].

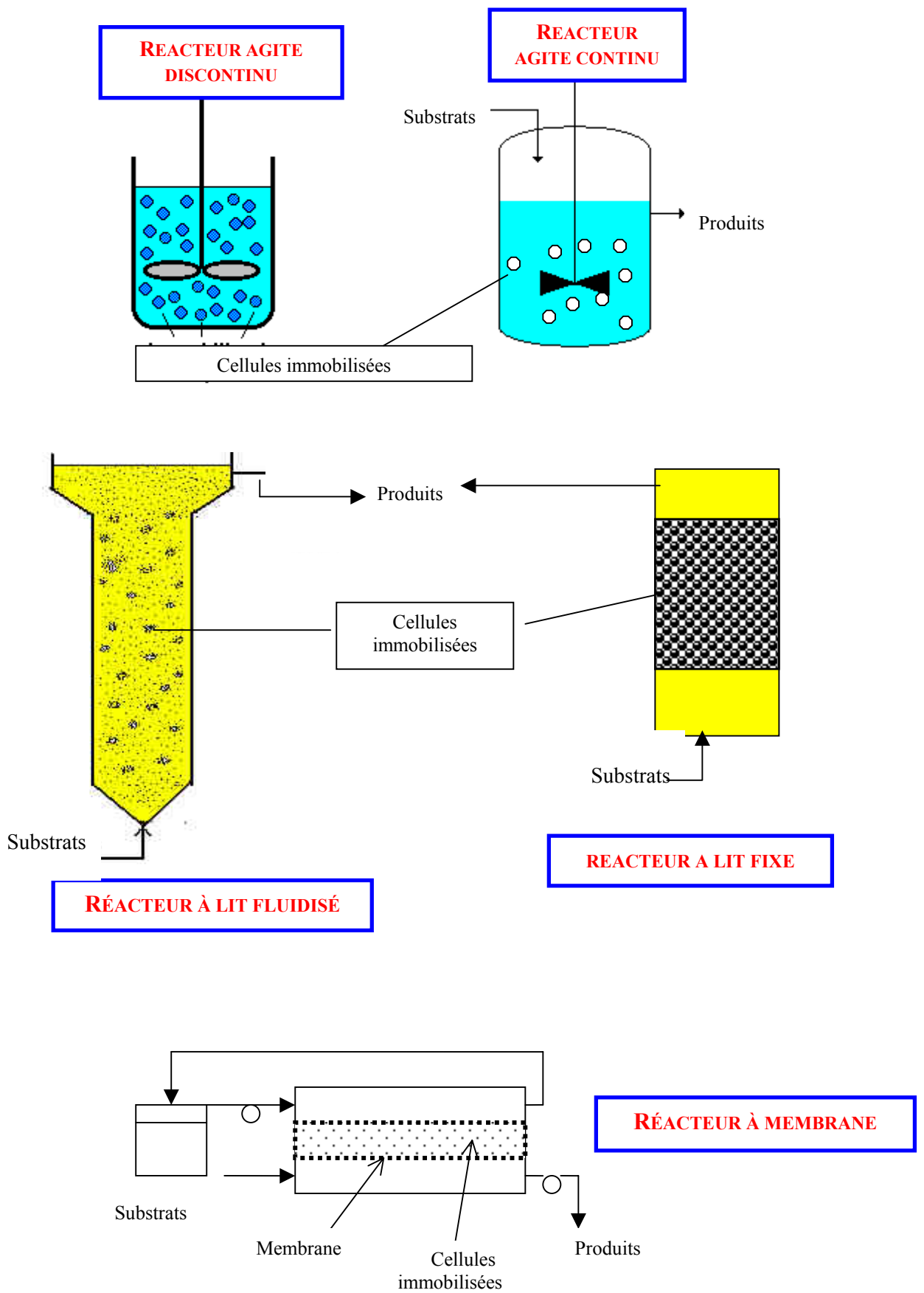


Figure A.V.9 : Différentes configurations de réacteurs à cellules immobilisées

A.V.10. Les limitations diffusionnelles

Lorsqu'un biocatalyseur, soit une enzyme ou une cellule est immobilisée dans ou sur un support, la vitesse de réaction est souvent limitée par des transferts de matière à l'intérieur ou à l'extérieur de ce support. En effet, le processus global de la transformation du substrat met en jeu plusieurs étapes :

- Le transport du ou des substrats de la solution jusqu'au niveau du catalyseur ;
- La transformation des substrats en produits au niveau du catalyseur ;
- Le transport en sens inverse du ou des produits du catalyseur jusque dans la solution.

Avec les cellules immobilisées, les étapes de transfert des substrats ou des produits peuvent aussi être limitantes. Ceci résulte à la fois des fortes concentrations locales (microenvironnement) de biocatalyseurs et des vitesses relativement faibles de transport des différents composés dans les solides. Ainsi, avec des supports suffisamment actifs on observe généralement des gradients de concentration de substrats et de produits à l'intérieur ou à l'extérieur des supports (figure A.V.10). En présence des limitations diffusionnelles la concentration de substrats diminue progressivement de la solution vers l'intérieur du support. Au contraire, les produits tendent à s'accumuler dans ou au voisinage du support, avec une augmentation de leur concentration de la solution vers l'intérieur .

Un appauvrissement des substrats et une accumulation des produits dans le microenvironnement des cellules peuvent évidemment en modifier les activités.

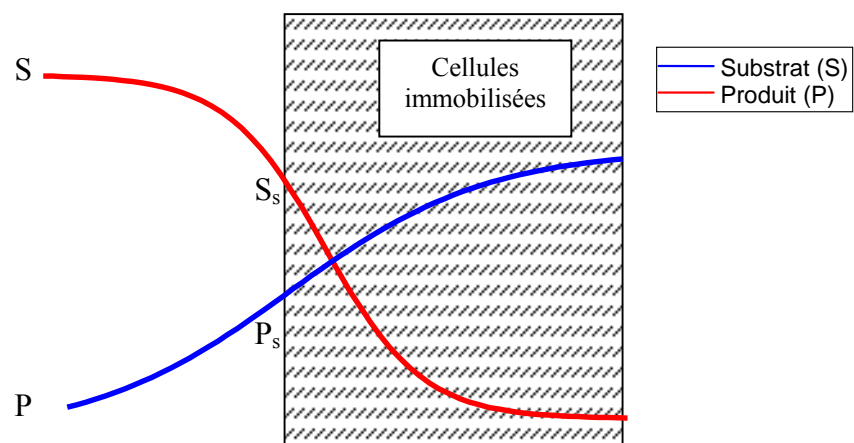


Figure A.V.10 : Gradients de concentration pour le substrat (S) et le produit (P) en présence de limitations diffusionnelles dans le cas de cellules immobilisées [Scriban, 1995]

En général, les limitations diffusionnelles résultent en une baisse de l'activité apparente du catalyseur. Différentes méthodes de calcul permettent la quantification de ces interférences diffusionnelles [Levenspiel, 1974]. Ces calculs proposent la cinétique intrinsèque de la réaction biocatalytique ainsi que la maîtrise des différentes étapes de transfert de matière. On distingue, par ailleurs, le transport des substances à l'extérieur des supports solides et la diffusion à l'intérieur du milieu poreux.

De nombreux travaux [Engasser et Hovart, 1976 ; Vieth et al., 1976 ; Bucholz, 1982] ont été consacrés au calcul de réacteurs biologiques en présence de limitations diffusionnelles. Nous allons considérer le calcul d'un réacteur à lit fixe des cellules immobilisées à l'intérieur de particules poreuses, dans le cas d'une cinétique de réaction du premier ordre .

A.V.11. Evaluation des paramètres cinétiques

On considère un réacteur à lit fixe, constitué d'une colonne de diamètre d_c et de hauteur L , remplie de particules sphériques de diamètre d_p . Le réacteur étant alimenté avec un débit Q de milieu contenant une concentration S_0 de substrat .

Paramètres cinétiques de la réaction

En prenant comme exemple une cinétique classique comme celle de MONOD, équation à deux paramètres , analogue à celle de MICHAELIS-MENTEN décrivant la cinétique enzymatique [Pavé, A., 1994 ; Scriban, 1995]. L'équation de MONOD donne la relation entre la vitesse spécifique de croissance μ et la concentration du substrat S :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (\text{A.1})$$

où : μ_{\max} : vitesse spécifique maximale (h^{-1}),

K_s : constante de saturation (mg/L)

μ_{\max} est obtenue pour des concentrations élevées $S \gg K_s$

K_s est la concentration pour laquelle la vitesse $\mu = \mu_{\max} / 2$.

En plus de la constante d'affinité K_s , il est nécessaire de connaître la vitesse maximale de la réaction par unité de volume du support, V_{\max} . Celle-ci est obtenue en multipliant la vitesse maximale spécifique μ_{\max} par la masse de cellules immobilisées par unité de volume de support. Si l'on considère la concentration en substrat inférieure à K_s , on pourra admettre que la réaction suit une cinétique du premier ordre. Ainsi, par unité de volume de support, la vitesse de réaction est exprimée par :

$$r = \frac{V_{\max}}{K_s} S = k S \quad (\text{A.2})$$

avec k la constante équivalente du premier ordre.

Diffusivité interne du substrat

Le transport du substrat à l'intérieur du milieu poreux se fait par diffusion moléculaire. Sa diffusivité interne (effective), D_i ou D_{eff} , est généralement inférieure à la diffusivité du substrat en solution. Elle peut être déterminée à l'aide d'expériences de diffusion dynamique du substrat en absence de catalyseur.

Coefficient de transfert externe

La vitesse de transport du substrat, par diffusion et convection, de la solution vers la surface externe du support est classiquement exprimée à l'aide d'un coefficient de transfert. Sa valeur dépend à la fois de la diffusivité du substrat en solution et de l'intensité de la convection dans le liquide en écoulement. Il peut être calculé à partir de corrélations empiriques [Willaert et al., 1996 ; Bailey, 1987].

A.V.12. Vitesse de réaction au niveau d'une particule

Dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer le profil de concentration du substrat à l'intérieur de la particule sphérique. Il résulte de la compétition entre diffusion interne et réaction. Le processus de transfert de masse est couplé à celui de la réaction chimique. Un gradient de concentration est créé suite aux limitations diffusionnelles [Mavituna, 1979].

Le flux de transfert de masse est donné en fonction de la concentration S et de la distance par rapport au centre de la particule r par :

$$J(S) = -D_{eff} \left(\frac{dS}{dr} \right)_{r_p} \quad (A.3)$$

$J(S)$: flux de substrat vers les particules de support (alginate) ($\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{sec}$).

r : distance radiale dans la particule de support (cm)

D_{eff} : coefficient de Diffusion effective à l'intérieur de la particule (cm^2/s)

Le bilan global établi au niveau d'une particule pourra être écrit comme suit :

$$D_{eff} \left(\frac{d^2S}{dr^2} + \frac{2}{r} \left(\frac{dS}{dr} \right) \right) = R_v \quad (A.4)$$

où R_v : est la vitesse de la réaction par unité de volume.

Pour une réaction d'ordre 1 : $R_v = k S$

La résolution de cette équation différentielle pour les conditions aux limites :

- à $r = r_p$ (rayon de la particule), on a $S = S_0$ (en négligeant la résistance externe au transfert de masse)

- à $r = 0$ on a $S = 0$

On obtient, donc, l'équation suivante donnant la variation de S avec la position radiale R

$$S = S_s \frac{r_p}{r} \frac{\sinh(3\Phi r/r_p)}{\sinh(3\Phi)} \quad (\text{A.5})$$

où :

S_s : concentration de substrat à la surface

Φ : nombre adimensionnel appelé Module de Thiele comparant les vitesses de réaction et de diffusion à l'intérieur d'une particule supposée sphérique :

$$\Phi = \frac{r_p}{3} \sqrt{\frac{k}{D_{eff}}} \quad (\text{A.6})$$

C'est la valeur de ce critère Φ qui détermine l'importance des limitations diffusionnelles et par conséquent des gradients de concentration à l'intérieur du support [Webb *et al.*,1986 ; Winterbottom et King,1999] (figure A.V.12).

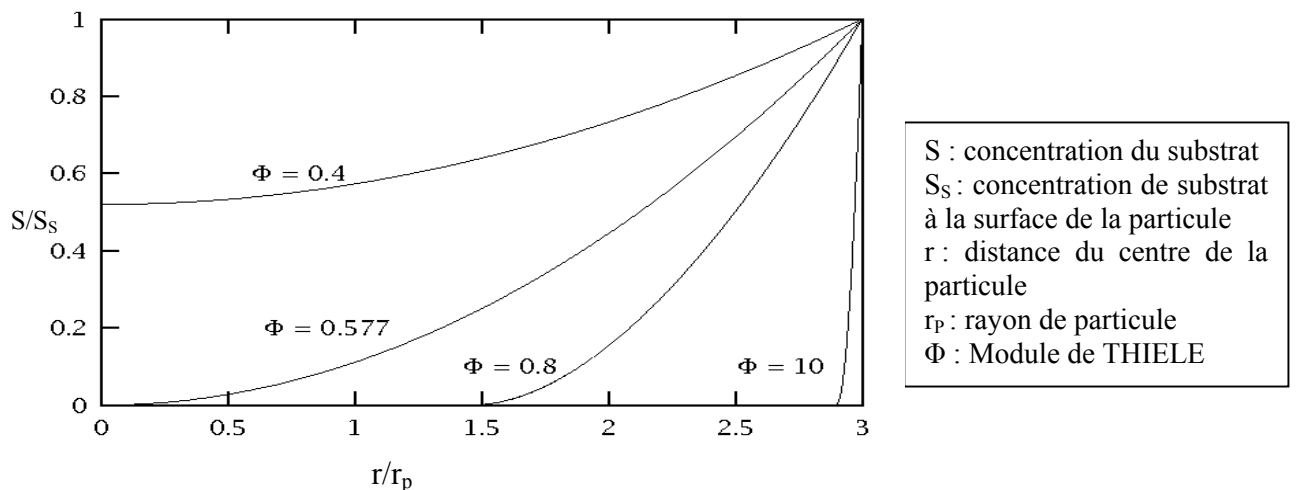


Figure A.V.12 : Concentration de substrat à l'intérieur d'une particule sphérique à différents degrés de limitations diffusionnelles [Webb *et al.*, 1986]

Aux faibles valeurs de Φ , lorsque l'activité catalytique du support est très faible, la diffusion du substrat n'est pas limitante et les concentrations sont pratiquement uniformes. Par contre, aux fortes valeurs de Φ , lorsque la quantité de biomasse est importante, la diffusion interne devient limitante et on obtient des gradients de concentration en substrat très prononcée dans le support.

La vitesse de réaction globale pour une particule, calculée au moyen d'une intégrale sur toute la particule, peut être mise sous la forme :

$$R_p = \eta V_p k S_s \quad (\text{A.7})$$

Avec V_p le volume de la particule, et η le facteur d'efficacité lié à Φ par la relation suivante :

$$\eta = \frac{1}{\Phi} \left(\frac{1}{\tanh 3\Phi} - \frac{1}{3\Phi} \right) = \frac{1}{3\Phi^2} [3\Phi \coth(3\Phi) - 1] \quad (\text{A.8})$$

Il est à noter que le produit $V_p k S_s$ représente la vitesse de réaction pour une particule en absence de limitations diffusionnelles, quand la concentration est uniformément égale à S_s . Par conséquent, le facteur d'efficacité η qui est égal à 1 aux faibles valeurs de Φ , est un facteur de réduction de la vitesse tenant compte de la présence d'un gradient de concentration de substrat. La concentration à la surface externe, S_s , est inférieure à la concentration dans le milieu, S , en présence de limitations diffusionnelles externes. Une relation simple peut être établie entre les deux concentrations, en introduisant le coefficient de transfert externe, h , et en écrivant l'égalité des vitesses de transport à l'extérieur de la particule et de réaction dans la particule :

$$A_p h (S - S_s) = \eta V_p k S_s \quad (\text{A.9})$$

A_p étant la surface externe de la particules sphérique. Par conséquent :

$$S_s = \frac{S}{1 + \eta V_p k / A_p h} \quad (\text{A.10})$$

et la vitesse de la réaction pour une particule s'écrit en fonction de la concentration du substrat dans le milieu :

$$R_p = \frac{V_p k}{1 + \eta V_p k / A_p h} S \quad (\text{A.11})$$

L'ensemble de ces relations donnant la cinétique de croissance de la biomasse et de transfert de matière montrent que la vitesse globale de la réaction reste proportionnelle à la concentration de substrat dans le milieu, avec une constante cinétique globale qui est une fonction des différentes constantes cinétiques de réaction et de transfert de matière. La vitesse de réaction par unité de surface de particules pourra, donc, être exprimée par une simple relation linéaire avec une constante globale K :

$$R_p = K S \quad (\text{A.12})$$

A.V.13. Applications environnementales de la technologie des cellules immobilisées

L'utilisation des cellules immobilisées dans les processus industriels est actuellement une tendance dans le domaine de la biotechnologie appliquée à l'environnement, notamment dans la bioremediation, le traitement des effluents ou la production de métabolites à usage environnemental [Willaert,1996 ; Cheetham, 1980 ; Brodelius, 1987]. En sélectionnant des cellules bactériennes prises à différents stades de croissance et dont le métabolisme utilise plus efficacement certains polluants, il sera possible de les immobiliser avec succès sur différentes matrices [Trevors et al. 1992] afin d'être utilisées en bioremediation de milieux pollués ou d'effluents contenant des composés xénobiotiques tels que le phénol [Bettmann 1984], le chlorophenol [O'Reilly, 1989], l'acétonitrile [Chapatwala, 1993], les hydrocarbures polyaromatiques [Manohar et al., 2001] ainsi que pour le processus de dénitrification [Tal, 2003].

Les supports d'immobilisation doivent remplir certains critères tels que la stabilité mécanique et chimique, une faible solubilité, une diffusivité élevée vis à vis des éléments nutritifs des bactéries et principalement celle de l'oxygène dans les procédés aérobies[Leenen 1996].

Différentes configurations de bioréacteurs en continu (lit fixe, agités ou fluidisés avec ou sans recirculation) (figure A.V.9) peuvent être rencontrés en amont ou en aval des procédés, en phases liquide, gazeuse ou hétérogène appelés encore biofiltres [Webb et al. 1986 ; Wagner et Hempel, 2004]. Dans de tels bioréacteurs, les microorganismes assurant l'épuration biologique, forment un biofilm qui permet d'améliorer la performance des traitements de la pollution ou de gagner en compacité pour un même degré de traitement.

Ces systèmes sont également connus pour être stables dans le cas de variations des conditions opératoires ou environnementales.

Les procédés à cellules immobilisées permettent l'élimination des polluants avec un rendement élevé, même au-delà des concentrations pouvant être inhibitrices ou toxiques aux bactéries. Le traitement de volumes importants dans un volume limité du réacteur à cellules immobilisées sans nécessité d'une étape de séparation est aussi un avantage à reconnaître. [Willaert et al. 1996].

Le transfert de masse à l'intérieur des réacteurs est amélioré grâce à la grande surface spécifique que présente les réacteurs à cellules immobilisées. A titre indicatif, on obtient avec les lits fluidisés une surface spécifique de l'ordre 3000-4000 m⁻¹. La comparaison pourra être faite par rapport aux systèmes (bassins) à boues activées. La vitesse globale de traitement

deviendra plus élevée, d'où la réduction du volume réactionnel jusqu'à 20% du volume requis pour les boues activées. La croissance microbienne est plus importante (10-40 g/L) par rapport aux systèmes à boues activées (2-5 g/L). Cette biomasse ne nécessite pas d'être séparée (étape de clarification et de recyclage de la biomasse) ou traitée périodiquement comme dans le cas des boues activées. Le sable pourra être utilisé comme support d'immobilisation à grande échelle. La contrainte principale dans le cas de ce type de réacteurs à cellules immobilisées est de garantir un apport supplémentaire en oxygène (30-50 mg/L) [Webb et al., 1986].

PARTIE B

MATERIEL ET METHODES

B.1. ISOLEMENT ET ADAPTATION DES MICRO-ORGANISMES

Le protocole d'isolement et d'adaptation des bactéries à utiliser le naphthalène comme source de carbone est illustré sur la figure B.1.. Des échantillons de sol (10g) et d'eau (200 ml) ont été prélevés aseptiquement dans des zones fortement contaminées par des hydrocarbures lourds (gas-oil, asphaltènes, goudrons) au niveau du port d'Alger, et mis dans des flacons stériles. Ces échantillons ont été dilués par de l'eau distillée stérile contenant 0.85% de NaCl, puis agités soigneusement au vortex pour servir à l'inoculation de cultures d'enrichissement dans des erlenmeyers munis de cotons cardés contenant 100 ml d'un milieu minéral de base (MMB) ayant la composition suivante (en g/L) :

- Di-Potassium hydrogénophosphate K_2HPO_4 (0.38)
- Sulfate de Magnesium heptahydraté $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2)
- Chlorure d'ammonium NH_4Cl (1.0)
- Perchlorure de fer $FeCl_3$ (0.05)
- Sulfate de Zinc $ZnSO_4$ (0.025)
- Chlorure de Sodium $NaCl$ (0.5)
- Extrait de levure (yeast extract) (0.01).
- 1 ml d'une solution traces d'oligoéléments.

Le pH du milieu a été ajusté à 7.0 ± 0.2 , avec une solution de soude ou d'acide hydrochlorique et mesuré à l'aide d'un pH mètre InolabWTW. Le naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie est ajouté à une concentration de 10-20 mg/L dissous dans un volume minimal de dimethyl formamide (DMF) ou de Tween 80. Les cultures ont été incubées à température ambiante sur agitateur orbital GFL3005 200 rpm. Après 48 heures, des échantillons sont prélevés afin de repiquer la suspension bactérienne sur boîtes pétri contenant le milieu solide MMB (sans naphthalène) auquel on a ajouté 15g/L d'agar. Les boîtes de pétri ont été maintenues à l'étuve (30°C) en position renversée avec le naphthalène (0.1g) sur le couvercle. Après 24-48 heures d'incubation, les colonies bactériennes qui apparaissent sont celles pouvant dégrader le naphthalène pour assurer le maintien de leur métabolisme vital. La procédure de cultures d'enrichissement, sur milieu liquide, et de repiquages sur milieu solide,

est répétée successivement plusieurs fois jusqu'à l'obtention des colonies pures adaptées à utiliser le naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie.

L'examen microscopique et la caractérisation morphologique et biochimique des bactéries par galerie classique et confirmée par API20E ont montré qu'elles appartenaient au genre *Pseudomonas sp.* (tableau B.1.). Les bactéries sont stockées dans des boîtes de pétri ou dans des tubes inclinés « slants » sur milieu solide à -18°C . Le repiquage de la souche et la vérification de sa pureté est effectués systématiquement tous les mois.

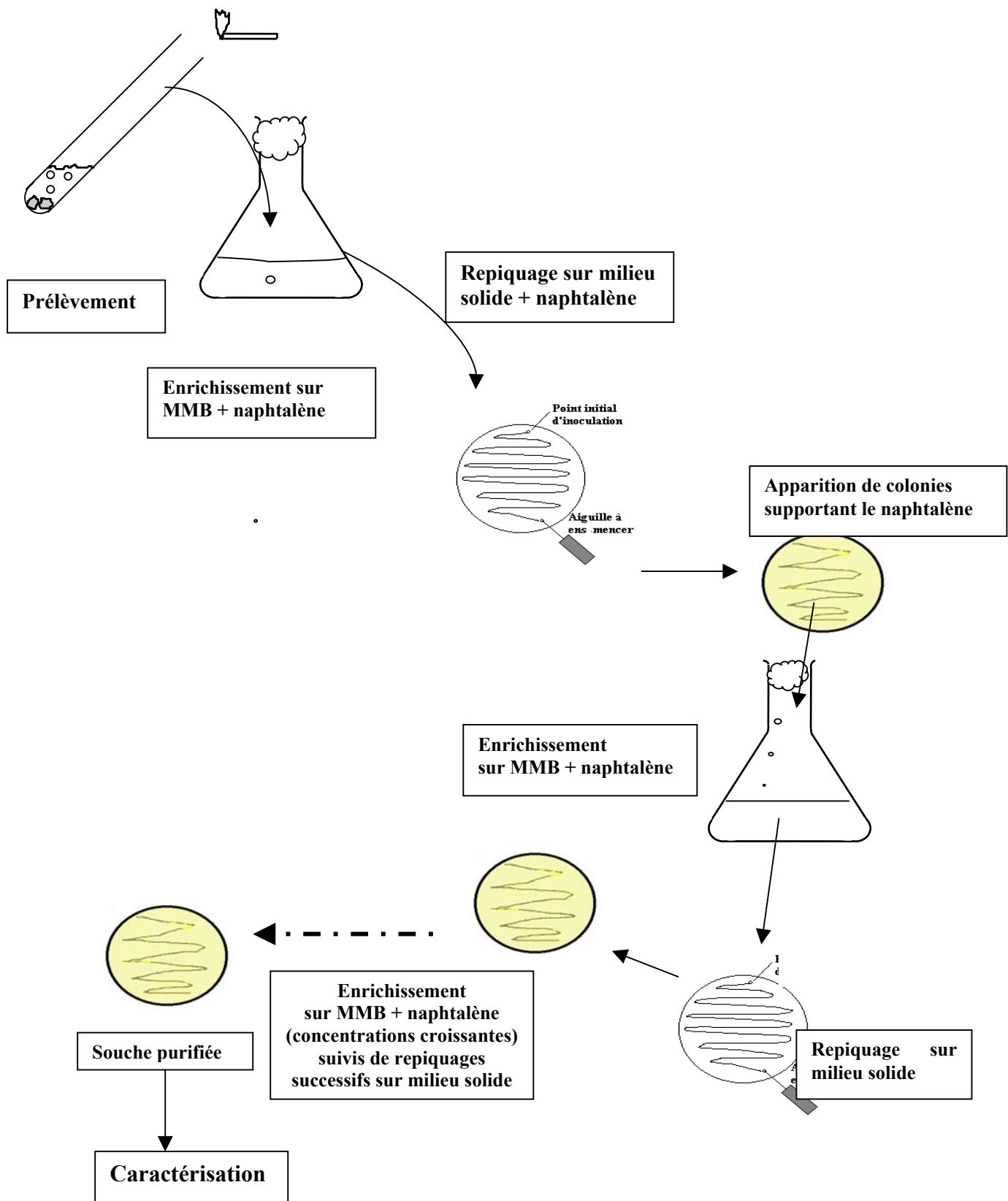





Figure B.1. : Protocole d'isolement des Pseudomonas sp. utilisant le naphtalène comme source de carbone et d'énergie

Tableau B.1. : Résultats des examens et tests morphologiques et biochimiques des bactéries isolées

Tests		Résultats	Apparence
Croissance : Milieux King , gélose au sang, PCB, Citrimide (30°C)		<i>Ensemencement positif</i>	
Caractères culturaux et morphologiques		<i>Taille plus ou moins grosse, brillantes, muqueuses</i>	
Examen microscopique		<i>Bacilles très mobiles fines</i>	
Coloration Gram		-	
Caractérisation Biochimique	Catalase	+	
	Oxydase	+	
	ONPG bêta-galactosidase	-	
	Citrate Utilisation de citrate	-	
	VP Production d'acétoïne	-	
	LDC lysine décarboxylase	-	
	ODC	-	
	ADH arginine dihydrolase	-	
	Uréase	-	
	Indole	-	
	Glucose	-	
	Lactose	-	
	Saccharose	-	
	H ₂ S	-	
	Mannitol	-	
	Mobilité	+	
	Nitrate	+/_	

B.2. DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE DES *Pseudomonas*

Des cultures d'enrichissement sont réalisées en fioles « Erlenmeyers » agitées de 250 mL contenant 50 mL MMB pour l'étude de l'influence des conditions physicochimiques sur la croissance des bactéries et sur la biodégradation de naphthalène. Les paramètres de l'étude sont respectivement : la température, le pH, la concentration en naphthalène et la nature de la source d'azote .

Le système comporte aussi :

- Des fioles stérilisées à l'aide de 200 μ L d'azoture de sodium NaN_3 10^{-2} M ou de d'une solution 5% HCl et 0.5M HgCl_2 , servant de témoins de référence (dégradation abiotique)
- Des solutions de tampons phosphatés ont été utilisées pour garder le pH initial constant (5-9)
- Une étuve bactériologique (Memmert-GMBH) ou un bain marie avec contrôle de température entre 25 et 40°C.
- Une solution mère de naphthalène à 1g/L dans le DMF ou le tween80 à 5 CMC préparée à l'aide d'un homogénéiseur est stérilisée par filtration sur membrane de porosité 0.2 μ pour servir à inoculer les milieux de culture à différentes concentrations (10-100mg/L).

L'inoculum servant à l'ensemencement des cultures est une suspension obtenue à partir de fragments de colonies prélevées sur des boites de pétri et diluées dans l'eau physiologique ou dans le milieu MMB. La suspension est homogénéisée au vortex (ZX3-VELP) pendant 30 secondes avant de servir à l'ensemencement (2 mL /50 mL).

L'effet de la nature de la source d'azote a été étudié pour une concentration d'azote équivalente à 1g/L de KNO_3 , NH_4Cl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Les cultures ont été maintenues sous agitation à 150 rpm sur agitateur orbital de type GFL 3005 pendant 24 à 48 heures. Les résultats sont présentés sur les figures B.2.1 et B.2.2.

B.2.1 Mesure de la concentration en biomasse

La concentration de la biomasse bactérienne a été mesurée à partir de prélèvements de cultures après dilution par deux méthodes :

- a- *Méthode indirecte* en mesurant de la densité optique (D.O.) à 600 nm d'un échantillon de milieu à l'aide d'un spectrophotomètre visible. Le zéro d'absorbance est réalisé sur du milieu prélevé avant inoculation.

b- *Méthode directe* en mesurant la biomasse sèche :

Un volume 5-10 mL de culture sont filtrés (filtre 0.45 μm , Schleicher & schuell, Dassel, Canada), ensuite le filtre est placé à l'étuve pendant 24 h à 105°C. La matière sèche (MS) correspond à la différence de masse entre le filtre seul et le filtre avec biomasse (refroidi pendant 1 heure dans un dessiccateur). Une courbe d'étalonnage (D.O._(600nm)-Biomasse sèche) a été établie (Annexe 1) pour plusieurs dilutions d'une suspension mère de bactéries, afin de faire une extrapolation de la biomasse sèche à partir de mesures directe de la densité optique.

B.2.2. Analyse de naphthalène

La concentration résiduelle en naphthalène est déterminée à 276nm par HPLC SHIMADZU-LC-10AT, muni d'un détecteur UV-SPD-10AV. Le protocole d'analyse est illustré sur la figure B.2.b

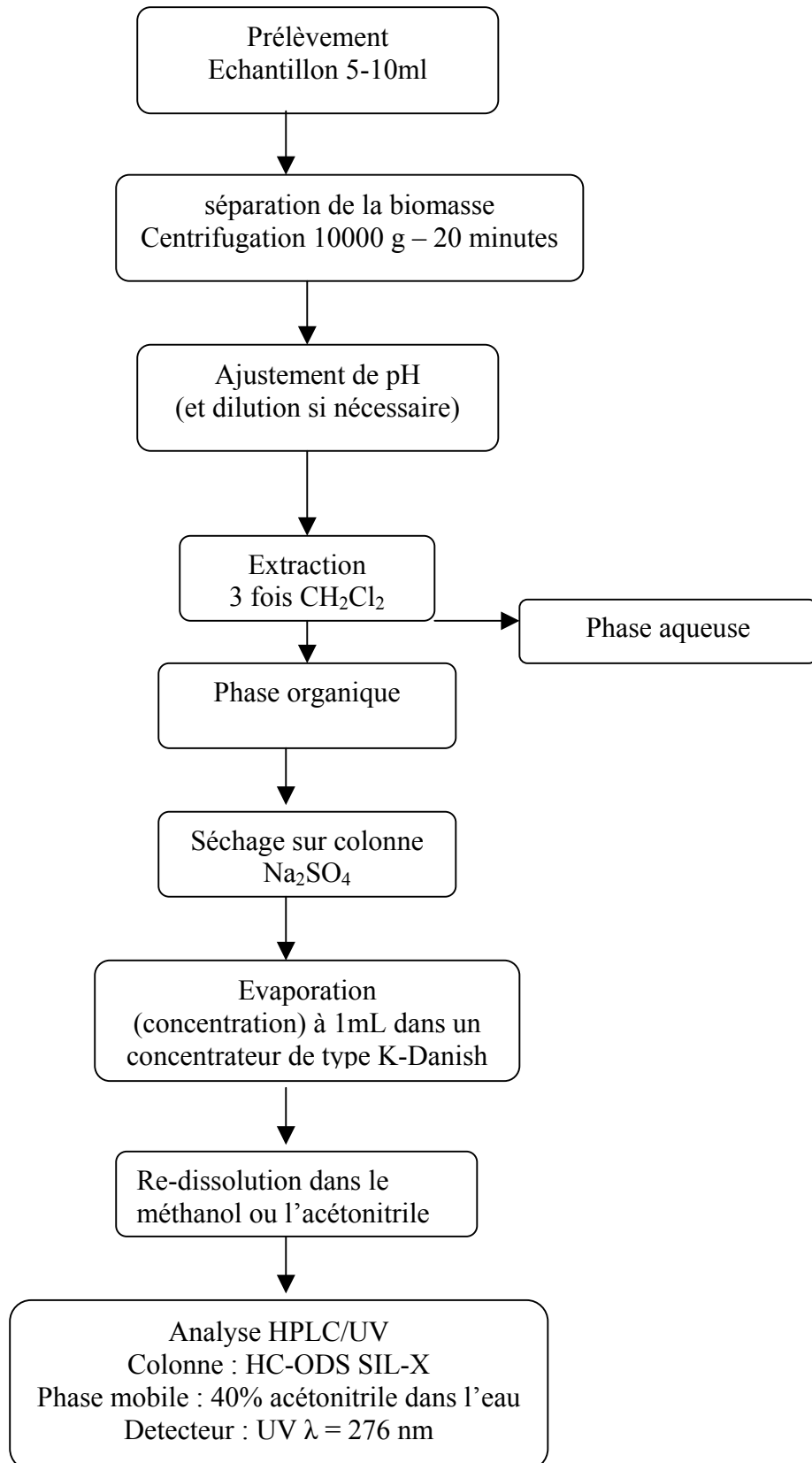


Figure B.2.b : Protocole d'extraction et d'analyse du naphthalène par HPLC

B.2.3. Résultats & Discussion

- **Effet de la température** : La température agit directement sur le catabolisme (dégradation de naphthalène) et sur l'anabolisme (croissance bactérienne).

L'activité des enzymes et par conséquent le rendement de la réaction de biodégradation augmente avec la température (figures B.2.1. [A]) jusqu'à un certain seuil à partir duquel la dénaturation des enzymes commence [Illanes, 1999]. De la même manière l'activité des enzymes responsables de la croissance augmente avec la température. Une augmentation excessive implique d'une part une dénaturation des enzymes ainsi que l'altération des acides gras de la paroi cytoplasmique des cellules bactériennes [Onysko et al., 2000].

Une température optimale de 30°C a été adoptée dans notre étude.

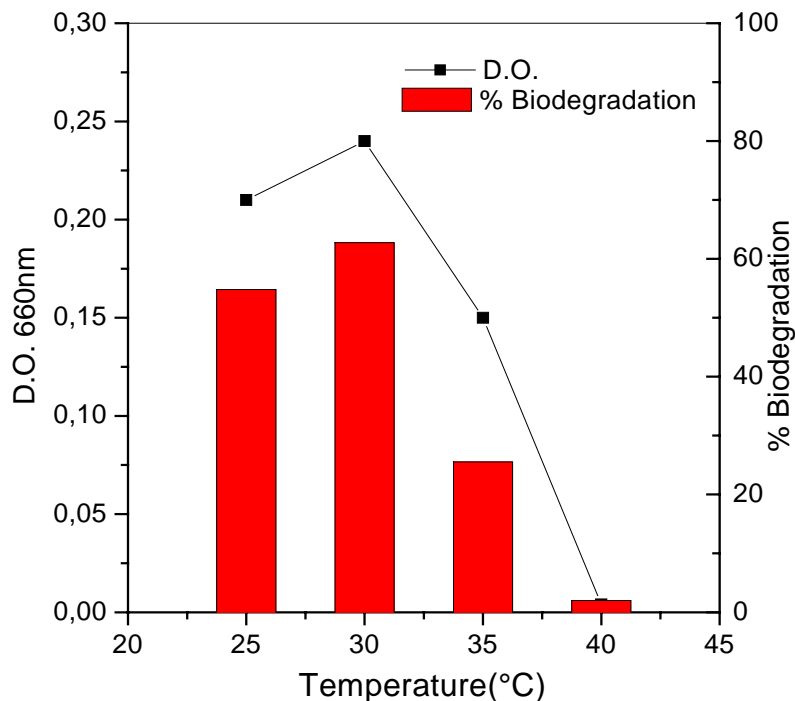


Figure B.2.1.A : Effet de la température sur la croissance des *Pseudomonas sp.* et sur le taux de biodégradation du naphthalène

L'effet de pH sur de l'activité cellulaire est important. Nous remarquons que la vitesse de croissance en fonction du pH est maximale dans l'intervalle de pH [6.5 à 7.5]. Pour les valeurs extrêmes de pH où peut avoir lieu la dénaturation des enzymes, le métabolisme de naphthalène est réduit (figures B.2.1.[B]). Cependant, la gamme de tolérance aux variations de pH, pour la souche de *Pseudomonas sp.* isolée, est plus large en comparaison avec d'autres

microorganismes ayant la capacité de dégrader le naphthalène. Un pH optimal de 7.0 a été considéré dans la suite de l'étude [Cornish-Bowden, 1995].

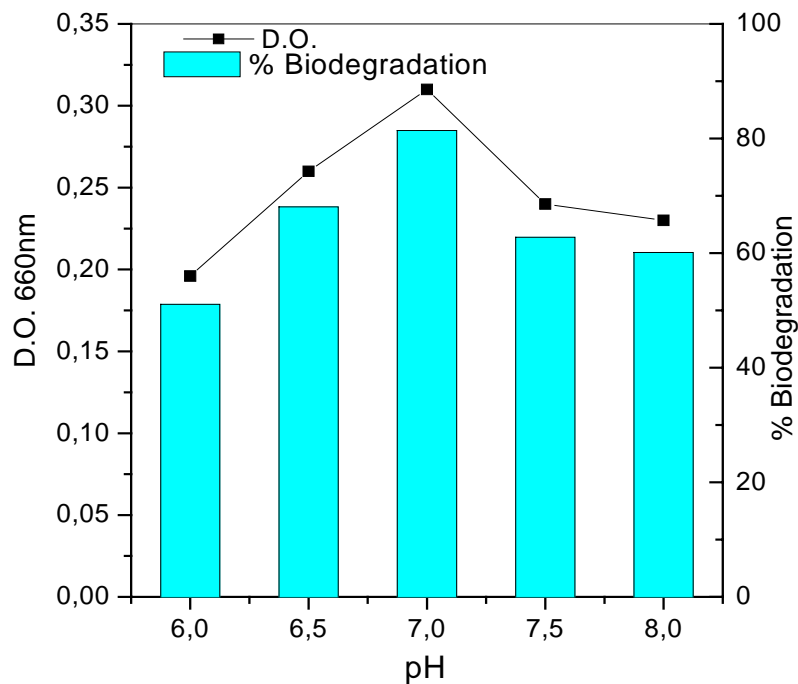


Figure B.2.1.B : Effet de pH sur la croissance des *Pseudomonas sp.* et sur le taux de biodégradation du naphthalène

- Effet de la concentration en naphthalène :

La croissance microbienne et le taux de biodégradation augmentent avec la concentration en naphthalène pour atteindre une valeur maximale à environ de 20 mg/L (85%) (figures B.2.1 [C]). A partir de cette concentration, il y a inhibition par le substrat, par suite de l'encombrement stérique des sites enzymatiques, d'où une diminution de la métabolisation du naphthalène. La souche isolée peut tolérer des concentrations élevées en naphthalène allant jusqu'à 60 mg/L , mais la biomasse produite dans ce cas sera faible .

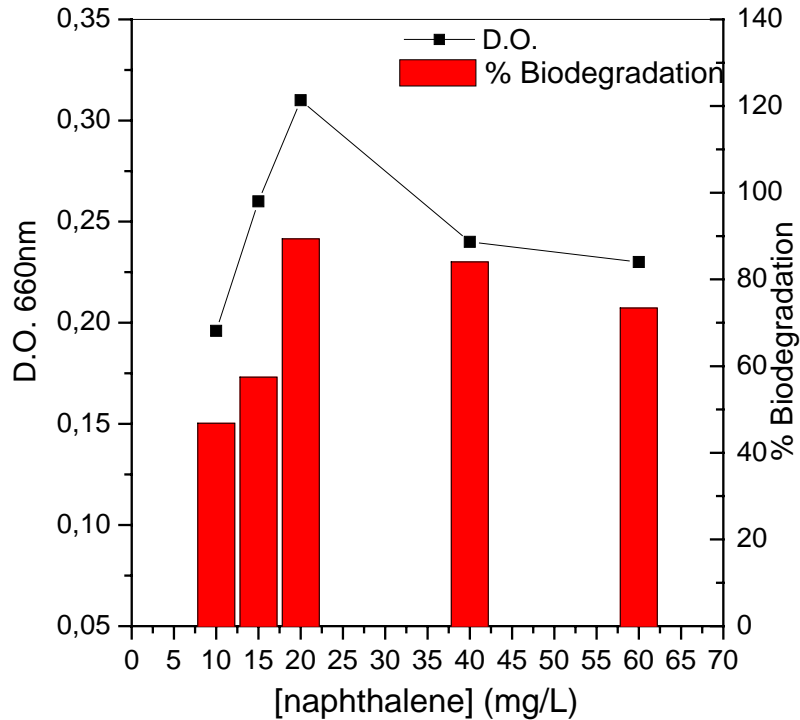


Figure B.2.1.C : Effet de la concentration initiale en naphthalène sur la croissance des *Pseudomonas sp.* et sur le taux de biodégradation du naphthalène

- Effet de la nature de la source d'azote :

L'azote est à la base de la synthèse des acides aminés (éléments des protéines, enzymatiques ou non) et des acides nucléiques. L'utilisation de l'azote ammoniacal donne apparemment le meilleur taux de croissance et de biodégradabilité de naphthalène par les *Pseudomonas sp.* (figures B.2.1.[D]). Le métabolisme de naphthalène dans le cas des nitrates de potassium prend un autre chemin que celui de NH_4Cl , selon d'autres auteurs (Arahna et Brown, 1981). En effet, la dégradation de naphthalène en présence de NH_4Cl prend le chemin de l'acide salicylique, qui est un inducteur de l'enzyme naphthalène dioxygénase (enzyme promoteur de la dégradation), alors qu'en prenant les nitrates comme source d'azote, le chemin métabolique est celui de la formation de 1,2-naphtoquinone (composé phénolique) pouvant être toxique pour les bactéries au delà d'un certain seuil. La coloration jaune observée sur les cultures en présence de nitrates en est une preuve. Un excès d'ammoniaque NH_4^+ (cas de sulfate d'ammonium) peut provoquer un excès d'acide salicylique et une inhibition partielle, d'où un rendement en biodégradation plus faible comparativement à NH_4Cl .

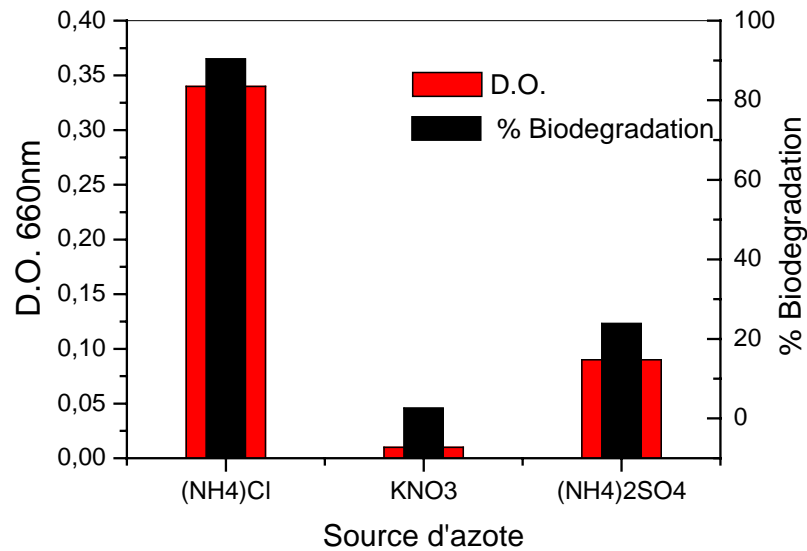


Figure B.2.1.D : Effet de nature de la source d'azote sur la croissance des *Pseudomonas sp.* et sur le taux de biodégradation du naphthalène

Les conditions optimales pour le métabolisme microbien du naphthalène par les *Pseudomonas sp.* et qui seront adoptées dans notre étude sont illustrées au tableau B.2.1 :

Tableau B.2.1 : Conditions optimales pour le métabolisme microbien du naphthalène par les cellules libres de *Pseudomonas sp.*

Paramètre	optimum
Température (°C)	30
pH initial	6.8-7.0
Concentration initiale en naphthalène (mg/L)	20
Nature de la source d'azote	NH ₄ Cl

B.3. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE L'ENZYME NAPHTALENE-DIOXYGENASE (NDO) ET DE LA PRODUCTION D'ACIDE SALICYLIQUE

B.3.1. Mise en évidence de la NDO

a- Test qualitatif :

L'activité de l'enzyme naphthalène-dioxygénase (NDO) est qualitativement mise en évidence par le test de conversion de l'indole en indigo [Ensley et al. 1983].

Selon la réaction décrite sur la figure B.3.1.i .

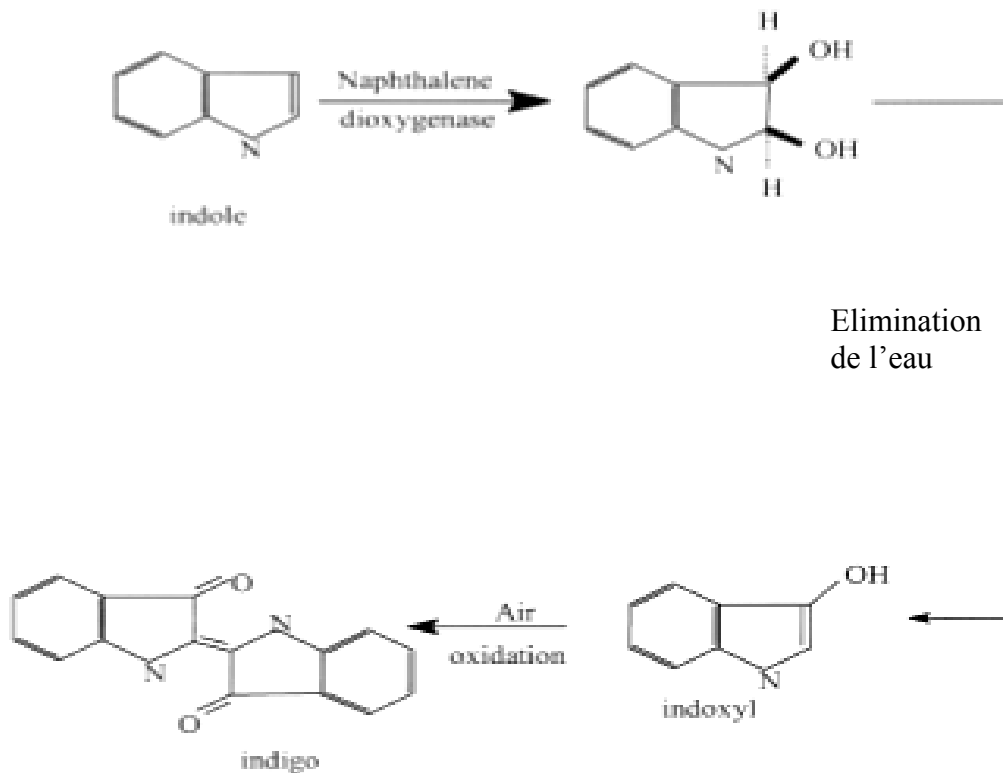


Figure B.3.1.i : schéma de la réaction de transformation enzymatique de l'indole en indigo [Ensley et al. , 1983].

Un échantillon de préculture bactérienne(24 heures) est centrifugé à 10000g pendant 20minutes . Les cellules précipitées sont lavées et resuspendues dans une solution tampon pH 7.0, afin de servir d'innoculum pour la détection de NDO. La suspension est distribué dans les *creusets de sérologie* contenant le milieu de culture déjà décrit , auxquels on ajoute 100µM de naphthalene et 1 mM d'indole . L'ensemble est incubé dans l'étuve à 30°C . Le changement de couleur au bleu observé pendant 48 heures est comparé avec le test négatif (incolore) obtenu avec d'autres bactéries ne contenant pas ou ne pouvant pas synthétiser le NDO. Les résultats du test sont visibles sur la figure B .3.1.ii :

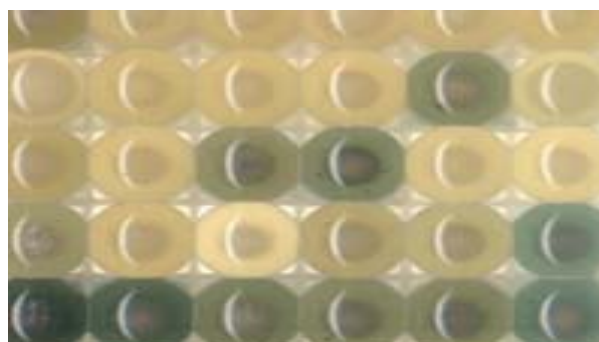


Figure B.3.1.ii : Transformation de l'indole en indigo (bleu) en présence de naphthalène dioxygénase

b) Test quantitatif :

L'activité de l'enzyme naphthalène di-oxygenase (NDO) est mise en évidence à l'aide du suivi de la réaction d'oxydation de NADH mesurée par spectrophotométrie UV. [Shamsuzzaman et Barnsley 1974].

Le NAD (Nicotinamide adénine dinucléotide), est le coenzyme nécessaire à de nombreuses réactions d'oxydoréduction. La forme oxydée, NAD^+ , accepte des électrons et des protons (H^+); la forme réduite, NADH, donne des électrons et des protons.

L'activité de l'enzyme naphthalène di-oxygenase (NDO) est mise en évidence à l'aide du suivi de la réaction d'oxydation de NADH mesurée par spectrophotométrie [Shamsuzzaman et Barnsley 1974].

Un échantillon de préculture bactérienne de 24 heures est centrifugé à 10000 g pendant 20 min.. Les cellules précipitées sont lavées et re-suspendues dans une solution tampon pH 7.0, afin de servir d'inoculum pour la détection de NDO . Un volume de 3mL de cette solution contenant approximativement 0.2 mg de protéine (déterminée par la méthode de Bradford [Grady, 1985]) est mélangé à 1.5 μM NADH et 1 μM de naphthalène dissous dans 0.1 ml de méthanol. La diminution de l'absorbance du mélange, suite à la disparition de naphthalène est mesurée au bout de 5 minutes par spectrophotométrie UV à 276 nm. La vitesse initiale de la réaction est directement proportionnelle à la concentration de l'enzyme.

Le résultat est exprimée en Unités enzymatiques (U.E.) :

$$1 \text{ U.E.} = \mu\text{M naphthalène consommée} / (\text{minute} \times \text{mg de protéine})$$

Les résultats suivants sont obtenus (tableau B.3):

Tableau B.3. : Activité enzymatique de la NDO dans les *Pseudomonas sp.*

Temps (heures)	Activité enzymatique (U.E.)/mg protéine)
24	0.18
48	0.12

Les résultats montrent une activité assez élevée de l'enzyme NDO qui diminue avec le temps suite à une inhibition due à l'accumulation d'un intermédiaire réactionnel, l'acide salicylique.

B.3.2. Mise en évidence de la production d'acide salicylique lors de la biodégradation de naphthalène

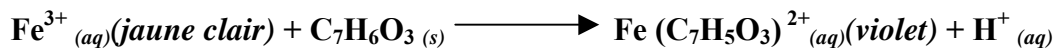
Le suivi de l'évolution du pH, remarqué au cours de la biodégradation du naphthalène indique la formation de l'acide salicylique comme métabolite secondaire de la dégradation. Afin de mettre en évidence ce phénomène, une culture d'enrichissement a été réalisée dans le milieu et sous les conditions suivantes :

T=30°C, pH = 7.0, [naphthalène]₀=50 mg/L].

Dosage de l'acide salicylique

L'acide salicylique, métabolite secondaire de la dégradation du naphthalène a été déterminé par colorimétrie (Aranha et Brown 1981).

La méthode consiste à ajouter 0.1 ml d'une solution fraîchement préparée (FeCl₃ 4g, Eau distillée 100 mL, HCl (1N) 12 mL, Fe₂NO₃.9H₂O 4g) à 7 mL de milieu séparé par centrifugation suivi d'une filtration sur une membrane 450µm. Le dosage colorimétrique est basé sur la formation d'un complexe de coloration rouge pourpre formé par l'ion salicylique avec les ions ferriques selon la réaction suivante :



L'intensité de la couleur mesurée à 525 nm à l'aide du spectrophotomètre est proportionnelle à la concentration d'acide salicylique (Annexe2.). Les résultats sont illustrés sur la figure B.3.2.b

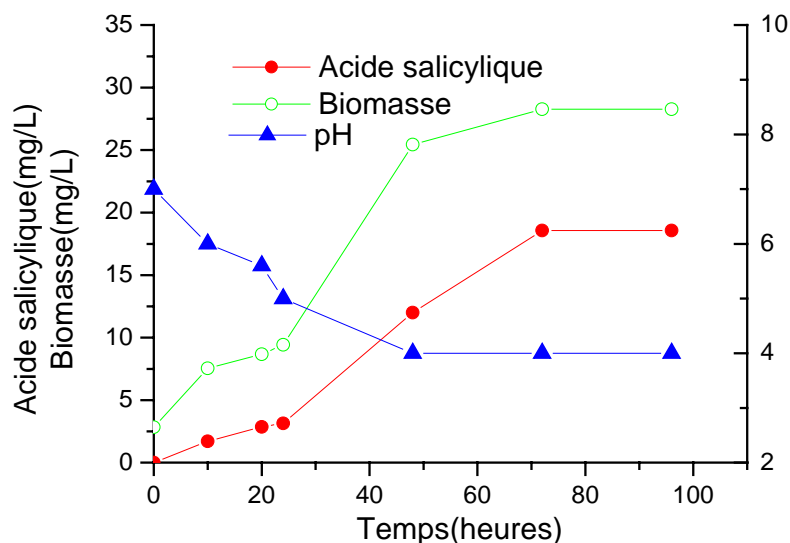


Figure B.3.2.b : Production d'acide salicylique au cours de la biodégradation du naphthalène par *Pseudomonas sp.*

L'augmentation de l'acidité suite à l'accumulation de l'acide salicylique dans le milieu a entraîné l'inhibition de la croissance bactérienne après 60 heures.

D'après les résultats obtenus, existence de l'activité de l'enzyme clé NDO et la production d'acide salicylique lors de la biodégradation du naphthalène il est donc clair que le chemin métabolique de dégradation de naphthalène par les *Pseudomonas sp.* est conforme à celui décrit par Eaton et Chapman, 1991 ; Sutherland *et al.*, 1995.

B.4. ETUDE DE LA CINETIQUE DE BIODEGRADATION DU NAPHTALENE PAR LES CELLULES LIBRES DE *Pseudomonas sp.*

B.4.1 Cultures d'enrichissement

Des cultures d'enrichissement dans le milieu de base déjà décrit en B.1. et optimisé en B.2. avec des concentrations initiales de naphthalène de 10 à 100 mg/L ont été suivies sur agitateur orbital afin d'établir les cinétiques de biodégradation du naphthalène et celle de la croissance des *Pseudomonas sp.*. Des échantillons sont systématiquement prélevés, filtrés ou centrifugés afin de séparer la biomasse humide du surnageant liquide contenant le naphthalène résiduel. La croissance bactérienne a été estimée par la mesure de la biomasse sèche ou indirectement en mesurant la densité optique qui peut être convertie en biomasse sèche en se basant sur la courbe d'étalonnage . La concentration en naphthalène a été déterminée par HPLC, après extraction suivant le protocole décrit sur la figure B.2. Les résultats sont illustrés sur les figures B.4.1 [A] et [B]

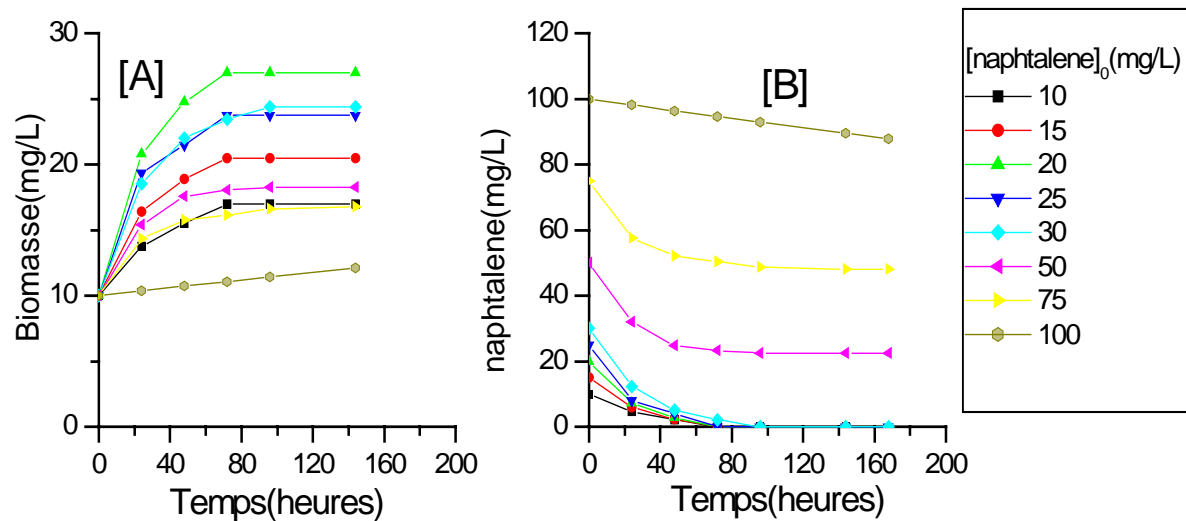


Figure B.4.1 : Cinétiques de croissance de *Pseudomonas* sp. [A] et de biodégradation du naphthalène[B] à différentes concentrations initiales .
 $T=30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7.0$

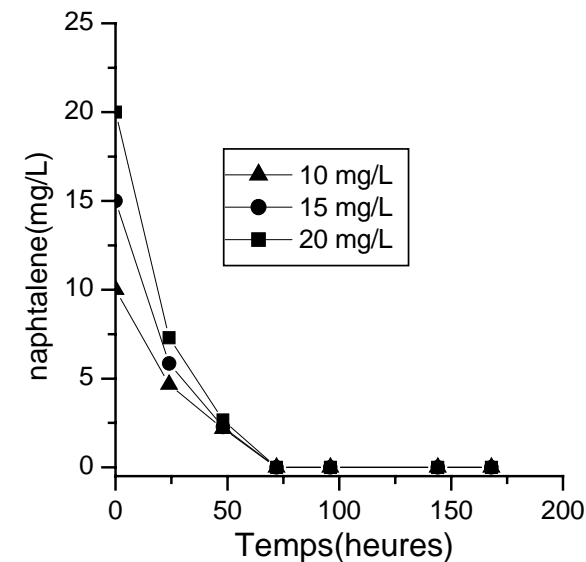


Figure B.4.1.a : Cinétiques de biodégradation du naphthalène aux concentrations initiales (10-20mg/L) .

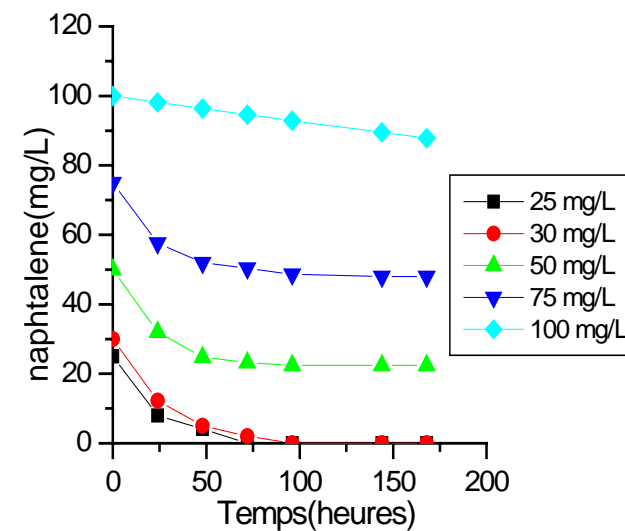


Figure B.4.1.b : Cinétiques de biodégradation du naphthalène aux concentrations initiales (25-100mg/L) .

Résultats et Discussion

Les résultats (figures B.4.1 [A] et [B]) montrent l'absence de la phase de latence lors de la croissance des *Pseudomonas sp.*, ce qui prouve une bonne adaptation au naphthalène comme source de carbone et d'énergie. La souche isolée provient d'un site systématiquement contaminé par des hydrocarbures lourds saturés et cycliques (HPA, asphaltènes, gas-oil et autres), ce qui lui confère une aptitude naturelle à dégrader le naphthalène en développant l'ensemble des enzymes responsables de la dégradation de ce type d'hydrocarbures. Donc les enzymes responsables du métabolisme du naphthalène par la souche de *Pseudomonas sp.* isolée sont des enzymes induites en présence du naphthalène (comme la NDO) .

La biodégradation peut être classée comme une « biodégradation gratuite »[Grady, 1985].

La croissance de la biomasse accompagnant la dégradation du naphthalène, démarre dès les premières heures, celle-ci est dûe à une activité élevée de l'enzyme dioxygénase .

Les vitesses de croissance et de biodégradation augmentent avec la concentration. Aux concentrations initiales de 10 à 20 mg/L, le taux de croissance croît avec la concentration initiale en naphthalène et le rendement de biodégradation atteint le 100 % au bout de 3 jours d'incubation avec une vitesse moyenne de biodégradation allant de 0.14 et 0.3 mg L⁻¹ h⁻¹. Pour de faibles concentrations , il y a un phénomène d'inhibition par manque de substrat, la vitesse de croissance est faible et le naphthalène dégradé sert principalement au maintien énergétique des bactéries . A 20 mg/L le taux de croissance est plus important d'où l'obtention d'une biomasse maximale.

Par ailleurs, un phénomène d'inhibition partielle est observé au-delà de 20 mg/L suite à l'inhibition par excès de substrat et à l'accumulation excessive d'acide salicylique. La vitesse globale du processus diminue avec la concentration. La biomasse atteinte au bout de 5-6 jours d'incubation est plus faible et le rendement final d'élimination de naphthalène varie entre 50 et 10% pour des concentration allant de 50 à 100 mg/L respectivement. Les *Pseudomonas sp.* isolées sont peu exigeantes et résistantes dans les milieux appauvris en éléments nutritifs (naphthalène, source d'azote, oxygène) car on remarque l'absence de la phase de déclin, même après un temps assez long (7jours). En conclusion, les résultats expérimentaux ont montré que la croissance des bactéries peut être indicatrice de la biodégradation du naphthalène. Par ailleurs, un suivi de la cinétique de croissance pourra être exploité pour le suivi en prévision de la biodégradation dans les milieux pollués.

B.4.2. Détermination des paramètres cinétiques de la croissance des *Pseudomonas sp.* et de la biodégradation du naphthalène

a. Vitesse spécifique de croissance μ :

La vitesse spécifique de croissance μ étant définie comme la vitesse de croissance (mg /L h) rapportée à l'unité de biomasse (mg/L) produite en (h^{-1})[Scriban, 1995] :

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{d \ln(X)}{dt} \quad (B.1)$$

où X est la biomasse sèche en mg/L.

t : temps d'incubation (h)

Cette grandeur μ est déterminée pour chaque concentration initiale à partir des tracés de la courbe de croissance $\ln(X) = f(\text{temps})$. Les valeurs de μ sont déterminées en mesurant les pentes pour la zone de croissance seulement (phase logarithmique).

La figure B.4.2-a illustre la variation de la vitesse spécifique de croissance μ en fonction de la concentration initiale en naphthalène S_0 . L'existence d'un maximum sur la courbe montre que la croissance bactérienne présente une zone de limitation par manque de substrat pour des concentrations inférieures à 20 mg/L et une zone d'inhibition par excès de substrat pour des concentrations au-delà de 20 mg/L. Une valeur maximale $0.035 h^{-1}$ est obtenue pour une concentration 20 mg/L.

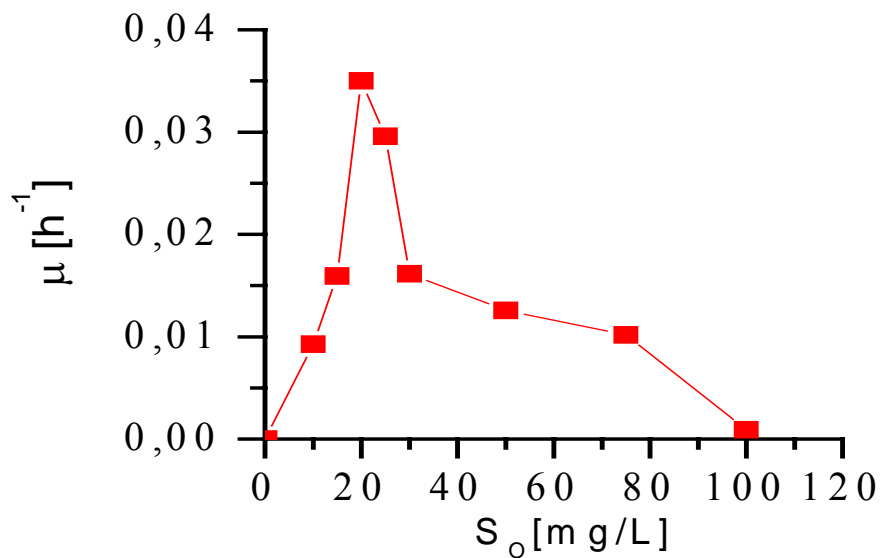


Figure B.4.2.a : Influence de la concentration en naphthalène sur la vitesse spécifique de croissance

b. Rendement en biomasse $Y_{X/S}$:

Le rendement en biomasse $Y_{X/S}$ est défini comme étant le rapport de la quantité (ou concentration) de biomasse produite à la masse (ou concentration) de produit consommé durant la phase de croissance.

$$Y_{X/S} = \frac{-dX}{dS} \quad (\text{mg/mg}) \quad (\text{B.2})$$

où

X : concentration en biomasse (mg/L)

S : concentration en substrat(naphtalène) (mg/L)

Une valeur moyenne peut être calculée :

$$Y_{X/S} = \frac{-\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (\text{B.3.})$$

X_0 et X_f : concentrations initiale et finale en biomasse (mg/L) respectivement.

S_0 et S_f : concentrations initiale et finale en substrat (naphtalène) (mg/L) respectivement.

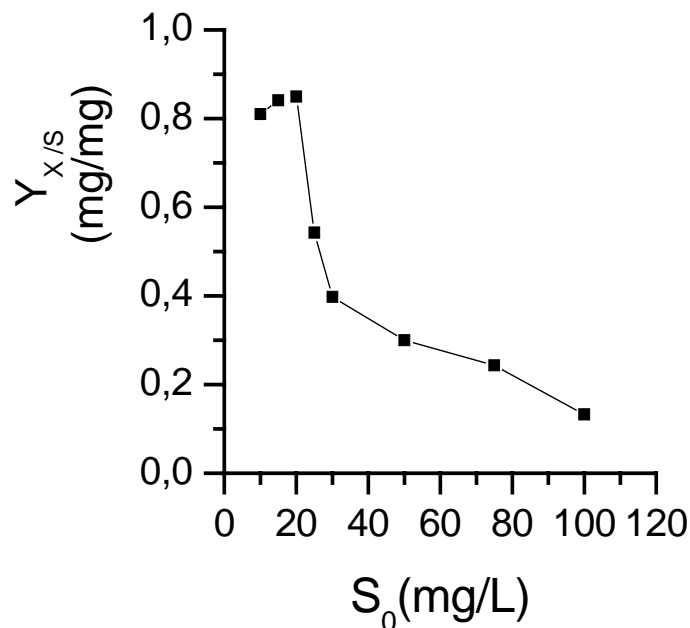


Figure B.4.2.b : Variation du rendement en biomasse en fonction de la concentration initiale en naphtalène

La valeur de $Y_{X/S}$ dépend de la concentration initiale. La figure B.4.2.b illustre cette variation de 0.8 à 0.15 (g/g) pour les concentrations 10 et 100mg/L respectivement. . Pour le cas de l'inhibition par excès de substrat, le métabolisme du naphtalène correspond à un métabolisme

de maintien à 80% et non pas de croissance. Pour la zone de vitesse spécifique optimale, 85% du carbone converti à partir de la dégradation du naphthalène sert à l'anabolisme (synthèse cellulaire) bactérien.

c. Temps de doublement t_d :

La croissance des bactéries se fait par fission binaire et le temps requis pour l'obtention du double de la quantité initiale en biomasse est appelé temps de doublement t_d . (ou de génération). Cette grandeur est obtenue à partir de l'équation suivante :

$$\mu = \frac{d(\ln X)}{dt} \quad (\text{B.1.})$$

$$d'où : d(\ln X) = \mu dt$$

En intégrant entre X et X_0 et t et t_0 respectivement, et en considérant μ constant durant la phase exponentielle, on obtient :

$$\int_{X_0}^X d \ln(X) = \int_{t_0}^t \mu dt$$

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu (t - t_0) \quad (\text{B.4.})$$

Pour $t = t_d$; $X = 2 X_0$

$$d'où : t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{B.5.})$$

Le tableau B.4.2.c. illustre les valeurs de t_d pour les différentes concentrations initiales en naphthalène.

Tableau B.4.2.c : Temps de doublement en fonction de la concentration initiale en naphthalène

Concentration naphthalène (mg/L)	Temps de doublement (heures)
10	75
15	44
20	20
25	23
30	43
50	55
75	68
100	770

Le temps de doublement minimal (20-23 heures) est atteint pour une gamme de concentrations 20-25 mg/L. Pour des concentrations trop élevées, ce temps n'est pratiquement pas atteint.

d. Vitesse de biodégradation V :

La vitesse de biodégradation du naphthalène (consommation de substrat) peut être définie comme suit :

$$V = -\frac{dS}{dt} \quad (B.6.)$$

avec S : concentration en substrat.

Sachant que :

$$Y_{X/S} = \frac{-dX}{dS} \quad (B.2.)$$

Et que :

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{d\ln(X)}{dt} \quad (B.1.)$$

On a :

$$V = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad (B.7.)$$

La vitesse initiale sera :

$$V_0 = \frac{\mu X_0}{Y_{X/S}} \quad (B.8.)$$

avec : X_0 la concentration initiale en biomasse.(10 mg/L)

On pourra alors calculer V_0 pour différentes concentrations initiales en naphthalène, (figure B.4.2.d)

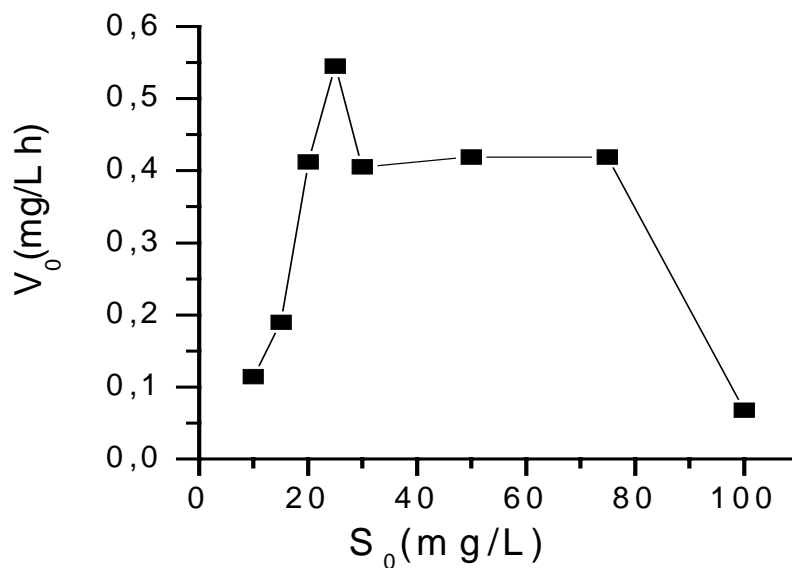


Figure B.4.2.d : Variation de la vitesse initiale de biodégradation de naphthalène par *Pseudomonas* sp. en fonction de la concentration initiale pour une concentration initiale en biomasse($X_0 = 10$ mg/L)

B.4.3. Modélisation

La littérature [Scriban, 1995 ; Okpokwasili et Nweke, 2005] rapporte deux modèles pour la description de la cinétique de croissance microbienne et qui sont fréquemment utilisées dans le domaine de la biodégradation des composés xénobiotiques :

i- Modèle de MONOD : équation à deux paramètres, analogue à celle de Michaelis-Menten décrivant la cinétique enzymatique [Pavé, A., 1994 ; Scriban, 1995]. L'équation de Monod donne la relation entre la vitesse spécifique de croissance μ et la concentration du substrat S :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (\text{A.1})$$

où μ_{\max} : vitesse spécifique maximale (h^{-1}), obtenue pour

K_s : constante de saturation (mg/L)

μ_{\max} est obtenue pour des concentrations élevées $S \gg K_s$

K_s est la concentration pour laquelle la vitesse $\mu = \mu_{\max} / 2$. Plus la valeur de K_s est faible plus l'affinité substrat – microorganismes est élevée.

ii- Modèle de HALDANE : Modèle à trois paramètres, utilisé dans le cas où une inhibition par excès de substrat est observée dans un certain domaine de concentration [Hill et Robinson, 2004 ; Nuhoglu et Yalcin, 2005], ce qui correspond à la dégradation du naphthalène par les *Pseudomonas sp.*.

Le modèle qui sera adopté est représenté par l'expression suivante :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (\text{B.9})$$

où

μ_{\max} et K_s sont les paramètres définis dans le modèle de Monod ,

K_I est la constante d'inhibition (mg/L)

Pour des concentrations élevées $S \gg K_s$, l'équation de Haldane deviendra donc :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{S + \frac{S^2}{K_I}} = \frac{\mu_{\max}}{1 + \frac{S}{K_I}} \quad (\text{B.10})$$

d'où

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{S}{K_I \mu_{\max}} \quad (\text{B.11})$$

c'est la forme linéaire de l'équation de Haldane simplifiée.

Le tracé de la courbe $1/\mu = f(S)$ selon l'équation (B.11) est une droite de pente $1/ K_I \mu_{\max}$ et d'ordonnée à l'origine $1/\mu_{\max}$.

Le tracé des données expérimentales dans la zone d'inhibition $S[25-75 \text{ mg/L}]$ permet d'obtenir les constantes du modèle μ_{\max} et K_I (figure B.4.3.a).

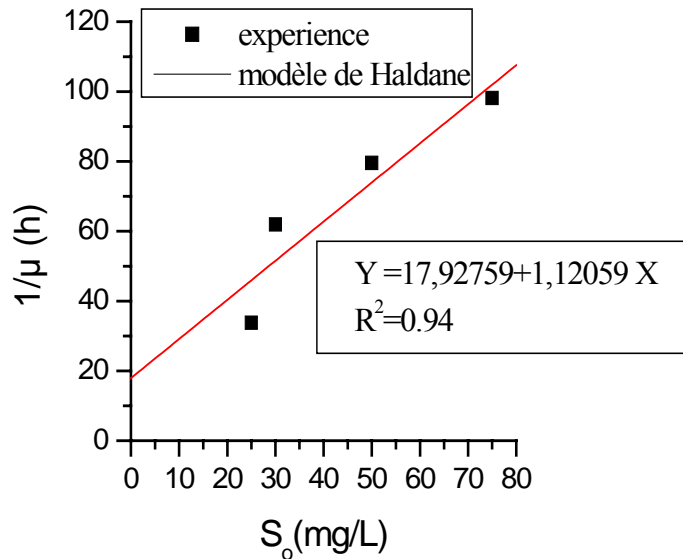


Figure B.4.3.a: Linéarisation de l'équation de Haldane pour les données expérimentales de la biodégradation de naphthalène par *Pseudomonas sp.*

L'on obtient alors :

$$\mu_{\max} = 0.0558 \text{ h}^{-1} \text{ et } K_I = 16 \text{ mg/L}$$

D'autre part le modèle de Haldane présente un maximum μ^* pour une concentration S^* .

En effet, ce maximum est obtenu en portant dans l'équation (B.9) :

$$\frac{d\mu}{dS} = 0$$

ce qui est vérifié pour une concentration

$$S^* = \sqrt{K_S K_I} \quad (\text{B.12})$$

D'où :

$$\mu^* = \frac{\mu_{\max}}{2\sqrt{K_S/K_I} + 1} = \frac{\mu_{\max}}{2(S^*/K_I) + 1} \quad (\text{B.13})$$

D'après les données expérimentales, nous avons : $S^* = 20 \text{ mg/L}$,

d'où $K_S = (S^*)^2/K_I$ et : $K_S = 25 \text{ mg/l}$

L'équation donnant la vitesse spécifique de croissance en fonction de la concentration sera :

$$\mu = \frac{0.0558}{25 + S + \frac{S^2}{16}} \quad (\text{B.14})$$

La figure B.4.3.b illustre les données expérimentales et celles calculées par le modèle de Haldane pour les concentrations initiales de 10 à 75mg/L.

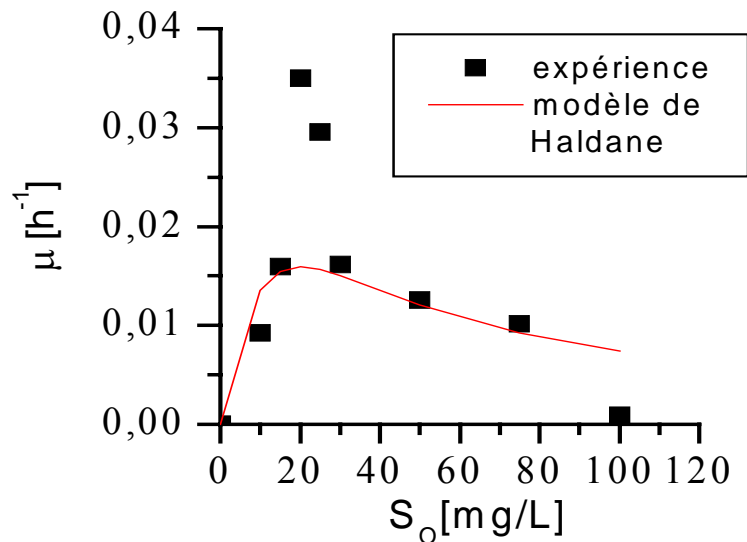


Figure B.4.3.b : vitesse spécifique de croissance des *Pseudomonas sp.* pour différentes concentrations en naphthalène

Ce modèle décrit convenablement les données expérimentales pour les concentrations extrêmes. Cependant, pour les intervalles intermédiaires et principalement pour 20 à 25 mg/L, l'écart entre les valeurs expérimentales et calculées devient trop important.

La vitesse maximale réellement atteinte (0.035 h⁻¹) est inférieure à la vitesse maximale (μ_{max} = 0.0558 h⁻¹) du modèle de HALDANE, qui est dans ce cas, une grandeur hypothétique imputable au phénomène d'inhibition. Le maximum atteint pour la concentration optimale 20 mg/L calculé d'après le modèle μ* = 0.0159 h⁻¹, est inférieure à la vitesse réelle 0.035 h⁻¹. Une modification de l'équation de Haldane est nécessaire pour pouvoir estimer la vitesse du processus dans ce domaine de concentration. L'introduction d'un paramètre supplémentaire prenant en compte la concentration du composé intermédiaire pouvant jouer le rôle d'inhibiteur (l'acide salicylique) [Wang et Loh, 1999] ou bien la prise en compte du coefficient de maintien des cellules [Arinjay et al. 2005], sont parmi les solutions proposées pour améliorer les résultats déduits du modèle de HALDANE.

B.4.4 Simulation

La cinétique de biodégradation peut être simulée à partir des données de la concentration en fonction du temps ($S = f(t)$) estimées par la résolution des équations suivantes :

$$\mu = \frac{d(\ln X)}{dt} \quad (\text{B.1})$$

$$-\frac{dS}{dt} = Y_{x/s} \frac{dX}{dt} \quad (\text{B.2})$$

$$\mu = \frac{0.0558}{25 + S + \frac{S^2}{16}} \quad (\text{B.14})$$

La résolution de ce système d'équations peut être rendue possible en utilisant la méthode d'approche numérique de Runge-Kutta ou bien par approximations moyennes pour des intervalles de temps limités. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure B.4.3.c

Le modèle paraît adéquat pour les concentrations initiales modérées et au début du processus. Il pourra être exploité pour la prévision des données de biodégradation, l'optimisation et que la conception d'un procédé de Bioremediation.

Pour les concentrations élevées il est nécessaire de modifier l'équation de vitesse spécifique de façon à prendre en compte qu'après un certain temps, le métabolisme de croissance s'arrête et il est remplacé par un métabolisme de maintien consommant moins de substrat et conduisant à une vitesse de dégradation assez faible [Arinjay et al., 2005].

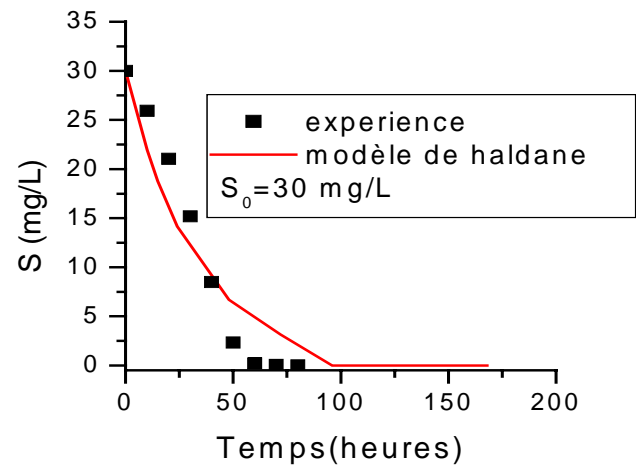
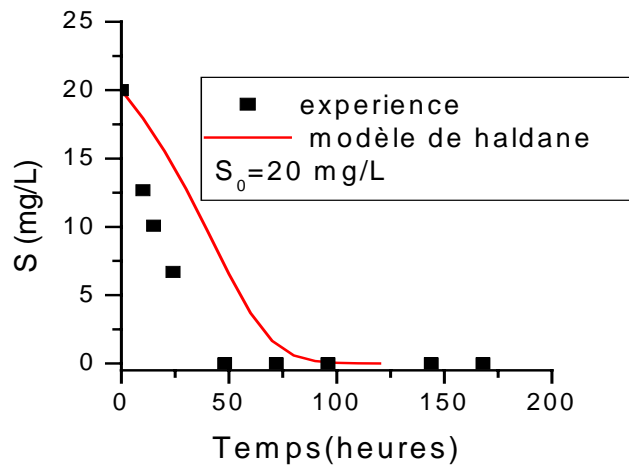
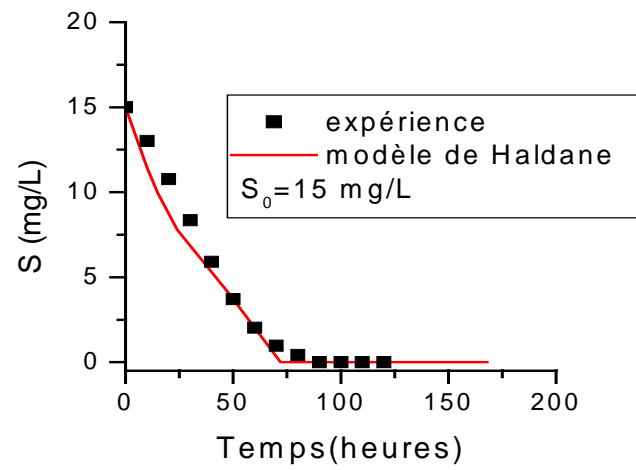
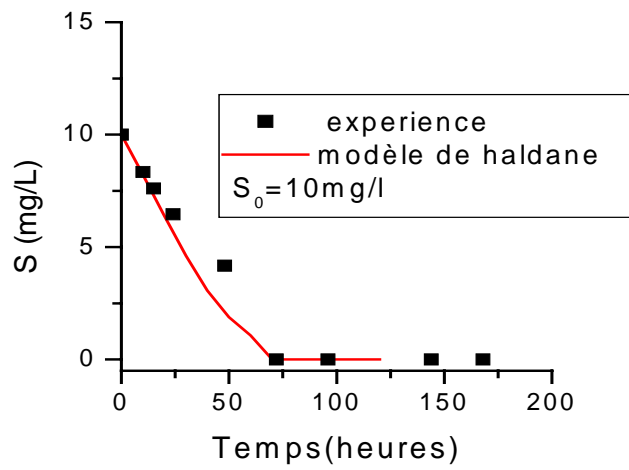


Figure B.4.3.c : Données expérimentales et calculées de la cinétique de biodégradation du naphthalène par *Pseudomonas sp.*

B.5. ETUDE COMPARATIVE DE LA BIODEGRADATION DU NAPHTALÈNE PAR DES CELLULES LIBRES ET IMMOBILISÉES DE *PSEUDOMONAS sp.*

La capacité de la souche isolée à utiliser le naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie a été montrée au cours des essais réalisés avec des cellules libres. L'intérêt est porté maintenant sur l'étude de la biodégradation du naphthalène aux concentrations élevées dans la zone présentant une inhibition partielle. L'inhibition a lieu pour des concentrations supérieures à 20mg/L. Les limitations diffusionnelles provoquées par l'immobilisation des *Pseudomonas* sur un support adéquat affectent le rendement global et la cinétique de la réaction de biodégradation du naphthalène. Les avantages et les contraintes de l'immobilisation des cellules ont déjà été discutés (A.V.3.). La gamme de concentration choisie pour cette étude comparative est donc de 25 à 75 mg/L.

B.5.1. Cultures d'enrichissement

Pour les essais avec cellules libres en batch, le milieu minéral de base (MMBL) est constitué de (en g par 1000 mL d'eau distillée stérilisée) :

- Di-Potassium hydrogénophosphate (K_2HPO_4 (0.38))
- Sulfate de Magnesium heptahydraté ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2))
- Chlorure d'ammonium (NH_4Cl (1.0))
- Perchlorure de fer ($FeCl_3$ (0.05))
- Sulfate de Zinc ($ZnSO_4$ (0.025))
- Chlorure de Sodium ($NaCl$ (0.5))
- Extrait de levure (0.01).

Pour les essais réalisés avec les cellules immobilisées dans l'alginate de calcium la composition du milieu de base (MMBI) est la suivante (en g/L) :

- Di-Potassium hydrogénophosphate* (K_2HPO_4 (0.15))
- Sulfate de Magnesium heptahydraté ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2))
- Chlorure d'ammonium (NH_4Cl (1.0))
- Perchlorure de fer ($FeCl_3$ (0.05))
- Sulfate de Zinc ($ZnSO_4$ (0.025))
- Chlorure de Sodium ($NaCl$ (0.5))
- Extrait de levure (0.01)
- Chlorure de calcium ($CaCl_2$ (0.2))

Pour les deux milieux, 1ml d'une solution traces d'oligo-éléments est ajouté.

*La concentration en phosphate est réduite dans le milieu utilisé pour les cellules immobilisées car leur présence favorise la dissolution de l'alginate de calcium et par la suite rend le support chimiquement et mécaniquement moins stable et provoque ainsi la fuite des cellules bactérienne.

Le pH est ajusté à 7.0 . Le naphthalène à différentes concentrations (25-75 mg/L) est dissous dans le N,N-diméthylformamide ou le Tween 80, puis ajouté au milieu stérile, avec agitation vigoureuse afin d'obtenir une suspension homogène.

Méthode d'immobilisation

Le protocole d'immobilisation est un protocole classique illustré par la figure B.5.1 et décrit par plusieurs auteurs [Emily et al.1996; Smidsord 1990; Trevor 1992] : Les cellules de *Pseudomonas sp.* sont cultivées dans le milieu (MMBI) contenant le naphthalène (20 mg/L) sur agitateur orbital à 30°C, et les bactéries séparées par centrifugation pendant la phase préstationnaire (48 heures). Une solution d'alginate de sodium dans l'eau distillée stérile (3% poids/vol.) est préparée et autoclavée à 120°C pendant 15minutes. Les microorganismes préparés à partir des précultures (3 g poids sec pour 100 mL de solution d'alginate) sont maintenus en suspension par agitation . Le mélange est ajouté goutte à goutte à l'aide d'une seringue à une solution CaCl₂ (0.05 M) où des particules sphériques d'alginate de calcium de diamètre moyen 2 mm sont instantanément formées. Les billes sont laissées au repos pendant 1 heure, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée. Pour la production de billes en quantité importante, une pompe péristaltique est utilisée avec une conduite flexible au bout de laquelle est branchée l'aiguille de la seringue.

B.5.2.Essais en batch

Pour les deux types de préparations (cellules libres ou immobilisées) l'étude en batch est conduite dans des erlenmeyers de 250 mL sous agitation 200 tours/min (agitateur orbital GFL3005) à température constante (30°C). Les erlenmeyers contenant 100 mL de milieu MMBL ou MMBI. Le pH du milieu ajusté à 7.0 ± 0.2 à l'aide d'une solution de soude ou d'acide hydrochlorique est mesuré à l'aide d'un pH mètre InolabWTW. Dans le cas de cellules libres, l'inoculum servant à l'ensemencement des cultures est une suspension obtenue à partir de fragment de colonies prélevées sur les boites de petri et diluées dans de l'eau physiologique ou dans le milieu MMB . La suspension est homogénéisée au vortex (ZX3-VELP) pendant 30 secondes avant de servir à l'ensemencement (2 mL /50mL). Pour les *Pseudomonas sp.* immobilisées, 25 g de billes sont placées dans 100ml de milieu de culture contenant la source de carbone à la concentration requise(25, 50, 75 mg/L) à partir d'une solution mère (1g/L) dans un volume minimal de Diméthyl formamide(DMF) ou de Tween 80.

Les échantillons qui sont prélevés à des intervalles de temps réguliers, sont destinés à l'analyse du naphthalène résiduel. Afin de suivre la croissance bactérienne, 0.1 g de billes (approxim.) sont prélevées et immergées dans une solution de polyphosphate (1M , pH = 7) où elles sont dissoutes par agitation afin de libérer les bactéries et mesurer leur nombre ou leur masse des bactéries.

Pour le cas des cellules libres, les cultures sontensemencées avec 0.5 mL d'une suspension bactérienne dense de façon à obtenir la même concentration initiale que pour les cellules immobilisées en gardant les mêmes conditions de culture que précédemment.

Des échantillons de solutions sont prélevés à des intervalles de temps réguliers afin de procéder à leur séparation des cellules bactériennes ou des billes d'alginate par centrifugation . Le naphthalène résiduel dans le surnageant est analysé par HPLC/UV, selon la méthode décrite précédemment.

Des essais témoins (sans bactéries) réalisés en parallèle afin de quantifier la dégradation non biologique (abiotique) due à l'évaporation ou à l'adsorption par les particules d'alginate de calcium ont montré un taux de dégradation négligeable (inférieur à 2%) pendant une durée de 5 jours .

Une analyse de la surface d'une particule d'alginate de calcium contenant les cellules immobilisées a été effectuée par microscope électronique à balayage (Philips XL30) avant et après 48 heures d'incubation.

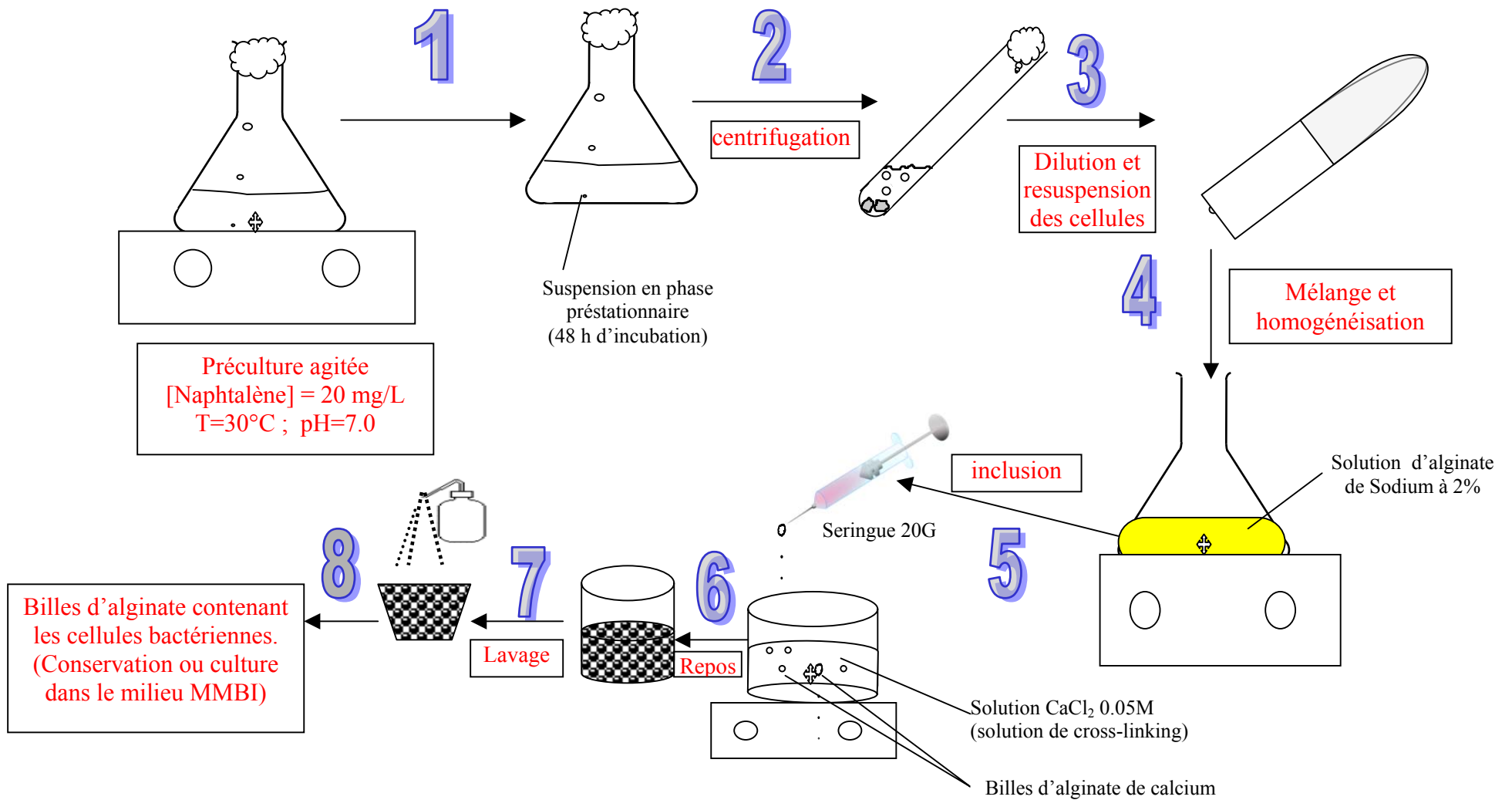


Figure B.5.1 : Protocole expérimental de l'immobilisation des cellules de *Pseudomonas sp.* dans l'alginate de calcium

B.5.3. Résultats & discussion

B.5.3.1. Cinétique de biodégradation du naphthalène par des cellules libres et immobilisées

Les *Pseudomonas sp.* isolées ont prouvé leur capacité à utiliser le naphthalène comme source d'énergie et de carbone pour assurer leur croissance et leur activité métaboliques. Cette même souche a déjà fait l'objet de travaux sur la biodégradation des hydrocarbures des fractions pétrolières [Maachi *et al.*, 2001]

L'inclusion dans l'alginate de calcium a été choisie comme méthode d'immobilisation, car à mettre en œuvre, garantissant un taux de rétention élevé, assurant une viabilité des bactéries ainsi qu'une stabilité chimique et mécanique du support, tout en contrôlant les dimensions des particules et leur forme [Emily *et al.*, 1996].

La figure B.5. montre la croissance bactérienne reflétée par l'état de surface du support avant et après 48 h d'incubation.

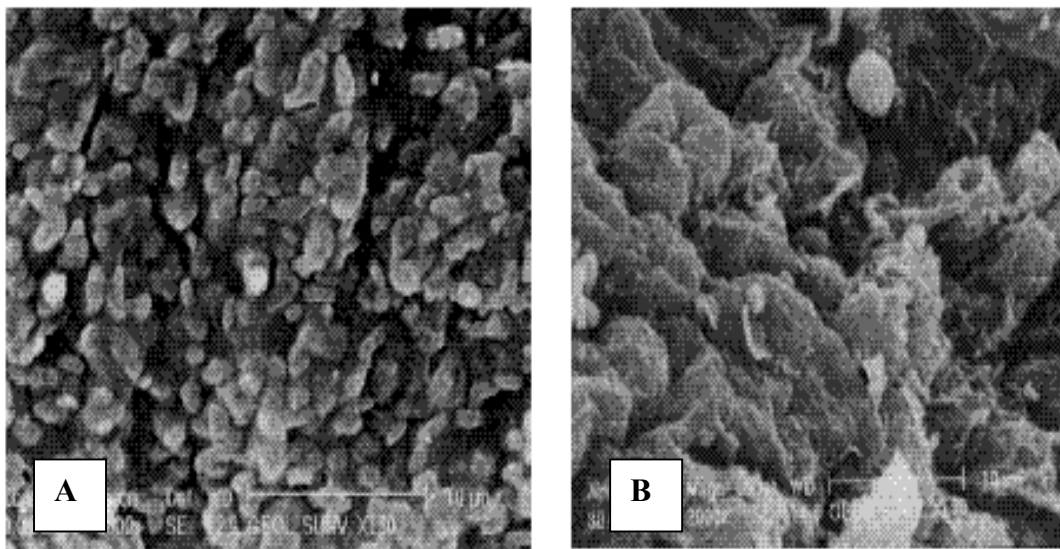


Figure B.5. : Cellules immobilisées de *Pseudomonas sp.* sur la surface d'une particule d'alginate de calcium avant [A] et après [B] 48 heures d'incubation

Les résultats de l'étude de la biodégradation du naphthalène en batch à différentes concentrations initiales par les cellules libres ou immobilisées de *Pseudomonas sp.* Sont présentés sur les figures B.5.1 [A] et [B], respectivement, sous la forme S/S_0 (S_0 étant la concentration initiale en naphthalène) fonction du temps d'incubation (en heures) .

L'absence de la phase de latence, montre à nouveau la bonne adaptation des cellules à la source de carbone et au milieu utilisé. La dégradation complète du naphthalène par les cellules libres de *Pseudomonas sp.* est complète après seulement quatre jours pour une concentration

initiale en naphthalène de 25 mg/L alors qu'on atteint un maximum de 60% pour des concentrations plus élevées. Ceci est dû à un phénomène d'inhibition imputable au substrat. Avec les cellules immobilisées (figure B.5.3.1[B]) et pour des concentrations initiales 25 et 50 mg/L la dégradation complète était obtenue après 117 et 167 heures respectivement alors que pour 75 mg/L ,la dégradation ne dépasse pas 80% même après 15 jours d'incubation. La vitesse initiale de biodégradation du naphthalène par les cellules immobilisées est moins importante qu'avec les cellules libres. La concentration effective à l'intérieur des billes est inférieure à celle trouvée dans le milieu liquide en raison des contraintes de diffusion à l'intérieur des particules d'alginate de calcium, ce qui ralentit le processus . Cependant, ces contraintes de diffusion ont un effet bénéfique pour la biodégradation car elles protègent les bactéries contre les concentrations élevées en naphthalène, en diminuant ainsi l'effet d'inhibition par le substrat [Callegari et Francotte, 1986].

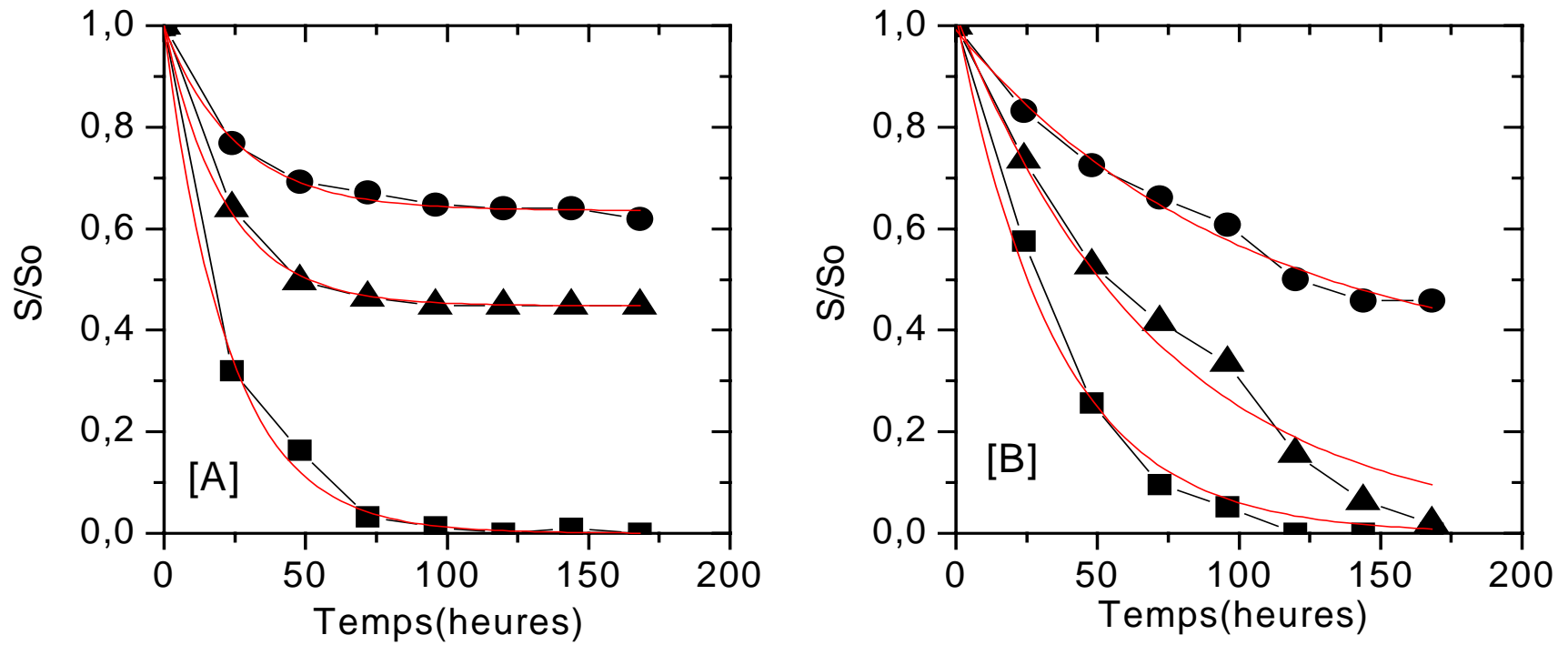


Figure B.5.3.1: Biodégradation du naphthalène par *Pseudomonas sp. libres* [A] et immobilisées sur alginate de calcium [B] à différentes concentrations initiales (—■—) 25 mg/L (—▲—) 50 mg/L (—●—) 75 mg/L (—) modèle. T = 30°C ; pH = 7.0

B.5.3.2. Modélisation

Vu les écarts parfois importants rencontrés lors de l'utilisation des modèles classiques, notamment celui de HALDANE, pour la prévision des données cinétiques ainsi que l'absence de données de croissance dans le cas des cellules immobilisées, il nous a semblé nécessaire de procéder à un lissage (point par point) des courbes de la cinétique de biodégradation afin d'obtenir un modèle adéquat qui permettra son exploitation pour le calcul de la vitesse de biodégradation et la déduction des paramètres cinétiques. Le lissage est réalisé à l'aide du logiciel « Microcal™ Origin version 6.0 .1999».

Le modèle cinétique exponentiel de premier ordre, incluant un décalage donnant la variation de la concentration en fonction du temps pour les cas de cellules libres et immobilisées peut être proposé aux conditions données sous la forme :

$$\frac{S}{S_0} = Y_0 + A_1 \exp\left(-\frac{t}{t_1}\right) \quad (\text{B.15})$$

Les constantes Y_0 , A_1 et t_1 sont les paramètres du modèle données dans le tableau B.5.3.1. Le temps de demi-réaction expérimental $t_{1/2}$ est obtenu pour $S/S_0 = 0.5$. L'exactitude du modèle est testée statistiquement par le test χ^2 (Chi2) avec un intervalle de confiance de 0.95. Le coefficient de corrélation varie entre 0.96 et 0.98 dans tous les cas. Les courbes de données expérimentales et calculées sont illustrées par les figures B.5.3.1 [A] et [B].

Tableau B.5.3.1 : Valeurs expérimentales du temps de demi-réaction ($t_{1/2}$) et paramètres du modèle cinétique pour la réaction de biodégradation du naphthalène par cellules libres et immobilisées de *Pseudomonas sp.*

Concentration initiale(mg/L)	Cellules libres				Cellules immobilisées			
	$t_{1/2}$ (heures)	Y_0	A_1	t_1 (heures)	$t_{1/2}$ (heures)	Y_0	A_1	t_1 (heures)
25	18.1	0.000	0.996	22.7	29.5	0.000	1.021	35.3
50	48.1	0.448	0.554	21.56	53.6	0.000	1.021	71.1
75	ND	0.619	0.374	30.05	122.0	0.317	0.673	100.74

ND : non déterminé

B.6. ESTIMATION DES PARAMETRES CINETIQUES

B.6.1. Facteur d'Efficacité, η

Le facteur d'efficacité expérimental η est défini comme étant le rapport de la vitesse globale de la réaction de biodégradation par les cellules immobilisées à la vitesse globale de la réaction avec les cellules libres sous les mêmes conditions opératoires [Mavituna, 1979]. Il caractérise le degré d'influence des contraintes de diffusion dans le support sur la vitesse

globale de la réaction. Il est lié à une autre grandeur adimensionnelle appelée module de THIELE Φ par l'expression suivante :

$$\eta = \frac{R}{R_{\max}} = \frac{1}{\Phi} \left(\frac{1}{\tanh 3\Phi} - \frac{1}{3\Phi} \right) \quad (\text{A.8})$$

avec :

$$\Phi = \frac{r_p}{3} \sqrt{\frac{k}{D_{\text{eff}}}} \quad (\text{A.6})$$

où :

R : vitesse initiale de la réaction pour le cas de cellules immobilisées (mg/L h)

R_{\max} : vitesse maximale correspondant à des contraintes de diffusion nulles (cellules libres) (mg/L h)

k : constante de vitesse d'ordre 1 (g de solution/(g de poids sec de cellules x seconde))

D_{eff} : coefficient de Diffusion effective à l'intérieur de la particule (cm^2/s)

r_p : rayon de la particule sphérique (cm)

Φ : module de THIELE.

η est obtenu en calculant R et R_{\max} à partir de l'équation (B.15) pour différentes concentrations initiales, ensuite Φ est évalué par approximations successives à partir de l'équation (A.8) et k/D_{eff} à partir de l'équation (A.6). Les valeurs obtenues sont illustrées sur le tableau B.6.1.

Tableau B.6.1 : valeurs expérimentales du facteur d'efficacité η , du module de THIELE Φ et de $(k/D_{\text{eff}})^{1/2}$

Concentration initiale (mg/l)	R_{\max} ($\text{mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$)	R ($\text{mg l}^{-1}\text{h}^{-1}$)	η	Φ	$(k/D_{\text{eff}})^{1/2}$ (cm^{-1})
25	1.100	0.723	0.657	1.08	32.4
50	1.284	0.718	0.559	1.35	40.5
75	0.933	0.501	0.537	1.43	43.0

L'ordre de grandeur des valeurs du facteur d'efficacité ($\eta < 1$) montrent le degré d'influence de l'effet de transfert de masse et des contraintes de diffusion internes sur la cinétique globale de la biodégradation du naphthalène.

La résistance au transfert réduit la vitesse du processus de plus de 50%. Cependant, les valeurs du module de THIELE Φ ne sont pas très élevées; ceci est dû probablement à l'utilisation d'un agent solubilisant (DMF ou tween 80). Un autre critère peut être choisi lorsque la dépendance efficacité-concentration est forte, en comparant les temps requis pour

un degré de conversion donné par la même masse de cellules libres ou immobilisées [Buchholz, 1982].

B.6.2. Coefficient de diffusion effective

Le coefficient de diffusion effective (D_{eff}) peut être calculé à partir du module de Thiele (équation A.6) en évaluant la constante de vitesse (k) de la réaction supposée d'ordre 1 (équation A.2), pour un poids sec de bactéries par volume de particules d'alginate [Willaert et al., 1996 a,b] :

$$\text{D'après A.6 :} \quad \Phi = \frac{k r_p^2}{9 D_{eff}}$$

$$\text{d'où} \quad D_{eff} = \frac{k r_p^2}{9 \Phi} \quad (\text{B.16})$$

D'après A.2, la constante k est donnée par :

$$k = \frac{V_{max}}{K_S} = \frac{\mu_{max}}{K_S} \frac{m}{V_p} \quad (\text{B.17})$$

avec :

μ_{max} : vitesse spécifique maximale = $0.0558 \text{ h}^{-1} = 1.55 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

K_S : constante d'affinité = $25 \text{ mg/L} = 25 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$

m : masse sèche immobilisée (mg)

V_p : volume de la particule d'alginate (cm^3)

La mesure approximative de la biomasse immobilisée est effectuée par dissolution d'une quantité déterminée de billes dans une solution de phosphates afin de libérer les cellules et mesurer la densité optique de la solution. La masse de cellules sèche est obtenue par la courbe d'étalonnage (figure B.2.A). En divisant cette masse par le nombre de particules, on obtient approximativement le rapport $\frac{m}{V_p} = 0.78 \text{ mg/cm}^3$

En remplaçant dans (A.17), on trouve : $k = 4.84 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

Enfin en substituant k dans (B.16) on pourra obtenir pour un rayon de particule $r_p = 0.1\text{cm}$; et une valeur du module de THIELE $\Phi = 1.03$

$$D_{eff} = 5.10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$$

La valeur obtenue n'est qu'une évaluation approximative de l'ordre de grandeur de la diffusivité du naphthalène à l'intérieur du gel d'alginate, car la valeur réelle dépend de la composition du matériau, de sa structure ainsi que de la charge en biomasse [Willaert et al.,1996b] ; ceci permettra de faire une estimation quantitative de la contribution du transfert de masse interne dans le processus global de dégradation.

La valeur obtenue peut être comparée au coefficient de diffusion du naphthalène dans l'eau (sans contraintes) calculée à partir de la corrélation de Wilke et Chang à 25°C [Perry et al., 1984] :

$$D_{eau} = 1.1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec.}$$

Les limitations diffusionnelles internes entraînant la diminution de la vitesse du processus de l'ordre de 50%.

B.6.3. Profil de concentration

Le gradient de concentration établi à l'intérieur de la particule d'alginate suite à l'existence de la résistance au transfert de masse évaluée à l'aide du modèle de Thiele , peut être illustré sur la figure B.6.3. en traçant la concentration relative S/S_0 en fonction de la position relative r/r_p à partir de l'équation donnant le bilan de masse au niveau d'une particule :

$$D_{eff} \left(\frac{d^2 S}{dr^2} + \frac{2}{r} \left(\frac{dS}{dr} \right) \right) = R_v \quad (\text{A.4})$$

où

R_v : est la vitesse de la réaction par unité de volume

Pour une réaction d'ordre 1 : $R_v = k S$

La résolution de cette équation différentielle pour les conditions aux limites :

- à $r = r_p$ (rayon de la particule) on a $S = S_s$ (S_s : concentration à la surface de la particule)

- à $r = 0$ on a $S = 0$

On obtient ainsi l'équation donnant la variation de S avec la position radiale r :

$$S = S_s \frac{r_p}{r} \frac{\sinh(3\Phi r/r_p)}{\sinh(3\Phi)} \quad (\text{A.5.})$$

En négligeant la résistance au transfert externe on a $S_s = S_o$.

S_o : concentration initiale de naphthalène en solution

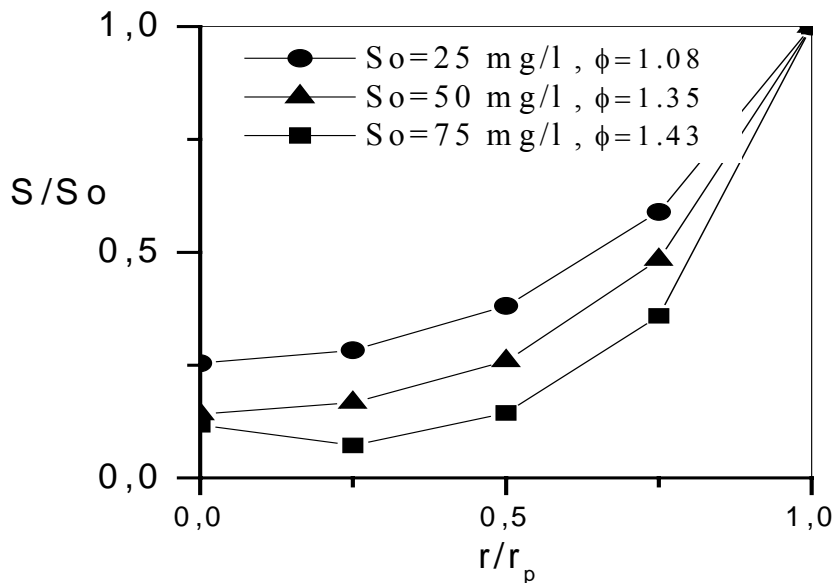


Figure B.6.3 : Profil de concentration de naphthalène à l'intérieur des particules d'alginate

La concentration du naphthalène atteignant les cellules bactériennes à l'intérieur des particules d'alginate varie entre 20 et 50 % de la concentration à la surface ou à l'extérieur des billes. Lorsque la concentration à l'extérieur est modérée, la concentration au centre de la particule se trouve si faible que la vitesse de bioconversion du naphthalène est négligeable et le processus de dégradation est pratiquement localisé à la surface de la particule. Alors qu'à des concentrations élevées, le phénomène d'inhibition a lieu au voisinage de la surface de la particule ; la concentration au centre se trouve proche de sa valeur optimale et la vitesse de bioconversion aussi.

En conclusion, cette partie a été consacrée à l'étude comparative de la biodégradation du naphthalène par des cellules libres ou immobilisées sur l'alginate de calcium pour des concentrations de 25 mg/L à 75 mg/L aux conditions optimales de température et de pH. Les résultats de l'étude en batch ont montré que la vitesse de biodégradation dépendait de la concentration initiale et que le taux maximal d'élimination du substrat est obtenu dans le cas des cellules immobilisées.

Les contraintes diffusionnelles à l'intérieur des particules d'alginate limitent l'effet de l'inhibition par le substrat. Un modèle statistique a été établi à partir des résultats expérimentaux afin d'exprimer l'évolution de la concentration résiduelle en naphthalène en

fonction du temps. Les constantes du modèle ont été déterminées par la méthode des moindres carrés, et des tests statistiques ont permis de valider sa consistance. Les équations obtenues ont été utilisées pour le calcul du facteur d'efficacité et du module de THIELE.

Les résultats ont montré que l'effet de limitations diffusionnelles est significatif et doit être pris en compte durant les calculs de conception d'un Bioréacteur [Buchholz, 1982].

Le coefficient de diffusion de naphthalène à l'intérieur des particules d'alginate a été déterminé à partir des résultats précédents et comparé à la valeur trouvée pour la diffusion dans l'eau pure. Les résultats de l'étude en batch peuvent être utilisés pour le dimensionnement d'un réacteur en continu du type lit fixe.

CONCLUSION

Une souche bactérienne appartenant à l'espèce *Pseudomonas* a été isolée et testée pour sa capacité à dégrader un composé polyaromatique, le naphthalène. La souche identifiée par des tests morphologiques et biochimiques comme *Pseudomonas sp.* utilise le naphthalène comme seule source d'énergie et de carbone pour garantir le maintien de son métabolisme de croissance et d'entretien. Les paramètres optimaux de croissance et de biodégradation ont été estimés ($T_{opt} = 30^{\circ}\text{C}$; $\text{pH}_{opt} = 7.0$; $[\text{naphthalène}]_0 = 20 \text{ mg/L}$; Source d'azote = NH_4Cl) . Le mécanisme de biodégradation a été identifié à partir de tests enzymologiques et chimiques. Le rôle de l'enzyme naphthalène-dioxygénase au début de la réaction ainsi que la production de l'acide salicylique ont été mis en évidence.

La cinétique de croissance a été étudiée aux conditions optimales dans des cultures en batch pour une gamme de concentrations allant de 10 à 100 mg/L . Les résultats montrent une adaptation à l'utilisation du naphthalène comme source de carbone, reflétée par l'absence d'une phase de latence lors de la croissance bactérienne. Les essais ont permis l'estimation de l'influence de la concentration initiale en naphthalène sur les paramètres cinétiques de croissance tel que la vitesse spécifique, le temps de doublement et le taux de croissance. Un phénomène d'inhibition par excès de substrat a été observé pour des concentration allant de 25 à 100 mg/L. Une croissance et un taux de dégradation optimaux ont été obtenus pour une concentration 20 mg/L. La connaissance de ces paramètres est indispensable pour la compréhension et la maîtrise du processus de biodégradation, en identifiant les étapes limitantes et les facteurs les contrôlent.

Le modèle simple de HALDANE a été adopté pour la description mathématique des données expérimentales dans la gamme de concentration étudiée. Les paramètres du modèle d'inhibition de HALDANE (μ_{max} ; K_s ; K_I) ont été estimés à partir des données expérimentales, et la simulation des données de la cinétique de biodégradation a montré que le modèle est convenable pour les concentrations extrêmes.

Afin d'examiner la possibilité d'utilisation des cellules immobilisées comme solution envisageable pour limiter l'effet d'inhibition par le substrat, les cellules bactériennes de la souche isolée ont été ensuite fixées par confinement dans l'alginate de calcium en vue d'une

étude comparative de la biodégradation du naphthalène par des cellules immobilisées et libres dans le domaine d'inhibition (25 à 75 mg/L).

La méthode d'immobilisation est simple dans sa mise en œuvre et permet d'une part de contrôler la taille et la forme des billes, et d'autre part, de conserver la viabilité et l'activité cellulaire, ainsi que sa capacité à dégrader le naphthalène. L'alginate de calcium est un support qui présente des propriétés physico-chimiques et mécaniques assez stables, des caractéristiques environnementales intéressantes vu son origine naturelle et son coût peu onéreux, ce qui favorise son utilisation comme support bactérien dans les biofiltres et les biocapteurs.

L'étude cinétique de la biodégradation par cellules immobilisées dans le domaine de concentration inhibitrice, a montré l'effet des limitations diffusionnelles sur la vitesse et sur le rendement d'élimination du naphthalène comparativement aux résultats obtenus avec les cellules libres.

Une relation empirique simple basée sur le lissage des données expérimentales a été proposée pour décrire la relation entre la dépendance de la concentration du naphthalène du temps. Le modèle obtenu a été utilisé pour estimer la vitesse de biodégradation.

L'estimation quantitative de l'effet des limitations diffusionnelles a été faite en calculant le facteur d'efficacité et le coefficient de diffusion effective. Les valeurs de ces deux paramètres ont montré que les contraintes diffusionnelles à l'intérieur des particules d'alginate limitaient l'effet d'inhibition par le substrat, ce qui permet ainsi l'obtention d'un meilleur rendement d'élimination du naphthalène. Le transfert de masse à l'intérieur des billes d'alginate est donc l'étape limitante dans le processus de biodégradation du naphthalène par les cellules immobilisées.

Les données obtenues sont nécessaires pour une conception optimale, une simulation fiable et une mise en œuvre rationnelle d'un procédé de dépollution biologique.

Enfin, en perspectives de cette étude, il est indispensable de revoir et de prévoir certains aspects complémentaires de l'étude tels que :

- Etudier l'influence de la présence d'une autre source de carbone et d'énergie avec le naphthalène, ainsi que l'effet de l'oxygène sur la vitesse et sur le taux de biodégradation.
- Confirmer la voie métabolique de biodégradation du naphthalène par la souche *Pseudomonas sp.*, en étudiant l'activité d'autres enzymes et la présence de métabolites intermédiaires.

- L'amélioration du modèle cinétique obtenu en introduisant des paramètres supplémentaires tels que le coefficient d'entretien.
- Examiner l'effet de la contrainte diffusionnelle externe du naphthalène dans le milieu de culture.
- Etudier l'influence des facteurs physico-chimiques (Température, pH, aération,...) sur la cinétique de biodégradation du naphthalène par cellules immobilisées.
- Evaluer l'influence des caractéristiques des supports d'immobilisation (nature de support, dimensions et forme de particule, méthode de préparation,.....) sur la cinétique de biodégradation, le rendement d'élimination et la physiologie des cellules bactériennes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1990). *Toxicological Profile for Naphthalene and 2-Methylnaphthalene*. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
2. Aislabie J., McLeod M. et Fraser M. (1998). Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49**: 210-214.
3. Alexander M.(1973). Non-biodegradable and other recalcitrant molecules. *Biotechnology and Bioengineering*, **15**: 611-615
4. Al-Hadrami, M.N., Lappin-Scott, H.M. et Fisher, P.J. (1995). Bacterial survival and n-alkane degradation Within Omani crude oil and a mousse. *Marine Pollution Bulletin*, **30**: 403-408.
5. Amooore, J.E. et Hautala, E. (1983). Odor as an aid to chemical safety: Odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. *Journal of Applied Toxicology*, **3**: 272-290
6. Annweiler E., Richnow H.H., Antranikian G., Hebenbrock S., Garms C., Franke S., Francke W. et Michaelis, W. (2000). Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 518-523.
7. Aranha H.G. et Brown L.R.. (1981). Effect of Nitrogen Source on End Products of Naphthalene Degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, **4**(1): 74-78
8. Arinjay K., Shashi K. et Kumar S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*, **22**:151–159
9. Armengaud, J., Happe B. et Timmis K. N. (1998). “Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. Strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome.” *Journal of Bacteriology*, **180**(15): 3954-3966.
10. Atlas R.M et Cerniglia C.E . (1995).Biodegradation of petroleum pollutants . *Bioscience* **45**: 332-338.
11. Atlas, R.M. et Bartha, R., (1972). Biodegradation and mineralization of petroleum in seawater at low temperature. *Canadian Journal of Microbiology*, **18**: 1851-1855.
12. Atlas, R.M., (1975). Effect of the temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Applied Microbiology*, **30**: 396-403.
13. Atlas, R.M., (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial Reviews*, **45**: 180-209.
14. Atlas, R.M., (1995a). Bioremediation of petroleum pollutants *International Biodeterioration and Biodegradation*, **35**: 1-3.
15. Atlas, R.M., (1995b). Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, **31**: 4-12.
16. Bailey J.E. et Ollis D. (1987). *Biochemical engineering fundamentals*.Mc Graw Hill, singapore.
17. Ballerini, D., Gatellier C. et Vogel T. (1998). Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués. Rapport pour l'ADEME : 248 pages.
18. Barnsley, E. A. (1983). Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-carboxybenzalpyruvate. *Journal of Bacteriology*, **154**(1): 113-117.
19. Bauer J.E. and Capone D.G. (1985) – Effects of four aromatic organic pollutants on microbial glucose metabolism and thymidine incorporation in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiolog* ,**49**: 828-835.

20. Bertrand J.C., Bianchi M., Al Mallah M., Acquaviva M. et Mille, G., (1993). Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **168**: 125-138.
21. Bertrand, J.C., Esteves, J.L., Mulyono, M. et Mille, G., (1986). Use of continuous flow through systems to determine petroleum hydrocarbon evolution in superficial marine sediments. *Chemosphere*, **15**: 205-210.
22. Bettmann, H. et Rehm, H. J. (1984) Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms *Applied Microbiology and Biotechnology*, **20**: 285-290.
23. Boonchan, S., Britz M. L. et Stanley G. A. (1998). "Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*." *Biotechnology and Bioengineering*, **59**(4): 482-494.
24. Bouchez, M., D. Blanchet et J. P. Vandecasteele (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**(1): 156-164.
25. Boyd, T.J., Montgomery, M.T., Spargo, B.J., Smith, D.C., Coffin, R.B., Kelley, C.A. et Mueller, J.G., (2001). Effects of oxygenation on hydrocarbon biodegradation in a hypoxic environment. *Bioremediation Journal*, **5**: 145-157.
26. Brodelius, P., Vandamme, E. J. Immobilized cells *In: Kennedy, J. F. (ed) Biotechnology vol. 7^a. VCH. Weinheim, (1987), p. 405-464.*
27. Broderick, L.S. et Cooney, J.J., (1982). Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. *Development in Industrial Microbiology*. **23**: 425-434.
28. Buchholz K. (1982). Reaction engineering parameters for immobilized biocatalysts. *In: Advances in Biochemical Engineering*, **24**: 39.
29. Butler, C. S. et J. R. Mason (1997). Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Advances in Microbial Physiology*, **38**: 47-84.
30. C.E. (1996) Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances. European Commission. Luxembourg.
31. Callegari J.P. et Francotte C. (1986). Physiological behavior of alginate immobilized cells *In : Process Engineering Aspects of Immobilized Cell Systems. The IChemE (Pergamon), Rugby.*
32. Carredano, E., Karlsson A., Kauppi B., Choudhury D., Parales R. E., Parales J. V., Lee K., T. Gibson D., Eklund H. et Ramaswamy S. (2000). Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding. *Journal of Molecular Biology*, **296**(2): 701-712.
33. Cassidy, M. B.; Lee, H.; Trevors, J. T. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, **16**: 79-101.
34. Cerniglia, C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons *Biodegradation*, **3** : 351-368.
35. Champagne C.P., Lacroix C. et Sodini-Gallot I. (1994). Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Critical Review of Biotechnology*, **14**: 109-134.
36. Chapatwala, K.D.; Babu, G. R. V.; Dudley, C.; Williams, R. et Aremu, K. (1993). Degradative capability of *Pseudomonas putida* on acetonitrile. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **39/40**:655-665.
37. Cheetham, P. S. J. Developments in immobilized cells and their applications. *In: Wiseman, A. (ed) Topics in enzyme and fermentation technology, vol. 4. Ellis Horwood. Chichester. 1980, p. 189-238.*;

38. Chibata, I. , Tosa, T. et Sato, S. (1983). Immobilized cells in preparation of fine chemicals . *Advances in Biotechnological Process*, **1**: 204-219
39. Chibata, I. et Wingard, L. B. (1983). Immobilized microbial cells. *Applied Biochemistry and Bioengineering*. **4**, 1-225
40. Chu, W. et Kwan C.Y. (2003). Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system. *Chemosphere*, **53**(1): 9-15.
41. Churchill, S. A., Harper J. P. et Churchill P. F. (1999). Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(2) : 549-552.
42. CITI (1992) – Biodegradation and Bioaccumulation data of existing chemicals based on the CSCL. Chemicals Inspection and Testing Institute. Japan.
43. Cornish-Bowden A. (1995). Fundamentals of Enzyme Kinetics. Portland Press 2nd ed. P344
44. 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.
45. Dalton , H et Stirling, D.I. Cometabolism . Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. **297** : 481-496
46. De Backer L. (1996). Immobilisation of cells in porous carriers. Pages 237-255 dans R.G.Willaert, G.V. Baron, et L. De Backer, eds. *Immobilised living cell systems:Modelling and experimental methods*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK.pp373
47. Dean-Ross, D. et Cerniglia C. E. (1996). Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**(3): 307-312.
48. Delfino J.J. et Miles C.J. (1985). Aerobic and anaerobic degradation of organic contaminants in Florida groundwater. *Proc Soil Crop Sci Soc Fla*, **44**, 9-14.
49. Demanèche, S., C. Meyer, J. Micoud, M. Louwagie, J. C. Willison et Y. Jouanneau (2004). Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 6714-6725.
50. Denissenko, MF., A. Pao, M. Tang et GP. Pfeifer (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, **274** : 430-432.
51. Doleyres Y..(2003). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse PhD. Université Laval.Qeubec. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Mars 2003
52. Dunne W.M., Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical Microbiology Review*. **15**: 155-166.
53. Eaton R.W; Chapman P.J. (1992). Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *Journal of Bacteriology*. **174**(23):7542-54.
54. Emily J. T. M. Leenen, Vítor A. P. Dos Santos, Katja C. F. Grolle, Johannes Tramper et René H. Wijffels . (1996). Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment . *Water Research* . **30**: 2831-3159
55. Encyclopedia of Public Health and Safety (EOHS).(1983).Vol.2 Genève. International labour organization. p.1425-1426
56. Engasser J.M. et Hovart C. (1976). Diffusionnal kinetic effects with immobilized enzymes. *Applied Biochemistry and bioengineering*, **1**:127-220

57. Ensley B. D., Ratzkin B.J., Osslund T.D., Simon M.J., Wackett L.P., Gibson D.T. (1983) Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science*. **222**(4620):167-9.
58. Ensley B. D. et Gibson D. T. (1983). "Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component." *J Bacteriol* **155**(2): 505-511
59. FEMS Symposium, (1980). Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds : FEMS Symposium no.12 Leisinger, T. Ed., London : Academic Press for the Swiss Academy of Sciences and the Swiss Society of Microbiology on behalf of the Federation of European Microbiological societies , 415p
60. Floodgate, G.D. (1995). Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology. *Aquatic Microbial Ecology*, **9**: 3-11.
61. Fukui, S. et Tanaka, A. (1982). Immobilized microbial cells. *Annual Review of Microbiology*. **36** :145-172.
62. Gibson, D.T., Koch, J.R. et Kallio, R.E. (1968). Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *Biochemistry*, **7**(7): 2653-2662.
63. Gonçalves, L.M.D., Barreto, M.T.O., Xavier, A.M.B.R., Carrondo, M.J.T. et Klein, J., (1992). Inert supports for lactic acid fermentation – a technological assessment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**: 305-311.
64. Grady, C.P.L., (1985). Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**: 660-674
65. Groboillot, A., Boadi, D.K., Poncelet, D. et Neufeld, R.J. (1994) Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Review of Biotechnology*, **14**: 75-107.
66. Grund, E., B. Denecke, et R. Eichenlaub, (1992). "Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. Strain B4." *Applied and Environmental Microbiology* **58**(6) : 1874-1877.
67. Hansen, N., Jensen, V.B., Appelquist, H. and Mřch, E. (1978) – The uptake and release of petroleum hydrocarbons by the marine mussel *Mytilus Edulis*. *Progress in Water Technology*, **10**: 351-359.
68. Harder, W., (1981). Microbial Degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds, T. Leisinger, R. Hütter, A.M. Cook et J. Nüesch Eds., Academic Press, New York, pp. 77-96
69. Harmsen, J. (1991). Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils. On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment, R. E.- B. Hinchee, ed.
70. Hill, G. A., and C. W. Robinson. (2004). Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*. **17**:1599-1615.
71. Hurst, C.J., Sims, R.C., Sims, J., Sorensen, D.L., McLean, J.E. and Huling, S., (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation as a function of oxygen tension in contaminated soils. *Journal of Hazardous materials*, **51**: 193-208.
72. Illanes A. (1999). Stability of biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology*, **2**, No.1, Issue of April 15.
73. Jouanneau, Y., Willison, J.C. et D. Rodarie (1999). Dégradation microbologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Rapport pour l'ADEME : 156 pages.
74. Kang, H., S. Y. Hwang, Y. M. Kim, E. Kim, Y. S. Kim, S. K. Kim, S. W. Kim, C. E. Cerniglia, K. L. Shuttleworth et G. J. Zylstra (2003). Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain. *Canadian Journal of Microbiology*. **49**(2): 139-144.
75. Karel, S.F., Libicki, S.B. et Robertson, C.R. (1985). The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science*, **40**: 1321-1354.

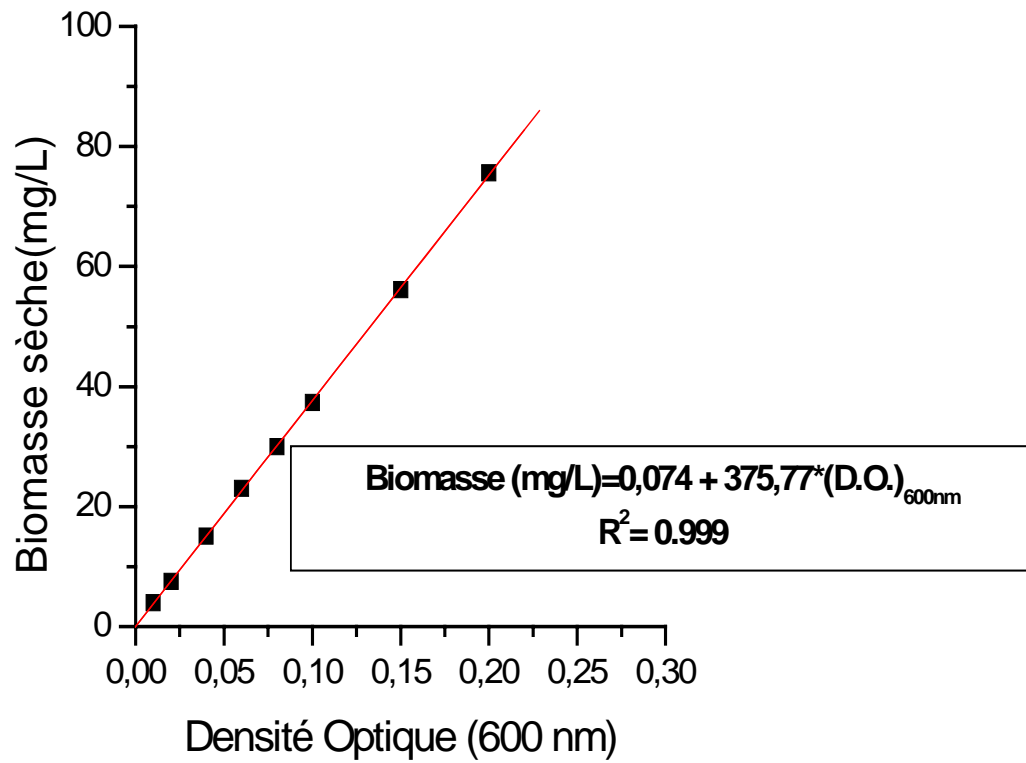
76. Kauppi, B., Lee, E., Carredano, R. E., D. T., Gibson, H., et S. Ramaswamy (1998). Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenasenaphthalene1,2-dioxygenase, *Structure*, **6**(5): 571-586.
77. Kipopoulou, A.M., Manoli, E. et Samara, C. (1999) – Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in industrial area. *Environmental Pollution*, **106**: 369-380.
78. Kirk-Othmer –Encyclopedia of Chemical Technology. (1978) . 3rd Ed. .vol.15 . N.Y. John Wiley and sons .pp.698-719
79. Klein, J., Vorlop, K.D. (1985). Immobilization techniques-Cells. Pages 203-224 dans M.Moo-Young, C.L. Cooney, et A.E. Humphrey, eds. *Comprehensive biotechnology*. Pergamon Press, Oxford, NY, USA.
80. Klein, J. et Wagner F. (1983). Methods for the immobilization of microbial cells . *Applied Biochemistry and Bioengineering*. **4**:11-51
81. Krishnan S., Gowda L.R., Misra M.C., Karanth N.G. (2001) Physiological and morphological changes in immobilized *L. Plantarum* NCIM 2084 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. *Food Biotechnology* **15**: 193-202.
82. Kuhm A.E. ; Stolz A. et Knackmuss H.J. (1981). Metabolism of naphthalene by biphenyl degrading bacterium *Pseudomonas paucimobilis* . *Biodegradation* **2**: 115-120.
83. Lauzon F., Lamarche P. et Héroux J A. (1997). Assainissement d'un effluent de naphthalène à l'aide d'un bioréacteur in situ. Projet de recherche Collège Militaire Royal du Canada . Institut de l'environnement.
84. Leahy J.G. et Colwell, R.R., (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, **54**, 305-315
85. Levenspiel O. (1974). Chemical reaction engineering. Wiley, N. Y.
86. Manohar, S. ; Karegoudar, T.B. (1996). Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in waste water treatment . *Water Research*, **30**: 2985-2996.
87. Manohar S., Kim C.K., Karegoudar T.B. (2001). Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. Strain NGK1 in polyurethane foam. *Applied and Microbial Biotechnology*, **55**(3) : 311-316.
88. Marin, M., Pedregosa, A., Rios, S. And Laborda, F., (1996). Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **27**: 69-75.
89. Mavituna, F., (1979). Biological reactors –A study of use and efficiency of immobilized microorganisms. PhD thesis, Univ. Of Manchester;U.K.
90. Mohn, W.W. et Stewart, G.R., (2000). Limiting factors for hydrocarbons at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 1161-1172.
91. Moody, J. D., J. P. Freeman, D. R., Doerge, et C. E., Cerniglia, (2001). “Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1.” *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4) : 1476-1483.
92. Mueller, J.G., Chapman P.J.; Pritchard P.H. (1989). Creosote-contaminated sites. *Environmental Science and Technology*. **23**:1197-1202.
93. Navatil, M. et Sturdic, E., (1999) Bioactive components in productions using immobilized biosystems. *Biologia Bratislava* **54**: 635-648.
94. Newman, L. A., et Reynolds, C. M., (2004). Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*. **15**(3): 225-230.
95. Nielsen, P.H. and Christensen, T.H., (1994). Variability of biological degradation of aromatic hydrocarbons in an aerobic aquifer determined by laboratory batch experiments. *Journal of Contaminated Hydrology*, **15**: 305-320.

96. Nuhoglu, A. et Yalcin, B. (2005). Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry*, **40**: 1233–1239
97. O'Reilly, K. T. et Crawford, R. L. (1989). Degradation of pentachlorophenol by polyurethane-immobilized *Flavobacterium* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, **55** : 2113-2118
98. O'Reilly, K.T. et Crawford, R.L. (1989). Kinetics of p-cresol degradation by an immobilized *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**(4): 866–870.
99. Okpokwasili, G.C. et Nweke, C.O. (2005). Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African Journal of Biotechnology*, **5**(4): 305-317
100. Olivera N.L., Esteves J.L. and Commendatore, M.G., (1997). Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediment in Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration Biodegradation*, **40**: 75-79.
101. Onysko, K.A., Budman, H.M et Robinson, C.W. (2000). Effect of temperature on the inhibition kinetics of phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* Q5. *Biotechnology and Bioengineering*, **70**(3):291-9
102. Owa, J.A. (1989) Relationship between exposure to icterogenic agents glucose – phosphate dehydrogenase deficiency and neonatal jaundice in Nigeria. *Acta Paediatrica Scandinavia*, **78** : 848-852.
103. Parales, R. E. (2003). The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**(5): 271-278.
104. Pavé A., (1994). Modélisation en biologie et en écologie. Aléas, Lyon, 559 pp.
105. Perry R.H. ; Green D.W. et Maloney J.O. (1984). Perry's Chemical Engineers Handbook. Sixth ed.:McGraw Hill,N.Y.pp. 3-286.
106. Prenosil, J.E., Kut, Ö.M., Dunn I.J. et Heinze E. (1995). Immobilized biocatalysts. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. VCH, Weinheim, Germany.
107. Ramakrishna S.V. et Prakasham R.S. (1999) Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science Bangalore*, **77**: 87-100.
108. Randerath K., Randerath E., Zhou G. D., Supunpong N., He L. Y., McDonald T. J. et Donnelly K.C. (1999). Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assessed by three different methods, *Environmental Molecular Mutagenesis*, **33**(4): 303-312.
109. Ratledge, C. (1978). Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Watkinson, R.J.(Ed.), Development in biodegradation of hydrocarbons. Applied Sciences Publishers. Vol. 1., pp 1-46. London.
110. Resnick, S. M. et Gibson, D. T. (1996). Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816-4, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(11): 4073-4080.
111. Rling, W.F.M., Head, I.M. et Larter, S.R., (2003). The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs : perspectives and prospects. *Research in Microbiology*, **154**: 321-328.
112. Scriban, R. (1995). Biotechnologie. Ed. Technique et documentation Lavoisier.
113. Shamsuzzaman, K.M et Barnsley, E.A. (1974). The regulation of naphthalene metabolism in pseudomonads. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 23;**60**(2):582–589.
114. Shannon, K. et Buchanan, G.R. (1982). Severe hemolytic anemia in black children with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Pediatrics*, **70**: 364-369.
115. Smidsord, O. et Skjak-Braek, G. (1990). Alginate as immobilisation matrix for cells. *Trends in biotechnology*, **8**: 71-78

116. Song, H.G., Wang, X. et Bartha, R., (1990). Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 652-656.
117. Sutherland, J.B., Raffi, F., Khan, A.A., et Cerniglia, C.E. (1995). Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. In: Microbial Transformation and degradation of toxic organic chemicals. Edited by Young, L.L and C.E. Cerniglia. Wiley-Liss. New York.
118. Tagger, S., Deveze, L., et LePetit, J., (1976). The conditions for biodegradation of petroleum hydrocarbons at sea. *Marine Pollution Bulletin*, **7**: 172-174.
119. Tal, Y. , Nussinovitch, A., et van Rijn, J. (2003). Nitrate Removal in Aquariums by Immobilized *Pseudomonas*. *Biotechnology Progress*, **19**(3): 1019 – 1021
120. Trevor J.T. ; Elsas J.D. (1992). Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells .*Microbial Release* .**1**:61-69.
121. Turkall, R.M., Skowronski, G.A., Kadry, A.L. (1994) – A comparison study of the kinetic and bioavailability of pure and soil-adsorbed naphthalene in dermally exposed male rat. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **26**: 504-509.
122. U.S. Department of Health and Human Services(DHHS). (1993) . Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS, online database). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD. U.S. Department of Health and Human Services. Hazardous Substances Data Bank (HSDB, online database). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD.
123. U.S. Environmental Protection Agency. (1986). *Health Effects Assessment for Naphthalene*.EPA/540/1-86/014. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH..
124. U.S. Environmental Protection Agency. (1986).*Health and Environmental Effects Profile for Naphthalene*.EPA/600/x-86/241. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH.
125. U.S. Environmental Protection Agency. (1993). *Integrated Risk Information System (IRIS) on Naphthalene*. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH..
126. U.S. Environmental Protection Agency. (1994).*Technical Background Document to Support Rulemaking Pursuant to the Clean Air Act—Section 112(g). Ranking of Pollutants with Respect to Hazard to Human Health*. EPA-450/3-92-010.Emissions Standards Division, Office of Air Quality Planning and Standards, Research Triangle Park, NC..
127. Vandermuulen, J.H. (1981). Contamination of marine population by hydrocarbons In: Amoco Cadiz :Fate and effect of oil spill .CNEO.Paris pp 563-572.
128. Vieth, W.R., Venkatsubramanian, K., Constantidines, A., et Davidson, B. (1976). Design and analysis of immobilized enzyme flow reactors. *Applied Biochemistry and Bioengineering*, **1**: 222-232
129. Wagner, K. et Hempel, D. C. (2004) . Biodegradation by immobilized bacteria in an airlift-loop reactor – influence of biofilm diffusion limitation. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**(6): 559 – 566
130. Wang, S et Loh, K. (1999). Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme and Microbial Technology* **25**:177-184
131. Ward, D.M. and Brock, T.D. (1978). Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments.*Applied and Environmental Microbiology*, **35**: 353-359.

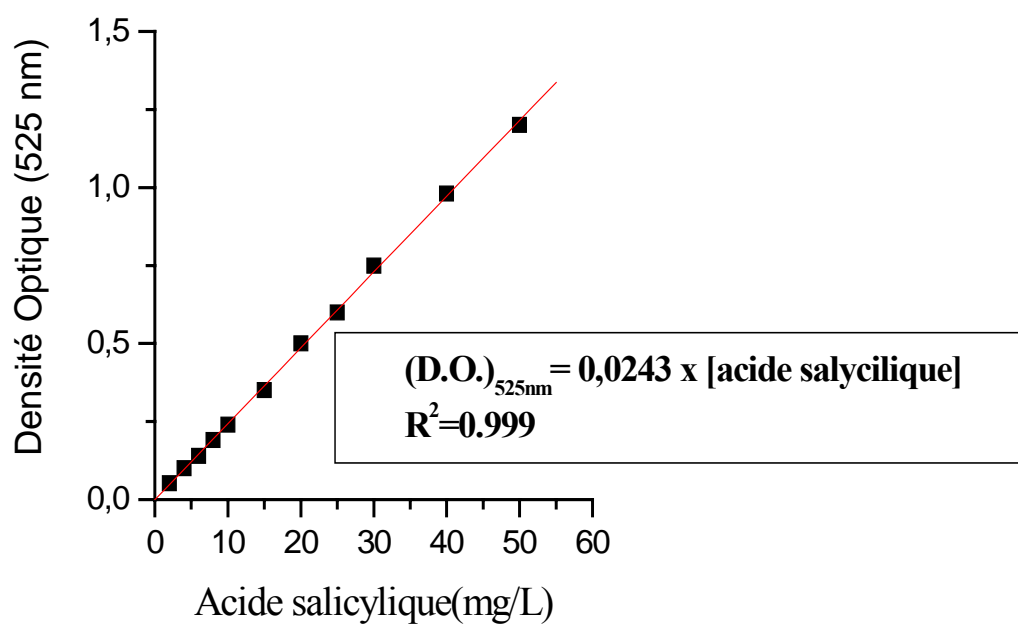
132. Webb, C., Black, G.M., et Atkinson, B. (1986). Process Engineering Aspects of Immobilized Cell Systems The IchemE (Pergamon) , Rugby.pp102-149.
133. Whitman, B. E., Lueking, D. R. et Mihelcic, J.R. (1998). Naphthalene uptake by a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Canadian Journal of Microbiology*, **44**(11): 1086-1093
134. Whyte L.G., Geer, C.W. et Innis, W.E., (1995). Assessment of biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. Abstract of General Meeting of the American Society for Microbiology 95, p 468.
135. Willaert G.V. Baron, et L. De Backer. (1996b). Mass transfer in immobilized cell systems. Pages 21-43 dans R.G.Willaert, G.V. Baron, et L. De Backer, eds. *Immobilised living cell systems: Modelling and experimental methods*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK. pp. 373
136. Willaert R., Baron G. (1996) Gel entrapment and micro-encapsulation: methods, applications and engineering principles. *Reviews in Chemical Engineering* **12**: 5-205
137. Willaert R.G.;Baron G.V. ; Backer L. (1996a). Immobilized living cell systems. Modeling and Experimental Methods. John Wiley&s.
138. Wilson S.C. et Jones K.C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution*, **81**(3): 229-249.
139. Winterbottom J.M.; King B.M. (1999). Reactor design for chemical engineers . Stanley Thornesed .UK. pp150-179
140. Xu, G.T., Zigler J.S. et Lou, M.F., (1992). Establishment of a naphthalene cataract model *in vitro*. *Experimental Eye Research*, **54**: 73-81.
141. Yen, K.M. et Serdar, C.M. (1988). Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. *Critical Review of Microbiology*, **15**(3) : 247-268.
142. Zarilla, K.L. et Perry, J.J., (1984). *Thermoleophilum album* gen. Nov and sp. Nov, a bacterium obligate for thermophily and *n*-alkane substrates. *Archives of Microbiology* **137**: 286-290.
143. ZoBell, C.E., (1969). Microbial modification of crude oil in the sea. In: Proceedings of joint conferences on prevention and control of oil spills. American. Petroleum. Institute. Washington, D.C., pp.317

Annexe 1



Courbe d'étalonnage Biomasse sèche en fonction de la densité optique

Annexe 2



*Courbe d'étalonnage de l'acide salicylique
en fonction de la densité optique à 525 nm*

Annexe 3

