République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mentouri Constantine
Faculté de Science de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Végétale et Ecologie

N° d'ordre :
N° de série :

MEMOIRE
EN VUE DE L'OBTENTION DE DIPLOME
DE MAGISTER EN ECOLOGIE
OPTION : GESTION DES DECHETS : EVALUATION ET SOLUTIONS ENVIRONNEMENTALES

Présenté par :

SILINI Soumaya

Thème :

Contribution à l'étude de la biodégradation de la méthyléthylcétone en réacteur batch par les actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration d'El-Atmania

Devant le jury :

Présidente	**: Mme. OUAHRANI Guania**	**Professeur**	**U. M.C.**
Encadreur	**: Mr. BOUDEMAGH Allaoueddine**	**Maître de conférences**	**U. M.C.**
Examinateur	**: Mr. ALI-KHOUDJA Housine**	**Professeur**	**U. M.C.**
Examinatrice	**: Mme. MIHOUBI Ilhem**	**Maître de conférences**	**U. M.C.**

L'année universitaire : **2011-2012**

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour terminer ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie Appliquée ainsi qu'au laboratoire de Pollution et Traitement des Eaux de l'Université Mentouri de Constantine.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Monsieur ***A. BOUDEMAGH*** *(Maître de conférences à l'Université Mentouri de Constantine) pour avoir dirigé ce travail, pour son aide, ses précieux conseils, sa compréhension et son soutien moral.*

Je remercie chaleureusement Monsieur ***H. ALI-KHOUDJA*** *(Professeur à l'Université Mentouri de Constantine) pour son très bon accueil et pour m'avoir facilité le travail au sein de son laboratoire.*

Toute ma gratitude va à Mme ***G. OUAHRANI*** *(Professeur à l'Université Mentouri de Constantine) qui a accepté de présider ce jury.*

Je tiens à remercier également les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger et de corriger ce travail. Que monsieur ***H. ALI-KHOUDJA*** *et Mme* ***I. MIHOUBI*** *(Maître de conférences à l'Université Mentouri de Constantine) trouvent ici toute ma reconnaissance pour en avoir été les examinateurs.*

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à Mlle ***K. LOUCIF*** *qui m'a bien accompagné pendant ce travail par son aide, ses conseils et ses encouragements.*

Je tiens à remercier aussi toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie Appliquée et plus particulièrement Mr ***CHEMSSEDDINE*** *et Mme* ***RADIA****, et toute l'équipe du laboratoire de pollution et traitement des eaux et plus particulièrement* ***AHMED*** *et* ***MOKHTAR*** *pour leur gentillesse, leur aide et leurs conseils qui m'ont beaucoup aidé pendant la réalisation de ce travail.*

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents que j'aime plus que tous au monde, pour leur amour, leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Que dieu les protège et leur donne la bonne santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

A mes deux chers frères Amine et Oussama et ma chère sœur Selma.

A toute ma famille.

A toutes mes chères amies, mes adorables copines de chambres et mes collègues.

A tous ceux et toutes celles qui m'ont encouragé et m'ont souhaité du bien de près ou de loin.

En témoignage de ma profonde affection

soumaya

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1. Les composés organiques volatils 3
I.1.1. Définition 3
I.1.2. Sources d'émission dans l'atmosphère 4
I.1.3. Effects et impacts des COV 5
I.1.3.1. Les effets sur l'environnement 5
I.1.3.2. Les effets sur la santé 5
I.1.4. Les principaux procédés de traitement des COV 6
I.1.5. Les procédés biologiques 7
I.1.5.1. Le principe 7
I.1.5.2. Les principaux procédés biologiques 9
I.1.5.2.1. Le lit bactérien 9
I.1.5.2.2. La biofiltration 9
I.1.5.2.3. Le lavage biologique 10
I.2. La méthyléthylcétone 11
I.2.1. Définition et propriétés 11
I.2.2. Production et sources d'émission 12
I.2.3. Utilisations 13
I.2.4. Comportement dans l'environnement 14
I.2.5. Les effets sur l'environnement 15
I.2.6. Les effets sur la santé 15
I.2.6.1. Les sources d'exposition 15
I.2.6.2. Toxicocinétique 16
I.2.6.2.1. Absorption 16
I.2.6.2.2. Distribution 16
I.2.6.2.3. Métabolisme 16
I.2.6.2.4. Excrétion 17
I.2.6.3. Toxicité 17

I.2.6.3.1. Toxicité aiguë 17
I.2.6.3.2. Toxicité chronique 18
I.2.6.3.3. Effets cancérogènes 19
I.2.6.3.4. Effets sur la reproduction 19
I.2.6.3.5. L'interaction avec d'autres solvants 19
I.2.7. Biodégradation 20
I.3. Les actinomycètes en tant qu'agents de biodégradation dans la nature 22
I.3.1. Caractères généraux 22
I.3.2. Ecologie 22
I.3.2.1. Les actinomycètes dans le sol 23
I.3.2.2. Dans le milieu aquatique 25
I.3.2.2.1. Dans les eaux douces 25
I.3.2.2.2. Dans les eaux marines 25
I.3.2.3. Dans les composts et les boues d'épuration 26
I.3.2.4. Dans l'air 26
I.3.2.5. Les végétaux 27
I.3.2.6. l'homme et l'animal 27
I.3.3. physiologie 27
I.3.3.1. Conditions de croissance 27
I.3.3.2. Le milieu de culture 28
I.3.4. Caractères culturaux 29
I.3.5. Reproduction 31
I.3.6. Cycle biologique 33
I.3.6.1. La formation des spores 33
I.3.6.1.1. Les exospores 33
I.3.6.1.2. Les endospores 34
I.3.6.2. La germination des spores 34
I.3.6.3. Le mycélium de substrat et le mycélium aérien 34
I.3.6.4. Les structures particulières 35
I.3.7. Taxonomie 37
I.3.8. Critères de détermination des genres d'actinomycètes 39
I.3.8.1. Les caractères morphologiques 39
I.3.8.2. Les caractères chimiotaxonomiques 41

I.3.8.2.1. Les acides aminés 41
I.3.8.2.2. Les sucres 41
I.3.8.2.3. Les lipides 41
I.3.8.2.3.1. Les lipides polaires 41
I.3.8.2.3.2. Les ménaquinones 43
I.3.8.2.3.3. Les acides gras 43
I.4. Rôle des actinomycètes dans la biodégradation de la matière organique 43
I.4.1. La notion de biodégradation 43
I.4.2. Le processus impliqué dans la biodégradation des polymères organiques 44
I.4.2.1. La fragmentation 44
I.4.2.2. L'assimilation 44
I.4.3. La biodégradation des polymères naturels 45
I.4.4. La biodégradation des polymères de synthèse 46

Chapitre II: Matériel et méthodes

II.1. Isolement des actinomycètes 48
II.1.1. Origine et prélèvement de l'échantillon 48
II.1.2. Observation à l'état frais 48
II.1.3. Réalisation des dilutions 48
II.1.4. Préparation du milieu d'isolement 48
II.1.5. Ensemencement et incubation 49
II.1.6. Dénombrement des colonies 49
II.1.7. Préidentification des actinomycètes 49
II.1.7.1. Aspect des colonies 49
II.1.7.2. Coloration de Gram 49
II.1.8. Repiquage et purification des souches 50
II.1.9. Conservation des souches 50
II.1.9.1. Sur gélose inclinée 50
II.1.9.2. Par congélation des cultures de spores 50
II.2. Fermentation en batch 50
II.2.1. Description du réacteur batch 51
II.2.2. Préparation du milieu de fermentation 51
II.2.3. Inoculum bactérien et source de carbone et d'énergie 51

II.2.4. Etude préliminaire de la biodégradation de la MEK par les isolats d'actinomycètes (Prise d'essai) 53
II.2.5. Première préculture....54
II.2.6. La fermentation....54
II.2.7. Prélèvements et préparation des échantillons 54
II.2.8. Mesure de la concentration cellulaire X 55
II.2.9. Réalisation des courbes d'étalonnage....56
II.2.10. Suivi de la consommation du substrat (la MEK) 56
II.2.10.1. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse....56
II.2.10.2. Les conditions opératoires de mesure de concentration en substrat....58
II.3. Caractérisation morphologique de la souche la plus performante 59
II.3.1. Etude de l'aspect macroscopique des colonies bactériennes....59
II.3.2. Etude de l'aspect microscopique (technique de culture sur lamelle)....59

Chapitre III: Résultats et discussions

III.1. Observation à l'état frais....60
III.2. Isolement....60
III.3. Etude préliminaire de la biodégradation de la MEK par les isolats d'actinomycètes (Prise d'essai)....62
III.4. Etude de la cinétique de croissance et détermination de quelques paramètres de la fermentation des isolats d'actinomycètes sélectionnés....65
III.4.1. Evolution de la concentration de la biomasse en fonction du temps de fermentation 65
III.4.2. Détermination du taux spécifique de croissance 66
III.4.3. Détermination du taux de croissance maximum µmax....69
III.4.4. Vitesse spécifique de consommation de la MEK ($r_{x.MEK}$) 73
III.4.5. Vitesse spécifique de croissance en fonction de la concentration de la MEK....76
III.5. Identification morphologique de la souche A5.7....79
III.5.1.Etude le l'aspect macroscopique....79
III.5.2. Etude de l'aspect microscopique 80
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 83
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 101
ANNEXES

LISTE DES FIGURES

Figure N°1 : Inventaire des sources principales d'émissions de COV **(Liu and Liptak, 1995)**....4
Figure N°2 : Les principaux procédés de traitement des COV....6
Figure N°3 : Schéma du principe des différents procédés biologiques **(Sandrine, 2005)**..10
Figure N°4 : Structure chimique de la méthyléthylcétone (MEK) **(http://fr.wikipedia.org/wiki/Butanone)**....11
Figure N°5 : Le métabolisme de la méthyléthylcétone **(INRS, 2009)**....17
Figure N°6 : Les voies de dégradation de la MEK par la souche *Nocardia* sp. LSU-169 **(Eubanks *et al.,* 1974)**....21
Figure N°7 : La croissance d'une colonie sur milieu solide **(http://classroom.sdmesa.net/eschmid/Lecture16-Microbio.htm)**....30
Figure N°8 : Les classes morphologiques de *Streptomyces* cultivé en milieu liquide **(Amanullah *et al.,*2000)**....30
Figure N°9 : Les modes de reproduction dans certains représentants des Actinomycetales **(Kalakoutskii et Agre, 1976)**....32
Figure N°10 : La formation des conidies....33
Figure N°11 : Le cycle de vie de *Streptomyces* **(Sophie, 2006)**....36
Figure N°12 : Le mycélium de substrat et le mycélium aérien chez certains genres d'actinomycètes **(Larpent et Sanglier, 1989)**....36
Figure N°13 : Morphologie des chaînes de spores chez les espèces de *Streptomyces* **(Shirling et Gottlieb, 1966)**....40
Figure N°14 : Ornementation de la paroi sporale des espèces de *Streptomyces* selon **Larpent et Sanglier (1989)**....40
Figure N°15 : Bain marie MEMMERT de type GFL 1083 contenant les réacteurs de fermentation....53
Figure N°16 : Centrifugeuse Hettich-Zentrifugen de type ROTOFIX 3....55
Figure N°17 : Spectrophotomètre JENWAY de types 6300 spectrophotomètre....55
Figure N°18 : Chromatographe SCHIMADZU de type GC-17A combiné à une colonne capillaire de type DB-5 (0,25 mm D.I×30 m) et un détecteur FID....58
Figure N°19 : Technique de culture sur lamelle....59
Figure N°20 : L'aspect macroscopique des différentes souches pures isolées....61
Figure N°21 : Cinétique de croissance des différentes souches d'actinomycètes....64
Figure N°22 : Evolution de la concentration en biomasse X (g_{PS}/l) en fonction du temps (h) pour les différentes souches....65
Figure N°23 : Evolution du taux spécifique de croissance μ expérimentale (h^{-1}) en fonction du temps (h) pour les différentes souches....68

Figure N°24 : Evolution de la concentration en biomasse X (g_{PS}/l) et de la concentration de la MEK résiduelle (ppm) en fonction du temps (h) pour les différentes souches.....74
Figure N°25 : Evolution de la vitesse spécifique de consommation du MEK ($r_{x.MEK}$) expérimentale ($g_{MEK}/g_{PS}.h$) en fonction du temps (h) pour les différentes souches.....75
Figure N°26 : Evolution du taux spécifique de croissance µ expérimentale (h^{-1}) en fonction de la concentration en MEK résiduelle (ppm) pour les différentes souches 76
Figure N°27 : Observation microscopique de l'isolat A5.7 au grossissement (G×100). 80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°1 : Exemples de micro-organismes impliqués dans la dégradation de certains polluants **(Franck, 2006)**. 8
Tableau N°2 : Classification des procédés de traitement biologiques **(Simon and Ottengraf, 1987)**. 9
Tableau N°3 : Habitats de certains actinomycètes **(Grigorova et Norris, 1990)**. 23
Tableau N°4 : La distribution générale des actinomycètes dans le sol **(Lechevalier et Lechevalier, 1967)**. 24
Tableau N°5 : La classification hiérarchique de la classe Actinobacteria basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S **(Garrity *et al.,* 2004)**. 38
Tableau N°6: Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires **(Lechevalier et Lechevalier, 1980)**. 42
Tableau N°7 : Types pariétaux et types glucidiques cellulaires des actinomycètes aérobies à méso-DAP **(Lechevalier et Lechevalier, 1980)**. 42
Tableau N°8 : La composition du milieu nutritif **(Vandermesse, 1996)**. 52
Tableau N°9 : Nombre des actinomycètes après 25 jours d'incubation. 60
Tableau N°10 : Valeurs maximales des densités optiques obtenues par les différentes souches sélectionnées. 64
Tableau N°11 : Valeurs des paramètres du modèle de l'équation 6, obtenues après ajustement paramétrique sur les courbes expérimentales de croissance. 70

LES ABREVIATIONS

COV: composé organique volatil.
IPA: alcool isopropanol.
CITEPA: Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique.
MEK: la méthyléthylcétone.
ppm: partie par million.
Kow: le coefficient de partage octane-eau.
ARNr: acide ribonucléique ribosomal.
ADNr: acide désoxyribonucléique ribosomal.
G+C%: coefficient de Chargaff.
DAP: l'acide 2,6 diaminopimélique.
ppb: partie par billion.
ATP: l'adénosine triphosphate.
DO: la densité optique.
HAPs: les hydrocarbures aromatiques polycycliques.
DDT: dichlorodiphenyltrichloroethane.
ISP: "International *Streptomyces* Project".
Psi: pound per square inch.
CPG: chromatographie en phase gazeuse.
FID: détecteur par ionisation à flamme.

NaCl: chlorure de sodium.
KNO_3: nitrate de potassium.
KH_2PO_4: phosphate monopotassique.
K_2HPO_4: phosphate dipotassique.
$(NH_4)_2SO_4$: sulfate d'ammonium.
$CaCO_3$: carbonate de calcium.
Na_2HPO_4, $2H_2O$: phosphate disodique dihydraté.
Na_2SO_4 : sulfate de sodium.
$MgSO_4$, $7H_2O$: sulfate de magnésium sept fois hydraté.
EDTA : acide éthylène tétracétique.
$FeSO_4$, $7H_2O$: sulfate de fer sept fois hydraté.
$MnCl_2$, $4H_2O$: chlorure de manganèse quatre fois hydraté.
$ZnSO_4$, $7H_2O$: sulfate de zinc sept fois hydraté.
$CuSO_4$, $5H_2O$: sulfate de cuivre cinq fois hydraté.
$CaCl_2$, $2H_2O$: chlorure de calcium dihydraté.
Na_2MoO_4, H_2O: molybdate de sodium une fois hydraté.

Introduction

INTRODUCTION

Les composés organiques volatils (COV) sont parmi les différentes émissions contribuant à la dégradation de notre environnement. Ils sont considérés comme étant les sources majeures de la pollution directe (toxicité, odeur) ou indirecte (« smog » et réchauffement) de l'air. Parmi les COV, on peut citer les composés aromatiques (toluène, xylènes), les composés cétoniques (acétone, méthyléthylcétone), les alcools (méthanol, éthanol, propanol), les acétates (acétate d'éthyle) et les dérivés chlorés (chlorure de méthylène, perchloro-éthylène).

La méthyléthylcétone ou (MEK) est le composé organique volatil qui fait l'objet de notre étude. C'est un produit largement utilisé comme solvant, entrant dans la composition des peintures, de vernis, d'encres, de colles et d'adhésifs. Il est utilisé également comme agent stérilisateur et dans de nombreux procédés tels que : l'extraction de certaines huiles végétales et minérales, la fabrication de cuir synthétique, de ruban magnétique, de film transparent et autres polymères, et sert également d'intermédiaire de synthèse de plusieurs produits chimiques.

La MEK est libérée dans l'environnement à partir des utilisations industrielles et domestiques conduisant à mettre en danger la qualité de l'air et la santé publique. Dans l'environnement, la MEK semble être très mobile, elle est pratiquement non bioaccumulable et facilement biodégradable. Cependant, dans l'air, elle produit des radicaux libres qui conduisent à la formation de l'ozone, qui l'un des principaux constituant du smog photochimique **(Grosjean *et al.*, 1983)**. En outre, dans le sol, elle peut être facilement lessivée et provoque l'altération de la qualité des eaux souterraines. Son impact pour la santé humaine peut aller des signes d'irritation des muqueuses (oculaires, nasales et pharyngées), à des troubles digestifs ou des céphalées, voire des troubles du système nerveux central à des fortes concentrations. La toxicité de la MEK est élevée en présence d'autres solvants organiques **(Murphy, 1984)**. Par conséquent, il est nécessaire d'éliminer la MEK de l'environnement, afin d'éviter ces impacts.

Depuis plusieurs décennies, le traitement de l'air contaminé par des solvants organiques volatils fait l'objet de plusieurs recherches dans l'espoir de trouver le procédé le plus efficace et le moins onéreux. En parallèle aux diverses technologies de traitements (physiques et chimiques), on assiste ces dernières années à l'émergence de procédés biologiques qui semblent très appréciées. En effet, ces procédés sont très efficaces, très respectueux du point de vue environnemental et reviennent à moindre coût. Le principe de ces procédés se base sur la capacité des microorganismes à utiliser les polluants comme seule source de carbone et d'énergie.

Les boues activées étant très riches en matière organique et inorganique, sont considérées comme un réservoir important de microorganismes. Dans cet écosystème, les bactéries filamenteuses notamment les actinomycètes y sont fortement présents **(Lechevalier et Lechevalier, 1994 ; Kampfer, 1997 ; Schuppler *et al.*, 1998 ; Seviour *et al.*, 2003 ; Boudemagh *et al.*, 2006)**. Quelques résultats de recherche, montrent que la MEK est biodégradée par des organismes présents dans certains environnements par exemple, les eaux usées **(Dore *et al.*, 1975)** et le sol **(Perry, 1968)**.

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram positif très répandues dans la nature, sont connues par leur aptitude à jouer un rôle très important dans la biodégradation de la matière organique et inorganiques présentes dans la nature. Les travaux mettant en œuvre des microorganismes responsables de la biodégradation de la MEK sont relativement rares, et très peu d'études ont été réalisées sur les actinomycètes.

Dans cette étude, l'objectif est d'isoler à partir des boues activées, les actinomycètes présents et d'étudier leur capacité à dégrader la méthyléthylcétone. Il s'agit également d'identifier au niveau du genre la ou les souches les plus performantes. Ce sujet s'inscrit dans le cadre de la protection de l'environnement et de la dépollution atmosphérique. Les objectifs assignés dans ce travail, s'inscrivent parfaitement dans le magistère de gestion des déchets, évaluation et solutions environnementales.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1. Les composés organiques volatils

I.1.1. Définition

Il n'y a pas d'accord sur une définition exacte des COV. D'une manière générale, les COV sont des substances organiques, c'est-à-dire contenant au moins un atome de carbone, qui passent facilement à l'état de gaz.

Dans le langage courant, les COV sont souvent synonymes des solvants organiques. Aux Etats-Unis, sous l'influence des problèmes environnementaux, on appelle COV tous les composés organiques qui contribuent à la création de l'ozone photochimique.

La plupart des définitions reposent sur les propriétés physiques et chimiques de ces composés: le point d'ébullition, l'équilibre gaz/liquide ou la tension de vapeur. La propriété qui est généralement prise en compte est la pression de vapeur saturante. Aux Etats-Unis, les COV sont des composés organiques dont la pression de vapeur est au-dessus de 13.3 Pa à 25°C **(Dewulf et Langenhove, 2002)**. En Europe, la Directive 1999/13/CE du Conseil du 11 mars 1999, définit les COV comme des produits chimiques organiques dont la pression de vapeur est au-dessus de 10 Pa à 20°C. En Australie les COV sont définis comme des composés chimiques ayant une pression de vapeur supérieure de 0.27 kPa à 25 °C **(Dewulf et Langenhove, 2002)**.

Les divergences qui existent au niveau de la définition des COV rendent difficile de dresser une liste exhaustive de ces composés.

Rafson (1998), répertorie environ 500 COV. Les familles de COV qui reviennent le plus souvent dans la littérature sont :

- Les aliphatiques (heptane, hexane, pentane, …) ;
- Les aromatiques (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène appelé aussi famille des BTEX) ;
- Les alcools (éthanol, méthanol, butanol, IPA : alcool isopropanol …) ;
- Les cétones (acétone, méthyléthylcétone, cyclohexanone…) ;
- Les esters (acétates d'éthyle, de butyle, d'isopropyle…) ;
- Les chlorés (perchloréthylène, trichloréthylène, dichlorométhane) ;
- Les composés azotés (amines, nitriles…) ;
- Les composés soufrés (mercaptans, diméthylsulfure…) ;

- Les éthers (1,4-Dioxane) ;
- Les aldéhydes (formaldéhyde).

I.1.2. Sources d'émission dans l'atmosphère

Les émissions de COV dans le monde sont estimées à environ un milliard de tonnes pour l'année 2000. Elles proviennent principalement, à hauteur de 90%, de sources naturelles (fermentation biologique, fuites de gaz naturel, éruptions volcaniques) et à hauteur de seulement 10% de sources anthropiques **(Cornille, 1992)**. Cependant, dans les grandes zones industrielles ou urbaines, les émissions anthropiques deviennent prépondérantes. Par exemple en France, en 1996, 16% des émissions sont d'origine naturelle contre 84% d'origine anthropique.

Pour cette raison, les pays industrialisés ont commencé à mettre en place des observatoires de surveillance de la qualité de l'air. En France, cela a été fait en 1961 par la création d'une association de type loi 1901 : le **CITEPA** (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique).

Grâce au travail du CITEPA, les principaux secteurs responsables des émissions de COV ont été reconnus. La **figure N°1**, présente l'inventaire des principales sources d'émissions de COV.

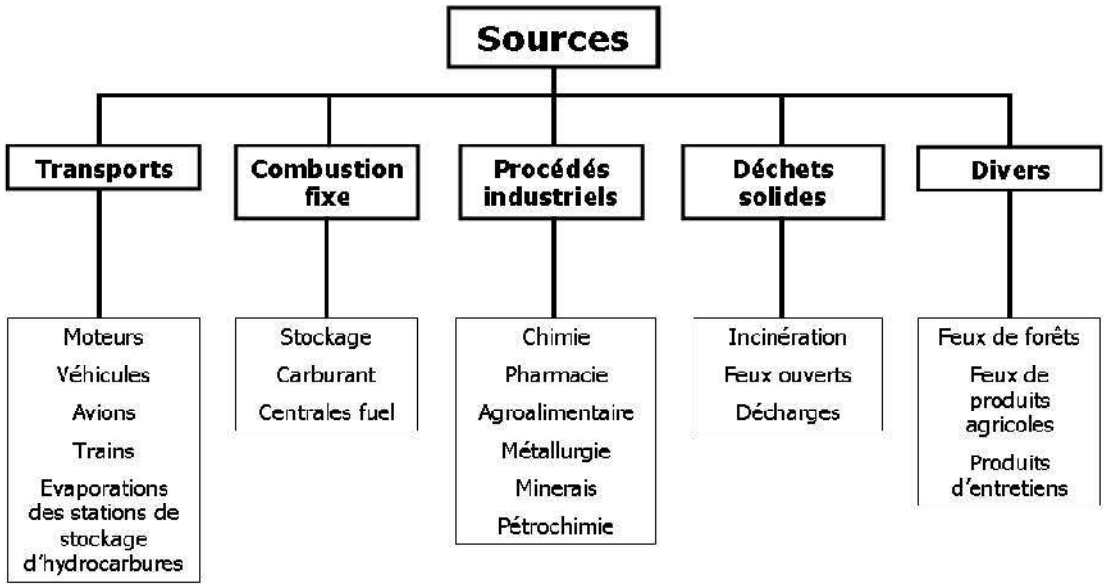


Figure N°1: Inventaire des sources principales d'émissions de COV **(Liu and Liptak, 1995)**.

I.1.3. Effets et impacts des COV

La présence de COV dans l'atmosphère présente des risques directs et indirects pour la santé humaine et pour l'environnement.

I.1.3.1. Les effets sur l'environnement

L'effet direct des COV sur les végétaux reste méconnu, leur impact est surtout indirect et étroitement lié à leurs propriétés de réactivité chimique. Dans la troposphère, c'est à dire entre sept et dix kilomètres du sol, et sous l'effet des rayonnements solaires, les COV et les oxydes d'azote réagissent pour former des polluants secondaires tels que l'ozone. C'est pourquoi les COV sont qualifiés de précurseurs photochimiques **(Monod *et al.*, 1998)**.

L'ozone est un polluant toxique, qui entraîne une baisse de la production des plantes. L'ozone provoque des perturbations des fonctions vitales de la plante : modification de la perméabilité des membranes, troubles physiologiques de la photosynthèse et de la respiration, changements de la pigmentation, pertes des aiguilles chez les conifères **(Dusserre *et al.*, 1998)**.

Par ailleurs, ce phénomène peut contribuer à des modifications climatiques du fait que l'ozone est un gaz à effet de serre.

I.1.3.2 Les effets sur la santé

Les COV affectent la santé selon deux voies : indirectement du fait de leur réactivité dans la troposphère (formation d'ozone) et directement sur l'organisme.

L'ozone généré affecte les capacités respiratoires et irrite les muqueuses (yeux, gorge). Les personnes les plus sensibles sont les enfants, et les personnes malades ou allergiques.

Les COV sont responsables d'un large panel d'affections décrites par les Fiches Toxicologiques de l'Institut National de Recherche et de Sécurité **(INRS)**. L'importance des symptômes dépend du polluant, du type de contact (inhalation, voies percutanées, ingestion), de la concentration, de la durée de l'exposition ainsi que de la sensibilité du sujet. Les troubles identifiés sont classés sur une gamme allant de l'irritation de la peau ou des muqueuses, à des troubles cardiaques, psychomoteurs ou neurologiques. Certains COV sont soupçonnés d'effets tératogènes et cancérigènes **(Dusserre *et al.*, 1998)**.

I.1.4. Les principaux procédés de traitement des COV

Face à l'impact environnemental et sanitaire des COV, les autorités ont mis en place des réglementations strictes sur les rejets industriels de ces composés. Afin de diminuer les émissions de composés polluants, une limitation d'utilisation de solvants au cours du procédé peut être envisagée **(Chadha and Parmele, 1993)**.

Cependant, si cette réduction ne peut être mise en place, il est nécessaire de traiter les rejets avant leurs émissions dans l'atmosphère.

Le traitement des rejets comporte deux aspects étroitement liés, qui sont le captage des polluants dans un débit d'air pour constituer l'effluent brut, et l'application à cet effluent d'un procédé de traitement. Les procédés de traitement se classent en deux grandes catégories :

- **Les procédés récupératifs :** toutes les possibilités de réutilisation des COV récupérés doivent être examinées (recyclage dans le même procédé, dans un autre procédé, vente). Parmi ces procédés figurent l'absorption, l'adsorption, la condensation, la séparation sur membrane.
- **Les procédés destructifs :** qui comprennent le traitement biologique, la photocatalyse, l'oxydation thermique et catalytique **(figure N°2)**.

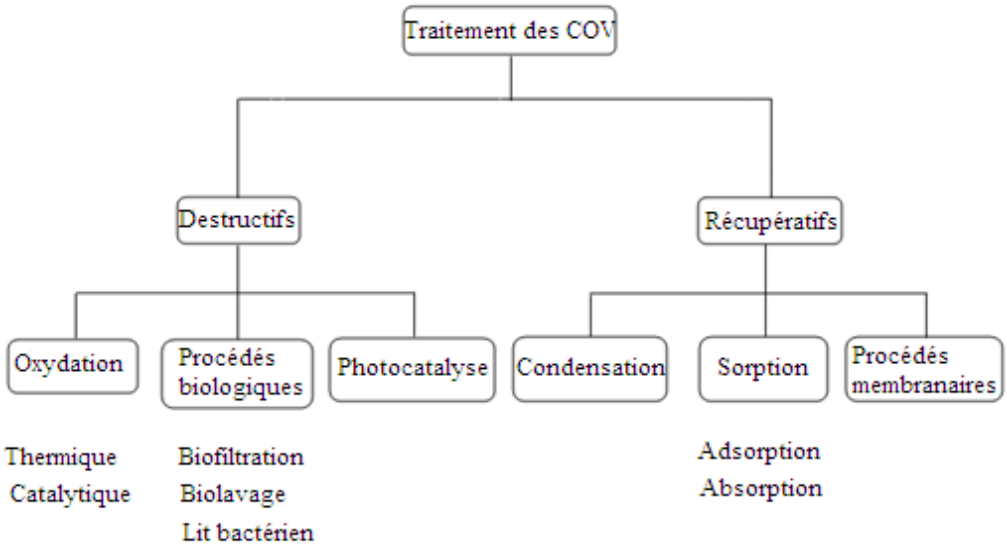


Figure N°2: Les principaux procédés de traitement des COV.

I.1.5. Les procédés biologiques

I.1.5.1. Le principe

Si l'utilisation des procédés biologiques date de plusieurs dizaines d'années dans le domaine du traitement des odeurs (mise en œuvre du premier biofiltre a lit de terre et a ciel ouvert pour l'élimination d'odeurs aux Etats-Unis en 1957) **(Brauer, 1986; Van Groenestijn and Hesslink, 1993)**, leur mise en œuvre pour le traitement d'effluents gazeux chargés en COV est beaucoup plus récente, notamment grâce a une meilleure connaissance des processus mis en jeu **(Fanlo *et al.*, 1998)**.

Le traitement biologique des COV se base sur la capacité des micro-organismes, en particulier des bactéries, à dégrader en aérobiose ces composés, qui servent de substrat pour leur croissance.

Le principe général de biodégradation des COV par de micro-organismes d'après Brauer **(Brauer, 1986)** suit la réaction exothermique suivante :

$$\text{COV} + O_2 + H_2O + N + P + \text{Oligoéléments} \xrightarrow{\textbf{Microorganismes}} \text{Biomasse} + CO_2 + H_2O + \text{chaleur}$$

Dans des conditions optimales de température et d'humidité, la réaction précédente montre que la biodégradation peut conduire à une transformation et une oxydation totale des COV en CO_2 et en H_2O.

Les micro-organismes impliqués dans ces réactions sont des hétérotrophes, c'est-a-dire qu'ils utilisent le carbone organique contenu dans les COV comme source de carbone et d'énergie indispensable à leur développement **(Edwards and Nirmalakhandan, 1996)**.

Les micro-organismes proviennent généralement d'une suspension de boues activées issue d'une station d'épuration des eaux usées **(Simon and Ottengraf, 1987)**. Dans certaines études, un inoculum spécialisé peut être également utilisé en amont du démarrage du laveur biologique **(Kennes and Thalasso, 1998)**. Dans ces cas là, une période d'adaptation est nécessaire afin de réduire leur phase d'adaptation et accélérer le démarrage de ces procédés **(Leson and Smith, 1997)**.

Le tableau N°1, présente des exemples de micro-organismes reconnus pour leur capacité à dégrader des COV.

Tableau N°1: Exemples de micro-organismes impliqués dans la dégradation de certains polluants **(Lalanne, 2006)**.

Polluants	**Micro-organismes**	**Bibliographies**
Acétone	*Rhodococcus sp.*	**(Kirchner, 1993)**
Monochlorobenzène	*Pseudomonas sp.* JS 150	**(Oliveira *et al.*, 2002)**
Méthanol	*Corynebacterium*	**(Le Cloirec *et al.*, 2003)**
Acétate d'éthyle	*Pseudomonas sp.*	**(Le Cloirec *et al.*, 2003)**
Acétate de butyle	*Pseudomonas sp.*	**(Le Cloirec *et al.*, 2003)**
Benzène	*Phanerochaete chrysosporium* *Pseudomonas Putida* *Pseudomonas sp.*	**(Oh *et al.*, 1998)** **(Converti *et al.*, 1997; Oh and Bartha, 1997)** **(Chang *et al.*, 1993)**
Dichloroéthane	*Xanthobacter*	**(Ottengraf, 1986)**
Dichlorométhane	*Hyphomicrobium sp.*	**(Ottengraf, 1986)**
Ethylbenzène	*Pseudomonas Putida*	**(Converti *et al.*, 1997; Oh and Bartha, 1997)**
MEK	*Rhodococcus sp.*	**(Kirchner, 1993)**
Toluène	*Nocardia* *Phanerochaete chrysosporium* *Pseudomonas Putida* *Pseudomonas sp.*	**(Le Cloirec *et al.*, 2003)** **(Oh *et al.*, 1998)** **(Converti *et al.*, 1997; Oh and Bartha, 1997)** **(Chang *et al.*, 1993)**
Xylène	*Phanerochaete chrysosporium* *Pseudomonas Putida* *Nocardia*	**(Oh *et al.*, 1998)** **(Converti *et al.*, 1997; Oh and Bartha, 1997)** **(Zili *et al.*, 1993)**

Il existe trois types de bioprocédés qui peuvent être classés suivant le caractère mobile ou statique de la phase aqueuse et de la biomasse. **Le tableau N°2** reprend cette classification.

Tableau N°2: Classification des procédés de traitement biologiques **(Simon and Ottengraf, 1987)**.

Phase aqueuse / Biomasse	Mobile	Stationnaire
En suspension	Biolaveur	-
Fixée	Lit bactérien	Biofiltre

Les avantages des procédés biologiques sont les suivants :

- Un coût de fonctionnement modéré,
- l'absence de nocivité des produits de dégradation (biomasse, eau et dioxyde de carbone),
- leur image positive auprès de l'opinion publique qui les perçoit comme des technologies respectueuses de l'environnement **(Sandrine, 2005)**.

I.1.5.2. Les principaux procédés biologiques

I.1.5.2.1. Le lit bactérien

Dans ce dispositif, la phase aqueuse est mobile, alors que la biomasse est immobilisée sur un matériau inorganique ou synthétique **(figure N°3)**.

Il semble parfaitement adapté à l'élimination de composés hydrosolubles **(Veiga *et al.*, 1998)** ou des composés odorants comme le l'hydrogène sulfuré **(Cox and Deshusses, 2002; Potivichayanon *et al.*, 2005)**.

I.1.5.2.2. La biofiltration

Dans un biofiltre, la biomasse est fixée sur un matériau support et les COV sont transférés de la phase gazeuse dans la phase liquide (biofilm) et servent de substrat à la croissance bactérienne **(figure N°3)**.

Les micro-organismes épurateurs peuvent provenir directement du matériau filtrant (sol, tourbe, compost..), d'une suspension de boues activées ou d'un inoculum spécialisé et préalablement adapté aux COV à épurer **(Jorio and Heitz, 1999)**.

Du point de vue de la mise en œuvre, la biofiltration est la technique biologique qui a fait l'objet du plus grand nombre d'applications industrielles.

I.1.5.2.3. Le lavage biologique

Un laveur biologique ou biolaveur, permet l'élimination des COV contenus dans un effluent gazeux selon deux phases distinctes. Dans un premier temps, le transfert des polluants dans la phase aqueuse a lieu dans une colonne de lavage **(Comas *et al.*, 1996)**. La dégradation biologique des COV transférés s'effectue ensuite au sein d'un bassin d'oxydation aérobie séparé contenant une biomasse en suspension **(Thalasso *et al.*, 1991) (figure N°3)**.

Ce système apparaît particulièrement approprié dans le cadre du traitement de composés ayant des cinétiques de dégradation lentes **(Sandrine, 2005)**.

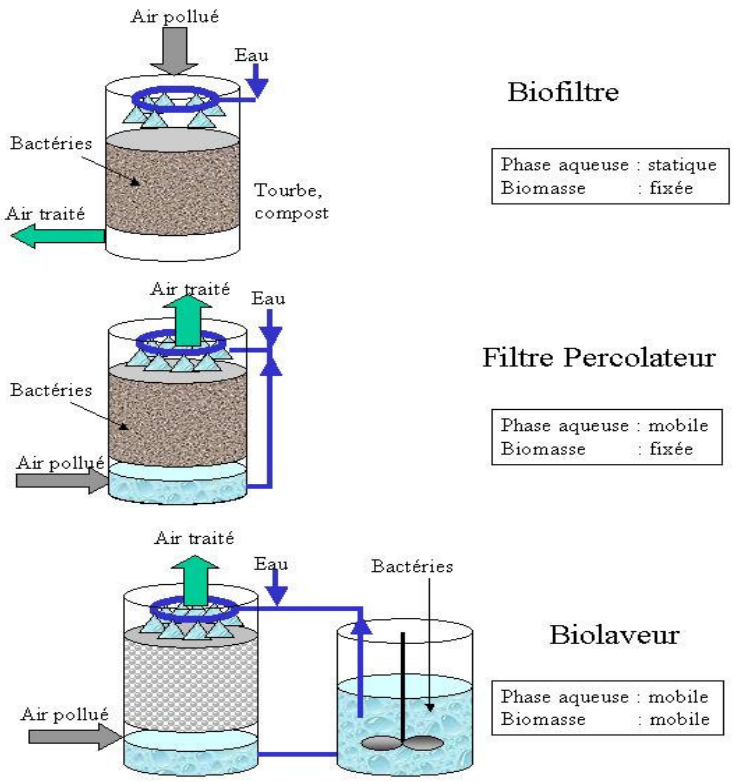


Figure N°3: Schéma du principe des différents procédés biologiques **(Sandrine, 2005)**.

I.2. La méthyléthylcétone

I.2.1. Définition et propriétés

La méthyléthylcétone est un liquide incolore, volatil, dégageant une forte odeur sucrée (limite olfactive : 5,4 ppm). Cette cétone est largement utilisée comme solvant, entrant dans la composition des peintures, de vernis, d'encres, de colles et d'adhésifs (particulièrement les vinyliques, nitrocellulosiques ou acryliques). Elle sert également comme agent d'extraction de certaines huiles végétales et minérales **(INRS, 2003)**.

Bien que la MEK est un produit chimique de synthèse, certaines sources naturelles existent, y compris certains aliments (poulet cru, le lait, certains fromages), certaines plantes et arbres, et la fumée du tabac.

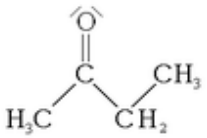


Figure N°4 : Structure chimique de la méthyléthylcétone (MEK)

La méthyléthylcétone, est également connu sous les noms de 2-butanone, butanone, methyl ethyl ketone (MEK) et methyl acetone. Certaines propriétés physiques et chimiques sont énumérés ci-dessous **(ATSDR, 1992; CRC, 1994; HSDB, 1999; NTP, 2002 ; INRS, 2009)** :

Formule chimique : C_4H_8O.

Masse molaire : 72.11.

Densité : 0.805 g/mL @ 20°C.

Pression de vapeur : 77.5 mm Hg @ 20°C.

Solubilité dans l'eau : 275 mg/ml @ 20°C.

Coefficient de partage octanol/eau, log Pow : 0,29.

Facteurs de conversion : 1 ppm = 2.95 mg/m^3, 1 mg/m^3 = 0.340 ppm @ 25°C, 760 mm Hg.

A température ambiante, La MEK est un liquide limpide, incolore, volatil, dont l'odeur forte et plutôt sucrée rappelle celle de l'acétone et peut être détectée des 5,4 ppm. Elle est très

soluble dans l'eau et miscible à de nombreux solvants organiques usuels, éthanol et éther diéthylique notamment. Elle est inflammable, avec un point d'éclair de -3°C.

La MEK est fortement réactive avec un certain nombre de produits chimiques, y compris le tert-butoxyde de potassium, le chloroforme, le peroxyde d'hydrogène, et les oxydants forts (par exemple, les acides chlorosulfoniques, sulfuriques, et nitriques).

Elle peut également réagir avec les bases et les agents réducteurs forts. Des réactions vigoureuses se produisent avec le chloroforme en présence de bases, et des peroxydes explosifs se forment lorsqu'elle est ajoutée au peroxyde d'hydrogène et l'acide nitrique.

I.2.2. Production et sources d'émission

Les valeurs récentes de fabrication industrielle annuelle de la méthyléthylcétone (en milliers de tonnes) sont les suivantes: États-Unis, de 212 à 305; Europe de l'Ouest : 215 ; Japon : 139 **(International Programme on Chemical Safety, 1992)**.

La MEK est libérée dans l'atmosphère par les industries chimiques, pétrochimiques, agroalimentaires, de pâtes et papiers, de l'impression couleur, de la peinture et de revêtement et des industries électroniques, etc conduisant à mettre en danger la qualité de l'air et la santé publique **(Mitchell, 1992)**.

En plus de l'activité industrielle, l'activité humaine peut être une source d'émission de méthyléthylcétone dans l'atmosphère, dont entre autres, la fumée de cigarette (500 ppm), et les gaz d'échappement des moteurs à essence (<0.1 à 1,0 ppm) **(International Programme on Chemical Safety, 1992)**.

La MEK se produit aussi naturellement à des faibles concentrations. Elle a été détectée dans les muscles de poitrine de poulet, les résidus de mauvaises herbes, les graines de pois, les feuilles de genévrier, les macroalgues marines. Des études ont montré que la MEK produit une saveur et une odeur dans une large gamme d'aliments, notamment le fromage et autres produits fermentés, souvent en raison de l'activité bactérienne.

La MEK a été détectée dans l'urine des humains non exposés professionnellement, dans le sang humain et dans l'air expiré. Des observations suggèrent fortement que la MEK peut être un produit secondaire du métabolisme des mammifères **(International Programme on Chemical Safety, 1992)**.

I.2.3. Utilisations

La méthyléthylcétone est surtout utilisée comme solvant. Son pouvoir de dissolution lui permet de dissoudre des gommes, des résines, plusieurs polymères synthétiques, des graisses et des huiles. Ainsi, on l'utilise dans diverses formulations comme les :

- Revêtements de polymères vinyliques,
- les laques, notamment les laques à base de nitrocellulose et des acryliques,
- les vernis et peintures à vaporiser,
- les décapants et diluants à peintures et vernis,
- les encres d'imprimeries,
- les colles et autres adhésifs.

En industrie, on utilise la méthyléthylcétone dans de nombreux procédés tels que :

- L'extraction de graisses, huiles, cires et résines naturelles,
- le déparaffinage des huiles minérales,
- la fabrication de cuir synthétique, de ruban magnétique, de film transparent et autres polymères,
- la fabrication des poudres colloïdales en pyrotechnie,
- la décaféination du café et du thé,
- l'extraction de saveurs.

La méthyléthylcétone est aussi un intermédiaire de synthèse de plusieurs produits chimiques de différentes catégories, comme le production de la méthyl isopropyl cétone, le peroxyde de méthyléthylcétone (un catalyseur de polymérisation), et la méthyl éthyl cétoxime (un antioxydant utilisé par exemple, dans les peintures) **(International Programme on Chemical Safety, 1992 ; Bohnet *et al.*, 2003)**.

De petites quantités de méthyléthylcétone sont aussi utilisés comme agent stérilisateur pour les instruments chirurgicaux, aiguilles hypodermiques, les seringues et les instruments dentaires; et comme solvant dans la production de produits pharmaceutiques et cosmétiques **(Mannsville, 1993 ; HSDB, 1994)**.

I.2.4. Comportement dans l'environnement

La méthyléthylcétone est libérée dans l'environnement à partir des utilisations industrielles et domestiques. Cette libération peut résulter d'un :

- Déversement;
- Evacuation des gaz;
- Emissions pendant la fabrication, le transfert et l'utilisation;
- Evaporation à partir des surfaces revêtues;
- Des pertes des décharges et des dépotoirs de déchets;
- Des pertes des gaz d'échappement des moteurs.

Ces rejets entre presque tous finalement dans l'atmosphère. La MEK a été détectée aussi dans l'eau potable, l'eau des puits, les eaux souterraines et dans les lixiviats des sites de déchets dangereux **(International Programme on Chemical Safety, 1992)**.

La MEK semble être très mobile dans l'environnement naturel. Elle est fortement soluble dans l'eau (275 g/l à 20°C) et s'évapore rapidement dans l'air.

C'est un composé très volatil. Une fois déversé sur le sol, il s'évapore. Les vapeurs, plus denses que l'air, peuvent se propager au niveau du sol et pénétrer dans les égouts et les sous-sols **(Guide d'intervention chimique, 2009)**.

D'après la valeur du log Pow, la méthyléthylcétone est pratiquement non bioaccumulable. Elle est rapidement absorbée et métabolisée par les mammifères **(Divincenzo *et al.*, 1976; Dietz *et al.*, 1981; Miyasaka *et al.*, 1982)**, et par de nombreux microbes **(Gerhold et Malaney, 1966; Dojlido, 1977; Urano et Kato, 1986)**.

Les principales voies de dégradation de la méthyléthylcétone dans l'atmosphère sont, la réaction avec les radicaux hydroxyles ainsi que la photolyse directe **(Guide d'intervention chimique, 2009)**.

I.2.5. Les effets sur l'environnement

La MEK est photochimiquement réactive, elle produit des radicaux libres qui conduisent à la formation de l'ozone, l'un des principaux constituant du smog photochimique **(Grosjean *et al.*, 1983)**. L'ozone présent des risques directs et indirects pour la santé humaine et pour l'environnement, dont les principaux sont décrits dans la partie précédente.

Elle est également très mobile et peut être lessivé du sol par l'eau et altérer cependant la qualité des eaux souterraines. Dans l'eau contenant des halogènes libres ou hypohalites, elle réagit pour former des haloformes qui sont plus toxiques que le composé d'origine **(International Programme on Chemical Safety, 1992)**. Son utilisation comme solvant dans les colles pour tuyau en chlorure de polyvinyle peut l'introduire dans l'eau potable (4,5 ppm, 6 mois après l'installation) **(HSDB, 1994)**.

Dans l'environnement aquatique, elle est facilement biodégradable et peu nocive. Elle peut cependant poser un problème de façon ponctuelle et localisée **(Guide d'intervention chimique, 2009)**. La toxicité de la méthyléthylcétone sur les organismes aquatiques est faible, les valeurs de toxicité sont supérieures à 100 mg/l.

Elle a également une faible toxicité sur les rongeurs terrestres après exposition par inhalation.

La MEK est produite par des champignons à des concentrations qui affectent la germination de certaines plantes **(International Programme on Chemical Safety, 1992)**.

I.2.6. Les effets sur la santé

Les effets de la méthyléthylcétone sur la santé humaine dépendent de la dose présente, la longueur et la fréquence de l'exposition, ainsi que de la santé de la personne.

I.2.6.1. Les sources d'exposition

L'exposition au MEK peut se produire dans le lieu de travail ou à partir de l'environnement par :

- La respiration de l'air contaminé de la production ou de l'utilisation des peintures, colles, revêtements, produits de nettoyage, etc.
- La respiration de l'air contaminé à proximité des sites de déchets dangereux.

- La respiration de la fumée de cigarette et des gaz d'échappement.
- La consommation de l'eau potable contaminée des puits, à proximité de la fabrication ou des sites de déchets dangereux.
- Contact de la peau ou des yeux avec le liquide pendant la production ou l'utilisation. **(Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995)**.

I.2.6.2. Toxicocinétique

I.2.6.2.1. Absorption

La méthyléthylcétone est rapidement absorbée par inhalation, contact cutané ou par ingestion. L'absorption cutanée est plus lente et moins importante sur une peau sèche ou normale que sur une peau humide.

I.2.6.2.2. Distribution

La MEK passe très vite dans le sang. En effet, suite à l'inhalation d'une concentration de 200 ppm durant 4 heures chez des volontaires, la concentration sanguine de la MEK augmente rapidement durant la première heure d'exposition, pour ensuite augmenter plus lentement jusqu'à la fin de l'exposition.

Elle se distribue dans les reins, le foie, le cerveau, les tissus adipeux, les muscles, le cœur et les poumons. La répartition de la MEK est à peu près équivalente dans tous les tissus.

Elle a été identifiée dans le sang de la mère et dans le cordon ombilical à la naissance, ce qui indique un passage placentaire.

La MEK ne s'accumule pas dans l'organisme humain.

I.2.6.2.3. Métabolisme

La MEK est métabolisée dans le foie où la majeure partie est oxydée en 3- hydroxy-2-butanone avant d'être réduite en 2,3-butanediol, qui lui est transformé en dioxyde de carbone et en eau **(Figure N°5)**. Une petite partie de la MEK peut être réduite en alcool butylique secondaire qui sera à son tour rapidement oxydé pour redonner de la MEK.

I.2.6.2.4. Excrétion

La MEK est éliminée dans l'air expiré sous forme inchangée et sous forme de CO_2, et dans l'urine sous forme inchangée et de métabolites glucurono-conjugués **(Figure N°5)**. Seulement 2 à 3 % de la MEK absorbée est excrétée de façon inchangée dans l'air expiré et 0,1 % se retrouve dans l'urine. La MEK et ses métabolites sont presque totalement éliminés chez les mammifères au bout de 24 heures. Elle a été trouvée dans le lait maternel **(Service du répertoire toxicologique, 2004)**.

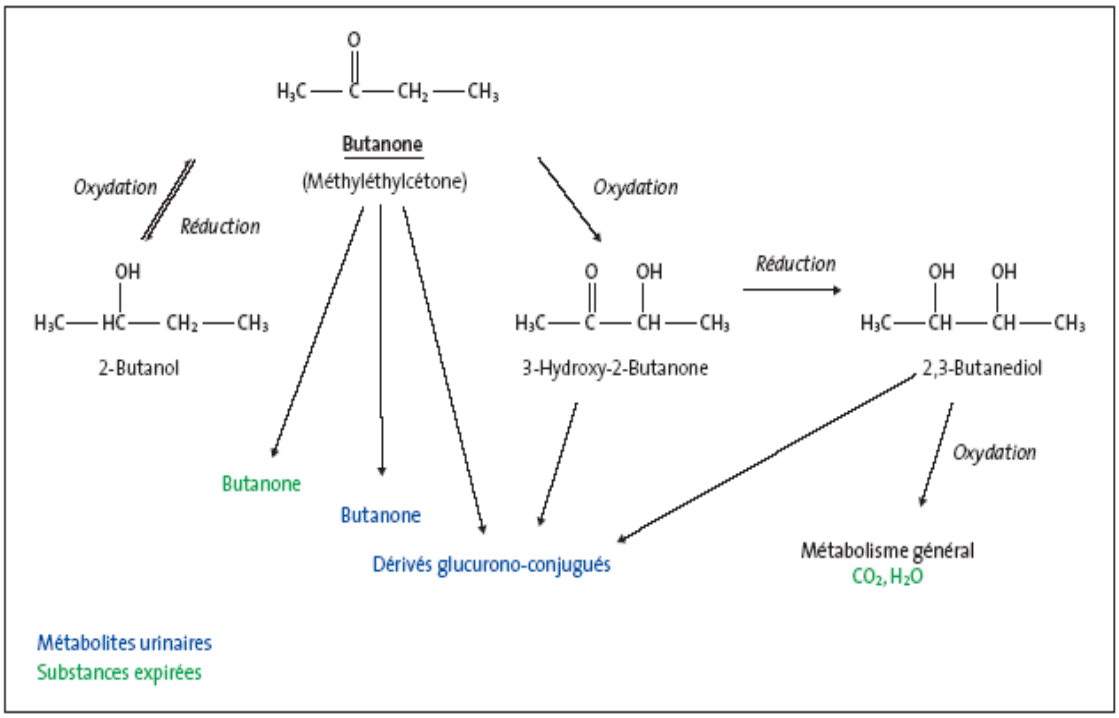


Figure N°5: Le métabolisme de la méthyléthylcétone **(INRS, 2009)**.

I.2.6.3. Toxicité

I.2.6.3.1. Toxicité aiguë

Les principaux effets décrits au cours d'expositions aiguës, que ce soit lors d'expositions professionnelles ou lors d'expositions humaines contrôlées, sont des signes d'irritation des muqueuses (oculaires, nasales et pharyngées) **(INRS, 2009)**.

L'exposition professionnelle des travailleurs à une atmosphère contenant 300 à 500 ppm (126 à 210 mg/kg/jour) entraine des maux de tête, nausées, irritation des voies respiratoires. Une exposition momentanée à 33.000 ou 100.000 ppm a causé une irritation intolérable des yeux, du nez et de la gorge **(Krasavage *et al.*, 1982)**.

A des concentrations plus élevées, peuvent apparaître des troubles digestifs ou des céphalées, voire des troubles du système nerveux central avec des symptômes tels que maux de tête, nausées, étourdissements, somnolence et confusion **(INRS, 2009)**.

Un contact par les yeux avec la méthyléthylcétone liquide peut provoquer des lésions de la cornée **(Krasavage *et al.*, 1982; HSDB, 1994)**.

Des études chez des volontaires exposés pendant 4 heures à 200 ppm de MEK n'ont pas permis de démontrer des effets neurocomportementaux significatifs (test psychomoteur, sensorimoteur, psychologique, etc.) **(Service du répertoire toxicologique, 2004)**.

I.2.6.3.2. Toxicité chronique

L'exposition répétée ou prolongée avec la peau peut provoquer des dessèchements ou des gerçures, des dermatites et le blanchissement de la peau.

Une exposition répétée ou prolongée peut provoquer une irritation de la peau et des dermatoses à cause des propriétés dégraissantes du produit.

La méthyléthylcétone pourrait être un dépresseur du système nerveux central à de très fortes concentrations. Une étude rapporte qu'un travailleur exposé à la MEK par inhalation pendant au moins 2 ans a eu des symptômes réversibles tels que des tremblements, des troubles de la coordination et des mouvements musculaires involontaires. L'étude ne précise pas les concentrations en milieu de travail et l'auteur note qu'un seul des travailleurs exposés a été affecté **(Guide d'intervention chimique, 2009)**.

Des études épidémiologiques et des études de cas concernant des expositions à la MEK en milieu de travail rapportent des effets sur le système nerveux central tels que des maux de tête, une perte d'appétit et de poids, des troubles gastro-intestinaux, des étourdissements et de la somnolence. Puisque les études ont été réalisées chez des travailleurs exposés simultanément à plusieurs solvants, il est difficile de relier ces effets à l'exposition à la MEK **(Service du répertoire toxicologique, 2004)**.

I.2.6.3.3. Effets cancérogènes

Les données ne permettent pas de faire une évaluation adéquate de l'effet cancérogène **(INRS, 2009)**.

I.2.6.3.4. Effets sur la reproduction

Un cas de malformations multiples a été rapporté après exposition d'une femme à la MEK pendant sa grossesse à des niveaux proches de 200 ppm (valeur estimée) pendant 20 heures par semaine. Cet unique cas ne permet pas de conclure sur la responsabilité de la MEK **(INRS, 2009)**.

I.2.6.3.5. L'interaction avec d'autres solvants

La co-exposition à la méthyléthylcétone (MEK), et au n-hexane potentialise la neurotoxicité de ce dernier, chez les humains ainsi que chez les animaux. Cet effet est associé à la persistance accrue de 2,5-hexanedione (2,5-HD), le métabolite neurotoxique du n-hexane, dans le sang, probablement due à l'inhibition de sa biotransformation par la MEK **(Rong *et al.*, 2002)**.

L'exposition simultanée à 200 ppm de MEK et 100 ppm de m-xylène inhibe le métabolisme du m-xylène en augmentant la concentration sanguine de m-xylène et en diminuant l'excrétion urinaire de l'acide méthylhippurique, son métabolite. Il n'y a pas eu d'effet sur la concentration sanguine de la MEK et sur la concentration urinaire du 2,3-butanediol.

L'exposition simultanée à la MEK (100 ppm) et au toluène (50 ppm) ou à la méthyl isobutyl cétone (50 ppm) ou à l'acétone (125 ppm) n'a pas eu d'effet ni sur les concentrations sanguines, ni sur les concentrations dans l'air expiré, des solvants.

L'inhalation de la MEK (200 ppm) combinée à l'ingestion d'éthanol (0,8 g/kg) chez des volontaires diminue le métabolisme de la butanone et augmente sa concentration dans le sang, l'urine et l'air expire **(Service du répertoire toxicologique, 2004)**.

I.2.7. Biodégradation

La méthyléthylcétone est absorbée et métabolisée par les organismes présents dans l'environnement, par exemple, dans les eaux usées **(Dore *et al.*, 1975)**, et dans le sol **(Perry, 1968)**.

Elle est presque entièrement dégradables à des concentrations allant jusqu'à 800 mg/litre. En présence de boues activées, il y avait une dégradation complète du MEK en 8 jours à une concentration de 200 mg/litre (200 ppm) et en 9 jours à une concentration de 400 mg/litre (400 ppm) **(Dojlido, 1979)**. A une concentration de 20 mg/litre dans l'eau de rivière contenant des microbes préadaptés, la MEK a été complètement dégradée en 2,5 jours **(Dojlido, 1977)**. **Delfino et Miles (1985),** rapportent un taux plus lent de la décomposition aérobie dans les eaux souterraines, 1 mg/litre a été entièrement dégradé dans 14 jours.

La MEK peut servir comme source unique de carbone et d'énergie pour un certain nombre de bactéries telles que : *Pseudomonas* sp. KT-3 **(Tae *et al.*, 2006)** et certains souches d'actinomycètes comme : *Mycobacterium vaccae* (JOB5) **(Phillips *et al.*, 1974)**, *Rhodococcus* sp **(Kirchner, 1993)** et *Nocardia* sp **(Eubanks *et al.*, 1974)**, et pour certains champignons comme les espèces de *Exophiala lecanii-corni* (CBS 102400), *Cladosporium sphaerospermum* (ATCC 200384), *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 24725), *Cladosporium resinae* (ATCC 34066) **(Qi *et al.*, 2002)**.

Peu de rapports traitent les voies de dégradation des cétones **(Deshusses, 1994)**. **Eubanks *et al.*, 1974**, ont décrit les voies de dégradation de la MEK, par la souche *Nocardia* sp. LSU-169, selon la **figure N°6**.

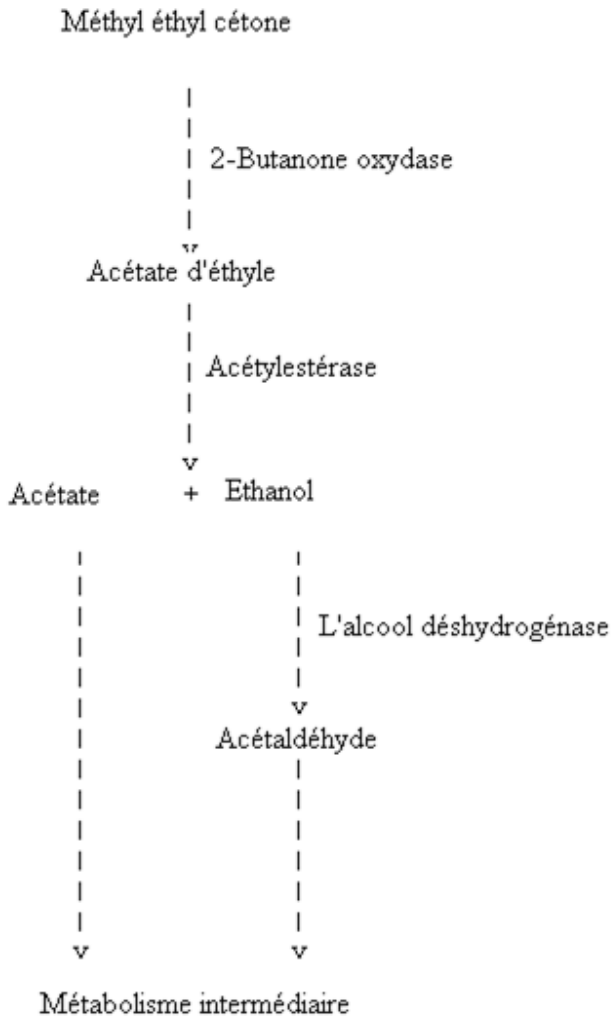


Figure N°6 *:* Les voies de dégradation de la MEK par la souche *Nocardia* sp. LSU-169 **(Eubanks *et al.*, 1974).**

I.3. Les actinomycètes en tant qu'agents de biodégradation dans la nature

I.3.1. Caractères généraux

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif **(Williams *et al.*, 1993 ; Sanglier et Trujillo, 1997)** dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires constituées d'hyphes **(Eunice et Prosser, 1983)**, c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et prosser, 1983)**. Cela explique leur dénomination: le mot « Actinomycètes » provient de deux substantifs grecs « Actino » et «Mycete » et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants ».

La morphologie générale des actinomycètes ressemble fortement aux mycètes **(Prescott *et al.*, 1995)**. Cependant, leur organisation cellulaire procaryotique ; le diamètre de ces hyphes, qui est habituellement inférieur à 1,5 microns chez les actinomycètes, toujours égal ou supérieur au double chez les champignons ; la structure chimique de leur paroi, qui ne contient ni cellulose ni chitine ; leur métabolisme azoté et leur sensibilité aux antibiotiques et aux phages, montrent bien que les actinomycètes sont en effet des bactéries **(Hawker and Linton, 1971)**.

La plupart des actinomycètes sont immobiles. Cependant, certains types produisent des spores flagellées permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques.

Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants **(Lacey, 1973 ; Porter, 1971 ; Waksman, 1959 ; Williams *et al.*, 1984)**. Beaucoup d'entre eux sont connus pour avoir la capacité de synthétiser des métabolites secondaires bioactifs qui comprennent les enzymes, les herbicides, les pesticides, les antibiotiques, etc.

Très peu d'actinomycètes sont pathogènes pour l'homme, les animaux et certains végétaux.

I.3.2. Ecologie

Les actinomycètes sont très répandus dans la nature. Ils sont plus fréquents dans le sol et dans le compost végétal, et se retrouvent également dans les fumiers, au fond des lacs et des rivières, dans les produits alimentaires, où ils peuvent causer leur détérioration, et dans l'air. Les

actinomycètes ont été isolés de l'eau de mer et de la boue du fond de la mer, bien que la mer ne semble pas être un habitat favorable pour eux. Certaines espèces d'*Actinomyces* et de *Nocardia*, sont des parasites des plantes et des animaux.

Certaines espèces d'actinomycètes semblent préférer certains habitats par rapport à d'autres, quelques exemples sont représentés dans le **tableau N°3** :

Tableau N°3 : Habitats de certains actinomycètes.
(Grigorova et Norris, 1990).

Actinomycètes	Habitats
Actinoplanes	L'eau douce, la litière végétale, le sol.
Frankia	Les nodules racinaires des non-légumineuses.
Micromonospora	L'eau douce, les sédiments, les sols humides.
Nocardia amarae	Les boues activées.
Rhodococcus coprophilus	Les déjections animales, l'eau, le sol.
Saccharopolyspora rectivirgula	Moisi du foin.
Streptomyces	Le sol, la litière végétale, l'eau.
Thermoactinomyces	Le compost.

I.3.2.1. Les actinomycètes dans le sol

Le sol héberge différents types de micro-organismes. Les actinomycètes sont l'un des grands groupes de la population du sol. Ils représentent presque 10 à 50% de la communauté microbienne totale. Numériquement ils sont moins dominants que les bactéries et plus dominants que les champignons. Leur nombre est très variable dans différents types de sols, allant de 10^5 à 10^8 g^{-1} dans les zones tempérées. Faible nombre d'actinomycètes ont été enregistrés dans l'Antarctique, les tourbes acides, et les sols saturés. Dans les sols secs alcalins, leur abondance est relativement élevée. Leur présence est maximale dans les premiers centimètres du sol et diminue avec la profondeur **(Arvind *et al.*, 2003)**.

Les actinomycètes les plus abondants dans le sol sont *Streptomyces* spp. **Lechevalier (1964)**, **Lechevalier et Lechevalier (1967)** ont pu isoler 5000 actinomycètes à

partir de 16 types de sols, dont > 95% étaient des *Streptomyces* et seulement un peu plus de 1% était des *Nocardia* et des *Micromonospora*. D'autres genres ont été isolés mais à des pourcentages faibles et variables **(Tableau N°4)**.

Tableau N°4: La distribution générale des actinomycètes dans le sol **(Lechevalier et Lechevalier, 1967)**.

Genres	***% des isolats***
Streptomyces	95.34
Nocardia	1.98
Actinomadura	0.10
Micromonospora	1.40
Thermoactinomyces	0.14
Microbispora	0.18
Thermomonospora	0.22
Microellobosporia	0.04
Actinoplanes	0.20
Streptosporangium	0.10
Pseudonocardia	0.06
Micropolyspora	0.10
Mycobacterium	0.14

Les actinomycètes sont souvent plus fréquents dans les prairies, que dans les champs cultivés ou les terres vierges **(Alexander, 1961)**, et sous herbe pâturée, que sous l'herbe coupée **(Hall and Grossbard, 1972)**. Ils sont souvent plus nombreux dans les rhizosphères des plantes, que loin des racines. Leur nombre peut augmenter brièvement lorsque la matière organique fraîche est ajoutée au sol.

Ils réalisent de nombreuses activités dans le sol, dont principalement la dégradation de la matière organique.

Les actinomycètes, surtout les S*treptomyces*, produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyle iso-borneol qui sont responsables de l'odeur d'humus caractéristique des sols **(Zaitlin *et al.*, 2003)**.

I.3.2.2. Dans le milieu aquatique

Les actinomycètes ne sont pas adaptés pour la croissance dans les habitats aquatiques, mais ils peuvent néanmoins être récupérés facilement de l'eau douce, de l'eau de mer et à partir des sédiments. L'isolement des actinomycètes à partir de l'eau ne signifie pas qu'elles sont réellement aquatiques, une provenance à partir d'un environnement terrestre avoisinant ou même atmosphérique doit toujours être prise en considération **(Hsu et Lockwood, 1975)**.

I.3.2.2.1. Dans les eaux douces

La présence et l'importance des actinomycètes dans l'écosystème d'eau douce ont été étudiés par plusieurs chercheurs. Les genres d'actinomycètes qui sont fréquents dans les habitats d'eau douce comprennent : *Actinoplanes, Micromonospora, Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces* et *Thermoactinomyces* **(Arvind *et al.*, 2003)**.

Les actinomycètes sont généralement plus nombreux dans les ruisseaux et les rivières, que dans les lacs et les réservoirs.

Ils transforment l'eau potable en une eau désagréable, en développant un goût et une odeur de terre ou de moisi. La géosmine et le méthyl iso-borméol en sont les responsables. La géosmine conduit à une odeur terreuse à aussi peu que 0,22 ppb. Autres composés volatils des actinomycètes responsable de l'odeur comprennent : mucidone, 2-phényl éthanol, phénol-3 actonone, Salicylaldehyde, isopropyl-3-méthoxy pyrazine et le 5-méthyl-3-neptanone **(Arvind *et al.*, 2003)**.

I.3.2.2.2. Dans les eaux marines

Les actinomycètes sont moins nombreux dans les eaux marines par rapport aux habitats terrestres et aux eaux douces. Ils peuvent survivre dans les sédiments marins et terrestres sous forme de spores **(Okazaki et Okami 1975; Goodfellow et Williams, 1983)**.

Plusieurs actinomycètes telle que *Actinoplanes, Microbispora, Miromonospora, Micropolyspora, Nocardia, Streptomyces, Streptosporangium, Streptoverticillium* et

Thermoactinomycetes, ont été isolés de l'eau de mer et des habitats marins **(Goodfellow et Williams, 1983)**, le genre *Streptomyces* prédomine dans les zones peu profondes des océans Pacifiques et Atlantiques, alors que *Micromonospora* et *Nocadiaforms* dominent dans les sédiments d'eau profonde **(Williams *et al.*, 1983)**.

I.3.2.3. Dans les composts et les boues d'épuration

Les microorganismes mésophiles y compris les actinomycètes procèdent à la décomposition des substrats nutritifs et créent une température plus élevée qui offrent des conditions idéales pour la croissance rapide des actinomycètes thermophiles.

Thermoactinomyces, Saccharomonospora, Micropolyspora, Pseudonocardia, Streptomyces, et *Thermomonospora,* ont été isolés à partir du compost. Leur prolifération et leurs activités sont stimulées par l'humidité, l'oxygène, des conditions de pH neutre à alcalin, la forte teneur en éléments nutritifs organiques, et la chaleur **(Arvind *et al.*, 2003)**.

Les actinomycètes mésophiles sont présents dans les boues d'épuration. Le genre *Nocardia* existe souvent, il forme des flocs qui facilitent la sédimentation des particules présentant une importance particulière **(Schuppler *et al.*, 1998, Lechevalier et Lechevalier, 1994)**. Le genre *Gordona* a été également isolé **(Kampfer, 1997)**.

Dans les boues activées, les Actinobacteria font partie des bactéries accumulatrices des polyphosphates **(Seviour *et al.*, 2003)**.

I.3.2.4. Dans l'air

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport **(Ouhdouch, 1989)**. La dissémination des actinomycètes dans l'air est principalement liée à la quantité de poussière dans laquelle les spores et les fragments du mycélium s'accrochent **(Arvind *et al.*, 2003)**. Cependant, quelques spores d'actinomycètes de l'air présentent un danger pour la santé humaine **(Suutari *et al* ., 2002)**.

I.3.2.5. Les végétaux

Les actinomycètes sont qualitativement et quantitativement importants dans la rhizosphère, ils ont une influence bénéfique sur la croissance et le développement des plante **(Petrolini *et al.*, 1991 ; Crawford *et al.*, 1993)**, Les genres, y compris : *Streptomyces* (15%), *Corynebacterium* (50-83%), *Mycobacterium* et *Nocardia* sont les plus abondants dans la rhizosphère des plantes.

L'exception la plus attractive est celle du genre *Frankia* qui s'intègre aux racines et fixe l'azote. Leur rôle réside aussi dans la protection des plantes contre les pathogènes par l'influence de leurs produits métaboliques **(Sardi *et al.*, 1992 ; Thirupl *et al.*, 2001)**.

Peu d'espèces sont phytopathogènes, l'exemple le plus étudié est *Streptomyces scabies,* responsable de la gale de la pomme de terre **(Lindholm, 1997)**.

I.3.2.6. l'homme et l'animal

Les actinomycètes sont responsables d'un certain nombre de maladies de l'homme et de l'animal **(Pirouz *et al.*, 1999)**, à titre d'exemple des espèces de *Nocardia* peuvent causer une variété d'infection chez l'homme, qui sont cliniquement classées en nocardiosis cutanée et nocardiosis pulmonaire **(Kano *et al.*, 2002)**.

I.3.3. physiologie

I.3.3.1. Conditions de croissance

Plusieurs facteurs environnementaux vont conditionner la croissance des actinomycètes:

- **Le PH :** Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin **(Omura, 1992)**.
- **La température :** Les actinomycètes sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C ou plus **(Omura, 1992)**.
- **L'oxygène :** Selon le type respiratoire, les actinomycètes peuvent être séparés en deux groupes: les formes oxydatifs aérobies, qui se trouvent essentiellement dans le sol, et les formes fermentatifs anaérobies strictes ou facultatives, qui vivent dans les cavités naturelles de l'homme et des animaux.

Concernant les besoins nutritifs, les actinomycètes sont, en général, des chimoorganotrophes, utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs espèces sont capables aussi d'être chimioautotrophes, utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone **(Mariat et Sebald, 1990)**.

Afin d'obtenir une croissance abondante, des matières suffisamment énergétiques doivent être fournis par des protéines, des hydrates de carbone, ou des acides organiques. Des sources appropriées d'azote, soit organique ou inorganique et certains minéraux notamment le potassium, le magnésium, le phosphore, le soufre et le fer, sont également nécessaires **(Srinivasan *et al.*, 1991)**.

Certains ont des exigences nutritionnelles en facteurs de croissance telles que les vitamines et certains acides aminés.

D'autres aliments peuvent être aussi nécessaires pour soutenir des activités métaboliques dans l'utilisation des actinomycètes au niveau industriel, comme par exemple, le besoin en cobalt pour la synthèse de vitamine B_{12} (cobalamine), et le besoin en chlorine pour la synthèse de chloramphénicol.

I.3.3.2. Le milieu de culture

La composition d'un milieu de culture doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries.

Les meilleurs milieux de culture pour l'isolement des actinomycètes sont ceux contenant de l'amidon, du glycérol ou de la chitine comme source de carbone, la caséine, l'asparagine ou l'arginine comme source d'azote organique **(Burman, 1973 ; Williams *et al.*, 1993 ; Hilali *et al.*, 2002)**.

Pour l'isolement des actinomycètes, les antibiotiques sont ajoutés dans les milieux sélectifs pour inhiber la croissance de certains germes indésirables. Les molécules les plus utilisées sont : La nystatine, le cycloheximide (Actidione), la pimaricine, l'amphotericine B pour l'inhibition des champignons. La polymixine, la novobiocine, l'acide nalidixique, la colistine pour stopper les bactéries Gram négatives **(Nonomura et Hayakawa, 1988 ; Larpent et Larpent, 1990, Takizawa *et al.*, 1993 ; Kurtbaoke et Wildman, 1998)**.

L'incubation se fait, généralement, à une température de 28 ou 30°C qui favorise le développement des actinomycètes **(Burman, 1973)**.

I.3.4. Caractères culturaux

Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

- Des colonies poudreuses habituellement couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu.
- Des colonies pâteuses rugueuses ou lisses, rarement couvertes de mycélium aérien, et qui peuvent être facilement détachées des milieux solides.
- Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons **(Kalakoutskii et Agre, 1976)**.

Ces colonies sont généralement de taille moyenne (1 à 4 mm de diamètre). Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, orange, vert, violet, rose, gris, noir,…,etc **(Leclerc H, 1975)**.

En milieu liquide, selon **Amanullah *et al.*, 2000**, les *Streptomyces* peuvent présenter, trois types de morphologie **(figure N°8)** :

- Les hyphes branchés ou non, sous forme de mycélium dispersé,
- un mycélium plus ramifié formant des enchevêtrements,
- des pelotes denses dont la taille peut varier de 0,1 µm à plusieurs millimètres **(Bushell, 1988 ; Hobbs *et al.*, 1989 ; Drouin, 1996 ; Amanullah *et al.*, 2000)**. ces pelotes peuvent donner lieu à des limitations de transfert d'oxygène et/ou des nutriments du milieu de culture vers les bactéries se trouvant à l'intérieur de la pelote **(Papagianni, 2004)**.

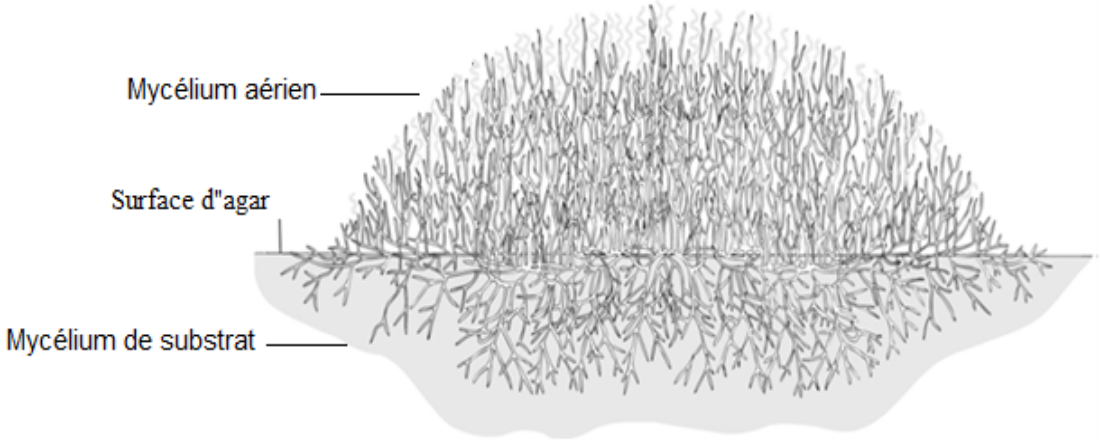


Figure N°7: La croissance d'une colonie d'actinomycète sur milieu solide

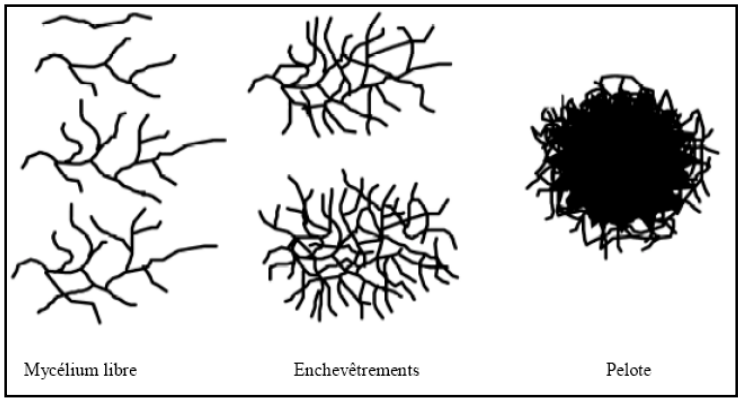


Figure N°8: Les classes morphologiques de *Streptomyces* cultivé en milieu liquide **(Amanullah *et al.*, 2000)**.

I.3.5. Reproduction

Les actinomycètes possèdent trois principaux modes de reproduction. Chez certains, de nombreuses cloisons transversales se forment parfois à travers le mycélium qui se fragmente en courts éléments en forme de bâtonnets, chacun capable de donner naissance à un nouveau mycélium.

Chez d'autres, des cellules reproductrices ovales ou sphériques, les conidies, se forment isolément ou par scission des extrémités de certains hyphes du mycélium.

Enfin, certains actinomycètes peuvent former des sporanges à l'extrémité des hyphes. A l'intérieur de ces petites structures en forme de sac, existent un grand nombre de cellules qui seront éventuellement libérées par la rupture de la paroi du sporange **(Stanier *et al.*, 1966)**.

D'autres groupes d'actinomycètes peuvent former des athrospores par fragmentation des hyphes.

Le mode de reproduction est différent selon les groupes d'actinomycètes **(figure N°9)** :

En effet, La forme de reproduction la plus simple est représentée par *mycococci*. Ces organismes ne constituent ni mycélium, ni des formes bâtonnets. Leurs cellules subissent des divisions irrégulières qui aboutissent à la formation d'éléments de forme et de tailles irrégulières, de temps en temps mobiles.

Des cellules bâtonnets et coccoïdes dans les représentants des *Mycobacteriaceae* et *Chlamydophila* qui peuvent se développer en un mycélium transitoire.

Chez *Nocardia* et *Oerskovia*, la fragmentation mycélienne peut être considérée comme la principale forme de reproduction végétative, elle est observée dans de nombreux actinomycètes et assez caractéristique de ceux qui sont appelés « nocardiophores ». Le processus de fragmentation dans ces groupes implique la formation de nombreuses cloisons qui divisent les hyphes en croissance en éléments plus ou moins réguliers. Des éléments Flagellés, mobiles, parfois ramifiés, sont formés sur le mycélium dans *Oerskovia* spp.

Chez *Dermatophilaceae*, des cloisons sont formés dans deux plans perpendiculaires, lors de la fragmentation du mycélium. Les cellules séparées sont souvent flagellés, très mobiles, et parfois appelé zoopores.

Le cycle de reproduction chez *Frankia* a été déduit à partir des observations faites sur des tranches de tissus végétaux infectés. Deux formes principales sont considérées: des ramifications

de mycélium cloisonné et des vésicules de 5 um de diamètre, ces derniers sont formés sur la partie terminale des hyphes mycéliens, subterminale, ou dans des positions intercalaires. Les vésicules sont abondantes dans les nodules qui fixent l'azote moléculaire.

Les *Streptomyces*, portent des spores simples ou des chaînes de spores sur le mycélium aérien, comme ils ont la capacité de former des cellules spécialisées à parois épais appelé arthrospores ou chlamydospores.

Des espèces rares d'Actinoplanes forment deux types de spores, soit des spores mobiles et flagellés inclus dans des sporanges sur le mycélium de substrat, soit des chaînes d'arthrospores sur le mycélium aérien.

Micromonospora spp, forme généralement des spores isolés, mais semble de former des spores occasionnelles en paires. il forme également des chlamydospores.

Les espèces de *Kitasatoa* et *Pilimelia* forment également des spores mobiles dans des sporanges et des spores immobiles en chaînes **(Kalakoutskii et Agre, 1976)**.

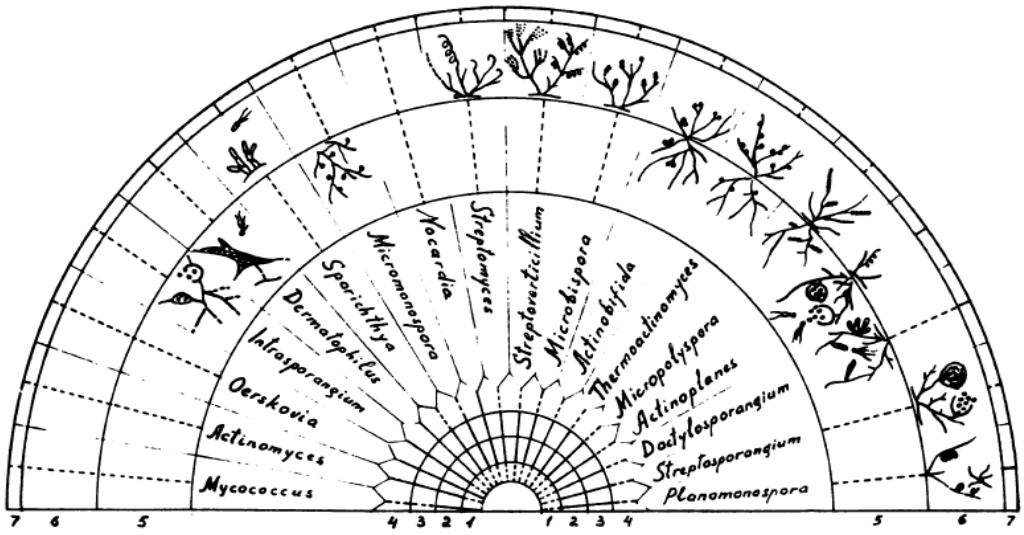


Figure N°9: Les modes de reproduction dans certains représentants des Actinomycetales **(Kalakoutskii et Agre, 1976)**.

Les lignes pleines indiquent la présence des étapes correspondantes; les lignes pointillées indiquent l'absence d'une étape. **(1-4)** Cycle de vie végétative; **(5-7)** spores ; **(1)** des cellules mobiles, **(2)** des cellules immobiles; **(3)** mycélium; **(4)** la fragmentation du mycélium; **(5)** la formation des spores sur le mycélium de substrat; **(6)** formation des spores sur le mycélium aérien; **(7)** spores mobiles.

I.3.6. Cycle biologique

Les actinomycètes possèdent une structure des procaryotes, mais un cycle biologique qui ressemble à celui de certains champignons **(Larpent et Sanglier, 1989)**.

I.3.6.1. La formation des spores

I.3.6.1.1. Les exospores

Les exospores peuvent être formés sur le mycélium de substrat et / ou le mycélium aérien. Elles sont biologiquement peu actives mais ne sont pas en dormance. Elles font preuve d'une bonne résistance à la dessiccation et à la chaleur sèche.

Les conidies sont formées par septation des extrémités des filaments. Dans ce cas, des parois transversales se forment pour délimiter les spores, ces parois s'épaississent autour de chaque spore individualisée et des ornementations externes peuvent se former **(figure N°10) (Wildermuth et Hopwood, 1970 ; Williams *et al.*, 1972 ; Miguelez *et al.*, 2000)**.

Ces spores peuvent, selon les genres, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores.

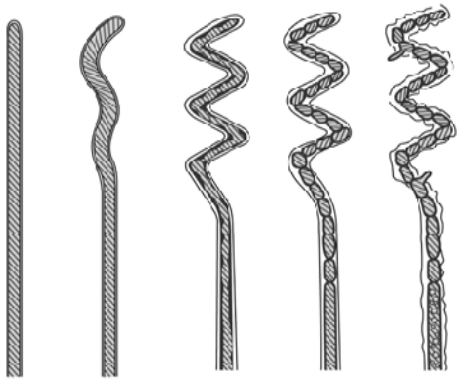


Figure N°10: La formation des conidies.

I.3.6.1.2. Les endospores

Elles naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. Elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*. Les endospores sont hautement résistantes à la chaleur et autres adversités.

I.3.6.2. La germination des spores

C'est une séquence de changements morphologiques de la spore en structure végétative. Trois événements distincts sont décrits :

- **L'activation :** qui débute par un apport de certains cations divalents. C'est un processus nécessitant de l'énergie. Cette étape est accompagnée par des changements de la réfractibilité des spores, d'une diminution de l'absorbance et de la thermorésistance et d'une augmentation remarquable de l'activité respiratoire.
- **L'initiation :** qui dépend de la présence d'une source de carbone exogène, et elle est marquée par une augmentation de l'activité métabolique et biosynthétique.
- **L'émergence du tube germinal :** qui nécessite une source de carbone et d'azote (**Sharples et Schaal, 1981 ; Salas et Hardison, 1981 ; Salas *et al.*, 1983)**.

Les endospores de *Thermoactinomyces* ne germent dans les conditions de milieu favorable qu'avec une activation spécifique de nature physique. Un refroidissement à 20°C de 2 à 48 h est nécessaire pour permettre aux spores de *Termoactinomyces vulgaris* de répondre ensuite au choc thermique de 55°C inducteur de la germination **(Leveau et Buix, 1993)**.

I.3.6.3. Le mycélium de substrat et le mycélium aérien

Le mycélium de substrat, appelé également mycélium primaire ou végétatif, est un ensemble de filaments multinucléaires formés à partir de tube germinal, ce dernier s'allonge par croissance apicale et se ramifie à maintes reprises. Son développement, sur la surface et à l'intérieur du milieu solide, donne naissance à des colonies jeunes, formées par des filaments attachés en matrice complexe qui pénètrent dans le milieu et solubilise les molécules organiques par l'action des enzymes extracellulaires. Cette structure leur permet de coloniser les matériaux solides **(Mighelez *et al.*, 2000)**.

Sur le mycélium de substrat se développe un mycélium aérien ou secondaire, composé d'hyphes, dressés sur le mycélium du substrat. Sa formation est influencée par plusieurs facteurs, notamment : la composition du milieu de croissance, la température d'incubation et la présence de composés stimulant sa croissance **(Srinivasan *et al.*, 1991)**.

Selon **Locci et Sharples (1984)**, la croissance aérienne est inhabituelle chez les procaryotes, elle doit donc présenter une adaptation à l'environnement terrestre. Ainsi, les actinomycètes typiquement aquatiques (par exemple, des espèces de Micromonospora, Actinoplanes, et Certains autres) sont généralement dépourvus de la croissance du mycélium aérien.

Il faut noter aussi que certains actinomycètes microaérophiles, telles que les *Rodococcus*, ne produisent pas de vrai mycélium. En effet, la propagule originale s'allonge par la synthèse de nouveau matériel pariétal sur l'un ou les deux pôles pour former des filaments plus au moins allongés **(Locci et Schaal, 1980)**.

Les différences entre le mycélium aérien et celui de substrat chez le genre *Streptomyces* sont les suivants :

- Le mycélium aérien est légèrement plus épais,
- Il est habituellement de couleur foncée (à cause des pigments insolubles),
- Il est moins ramifié,
- ne montre presque aucune tendance à pénétrer le milieu,
- sa couche aérienne est hydrophobe,
- Il forme des spores par fragmentation **(Kalatouskii et Agre, 1976)**.

I.3.6.4. Les structures particulières

D'autres structures morphologiques particulières sont observées chez certaines espèces d'actinomycètes à savoir :

- Les **sclérotes** trouvés chez *Chainia*, sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés.
- Les **synnemata,** appelés également corémies, sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

- Des vésicules appelés **sporanges**, contenant des spores, chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium*.

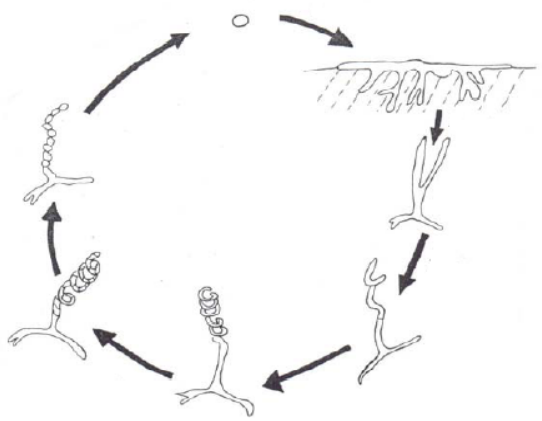


Figure N°11: Le cycle de vie de *Streptomyces* **(Sophie, 2006)**.

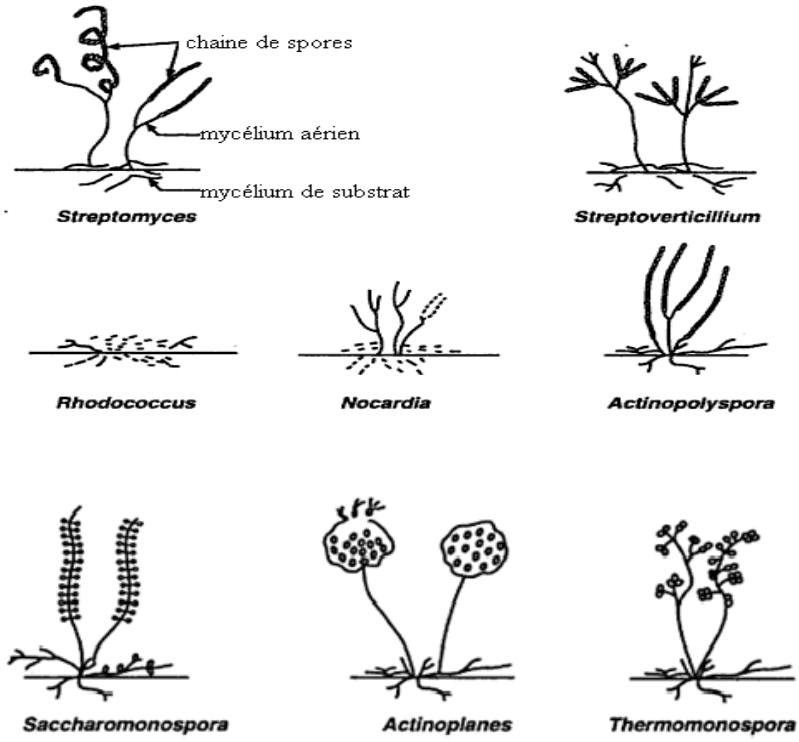


Figure N°12: Le mycélium de substrat et le mycélium aérien chez certains genres d'actinomycètes **(Chandrakant, 2008)**.

I.3.7. Taxonomie

La taxonomie des actinomycètes a beaucoup évolué au cours des vingt à trente dernières années en même temps qu'évoluait le nombre de genres d'actinomycètes.

L'ordre des actinomycètes qui comptait 5 genres en 1948, 9 en 1958, en comprenait 37 en 1974 selon la 8éme édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* **(Gottlieb, 1974)**.

En 1989, l'application de critères chimiotaxonomiques a permis de répartir les actinomycètes en sections (de 26 à 33) sur la base de caractères morphologiques et biochimiques.

Selon la classification présentée dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* édité en 1994, les actinomycètes sont répartis en 8 groupes (de 22 à 29) avec l'introduction de nouveaux genres et avec une division plus précise du groupe (22) des Nocadioformes en 4 sous-groupes et du groupe (26) des Maduromycetes en 2 sous groupes.

En **1997, Stackebrandt *et al.*,** proposent une nouvelle classification hiérarchique des actinomycètes qui reposent uniquement sur l'analyse des séquences des ARNr 16S et des gènes codant pour les ARNr 16S. Donc, ils ont décrit une nouvelle classe, qui se définit comme un ensemble de souches présentant plus de 80% de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S et possédant un résidu adénine à la position 906 et un résidu adénine ou cytosine à la position 955.

Actuellement et selon la classification du « Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », seconde édition 2004 **(Garrity *et al.*, 2004)**, le phylum *Actinobacteria* (bactéries à Gram positif et G+C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également « *Actinobacteria* ». Cette classe est divisée en 5 sous-classes **(Tableau N°5)**: *Acidimicrobidae, Rubrobacteridae, Coriobacteridae, Sphaerobacteridae, Actinobacteridae.*

Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae*, l'ordre des *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordres : *Actinomycineae, Micrococcineae, Corynebacterineae, Micromonosporineae, Propionibacterineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae, Streptosporangineae, Frankineae* et *Glycomycineae* **(Stackebrandt *et al.*, 1997; Labeda et Kroppenstedt, 2000 ; Stackebrandt et Schumann, 2000)**.

Tableau N°5: La classification hiérarchique de la classe Actinobacteria basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S **(Garrity *et al.*, 2004)**.

Classe : *Actinobacteria*

S/C	*Acidimicrobidae*	*Rubrobacteridae*	*Coriobacteridae*	*Sphaerobacteridae*	*Actinobacteridae*

S/C	*Actinobacteridae*	
Ordres	*Bifidobacteriales*	*Actinomycetales*

Ordre : *Actinomycetales*				
S/O *Actinomycineae*	**S/O** *Micrococcineae*	**S/O** *Corynebacterineae*	**S/O** *Micrimonosporineae*	**S/O** *Propionibacterineae*
Famille *Actinomycetaceae*	**Familles** *Micrococcaceae* *Bogoriellaceae* *Rarobacteraceae* *Sanguibacteraceae* *Brevibacteriaceae* *Cellulomonadaceae* *Dermabacteraceae* *Dermatophilaceae* *Dermacoccaceae* *Intrasporangiaceae* *Jonesiaceae* *Microbacteriaceae* *Beutenbergiaceae* *Promicromonosporceae*	**Familles** *Corynebacteriaceae* *Dietziaceae* *Gordoniaceae* *Mycobacteriaceae* *Nocardiaceae* *Tsukamurellaceae* *Williamsiaceae*	**Famille** *Micromonosporineae*	**Familles** *Propionionibacteriaceae* *Nocardioidaceae*
S/O *Pseudonocardineae*	**S/O** *Streptomycineae*	**S/O** *Streptosporangineae*	**S/O** *Frankineae*	**S/O** *Glicomycineae*
Familles *Pseudonocardiaceae* *Actinozynnemataceae*	**Famille** *Streptomycetace*	**Familles** *Streptosporangiaceae*	**Familles** *Frankiaceae* *Geodermatophilaceae* *Microsphaeraceae* *Sporichthyaceae* *Acidothermaceae* *Kineosoriaceae*	**Famille** *Glycomycetaceae*

S/C : sous-classe, S/O : sous-ordre.

I.3.8. Critères de détermination des genres d'actinomycètes

Les actinomycètes constituent un groupe bactérien très varié dont l'appartenance ou non à un genre donné est très délicate à établir. L'étude des caractères morphologiques, les caractères physiologiques et la composition chimique de la paroi cellulaire permettent de séparer ces microorganismes avec une grande précision en groupes et genres différents et d'identifier ces bactéries jusqu'au niveau de l'espèce **(Boone et Pine, 1968; Lechevalier and Lechevalier, 1970; Lechevalier *et al.*, 1973 ; Lechevalier *et al.*, 1977 ; Xu et Jiang, 1996)**.

La description des espèces appartenant au genre *Streptomyces*, le genre le plus important, a fait l'objet de travaux réalisés par "International *Streptomyces* Project" grâce à des méthodes standardisées qui ont permit la description de 450 espèces de *Streptomyces* sur la base des caractères principaux suivants :

- La couleur du mycélium aérien sporulé avec 7 classes de couleur : blanc, gris, jaune, rouge, bleu, vert et violet ;
- La forme des chaînes de spores **(Figure N°13)** ;
- La production du pigment mélanoïde bruns à noirs ;
- L'ornementation de la paroi sporale : lisse, verruqueuse, échinulée ou chevelue **(Figure N°14)** ;
- La capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer : D-glucose, Dxylose, L-arabinose, L-rhamnose, D-fructose, D-galactose, raffinose, D-mannitol, inositol et saccharose **(Larpent et Sanglier, 1989)**.

I.3.8.1. Les caractères morphologiques

Les caractères morphologiques principalement utilisés dans la classification des actinomycètes sont :

- La présence, l'importance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien.
- La présence de spores, leur mobilité, leur disposition sur les hyphes et leurs formes.
- La présence de structures particulières comme les sporanges, les sclérotes ou synnemata **(Schofieled et Schaal, 1981 ; Demain et Solomon, 1985)**.

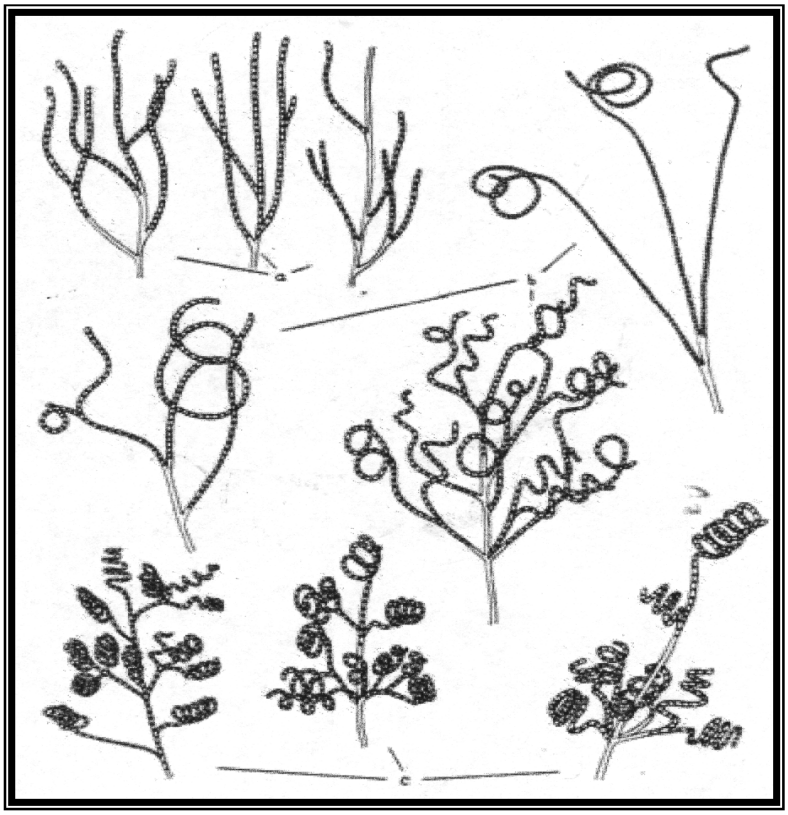


Figure N°13: Morphologie des chaînes de spores chez les espèces de *Streptomyces* **(Shirling et Gottlieb, 1966)**.

a : Chaînes de spores droites.
b : Chaînes de spores rectiflexibles.
c : Chaînes de spores spirales.

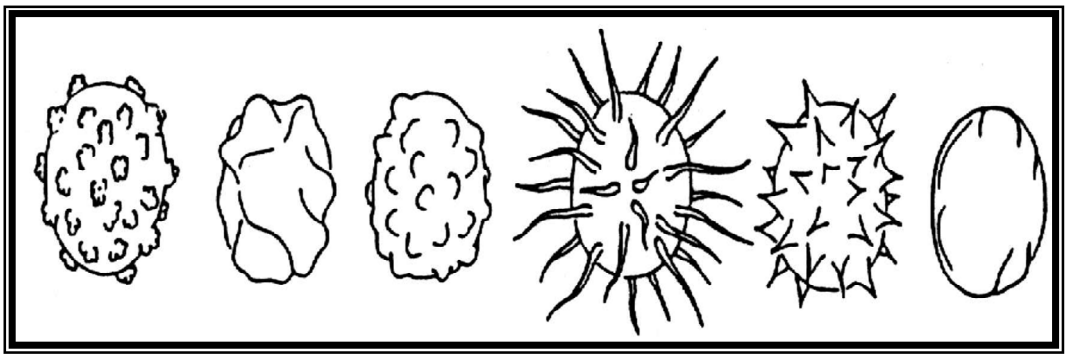


Figure N°14: Ornementation de la paroi sporale des espèces de *Streptomyces* selon **Larpent et Sanglier (1989)**.

I.3.8.2. Les caractères chimiotaxonomiques

L'étude des constituants majeurs de la paroi cellulaire des actinomycètes constitue un outil pratique pour leur taxonomie **(Stanek et Robert, 1974 ; Lechevalier *et al*., 1977)**.

I.3.8.2.1. Les acides aminés

La paroi cellulaire des actinomycètes est composée soit d'une :

- Glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, tel que : *Actinomyces* **(Lechevalier et Lechevalier, 1985)**.
- Glycoprotéine contenant le plus souvent de l'acide 2,6 diaminopimélique (DAP) ; ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives tel que les *Streptomyces*. Il se présente sous deux formes : la forme LL et la forme méso **(Tableau N°6) (Lechevalier et Lechevalier, 1970 ; Demain et Solomon, 1985)**.

La glycine est également présente en quantité important chez les *Streptomyces* et les *Actinoplanetes* **(Larpent et Sanglier, 1989)**.

I.3.8.2.2. Les sucres

La présence ou l'absence de quatre sucres (arabinose, galactose, xylose et madurose) dans les hydrolysats acides de cellules entières permet de classer les actinomycètes de type pariétal II, III et IV contenant du méso-DAP **(Tableau N°7)**. Sur cette même base, il est aussi possible de répartir en deux sous groupes les actinomycètes de type pariétal III selon la présence ou l'absence de Madurose.

I.3.8.2.3. Les lipides

Les lipides taxonomiquement important peuvent être représentés par trois groupes : les lipides polaires, les ménaquinones et les acides gras.

I.3.8.2.3.1. Les lipides polaires

Les plus communs chez les actinomycètes sont les phospholipides d'origine membranaire **(Lechevalier et Lechevalier, 1980)**. Leur analyse aide à la détermination du genre de ces microorganismes par exemple l'étude de 7 espèces appartenant au genre *Micromonospora* a révélé la présence constante de 5 phospholipides : cardiolipides,

Tableau N°6: Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires **(Lechevalier et Lechevalier, 1980)**.

Type pariétal	Constituants distinctifs majeurs	Exemples de genres
I	LL-DAP, glycine	*Streptomyces*
II	méso-DAP, glycine	*Micromonospora,*
III	méso-DAP	*Actinomadura*
IV	méso DAP, arabinose, galactose	*Nocardia*
V	lysine, ornithine	*Actinomyces israelii*
VI	lysine	*Oerskovia*
VII	DAB, glycine	*Agromyces*
VIII	ornithine	*Cellulomonas*

DAP : acide 2,6 diaminopimélique ; DAB : acide 2,4 diaminobutyrique.

Tableau N°7 : Types pariétaux et types glucidiques cellulaires des actinomycètes aérobies à méso-DAP **(Lechevalier et Lechevalier, 1980)**.

Type pariétal	Constituants pariétaux distinctifs majeurs	Type glucidique cellulaire (Spectre glucidique)	Constituants glucidiques caractéristiques
II	Glycine	D	Xylose, Arabinose
III	Aucun	B	Madurose
		C	Aucun ou Rhamnose
IV	Arabinose, galactose	A	Arabinose, galactose

phosphatidyl-éthanol amine, phosphatidyl-inositol et monoside de phosphatidyl- inositol, et lysocardiolipide **(Lechevalier *et al.*,1977)**.

I.3.8.2.3.2. Les ménaquinones

Les ménaquinones sont des lipides ayant dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carboné aliphatique composée d'unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne **(Collins *et al.*, 1977)**. Par exemple, le genre *Planomonospora* se caractérise par une ménaquinone MK9 (H2) : ménaquinone avec neuf unités isoprènes dont deux hydrogénées.

Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides.

I.3.8.2.3.3. Les acides gras

Sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre. Les acides gras rencontrées chez les actinomycètes sont, soit des molécules de 12 à 20 atomes de carbone, soit un groupe d'acides mycoliques de 20 à 90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium, Nocardia* et *Rhodococcus.*

I.4. Rôle des actinomycètes dans la biodégradation de la matière organique

I.4.1. La notion de biodégradation

La biodégradation consiste à décomposer un substrat organique comme, les hydrocarbures, les solvants, les composés organochlorés, etc. par l'action des microorganismes vivants. Les polluants sont digérés par les microbes et transformés en composés plus simples non toxiques.

On distingue la biodégradation en présence d'oxygène (en aérobiose), de la biodégradation en absence d'oxygène (en anaérobiose), par la nature des microorganismes dégradateurs et les produits de dégradation.

I.4.2. Le processus impliqué dans la biodégradation des polymères organiques

Le processus de biodégradation est généralement réalisé en deux étapes :

I.4.2.1. La fragmentation

Les microorganismes utilisent différents modes opératoires pour fragmenter les polymères en un mélange d'oligomères et/ou monomères, dont principalement, la sécrétion des enzymes spécifiques.

Ces enzymes peuvent être :

- **Des hydrolases** comme : les cellulases, les amylases et les chitinases, qui sont des hydrolases facilement synthétisés par les microorganismes du sol pour hydrolyser les polymères naturels abondants (par exemple la cellulose, l'amidon et de la chitine). Les lipases, les estérases et les endopeptidases.
- **Des oxydoréductases** comme : les mono-oxygénases, les di-oxygénases, les peroxydases et les oxydases qui sont produites par la plupart des micro-organismes lignolytiques **(Lucas *et al.*, 2008)**.

I.4.2.2. L'assimilation

L'assimilation est l'événement unique dans lequel il ya une intégration réelle des atomes à partir des fragments d'un polymère à l'intérieur des cellules microbiennes. Les molécules transportées sont oxydés par 3 principales voies cataboliques (La respiration aérobie et anaérobie et la fermentation) qui conduisent à la production d'ATP et des éléments constitutifs de la structure cellulaire **(Lucas *et al.*, 2008)**.

- **La respiration aérobie:** les micro-organismes sont capables d'utiliser l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Tout d'abord, les voies cataboliques de base (glycolyse, par exemple, β-oxydation, les réactions cataboliques des acides aminés, des purines et des pyrimidines) produisent une quantité limitée d'énergie. Deuxièmement, plus d'énergie est encore produite par la phosphorylation oxydative réalisée par des systèmes de transport

d'électrons qui réduisent l'oxygène en eau. Le résultat est aussi la synthèse de plus grandes quantités de molécules d'ATP que dans l'oxydation incomplète.

- **La respiration anaérobie:** les micro-organismes utilisent des accepteurs finals d'électrons autres que l'oxygène (par exemple, NO^-_3, SO_4^{2-}, S, CO_2, Fe^{3+} et de fumarate) **(Brock and Madigan, 1991)**. Le résultat est aussi la synthèse de plus grandes quantités de molécules d'ATP que dans l'oxydation incomplète.

- **La fermentation :** une voie d'oxydation incomplète dans laquelle les molécules organiques endogènes synthétisées par la cellule elle-même sont utilisées comme accepteurs finals d'électrons. Les produits de la fermentation peuvent être minérales et/ou organiques (le CO_2, l'éthanol, le lactate, l'acétate et le butanediol) **(Regnault, 1990; Brock and Madigan, 1991; Alcamo, 1998)**.

I.4.3. La biodégradation des polymères naturels

Les actinomycètes peuvent utiliser beaucoup de sources naturelles de carbone et d'azote. Les genres mésophiles et thermophiles et plus particulièrement : *Streptomyces* et *Thermomonospora* respectivement, ont la capacité de dégrader l'amidon par hydrolyse grâce à des complexes enzymatiques extra-cellulaires composés α et β amylases. L'amylase de *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces praecox* peuvent produire des concentrés de sirop de maltose à partir d'amidon **(Martin *et al.*, 1998)**.

Ils sont capables également d'attaquer tous les composants lignocellulotiques, y compris la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Il a été montré que *Thermomonospora fusca* peut convertir les déchets des usines de pâte hautement cellulosiques et à lignine faible, en un produit protéique à haute valeur nutritionnelle, utilisé comme complément alimentaire dans le régime alimentaire des poussins **(Martin *et al.*, 1998)**.

La présence de grandes quantités de chitine dans les sols et dans les environnements marins a permis l'évolution d'une grande diversité de microorganismes capables de décomposer cette substance, dont les principaux sont les actinomycètes **(Jerome *et al.*, 2004)** tel que les genres *Microbispora, Micromonospora, Nocardiopsis, Planobispora, Planomonospora,*

Thermoactinomyces, *Thermomonospora* et les espèces *Nocardia mediterranei*, *Actinomadura pelletierii* **(Hsu et Lockwood, 1975 ; Demain et Solomon, 1985)** par deux principaux enzymes : La chitinase et la chitobiase **(Jerome *et al.*, 2004)**.

I.4.4 La biodégradation des polymères de synthèse

Les capacités biodégradatrices des actinomycètes ne se limitent pas seulement aux composés organiques naturels mais concernent également des substrats organiques de synthèse, tel que : les hydrocarbures, les phénols, les pesticides et d'autres composés récalcitrants **(Kimura et Urushigawa, 2001 ; Lin *et al.*, 2005 ; De Schirijver et De Mot, 1999)**.

Il a été démontré que les souches de *Nocardia* peuvent dégrader une variété d'alcanes tels que le 1-phénylalcanes et 1 cyclo-hexylalcanes, des cycloalcanes et cycloalcènes, des hydrocarbures aromatiques tels que le biphényle, la benzidine **(Martin *et al.*, 1998)**, le xylène, le p-nitrophénol (PNP) et de nombreux autres composés phénoliques **(Hanne *et al.*, 1993)**.

Le genre de *Nocardia* est efficace dans la dégradation des huiles **(Jirasripongpun, 2002)**, du kérosène **(Edelvio *et al.*, 2009)** et du caoutchouc **(Emo and Roberto, 2003)**. Il est capable aussi de dégrader certains pesticides, tel que : l'herbicide « dalapon », et l'acide 2,2-dichloropropionique **(Martin *et al.*, 1998)**.

De nombreuses espèces isolées du genre *Rhodococcus* dégradent un large spectre de composés récalcitrant. Par exemple, *R.opacus* SAO101 est capable de croître sur le phénol, le benzène, le 4-nitrophénol, le biphényle, le naphtalène, le dibenzofurane et le dibenzo-p-dioxine **(Kimura et Urushigawa, 2001)**. *R.opacus* M213 dégrade le naphtalène, le toluène, le phénol et l'hydroxybenzoate **(Uz *et al.*, 2000)**.

Certains pesticides persistants comme le thiocarbamate et le s-triazine **(De Schrijver et De Mot, 1999)**, ainsi que le 2-mercaptobenzothiazole peuvent être catabolisés par des actinomycètes appartenant aux genre *Rhodococcus* **(Haroune *et al.*, 2004)**.

La dégradation versatile du genre *Rhodococcus* est due à la présence de larges plasmides linéaires portants des gènes codant pour la dégradation de différents composés **(Van der Geize et Dijkhuizen, 2004 ; Konig *et al.*, 2004)**.

Le genre *Mycobacterium* a également un grand pouvoir dégradant. **Mrozik *et al*., (2003)** ont montré que la majorité des isolats capable de croître sur les HAPs appartiennent à ce genre.

Les *Streptomyces* sont très répandus dans la nature et jouent un rôle très important dans la biodégradation des composés naturels et aromatiques **(Anurag *et al*., 2005),** et également des pesticides et des plastiques **(Byungtae L *et al*., 1991 ; Ei-Shafei *et al*., 1998)**.

Un actinomycète halotolérant *Streptomyces albiaxialis* est capable de croître sur le pétrole brute et l'utiliser comme source unique de carbone et d'énergie dans une gamme de salinité de 3-10% de NaCl **(Kuznetsov *et al*., 1992)**.

Il a été démontré que 17 souches, identifiées comme *Streptomyces* sp ont été capables de dégrader le diuron (4 mg/l), qui est un puissant biocide qui - jusqu'à son interdiction - a été très utilisé comme désherbant pour tuer les graminées indésirables et d'autres mauvaises herbes (**Castillo *et al*., 2006)**.

Une souche appartenant au genre S*treptomyces* est capable de dégrader le lindane : un insecticide organochloré commercialisé depuis 1938, longtemps utilisé en agriculture et dans les produits pharmaceutiques pour le traitement de la gale et l'élimination des poux. Chez l'homme, le lindane atteint principalement le système nerveux, le foie et les reins, et il est peut-être un agent cancérigène et / ou perturbateur endocrinien **(Benimeli *et al*., 2006)**. Des espèces de ce genre peuvent aussi dégrader certains pesticides résistants comme le DDT et la simazine. Dans des travaux récents, une étude réalisée sur la biodégradation du pesticide, carbofuran par 319 actinomycètes isolés à partir d'un sol salin, prouve que seul sept isolats de ces actinomycètes ont été capables de résister au pesticide, à une concentration de 20µg/ml, et ils ont été identifiés comme : *Streptomyces alanosinicus, Streptoverticillium album, Nocardia farcinia, Streptomyces atratus, Nocardia vaccini, Nocardia amarae* et *Micromonospora chalcea* **(Jayabarath *et al*., 2010)**.

Plusieurs rapports ont été publiés sur les souches du genre *Gordona* appartenant aux actinomycètes, possèdent un pouvoir dégradant des composés xénobiotiques. Plusieurs isolats de ce genre utilisent le benzène, le toluène, le xylène, le pyrène et le diester de phthalate comme seule source de carbone et d'énergie **(Zermane, 2008)**.

Chapitre II
Matériel et méthodes

II.1. Isolement des actinomycètes

II.1.1. Origine et prélèvement de l'échantillon

L'échantillon utilisé dans cette étude provient des boues activées prélevées à partir de la station d'épuration des eaux usées d'El- Athmania dans la région de Mila à l'Est du pays. Les prélèvements sont effectués dans le bassin d'aération de la station dans des flacons stériles de 250 ml de capacité. Les échantillons ont été transportés au laboratoire dans la même journée, ensuite conservés à 4 °C au réfrigérateur jusqu'à utilisation.

II.1.2. Observation à l'état frais

Une goutte de l'échantillon est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, puis déposée sur une lame propre. La lame est ensuite recouverte par une lamelle propre. Une observation à l'état frais à l'aide d'un microscope optique et sous grossissement **×40** a été effectuée sur cette préparation. Les formes biologiques ou autres structures ont été notées.

II.1.3. Réalisation des dilutions

Des dilutions décimales de la solution mère, allant jusqu'à 10^{-6} ont été réalisées dans l'eau physiologique stérile contenant 9 ‰ d'NaCl. Pour chaque dilution deux répétitions ont été réalisés.

II.1.4. Préparation du milieu d'isolement

Le milieu sélectif utilisé est le milieu ISP4 **(Annexe 1)**, additionné de nystatine comme agent antifongique à une concentration de 100 µg/ml et d'acide nalidixique à 10 µg/ml à action contre les bactéries à Gram négative. Les antibiotiques sont stérilisés après filtration à travers un filtre millipore de 0.22 µm de porosité. Ces solutions d'antibiotiques stériles sont mélangées au milieu de base en surfusion à une température de 45 °C.

II.1.5. Ensemencement et incubation

A l'aide d'une pipette stérile, 0,1 ml de chaque dilution a été prélevé et déposé dans une boite de Pétri contenant environ 15 ml du milieu d'isolement refroidi. L'inoculum déposé est ensuite étalé sur le milieu à l'aide d'un râteau en verre. Les boites ainsi préparées ont été incubées à une température de 28 °C pendant 3 semaines. Des observations journalières sont effectuées afin de suivre la croissance des colonies et d'éviter les contaminations.

II.1.6. Dénombrement des colonies

Après croissance, les colonies bactériennes rapprochant par leur aspect macroscopique et microscopique aux actinomycètes, sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies, après 5, 12 et 25 jours.

II.1.7. Préidentification des actinomycètes

II.1.7.1. Aspect des colonies

Dans un premier temps, les colonies d'actinomycètes sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect microscopique (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique (Leica DMLS), grossissement **×10 (Williams et Cross, 1971)**.

Dans une seconde observation, une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique au grossissement **×40**. Les caractères morphologiques sont notés **(Suzuki, 2001)**.

II.1.7.2. Coloration de Gram

En utilisant un microscope optique au grossissement **×100**, des observations microscopiques après coloration de Gram (par la méthode classique), sont effectuées sur l'ensemble des colonies obtenues. Une coloration de Gram est faite à chaque fois, pour contrôler la pureté des souches.

II.1.8. Repiquage et purification des souches

Sur la base de l'aspect macroscopique et microscopique, des colonies d'actinomycètes sont prélevées et repiquées sur le même milieu par la méthode des stries, dans le but d'obtenir des souches pures.

II.1.9. Conservation des souches

Les isolats d'actinomycètes purifiés, sont conservés jusqu'à utilisation par deux méthodes :

II.1.9.1. Sur gélose inclinée

Les isolats sont ensemencés par la méthode des stries sur le même milieu d'isolement en gélose inclinée. Après incubation à 28°C pendant 21 jours, les cultures sont conservées à 4°C. Un repiquage est réalisé tous les deux mois **(Suzuki, 2001)**.

II.1.9.2. Par congélation des cultures de spores

Les souches sont ensemencées sur le même milieu gélosé, puis incubées jusqu'à sporulation. Une suspension de spores est préparée par raclage de la surface de la culture puis conservée par congélation à -20°C en présence du glycérol comme cryoprotecteur à une concentration de 20 %. Les spores conservées par cette technique de conservation, peuvent résister jusqu'à cinq ans **(Isik *et al.*, 1999)**.

II.2. Fermentation en batch

Cette étape vise à rechercher les souches qui ont une capacité à dégrader la méthyléthylcétone (MEK) en tant que seule source de carbone. La cinétique de croissance des différents isolats d'actinomycètes mis en culture et de la dégradation de la MEK ont été suivit. Les courbes de croissance et de dégradation, ont été établies par le logiciel **Origin (2008)**.

II.2.1. Description du réacteur batch

Le réacteur utilisé dans notre fermentation est un réacteur batch qui se présente sous forme d'une bouteille en verre d'un volume total de 500 ml, fermé par un bouchon en caoutchouc avec un orifice qui permet l'introduction de l'aiguille de la seringue. Ce dernier sert à effectuer des prélèvements, visant le suivi de la croissance bactérienne et du substrat. Néanmoins, l'orifice suscité doit être immédiatement rebouché ou refermé après toute éjection de l'aiguille de la seringue pour éviter tout échange avec le milieu extérieur.

II.2.2. Préparation du milieu de fermentation

Le milieu minimum utilisé dans cette étude, est celui de **Vandermesse 1996**. Ce milieu a été choisi de façon à obtenir un pH constant de 7. Il est complètement exempte d'aucune source de carbone. Sa composition chimique est représentée dans le **tableau N°8**.

La préparation du milieu nutritif est réalisée dans un litre d'eau distillée, en mélangeant tous les ingrédients du milieu dans une fiole Erlenmeyer de 2L sous agitation à l'aide d'un barreau magnétique jusqu'à ce que tous les sels du milieu soient dissouts.

II.2.3. Inoculum bactérien et source de carbone et d'énergie

A partir des cultures bactériennes, 2 anses de platines ont été prélevées aseptiquement et transférées dans un tube à essai contenant 15 ml d'eau distillée stérile. Les tubes subissent ensuite une agitation vigoureuse au Vortex jusqu'à homogénéisation. Les souches dans cet état vont servir d'inoculum pour les prochaines fermentations. Ces préparations ne doivent pas dépasser les 3 heures dans le réfrigérateur (à 4°C).

La seule source de carbone et d'énergie étudiée est la méthyléthylcétone (MEK).

Tableau N°8 : La composition du milieu nutritif **(Vandermesse, 1996)**.

Milieu nutritif		***Concentration***
Tampon et macro-éléments	KNO_3	13,76 g/l
	KH_2PO_4	1,78 g/l
	Na_2HPO_4, $2H_2O$	4,66 g/l
	Na_2SO_4	9,68 g/l
	$MgSO_4$, $7H_2O$	0,8 g/l
Micro-éléments	EDTA	10 mg/l
	$FeSO_4$, $7H_2O$	5 mg/l
	MnC_{l2}, $4H_2O$	1,22 mg/l
	$ZnSO_4$, $7H_2O$	0,25 mg/l
	$CuSO_4$, $5H_2O$	0,2 mg/l
	CaC_{l2}, $2H_2O$	1 mg/l
	Na_2MoO_4, H_2O	0,2 mg/l

II.2.4. Etude préliminaire de la biodégradation de la MEK par les isolats d'actinomycètes (Prise d'essai)

Pour connaître l'évolution de chaque souche vis-à-vis de la MEK prise comme seule source de carbone, il est nécessaire de s'informer sur la cinétique de croissance de chaque isolat, afin de soutirer une première conclusion si l'actinomycète isolé possède ou non les aptitudes de biodégradation de ce substrat.

L'oxygène est indispensable pour la croissance des actinomycètes, le volume de la phase liquide doit être réduit au maximum, pour une bonne disponibilité de l'oxygène. Dans des études antérieures réalisées dans le laboratoire de pollution et traitement des eaux, Université Mentouri Constantine, Le volume de la phase liquide a été fixé à 90 ml **(Alikhodja et Beldjoudi, 2005 ; Beldjoudi, 2004)**.

L'inoculum bactérien (15 ml), 75 ml du milieu Vandermesse et 100 µl du substrat (la MEK), sont introduits dans les réacteurs stériles de 500 ml de capacité.

Les réacteurs ainsi préparés sont mis dans un bain marie agité (MEMMERT de type GFL 1083) **(figure N°15)**, réglé à 30°C sous agitation moyenne. Des prélèvements de 2 ml chaque 6 heures sont effectués à l'aide d'une seringue stérile préalablement posée dans chaque réacteur. Ces prélèvements servent à mesurer les DO en fonction du temps d'incubation (DO = f [t]).

Figure N°15 : Bain marie MEMMERT de type GFL 1083 contenant les réacteurs de fermentation.

II.2.5. Première préculture

L'objectif de cette étape est l'adaptation des actinomycètes aux conditions du milieu. Cette étape permet également de réduire le temps de la phase de latence et offrir des cellules en plein phase de croissance qui vont servir comme pied de cuve pour un bon démarrage de la fermentation.

L'inoculum préparé selon le même principe utilisé dans la prise d'essai, a été additionné à 75 ml du milieu Vandermesse, et 100 µl de la MEK.

La mise en culture des réacteurs a été effectuée dans le bain marie agité et réglé à 30°C. Afin de suivre la cinétique de croissance de chaque isolat, des prélèvements sont effectués chaque 6 heures. Les cellules dans leur phase exponentielle servent à inoculer les réacteurs de la fermentation.

II.2.6. La fermentation

Un volume de 15 ml de la première préculture est prélevé puis centrifugé à 400 g pendant 20 min moyennant une centrifugeuse **Hettich-Zentrifugen** de type **ROTOFIX 32 (figure N°16)**. Le surnageant est éliminé, le culot est ensuite additionné d'eau distillée stérile jusqu'à 15 ml. Cette quantité sert à ensemencer les réacteurs de fermentation contenant 75 ml du milieu Vandermesse et 100 µl de la MEK. Pour toutes les fermentations, l'inoculum est ajusté de façon à avoir une taille équivalente dans chaque réacteur de 0,125 g/l **(Tarrouche, 2009)**.

II.2.7. Prélèvements et préparation des échantillons

Après mise en culture dans le bain marie, des prélèvements de 2 ml sont effectués chaque 6 h, et servent à deux mesures :

- 1,5 ml servent à suivre la croissance bactérienne, par lecture de la densité optique ensuite convertir le résultat en g/l.
- 0,5 ml est mis dans un tube fermé hermétiquement pour éviter les pertes du substrat, Il subit une centrifugation à 400 g pendant 20 min afin d'obtenir un surnageant exempt de cellules microbiennes. L'échantillon est ensuite conservé à 4°C et va servir à la mesure de la concentration du substrat (MEK) par chromatographie en phase gazeuse.

Figure N°16 : Centrifugeuse Hettich-Zentrifugen de type ROTOFIX 3.

II.2.8. Mesure de la concentration cellulaire X

Le suivi de la quantité de biomasse au cours du temps de fermentation, se fait par lecture directe de la densité optique (DO) de chaque échantillon à 546 nm avec un spectrophotomètre **JENWAY** de types **6300 spectrophotometer (figure N°17)**. Le milieu nutritif utilisé dans la fermentation est pris comme blanc.

Figure N°17 : Spectrophotomètre JENWAY de types 6300 spectrophotomètre.

II.2.9. Réalisation des courbes d'étalonnage

Pour obtenir la concentration des cellules bactériennes en g/l, il faut tracer une courbe d'étalonnage DO en fonction de l'évolution de la charge microbienne (DO = f [X]).

On effectue des prélèvements de 25 ml du produit de fermentation à partir de la 1ère préculture de chaque souche, cette quantité prélevée est réparti en deux tubes comme suit :

- Le premier tube contient 5 ml et servent à la lecture de la DO. Une série de 5 dilutions (solution mère, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) est effectuée avec de l'eau distillée.
- Le deuxième tube contient 20 ml, il sert à la détermination de la matière sèche cellulaire. Les tubes vont subir d'abord une centrifugation à 400 g pendant 20 min. Le surnageant est éliminé et l'aliquote est dilué dans de l'eau distillée en complétant le volume jusqu'à 20 ml. Cette étape vise à éviter que les macroéléments du milieu ne perturbent la mesure du poids sec réel de la biomasse. Une série de dilutions (la solution mère, 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16) est ensuite réalisée dans des creusets résistants à de hautes températures. Les creusets sont déposés à l'étuve réglée à 150°C pendant 20 minutes. Ces conditions sont idéales pour l'évaporation de toute l'eau même celle qui est contenue dans les cellules bactériennes.

A l'issue de cette opération, les creusets mis à l'extérieur sont placés directement dans un dessiccateur pour éviter la formation de la vapeur d'eau. Après refroidissement des creusets, il y'a lieu de mesurer leurs poids à l'aide d'une balance analytique **Sartoruis** de type **ISO 9001.** A la fin, on obtient pour chaque dilution la concentration qui lui est appropriée.

II.2.10. Suivi de la consommation du substrat (la MEK)

II.2.10.1. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse

Le suivi de la consommation du substrat au cours du temps se fait par chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode chromatographique permet de séparer des mélanges gazeux complexes suite à un équilibre s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire appropriée. Cette méthode ne s'adresse pas seulement aux molécules se trouvant

naturellement à l'état de gaz, mais à tout composé susceptible d'être volatilisé par l'élévation de la température. La nécessité de maintenir les molécules à l'état gazeux implique donc que toute l'opération d'analyse chromatographique se réalise à une température compatible avec cet état sans provoquer leur destruction. Un nombre de molécules peuvent ainsi être séparées directement ou après transformation lorsqu'elles sont thermolabiles ou peu volatiles. Les composants de base d'un appareil de chromatographie gazeuse sont décrits comme suit :

- **L'injecteur**

Les gaz vecteurs doivent être chimiquement inertes, comme c'est le cas pour l'hélium, l'argon, l'azote, le dioxyde de carbone et l'hydrogène. A l'alimentation en gaz sont associés des régulateurs de pression, gauges et des débitmètres, et souvent un tamis moléculaire qui élimine l'eau et d'autres impuretés. Les pressions d'admission sont usuellement comprises entre 10 et 50 psi (au dessous de la pression ambiante), avec des débits de l'ordre de 25 à 150 ml/min pour les colonnes remplies et de 0,5 ml/min pour les colonnes capillaires.

- **Système d'injection de l'échantillon**

La méthode la plus courante consiste à utiliser une seringue avec laquelle on injecte l'échantillon liquide ou gazeux à travers un diaphragme ou un septum en élastomère dans une chambre à vaporisation instantanée située au sommet de la colonne. La chambre d'injection est habituellement maintenue à environ 50,00°C au dessus du point d'ébullition du constituant le moins volatil de l'échantillon. Les volumes varient de quelques dixièmes de microlitres à 20 µl.

- **La colonne**

Il existe deux types de colonne en chromatographie gazeuse, les colonnes replies et les colonnes tubulaires ouvertes, ou colonnes capillaires. Les colonnes chromatographiques ont des longueurs comprises entre 2 et 50 m ou plus. Elles sont en acier inoxydable, en verre, en silice fondue ou en téflon. Pour pouvoir s'emboîter dans un four thermostatique, elles sont usuellement formées d'enroulement de 10 à 30 cm de diamètre. La température optimale de la colonne dépend du point d'ébullition, il est préférable d'employer une programmation de température telle que la température de la colonne augmente de manière continue ou discontinue au cours de la séparation.

- **Le détecteur**

Le détecteur à ionisation de flamme est le détecteur le plus utilisé. L'éluât de la colonne est mélangé avec de l'hydrogène et de l'air, et ce mélange est enflammé électriquement. La plupart des composés organiques sont pyrolyses à la température d'une flamme hydrogène-air en produisant des ions et des électrons capable de conduire l'électricité à travers la flamme. Le FID présente une sensibilité élevée (= 10-13), un étendu de repense linéaire (107). Une connexion adéquate entre ces différentes composantes permet au CPG d'être fonctionnel **(Rouessac et Rouessac, 1994)**.

II.2.10.2. Les conditions opératoires de mesure de concentration en substrat

Un volume de 1µl de l'échantillon est manuellement introduit avec une micro-seringue SGE de 10 µl dans un chromatographe ***SCHIMADZU*** de type **GC-17A (Figure N°18)** opérant isothermique à 130°C, combiné à une colonne capillaire de type **(DB-5/ 0,25 mm D.I × 30 m)** et un détecteur **FID**. Le gaz vecteur est l'azote **(N2)**, il est utilisé avec un débit entrant de 45 ml/min et un débit traversant la colonne de 0,9 ml/min. Les températures atteintes par le détecteur et l'injecteur sont de 200°C et de 250°C respectivement.

L'utilisation d'un standard externe avec une concentration de 1000 ppm de la MEK permet l'étalonnage de l'appareil. Le temps de rétention de la MEK est en moyenne de 2,3 minutes.

Figure N°18 : Chromatographe SCHIMADZU de type GC-17A combiné à une colonne capillaire de type DB-5 (0,25 mm D.I×30 m) et un détecteur FID.

II.3. Caractérisation morphologique de la souche la plus performante

II.3.1. Etude de l'aspect macroscopique des colonies bactériennes

L'aspect macroscopique (couleur, forme, etc.) de la colonie est observé après 21 jours d'incubation à 30°C, sur le même milieu.

La couleur du mycélium du substrat est déterminée comme suit : Une parcelle de la gélose est découpée à partir des cultures matures, puis déposée sur un support désinfecté. L'excès de la gélose est éliminé par une lame de rasoir et la couleur est notée **(Shirling et Gottlieb, 1966)**.

II.3.2. Etude de l'aspect microscopique (technique de culture sur lamelle)

L'observation de la morphologie des chaînes de spores, du mycélium aérien et du mycélium de substrat est effectuée selon la technique de culture sur lamelle.

Cette technique consiste à insérer délicatement des lamelles stériles dans un milieu gélosé ISP2, ISP3, ISP4 ou ISP5, de telle sorte qu'elles forment un angle de 45°C avec la surface de celui-ci. La souche est ensuite ensemencée contre la lamelle en contact avec le milieu **(Figure N°19)**.

Après 14 jours d'incubation à 30°C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose, entraînant avec elle des fragments du mycélium de substrat et aérien, elle est ensuite déposée sur une lame puis examinée au microscope optique **(G x 100) (Djaballah, 2010).**

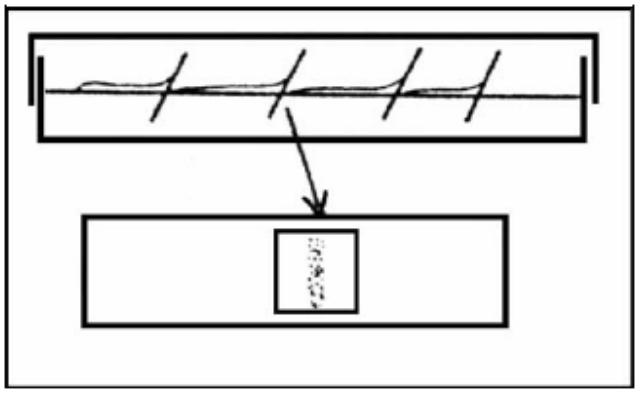


Figure N°19 : Technique de culture sur lamelle.

Chapitre III

Résultats et discussions

III.1. Observation à l'état frais

L'observation microscopique directe de l'échantillon des boues activées, révèle la présence d'une charge importante de microorganismes. En effet, des formes filamenteuses immobiles et très nombreuses, apparaissent avec des enchevêtrements multiples et variés. Plusieurs de ces filaments sont très fins et ressembles à quelques actinomycètes. D'autres filaments plus larges sont également présents et sont cependant caractéristiques des champignons. Des formes circulaires et bacillaires de différentes tailles sont également présentes. Plusieurs d'entre elles sont mobiles, d'autres sont immobiles. Certaines formes relativement grandes non identifiés sont présentes dans l'échantillon. Plusieurs débris végétaux sont également observés.

III.2. Isolement

À partir du milieu sélectif utilisé (ISP4 additionné d'antibiotiques), des colonies d'actinomycètes ont été dénombrées puis prélevées, ces colonies ont été repérées d'après leur aspect macroscopique (colonies d'aspect poudreux ou des colonies dures incrustées dans la gélose) et leur aspect microscopique (aspect filamenteux à coloration de Gram positive).

Les résultats du dénombrement des actinomycètes sont représentés dans le **tableau N°9**:

Tableau N°9: Nombre des actinomycètes après 25 jours d'incubation.

La dilution		***10^{-1}***		***10^{-2}***		***10^{-3}***		***10^{-4}***		***10^{-5}***		***10^{-6}***	
Les répétitions		***1***	***2***	***1***	***2***	***1***	***2***	***1***	***2***	***1***	***2***	***1***	***2***
Le nombre des colonies d'actinomycètes	**Après 5 jrs**	1	2	8	2	3	0	0	0	1	0	0	0
	Après 12 jrs	1	2	8	2	11	3	2	37	2	2	0	1
	Après 25 jrs	1	2	8	2	11	3	2	37	2	5	4	1

Après repiquages successifs, 7 isolats d'actinomycètes complètement différents ont pu êtres sélectionnés. Ces isolats sont dénommés par un nom de code comme suit : **A2.3**, **A3.2**, **A3.3**, **A3.9**, **A5.2**, **A5.3**, **A5.7 (figure N°20)**.

Le milieu ISP4, utilisé dans cette étude est efficace pour l'isolement des actinomycètes à partir de cet écosystème. L'amidon et le sulfate d'ammonium présents dans ce milieu respectivement comme source de carbone et d'azote sont connus d'être favorables pour l'isolement des actinomycètes à partir des sols **(Williams et Cross, 1971 ; Hilali et *al*., 2002 ; Salas et Hardisson, 1981 ; Soliveri *et al*., 1988)**. Ces mêmes composants, permettent également l'isolement de ces bactéries à partir de ces écosystèmes aquatiques.

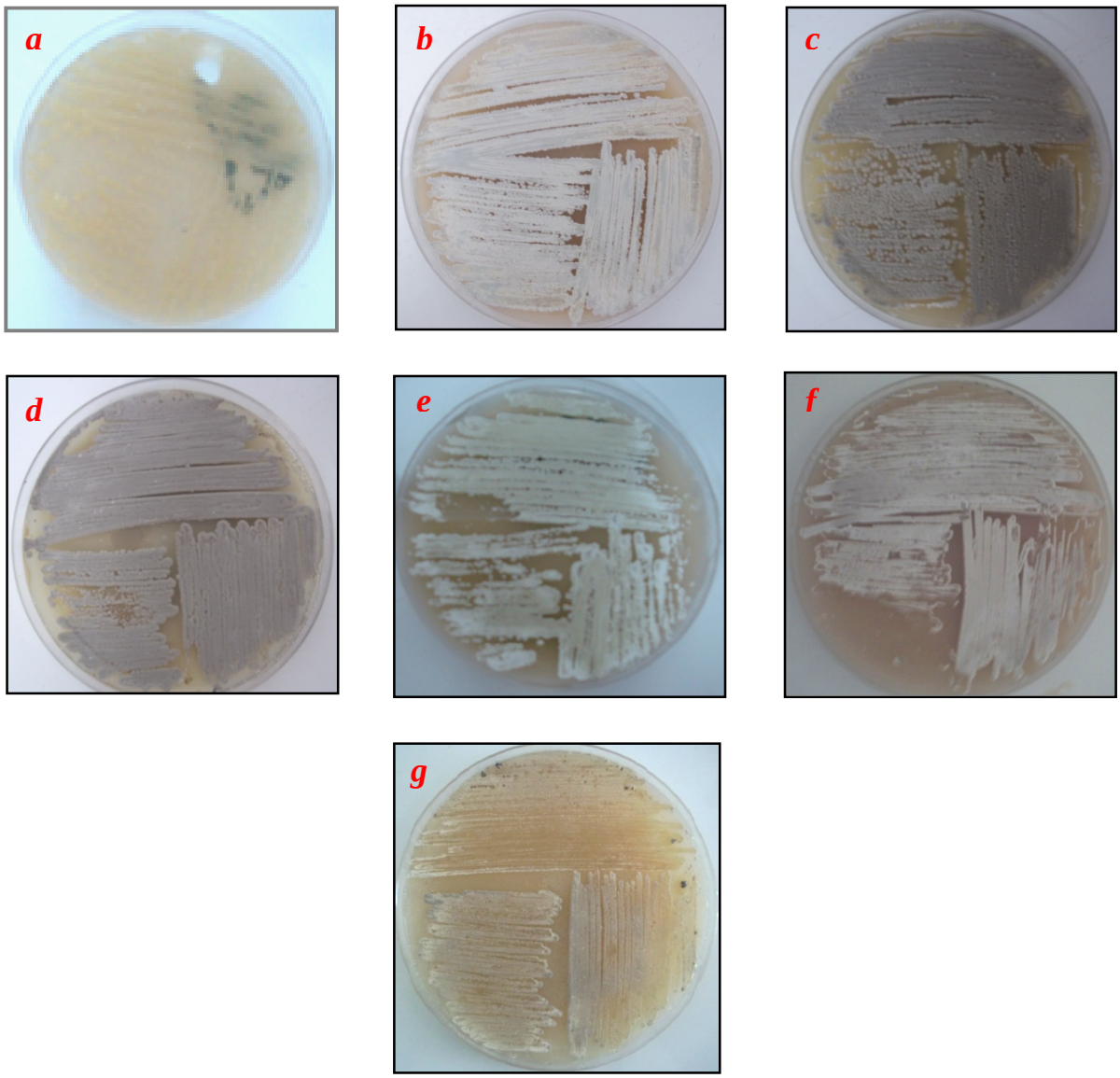


Figure N°20 : L'aspect macroscopique des différentes souches pures isolées. **(a):** A2.3, **(b):** A3.2, **(c):** A3.3, **(d):** A3.9, **(e):** A5.2, **(f):** A5.3, **(g):** A5.7.

Le mélange de nystatine (antifongique) à 100 µg/ml et de l'acide nalidixique (anti-Gram-) à 10 µg/ml ajouté au milieu sélectif a permis d'éliminer presque la totalité de contaminants fongiques et bactériens indésirables. La nystatine est un antibiotique très efficace pour l'inhibition de la croissance des champignons. **Williams et Davies (1965)** ont testé cet antifongique sur des champignons isolés du sol, ils ont constaté qu'il inhibe la croissance de la majorité des champignons à une concentration de 50 µg/ml. En plus, cet antibiotique lorsqu'il est testé sur les actinomycètes il n'a aucune action négative contre leur croissance même en augmentant sa concentration à 100 ug/ml.

L'acide nalidixique a été utilisé dans les travaux de **Takizaw *et al.*, (1993)**, pour l'isolement des actinomycètes à partir des milieux marins. **Suzuki *et al.*, (1999)**, ont trouvé que les actinomycètes peuvent résister à l'acide nalidixique jusqu'à une concentration de 10 µg/ml, au-delà, la croissance de certains genres peut être diminuée.

D'après nos résultats, ces deux antibiotiques, sont aussi indiqués dans l'isolement des actinomycètes à partir des boues activées.

Il est à signaler par ailleurs, que certains problèmes de contamination ont été rencontrés dans les isolements et même les repiquages des colonies. Il s'agit d'une sorte de plage bactérienne qui gêne la croissance des actinomycètes par l'envahissement de la gélose. Cet organisme a été assigné à une bactérie appartenant au genre *Bacillus*. Ce type de contamination a été longtemps remarqué dans beaucoup de travaux de ce genre **(Boudemagh, 2007 ; Kitouni, 2007 ; Chelli, 2010)**.

III.3. Etude préliminaire de la biodégradation de la MEK par les isolats d'actinomycètes (Prise d'essai)

Les résultats de l'évolution de la densité optique (DO) en fonction du temps pour les souches isolées sont représentés dans la **figure N°21**.

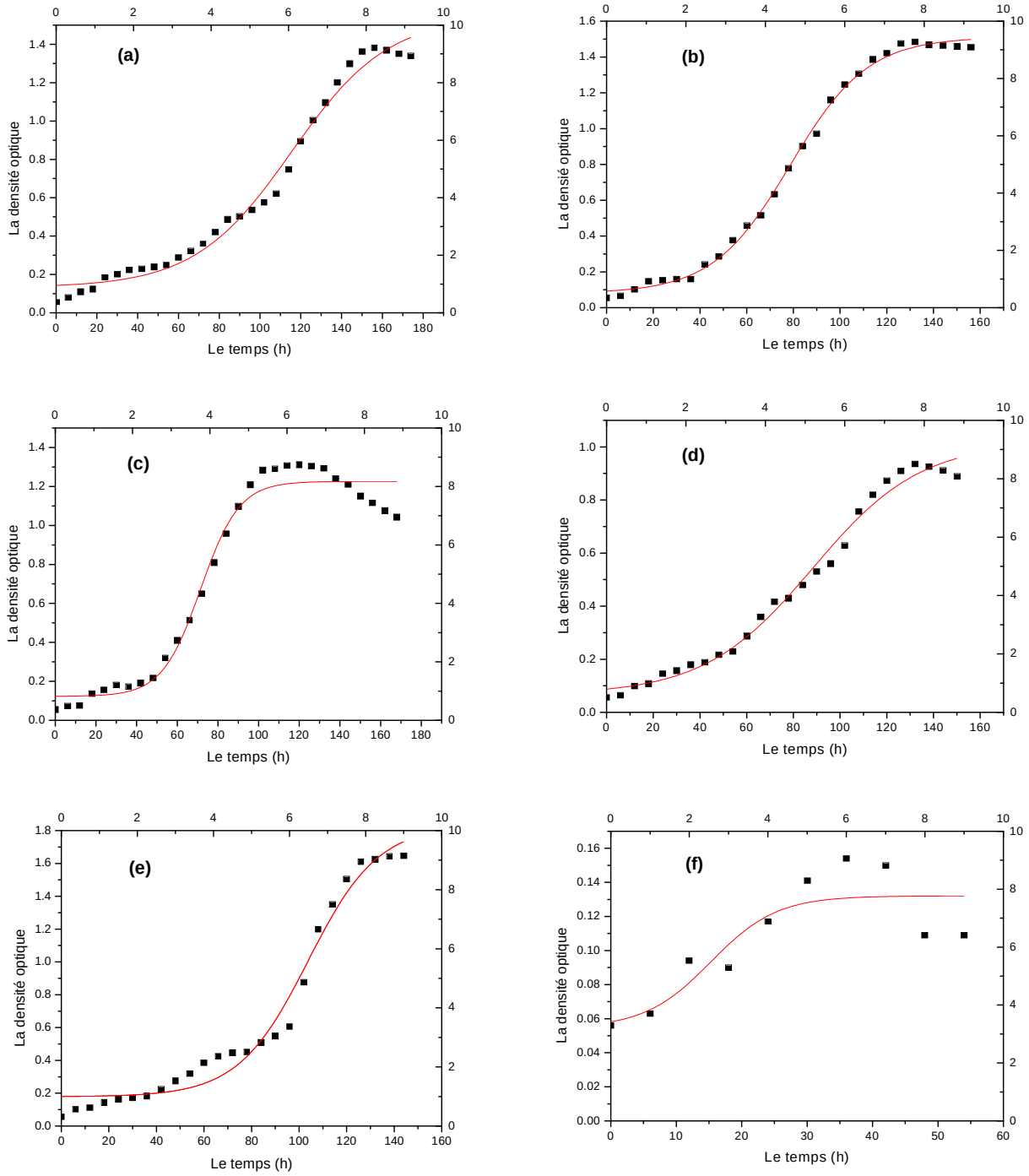


Figure N°21: Cinétiques de croissance des différentes souches d'actinomycètes. **(a):** A2.3, **(b):** A3.2, **(c):** A3.3, **(d):** A3.9, **(e):** A5.7, **(f):** A5.2, **(g):** A5.3.

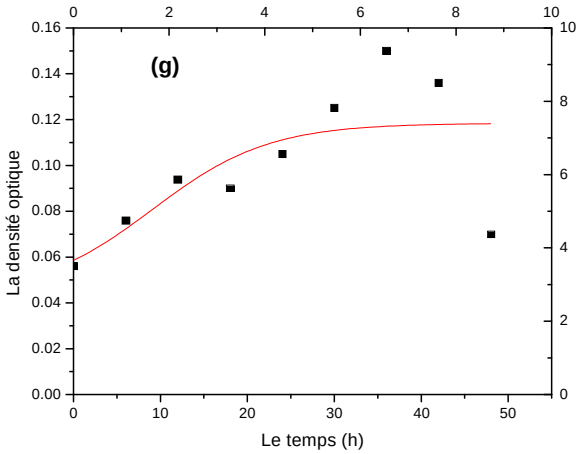


Figure N°21(suite): Cinétiques de croissance des différentes souches d'actinomycètes. **(a):** A2.3, **(b):** A3.2, **(c):** A3.3, **(d):** A3.9, **(e):** A5.7, **(f):** A5.2, **(g):** A5.3.

D'après les graphes représentés dans la **figure N°21**, il apparait d'après la cinétique de croissance que les souches A2.3, A3.2, A3.3, A3.9 et A5.7 sont les plus performantes à utiliser la MEK comme seule source de carbone et d'énergie. Les souches A5.2 et A5.3 semblent relativement incompétentes d'utiliser ce même substrat. Par conséquent, Les isolats A2.3, A3.2, A3.3, A3.9 et A5.7 ont été sélectionnés pour la poursuite de nos études. Le profil de la cinétique de croissance de ces bactéries montre, un début de fermentation généralement lent. En effet, la phase d'adaptation de l'ensemble des isolats sélectionnés varie de 12 à 36 heures d'incubation. La phase logarithmique survient juste après et dure longtemps (100 à 150 h) de croissance. Les valeurs maximales de croissance de ces 5 isolats représentées par leurs DO sont cependant variables d'une bactérie à une autre **(tableau N°11)**.

Tableau N°10: Valeurs maximales des densités optiques obtenues par les différentes souches sélectionnées.

La souche	***A2.3***	***A3.2***	***A3.3***	***A3.9***	***A5.7***
La DO	1,37	1,48	1,31	0,92	1,64

III.4. Etude de la cinétique de croissance et détermination de quelques paramètres de la fermentation des isolats d'actinomycètes sélectionnés

III.4.1. Evolution de la concentration de la biomasse en fonction du temps de fermentation

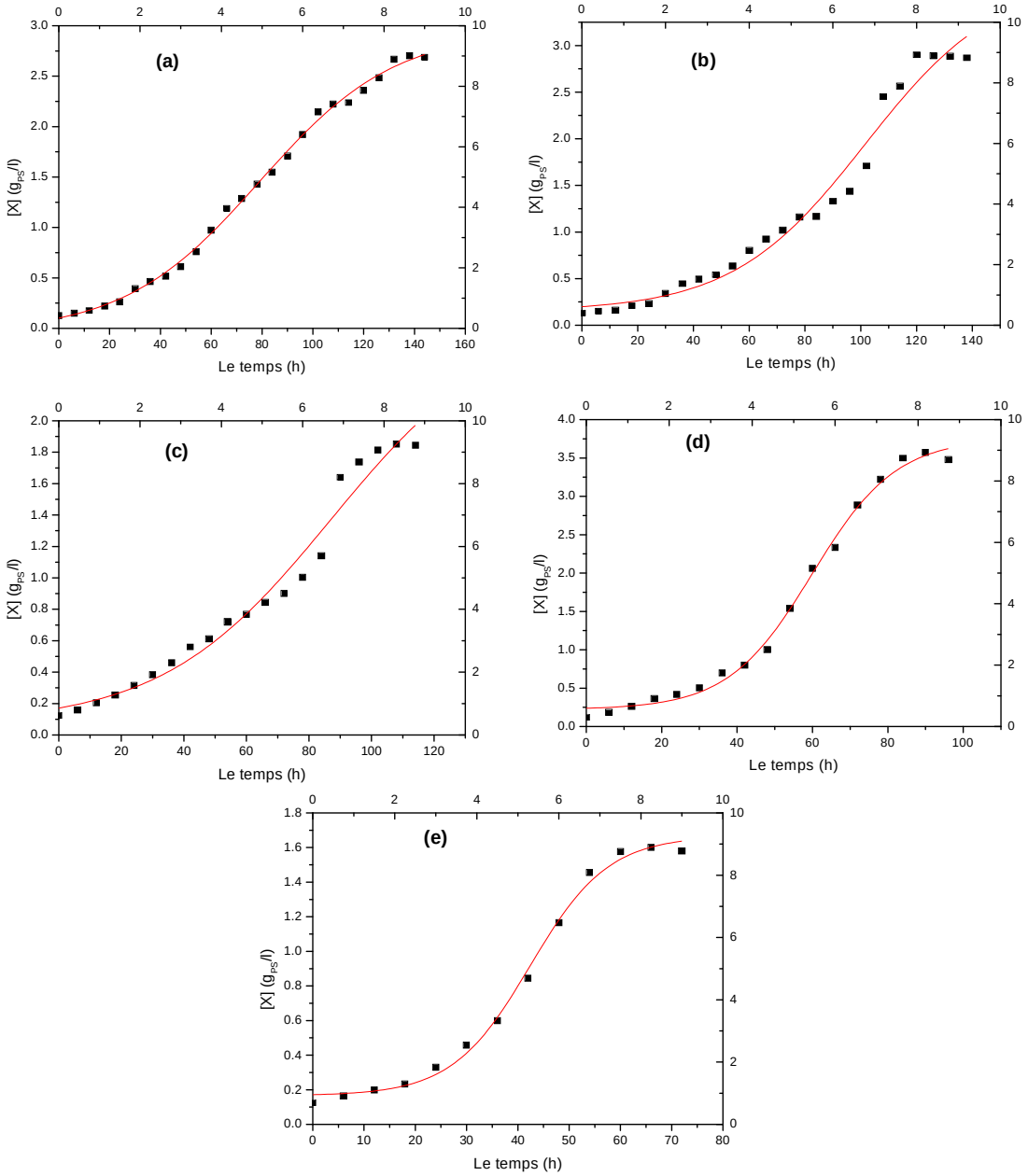


Figure N°22: Evolution de la concentration en biomasse X (g_{PS}/l) en fonction du temps (h) pour les différentes souches. **(a):** A2.3, **(b):** A3.2, **(c):** A3.3, **(d):** A3.9, **(e):** A5.7.

Les concentrations en biomasse X sont obtenues après conversion des densités optiques en g_{PS}/l à l'aide des courbes d'étalonnage **(Annexe 2)**.

La **figure N°22**, montre une diminution remarquable du temps de la phase de latence, dans les 5 réacteurs de la fermentation. Ces résultats, diffèrent considérablement de ceux trouvés dans l'étude préliminaire. En effet, la durée de cette phase a été de 12 à 36 heures d'incubation pour les essais préliminaires et de quelques heures à 18 h, pour les cinétiques de la fermentation, qui passent par une étape de préculture (pied de cuve). Ce résultat montre la nécessité de cette étape d'adaptation, avant chaque fermentation.

III.4.2. Détermination du taux spécifique de croissance

Les résultats de l'évolution de la concentration en biomasse X des différentes souches en fonction du temps, sont représentés sous forme graphique dans la **figure N°22**. Une allure sigmoïdale est obtenue pour les différentes courbes.

Le taux spécifique de croissance est défini selon Monod par l'équation 1 **(Schuler et Kargi, 1992)** :

$$\mu = (dx/dt) \cdot (1/x) \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

où :

μ : Taux spécifique de croissance (h^{-1}).

x : Concentration en biomasse (g_{PS}/l).

t : Temps (h).

Dans notre cas, le taux spécifique de croissance est significatif d'un taux de multiplication d'une souche pure. Ce taux désigne donc un nombre de générations par unité de temps caractéristique d'une cellule « moyenne » représentative de notre souche et dans un état physiologique et structural représentatif des bactéries de la même souche.

En modifiant l'équation (1), on obtient l'équation 2:

$$\mu \cdot dt = dX/X \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

Le taux spécifique de croissance peut être déterminé en portant le logarithme népérien de la concentration en biomasse mesurée expérimentalement en fonction du temps, c'est l'équation 3.

$$\mu = (\mathrm{Ln}\, X_{t2} - \mathrm{Ln}\, X_{t1}) / (t_2 - t_1) \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

Où X_{t2} et X_{t1} sont les concentrations en biomasse (g/l) respectivement au temps t_2 et t_1. Sachant que pour une souche pure, l'abondance du substrat permet au taux spécifique de croissance de rester constant pendant la phase exponentielle de croissance, celle-ci peut être décrite par l'équation 4 suivante :

$$\mathrm{Ln}\, X = \mu_{max} \,.\, t + b \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (4)$$

Une partie linéaire est définie sur une période de croissance appréciable. Sa représentation par une droite permet d'estimer le taux spécifique de croissance maximum μ_{max} qui représente la pente de la droite obtenue. Si la valeur obtenue de μ_{max} est proche de sa valeur expérimentale, on peut dire qu'on est en présence d'une souche pure.

A partir des mesures expérimentales estimées en chaque temps, on peut donner la valeur réelle du taux spécifique de croissance grâce à l'équation 5

$$\mu_n = (1/X_n) \,.\, (X_{n+1}) / (t_{n+1} - t_n) \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (5).$$

Les résultats de l'évolution du taux spécifique de croissance pour les différentes souches sont représentés dans la **figure N°23**.

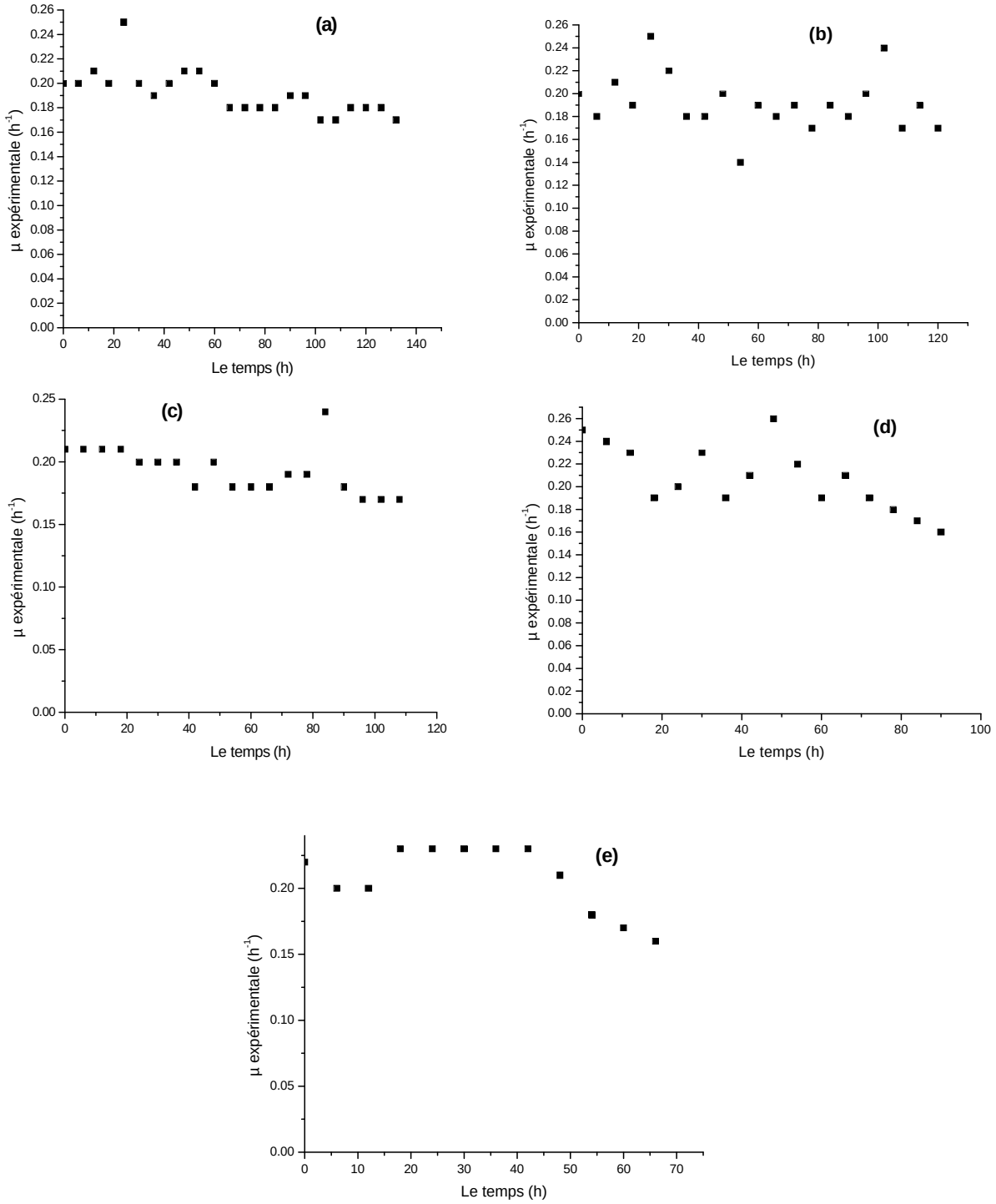


Figure N°23: Evolution du taux spécifique de croissance **µ** expérimentale (h^{-1}) en fonction du temps (h) pour les différentes souches. **(a):** A2.3, **(b):** A3.2, **(c):** A3.3, **(d):** A3.9, **(e):** A5.7.

III.4.3. Détermination du taux de croissance maximum μ_{max}

La méthode utilisée pour la détermination du taux de croissance maximum μ_{max}, est la méthode de modélisation. Afin de modéliser la croissance, on applique un modèle dont l'équation 6 **(Relation de Boltzman)** est reprise ci-dessous :

$$X = P1 / [1 + \exp(-P2 + P3.\ t)] + P4 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad (6).$$

Avec :

X: concentration en biomasse au temps t (g_{PS}/ l)

t : Temps (h)

p1, p2, p3, p4 : Paramètres.

Les paramètres de cette équation sont ajustés par rapport aux mesures expérimentales par une méthode itérative. Les séries de paramètres obtenus pour chaque réacteur batch sont représenté au **tableau N°10**.

Une signification est donnée à chacun de ces paramètres:

P_1: différence en valeur absolue entre les concentrations **(g_{PS} /l)** : **P_1** est donc égal à la valeur de (**A_1 – A_2)**.

P_2: Etalement de la courbe le long de l'axe des abscisses (sans unité). Il est égal à **x_0 / dx.**

P_3: pente de la sigmoïde **(h^{-1}). P_3** est égal à **1/dx**.

P_4: concentration finale en biomasse **(g_{PS}/ l)**. **P_4** est représentée par **A_2**.

Tableau N°11: Valeurs des paramètres du modèle de l'équation 6, obtenues après ajustement paramétrique sur les courbes expérimentales de croissance.

Souche	**A2.3**			
Paramètres	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**
valeurs	3,003	2,956	**0,037**	2,957

Souche	**A3.2**			
Paramètres	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**
valeurs	3,589	4,269	**0,042**	3,738

,

Souche	**A3.3**			
Paramètres	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**
valeurs	2,598	3,219	**0,038**	2,669

Souche	**A3.9**			
Paramètres	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**
valeurs	3,534	5,382	**0,090**	3,755

Souche	**A5.7**			
Paramètres	**P1**	**P2**	**P3**	**P4**
valeurs	1,501	5,577	**0,132**	1,666

Le profil de la cinétique de croissance des souches d'actinomycète, varie d'une bactérie à une autre **(figure N°22)**, et dépend du taux de croissance **(figure N°23)**.

- La souche A2.3

La souche A2.3 parait la souche la plus lente, sa croissance dure 138 h (presque 6 jours) **(figure N°22)**. Le taux de croissance maximum μ_{max}, calculé par la relation de Boltzmen, confirme bien quelle a le taux le plus faible (0,037 h^{-1}) **(tableau N°10).**

Les résultats de l'évolution du taux spécifique de croissance µ en fonction du temps, montrent que la souche A2.3 entre rapidement dans la phase exponentielle, une augmentation significative du taux de croissance de cette souche est remarquée après 24 h pour atteindre un maximum de 0,25 h^{-1}. Ce taux varie peu durant le reste du temps (entre 0,17 et 0,21 h^{-1}) et arrive à la fin de la croissance à un taux faible de 0,17 h^{-1} **(figure N°23)**.

La biomasse atteint un taux maximum de 2,957 g_{PS} /l, après 138 h de croissance **(tableau N°10)**.

-La souche A3.2

La souche A3.2 a une croissance relativement lente. Sa croissance dure 120 h (5 jours) **(figure N°22)**, avec un taux de croissance maximum de 0,042 h^{-1} **(tableau N°10)**.

Selon les résultats de l'évolution du taux spécifique de croissance µ en fonction du temps **(figure N°23)**, la souche A3.2 entre rapidement dans la phase exponentielle. Sa croissance est plus rapide à 24 h et à 102 h avec respectivement des vitesses spécifiques de 0,25 et 0,24 h^{-1}. Elle est plus lente à 54 h de fermentation où la vitesse atteint 0,14 h^{-1}. La vitesse spécifique de croissance est irrégulière durant le reste des temps d'incubation et varie de 0,17 à 0,22 h^{-1}.

La concentration finale en biomasse est enregistrée après 120 h de fermentation, avec une valeur de 3,738 g_{PS} /l **(tableau N°10)**.

-La souche A3.3

La souche A3.3 a une croissance qui dure 108 h (4 jours et demi) **(figure N°22)**, avec un taux de croissance maximum de 0,038 h^{-1} **(tableau N°10)**.

La phase de latence de la souche A3.3 est presque inexistante, cette souche entre directement dans la phase exponentielle **(figure N°22)**, cela se traduit par des taux spécifique de

croissance élevés et plus au moins réguliers dès le début de la croissance (entre 0,20 h^{-1} et 0,21 h^{-1}), jusqu'à la fin de la phase exponentielle où ils commencent à diminuer pour atteindre des taux plus faible de 0,17 h^{-1} **(figure N°23)**. A 108 h de fermentation, la biomasse de cette souche arrive à 2,669 g_{PS} /l **(tableau N°10)**.

- La souche A3.9

La souche A3.9 est moins lente que les souches précédentes, cette souche prend 96 h soit 4 jours de croissance **(figure N°22)**. Son taux de croissance maximum est de 0,090 h^{-1} **(tableau N°10)**.

Selon les résultats de l'évolution du taux spécifique de croissance µ en fonction du temps **(figure N°23)**, le taux de croissance commence à augmenter significativement après 18 h d'incubation. Il atteint son maximum après 48 h soit (0,26 h^{-1}) puis il commence à diminuer progressivement après 66 h jusqu'à la fin de la croissance pour atteindre un taux très faible de 0,16 h^{-1}.

Une assez importante biomasse de 3,755 g_{PS} /l a été enregistrée pour cette souche après seulement 96 h de croissance **(tableau N°10)**.

- La souche A5.7

La souche A5.7 parait la souche la plus rapide. Sa croissance dure 72 h (3 jours) **(figure N°22)**. Le résultat du taux de croissance maximum μ_{max} calculé, confirme bien quelle a le taux le plus élevé (0,132 h^{-1}) **(tableau N°10)**.

Les résultats de l'évolution du taux spécifique de croissance µ en fonction du temps, montrent que le taux de croissance augmente après 12 h, il devient maximum et stable entre 12 h et 42 h avec une valeur de 0,23 h^{-1}. Une diminution progressive qui atteint à la fin de la croissance un taux bas de 0,16 h^{-1} est également remarquée **(figure N°23)**. La biomasse maximale est de 1,666 g_{PS} /l, elle a été enregistrée après 66 h de fermentation **(tableau N°10)**.

III.4.4. Vitesse spécifique de consommation de la MEK ($r_{x.MEK}$)

Les résultats de l'évolution de la concentration en biomasse X et de la concentration de la MEK résiduelle en fonction du temps pour les différentes souches, sont représentés sous forme graphique dans la **figure N°24**.

La vitesse spécifique de consommation du MEK ($r_{x.MEK}$) se définit par la masse de la MEK dégradée par unité de poids sec de biomasse et par unité de temps (h). Cette vitesse de dégradation est calculée par l'équation 7. Les profils de **($r_{x.MEK}$)** expérimentale en fonction du temps sont présentés par la **figure N°25**.

$$(r_{x.MEK})_n = -(1/X_n).[(S_{n+1} - S_n) / (t_{n+1} - t_n)] \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (7)$$

Où

n = numéro d'ordre de la mesure de la concentration en MEK.

($r_{x.MEK}$)$_n$ = vitesse spécifique de consommation de la MEK au temps t_n (g_{MEK}/g_{ps}.h).

X_n = concentration en biomasse au temps t_n (g_{ps}/l).

S_n = concentration en MEK résiduelle en phase liquide au temps t_n (ppm).

S_{n+1} = concentration en MEK résiduelle en phase liquide au temps t_{n+1} (ppm).

t_n = temps lors de la $n^{ième}$ mesure de la concentration en MEK résiduelle (h).

t_{n+1} = temps lors de la ($n^{ième}$+1) mesure de la concentration en MEK résiduelle (h).

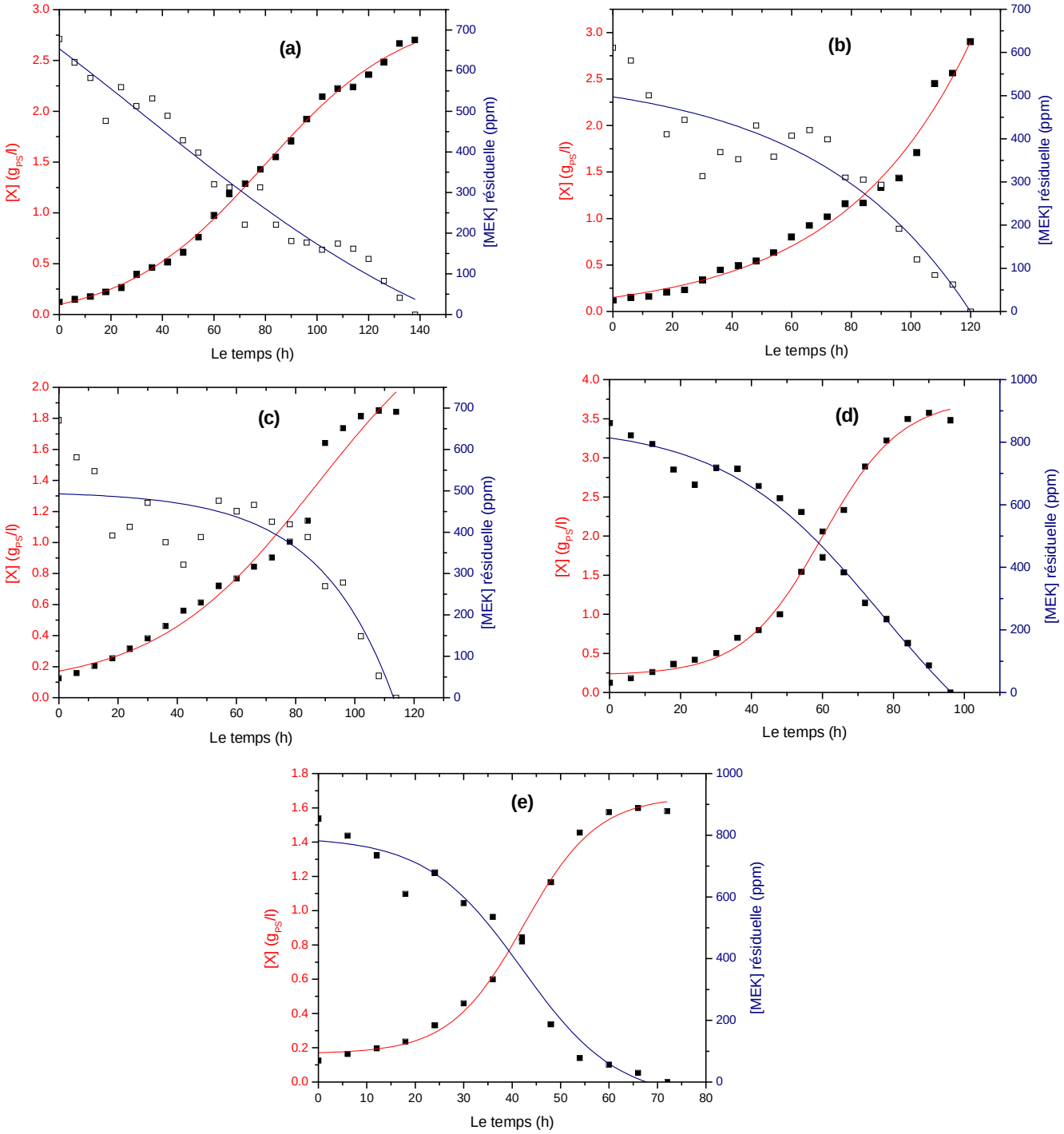


Figure N°24: Evolution de la concentration en biomasse X (g_{PS}/l) et de la concentration de la MEK résiduelle (ppm) en fonction du temps (h) pour les différentes souches. **(a):** A2.3, **(b):** A3.2, **(c):** A3.3, **(d):** A3.9, **(e):** A5.7.

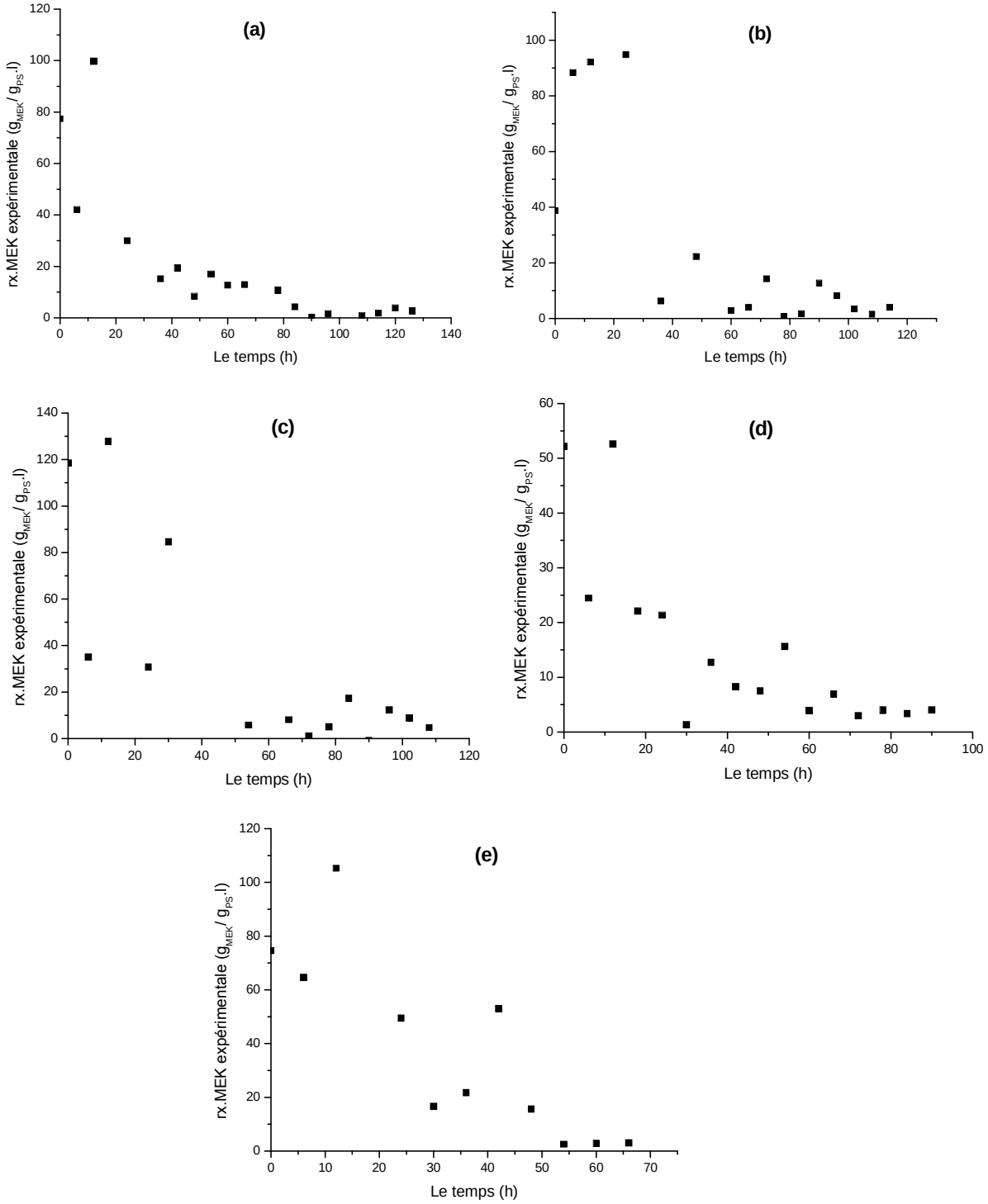


Figure N°25: Evolution de la vitesse spécifique de consommation du MEK ($r_{x.MEK}$) expérimentale (g_{MEK}/g_{PS}.h) en fonction du temps (h) pour les différentes souches. **(a):** A2.3, **(b):** A3.2, **(c):** A3.3, **(d):** A3.9, **(e):** A5.7.

III.4.5. Vitesse spécifique de croissance en fonction de la concentration de la MEK

Les profils des vitesses spécifiques de croissance en fonction de la concentration en MEK sont représentés dans la **figure N°26**.

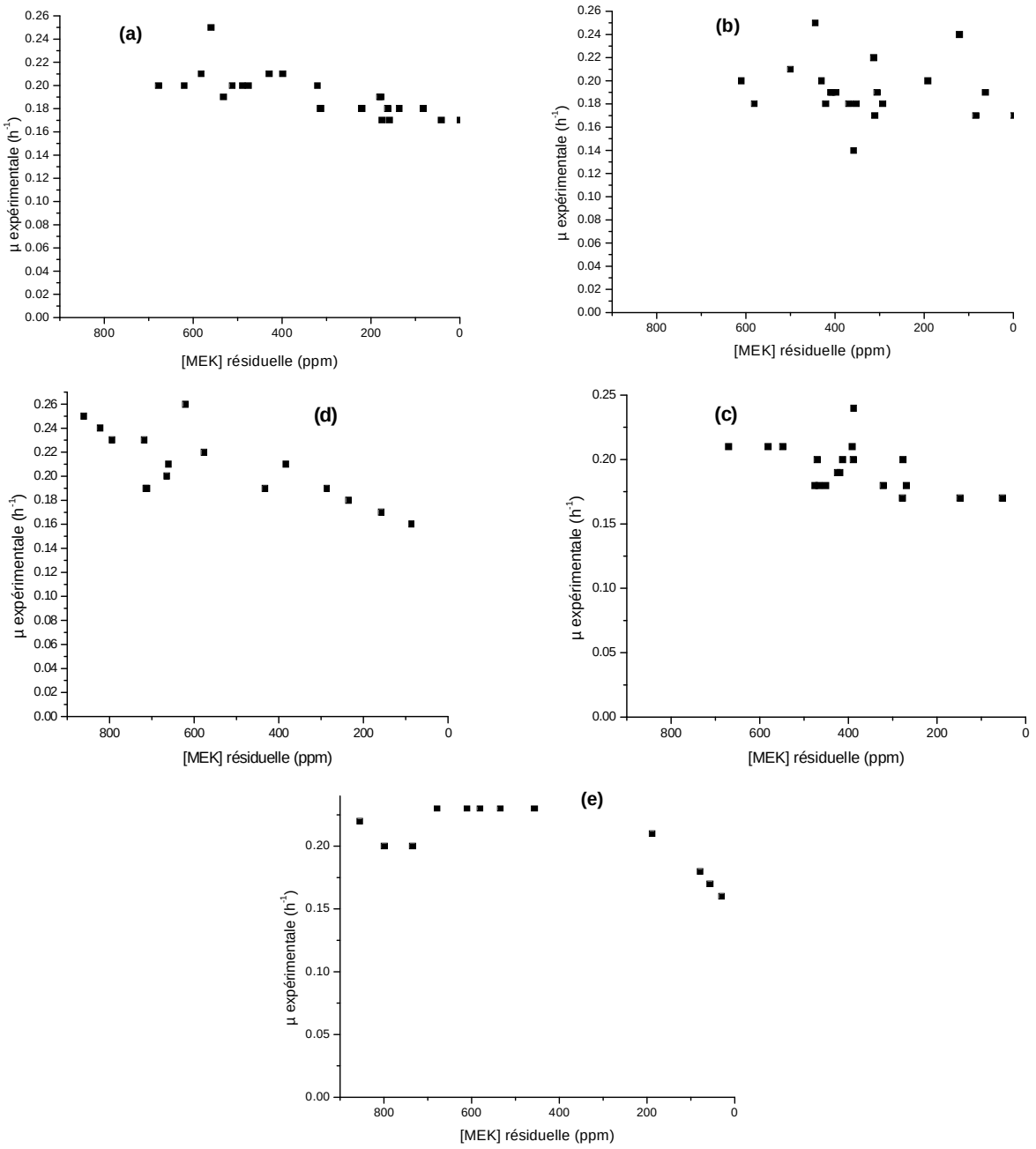


Figure N°26: Evolution du taux spécifique de croissance μ expérimentale (h^{-1}) en fonction de la concentration en MEK résiduelle (ppm) pour les différentes souches **: (a):** A2.3, **(b):** A3.2, **(c):** A3.3, **(d):** A3.9, **(e):** A5.7.

Les 5 réacteurs de fermentation sont lancés avec une concentration initiale en biomasse X_0 **de 0,125 g_{ps}/l**, et une même concentration en substrat S (la MEK) de **(100 µl soit 894,44 ppm).**

Les résultats montrent, que pour toutes les souches testées, il y a une consommation totale du substrat (MEK), dès que les souches arrivent à leur phase stationnaire **(figure N°24)**. Ce résultat confirme que tous les isolats d'actinomycètes sélectionnés, utilisent la MEK comme seule source de carbone pour leur croissance. Cependant, l'évolution de la concentration de la MEK résiduelle diffère d'une souche à une autre en fonction du temps.

La vitesse spécifique de consommation de la MEK calculée à des temps variables, montre que pour toutes les souches, il y a une diminution progressive et irrégulière **(figure N°25)**. La vitesse maximale de consommation du substrat a été enregistrée après 12 h de temps pour toutes les souches, elle atteint respectivement **99,72 g_{MEK}/g_{PS}.l** ; **92,15 g_{MEK}/g_{PS}.l** ; **127 g_{MEK}/g_{PS}.l** ; **52,62 g_{MEK}/g_{PS}.l** ; **105,23 g_{MEK}/g_{PS}.l** pour les souches A2.3, A3.2, A3.3, A3.9, A5.7.

Les profils des taux spécifiques de croissance en fonction de la concentration de la MEK résiduelle, témoignent que la croissance et la dégradation sont liées. En effet, pour les souches A2.3, A3.3 et A3.9, le taux de croissance devient maximal à des concentrations respectives de 560 ppm; 388,2 ppm et de 621,32 ppm. Il diminue ensuite, d'une manière irrégulière avec la consommation de la MEK **(figure N°26)**. Pour la souche A3.2, le taux spécifique de croissance varie irrégulièrement avec la consommation de la MEK.

La croissance de la souche A5.7 varie plus régulièrement avec la consommation de la MEK. Son taux spécifique de croissance est faible au début de la consommation et augmente jusqu'à atteindre un plateau maximum ensuite diminue progressivement.

Il ressort d'une manière plus générale, que parmi toutes ces bactéries sélectionnées possédant la capacité de biodégrader la MEK, les cinétiques sont complètement différentes. La seule ressemblance est que la consommation totale du substrat est atteinte dès que les souches arrivent à leur phase stationnaire. Autrement dit, à la fin de la phase logarithmique de croissance.

Cela confirme que ces souches utilisent la MEK comme seule source de carbone et d'énergie pour se développer.

Il est à signaler cependant, que la cinétique de croissance et de dégradation de la MEK des isolats A2.3, A3.2 et A3.3 est un peu particulière. En effet, au début de la fermentation on remarque une diminution rapide de la concentration du substrat, qui augmente après quelques heures **(figure N°24)**. Cela peut être soit le résultat d'erreurs de manipulation ou à notre avis et probablement à un phénomène physiologique un peu particulier. Ces bactéries aspirent au début de la fermentation une grande quantité de solvant, dégradent une partie et refoulent l'autre dans le jus de fermentation

Dans ce lot, la souche A5.7 se détache plus particulièrement et parait être la meilleure pour dégrader la MEK. En effet, la dégradation de 100 % du substrat est atteinte après seulement 72 h de fermentation. Elle est par conséquent la plus rapide parmi le reste des actinomycètes. La croissance varie plus régulièrement avec la consommation de la MEK, et se caractérise par un taux de croissance maximum le plus élevé de 0,132 h^{-1}, en comparaison avec le reste du lot. L'isolat A5.7 a été par conséquent sélectionné parmi l'ensemble des bactéries actinomycétales isolés.

Les conditions de croissance choisies pour cette fermentation montrent qu'effectivement la souche A5.7 est la plus performante pour la dégradation de la MEK. Les quatre autres bactéries sont aussi dégradatrices de ce même solvant. Donc, il n'est pas exclu que ces isolats soient aptes à donner des paramètres plus satisfaisants juste en variant seulement les facteurs et les conditions de fermentation. Des études d'optimisation et de modélisation peuvent êtres entreprises dans des travaux avenir afin de pouvoir tester plus spécialement ces souches. Il est à noter également, la possibilité d'utiliser les cultures mixtes pour ce même type de biodégradation.

Les travaux qui ont étudié la biodégradation de la méthyléthylcétone par une culture pure dans des réacteurs batch sont très rares **(Wu-Chung C et Tzu-Yu L, 2010)**. Les cultures mixtes et les consortiums sont couramment utilisés. Par ailleurs, la biodégradation optimale des

composés organiques volatiles n'est toujours pas meilleure avec le consortium. En effet, la biodégradation du méthanol par les microorganismes isolés des boues activées s'avère plus rapide que celle qui utilise la boue entière comme inoculum **(Boudemagh *et al*., 2006)**. Il serait intéressant de tester la biodégradation de la MEK par le consortium d'actinomycètes isolés des boues activées.

En présence de boue activée, la dégradation complète de la MEK s'effectue en 8 jours à une concentration de 200 mg/litre (200 ppm) et en 9 jours à une concentration de 400 ppm **(Dojlido, 1979)**. A une concentration de 20 mg/litre dans l'eau de rivière contenant des microbes pré-adaptés à la MEK, la biodégradation complète a été obtenue en 2,5 jours **(Dojlido, 1977)**. **Delfino et Miles (1985)** rapportent un taux plus lent de la décomposition aérobie dans les eaux souterraines, 1 mg/litre a été entièrement dégradé dans 14 jours.

Nos résultats sont très prometteurs et satisfaisants. L'actinomycète dénommé A5.7 isolé des boues activées de la station d'El-Athmania, dégrade totalement une concentration d'environ 900 ppm en seulement 72 h de fermentation.

III.5. Identification morphologique de la souche A5.7

III.5.1.Etude le l'aspect macroscopique

Selon la vitesse de croissance, la souche A5.7, est considérée comme étant la plus rapide parmi les cinq sélectionnées. Les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies rondes, pâteuses et légèrement enfoncées dans la gélose après 2 à 3 jours d'incubation. Après 7 jours d'incubation, cette souche présente un aspect poudreux de couleur blanche, cela constitue le mycélium aérien caractéristique des actinomycètes. A partir du 14ème jours, le mycélium aérien prend progressivement une couleur grise. Ce qui correspond surement à la formation des spores à l'extrémité des hyphes aériens.

III.5.2. Etude de l'aspect microscopique

Les résultats de l'observation microscopique de la souche sélectionnée, par la technique des lamelles inclinées sont présentés dans la **figure N°27**.

La souche A5.7, est composée d'un mycélium de substrat bien développé, et un mycélium aérien moins dense et plus épais portant de longues chaînes de spores (généralement 20 spores par chaîne). Les chaînes de spores de forme cylindrique se présentent soit droites, spirales ou rectiflexibles.

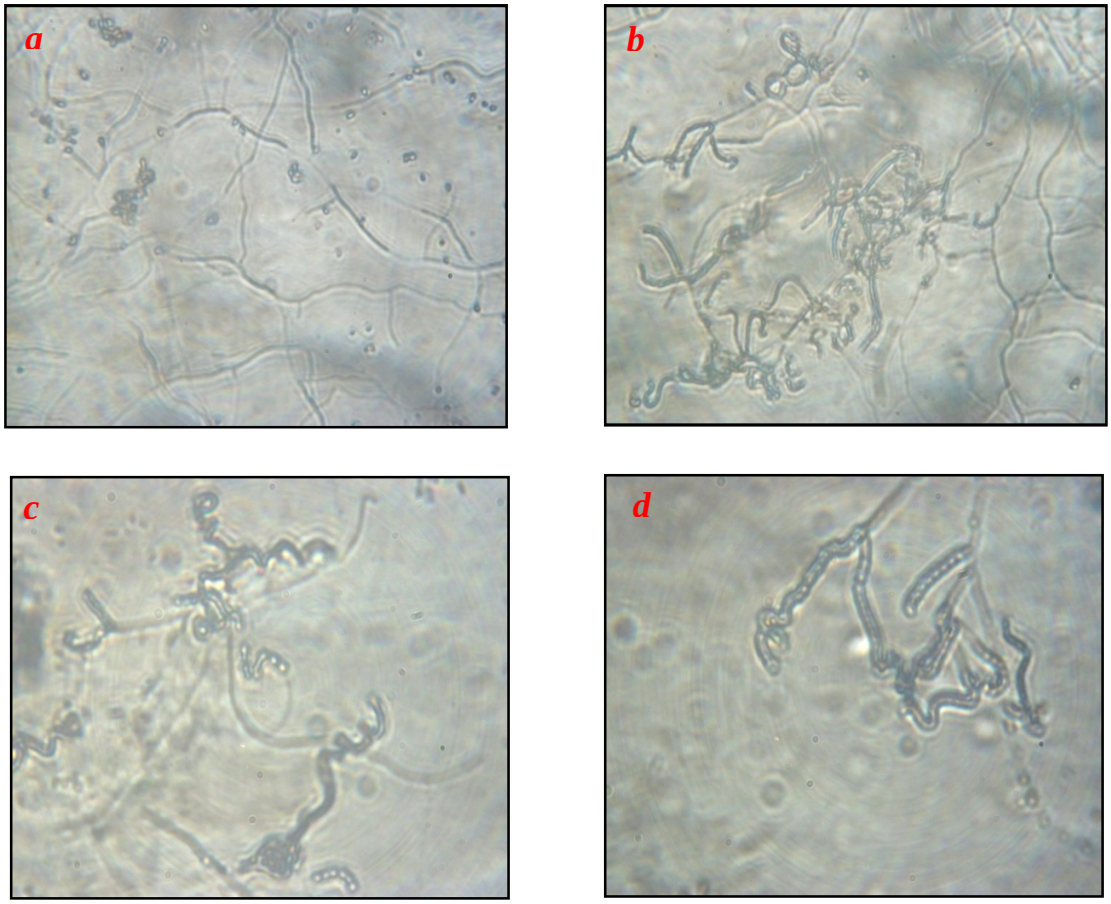


Figure N°27 : Observation microscopique de l'isolat A5.7 au grossissement **(G×100)**. **(a):** mycélium de substrat, **(b):** mycélium aérien avec des chaînes de spores, **(c):** Chaînes de spores droites et spirales**, (d):** Chaînes de spores droites, spirales et rectiflexibles.

La taxonomie des actinomycètes est basée sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques tandis que les critères chimiques, physiologiques et moléculaires séparent les espèces **(Slim, 2010)**. Selon **Williams *et al.*, 1993**, certains genres d'actinomycètes (*Streptomyces, Streptoverticillium, micromonospora, microbispora*…) peuvent être identifiés avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia, Actinomadura*…) par simple observation microscopique. Plusieurs auteurs ont pu déterminer les genres des actinomycètes à partir des caractéristiques morphologiques comme **Zaitlin *et al.*, (2003)**, dont les travaux ont permis d'identifier le genre par simple observation microscopique d'une souche actinomycétale cultivée sur un le milieu Czapek. D'autres, ont identifié des genres actinomycétales par observation des chaînes de spores au microscope optique **(Balagurunathan *et al.*, 1996)**.

La souche A5.7 développe des colonies après 2 à 3 jours d'incubation, c'est une caractéristique des actinomycètes à croissance rapide. **Nodwel et Losick (1998)**, ont constaté que les colonies de *Streptomyces coelicolor* érigent les hyphes aériens en 24 heures. Le genre *Streptomyces* fait partie des actinomycètes à croissance rapide.

Les colonies de l'isolat A5.7 sont de formes rondes, d'aspect poudreux et légèrement enfoncées dans la gélose. Les chaînes de spores sont soit de forme spirale, droite ou rectiflexible. Ces caractéristiques selon **Myadoh *et al.*, (2002)** sont typique des *Streptomyces.*

A cela s'ajoute la forme cylindrique des spores qui selon **Erz *et al.*, (2004)** caractérise le genre *Streptomyces*.

Les aspects morphologiques schématisés qui caractérisent les genres appartenant aux actinomycètes sont proposés par **Lechevalier, 1994** et parus dans la 9ème édition du Bergey's manuel **(Annexe 3)**, permettent d'identifier la plupart de ces bactéries**.** L'aspect des mycéliums aériens et de substrats de l'isolat A5.7 **(Figure N°27)**, est parfaitement identique avec le genre *Streptomyces*.

Par conséquent, et à partir de toutes ces ressemblances, l'isolat en question est assigné au genre ***Streptomyces*.** Le rôle des actinomycètes dans les traitements biologiques des composés organiques volatils est plus particulièrement connu dans les bio-filtres **(Juteau *et al.*, 1999 ; Khammar *et al.*, 2005 ; Sandrine, 2005)**.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La gestion des déchets est un des problèmes les plus complexes tant pour les pays riches que pour ceux en voie de développement. De plus, la mondialisation place la question des déchets parmi les préoccupations majeures des sociétés. La gestion des déchets touche plusieurs points sensibles comme le développement durable, les enjeux économiques, les préoccupations de santé ainsi que les problèmes environnementaux.

L'Algérie étant parmi les signataires de plusieurs protocoles et traités, lutte contre la pollution et pour la préservation de l'environnement. Ainsi, les émissions dans l'air de plusieurs composés organiques volatils (COV) sont formellement interdites **(J.O.R.A, 2007)**.

Dans le cadre du traitement des effluents gazeux contenant des COV, les procédés biologiques sont couramment mis en œuvre **(Smita et Babu, 2009 ; Wu-Chung et Tzu-Yu, 2010 ; Qi *et al.*, 2002 ; Spiros *et al.*, 1997 ; Tae *et al.*, 2006 ; Eubanks *et al.*, 1974 ; Phillips et Perry, 1974)**. Leur développement et leur utilisation à l'échelle industrielle croît de façon exponentielle.

Les travaux de l'emploi de souches pures de bactéries d'actinomycètes aquatiques, dans la biodégradation de la MEK sont rares.

Dans notre travail, l'isolement de quelques souches pures d'actinomycètes à partir des boues activées de la station d'épuration d'El Athmania a été entrepris. 5 souches pures d'actinomycètes capables de biodégrader la MEK ont été sélectionnées. La souche **A5.7** est la plus rapide parmi le lot choisi. La dégradation totale du substrat est obtenue après 72 h de culture. Le taux de croissance maximum μ_{max}, calculé est de **0.132 h^{-1}**. Il est le plus élevé parmi l'ensemble des actinomycètes testés. Il apparait également que la croissance de cette souche varie régulièrement avec la consommation de la MEK.

L'isolat A5.7 a été identifié par des méthodes morphologiques et culturales comme étant appartenir au genre ***Streptomyces***.

Nous comptons dans l'avenir étudier la dégradation de la MEK par ce *Streptomyces* et cette culture continue. Il est également très intéressant de tester plus spécialement le reste des isolats, en variant les conditions de fermentation. Nous envisageons également d'utiliser pour la biodégradation de ce même composé, des cultures mixtes à partir de ces actinomycètes isolés. Enfin, Il est plus que souhaitable d'identifier l'isolat **A5.7** au niveau de l'espèce.

Références bibliographiques

Alcamo I.E. (1998). Theory and Problems of Microbiology. Schaum's Outline Series., Inc. McGraw-Hill Companies, New York.

Alexander M. (1961). Introduction to Soil Microbiology. New York: John Wiley.

Alikhodja H. et Beldjoudi M.F. (2005). Biodégradation du méthanol en réacteur batch, influence de la présence de l'éthanol et des conditions de culture initiales. *Journal de la société Algérienne de chimie.* **15 (2),** 251-261.

Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A.W. and Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicilium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.* **5 (2),** 109-114.

Anurag pandey., Anupam shukla. and Majumdar S.K. (2005). Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Anti bacterial antibiotic. *African Journal of Biotechnology*. **4 (9)**, 909-910.

Arvind K., Bohra C. P. and Singh L. K. (2003). Environment, pollution and management. S.B. Nangia et A.P.H. Publishing Corporation. 531 p.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1992). Toxicological profile for 2-butanone. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1995). 2-butanone. Online at: http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts29.pdf. (Consulté le 02-07-2010).

Balagurunathan R., Xu L. and Jiang C. (1996). Diversity of Actinomycetes from south India and south China. *Actinomycetes.* **4 (3),** 89-94.

Beldjoudi M.F. (2004). Biodégradation du Méthanol en réacteur batch, influence de la présence d'éthanol et des conditions de culture initiales. Mémoire de Magister en pharmaco-chimie. Université Mentouri Constantine. 130 p.

Benimeli C.S., Castro G.R., Chaile A.P. and Amoroso M.J. (2007). Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. strain M7 . *International Biodeterioration & Biodegradation.* **59 (2),** 148-155.

Bohnet M. *et al.*, (2003). Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7th. Wiley InterScience (John Wiley & Sons).

Boone C.J. and Pine L. (1968). Rapid method for characterization of *Actinomyces* by cell wall composition. *Appl. Microbiol*. **Feb**, 279-284.

Boudemagh A. (2007). Isolement à partir des sols sahariens, de bactéries actinoycétales productrices de molécules antifongiques. Identification moléculaire de souches actives. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine. 120 p.

Boudemagh A., Ali-khoja H., Beljoudi M.F., Bensouici K., Kitouni M., Boulahrouf A., Mahboul M., Zaaout H., Larkem N. (2006). Biodegradation of methanol in a batch reactor by a microbial flora isolated from a wastewater treatment plant sludge at el-Menia in Constantine. *Fresenius Environmental Bulletin.* **15 (12b),** 1590-1594.

Brauer H. (1986). Biological purification of waste gases. *International Chemical Engineering.* **26 (3),** 387- 395.

Brock T.D. and Madigan M.T. (1991). Biology of Microorganisms. Prentice-Hall, Inc.

Burman N.P. (1973). The occurrence and significance of actinomycetes. In: Actinomycetales. Characteristics and practical importance. Academic Press (Ed). pp 219-230.

Bushell M.E. (1988). Growth, product, formation and fermentation technology. Actinomycetes in biotechnology. pp 185-217.

Byungtae Lee., Pometto A.L., Fratzke A. and Bailey T.B. (1991). Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and environmental microbiology*. **57,** 678-685.

Castillo M.A., Felis N., Aragón P., Cuesta G. and Sabater C. (2006). Biodegradation of the herbicide diuron by Streptomycetes isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **58 (3-4),** 196-202.

Chadha N. and Parmele C.S. (1993). Minimize emissions of air toxics via process changes. *Chem. Eng. Prog.* **89 (1),** 37-42.

Chandrakant R.K. (2008). Pharmaceutical microbiology : Principles and applications. 6 ème édition. Author.

Chang M.K. and Voice T.C. (1993). Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene and p-xylene, by two pseudomonas isolates. *Biotchenology Bioengineering*. **41,** 1057-1065.

Chelli R. (2010). Etude de la diversité des bactéries actinomycétales dans les sols fertiles d'El-baaraouia de la région de Constantine. Mise en évidence de l'activité antibiotique des isolats d'actinomycètes rares. Mémoire de Magister en Microbiologie de l'environnement. 80 p.

Collins M.D., Pirouz T., Goodfellow M., Minnikin D.E. (1977). Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *Gen. Microbiol.* **100**, 221-230.

Comas J., Balaguer M. D. and Rigola M. (1996). Biological traetment of gases and odours: a pilot plant for the treatment of H2S from a waste gas. *Revista dei combustibili.* **50 (11-12),** 431-438.

Converti A., Del Borghi M. and Zili M. (1997). Evaluation of phenol diffusivity through Pseudomonas Putida biofilm: application to the study of mass velocity distribution in a biofilter. *Bioprocess Engineering*. **16 (2),** 105-114.

Cornille A. (1992). Pollution chimique de la troposphère: mise au point d'une méthode de prélèvement et d'analyse des composés organiques volatils. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.

Cox H. H. J. and Deshusses M. A. (2002). Co-treatment of H_2S and toluene in a biotrickling filter. *Chemical Engineering Journal.* **87 (1),** 101-110.

Crawford D.L., Lynch J.M., Whipps J.M and Ousley M.A. (1993). Isolation and characterization of Actinomycetes antagonists of a fungal roots pathogen. *Appl. Env. Microbiol.* **59 (11),** 3899-3905.

CRC- Handbook of chemistry and physics. (1994). 5th Edition. Lide, DR, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

De Schrijver A., De Mot R. (1999). Degradation of pesticides by actinomycetes. *Critical reviews in microbiology.* ***25,*** 85-119.

Delfino J.J. and Miles C.J. (1985). Aerobic and anaerobic degradation of organic contaminants in Florida groundwater. *Soil Crop Sci Soc Florida Proc.* **44,** 9-14.

Demain A.L. and Solomon N.A. (1985). Biology of industrial microorganisms. The Benjamin/Cummings publishing company, Inc. pp 291-357.

Deshusses M.A. (1994). Biodegradation of mixtures of ketone vapours in biofilters for the treatement of waste air. Thèse de Doctorat en Sciences Techniques. Institut de technologie federal Suisse, Zurich.

Dewulf J.O and Langenhove H.V. (2002). Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry.* **21 (9-10),** 637-645.

Dietz F.K., Rodriguez-Giaxola M., Traiger G.J., Stella V.J. and Himmelstein K.J. (1981). Pharmacokinetics of 2-butanol and its metabolites in the rat. *J Pharmacokinet Biopharm.* **9,** 553-576.

Divincenzo G.D., Kaplan C.J. and Dedinas J . (1976). Characterization of the metabolites of methyl-N-butyl ketone, methyl iso-butyl ketone, and methyl ethyl ketone in guinea-pig serum and their clearance. *Toxicol Appl Pharmacol.* **36,** 511-522.

Djaballah C. (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'lila. Thèse de Magister en Ecologie Microbienne. Université Mentouri Constantine.

Dojlido J.R. (1977). Testing of biodegradability and toxicity of organic compounds in industrial wastewaters. In: Polish/US Symposium on Wastewater Treatment and Sludge Disposal, Cincinnati, Ohio, 10-12 February 1976. Cincinnati, Ohio, US Environmental Protection Agency, vol II, pp 112-131.

Dojlido J.R. (1979). Investigations of biodegradability and toxicity of organic compounds. Washington, DC, US Environmental Protection Agency. pp 99.

Dore M., Brunet N. and Legube B. (1975). Participation of various organic compounds in the evaluation of global pollution criteria. *Trib Cebedeau.* **28,** 3-11.

Drouin J.F. (1996). Analyse d'image en biotechnologie. Quantification de la morphologie de micro-organismes filamenteux au cours de fermentation et suivi de la croissance de cellules animals sur microporteurs au cours de cultures. Thèse de Doctorat, ENSAIA INPL, Nancy, France.

Dusserre G., Cabridenc R. and Cloirec P. L. (1998). Chapitre 6 : écotoxicologie des COV. In : Les Composés Organiques Volatils (COV) dans l'environnement. Ed : L.T.E. DOC. pp 163-186.

Edelvio de Barros G., Adriana U.S., Rita de Cássia Mendonça de Miranda., Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa. and Nei Pereira J.r. (2009). Biodegradation of Stored jet

Fuel by a *Nocardia sp.* Isolated from Contaminated Soil *Biology and technology.* **52 (5),** 1279-1284.

Edwards F.G. and Nirmalakhandan N. (1996). Biological treatment of airstreams contaminated with VOCs: an overview, Water Science and Technology. **34 (3- 4),** 565- 571.

Ei-Shafei H.A., Abd el-Nassser N.H., Kansoh A.L. and Ali A.M. (1998). Biodegradation of disposable polyethylene by fungi and Streptomyces species. *polymer degradation and stability.* **62,** 361-365.

Emo C. and Roberto S. (2003). Biodegradable polymers and plastics. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. New York. 395p.

Erz D., **Castillo U.F. and Strobel G.A. (2004).** Caronamycins, peptide antibiotics produced by a Verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic Monstera. *Microbiol.* **150,** 785-793.

Eubanks E.F., Forney F.W. and Larson. A.D. (1974). Purification and characterization of the nocardial acetylesterase involved in 2-butanone degradation. *J. Bacteriol.* **120,** 1133-1143.

Eunice J.A. and Prosser J. I. (1983). Mycelial growth and branching of *streptomyces coelicolor.* A3 (2) on solid medium. *J. gen. Microbial.* **129**, 2029-2036.

Fanlo J.L., Martin G. and Degorce-Dumas J.R. (1998). Chapitre 16: Bioépuration des Composés Organiques Volatils, dans: Les composés organiques volatils (COV) dans l'environnement, t.d. Ed : Lavoisier. pp 549, 550, 588.

Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (2004). Taxonomic Outline of the prokaryotes. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Springer-Verlag. New York.

Gerhold R.M. and Malaney G.W. (1966). Structural determinants in the oxidation of aliphatic compounds by activated sludge. *J Water Pollution Control Fed.* **38,** 562-579.

Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**,189-215.

Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the actinomycetales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Eds : G. Sykes and F.A. Skinner. Academic press, London, New York.

Gottlieb D. (1974). Actinomycetales. In : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eds: R.E. Buchanan et N.E. Gibbons, 8th Ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. pp 657, 881.

Grosjean D., Swanson R.D. and Ellis C. (1983). Carbonyls in Los Angeles air: Contribution of direct emissions and photochemistry. *Sci Total Environ.* **29,** 65-85.

Guide d'intervention chimique. (2009*).* méthyléthylcétone. Online at: http://www.cedre.fr/fr/publication/guides/chimique/methylethylcetone.pdf. (Consulté le 06-06-2010).

Hall D.M. and Grossbard E. (1972). The effects of grazing or cutting a perennial ryegrass and white clover on the microflora of the soil. *Soil Biol. Biochem.* **4,** 199.

Hanne L.F., Kirk L.L., Appel S.M., Narayan A.D. and Bains K.K. (1993). Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade p-nitrophenol. *Appl Environ Microbiol.* **59 (10),** 3505-3508.

Haroune N., Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Kloepfer A., Reemtsma T., De Wever H. and Delort A.M. (2004) Metabolism of 2-mercaptobenzothiazole by *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl Environ Microbiol.* **70,** 6315-6319.

Hawker L.E. and Linton A.H. 1971. Mico-organismes. pp : 325-333.

Hilali L., Khatabi A., Nassrallah N., Malki A. et finance C. (2002). Isolement des nouvelles souche d'actinomycetales productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev .Biol .Biotech.* **2,** 49-53.

Hobbs G., Frazer C.M., Gardner D.C.J., Cullum J.A. et Oliver S.G. (1989). Dispersed growth of streptomyces in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31,** 272-277.

HSDB (Hazardous Substance Data Bank). (1999). National Library of Medicine, Bethesda, MD. Online at: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB. (Consulté le 23-06-2010).

HSDB (Hazardous Substances Data Bank). (1994). MEDLARS Online Information Retrieval system, National Library of Medicine. Retrieved 8/3/94. (Consulté le 23-06-2010).

Hsu S.C. and Lockwood J.L. (1975). Powdred chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol*. **29(3),** 422-426.

INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité). (2003). Butanone. Fiche Toxicologique n°14, 1-4. Online at : http://cp2s.uhp-nancy.fr/HYG/document/**Butanone**.pdf. (Consulté le 06-06-2010).

INRS (Institut National de recherche et de sécurité). (2009). Butanone ou Méthyléthylcétone. Fiche toxicologique n°14.
online at : http://www.inrs.fr/default/dms/inrs/**FicheToxicologique**/TI-FT-**14**/ft14.pdf. (Consulté le 06-06-2010).

International Programme on Chemical Safety. (1992). Methyl ethyl ketone. Environmental health criteria, 143. Genève : World Health Organization. Online at: http://www.inchem.org/pages/ehc.html. (Consulté le 10-06-2010).

Isik K., Chun J., Hah Y.C. and Goodfellow M. (1999). *Nocardia Salmocida:* a fish pathogen. Inter. *J. Syst. Bacteriol*. **49,** 833-837.

Jayabarath J., Asma Musfira S., Giridhar R., Shyam sundar., Arulmurugan R. (2010). Biodegradation of Carbofuran Pesticide by Saline Soil Actinomycetes. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. **6 (2),** 187–192.

Jerome J. P., James T.S., Stephen Lory. (2004). « Microbiologie, Cours et questions de révision ». Ed: Dunod. paris.

Jirasripongpun. K. (2002). The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil. *Applied Microbiology*. **35 (4),** 296–300.

Jorio H. and Heitz M. (1999). Traitement de l'air par biofiltration, *Can. J. Eng*. **26 (4),** 402-424.

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE n°34 du 22 mai **2007**.

Juteau P., Larocque R., Rho D. and LaDuy A. (1999). Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52,** 863-868.

Kalakoutskii L. V. and Agre N. S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev*. **40(2),** 469–524.

Kampfer P. (1997). Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge. *Fems. Microbiol. Ecol.* **23,** 169-181.

Kano R., Hattori Y., Murakami N., Kashima M., Kroppenstedt R.M., Migoguchi M. and Hasegawa A. (2002). The first isolation of Nocardia veterina from a human mycetoma. *Microbiol. Immunol.* **46 (6),** 409-412.

Kennes C. and Thalasso F. (1998). Waste gas biotreatment technology, a review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **72,** 303-319.

Khammar N., Malhautier L., Degrange V., Lensi R., Godon J.J. and Fanlo J.L. (2005). Link between spatial structure of microbial communities and degradation of a complex mixture of volatile organic compounds in peat biofilters. *J. App. Microbiology.* **98,** 476-490.

Kimura N. and Urushigawa Y. (2001). Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzop-dioxin by a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO 101. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 138-143.

Kirchner K. (1993). Biological waste gas cleaning: applications, process technology, dans: 6th European Congress on Biotechnology (ECB6), Florence, Italie.

Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine.

Konig C., Eulberg D., Groning J., Lakner S., Seibert V., Kaschabek SR. and Schlomann M. (2004). A linear megaplasmid, p1CP, carrying the genes for chlorocatechol catabolism of *Rhodococcus opacus* 1CP. *Microbiol.* **150,** 3075-87.

Krasavage W.J., O'Donoghue J.L. and Divincenzo G.D. (1982). Ketones. In: Clayton GD & Clayton FE ed. Patty's industrial hygiene and toxicology. 3rd ed. New York, John Wiley and Sons, Wiley Interscience. pp 4709-4800.

Kurtbaoke D.I. and Wildman H.G. (1998). Accessing Australian biodiversity, towards an improved detection of Actinomycetes. **9(1-2),** 10-13.

Kuznetsov V.D., Zaitseva T.A., Vakulenko L.V. and Filippova S.N. (1992). *Streptomyces albiaxialis sp* . Nov. A new petroleum hydrocarbon degrading species of thermo and halotolerant *Streptomyces. Microbiology.* **61,** 62–67.

Labeda D.P. and Kroppenstedt R.M. (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa : proposal for *Actinozynnzmataceae* fam. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50,** 331-336.

Lacey J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: Actinomycetales: characteristics and practical importance. Eds: G. Sykes, F.A. Skinner.Academic press, London, New York. pp 231-251.

Lalanne F. (2006). Etude des potentialités du lavage biologique pour le traitement d'un mélange complexe de composés organiques volatils. Thèse de Doctorat. Université de Pau et des Pays de L'Adour.

Larpent J.P. et Larpent-Gourgand M. (1990). Mémento Technique de Microbiologie (2ème Ed). Technique et documentation –Lavoisier (Ed). pp. 342-345.

Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris.

Le Cloirec P., Fanlo J. L. and Gracian C. (2003). Traitements des odeurs; procédés curatifs, http://www.techniques-ingenieur.fr/affichage.

Lechevalier H.A. (1964). The actinomycetes. In: Principles and Application in Aquatic Microbiology. Eds: H. Heukelekian & N. C. Dondero. New York.

Lechevalier H.A. (1994). A pratical guide to genetic identification of actinomycetes. In Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth Edition. Eds: Williams and Wilins. pp: 605-617.

Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: The procaryotes, Eds : Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. *Springer-Verlag. Berlin.* **2,** 1915-1922.

Lechevalier H.A. and Lechevalier Mary P. (1967). Biology of the widespread soil fungistasis. *J. gen. Microbiol.* **26,** 473.

Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1985). Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: Biology of industrial microorganisms. The Benjamen Cummings Publishing Company, INC. pp 315-360.

Lechevalier M.P. and Lechevalier H. and Horan C. (1973). Chemical characteristics and classification of *Nocardiae*. Can. J. Microbiol. **19**, 965-972

Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic Actinomycetes .Inter. J. Syst. Bcteriol. **20 (4),** 435-443.

Lechevalier M.P., Bievre C.D. and Lechevalier H. (1977). Chemotaxonomie of aerobic Actinomycetes : phospholipides composition. .*Bioch. Syst. Ecol*. **5,** 249-260.

Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. In: microbiology thayer,.Actinomycete taxonomy. Eds: A. DIETZ, D.W. Society for industrial SIM special publication number 6. Arlington, Virginia USA. pp 225-291.

Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1994). *Nocardia amarae* sp. nov. an actinomycete common in fooming activated sludge. *Int. J. Syst. Bacterial*. **24,** 278-288.

Leclerc H. (1975). Microbiologie générale. Ed : Doin. Paris**.**

Leson G. and Smith B. J. (1997). Petroleum Environmental research forum field study on biofilters for control of volatile hydrocarbons. *J. Environ. Eng*. **123 (6),** 556-562.

Leveau J.Y. and Buix M. (1993). Les Actinomycètes. In. : Les microorganismes d'intérêt industriel. Eds : Florent J. Edition Tec et Doc. Lavoisier Apria. pp 424-480.

Lindholm P., Kortemaa H., Kokkola M., Haahtela K., Salkinoja S.M. and Valkonen J.P.T. (1997). Streptomyces spp. Isolated from potato scab lesion unde nordic conditions in Finland. *Plant Diseases*. **81,** 1317-1322.

Lin D.H.F. and Liptak B.G. (1995). Environmental Engineers' handbook, 2nd Ed. P. Lewis, Boca Ranton, USA.

Locci R. and Schaal K.P. (1980). Apical growth in facultative anaerobic actinomycetes as determined by immunofluorescent labelling. *Zbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg.* **246**, 112-118.

Locci R. and Sharples G.P. (1984). Morphology. In: the biology of actinomycetes. (Eds: Goodfellow M., Modarski M. and Williams S.T.,). *Ac. Press. London.* pp 165-199.

Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F. and Nava-Saucedo J.E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere*. **73,** 429–442.

Mannsville. (1993). Chemical Products Synopsis, Methyl Ethyl Ketone. Mannsville Chemical Products Corporation.

Mariat F. et Sebald M. (1990). Les actinomycètes. In: Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France. pp 935-949.

Martin H., van A., Sytze K. and Dick B.J. (1998). Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London.

Mighelez E.M., Hardisson C. and Mauzanal M.B. (2000). Streptomycetes: a new model to study cell death. In: Identification des actinomycétales isolées des eaux et de sol de Sebhga. Optimisation des milieux de culture de sporulation et de croissance (Boughachiche Faiza Mémoire de Magister).

Mitchell J.W. (1992). Alternative starting materials for industrial processes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89,** 821–826.

Miyasaka M., Kumai M., Koizumi A., Watanabe T., Kurasako K., Sato K. and Ikeda M. (1982). Biological monitoring of occupational exposure to methyl ethyl ketone by means of urinalysis for methyl ethyl ketone itself. *Int Arch Occup Environ Health.* **50,** 131-137.

Monod, A., Doussin J.F., Chebbi A. and Carlier P. (1998). Chapitre 5 : transformations chimiques des COV dans la troposphère. Impact sur la qualité de l'air. In: Les Composés Organiques Volatils (COV) dans l'environnement. Ed : L.T.E. DOC. pp 119-162.

Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Labuzek S. (2003). Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Pol. J. Environm. Stud.* **12**, 15-25.

Murphy D.C. (1984). Acute illness among workers connected to solvent exposure. *Occup Health Saf*. 36-38.

Myadoh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J. and Hotta K. (2002). Digital Atlas of Actinomycetes. (http://www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas). The Society of Actinomycetes. Tokyo, Japan.

Nathalie L., Christophe B., Christian B., Michèle Q., Françoise S., José-Edmundo N.S. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere*. **73,** 429–442.

Nodwell J.R. and Losick R. (1998). Purification of an extracellular signalling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol*. **180(5),** 1334-1337.

Nonomura H. and Hayakawa M. (1988). New methods for selective isolation of soil actinomycetes, dans « biology of Actinomycetes ». Japon Scientific Societies Press. Tokoyo. (Ed). pp 88-100.

NTP (National Toxicology Program). (2002). Chemical health and safety data. Online at: <http://ntp server.niehs.nih.gov/cgi/iH_Indexes/ALL_SRCH/iH_ALL_SRCH_Frames.html>. (Consulté le 23-06-2010).

Oh Y.S. and Bartha R. (1997). Construction of a bactérial consortium for the biofiltration of benzene, toluene and xylene emissions. *World Journal Microbiology and Biotechnologiy*. **13(6),** 627-632.

Oh Y.S., Choi S. C. and Kim Y.K. (1998). Degradation of gaseous BTX by biofiltration with Phanerochaete chrysosporium. *Journal of Microbiology*. **36 (1),** 34-38.

Okazaki T. and Okami Y. (1975). Actinomycetes talerant to increased NaCl concentration and their metabolites. *J. Fermentation Technol*. **53,** 833-840.

Oliveira T.A.C., Scarpello J.T. and Livingston A.G. (2002), Pervaporation-biological oxidation hybrid process for removal of volatile organic compounds from wastewaters. *Journal of Membrane Science*. **195,** 75-88.

Omura S. (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Ed: Springer Verlag, New York. Inc. pp 281-303.

Ottengraf P. (1986). Exhaust gas purification in biotechnology, dans: VCH Verlagsgesellschaft, Eds: H. J. a. R. Rehm, G., Weinheim. pp 425-452.

Ouhdouch Yedir. (1989). Bactéries actinomycétales rares productrices d'antifongiques. Thèse de Doctorat .Nancy.

Papagianni M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia *processes. Biotechnol. Adv*. **22 (3),** 189-259. Review.

Perry J.J. (1968). Substrate specificity in hydrocarbon utilizing micro-organisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **34,** 27-36.

Petrolini B., Quaroni S., Saracchi M. and Sardi P. (1991). Studies on the *Streptomycetes* population inhabiting plant roots. *Actino*. **2 (1),** 56-65.

Phillips W.E, JR. and Perry J.J. (1974). Métabolisme of n-Butanone and 2-Butanone by *Mycobacterium vaccae. Journal of Bacteriology*. **120 (2),** 987-989.

Pirouz T., Karbasian M.A. and Goodfellow M. (1999). Isolation of some aerobic Actinomycetes species from the soil of Zahedan country, south-east of Iran.

Porter J.N. (1971). Prevalance and distribution of antibiotic producing actinomycetes. *Adv. Appl. Microbiol*. **14,** 73-92.

Potivichayanon S., Pokethitiyook P. and Kruatrachue M. (2005). Hydrogen sulfide removal by a novel fixed-film bioscrubber system, Process Biochemistry, Article in press.

Prescott L., Harley.k J.P. and Klein D.A. (1995). Microbiologie tomeII. De Boeck, Bruxelles. pp 506-517.

Qi B., Moe W.M. and Kinney K.A. (2002). Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species. *Appl Microbiol Biotechnol.* **58,** 684–689.

Rafson H.J. (1998). Odor and VOC control handbook. New York : McGraw-Hill. pp 800.

Regnault J.P. (1990). Microbiologie Générale. Décarie Editeur Inc., Montreal. *Rhodococcus opacus* 1CP. *Microbiol.* **150,** 3075-87.

Rouessac F. and Rouessac A. (1994). Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes. Enseignement de la chimie. Edition Masson.

Salas J.A. and Hardisson C. (1981) Sugar uptae during germination of *Streptomyces antibioticus* spores. *J. Gen. Microbiol*. **125,** 25-31.

Salas J.A., Guijarro J.A. and Hardisson C. (1983) High calcium content in *Streptomyces* spores and its release as an early event during spore germination. *J. Bacteriol.* **155 (3),** 1316-1323.

Sandrine B. (2005). Traitement d'effluents gazeux chargés en composés organiques volatils par oxydation biologique : approche écologique des communautés microbiennes. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard de Lyon.

Sanglier J.J. et Trujillo M. (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*. **12,** 13.

Sardi P., Saracchi M., Petrolini B., Borgonovi G.E. and Merli S. (1992). Isolation of endophytic Streptomyces strains from surface-strerilized roots. *Appl. Env. Microbiol.* **58 (8),** 2691-2693.

Schofield G.M. and Schaal K.P. (1981). A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J. Gen. Microbiol*. **121**, 237-259.

Schuler M.L. and kargi F. (1992). Bioprocess Engineering :Basic concepts . Edition Prentice Hall PTR.

Schuppler M., Wasner M., Schôn G., G□bel U.B. (1998). In situ identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRW1 targeted oligonucleotide probes. *Microbiology*. **144,** 249-259.

Service du répertoire toxicologique (CSST). (2004). Méthyl éthyl cétone. Online at: http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=2436. (Consulté le 10-06-2010).

Seviour J.R., Mino T. and Onuki M. (2003). The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *Fems. Microbiol. Rev.* **27,** 99-127.

Sharples G.M. and Schaal K.P. (1981). A numerical taxonmic study of members of the Actinomycetaceae and related taxa. *J. Gen.Microbiol.* **121,** 237-259.

Shirling E.b. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of Streptomyces spicies. *Inter J. Syst . bacterial.* **16,** 313-340.

Simon P. and Ottengraf P. (1987). Biological systems for waste gas elimination. *Trends in Biotechnology*. **5 (5),** 132- 136.

Slim S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).

Smita R. et Babu B.V. (2009). Experimental studies and kinetic modeling for removal of methyl ethyl ketone using biofiltration. *Bioresource Technology*. **100,** 3855–3861.

Soliveri J., Mendoza A. and Arias M.E. (1988) Effect of different nutrients on the production of polyene antibiotics PA-5 and PA-7 by *Streptoverticillium* sp 43/16 in chemically defined media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 254-257.

Sophie S. (2006). Etude de métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis.* Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.

Spiros N.A., Emmanuel H., Hocine A., Sébastien D., Fabrice V. and Henry N. (1997). Gasphase methyl ethyl ketone biodegradation in a tubular biofilm reactor: microbiological and bioprocess aspects. *Biodegradation*. **8,** 251–264.

Srinivasan M.C., Laxman R.S. and Deshpande M.V. (1991). Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **7,** 171-184.

Stackebrandt E. and Schumann P. (2000). Description of *Bogoriellacea* fam. Nov., *Dermacocaceae* fam. Nov., *Rarobacteraceae* fam. Nov. and *Sanguibacterceae* fam. Nov.and emandation of some familiesof the suborder *Micromcoccineae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **50,** 1279-1285.

Stackebrandt E. Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *j. Syst.Bacteriol*. **47**, 479-491.

Stanier R.Y., Doudoroff M. et Adelber E.D. (1966). Microbiologie générale. Masson et Cie Editeurs. pp 131-132.

Suutari M., Lignell U., Hyvarinen A. and Nevalailen A. (2002). Media for cultivation of indoor *streptomycetes. J. Microbiol. Meth.* 1668-1674.

Suzuki S.I. (2001). Etablishement and use of gellan gun media for selective isolation and survey of specific rare Actinomycetes. *Actinomy*. **15 (2),** 55-60.

Suzuki S.I., Okuda T. and Komatsubara S. (1999). Selective isolation and distribution of *Sporichthya* strains in soil. *Appl. Env. Microbiol*. **65 (5),** 1930-1935.

Tae H.L., Jaisoo K., Min J.K., Hee W.R. and Kyung S.C. (2006). Degradation characteristics of methyl ethyl ketone by Pseudomonas sp. KT-3 in liquid culture and biofilter. *Chemosphere* **63,** 315–322.

Takizawa M, Colwell R.R. and Hill R.T (1993) Isolation and diversity of actinomycètes in the chesapeake bay *Appl. Environ. Microbiol.* **59,** 997-1002.

Tarrouche A. (2009). Biodégradation du MEK en réacteur batch : influence de la présence de l’acétone et des conditions des cultures initiales. Mémoire de Magister en chimie analytique et physique. Université Mentouri Constantine.

Thalasso F., L'hermite P., Hammami R., Naveau H. P. and Nyns E. J. (1991). Reactor design for biological gas treatment using the "mist foam concept", dans: Int. Symp. Environ. Biotech, Ostende, Belgique, Part I.

Thirupl L., Johsen K. and Winding A. (2001). Succssion of indigenus *Pseudomonas spp.* And Actinomycetes on Barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorecens* DR54 and the fungicide imazalil. *Appl. Env. Microbiol.* **67 (3),** 1147-1153.

Urano K and Kato Z. (1986). Evaluation of biodegradation ranks of priority organic compounds. *J Hazard Mater.* **13,** 147-159.

Uz I., Duan Y.P. and Ogram A. (2000). Characterization of the naphthalenedegrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. *FEMS. Microbiol. Lett*. **185,** 231-238.

Van der Geize R. and Dijkhuizen L. (2004). Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr. Opin. Microbiol.* **7,** 255-261.

Van Groenestijn J. and Hesslink P. G. M. (1993). Biotechniques for air pollution control. Biodegradation. **4 (4),** 283-301.

Vandermesse F. (1996). Capacité d'une communauté microbienne mixte à dégrader la MEK en réacteur batch, en vue de l'optimisation d'un bioréacteur. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études en science naturelle appliquée. Option : Biotechnologie industrielle. Université catholique de Louvain.

Waksman S.A. (1959). The actinomycetes: nature, occurrence and activities, Williams and Wilkins. Company, Baltimore. **1,** 29-46.

Wildermuth H. and Hopwood D.A. (1970) Septation during sporulation in *Streptomyces coelicolor. J. Gen. Microbiol.* **60**, 51-59.

Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kuznetsov V. D., Le Monnier F. J., Long P. F., Maycroft K. A., palma R. A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J.I. and West.M. (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiol.* **144,** 653-656.

Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kuznetsov V. D., Le Monnier F. J., Long P. F., Maycroft K. A., palma R. A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J.I. and West M. (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiol.* **144**, 653-656.

Williams S.T. and Davies F.L. (1965) Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycètes in soil .*J. Gen . Microbiol*. **38,** 251-261.

Williams S.T. and Cross T. (1971). "Actinomycetes". *In* Methods in microbiology. *Booth C. Ed., Academic Press. London.* **4,** 295-334.

Williams S.T., Bradshaw R.M., Costerton J. W. and Forge A. (1972). Fine structure of the spore sheath of some Streptomyces species. *J. Gen. Microbiol.* **72,** 249-258.

Williams S.T., Goodellow M., Wellington E.M.H., Vickers J.C., Alderson G., Sneath P.H.A., Sackin M.J. and Mortimer A.M. (1983). A probability matrix for identification of some streptomyces. J. Gen. Microbiol. **129,** 1815-1830.

Williams S.T., Lanning S. and Wellington E.M.H. (1984). Ecology of Actinomycetes. In: The Biology of the Actinomycetes. Eds : M. Goodfellow, M. Mordarski et S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. pp 481-528.

Wu-Chung C et Tzu-Yu L. (2010). Compounds interaction on the biodegradation of acetone and methyl ethyl ketone mixture in a composite bead biofilter. *Bioresource Technology*. **101,** 126–130

Xu L. H., Li Q.R. and Jiang C.L. (1996). Diversity of soil Actinomycetes in Yuman, China. Appl. Env. Microbiol. **62 (1),** 244-248 In **:** « Identification des *Actinomycetales* Isolés de Sols Arides. Optimisation des Milieux de Croissance et de Sporulation » (Zerizer Habiba) Mémoire de Magister.

Zaitlin B., Watson S.b., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D. (2003). Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res. J. Can.* **95 (2),** 113-118.

Zermane F. (2008). Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques, et des composés organiques de synthèse. Thèse de Magister. Université Mentouri Constantine.

Zili M., Converti A., Lodi M., Borghi and Ferraiolo G. (1993). Phenol removal from waste gases with a biologicalfilter by Pseudomonas Putida, *Biotchenology Bioengineering*, **41 (7),** 693-699.

Annexes

Annexe 1

Milieu de culture

Le milieu ISP4:

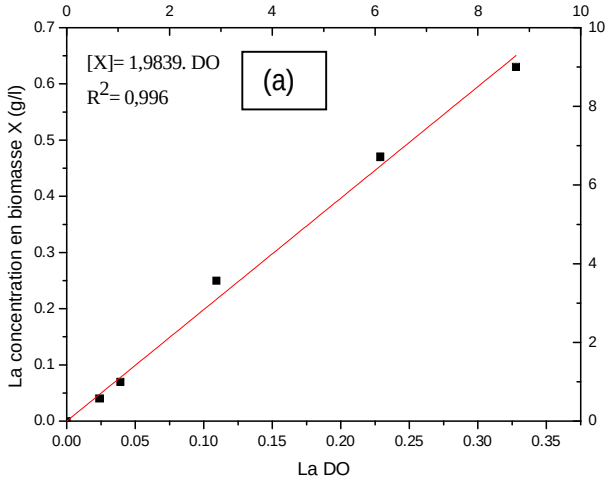
- Amidon soluble 10g
- Agar 20g
- K_2HPO_4 1g
- $MgSO_4\ 7H_2O$ 1g
- NaCl 1g
- $(NH_4)_2SO_4$ 2g
- $CaCo_3$ 2g
- Solution d'oligo-éléments 1ml
- pH 7,0 à 7,4
- Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

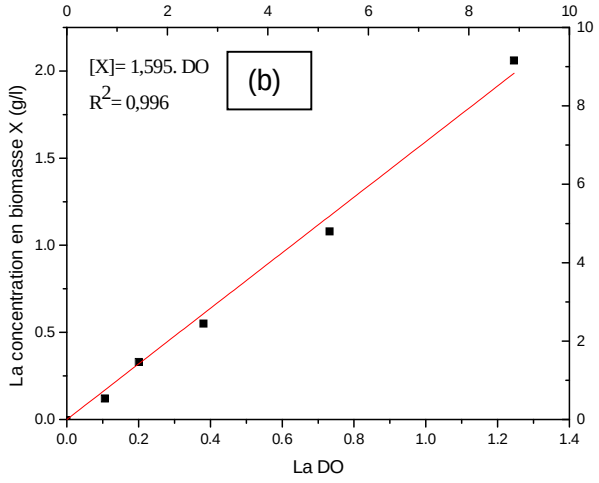
Solution d'oligo-éléments :

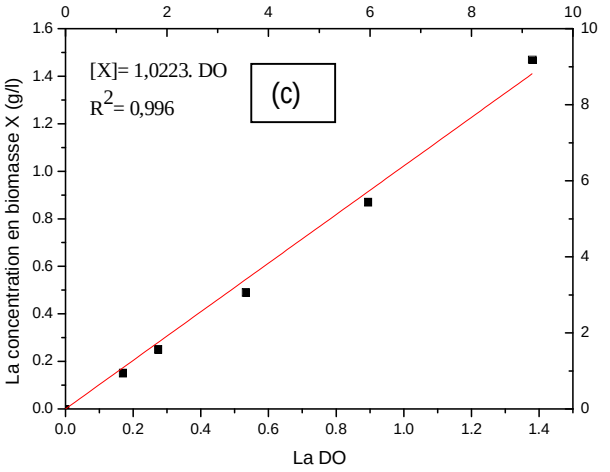
- $FeSO_4\ 7H_2O$ 0,1g
- $MnCl_2\ 4H_2O$ 0,1g
- $ZnSO_4\ 7H_2O$ 0,1g
- Eau distillée 100ml

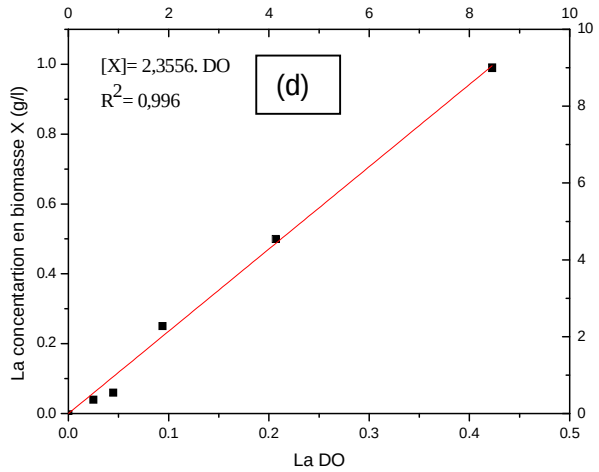
Annexe 2

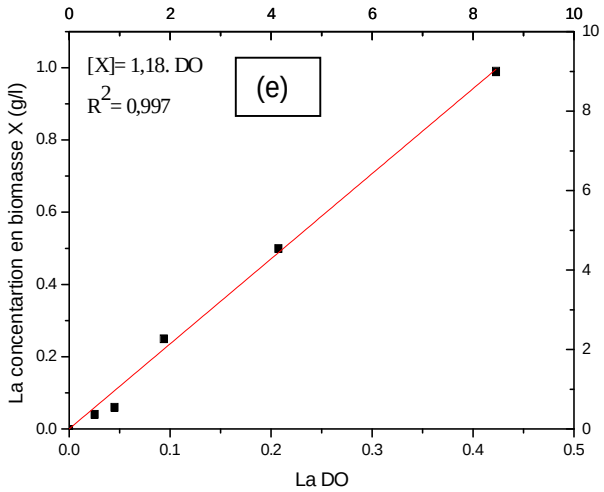
Les courbes d'étalonnage des différentes souches étudiées (a) : A2.3, (b) : A3.2, (c) :A3.3, (d) : A3.9, (e) : A5.7.





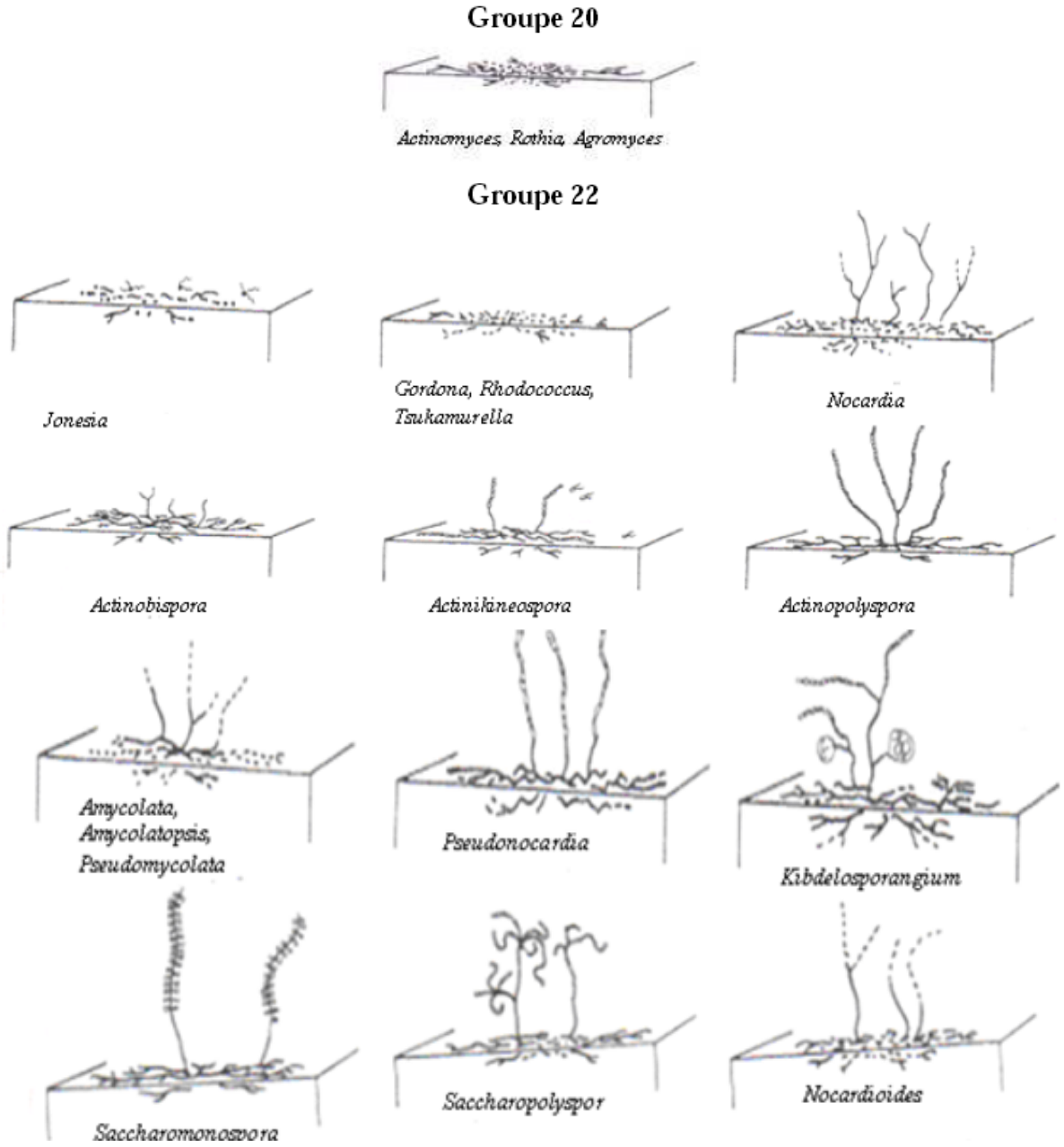






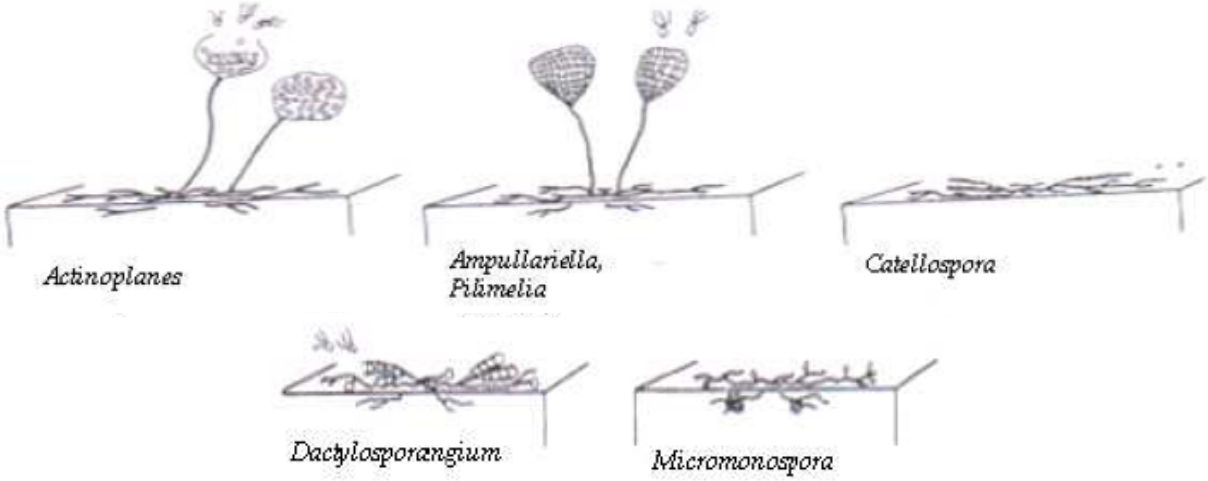
Annexe 3

Schémas représentatifs des mycéliums aériens et de substrat de quelques genres d'actinomycètes (Lechevalier, 1994).

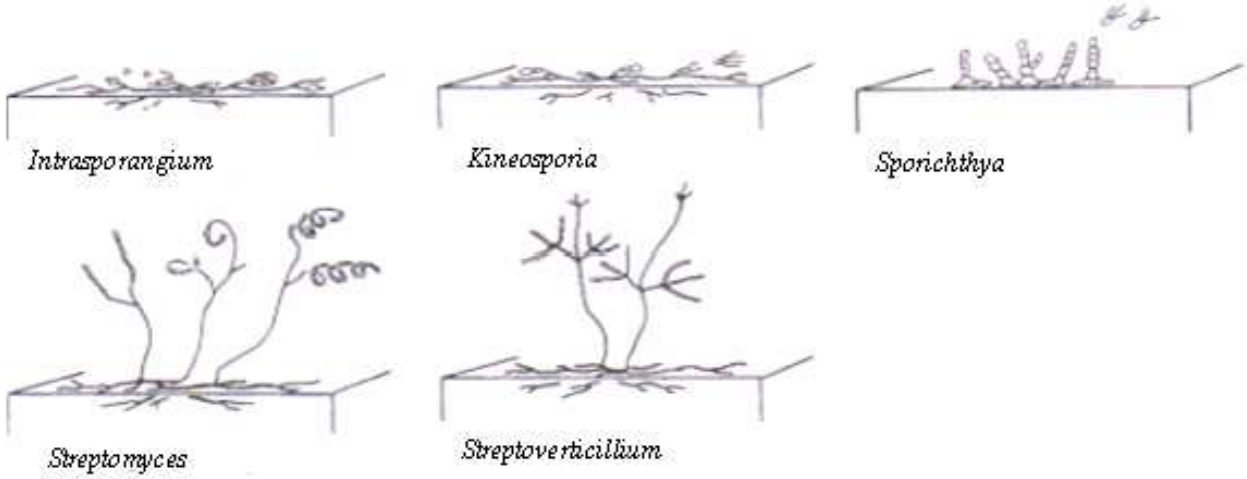


Groupe 23

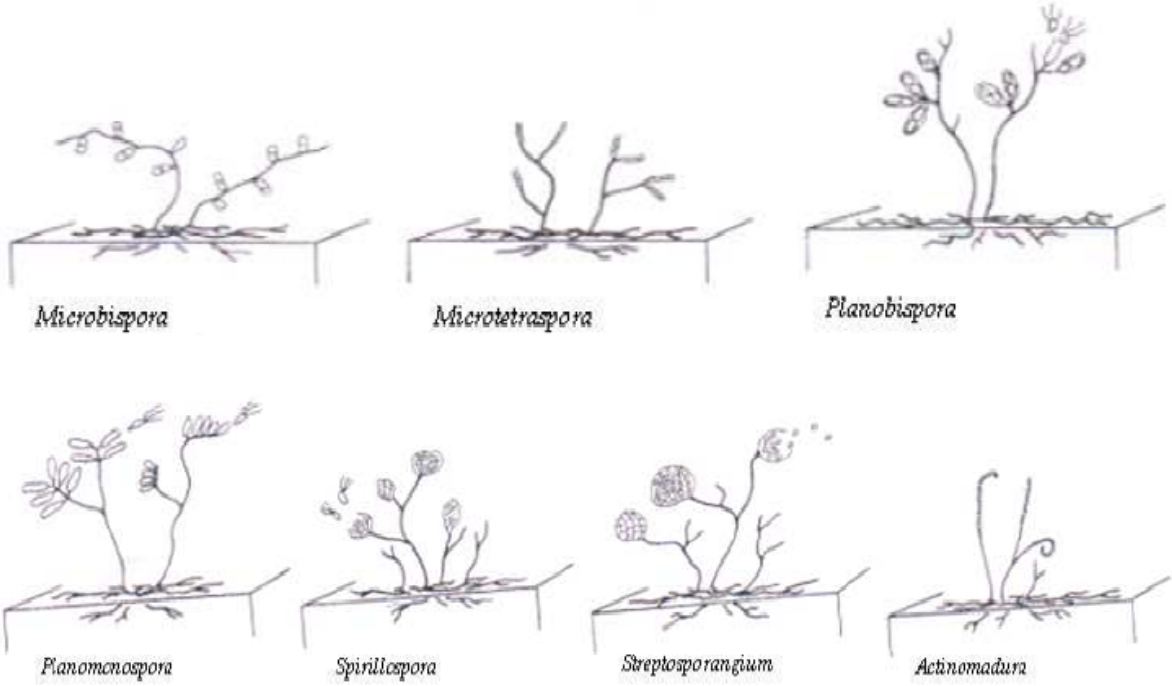
Groupe 24



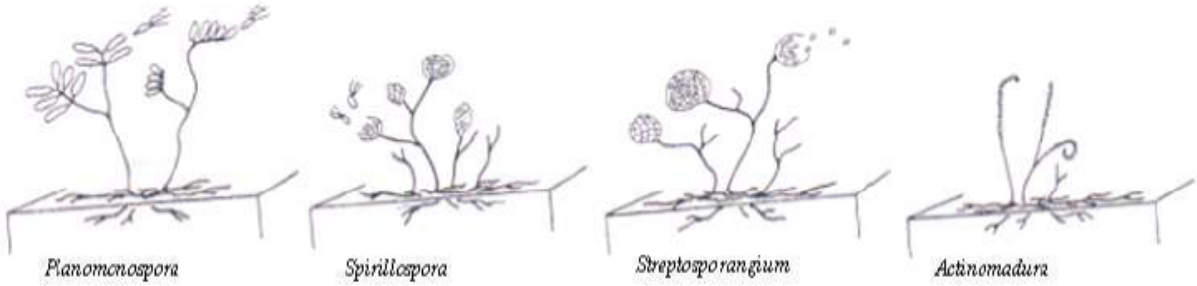
Groupe 25



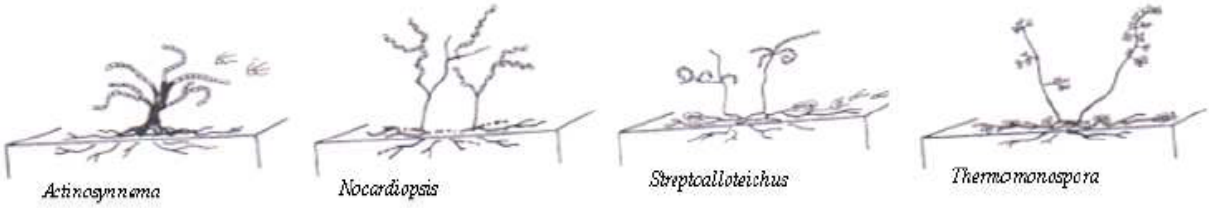
Groupe 26



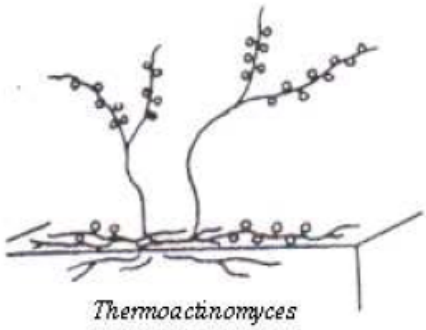
Groupe 26 (suite)



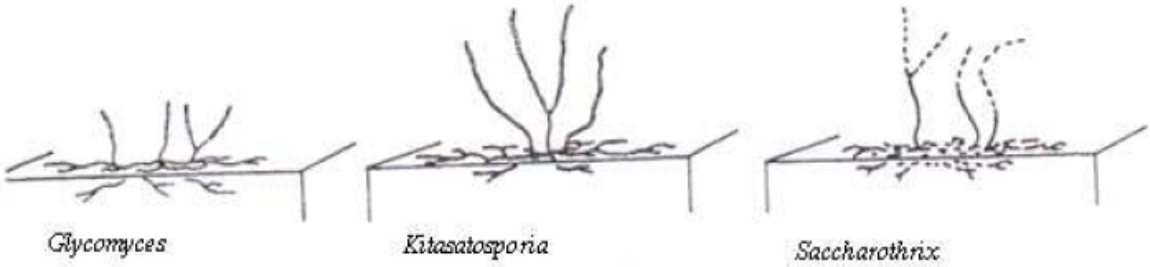
Groupe 27



Groupe 28



Groupe 29



ملخـــــص

النفايات الصناعية تطرح مشاكل كبرى بسبب تنوعها وتكوينها. البعض من بين هذه النفايات سامة للإنسان وتؤثر على البيئة. هذا هو حال الميتيل ايتيل سيتون وهي مركب عضوي جد طائر. هذا الأخير يستخدم على نطاق واسع كمذيب ويدخل في تركيب الدهانات, الورنيشات, الأصماغ, الأحبار والمواد اللاصقة (خصوصا الفينيلية, النيتروسيليلوزية و الأكريلية) و يستخدم أيضا كعامل استخراج للزيوت النباتية والمعدنية . نحن نستخدم عادة بعض التقنيات الفيزيو- كيميائية لتدمير هذه الملوثات مثل الحرق على سبيل المثال. هذه التقنيات مكلفة ولها بعض المساوئ. اليوم نحن نشهد تطور تقنيات بيولوجية تستخدم كائنات حية دقيقة قادرة على تحليل هذه النفايات.

في دراستنا قمنا بعزل في وسط ISP4 ,7 سلالات مشابهة للاكتنوميسات من الأوحال المنشطة لمحطة معالجة مياه الصرف بالعثمانية, العديد منها كانت قادرة على تحليل الميتيل إيتيل سيتون. السلالة المسماة **A5.7** كانت الأكثر كفاءة من بين السلالات. هذه السلالة قادرة على تحليل هذا المركب بنسبة 100% بعد 72 ساعة أي ثلاثة أيام من التخمر،معدل نموها الأقصى **(μ_{max})** هو الأعلى ويقدر بـــ**$0,132\ h^{-1}$.** حدد نوع السلالة بعدة طرق مورفولوجية وزراعية و تبين أنها تنتمي للنوع ***Streptomyces***.

كلمات مفتـــاحية : أكتينوميسات, التحلل البيولوجي, الميتيل ايتيل سيتون, الأوحال المنشطة, المعالجة البيولوجية.

Abstract

Industrial wastes pose major problems because of their diversity and composition. Among these wastes, some are toxic to humans and affect the environment. This is the case of methyl ethyl ketone which is a highly volatile organic compound. This VOC is widely used as a solvent in the composition of paints, varnishes, inks, glues and adhesives (particularly vinylics, nitrocellulosics or acrylics). It also serves as an extraction agent of certain vegetable and mineral oils. We usually use some physico-chemical techniques for the destruction of this pollutant such as incineration for example. These techniques are expensive and have some disadvantages. Today we are witnessing the development of biological techniques implementing microoganismes, able to completely biodegrade these wastes. In our study, we isolated in ISP4 medium, 7 strains similar to actinomycetes from activated sludge of the wastewater treatment plant of El-Athmania. Many of them have the ability to biodegrade the methyl ethyl ketone. The strain called **A5.7** was the most efficient among the tested actinomycetes. This strain is able to degrade 100% of this compound after 72 hours or three days of fermentation in batch. Its maximum growth rate **(μ_{max})** is the highest, it is **0.132 h^{-1}**. This isolate was identified by several morphological methods and methods of cultivation as belonging to the genus ***Streptomyces***.

Keywords: Actinomycetes, biodegradation, methyl ethyl ketone, activated sludge, biodepollution.

Nom : SILINI **Prénom :** SOUMAYA	**Date de soutenance :** 23-04-2012

Diplôme : Magister

Thème:

Contribution à l'étude de la biodégradation de la méthyléthylcétone en réacteur batch par les actinomycètes isolés à partir des boues activée de la station d'épuration d'El Athmania.

Résumé :

Les rejets industriels posent de gros problèmes de par leur diversité et leur composition. Parmi ces déchets, certains sont toxiques pour l'homme et affectent l'environnement. C'est le cas de la méthyléthylcétone qui est un composé organique très volatil. Ce COV est largement utilisée comme solvant, entrant dans la composition des peintures, de vernis, d'encres, de colles et d'adhésifs (particulièrement les vinyliques, nitrocellulosiques ou acryliques). Il sert également comme agent d'extraction de certaines huiles végétales et minérales. On emploie habituellement des techniques physico-chimiques, pour la destruction de ce polluant comme l'incinération par exemple. Ces techniques sont couteuses et présentent certains inconvenants. On assiste aujourd'hui au développement des techniques biologiques mettant en œuvre des microoganismes, capables de biodégrader complètement ces déchets. Dans notre étude, nous avons isolé sur le milieu ISP 4, 7 souches assignées aux actinomycètes à partir des boues activées de la station d'épuration des eaux usées d'El-Athmania. Plusieurs d'entre elles ont une aptitude à biodégrader la méthyléthylcétone. Une souche dénommée **A5.7** a été constatée la plus performante parmi les actinomycètes testés. Cette souche est capable de dégrader 100 % de ce composé après 72 h soit trois jours de fermentation en batch. Le taux de croissance maximum **(μ_{max})** est le plus élevé, il est de **0,132 h^{-1}**. Cet isolat a été identifié par plusieurs méthodes morphologiques et culturales comme étant appartenir au genre ***Streptomyces.***

Mots clés : Actinomycètes, biodégradation, méthyléthylcétone, boues activées, biodépollution.

Laboratoires de recherche : Laboratoire de Microbiologie Appliquée.
Laboratoire de Pollution et Traitement des Eaux.

Directeur de recherche : A. BOUDEMAGH.

Devant le jury :

Présidente : G. OUAHRANI.	**Professeur**	**U.M.C.**
Encadreur : A. BOUDEMAGH.	**Maître de conférences**	**U.M.C.**
Examinateur : H. ALI-KHOUDJA.	**Professeur**	**U.M.C.**
Examinatrice : I. MIHOUBI.	**Maître de conférences**	**U.M.C.**