Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Eau Terre Environnement

Nouvelle approche pour la biodégradation des BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylène) dans l'eau

Par

TADLAOUI Sofia

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr Yann Le Bihan CRIQ
Examinateur externe	Pr. Hassine BOUAFIF UQAT, Québec
Directeur de recherche	Pr Satinder Kaur Brar INRS ETE
Codirecteur de recherche	Pr. Patrick Dogui INRS ETE

© Droits réservés de *TADLAOUI Sofia*, 2019

REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de recherche Pr Satinder Kaur Brar pour avoir accepté de diriger mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier particulièrement, **le** ***Pr Patrick Drogui qui a assuré co-encadrement et la codirection de mes travaux de recherche.Je remercie aussi le Dr Tarek Rouissi pour sa précieuse aide durant toute la période de ma Maitrise.***

Je suis particulièrement reconnaissante envers le corps administratif et le président de l'ISHÉDD M. Kamal El Haji,

Je tiens aussi à remercier chaleureusement mes collègues pour leur aide et leur patience. Et finalement, je souhaite aussi remercier ma famille, mes parents et mes amis.

RÉSUMÉ

Les composés BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène) sont les contaminants les plus fréquemment rencontrés dans les eaux souterraines adjacentes aux sites pétroliers. Dans cette étude, une nouvelle approche a été mise en place afin de dégrader les BTEX en exploitant la capacité des laccases (laccases libres et immobilisés) à dégrader les composés phénoliques. Le traitement biocatalytique (en présence d'enzymes oxydoréductases) offre une solution verte et efficace pour la bioremédiation environnementale.

L'étude a été divisée en deux parties. Pour ce faire, une production des laccases à l'état solide a été employé tout au long de cette expérience.

Dans la première partie, les laccases libres avec une activité de 0.5 U/ml ont été testées. La biodégradation des BTEX a été étudiée à température ambiante pour une durée de 30 jours., Les résultats ont montré une biodégradation qui varie entre 69 et 94% pour les différents composés de BTEX .

La deuxième partie a porté sur l'immobilisation des laccases sur du microbiocharbon activé chimiquement par un traitement acide H_2SO_4/HNO3 (1:1, v/v) et ce, pendant une période de 20 jours. Les essais ont été ont été réalisé à la température ambiante (autour de 20°C) et en imposant une concentration intiale de BTEX se situant entre 331 et 3994 ppm. Une dégradation presque totale a été observée pour tous les composés BTEX, spécifiquement elle était de 99% pour le Benzène, 97% pour le Toluène, 88% pour l'Ethylbenzène, 89% pour le m-p xylènes et finalement 92% pour l'o-xylène dans l'eau.

Mots clés : Eaux contaminées, sites pétroliers, BTEX laccase, immobilisation

ABSTRACT

BTEX compounds (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene) are the most common contaminants found in groundwater adjacent to petroleum sites. In this study, a new approach was implemented to degrade BTEX by exploiting the ability of laccases (free and immobilized laccases) to degrade phenolic compounds, thus biocatalytic treatment with these oxidoreductase enzymes provides a green and efficient solution for environmental bioremediation.

The study was divided into two parts. To make a production of laccases in the solid state was used throughout this experiment.

In the first part, free laccases with an activity of 0.5 U / ml were tested. The biodegradation of BTEX was studied at room temperature for a period of 30 days, the results showed a biodegradation which varies between 69 and 94% for the different compounds of BTEX.

The second part focused on the immobilization of laccases on chemically activated microbiochar by acid treatment H_2SO_4/HNO_3 (1: 1, v / v), for a period of 20 days and an initial laccase activity, a concentration of btex between 331 and 3994 ppm and at room temperature. almost total degradation was observed for all btex compounds, specifically it was 99% for benzene, 97% for toluene, 88% for ethylbenzene, 89% for xylenes and finally 92% for benzene. -xylene in water.

Key word : Contaminated water, oil sites ,BTEX, laccase, Immobilization

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS ..... **III**

RÉSUMÉ ..... **V**

ABSTRACT ..... **VI**

TABLE DES MATIÈRES ..... **IX**

LISTE DES TABLEAUX ..... **XIII**

LISTE DES FIGURES ..... **XV**

LISTE DES ÉQUATIONS ..... **XVII**

LISTE DES ABRÉVIATIONS ..... **XIX**

I. INTRODUCTION **1**

II. REVUE DE LITTÉRATURE **2**

2.1 GENERALITES : 2

2.2 APERÇU CHRONOLOGIQUE DES DIFFERENTS DEVERSEMENTS DE PETROLE ET SES DERIVES DANS LES VINGT DERNIERES ANNEES, DANS LE MONDE, EN AMERIQUE DU NORD ET AU CANADA :..... 3

2.3 LES METHODES DE TRAITEMENT DES EAUX ET SITES CONTAMINES PAR LE PETROLE ET SES DERIVES D'UNE FAÇON GENERALE 5

Traitement physico-chimique : *5*

2.4 TRAITEMENT ENZYMATIQUE 7

2.4.1 Productions des enzymes par fermentation à l'état solide *7*

2.5 PROPRIETES ET APPLICATIONS DE LA LACCASE : 9

2.6 APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES 13

Activation du microbiocharbon avec de l'acide pour une immobilisation de la laccase *15*

3 PROBLEMATIQUE 16

3.1 HYPOTHESES 16

3.2 OBJECTIFS DU TRAVAIL 16

Objectif principal *16*

Objectifs spécifiques *16*

3.3 ORGANISATION DU TRAVAIL 17

IV. MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES 17

4.1 PREPARATION D'INOCULUM : 17

4.2 PROCEDURES EXPERIMENTALES 18

4.2.1 Productions des enzymes ligno-cellulosique *18*

4.3.1 Mesure de l'activité enzymatique *19*

4.4 FONCTIONNALISATION DU MICROBIOCHARBON 20

4.4.1 Titrage *20*

4.4.2 Immobilisation de la laccase *20*

4.4.3 Chromatographie en phase gazeuse : *20*

V. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 22

5.1 PRODUCTION DES LACCASES 22

5.2 TEST DE DEGRADATION DE BTEX 23

5.3 DEGRADATION DES BTEX AVEC LES LACCASES IMMOBILISEES DE SUR DU MICROBIOCHARBON TRAITES A L'ACIDE : 30

5.3.1 Caractérisation et fonctionalisation du microbiocharbon : *30*

5.3.2 Dégradation des BTEX avec de la laccase immobilisée sur du microbiocharbon traité avec de l'acide : *31*

VI. CONCLUSION 35

VII. RÉFÉRENCES 37

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: LES DIFFERENTS DEVERSEMENTS DURANT CES VINGT DERNIERES ANNEES 3
TABLEAU 2: EFFECTS TOXIQUES DES BTEX 6
TABLEAU 3 : DEGRADATION DE BTEX A UNE CONCENTRATION ENTRE 522 ET 1530 PPM ET 0.5 U/ML DE LACCASES 24
TABLEAU 4 : DEGRADATION DE BTEX A UNE CONCENTRATION ENTRE 976 ET 3277 PPM..... 26
TABLEAU 5 : DEGRADATION DE BTEX A UNE CONCENTRATION ENTRE 805 ET 3919 PPM..... 28
TABLEAU 6 : POURCENTAGES DE DEGRADATIONS DE CHACUN DECOMPOSES BTEX 30
TABLEAU 7 : DEGRADATION DE BTEX D'UNE CONCENTRATION INITIALE ENTRE331 ET 3994 PPM AVEC L'APPLICATION DE LACCASE IMMOBILISE SUR DU BIOCHARBON ACTIVE PAR UNE COMBINAISON DE H_2SO_4/HNO_3 32

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: LACCASE ACTIVE DE TRAMETES VERCICOLOR 9
FIGURE 2 : SITE ACTIF DE LA LACCASE (RIVERA-HOYOS *ET AL.*, 2013) 10
FIGURE 3 : - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CYCLES REDOX CATALYSES PAR LA LACCASE POUR L'OXYDATION DES SUBSTRATS EN L'ABSENCE (A) OU DANS LES PRESENTS (B) DES MEDIATEURS REDOX (RIVA, 2006)..... 13
FIGURE 4 : PROFIL DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES LACCASES PRODUITE PAR FERMENTATION SOLIDE..... 23
FIGURE 5 : SUIVI DE LA DEGRADATION DU BTEX (INITIALEMENT ENTRE 522 ET 1530 PPM) PAR LES LACCASES..... 25
FIGURE 6 : SUIVI DE LA DEGRADATION DU BTEX (INITIALEMENT ENTRE 976 ET 3277PPM) PAR LES LACCASES..... 27
FIGURE 7 : SUIVI DE LA DEGRADATION DU BTEX (INITIALEMENT ENTRE 805 ET 3919 PPM) PAR LES LACCASES..... 29
FIGURE 8 : SPECTRE DE FT-IR DU MICROBICHARBON TRAITE AVEC H_2SO_4/HNO_3..... 31
FIGURE 9 : DEGRADATION DES BTEX DANS LES EAUX DE LAVAGES AVEC UNE CONCENTRATION INITIALE ENTRE 331 ET 3994 PPM A L'AIDE DES LACCASES IMMOBILISEES SUR DU MICROBIOCHARBON ACTIVE 34

LISTE DES ÉQUATIONS

ÉQUATION 1 : L'EQUATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE..... 19

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène et xylènes

SSF : Fermentation à l'état solide

HAP : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

I. INTRODUCTION

Le pétrole demeure la source d'énergie la plus demandée dans le monde, il est disponible sous plusieurs formes (brute ou raffinée). Le pétrole est constitué généralement de mélanges d'hydrocarbures sous différentes formes moléculaires (Brandt *et al.*, 2014). Les hydrocarbures sont constitués d'alcanes, d'alcènes, de composés aromatiques et de composés polaires. Les composés aromatiques, qui nous intéressent, dans cette étude sont constitués d'au moins un cycle benzène à 6 atomes de carbones. Les plus petits et volatiles parmi eux sont les : benzène, toluène, ethylbenzène et xylène (BTEX). (Hubbe *et al.*, 2013)

Les déversements accidentels du pétrole causent plusieurs problèmes environnementaux dus à son transport et peuvent causer plusieurs dégâts significatifs dus à sa composition physico-chimique et aussi son interaction avec les différents milieux récepteurs.

Il existe plusieurs méthodes de traitements des sites contaminés : ces méthodes peuvent être chimiques, physiques ou biologiques. Dans cette étude nous nous focaliserons plus précisément sur le traitement biologique en utilisant les enzymes laccases pour la dégradation des BTEX.

II. REVUE DE LITTÉRATURE

Dans le présent chapitre, une attention particulière aux différents déversements issus de pétrole dans les vingt dernières années dans le monde, l'Amérique du Nord et le Canada… aussi les différentes méthodes de traitements de ces déversements dans l'eau d'une manière façon générale.

Finalement un accent sera fait sur le traitement biologique, plus précisément par voie enzymatique en utilisant la laccase avec ses multiples applications dans le domaine biotechnologique.

2.1 Généralités :

Le pétrole est l'une des ressources naturelles indispensables à l'être humain et qui est exploité depuis plusieurs décennies . Il a été clairement démontré que depuis le début de son utilisation, plusieurs problèmes environnementaux majeurs ont été observés suite aux différents déversements (Herbert, 2010). Ill existe deux sortes de pétrole raffiné, le léger qui se distingue comme peu coloré et très fluide, et le brut lourd qui est généralement visqueux, de couleur noire et qui comportent peu de fractions légères.

2.2 Aperçu chronologique des différents déversements de pétrole et ses dérivés dans les vingt dernières années, dans le monde, en Amérique du Nord et au canada :

Le tableau ci-dessous nous démontre une chronologie des différents déversements qui se sont déroulés ces vingt dernières années partout dans le monde et leurs dégâts sur l'environnement.

Tableau 1: les différents déversements durant ces vingt dernières années

Année	Lieux	Dégâts
Mars 1967	**Torrey canyon**	Le Torrey Canyon, un navire libérien, s'échoue à proximité des îles Scilly (Grande-Bretagne) et déverse dans la mer 121 000 tonnes de brut, atteignant la Bretagne (ouest de la France). D'autres naufrages de pétroliers, au volume d'hydrocarbures moins élevé, ont causé d'importantes catastrophes naturelles comme les marées noires de l'Exxon Valdez en Alaska (1989), du Sea Empress au Pays de Galles (1996), de l'Erika en France (1999) ou du Prestige en Espagne (2002). (Le Berre *et al.*, 2004)
Juillet 1979	**Atlantic empress/Aegean captain**	La collision de deux navires battant pavillon grec, l'Atlantic Empress et l'Aegean Captain, au large de Tobago, provoque le déversement de 287 000 tonnes de pétrole, en plus de causer la mort de 30 marins. (Le Berre *et al.*, 2004)
Juin 1979 MEXIQUE	**Plateformes et puits : Les volumes les plus importants**	Le déversement d'un million de tonnes de pétrole dans le golfe du Mexique, après l'explosion du puits de pétrole Ixtoc Uno, provoque une gigantesque marée noire. Plus de neuf mois de travail seront nécessaires

		pour juguler la fuite. (Le Berre *et al.*, 2004)
Novembre 1988	**Odyssey**	L'Odyssey, navire britannique transportant 132 000 tonnes de pétrole, sombre dans l'Atlantique à environ 1300 km des côtes canadiennes avec les 27 membres de l'équipage (Le Berre *et al.*, 2004).
Janvier 1991	**Golfe**	Un million de tonnes de pétrole brut échappé des réservoirs de navires-citernes en rade, de terminaux et de puits offshore saboté sont déversées dans le Golfe à la suite de la guerre contre l'occupation du Koweït par l'Irak. 560 kilomètres de côtes sont pollués (DECLERCK, 2013).
Avril 1991	**Haven**	Un pétrolier chypriote, le Haven, sombre dans le golfe de Gênes (Italie) après plusieurs incendies qui détruisent une grande partie de sa cargaison de 144 000 tonnes. Le reste du pétrole forme une marée noire qui pollue les côtes de Ligurie et de Provence (Le Berre *et al.*, 2004)I.
Avril 2010	**ÉTATS-UNIS**	L'explosion de la plateforme pétrolière Deepwater Horizon, opérée par BP dans le Golfe du Mexique, fait 11 morts et entraîne le déversement de 4,9 millions de barils de brut (plus de 600 000 tonnes de pétrole) (Martin & Dalian, 2018).
6 juin 2013	**Lac Mégantic, Québec**	Il a induit à la mort plus de 47 personnes et la destruction d'une quarantaine d'édifices.

2.3 Les méthodes de traitement des eaux et sites contaminés par le pétrole et ses dérivés d'une façon générale

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont une classe de composés organiques qui s'accumulent dans le milieu naturel principalement à la suite d'activités anthropiques telles que la combustion de combustibles fossiles. L'intérêt a entouré l'apparition et la distribution des HAP pendant de nombreuses décennies en raison de leurs effets potentiellement nocifs sur la santé humaine. Cette préoccupation a incité les chercheurs à trouver des moyens de détoxifier / éliminer ces composés organiques de l'environnement naturel. (Bamforth & Singleton, 2005)

Il existe plusieurs méthodes (chimiques, physiques ou biologiques) pour éliminer et dégrader ces composés.**Traitement physico-chimique :**

L'utilisation du procédé de réactif de Fenton a été étudiée pour le traitement de matrices contaminées par des hydrocarbures aromatiquespolycycliques (HAP)(Flotron *et al.*, 2005)

L'extraction par solvant, la phytoremédiation, l'oxydation chimique, la dégradation photocatalytique, le traitement électrocinétique, le traitement thermique et les technologies d'assainissement intégrées. (Ceylan *et al.*, 2009)

L'utilisation d'un matériau polymère macroporeux à base de caoutchouc butyle (BR) comme absorbant dans le nettoyage de déversement d'hydrocarbures(Ceylan *et al.*, 2009)

L'oxydation chimique des sols contaminés aux HAP. Les processus d'adsorption et d'extraction sont également documentés et discutés. L'utilisation d'ozone, de peroxyde d'hydrogène (avec ou sans ajout de fer ferreux) et d'eau sous haute pression (dans des conditions sous et supercritiques) en présence d'un oxydant ajouté comme peroxyde d'hydrogène. (Rivas, 2006)

L'ajout de la molécule-cage la cyclodextrine dans des solutions de lavages a été également utilisée (Viglianti *et al.*, 2006)

Les hydrocarbures aromatiques tels que le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes (BTEX) sont considérés comme polluants néfastesà cause de leurs grandes volatilités et toxicités pour l'environnement. Le tableau 2 illustre bien les différents problèmes que peuvent causer les BTEX.

Tableau 2: Effects toxiques des BTEX

	Benzène	**Toluène**	**Étyle Benzène**	**Xylène**
Concentrations toxiques	CL_{50}= 64 980 mg/m^3 LOAEL = 32 mg/m^3	CMEO = 375 mg/m^3	200 mg/m^3	CMEO = 250 mg/m^3
Classement Carcinogénique (EPA)	Substance qui est cancérigène pour l'homme (1998)	Substance non classifiable par manque de donnée* (2005)	Substance non classifiable quant à sa cancérogénicité pour l'homme** (1991)	Substance non classifiable quant à la cancérogénicité pour l'homme (1987)
Où on les retrouve principalement dans l'organisme	Tissue riche en lipides	Tissue riche en lipides surtout le cerveau	Aucune donnée sur la distribution chez l'homme	Tissue adipeux et circulation systémique
Effets sur l'homme	Cancérigène, mutagène, hémotoxique et immunotoxique	Irritation cutanée, irritation des muqueuses et dommage à des organes	Irritation des muqueuses et irritation cutanée	Trouble respiratoire, cardiovasculaire, gastro-intestinal et neurologique

2.4 Traitement enzymatique

L'utilisation des enzymes a connu une grande évolution, touchant plusieurs domaines industriel et agricole.

Le développement des différentes méthodes de fermentation que ce soit à l'état solide ou liquide à rendu possible l'exploitation industrielle des enzymes et sa rentabilité économique.

L'aptitude de différents champignons comme Trametes versicilor à produire plusieurs types d'enzymes hydrolytiques à était démontré dans plusieurs études récentes (Laadila, 2016), mais aussi elles peuvent être utilisées dans plusieurs phases de traitement (extraction, purification, hydrolyse et activation) (Fang *et al.*, 2015).

2.4.1 Productions des enzymes par fermentation à l'état solide

la biomasse ligno-cellulosiques à était reconnue comme l'une des ressources naturelles les plus abandantes, elle est exploitée en industries pour différentes fins (production d'énergie, biomolécules, construction..etc.), ceci grâce aux différentes avancées technologiques (Pereira *et al.*, 2015) avec le développement industriel et agricole, la génération de déchets est devenue une grande problématique (Tableau 2), ces déchets peuvent être utilisés comme matières premières par l'industrie de la biotechnologie.

La réutilisation de ces déchets permet de réduire leur impact environnemental si elle se fait dans le respect des normes.

Plusieurs microorganismes possèdent une aptitude particulière à biodégradé les déchets grâce à leurs systèmes enzymatiques (Pandey *et al.*, 2000)

Actuellement, il a été démontré que la fermentation à l'état solide permet une production très pertinente d'enzymes, en particulier les enzymes ligninolytiques. Cette technique de fermentation date depuis plusieurs siècles (Pereira *et al.*, 2015), elle est intéressante étant donné ses avantages économiques et environnementaux. La multiplication des microorganismes se fait dans des conditions chimiques, physiques et biochimiques spécifiques aux conditions solides (Pandey *et al.*, 2000)

Parmi les microorganismes qui sont capables de produire une quantité importante d'enzymes ligno-cellulosiques, on peut citer *Trametes versicolor.* Ce champignon est capable de produire une variété d'enzymes oxydatives principalement les laccases qui dégradent les composés phénoliques et non phénoliques liés à la lignine ainsi que les polluants organiques (Gassara *et al.*, 2010)

Principe de la fermentation à l'état solide :

Cette technique de fermentation fait partie des techniques les plus utilisés en biotechnologie. Elle permet la production de bioproduits à valeur ajoutée par exemple : les enzymes, les acides organiques, les lipides, les alcools..etc (Pandey, 2003). Les déchets organiques peuvent être valorisés comme source de carbone en fermentation à l'état solide (Singhania *et al.*, 2009)

Généralement le substrat peut jouer deux rôles :

- Support pour l'immobilisation des microorganismes ;
- Source d'énergie pour la croissance des microorganismes (Couto & Sanromán, 2005).

Le principe de la fermentation à l'état solide ne diffère aucunement de la fermentation conventionnelle. La différence réside au niveau de la nature du substrat (liquide ou solide) et des conditions opératoires imposées (température, l'humidité et l'oxygène, etc.) qui controlent la croissance des microorganismes(Pandey, 2003)

La fermentation utilisant des substrat solide est la plus avantageuse à cause de son faible coût et sa facilité de contrôle de production d'enzymes.. La fermentation en milieu solide possède des inconvénients comme le nombre limité des microorganismes actifs, leurs efficacités seulement à petite échelle et leur implication catalytique qui reste localisée (Singhania *et al.*, 2009)

Les enzymes produites par la fermentation à l'état solide sont appliquées au développement des procédés comme la bioremédiation des sites contaminés par les biocarburants, les biosurfactants et les biopesticides (Pandey, 2003)

2.5 Propriétés et applications de la laccase :

La laccase (figure 1) est une enzyme qui appartient au groupe des oxydases. Ce groupe d'enzymes a reçu beaucoup d'attention de la part des chercheurs ces dernières décennies en raison de leur capacité à oxyder plusieurs polluants environnementaux hautement récalcitrants. La laccase est capable d'oxyder un large spectre de substrats organiques (Piontek *et al.*, 2002).Elle est utilisée dans plusieurs applications, comme par exemple la décoloration du denim dans l'industrie du textile, le blanchiment de la pâte à papier, la décoloration des effluents et bien d'autres. La laccase est présente dans les plantes supérieures et les champignons (MESSERSCHMIDT & HUBER, 1990) et a également été détectée dans les insectes et les bactéries. En raison de leurs capacités à oxyder plusieurs substrats, les laccases sont de plus en plus utilisées pour des applications industrielles.

Figure 1: laccase active de Trametes vercicolor

En ce qui concerne la structure de la laccase, elle est considérée comme une enzyme ayant une grande stabilité en raison du niveau élevé de glycosylation (Durán *et al.*, 2002). La laccase est sous la forme d'une holoenzyme active, est une glycoprotéine dimère ou tétramère, contenant habituellement (par monomère) quatre atomes de cuivre (Cu) liés à trois sites redox (Type 1, Type 2 et Type 3 pairs de Cu). Pour avoir une activité catalytique, un minimum de quatre atomes de Cu par unité de protéine

active est nécessaire. Trois types de cuivre peuvent être distingués en utilisant la spectroscopie UV/visible et la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique (EPR). Le type 1 Cu (T1) à son état de repos oxydé est responsable de la couleur bleue de la protéine à une absorbance d'environ 610 nm et est EPR détectable. Le type 2 Cu (T2) ne confère pas de couleur, mais est EPR détectable. Les atomes de Cu (T3) de type 3 consistent en une paire d'atomes de Cu dans une conformation binucléaire qui donne une faible absorbance dans la région proche des UV, mais aucun signal EPR détectable. Les sites de cuivre de type 2 et de type 3 sont proches les uns des autres et forment un centre trinucléaire impliqué dans le mécanisme catalytique de l'enzyme (figure 2) (Thurston, 1994).

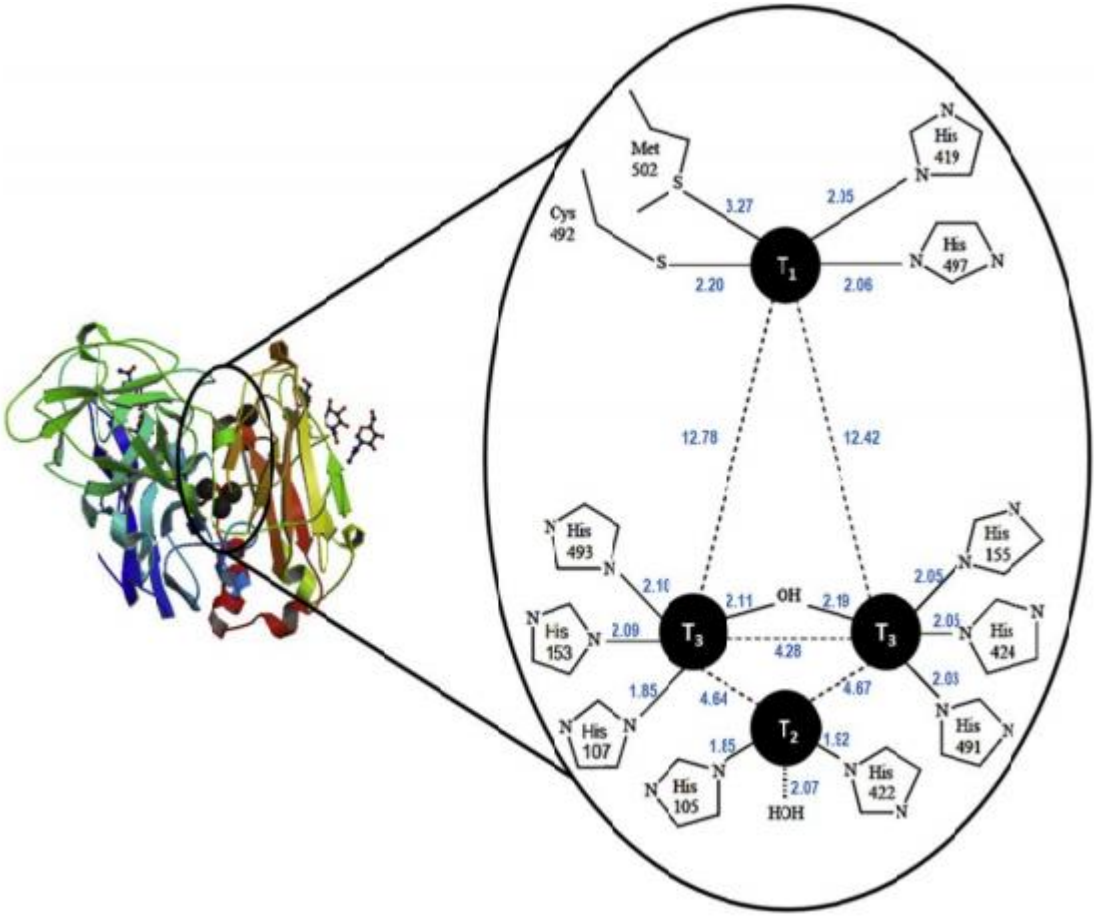

Figure 2 : Site actif de la laccase (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013)

Trois étapes principales sont impliquées dans le mécanisme de l'action de la laccase. Initialement, Cu T1 est réduit par l'action d'un substrat réducteur, qui est ensuite oxydé. Ensuite, l'électron est transféré de Cu T1 sur> 13 interne par une voie Cys-His vers le centre trinucléaire, formé par les atomes de cuivre T2 et T3. La molécule d'oxygène se lie au centre trinucléaire pour une activation asymétrique à travers un site de liaison au substrat situé à proximité des ligands His du centre Cu T1. Il a été proposé que la poche de liaison pour O_2 semble restreindre l'accès des agents oxydants différents de O_2. Pendant l'état d'équilibre du processus, H_2O_2 n'est pas détecté à l'extérieur de l'enzyme, ce qui indique qu'il se produit une réduction de quatre électrons de l'O_2 à l'H2O (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Puisque l'oxydation d'un électron dans le substrat phénolique est liée à la réduction de quatre électrons d'oxygène, on ne peut pas supposer que le mécanisme de la réaction est simple. Par conséquent, il est supposé que la laccase agit comme une batterie, stockant des électrons de réactions d'oxydation individuelles afin de réduire l'oxygène moléculaire. Par conséquent, l'oxydation de quatre molécules de substrat est nécessaire pour produire une réduction complète de l'oxygène moléculaire en eau (Solomon *et al.*, 2008). Au cours du processus catalytique de la laccase, différentes réactions radicalaires résultent, selon la structure et les conditions de réaction. Les réactions les plus fréquentes sont le couplage de radicaux libres qui génèrent des produits dimères ou des composés polymériques et des carboxylations oxydatives. L'oxydation des substrats est couplée à la réduction de l'oxygène moléculaire, générant deux molécules d'eau. Pour chaque oxygène réduit, quatre molécules de substrat sont oxydées sans production de peroxyde d'hydrogène (Solomon *et al.*, 2008)

Substrat $4H^+$ + 4 + substrat $O_2 \rightarrow 2\ H_2O$ + 4 +

Par conséquent, les laccases sont considérées comme des catalyseurs «verts», car elles utilisent l'O_2 comme cosubstrat et génèrent du H_2O comme sous-produit (figure 3).

La laccase peut être également utilisée comme médiateur avec certains médiateurs chimiques. En raison de la grande dimension de la molécule de laccase (Rodgers, Blanford et al., 2010) et de son faible potentiel redox (≤ 0,8 V), il est souvent nécessaire d'utiliser d'autres composés formant un système médiateur. Comme on peut le voir sur

la figure 3, il existe deux mécanismes par lesquels les composés peuvent être oxydés sous l'action catalytique de l'enzyme. Dans les interactions typiques de la laccase avec un substrat, le site catalytique de l'enzyme extrait les électrons du substrat et libère un produit oxydé. Dans les cas où un médiateur est présent, le médiateur peut être oxydé par l'enzyme et ensuite oxyder un autre composé qui est soit un substrat ou non-substrat entraînant la formation de produit (s) oxydé (s) et la régénération du médiateur (Banci *et al.*, 1999). Ces médiateurs sont des composés de bas poids moléculaire facilement oxydables par la laccase, produisant des radicaux cationiques très réactifs et instables. Cependant, en même temps, ces radicaux cationiques peuvent oxyder des composés complexes (non compris les substrats phénoliques) avant de revenir à leur état d'origine (Torres *et al.*, 2003). Par ce mécanisme, les médiateurs agissent comme des transporteurs d'électrons diffusibles, permettant l'oxydation indirecte de substrats polymères tels que la lignine, pénétrant même dans des zones moins accessibles de sa structure. De plus, en raison de l'utilisation de médiateurs, les laccases sont capables de s'oxyder les composés ayant un plus grand potentiel redox que le leur; un exemple de ceci est l'oxydation médiée par les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP (Riva, 2006). Puisque le Bourbonnais a démontré que l'inclusion du médiateur augmente l'activité catalytique de la laccase vers les substrats non phénoliques (Bourbonnais & Paice, 1990), plus de 100 médiateurs différents ont été décrits avec l'ABTS (2.2'-azino-bis (3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)). Le HBT (1-hydroxybenzotriazole) étant le plus couramment utilisé. Ce système de laccase-médiateur peut être appliqué dans diverses réactions oxydatives (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

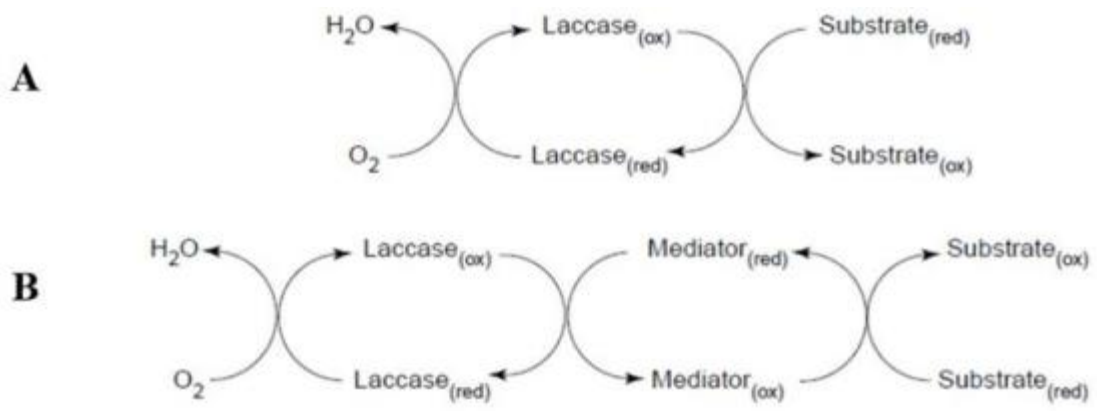

Figure 3 : - Représentation schématique des cycles redox catalysés par la laccase pour l'oxydation des substrats en l'absence (A) ou dans les présents (B) des médiateurs redox (Riva, 2006).

2.6 Applications biotechnologiques

Les laccases présentent un grand intérêt pour l'industrie et ont été utilisées dans de nombreuses applications telles que la délignification des composés lignocellulosiques, le biopulpage et le bioblanchiment, la transformation des colorants dans l'industrie textile, le traitement des eaux usées et la dégradation des explosifs et des pesticides ((Rivera-Hoyos *et al.*, 2013).

Les laccases sont largement utilisées dans l'industrie du papier. La laccase de *T. versicolor* était capable de délignifier la pulpe de papier en présence de médiateurs, sans avoir recours à des techniques traditionnelles de réactifs toxiques chlorés (Bourbonnais *et al.*, 1997). De nombreuses études ont été développées pour optimiser l'ensemble du processus (Ferraroni *et al.*, 2012). En raison de son fort potentiel d'oxydoréduction, la laccase peut être utilisée dans presque toutes les chaînes de production de produits en papier: développement de la pâte à papier, lavage sans chlore de la pâte ou traitement des effluents. Il est de notoriété publique que la charge polluante dans les eaux usées résultant du processus de lavage pendant la production de papier est caractérisée par des niveaux élevés de demande chimique en oxygène (DCO), de couleur et plus de 500 composés halogénés organiques absorbables différents (AOX) (Savant *et al.*, 2006). En ce qui concerne l'industrie des produits

forestiers, deux domaines ont récemment été étudiés: i) la conception de matériaux lignocellulosiques dotés de nouvelles propriétés de résistance et de stabilité au moyen de greffes de composés phénoliques catalysées par la laccase, ce qu'on appelle la «fonctionnarisation des fibres cellulosiques»; ii) utilisation de la laccase pour améliorer le degré de compression dans les panneaux à base de bois (par couplage enzymatique in situ), sans utiliser d'adhésifs toxiques contenant du formaldéhyde (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013)

L'application de Laccase dans l'industrie textile va du lavage des fibres de coton au blanchiment des textiles en passant par le précurseur de la production de colorants jusqu'à l'élimination de la première dans les eaux usées (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013)

Par exemple, la laccase peut être utilisée pour la biorestauration dans des matrices contenant des composés tels que les HAP, les chlorophénols, les diméthoxyphénols, les nitrophénols et les pesticides, les askarels, entre autres (Gayosso-Canales *et al.*, 2012). En fait, la laccase de M. thermophila a été récemment utilisée pour l'oxydation du colorant indigo dans le tissu de denim (Riva, 2006). La dégradation des HAP est considérée comme particulièrement intéressante, car les hydrocarbures aromatiques polycycliques constituent un groupe de xénobiotiques très dangereux (mutagènes, cancérogènes et/ou tératogènes) largement distribué dans les milieux terrestres et aquatiques. Les principales sources d'émission proviennent du déversement en mer, des moteurs de véhicules, des processus industriels et des incendies de forêt. Les tendances récentes pour l'élimination des HAP visent à combiner des méthodes chimiques et biologiques, telles que le traitement-choc pour l'oxydation (Riva, 2006). Ainsi, un effort plus important est fait pour concevoir une oxydation efficace des HAP par les laccases. Ces procédures nécessitent des conditions de traitement exigeantes, telles que la présence de solvants organiques et des conditions environnementales extrêmes, entre autres (Kudanga *et al.*, 2011).

Les laccases ont également des caractéristiques qui leur permettent d'être exploités en nanobiotechnologie. Cette enzyme peut être utilisée dans le développement de biocapteurs pour l'analyse clinique et environnementale et être employée dans l'avancement du biocarburant pour l'énergie électrique propre (sans

utilisation de combustible fossile) par l'immobilisation de laccase dans la cathode. Par exemple, l'activité enzymatique de la laccase couplée à des transducteurs physiques peut être utile dans la conception de biocapteurs pour détecter O_2 et une grande variété de réducteurs de substrat tels que les phénols, les anilines et le glucose. En outre, l'activité indirecte d'autres enzymes (par exemple, les amylases, les aminopeptidases, la phosphatase alcaline, la cellobiose oxydase, la chymotrypsine ou la glucosidase) peut être déterminée (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Pour l'industrie pharmaceutique, les laccases ont été utilisées pour le développement d'agents antitumoraux, de nouveaux dérivés antibiotiques et de cosmétiques.

Enfin, les laccases peuvent catalyser la réduction de l'oxygène en eau, une application prometteuse de laccase vise la conception de biocombustibles et le nettoyage de certains explosifs dans le sol, comme le trinitrotoluène (TNT) (Shekher *et al.*, 2011)

En résumé, les laccases sont des enzymes à fort potentiel dans divers domaines de l'industrie. Ce sont des «outils verts» très prometteurs dans plusieurs processus, qui attirent l'attention de la communauté scientifique.

Activation du microbiocharbon avec de l'acide pour une immobilisation de la laccase

D'après une étude récente, plusieurs combinaisons d'acides pour activé le nanobiocharbon ont était testés, tel que HCl, H_2SO_4 et H_2SO_4 / HCl qui ont démontré presque les mêmes spectres sur le FT-IR que le spectre du nanobicharbon non traité, ce qui signifie que ces combinaisons ne sont pas efficaces donc elles sont négligeables (Naghdi *et al.*, 2017). En comparaison avec d'autres combinaisons d'acides qui contenaient du HNO_3 ont démontrés des pics plus forts pour le groupe fonctionnel acide carboxylique, parmi lesquels H_2SO_4 / HNO_3 a présenté le pic avec l'intensité la plus élevée (Naghdi *et al.*, 2017)

3 PROBLÉMATIQUE

L'industrie du pétrole s'agrandit de plus en plus avec les diverses utilisations de ce dernier dans la vie de tous les jours, les accidents durant le transport que ce soit par voie terrestre ou maritime causent plusieurs problèmes environnementaux soit pour les sols ou les eaux. Plusieurs solutions existent déjà comme les traitements physico-chimiques qui ont des effets néfastes pour la faune et la flore, mais aussi coutent cher. C'est ainsi que de nouvelles solutions écologiques ont apparu comme le traitement enzymatique.

Notre projet propose une alternative verte basée sur l'utilisation des enzymes laccases produites parfermentation à l'état solide à partir des déchets agroalimentaires, ce qui nous ramène a une solution moins couteuse et plus écologique.

3.1 Hypothèses

La principale hypothèse de ce travail est :

La lacasse (enzyme lignocelulosique) produite par *Trametes vercicolor* en utilisant des déchets de l'industrie de jus de fuits serait capable de dégrader les BTEX (Benzène, Toluène, Ethyl-benzène et xylène). Le conditionnement ett l'adaptation de l'enzyme cellulosique (Laccase libre et laccase immobilisée sur du microbiocharbon) contribuerait à la dégradation des BTEX.

3.2 Objectifs du travail

Objectif principal

L'objectif principal de ce travail est l'étude la dégradation des BTEX par la laccase.

Objectifs spécifiques

Ce travail poursuit les objectifs spécifiques suivants :

- Optimisation de la production de la laccase en utilisant le marc de pomme comme substrat.
- Optimisation de la dégradation des BTEX à différentes concentrations de BTEX .
- Application sur des eaux usées de lavage des voitures

3.3 Organisation du travail

Pour aboutir aux objectifs visés par cette étude, nous avons adopté la démarche méthodologique suivante :

1. la production des enzymes laccases par fermentation à l'état solide en utilisant le marc de pomme comme substrat de fermentation.
2. Évaluation de la dégradation des BTEX par la laccase déjà produite.
3. Immobilisation de la laccase produite sur du microbiocharbonet évaluation de son efficacité de dégradation des BTEX par rapport aux laccases libres sur les eaux de lavage de voitures.

IV. MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

4.1 Préparation d'inoculum :

Le champignon *Trametes versicolor* a été cultivé dans le milieu gélose dextrose de pomme de terre (PDA, C = 39g/l) (autoclavé à T=121°C pour 20 min), ensuite *T. versicolor* a été maintenu dans le milieu préparé précédemment et incubé à T=30 ± 1 °C pendant 14 jours (Lorenzo *et al.*, 2006).

4.2 Procédures expérimentales

4.2.1 Productions des enzymes ligno-cellulosique

4.2.1.1 Préparation de milieu de culture

Le marc de pomme (déchet de l'industrie de jus de pomme) a été utilisé comme substrat pour la fermentation à l'état solide (SSF) pour la production des laccases en raison de sa teneur en carbone à 44,5 % (w/w) (exprimé par rapport au poids de la matière sèche) et sa teneur en azote. 40 grammes de notre substrat solide (75% p/p d'humidité et pH 4,5), dans un Erlenmeyer de 500 ml, ont été mélangés et autoclavés à 121 °C ±1 °C et à 15 psi pendant 20 minutes. Le substrat a été ensuite inoculé par les cultures en question : *Trametes versicolor*.

Un échantillon est prélevé toutes les 24h pour dresser le profil de production de laccase et de celullase.

4.2.1.2 Production des laccases

La production des laccases a été effectuée par *Trametes versicolor* (ATCC-20869). *T. versicolor* a été fraîchement pré-cultivé dans le milieu de culture liquide PDB (Potato Dextrose Broth) et incubé à 30 ± 1 °C, 150 rpm pendant 7 jours dans un incubateur agitateur. Ensuite, le champignon a été re-cultivé sur de la gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA) qui est utilisée comme inoculum et laissé incuber à 30 ± 1 °C pendant 10 jours dans l'incubateur statique (Gassara *et al.*, 2010).

La fermentation à l'état solide (SSF) a été réalisée dans le marc de pomme préalablement préparé. Le milieu a été inoculé avec une culture fraîche de PDA et incubé à 30 ± 1 °C pendant 15 jours (Gassara *et al.*, 2010)

4.2.1.3 Extraction des laccases

L'extraction des laccases a été effectuée de la façon suivante :

Un gramme est prélevé de chaque milieu de fermentation solide est mélangé avec 20 ml de la solution tampon à base de phosphate de sodium 50 mM (10/1 : v/p) à pH 6,5. Le mélange a été placé dans un incubateur agitateur à 150 rpm pendant une heure à

30 ± 1 °C. Ensuite le mélange est centrifugé à 7000 × g pendant 20 min à 4 ± 1 °C (Gassara *et al.*, 2010). Le surnageant recueilli a été ainsi analysé pour l'activité enzymatique.

4.3.1 Mesure de l'activité enzymatique

4.3.1.1 Activité enzymatique des laccases

L'activité enzymatique des laccases a été déterminée selon la méthode décrite par Gassara et al. (2010) et mesurée à l'aide du spectrophotomètre. Dans une cuvette de 1 cm, on mélange 0,5 ml de l'acide 2,2'- azino bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) à 0,5 mM avec 2,58 ml de la solution tampon citrate de phosphate à 0,1 M et pH 4.

On ajoute 0,02 ml de la solution d'enzyme au mélange et on laisse incuber pendant 10 min à 45°C .L'oxydation de l'ABTS est déterminée à une longueur d'onde de 420 nm (ε420 = 36mm / cm). (Collins & Dobson, 1997)

Une unité d'activité des laccases est définie comme la quantité d'enzymes nécessaire pour oxyder une µmole de l'ABTS par minute.

Équation 1 : L'équation de l'activité enzymatique en unité de laccase par gramme est la suivante :

$$E = \frac{P * volume\ de\ la\ cuvette}{\varepsilon * longueur\ du\ trajet * volume\ de\ l'enzyme} * volume\ de\ tampon\ par\ 1g\ de\ substrat$$

Où **P** est la pente de la courbe standard de la laccase pure et **ε** est le coefficient d'extinction.

4.4 Fonctionnalisation du Microbiocharbon

Un traitement acide a été utilisé pour l'activation de microbiocharbon.

Un échantillon 200 mg de microbiocharbon a été dispersé dans 25 mL d'une solution à 5 M de mélange H_2SO_4 / HNO_3 (1:1 v/v) et incubé à température ambiante à une agitation de 200 tr / min pendant 48 h. Par la suite, la suspension de microbiocharbon a été lavée à plusieurs reprises avec de l'eau milli-Q pour éliminer les acides et atteindre un pH de 7. Le microbiocharbon traité a été ensuite lyophilisé et conservé à température ambiante sous la forme d'une poudre sèche. Du microbiocharbon sans aucun traitement a été considéré comme contrôle. (Naghdi *et al.*, 2017)

4.4.1 Titrage

L'échantillon de microbiocharbon traité à l'acide a été examiné par titrage pour mesurer la quantité de groupes carboxyliques formés (COOH) sur sa surface.

4.4.2 Immobilisation de la laccase

Dans des flacons de 50 ml, 100 mg de microbiocharbon traité avec une combinaison d'acide H_2SO_4/HNO_3 ont été suspendus dans 10 ml de tampon citrate-phosphate (pH 3 .5) le mélange est par la suite incubé à une température de 25 °C et sous une agitation de 200 rpm dans un agitateur rotatif pendant 24h. L'immobilisation de la laccase a été également réalisée sur du microbiocharbon sans traitement acide (contrôle). Le microbiocharbon a été centrifugé, décanté et l'activité de la laccase dans le surnageant et également dans le complexe laccase-biocharbon a été déterminée.

4.4.3 Chromatographie en phase gazeuse :

À la fin de l'étude de dégradation des BTEX (30 et 20 j), les échantillons ont été prélevés et dilués dans de l'eau distillée avant d'être injectés dans la GC-MS.

Un système Shimadzu consistant en un spectromètre de masse connecté à un chromatographe en phase gazeuse GC avec un injecteur split/splitless a été utilisé pour la quantification des BTEX. Une colonne de silice fondue, DB-5 MS (5% de phényl-95%

de diméthylpolysiloxane; 30 mx 0,25 mm DI, 0,25 µm) a été utilisée avec de l'hélium. La température de la colonne a été programmée comme suit: 40 °C pendant 1 min, augmentation à 160 °C à une vitesse de 25°C/ min , puis augmentation à 300 °C à une vitesse de 5°C/min. Les données ont été acquises et traitées par le logiciel Shimadzu Class 5000. L'effluent de la colonne GC a été transféré via une ligne de transfert maintenue à 280 °C et introduit dans une source d'ionisation par impact d'électrons à 70 eV maintenu à 280 °C.

V. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Dans ce chapitre nous présentons les résultats obtenus durant ce projet de maîtrise ;

5.1 Production des laccases

Les déchets générés par les industries agroalimentaires, sont actuellement reconnus comme une matière première pouvant avantageusement être exploitée pour la production des enzymes par fermentation à l'état solide (SSF) ce qui aura pour conséquence de réduire le coût global de la production d'enzymes (Karmakar & Ray, 2010)

.

Selon la cinétique de production des laccases durant la fermentation (Figure 4), nous avons observé que la production maximale de l'enzyme est de l'ordre de 36 ± 2 U/g $_{\text{substrat sec}}$, après 8 jours de fermentation.

La production enzymatique dans cette étude est comparable à plusieurs travaux déjà publiés en utilisant différents substrats, dont la prduction maximale de l'enzyme a atteint 38 U/$g_{\text{substrat sec}}$ après 13 jours de fermentation. (Chaali, 2017).

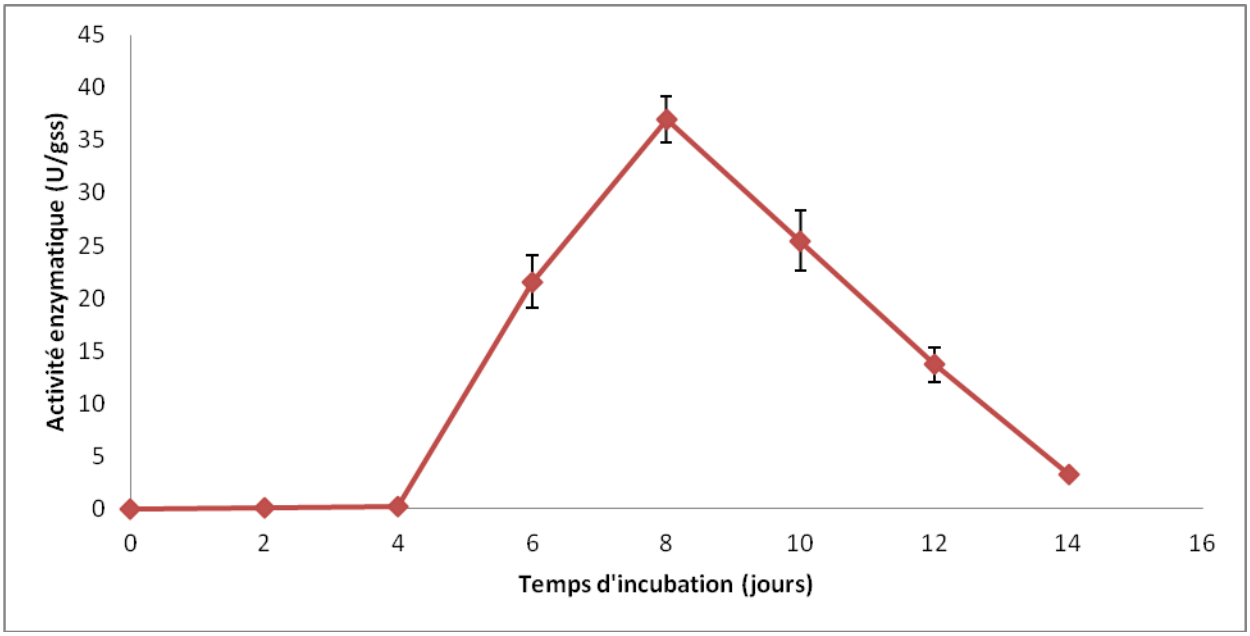

Figure 4 : Profil de l'activité enzymatique des laccases produite par fermentation solide

5.2 Test de dégradation de BTEX

Le test de dégradation a été effectué pour une période de 30 jours, avec différentes concentrations de BTEX (entre 522-1530, 976-3277 et 805-3994 ppm), et avec une activité enzymatique de 0,5 U/ml et à une température ambiante de 20°C. Par la suite, les laccases libres sont utilisées dans le processus de dégradation.

Tableau 3 : Dégradation de Btex à une concentration entre 522 et 1530 ppm et 0.5 U/ml de laccases

Temps (jours)	Composés (ppm)				
	Benzène	Toluène	Ethylbenzène	m-p-xylène	o-xylène
0	1530	620	522	733	582
0.5	1517	571	498	697	517
1	1295	476	401	579	406
2	1289	466	376	548	385
3	1231	439	293	535	364
6	901	336	230	432	268
9	789	297	209	395	231
12	682	177	96	157	134
15	609	161	87	139	121
20	581	150	80	129	108
25	506	135	75	116	96
30	473	124	67	105	87
% de dégradation	**69%**	**80%**	**87%**	**85%**	**84%**

D'après les valeurs présentées dans le tableau 3, nous constatons qu'à partir du 12ième jour la dégradation deveint de plus importante

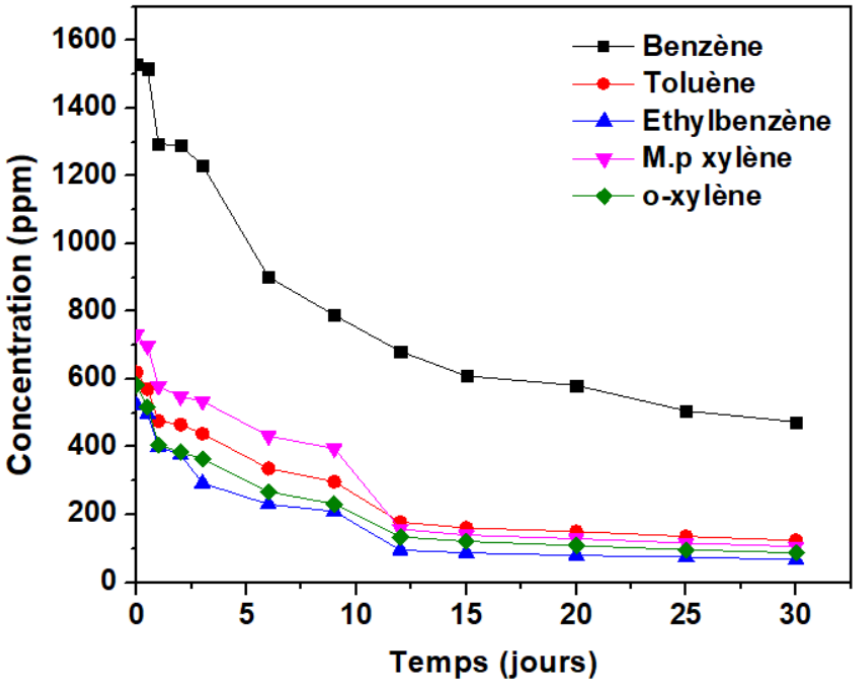

Figure 5 : Suivi de la dégradation du BTEX (initialement entre 522 et 1530 ppm) par les laccases

La figure 5 présente la dégradation des différents composés durant une période de 30 jours et avec une concentration de laccase de 0.5 U/ml. La dégradation est beaucoup plus accentuée au bout de 12 jours de temps de traitement, on peut expliquer les courbes par 3 phases : la première phase qui est de 0 à 2 jours c'est la phase d'adaptation des enzymes avec le nouveau milieu ;

La deuxième phase qui est du 2ième au 12ième jours c'est la période d'activation des enzymes dans le milieu d'où on observe une dégradation accentuée ;

Finalement la troisième phase, qui est l'étape de la stabilisation et l'atteinte de la dégradation maximale des BTEX, vu que les enzymes qu'on avait, on put dégrader presque la totalité des composés.

Tableau 4 : Dégradation de Btex à une concentration entre 976 et 3277 ppm

Temps (jours)	Composés (ppm)				
	Benzène	**Toluène**	**Ethylbenzène**	**m-p-xylène**	**o-xylène**
0	3277	1117	976	1283	987
0.5	2916	1054.5	954.5	1257	985
1	2864	967	610	1108	883
2	2531	839	516	853	742
3	2370	765	470	541	627
6	1445	381	287	355	368
9	1133	366	198	305	297
12	1105	297	166	280	247
15	946	283	161	261	222
20	830	217	152	194	161
25	401	199	116	94	150
30	266	86	55	82	66
% de dégradation	**91%**	**92%**	**94%**	**93%**	**93%**

D'après les valeurs présentées dans le tableau 4, nous constatons qu'à partir du 20ième jour la dégradation deveint de plus importante

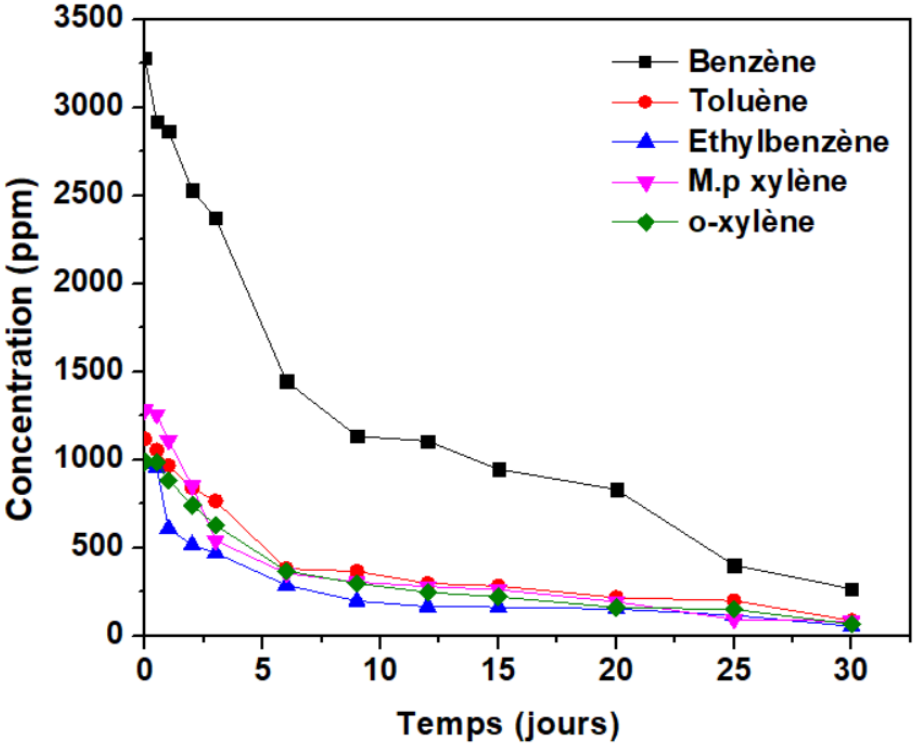

Figure 6 : Suivi de la dégradation du BTEX (initialement entre 976 et 3277ppm) par les laccases

La figure 6 démontre la dégradation des différents composés durant une période de 30 jours avec une concentration de laccase de 0.5 U/ml, nous constations que la dégradation commence à devenir importante à partir de la 20ième journée.

Tableau 5 : Dégradation de Btex à une concentration entre 805 et 3919 ppm

Temps (jours)	Composés (ppm)				
	Benzène	Toluène	Ethylbenzène	m-pxylène	o-xylène
0	3919	1232	805	1314	1083
0.5	3354	1205	734	1090	1074
1	3212	1023	613	1074	863
2	3159	1020	580	1072	848
3	2687	833	472	865	640
6	2094	532	270	472	439
9	1754	433	228	427	349
12	1582	389	226	391	293
15	1326	341	191	347	251
20	1161	332	163	289	246
25	1006	284	141	239	212
30	794	206	114	190	165
% de dégradation	**79%**	**83%**	**85%**	**85%**	**84%**

D'après les valeurs présentées dans le tableau 6, nous constatons qu'à partir du 20ième jour la dégradation deveint de plus importante

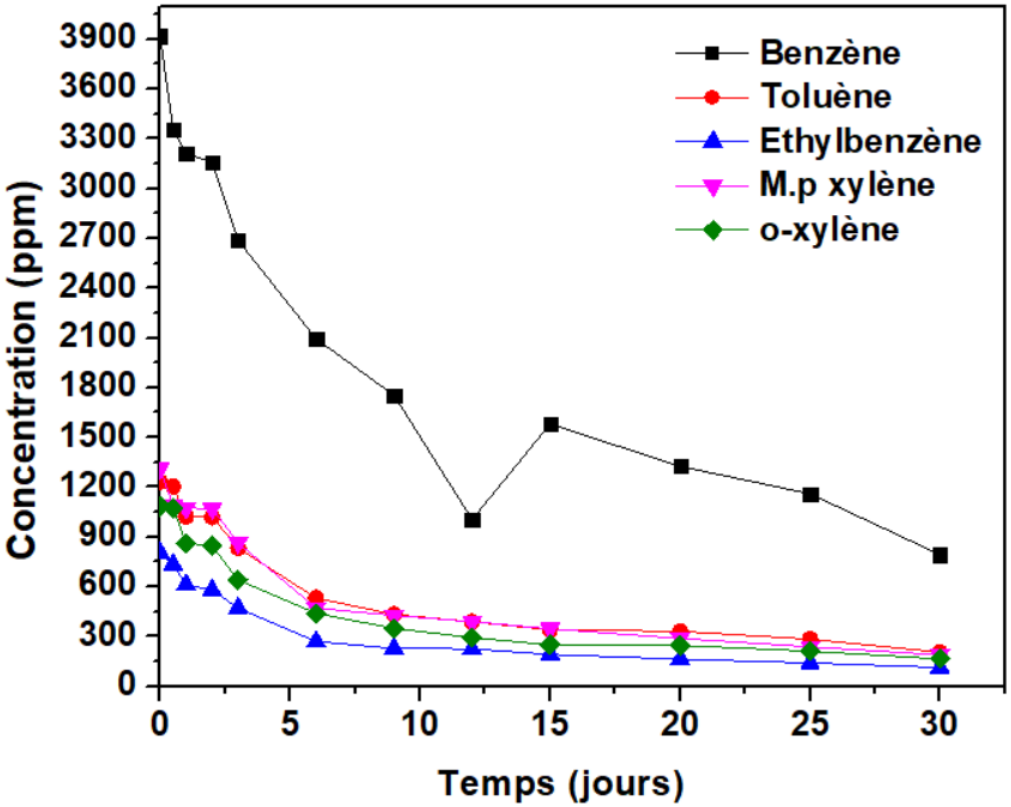

Figure 7 : Suivi de la dégradation du BTEX (initialement entre 805 et 3919 ppm) par les laccases

Pour conclure, le tableau ci-dessous présente les pourcentages de dégradation de chaque composé durant leurs décompositions avec la même concentration d'enzyme qui est de 0.5 U/ml et à une température ambiante, cette température a été fixée en se

basant sur des travaux préalables dans notre équipe de recherche qui ont démontré qu'à cette température, il y a une meilleure stabilité de l'activité enzymatique de la laccase (Naghdi, M., et al., 2017).

Tableau 6 : Pourcentages de dégradations de chacun décomposés BTEX

Concentration initiale de BTEX	Pourcentage de dégradation des BTEX				
	Benzène	Toluène	Ethylbenzène	m-p-xylène	o-xylène
522-1530 ppm	69%	80%	87%	85%	84%
976-3277 ppm	91%	92%	94%	93%	93%
805-3919 ppm	79%	83%	85%	85%	84%

5.3 Dégradation des BTEX avec les laccases immobilisées de sur du microbiocharbon traités à l'acide :

5.3.1 Caractérisation et fonctionalisation du microbiocharbon :

La figure 8 montre les spectres FTIR du microbiocharbon traité par la combinaison d'acide de H_2SO_4 / HNO_3. Le spectre infrarouge mesure la quantité de rayonnement absorbée par les atomes à différentes fréquences. Lorsqu'un composé est exposé à un rayonnement infrarouge, la différence de charge entre les atomes de carbone provoque la formation d'un dipôle électrique qui génère des signaux détectables (Osorio *et al.*, 2008). Le microbiocharbon sans traitement acide a montré des signaux infrarouges faibles en raison de la faible différence de charge entre ses atomes de carbone, ce qui a entraîné un dipôle électrique très faible.

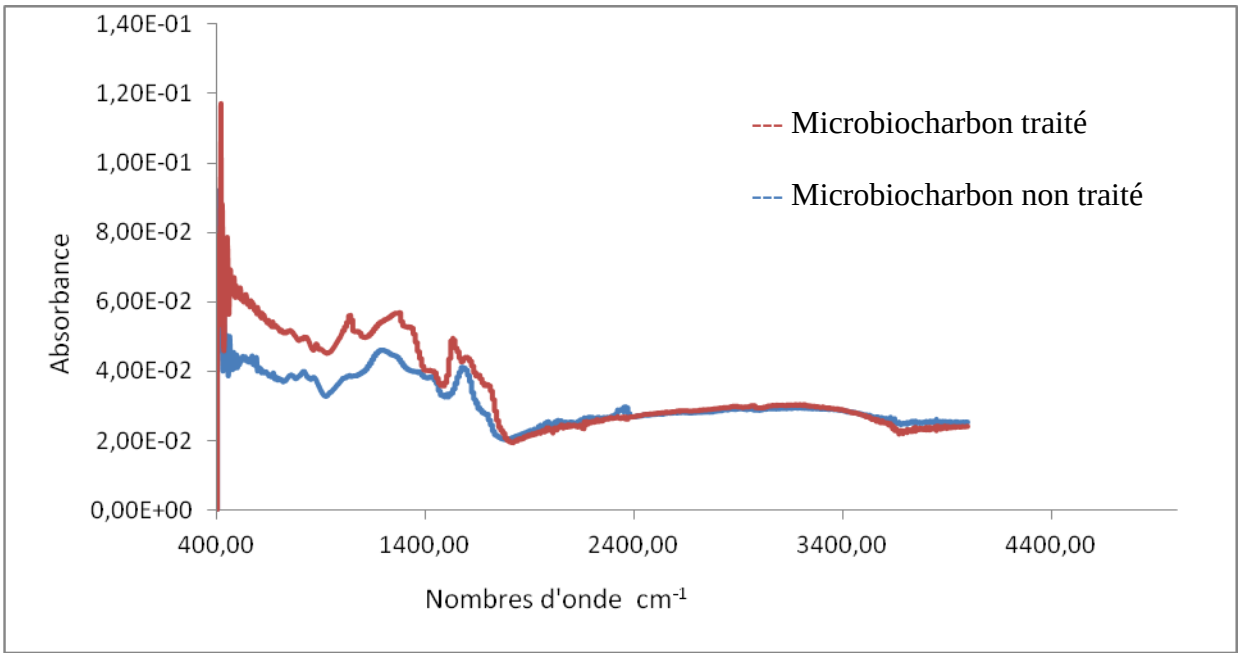

Figure 8 : spectre de FT-IR du microbicharbon traité avec H_2SO_4/HNO_3

Comme observé sur la figure 8, la large bande à environ 3 400 cm-1 dans les deux spectres est un pic caractéristique d'étirement O \\ H qui peut être attribué aux groupes carboxyliques ou alcooliques (O-C \ OH et C \ OH) (Atieh, 2011) Le pic fort aux alentours de 1280 cm-1 qui correspond l'étirement C \\ O des acides carboxyliques, confirme la formation de groupes carboxyliques à la suite d'une oxydation de surface (Osorio *et al.*, 2008)

De plus, deux bandes observées à 1330-1380 cm-1 et à 1520-1550 cm-1 peuvent être attribuées au groupe C \\ NO_2 qui a été formé en tant que résultat de la nitration des noyaux aromatiques (Olah *et al.*, 1962)

5.3.2 Dégradation des BTEX avec de la laccase immobilisée sur du microbiocharbon traité avec de l'acide :

Le tableau 7 ci-dessous nous montre la dégradation des BTEX avec des laccases immobilisées sur du microbiocharbon activé à l'acide pendant une période de 20 jours, une concentration initiale de laccases et une concentration de BTEX entre 331 et 3994 ppm ont était utilisés tout au long de cette expérience.

Tableau 7 : Dégradation de BTEX d'une concentration initiale entre331 et 3994 ppm avec l'application de laccase immobilisé sur du biocharbon activé par une combinaison de H_2SO_4/HNO_3

Temps	Composés (ppm)				
	Benzène	Toluène	Ethylbenzène	m-p-xylène	o-xylène
0 jour	3994	948	331	603	503
2 jours	3271	766	303	584	426
4 jours	2503	335	264	471	404
5 jours	1665	321	215	434	322
6 jours	724	218	205	357	265
7 jours	579	215	173	243	192
8 jours	529	208	130	219	180
9 jours	488	174	112	201	142
10 jours	411	164	107	192	129
11 jours	392	156	103	175	126
12 jours	125	125	98	161	113
13 jours	95	83	92	156	103
15 jours	93	78	89	152	102
17 jours	70	62	88	148	97
18 jours	30	58	69	107	55

19 jours	29	27	50	91	38
20jours	26	25	38	61	36
% de dégradation	**99%**	**97%**	**88%**	**89%**	**92%**

D'après le tableau 7 et la figure 9, on peut visualiser un pourcentage de dégradation très important pour les différents composés,

Pour le Benzène, on peut voir qu'à partir du 6e jour, on observe le début d'une dégradation significative, qui s'accentue vers la fin (20 jours), le pourcentage final de dégradation observé est ainsi autour de 99%

Pour le Toluène , la dégradation a été significativement observée à partir du 12e jour, et finalement presque total vers le 20e jour avec un pourcentage de dégradation de 97%

Pour l'o-xylène, on constate que la dégradation commence à devenir importante à partir du 15e jour et devient presque totale au 20e jour avec un pourcentage de dégradation de 92%

Pour finir, par rapport à l'éthylbenzène et le p-xylène, leurs pourcentages dégradation est relativement plus faibles que le cas des composés précédents, toute fois les valeurs dépassent les 85%.

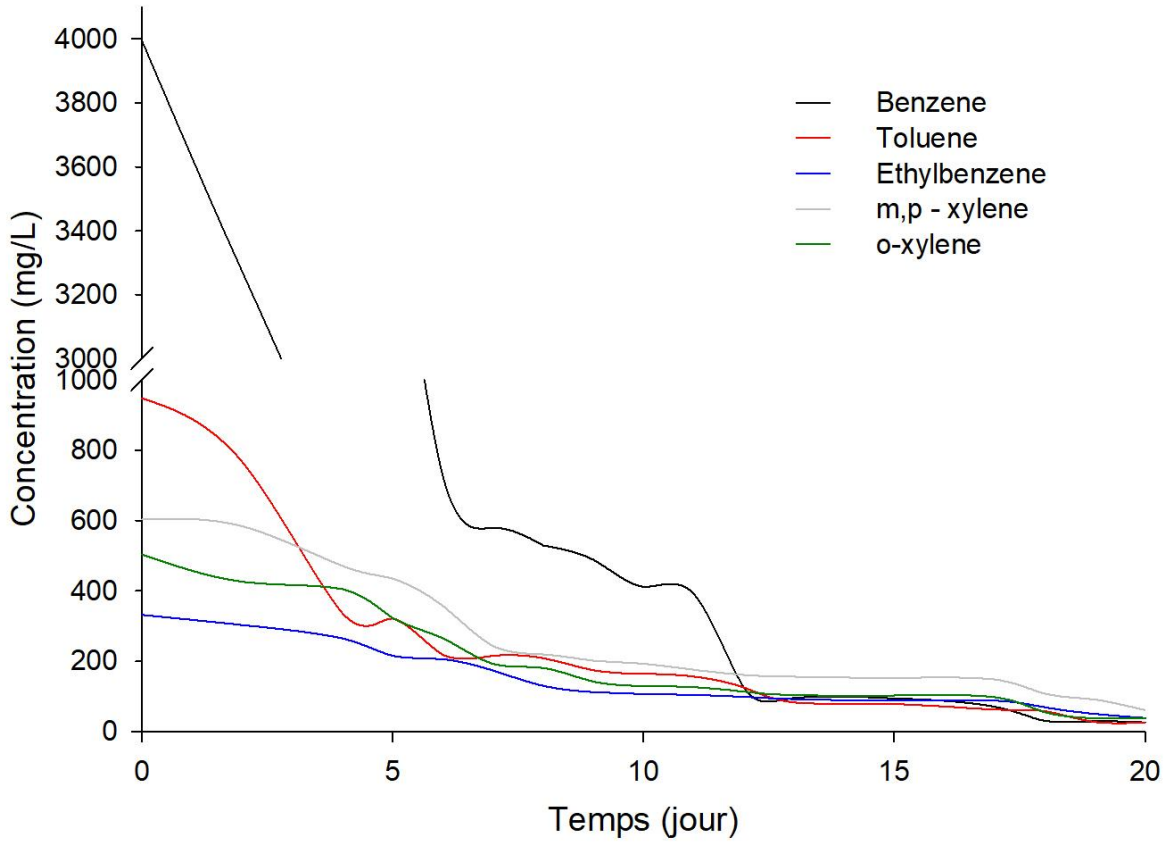

Figure 9 : Dégradation des BTEX dans les eaux de lavages avec une concentration initiale entre 331 et 3994 ppm à l'aide des laccases immobilisées sur du microbiocharbon activé

La figure 9 nous démontre la dégradation des BTEX dans les eaux de lavages pendant une durée de 20 jours, la courbe de benzène est nécessaire à ce graphe puisqu'elle permet de mieux visualiser les différentes courbes et ne pas avoir un certain encombrement durant la dégradation

VI. CONCLUSION

La présente étude nous a permis d'évaluer et de comparer le potentiel des laccases libres et immobilisées (sur du microbiocharbon activé par traitement acide) à dégrader les composés de BTEX. Nous avons observé que les laccases peuvent être produites en utilisant le marc de pomme comme substrat, ce qui a permis d'atteindre des concentrations en laccase qui dépassent les 35U/g dans la 8e journée de fermentation.

Nous avons utilisé la laccase libre produite par une fermentation à l'état solide qui a été préalablement immobilisé sur du microbiocharbon activé avec une concentration itiniale de laccase et une différente concentration de BTEX.

La présente étude nous a permis d'atteindre un pourcentage très significatif de dégradation des BTEX qui a atteint les 99% pour les laccases immobilisées et 91% pour les laccases libres, pendant une durée entre 20 et 30 jours respectivement.

Cette méthode biotechnologique nous a démontré plusieurs avantages environnementaux contrairement aux méthodes conventionnelles, puisqu'elle a une meilleure éco-efficience ce qui veut dire qu'elle consomme moins d'énergie puisque le processus est moins long, mais aussi elle réutilise les déchets industriels comme matière première de production des laccases

Il serait recommandé dans les études à venir de planifier des essais à grande échelle pour évaluer l'efficacité de dégradation avec des expériences in situ.

VII. RÉFÉRENCES

Atieh MA (2011) Removal of chromium (VI) from polluted water using carbon nanotubes supported with activated carbon. *Procedia Environmental Sciences* 4:281-293.

Bamforth SM & Singleton I (2005) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 80(7):723-736.

Banci L, Ciofi-Baffoni S & Tien M (1999) Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. *Biochemistry* 38(10):3205-3210.

Bourbonnais R, Paice M, Freiermuth B, Bodie E & Borneman S (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and environmental microbiology* 63(12):4627-4632.

Bourbonnais R & Paice MG (1990) Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS letters* 267(1):99-102.

Brandt AR, Heath G, Kort E, O'sullivan F, Pétron G, Jordaan S, Tans P, Wilcox J, Gopstein A & Arent D (2014) Methane leaks from North American natural gas systems. *Science* 343(6172):733-735.

Ceylan D, Dogu S, Karacik B, Yakan SD, Okay OS & Okay O (2009) Evaluation of butyl rubber as sorbent material for the removal of oil and polycyclic aromatic hydrocarbons from seawater. *Environmental science & technology* 43(10):3846-3852.

Chaali M (2017) *Développement d'une nouvelle alternative aux antibiotiques utilisés dans l'élevage de volaille à base d'une combinaison entre: laccase-protéines de levure-acide citrique*. (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).

Collins PJ & Dobson A (1997) Regulation of laccase gene transcription in trametes versicolor. *Applied and Environmental Microbiology* 63(9):3444-3450.

Couto SR & Sanromán MA (2005) Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22(3):211-219.

DECLERCK H (2013) *Création d'un biocentre et d'une plateforme de transit pour la gestion des terres polluées*. (Insa de Strasbourg).

Durán N, Rosa MA, D'Annibale A & Gianfreda L (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and microbial technology* 31(7):907-931.

Fang L-X, Huang K-J & Liu Y (2015) Novel electrochemical dual-aptamer-based sandwich biosensor using molybdenum disulfide/carbon aerogel composites and Au nanoparticles for signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics* 71:171-178.

Ferraroni M, Matera I, Chernykh A, Kolomytseva M, Golovleva LA, Scozzafava A & Briganti F (2012) Reaction intermediates and redox state changes in a blue

laccase from Steccherinum ochraceum observed by crystallographic high/low X-ray dose experiments. *Journal of inorganic biochemistry* 111:203-209.

Flotron V, Delteil C, Padellec Y & Camel V (2005) Removal of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons from soil, sludge and sediment samples using the Fenton's reagent process. *Chemosphere* 59(10):1427-1437.

Gassara F, Brar SK, Tyagi R, Verma M & Surampalli R (2010) Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by Phanerochaete chrysosporium. *Biochemical Engineering Journal* 49(3):388-394.

Gayosso-Canales M, Rodríguez-Vázquez R, Esparza-García F & Bermúdez-Cruz R (2012) PCBs stimulate laccase production and activity in Pleurotus ostreatus thus promoting their removal. *Folia microbiologica* 57(2):149-158.

Herbert V (2010) La gestion terrestre d'une pollution d'origine maritime à l'échelle locale: quelle intégration? *[VertigO] La revue électronique en sciences de l'environnement* (8).

Hubbe MA, Rojas OJ, Fingas M & Gupta BS (2013) Cellulosic substrates for removal of pollutants from aqueous systems: A Review. 3. Spilled oil and emulsified organic liquids. *BioResources* 8(2):3038-3097.

Karmakar M & Ray R (2010) Extra cellular endoglucanase production by Rhizopus oryzae in solid and liquid state fermentation of agro wastes. *Asian J Biotechnol* 2(1):27-36.

Kudanga T, Nyanhongo GS, Guebitz GM & Burton S (2011) Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme and microbial technology* 48(3):195-208.

Laadila MA (2016) *Développement des bio-composites à partir des fibres cellulosiques et de l'acide poly-lactique (PLA) recyclé*. (Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).

Le Berre I, Gouriou V, Nédelec M & Albrecht M (2004) SIG et lutte antipollution marine par les hydrocarbures. (Ed. Hermès).

Lorenzo M, Moldes D & Sanromán MÁ (2006) Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by Trametes versicolor and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere* 63(6):912-917.

Martin S & Dalian C (2018) Annexe J2: Principaux déversements de pétrole brut dans le monde mettant en cause un pipeline, un réservoir de stockage ou un puits continental. *GUIDE POUR LA GESTION DE LA SANTÉ PUBLIQUE ET ENVIRONNEMENTALE EN CAS D'INCIDENT METTANT EN CAUSE DU PÉTROLE BRUT* :148.

MESSERSCHMIDT A & HUBER R (1990) The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin modelling and structural relationships. *European journal of Biochemistry* 187(2):341-352.

Naghdi M, Taheran M, Brar SK, Kermanshahi-pour A, Verma M & Surampalli RY (2017) Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral

acids treatment for removal of carbamazepine. *Science of The Total Environment* 584:393-401.

Olah GA, Kuhn SJ & Flood SH (1962) Aromatic Substitution. X. 1 The AlCl3⊙ CH3NO2-Catalyzed Benzylation of Benzene and n-Alkylbenzenes with Benzyl Chloride in Nitromethane Solution. *Journal of the American Chemical Society* 84(9):1688-1695.

Osorio A, Silveira I, Bueno V & Bergmann C (2008) H2SO4/HNO3/HCl—Functionalization and its effect on dispersion of carbon nanotubes in aqueous media. *Applied Surface Science* 255(5):2485-2489.

Pandey A (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13(2-3):81-84.

Pandey A, Soccol CR & Mitchell D (2000) New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process biochemistry* 35(10):1153-1169.

Pereira SC, Maehara L, Machado CMM & Farinas CS (2015) 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnology for biofuels* 8(1):44.

Piontek K, Antorini M & Choinowski T (2002) Crystal structure of a laccase from the fungusTrametes versicolor at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 277(40):37663-37669.

Riva S (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology* 24(5):219-226.

Rivas FJ (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: a short review of chemical oxidation based treatments. *Journal of Hazardous Materials* 138(2):234-251.

Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, RodrÍguez-Vázquez R & Delgado-Boada JM (2013) Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews* 27(3-4):67-82.

Savant D, Abdul-Rahman R & Ranade D (2006) Anaerobic degradation of adsorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology* 97(9):1092-1104.

Shekher R, Sehgal S, Kamthania M & Kumar A (2011) Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme research* 2011.

Singhania RR, Patel AK, Soccol CR & Pandey A (2009) Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44(1):13-18.

Solomon EI, Augustine AJ & Yoon J (2008) O 2 Reduction to H2O by the multicopper oxidases. *Dalton Transactions* (30):3921-3932.

Torres E, Bustos-Jaimes I & Le Borgne S (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46(1):1-15.

Viglianti C, Hanna K, De Brauer C & Germain P (2006) Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged-contaminated soil using cyclodextrins: experimental study. *Environmental Pollution* 140(3):427-435.