

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE

FACULTE DE GENIE MECANIQUE ET DE GENIE DES PROCEDES



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

En : GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Génie de l'environnement

Par : HEMIDOUCHE Sabra

Thème

Etude de la dégradation du phénol en milieu aqueux par une
bactérie acclimatée appartenant au genre *Pseudomonas*

Soutenue publiquement le 26/05/2009, devant le jury composé de :

M ^{me} R. MAACHI	Professeur, USTHB	Présidente
M ^{me} Z. SADAoui	Maître de Conférences, USTHB	Directrice de thèse
M ^{me} L. TOUMI	Maître de Conférences, USTHB	Examinatrice
M ^{me} Z. SALEM	Maître de Conférence, USTHB	Examinatrice
M ^r L. KACI	Maître de Conférences, USTHB	Examineur

Dédicace

Avec toute l'ardeur de mes sentiments je dédie ce mémoire

A toi mon tendre papa

*A toi celle qui m'a procuré l'affection, la tendresse, l'amour,
la grandeur d'âme et d'esprit, celle qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*Celle qui a laisser une empreinte ineffaçable dans ma vie
et à qui je n'aurais jamais exprimer mon amour et ma gratitude.
A toi maman, la ou tu es je te dédie ce travail et je prie le bon dieu
de t'accueillir dans son vaste paradis.*

A mes très chères sœurs

A mes très chers frères

A mes amies

Remerciements

*Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire de Génie de la Réaction, sous la direction de Madame **Z. SADAOUI**. Je tiens à la remercier d'avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire de recherche et surtout pour la confiance qu'elle m'a accordée tout au long du déroulement de mon travail, pour tout l'aide et le soutien de tous les instants qu'elle m'a apportés, pour son encadrement scientifique très formateur et de qualité. Merci pour votre gentillesse. Merci pour tout.*

*Je remercie l'ensemble du jury, M^{me} le professeur **MAACHI**, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury, ainsi que M^{me} **TOUMI**, M^{me} **SALEM** et M^r **KACI** pour avoir bien voulu faire partie de ce jury.*

*J'adresse mes vifs remerciements à M^r **KACI** pour son aide et ses conseils constructifs. Malgré ses énormes occupations, il m'a consacré énormément de temps pour me transmettre une partie de son savoir de biologiste. Sans pour autant oublier cette occasion pour lui adresser mes remerciements sur sa grande compréhension, respect et humanité.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à M^{me} **MOKADDEM** pour ses encouragements, ses conseils et astuces qui ont permis de faciliter le travail. Qu'elle puisse trouver ici l'expression de ma reconnaissance.*

Un grand merci à toutes les personnes qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail trouvent ici le témoignage de mon estime.

Résumé :

L'objectif de ce travail de recherche est d'étudier la cinétique de biodégradation du phénol contenu dans une solution aqueuse, dans des cultures en batch, en utilisant une souche bactérienne appartenant au genre *Pseudomonas*.

Avant d'aborder les essais de biodégradation, nous avons jugé nécessaire d'effectuer une procédure d'acclimatation de la souche bactérienne. Celle-ci est réalisée aux concentrations croissantes en phénol (10 - 200mg/L).

L'étude d'optimisation des paramètres opératoires a été effectuée pour une concentration en phénol de 50mg/L, la température et la vitesse d'agitation ont été maintenues constantes respectivement à 30°C et 80 tr/min. Les résultats obtenus ont révélé un pH optimal de $7,5 \pm 0,2$ et une source d'azote sous forme de NH_4Cl à une concentration en azote de 0,35g/L.

Dans ces conditions optimales, une étude cinétique a été entreprise pour différentes concentrations initiales en phénol : 50 à 400mg/L. Les résultats expérimentaux obtenus font apparaître d'excellents rendements d'élimination du phénol qui ont atteint 100% selon la concentration initiale du substrat.

Par ailleurs, il a été montré que le phénol présente un comportement inhibiteur pour les concentrations supérieures à 150mg/L. L'équation de Haldane a été adoptée pour décrire la relation entre la vitesse spécifique de croissance μ et la concentration initiale en substrat S_0 . Les constantes cinétiques déterminées à partir du modèle sont $\mu_{\max} = 0.114 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 288.97 \text{ mg.L}^{-1}$, $K_i = 97.88 \text{ mg.L}^{-1}$. Le modèle de Haldane décrit d'une manière plus ou moins satisfaisante les données expérimentales dans les intervalles de concentrations en phénol explorés. Cependant, on a observé un écart entre les valeurs mesurées et estimées par le modèle au voisinage de la concentration en phénol de 150mg/L. Cette inadéquation du modèle peut être attribuée, d'après plusieurs chercheurs, à l'effet d'inhibition par les métabolites intermédiaires de la dégradation de phénol. Les résultats de la simulation des profils des concentrations du phénol au cours de la biodégradation ont montré que le modèle choisi décrit convenablement le phénomène de biodégradation du phénol par la souche bactérienne acclimatée pour des concentrations initiales inférieures à 300mg/L. Par conséquent, le modèle pourra être exploité pour la prévision des données de biodégradation, l'optimisation et pour la conception d'un procédé de biotraitement.

Mots clés : bactérie Acclimatée; pseudomonas; biodégradation; phénol; modélisation.

Abstrat :

The objective of this research is to study the kinetics of phenol biodegradation contained in an aqueous solution, in batch cultures, by using a bacterial strain belonging to the *Pseudomonas* species.

The kinetics of phenol biodegradation by *Pseudomonas sp* were investigated over a range of initial phenol concentrations (50–400mg.L⁻¹). The efficiency of phenol degradation was optimized by changing various processing parameters, such as the source of nitrogen, pH and acclimatization strategy using batch experiments, a stirring velocity and temperature were fixed respectively to 80 tr/min and 30°C. The bacteria was acclimated by increasing the phenol concentration from 10 to 200mg.L⁻¹. The results obtained revealed an optimal pH of 7.5 ± 0.2 and NH_4Cl as a source of nitrogen at concentration of 0.35g/L. Under these optimal

conditions, a kinetic study was carried out. The experimental results reveal excellent rate of phenol biodegradation which reached 100% according to the initial concentration of the substrate.

In addition, the phenol was observed to be the inhibitory compound for concentrations up to 150mg.L^{-1} . The Haldane equation was adopted in order to describe the relation between the specific growth rates (μ) and the initial concentration of phenol (S_0). Kinetic constants of the Haldane equation were $\mu_{\max} = 0.114 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 288.97 \text{ mg.L}^{-1}$, $K_i = 97.88\text{mg.L}^{-1}$. In simulation studies including the Haldane model, an evident disagreement was observed between measured and estimated specific growth rates when an S_0 of 150 mgL^{-1} was applied. The inadequacy of this model was attributed to the inhibition of metabolic intermediates of phenol degradation.

The results of the simulation profiles of the phenol concentrations during the biodegradation showed that the selected model suitably describes the phenomenon of phenol biodegradation by the acclimatized bacteria strain for initial concentrations lower than 300mg/L . This model could be exploited for the estimates of the biodegradation data, optimization and for the design of biotreatment process.

Key words: Acclimatized bacteria; pseudomonas; biodegradation; phenol; modelling.

Nomenclature

Caractères romains

T	: Température	(°C)
DO	: Densité optique	-
C _T	: Concentration du phénol dans le témoin.	(mg/L)
C _S	: Concentration du phénol dans l'échantillon.	(mg/L)
C ₀	: Concentration initiale du phénol	(mg/L)
X	: Concentration en biomasse sèche	(mg/L)
X ₀	: Concentration initiale en biomasse sèche	(mg/L)
X _f	: Concentration finale en biomasse sèche	(mg/L)
S	: Concentration en substrat	(mg/L)
S ₀	: Concentration initiale en substrat	(mg/L)
S _f	: Concentration finale en substrat	(mg/L)
Y _{X/S}	: Rendement en biomasse (mg de biomasse produite/mg de phénol consommé)	-
t	: Temps d'incubation	(h)
t _d	: Temps de doublement	(h)
K _S	: Constante de saturation	(mg/L)
K _I	: Constante d'inhibition	(mg/L)
S*	: Concentration optimale en substrat	(mg/L)
K _S /K _I	: Facteur d'inhibition	-
MES	: Matière en suspension	(mg/L)
DCO	: Demande chimique en oxygène	(mg/L)
COT	: Carbone organique total	(mg/L)

Caractères grecs

μ	: Vitesse spécifique de croissance	(h ⁻¹)
μ^*	: Vitesse spécifique optimale de croissance	(h ⁻¹)
$\mu_{\max}$	: Vitesse spécifique maximale de croissance	(h ⁻¹)

Abréviation

BN	: Bouillon nutritif
GN	: Gélose nutritive
MC	: Milieu de culture
MMB	: Milieu minéral de base
R ²	: Coefficient de corrélation
rpm	: Nombre de tour par minute

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Propriétés physico-chimiques du phénol.....	5
Tableau 2 :	Composition des eaux résiduaires des raffineries de pétrole.....	6
Tableau 3 :	Composition des eaux résiduaires des usines pétrochimiques.....	7
Tableau 4 :	Micro-organismes dans la biodégradation des composés phénoliques.....	23
Tableau 5 :	Résultats des tests morphologiques et biochimiques des <i>Pseudomonas sp</i>	25
Tableau 6 :	Croissance bactérienne durant la phase d'acclimatation.....	29
Tableau 7 :	Temps de doublement en fonction de la concentration initiale en phénol...	48
Tableau 8 :	Modèles d'inhibition du substrat.....	53
Tableau 9 :	Comparaison des paramètres cinétiques de croissance déterminés par plusieurs chercheurs.....	57

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de la molécule de phénol.....	4
Figure 2 : Exemples de composés dont la dégradation mène au phénol.....	5
Figure 3 : Courbe de croissance bactérienne.....	14
Figure 4 : Métabolites et enzymes des deux chemins oxydatifs « meta » et « ortho » pour la dégradation du phénol.....	16
Figure 5 : Les deux modes de clivage du noyau aromatique par les enzymes dioxygénases..	17
Figure 6 : Dégradation anaérobie du phénol par voie métabolique réductrice proposée par Evans (1977).....	18
Figure 7 : Dégradation anaérobie du phénol par voie métabolique impliquant la carboxylation.....	19
Figure 8 : Protocole expérimental de l'acclimatation des <i>Pseudomonas sp.</i> au phénol.....	28
Figure 9 : Souche <i>Pseudomonas sp.</i> acclimatée.....	29
Figure 10: Pourcentage de biodégradation du phénol durant la phase d'acclimation.....	32
Figure 11: Effet du pH sur la croissance du <i>Pseudomonas sp.</i>	34
Figure 12: Effet du pH sur la biodégradation du Phénol.....	34
Figure 13: Effet de la nature de la source d'azote sur la croissance du <i>Pseudomonas sp.</i>	35
Figure 14: Effet de la nature de la source d'azote sur la biodégradation du Phénol.....	36
Figure 15: Effet de la concentration d'azote sur la croissance du <i>Pseudomonas sp.</i>	37
Figure 17: Effet de la concentration d'azote sur la biodégradation du Phénol.....	37
Figure 17: Schéma du dispositif expérimental.....	39
Figure 18: Cinétique de croissance du <i>Pseudomonas sp.</i> et de biodégradation du Phénol à 50 mg/L du phénol.....	40
Figure 19: Cinétique de croissance du <i>Pseudomonas sp.</i> et de biodégradation du Phénol à 75 mg/L du phénol.....	40
Figure 20: Cinétique de croissance du <i>Pseudomonas sp.</i> et de biodégradation du Phénol à 100 mg/L du phénol.....	41
Figure 21: Cinétique de croissance du <i>Pseudomonas sp.</i> et de biodégradation du Phénol à 150 mg/L du phénol.....	41
Figure 22: Cinétique de croissance du <i>Pseudomonas sp.</i> et de biodégradation du Phénol à 200 mg/L du phénol.....	42

Figure 23: Cinétique de croissance du <i>Pseudomonas sp.</i> et de biodégradation du Phénol à 300 mg/L du phénol.....	42
Figure 24: Cinétique de croissance du <i>Pseudomonas sp.</i> et de biodégradation du Phénol à 400 mg/L du phénol.....	43
Figure 25: Cinétique de croissance du <i>Pseudomonas sp.</i>	44
Figure 26: Cinétique de biodégradation du Phénol par la souche <i>Pseudomonas sp.</i>	44
Figure 27: Détermination de la vitesse spécifique de croissance μ	46
Figure 28: Influence de la concentration du phénol sur la vitesse spécifique de croissance..	47
Figure 29: Influence de la concentration du phénol sur le temps de doublement d'une population bactérienne et la vitesse spécifique de croissance.....	48
Figure 30: Evolution de la quantité de biomasse produite en fonction de la quantité de phénol consommé.....	49
Figure 31: Variation de la vitesse initiale de biodégradation du phénol en fonction de la concentration initiale.....	50
Figure 32: Linéarisation de l'équation de Haldane.....	54
Figure 33: Evolution de la vitesse spécifique de croissance de la souche <i>Pseudomonas sp</i> avec la concentration initiale du phénol.....	58
Figure 34: Profil de concentrations du phénol pour 50mg/L.....	61
Figure 35: Profil de concentrations du phénol pour 75mg/L.....	61
Figure 36: Profil de concentrations du phénol pour 100mg/L.....	62
Figure 37: Profil de concentrations du phénol pour 150mg/L.....	62
Figure 38: Profil de concentrations du phénol pour 200mg/L.....	63
Figure 39: Profil de concentrations du phénol pour 300mg/L.....	63
Figure 40: Profil de concentrations du phénol pour 400mg/L.....	64

Sommaire

Dédicace.....	i
Remerciements.....	ii
Résumé.....	iii
Nomenclature.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Listes des figures.....	viii
Introduction Générale.....	1

Partie 1. Etude Bibliographique

I. Pollution des eaux par le Phénol.....	4
I.1 Introduction.....	4
I.2 Généralité sur le phénol.....	4
I.3 Principe de production.....	6
I.4 Origine des rejets d'eau contenant des substances phénoliques.....	6
I.5 Impact du phénol sur la santé humaine et l'environnement.....	7
I.6 Normes de rejet du phénol.....	8
I.7 Conclusion.....	8
II. Différents procédés de traitement du phénol.....	9
II.1 Introduction.....	9
II.2 Procédés physico-chimiques.....	9
II.3 Procédés biologiques.....	10
II.3.1 Principe de l'épuration biologique.....	10
1. <i>Besoin des micro-organismes</i>	10
2. <i>Croissance Bactérienne</i>	12
2.1 <i>Facteur influencent la croissance bactérienne</i>	12
2.2 <i>Cinétique de croissance bactérienne</i>	13

II.3.2 Principaux types de dégradation.....	15
1. <i>Dégradation aérobie du phénol</i>	15
2. <i>Dégradation anaérobie du phénol</i>	17
II.4 Conclusion.....	19
III. Résultats des travaux antérieurs effectués sur la biodégradation du phénol	20

Partie 2. Etude Expérimentale

I. Introduction	24
II. Matériels et Méthodes	25
II.1 Les caractéristiques de la souche utilisée.....	25
II.2 Acclimatation de la souche bactérienne au phénol.....	26
II.2.1 Préparation d'inoculum.....	26
II.2.2 Composition du milieu MMB.....	26
II.2.3 Description du protocole expérimental.....	26
II.3 Détermination des paramètres optimaux de croissance.....	33
II.3.1 Effet du pH.....	33
II.3.2 Effet de la source d'azote.....	35
II.3.3 Effet de la concentration d'azote.....	36
II.4 Etude de la cinétique de dégradation du phénol par les bactéries acclimatées de <i>Pseudomonas sp.</i>	38
II.4.1 Milieu et conditions de culture.....	38
II.4.2 Interprétation des résultats.....	45
III. Détermination des paramètres cinétiques de croissance	45
III.1 Vitesse spécifique de croissance.....	45
III.2 Temps de doublement.....	47
III.3 Coefficient de rendement en biomasse.....	49
III.4 Vitesse de biodégradation.....	50

IV. Modèles mathématiques.....	51
1. Modèle de MONOD.....	51
2. Modèle de HALDANE.....	52
2.1 Principe et équation du modèle.....	52
2.2 Détermination des constantes du modèle de Haldane.....	53
2.3 Interprétation des résultats.....	56
2.4 Comparaison des résultats expérimentaux avec ceux du modèle.....	57
V. Validation du modèle.....	58
Conclusion générale.....	65
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction Générale

Au cours des dernières décennies, les problèmes de pollution croissante sont devenus de plus en plus aigus et ont atteint une ampleur telle que c'est tout l'équilibre de l'écosystème qui est menacé. Parmi les milieux récepteurs, l'eau est la cible de prédilection de la pollution, elle en est également le vecteur principal. Il en résulte qu'aujourd'hui, les ressources en eau potables sont devenues vulnérables et se raréfient de jour en jour.

Diverses eaux résiduaires industrielles dont les eaux phénoliques, sont directement évacuées dans les cours d'eau causant des effets irréversibles sur la qualité de l'eau. Le phénol est un produit utilisé dans la synthèse des matières plastiques, de colorants, d'insecticides. Le phénol figure néanmoins dans la catégorie des substances présentant un risque de pollution des eaux en raison de sa forte toxicité.

Chez l'être humain, une intoxication phénolique aiguë se manifeste par une vasodilatation, une dépression cardiaque, une hypothermie, un coma et un arrêt respiratoire. L'ingestion de phénol provoque une intense douleur abdominale et une sensation de brûlure dans la cavité buccale.

En réponse à ces problèmes de toxicité, il est indispensable de limiter les rejets de ce polluant dans le milieu naturel par le traitement de l'ensemble des effluents industriels afin qu'ils soient conformes aux normes en vigueur.

A cet effet, une multitude de travaux de recherches fondamentales et appliquées ont été entrepris pour aboutir à des procédés de traitement de plus en plus performants. Ces traitements peuvent être réalisés par voie biologique, chimique ou physique.

La performance des méthodes biologiques pour le traitement d'une grande variété de composés organiques et inorganiques est prouvée depuis déjà plusieurs années. Leur développement et leur utilisation à l'échelle industrielle croît de façon exponentielle [1].

Comparées aux technologies physico-chimiques, où le contaminant est simplement transféré d'une phase à l'autre, les technologies de biotraitement présentent la possibilité de dégrader complètement les contaminants en produits inoffensifs ou moins polluants.

Bien qu'ils soient un peu lents, les procédés de traitement par voie biologique sont moins coûteux relativement aux méthodes physico-chimiques [2].

Actuellement, pour pallier à cette lenteur de la digestion bactérienne, les chercheurs en biotechnologie tentent d'intervenir dans la modification des gènes des bactéries pour les rendre plus gourmandes [3].

Puisque les méthodes biologiques utilisent les microorganismes qui dégradent principalement de façon aérobie les composées organiques en dioxydes de carbone et en eau, il fallait déterminer quels microorganismes étaient en mesure d'effectuer cette dégradation. Ce fut le sujet de nombreuses recherches et c'est toujours le cas aujourd'hui car les connaissances actuelles sur les microorganismes impliqués sont encore limitées.

Dans la présente étude, nous avons entrepris un travail de recherche portant sur le suivi de la dégradation biologique du phénol contenu dans une solution aqueuse par une bactérie acclimatée appartenant au genre *Pseudomonas*.

La première partie de l'étude est consacrée à la recherche bibliographique et aux généralités liées aux techniques utilisées, y sont développés respectivement : les généralités sur le phénol, un aperçu sur les procédés de traitement des eaux usées contenant des composées phénoliques et en particulier les traitements biologiques ainsi que leurs mécanismes de biodégradation et les facteurs influençant ces processus. Par la suite, nous présenterons les travaux de recherche antérieurs effectués sur la biodégradation du phénol par des souches bactériennes du genre *pseudomonas* en condition aérobies.

La deuxième partie du mémoire porte sur les expériences réalisées en batch pour cerner l'influence du phénol sur la croissance des *pseudomonas* Sp. Tout d'abord nous avons procédé à l'acclimatation de cette souche pure ayant prouvé sa capacité à utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie, ensuite nous avons optimisé les facteurs de croissance à savoir : le pH, la nature et la concentration de la source d'azote.

Une étude des cinétiques de croissance des bactéries acclimatées et de biodégradation du phénol est réalisée dans les conditions optimales à différentes valeurs de concentrations en substrat. A partir de ces résultats expérimentaux, nous avons déterminé les paramètres de ces deux cinétiques tels que : la vitesse spécifique de croissance et de biodégradation, le temps de doublement et le coefficient de rendement en biomasse.

Afin de déterminer le mode de biodégradation du phénol par la bactérie acclimatée, nous avons examiné l'application du modèle de Haldane aux résultats expérimentaux obtenus. La simulation des profils des concentrations du phénol au cours de la biodégradation a été effectuée.

Après examen des résultats obtenus, nous terminerons notre travail par une conclusion générale.

Partie I

Etude Bibliographique

I. Pollution des eaux par le Phénol

I.1 Introduction

Le phénol et ses dérivés sont considérés comme des indices de pollution industrielle. Leur nuisance la plus marquante est le goût désagréable et persistant des chlorophénols qui apparaît dans l'eau en présence de chlore et à des teneurs extrêmement faibles [4].

I.2 Généralité sur le phénol

Le phénol est un composé aromatique qui possède un groupement hydroxyle (-OH) lié à un atome de carbone d'un cycle benzénique (**Figure 1**).

Il a été découvert par **Runge** en **1834** dans le goudron provenant de la houille. Mais c'est en **1842** que sa vraie composition chimique et son poids moléculaire de **94,11g/mol** ont été donnés par le chimiste français **Auguste Laurent** [5].

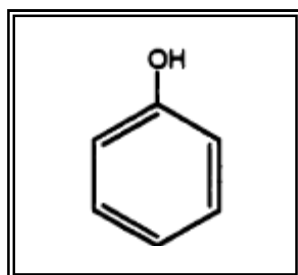


Figure 1 : Structure chimique de la molécule de phénol.

🧪 Le phénol est un solide cristallin blanc à rose pâle, il possède une odeur âcre caractéristique et un goût donnant une vive sensation de brûlure. Ses propriétés physico-chimiques sont présentées dans le **tableau 1**

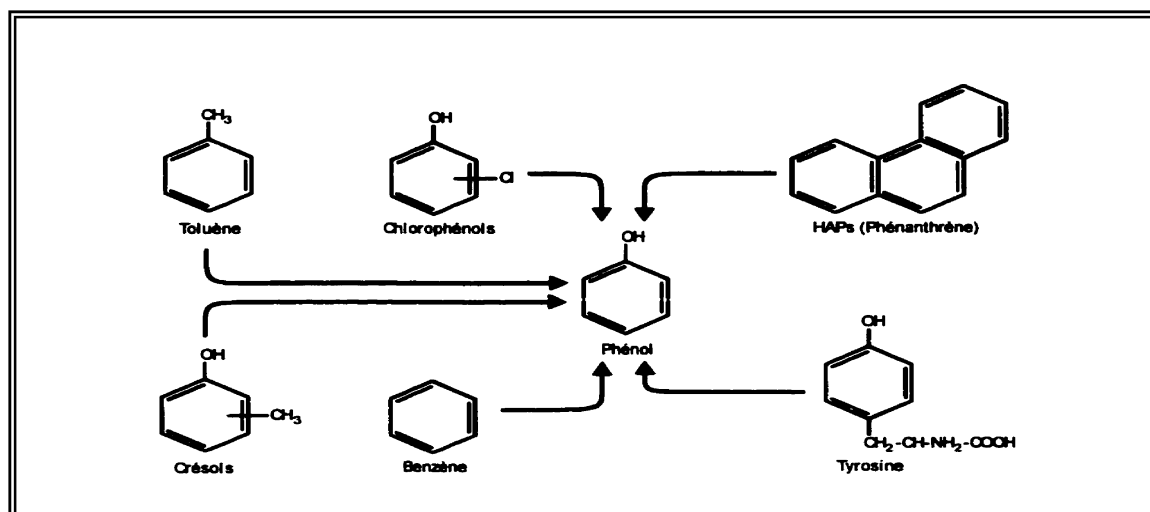
Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du phénol [5] [10]

Formule brute	Paramètre	Valeur
C_6H_6O	Masse molaire (g/mol)	94,11
	Point de fusion ($^{\circ}C$)	41
Synonymes	Point d'ébullition (à $P = 1\text{Atm}$) ($^{\circ}C$)	182
Monohydroxybenzène Hydroxyde de phényle	Température d'auto - inflammation ($^{\circ}C$)	715
	Densité (d_4^{25}) (solide)	—
	Densité (d_4^{50}) (liquide)	—
Acide carboxylique Acide phénique	Pression de vapeur (kPa)	0,047 ($25^{\circ}C$) 5,3 ($100^{\circ}C$) 53,3 ($160^{\circ}C$)
	Solubilité dans l'eau (mg/L)	83 500 ($20^{\circ}C$) 85 700 ($25^{\circ}C$)
	Constante d'Henry (Pa.m ³ /mol)	$4,56 \cdot 10^{-2}$ ($20^{\circ}C$) $4,02 \cdot 10^{-2}$ ($25^{\circ}C$)
	Coeff. de diffusion dans l'air (cm ² /s)	$8,2 \cdot 10^{-2}$
	Coeff. de diffusion dans l'eau (cm ² /s)	$8,810^{-6}$
	Perméabilité cutanée à une solution aqueuse (cm/h)	$8,2 \cdot 10^{-3}$

Les phénols sont utilisés comme : [6]

- Anesthésiques dans les applications pharmaceutiques : aspirine, pastilles de gorge, lotions antiseptiques.
- Intermédiaires de synthèses des parfums, colorants et résines phénoliques.
- Désinfectants, révélateurs photographiques, additifs des lubrifiants et des essences.

D'autre part, le phénol peut être considéré comme un composé principal, puisqu'il constitue un intermédiaire dans la dégradation de plusieurs composés aromatiques (Figure 2) [7 - 9].

**Figure 2 : Exemples de composés dont la dégradation mène au phénol [11].**

I.3 Principe de production

Il existe plusieurs méthodes de production du phénol, mais seules deux d'entre elles sont mises en œuvre industriellement : [5]

✧ **Méthode de Hock**, elle comporte 3 phases :

- Alkylation du benzène avec du propène pour former de l'isopropylbenzène (cumène),
- Oxydation du cumène donnant naissance à des tert-hydroperoxydes,
- Séparation en phénol et acétone.

✧ **Méthode "Dow "**, elle comporte 2 phases :

- Oxydation du toluène pour former de l'oxyde benzoïque,
- Décarboxylation oxydante permettant d'obtenir du phénol.

Le phénol commercial obtenu à partir du cumène (méthode de Hock, procédé de fabrication le plus répandu) est pur à 99,8 %.

I.4 Origine des rejets d'eau contenant des substances phénoliques

L'industrie est la source principale d'émission du phénol dans la nature, sa présence provient des eaux résiduares des raffineries de pétrole, d'industries métallurgiques, d'usines pétrochimiques, de cokeries, d'industries papetières et d'industries de cellulose ...etc [11].

Les caractéristiques de certaines eaux résiduares contenant du phénol est représentée dans les tableaux suivants :

Tableau 2 : Caractéristiques des eaux résiduares des raffineries de pétrole. [12]

Paramètres	Valeurs
pH	8,8
MES	46 mg/L
DCO	625 mgO ₂ /L
Phénols	22 mg/L
Hydrocarbures	30 mg/L
Détergents	13,7 mg/L

Tableau 3 : Caractéristiques des eaux résiduaires des usines pétrochimiques. [13]

Paramètres	Valeurs
Phénols	60 mg/L
O-Crésol	15 mg/L
P- Crésol	18 mg/L
DCO	790 mgO ₂ /L
COT	230 mg/L

I.5 Impact du phénol sur la santé humaine et l'environnement

I.5.1 Effet sur l'homme [6]

Chez l'être humain, une intoxication phénolique aiguë se manifeste par une vasodilatation, une dépression cardiaque, une hypothermie, un coma et un arrêt respiratoire.

L'ingestion de phénol provoque une intense douleur abdominale et une sensation de brûlure dans la cavité buccale.

L'application de solutions aqueuses de phénol même faiblement concentrées pour nettoyer la peau, peut occasionner des lésions locales dont la plus grave est la gangrène phénique si le contact est prolongé. Cette gangrène est d'abord insidieuse, elle évolue sans douleur, ensuite la plaie devient sombre et douloureuse.

Absorbé à petites doses de façon répétée, le phénol est susceptible de provoquer un syndrome nerveux connu sous le nom marasme phénique qui est caractérisé entre autre par des céphalées et des vertiges.

Ces troubles s'accompagnent souvent d'anémies et parfois d'atteinte rénale avec albuminurie.

I.5.2 Effet sur l'environnement [14]

Les phénols synthétiques sont plus toxiques que ceux existants à l'état naturel, une réduction des émissions s'impose :

Les phénols sont plus lourds que l'eau et tendent à se déposer. Ils se dissolvent lentement et, même dilués, continuent de former des solutions toxiques. En raison de leur forte toxicité dans l'eau, les phénols figurent dans la catégorie des substances présentant un risque de pollution des eaux.

- ✚ Les vapeurs de phénol sont plus lourdes que l'air et forment des mélanges explosifs sous l'effet de la chaleur. Ils s'oxydent à l'air, ce processus est accéléré par la lumière ou par des impuretés à effet catalytique.
- ✚ Dans le sol, une condensation avec formation d'acide humique peut se produire. En revanche, la dégradabilité des phénols synthétiques est plus faible, car un certain nombre d'entre eux, ont une action bactéricide. Plus les phénols contiennent d'atomes de chlore ou d'azote, plus leur toxicité est forte

I.6 Normes de rejet du phénol

De façon générale, le terme "normes" recouvre tout un ensemble de paramètres, d'indicateurs ou de systèmes de classification permettant de contrôler les effets d'un projet sur l'environnement et de décrire la qualité du milieu naturel.

Les normes de rejets de phénol dans l'eau usée sont variables suivants les pays, en général les valeurs limites imposées sont de 0,1 à 1 mg/L [15].

I.7 Conclusion

Les rejets intensifs ou irréguliers de phénol peuvent provoquer des perturbations parfois irréversibles dans l'équilibre écologique de l'eau.

Il est donc impératif de procéder à la destruction des phénols, la plus complète possible, avant de rejeter les eaux contaminées dans le milieu naturel.

II. Différents procédés de traitement du phénol

II.1 Introduction

On distingue deux grandes catégories de procédés de traitement des rejets d'eaux contaminées par le phénol :

1. Procédés physico-chimiques : qui ont pour but la récupération des phénols.
2. Procédés biologiques : qui ont pour but l'élimination des phénols.

Cependant,

“Faut il récupérer ou éliminer le phénol ?”

La décision doit être prise en fonction de la capacité économique et technologique de l'usine en question.

Pour les petites exploitations ou le volume des rejets d'eau phénoliques n'atteint que quelques m³ par jour, la récupération n'est pas rentable.

Par contre si le volume rejeté par jour est élevé et si les conditions techniques sont présentes, la récupération du phénol s'avère être la meilleure des solutions.

II.2 Procèdes physico-chimiques

II.2.1 Traitement par adsorption sur charbon actif [16]

L'adsorption sur charbon actif, compte parmi les méthodes physiques de transfert de masse et les méthodes les plus anciennes de traitement de l'eau.

L'adsorption sur charbon actif figure parmi les méthodes les plus courantes, cependant ce processus ne résout pas complètement le problème car il faut encore détruire les composés extraits de l'eau. Pour cela, le charbon chargé de polluant est traité, en présence d'oxygène, dans des fours à hautes températures (régénération thermique) où les composés sont brûlés.

.

II.2.2 Traitement par l'ozone

L'ozone est un agent oxydant très efficace pour l'élimination de plusieurs polluants organiques. Des études menées par certains auteurs ont montré que l'ozone peut conduire à la polymérisation des composées phénoliques. [17]

II.2.3 Traitement par les radiations UV

Plusieurs auteurs ont montré que les rayons UV donnent dans l'eau, en présence d'oxygène, des réactions radicalaires en chaîne [17].

La lumière UV seule n'est pas suffisante et un oxydant utilisé seul ne produit qu'une décontamination partielle. Il faut donc l'utilisation simultanée de la lumière et de l'oxydant.

II.2.4 Traitement par l'ozone et les radiations UV

Le procédé O_3/UV permet une destruction efficace des composés organiques toxiques et réfractaires comparativement aux méthodes classiques de traitement de l'eau

Le principe de ce procédé consiste en l'irradiation à 254 nm d'une solution aqueuse saturée en ozone dans un réacteur approprié [16].

Ces procédés physico-chimiques sont limités du fait de leurs coûts ou de leurs impact secondaire sur l'environnement. C'est pour cela qu'on fait appel aux traitements biologiques qui sont plus ou moins lents mais permettent néanmoins l'élimination complète du contaminant, cette épuration s'effectue grâce à l'action d'une biomasse bactérienne (algues, champignons et bactéries).

I.3 Procédés biologiques

II.3.1 Principe de l'épuration biologique

L'épuration biologique des eaux usées chargées en matières organiques biodégradables est réalisée par l'action des micro-organismes qui sont capables de métaboliser ces composés en matière plus simple [11].

a. Besoin des micro-organismes [18]

Les micro-organismes se multiplient grâce aux nutriments présents dans les milieux de culture. Ils possèdent un certain nombre de besoins élémentaires, énergétiques et spécifiques.

🌈 **Besoins élémentaires** : sont constitués d'éléments entrants dans la composition de la substance microbienne :

- **Source de carbone** : un des éléments les plus abondants de la bactérie. Le plus simple des composés carbonés est le CO_2 .

On distingue deux catégories de bactéries :

1. **Bactéries autotrophes** : ont une capacité de développement en milieu inorganique contenant le CO_2 comme seule source de carbone.

2. **Bactéries hétérotrophes** : ont une capacité de dégrader une panoplie de substances hydrocarbonées. Elles exigent des composés organiques comme source de carbone.

- **Source d'azote** : l'azote entre dans la composition des protéines bactériennes. Il peut être fixé par la bactérie sous trois formes :

1. Sous forme d'azote moléculaire N_2 utilisé par un nombre limité de microorganismes tels que : les Rhizobium, Azotobacter et certains Clostridium.
2. Sous forme de composés inorganiques NO_2 utilisé par les Nitrobacter.
3. Sous forme de composés organiques R-NH_2 dont les groupements aminés représentent la source d'azote.

- **Source de phosphore** : Le phosphore entre dans la composition des acides nucléiques, de nombreux coenzymes et de l'ATP. Il est incorporé dans la bactérie sous forme de phosphate inorganique. Il permet la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la cellule.

- **Source de soufre** : Le soufre entre dans la composition des acides aminés, des protéines (groupement thiol). Il est incorporé dans la cellule sous forme de sulfate, de composés soufrés organiques, rarement sous forme de soufre réduit.

 **Besoins énergétiques** : Ils couvrent les dépenses engagées dans les processus du catabolisme et de biosynthèse.

Les bactéries peuvent utiliser comme source d'énergie soit :

- L'énergie lumineuse (*bactéries Phototrophes*),
- L'énergie fournie par les processus d'oxydo-réduction (*bactéries Chimiotrophes*).

🌈 **Besoins Spécifiques (facteurs de croissances):** Il s'agit de métabolites essentiels dont certaines bactéries ont besoin pour leur croissance et qu'elles sont incapables de synthétiser par défaut enzymatique.

Les facteurs de croissance présentent des caractères communs:

- Actifs à concentration infime
- Etroitement spécifiques

Les bactéries exigeant des facteurs de croissance sont appelées: *Bactéries Auxotrophes* et les bactéries non exigeantes sont dites: *Bactéries Prototrophes*.

2. Croissance bactérienne [18] [19]

C'est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle se manifeste par une augmentation numérique des cellules bactériennes et non pas par une augmentation de taille comme chez les organismes supérieurs (homme, animal ou plante).

2.1 Facteurs influençant la croissance bactérienne

Ils interviennent de façon primordiale dans l'obtention d'une culture optimale. En effet les nutriments doivent être apportés à la bactérie dans les conditions d'environnement qui lui conviennent, sinon, ils peuvent l'inhiber.

🌈 **Température :** Selon le comportement de la bactérie vis à vis de la température, on distingue :

- **Les bactéries mésophiles :** La température optimale de croissance est de 20 à 40°C (30°C pour les mésophiles saprophytes, 37°C pour les mésophiles pathogènes).
- **Les bactéries thermophiles :** La température optimale de croissance est de 45 à 65°C.
- **Les bactéries psychrophiles :** La température optimale de croissance est de 0°C à 4°C. Ces bactéries contaminent souvent les produits laitiers, de même que les produits biologiques (sang ou dérivés sanguins) conservés à basse température.
- **Les bactéries cryophiles :** La température optimale de croissance est inférieure à 0°C, on distingue les bactéries des océans et des glaciers.

✚ **pH** : Les bactéries préfèrent un pH neutre ou légèrement alcalin (7 –7.5), cependant, il existe des bactéries qui se développent à des pH acides (**acidophiles**) et très rarement à des pH basiques supérieur à 8 (**basophiles**).

✚ **L'oxygène** : suivant le rapport des bactéries avec l'oxygène, elles peuvent être classées en :

- *Aérobies strictes* : qui se divisent en présence d'oxygène.
- *Anaérobies strictes* : qui se divisent en absence d'oxygène.
- *Aérobies – anaérobies facultatives* : qui se divisent aussi bien en absence qu'en présence d'oxygène.
- *Microaérophiles* : qui ne divisent qu'en présence d'une faible concentration d'oxygène dans l'eau (2 à 10 %).

L'oxygène est facilement réduit en radical superoxyde, en peroxyde d'hydrogène et en radical hydroxyle. Ces produits sont très toxiques car ils détruisent les constituant cellulaires.

Les aérobies et anaérobies facultatifs possèdent la superoxyde dimutase et la catalase qui vont neutraliser ces produits toxiques. Tandis que les anaérobies strictes sont dépourvues de ses deux enzymes (ce qui explique qu'elles ne peuvent vivre en présence d'oxygène).

✚ **Pression Osmotique** : la plupart des bactéries sont pratiquement insensibles aux variations de pressions osmotiques et cela grâce à une paroi spécifique qui leur confère une rigidité et une résistance aux chocs.

2.2 Cinétique de croissance bactérienne

L'étude de la croissance bactérienne consiste à suivre en fonction du temps l'évolution de la concentration cellulaire. En effet, en milieu non renouvelé, la croissance des bactéries est limitée et suit différentes phases comme il est illustré dans la **Figure 3**

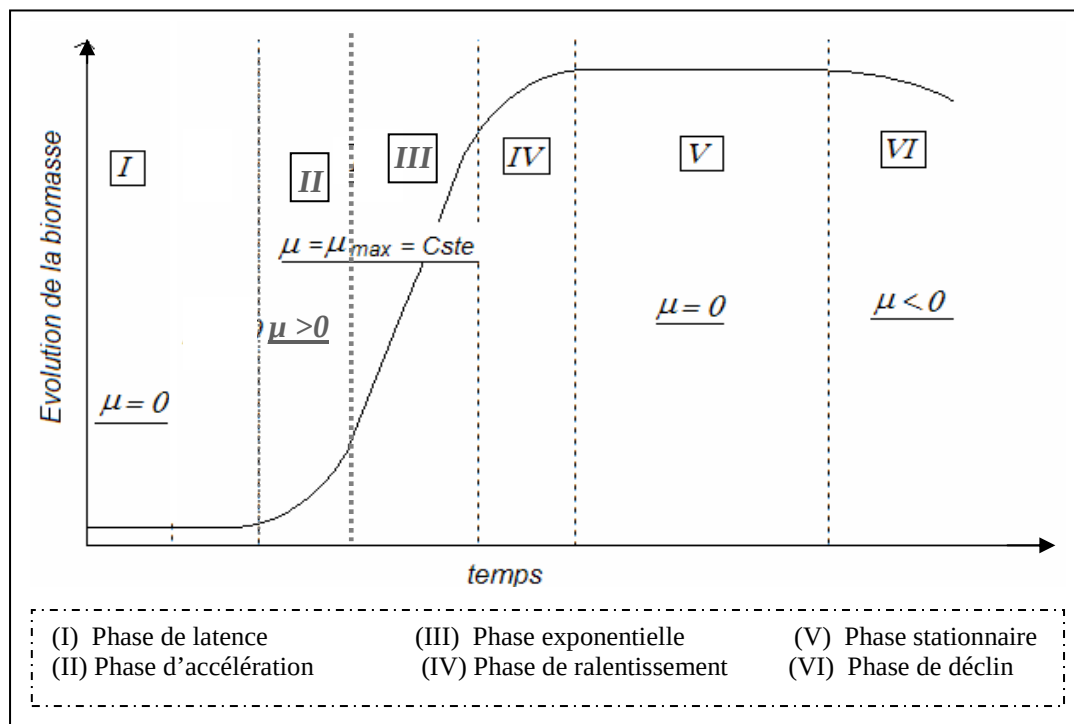


Figure 3 : Courbe de croissance bactérienne [19]

🔧 Phase de latence :

Il s'agit d'une période d'adaptation des bactéries durant laquelle les cellules synthétisent les enzymes nécessaires pour utiliser les substrats (éléments nutritifs) du milieu. Durant cette phase, il n'y a pas de division cellulaire : $X = X_0$ et $\mu = 0$.

🔧 Phase d'accélération :

Elle représente le début de la division cellulaire. Au cours de cette phase, la concentration cellulaire (X) et la vitesse spécifique de croissance (μ) augmentent.

🔧 Phase exponentielle :

La vitesse de reproduction cellulaire a atteint son maximum et reste constante. Dans cette phase, le temps de doublement est le plus court.

🔧 Phase de ralentissement :

La vitesse de croissance des bactéries diminue au cours de cette phase. Le milieu s'appauvrit en éléments nutritifs disponibles et s'enrichit en produits du catabolisme, souvent toxiques.

Phase stationnaire :

La croissance bactérienne s'arrête ($\mu = 0$), le nombre de cellules atteint son maximum et se caractérise par un plateau sur la courbe.

Phase de déclin :

La vitesse de croissance spécifique est négative ($\mu < 0$), toutes les ressources nutritives sont épuisées, il y a accumulation de métabolites toxiques ce qui produit une diminution d'organismes viables et une lyse des bactéries.

II.3.2 Principaux types de dégradation

1. Dégradation aérobie du phénol

L'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons qui génère le plus d'énergie pour la bactérie. Pour cette raison, mais aussi parce qu'il est toxique pour plusieurs processus anaérobies, le métabolisme aérobie prédomine même si d'autres accepteurs terminaux d'électrons sont présents.

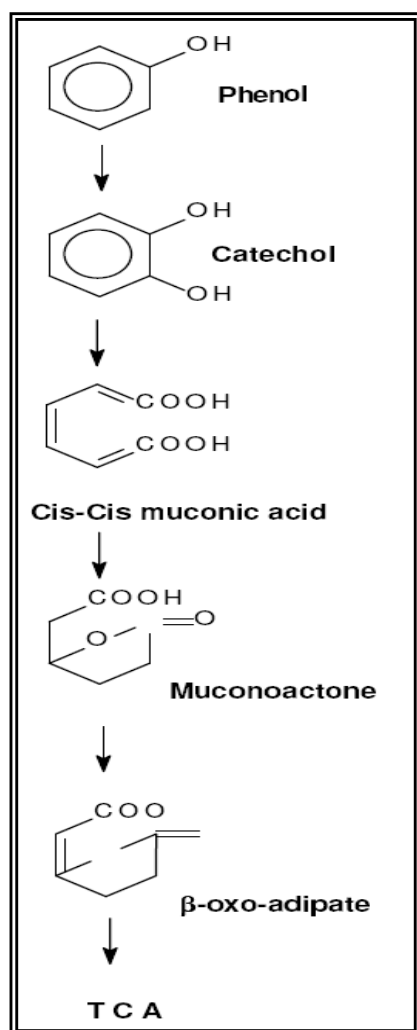
Un grand nombre de micro-organismes sont capables de dégrader les composés aromatiques dans les conditions aérobies, tels que les genres *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Acinetobacter* [20]. En particulier, la transformation du phénol a été réalisée en utilisant plusieurs espèces bactériennes telles que *Bacillus sp.* [21], différentes espèces d'*Acinetobacter* [22] [23] et plusieurs espèces de *Pseudomonas* [19] [26] [37].

En présence de l'oxygène, le phénol peut être dégradé soit par la voie de fission ortho, soit par la voie de fission meta (**Figure 4**). Dans les deux cas, l'oxygène est essentiel à la déstabilisation du cycle aromatique car il est incorporé directement dans la molécule attaquée pour former l'intermédiaire central tel que le catéchol.

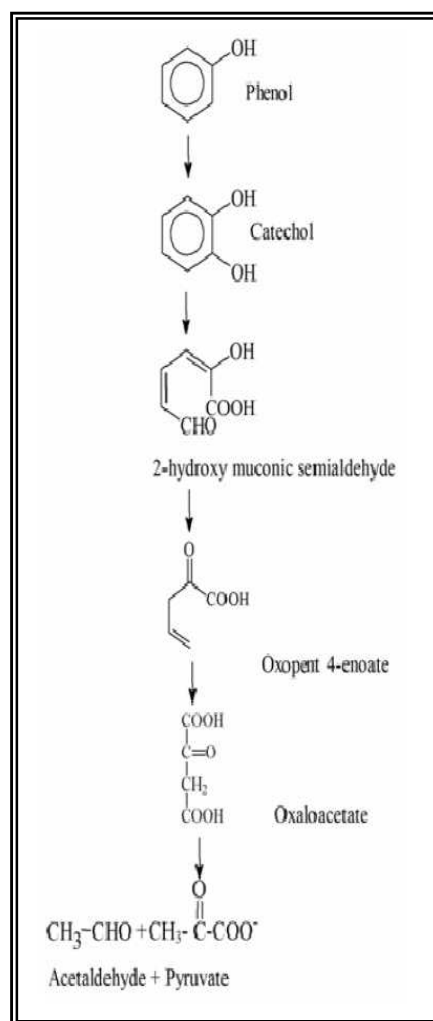
Cette incorporation de l'oxygène, suivie par la fission du cycle, est orchestrée par les enzymes mono- et dioxygénases [8] [26].

- **Monoxygénase** : Ce type d'enzyme hydroxyle le noyau aromatique, il est appelé également hydroxylase.
- **Dioxygénase** : Ce type d'enzyme clive le noyau aromatique, il est classé selon le mode de fission de ce dernier (**Figure 5**).

- Lorsque la fission se fait en ortho (clivage entre les carbones porteurs des groupements hydroxyles), l'enzyme est appelée intradiol dioxygénase.
- Lorsque la fission se fait en meta (clivage entre les deux carbones adjacents au diol), l'enzyme est appelée extradiol dioxygénase [24].



Chemin oxydatif «ortho»



Chemin oxydatif «meta»

Figure 4 : Métabolites et enzymes des deux chemins oxydatifs « meta » et « ortho » pour la dégradation du phénol [37].

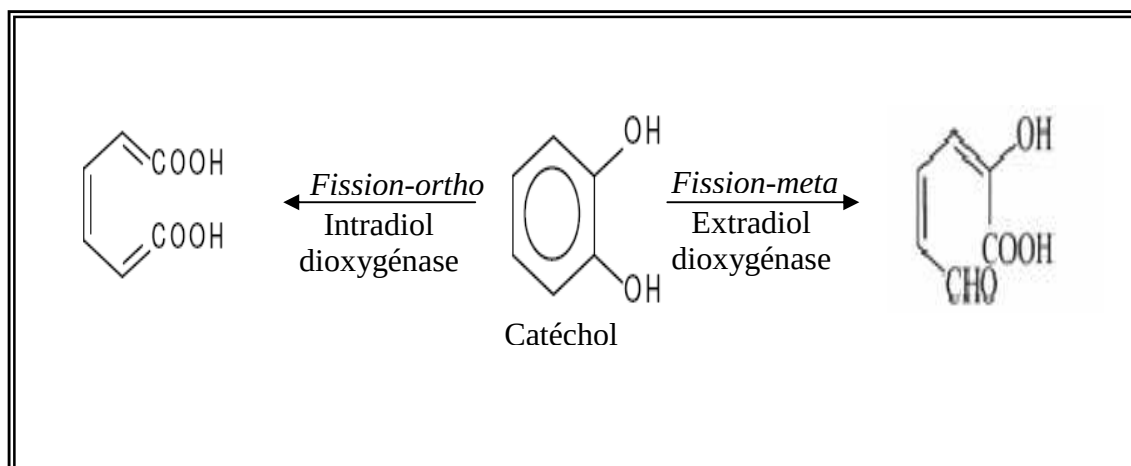


Figure 5: Les deux modes de clivage du noyau aromatique par les enzymes dioxygénases [24]

Dans le cas des *Pseudomonas sp.* (la souche sélectionnée dans notre étude), le phénol est minéralisée selon le chemin oxydatif « meta ». Le premier produit qui suit le catéchol est le «2-hydroxymuconique acide semialdéhyde (2-HMAS) » [27] [37]. La présence de ce produit, donne au milieu une coloration jaune verdâtre.

2. Dégradation anaérobie du phénol

En condition anaérobie où l'oxygène n'est pas disponible, pour transformer les composés aromatiques, les micro-organismes qui s'y trouvent doivent utiliser des mécanismes différents de ceux décrits plus haut.

Généralement, la spécialisation métabolique chez les bactéries anaérobies est plus grande que chez les bactéries aérobies [29]. A l'exception des composés hydrocarbures halogénés, la biodégradation en conditions anaérobies est généralement plus lente en comparaison à la biodégradation en conditions aérobies [30]. Ceci est principalement dû à la faible énergie que les bactéries sont capables de puiser à partir de la dégradation de la matière organique dans ces conditions [31].

En utilisant le nitrate comme accepteur terminal d'électrons ; Bakker [76] a montré que le phénol était dégradé en acide n-caproïque par une culture mixte. Ce chercheur a conclu que le cycle aromatique du phénol était réduit pour former le cyclohexanone avant d'être dégradé en composés aliphatiques.

Les intermédiaires de dégradation ont été suivis par Balba et Evans [33] dans leur consortium méthanogène adapté au catéchol. Le phénol a été métabolisé rapidement et les produits

suivants ont été détectés dans le milieu de culture: le cyclohexanone, le 2-hydroxycyclohexanone, l'adipate, le succinate, le propionate et l'acétate, confiant une voie métabolique réductrice (**Figure 6**).

Une autre voie métabolique de la dégradation du phénol, différente de la voie réductrice, a été rapportée par plusieurs chercheurs [34] [35] [36].

Quand le phénol non marqué et le CO_2 marqué au ^{14}C ont été fournis à leur culture méthanogène, Knoll et al. [36] ont observé la formation du benzoate radioactif. Ce résultat indique que la dégradation du phénol passe probablement par la carboxylation du phénol.

Les métabolites intermédiaires détectés dans le milieu de culture sont : le benzoate, le cyclohexane carboxylate, le 1-cyclohexene carboxylate et le caproate, tandis que les intermédiaires potentiels de la voie réductrice (le cyclohexanol, le cyclohexanone, le pimelate et quelques autres) n'ont pas été transformés (**Figure 7**)

Les deux voies de traitement anaérobies mènent à une production d'un mélange gazeux très énergétique ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$)

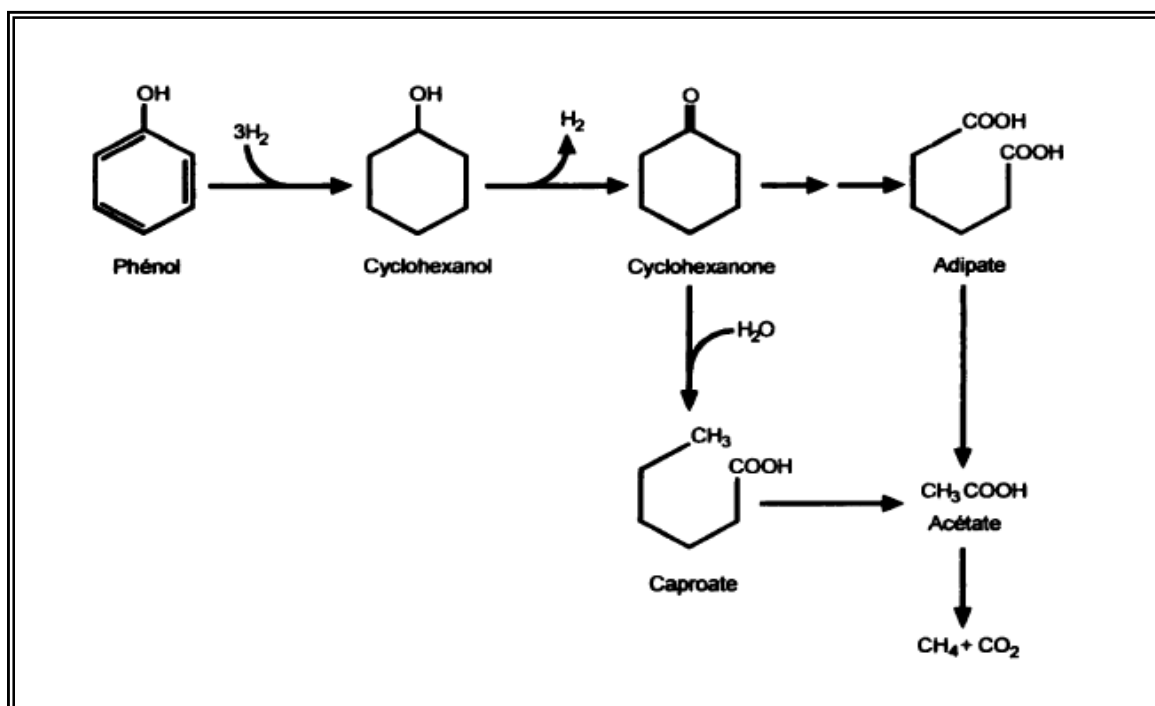


Figure 6 : Dégradation anaérobie du phénol par voie métabolique réductrice proposée par Evans (1977) [28].

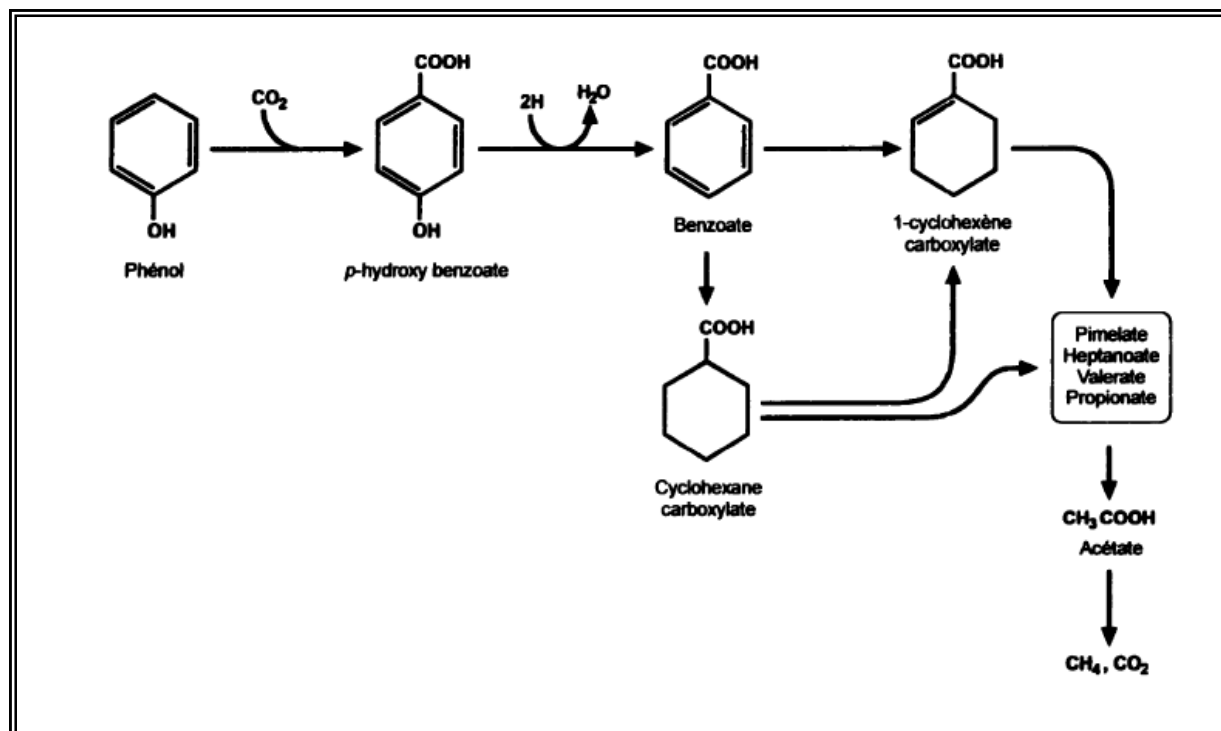


Figure 7 : Dégradation anaérobie du phénol par voie métabolique impliquant la carboxylation [36].

II.2 Conclusion

Le phénol est présent dans diverses eaux résiduaires industrielles, pour l'éliminer, différents procédés physico-chimiques existent. Cependant, aucun n'est réellement satisfaisant en terme d'efficacité, de faisabilité ou de coût. En effet, les méthodes physico-chimiques présentent l'inconvénient de déplacer le phénol et non pas de le détruire ou de le transformer et également elles peuvent générer des sous produits toxiques. Par ailleurs, la voie biologique qui est une technique économique, présente l'avantage d'éliminer le phénol en le transformant en produits inoffensifs ou moins polluants par l'intermédiaire de microorganismes.

C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris, dans cette étude, un travail de recherche portant sur l'élimination du phénol par voie biologique.

III. Résultats des travaux antérieurs effectués sur la biodégradation du phénol

1. Introduction

La biodégradation du phénol et de ses dérivées par les cultures microbiennes mixtes et pures a fait l'objet d'un certain nombre de travaux au cours de ces dernières années. Le genre *Pseudomonas* est largement appliqué pour la dégradation des composés phénoliques. Ces bactéries sont connues pour leur immense capacité de se développer sur divers composés organiques. Le **tableau (4)** résume les différents microorganismes capables de dégrader les composés phénoliques [37].

Monteiro et coll., (2000) [57] ont étudié la biodégradation du phénol par une culture pure de *Pseudomonas putida* DSM548. Les expériences ont été menées dans des cultures en batch avec des concentrations en phénol allant de 1- 100 mg/L, $T = 26^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH} = 6,8$. Le taux de croissance spécifique maximum obtenu pour cette souche pure est de $\mu_{\text{max}} = 0,436\text{h}^{-1}$, ce dernier a été comparé avec d'autres études utilisant des cultures mixtes avec un taux de croissance de $\mu_{\text{max}} = 0,131\text{h}^{-1}$. Ils ont constaté que le rendement est plus élevé lors de la sélection d'une culture pure pour la dégradation du phénol.

Muhammad et coll., (2007) [38] ont comparé la capacité de deux souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas pseudomallei* capable d'utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie. Les résultats ont montré qu'avec les mêmes conditions de cultures ; le taux spécifique de croissance et la vitesse de biodégradation du phénol par la souche *pseudomonas aeruginosa* sont $0,016\text{ h}^{-1}$ et $26,16\text{ mg/L.h}^{-1}$, ces valeurs sont plus importantes comparativement à ceux obtenus avec la souche *Pseudomonas pseudomallei* ($0,013\text{h}^{-1}$, $13,85\text{mg/L.h}^{-1}$).

Abuhamed et coll., (2004) [64] ont étudié l'effet de l'adaptation (acclimatation) de la souche *Pseudomonas putida* F1 au phénol pour une concentration de 50mg/L. Ils ont constaté que la biodégradation du phénol par les cellules adaptées (18h) était plus rapide que celle observée avec les cellules non adaptées (90h).

Kumar et coll., (2005) [48] ont acclimaté une souche pure qui est la *Pseudomonas putida* MTCC 1194 au phénol jusqu'à 1000 mg/L en présence du glucose. Les résultats des expériences en batch à $T = 29,9 \pm 0,3$ °C et $pH = 7,1$ ont révélé que le phénol, avec une concentration initiale de 1000mg/L, pourrait être entièrement dégradé au bout de 162 h.

Par ailleurs, malgré l'acclimatation de la culture bactérienne à une concentration en phénol de 1000mg/L, ces auteurs ont observé un temps de latence qui varie linéairement avec la concentration du phénol.

Plusieurs facteurs externes peuvent limiter le taux de biodégradation des composés organiques. Ces facteurs peuvent inclure la température, le pH du milieu, la teneur et la disponibilité en oxygène, la concentration en substrat et les propriétés physiques des contaminants. Chacun de ces facteurs devra être optimisé pour la souche sélectionnée dans le but d'aboutir à une dégradation maximale du composé organique utilisé [39].

Hsieh et coll., (2008) [41] ont étudié l'effet du pH sur la biodégradation du phénol pour la souche *Pseudomonas putida* dans un intervalle de 6,7 à 10. Les résultats ont montré que le phénol a été dégradé plus rapidement dans un milieu dont le pH est proche de la neutralité.

Ballesteros et coll., (2008) [50] ont examiné l'influence de la température sur la biodégradation du phénol par la souche *Pseudomonas putida* dans la gamme 25 à 35°C. Ils ont remarqué que pour toutes les températures étudiées et pour un pH compris entre 5 et 7, cette souche dégradait le phénol rapidement dans les conditions optimales $T = 30^\circ\text{C}$ et $pH = 7$, et lentement à une température de 35°C. A travers cette étude, nous constatons qu'une température de 30°C et un pH proche de la neutralité constituent des conditions favorables pour dégrader le phénol par les bactéries de genre *Pseudomonas*.

Une variété de modèles cinétiques d'inhibition de substrat a été appliquée pour décrire la dynamique de la croissance microbienne sur le phénol. Divers modèles d'inhibition de substrat, qui découlent de l'équation de Haldane, ont été fréquemment utilisés afin de décrire la biodégradation du phénol.

Arutchelvan et coll., (2006) [42] ont isolé une souche bactérienne nommée *Bacillus brevis*, celle-ci a été acclimatée dans un milieu minéral de base contenant le phénol comme seule source de carbone et d'énergie dans une gamme de concentration variant de 500 à 1750 mg/L. Les conditions optimales de croissance et de biodégradation du phénol obtenues pour cette

souche étaient : $T = 30^{\circ}\text{C}$ et $\text{pH} = 8$. Ils ont montré également que la cinétique de croissance de cette souche bactérienne était bien corrélée par le modèle d'inhibition de Haldane avec une concentration optimale en phénol de 750 mg/L.

Yoon et coll., (2001) [40] ont constaté que l'équation de Haldane n'était pas suffisante pour modéliser la dégradation du phénol, particulièrement pour les expériences menées à des concentrations initiales en phénol élevées, bien qu'elle puisse corrélérer parfaitement le taux de croissance spécifique avec les concentrations initiales en substrat.

Nuhoglu et coll., (2005) [70] ont montré que l'inadéquation du modèle de Haldane dans un certain intervalle de concentration en phénol est attribuée au phénomène d'inhibition par les métabolites intermédiaires de dégradation du phénol. Ainsi, **Wang et Loh (1999) [73]** ont proposé un modèle cinétique de dégradation du phénol qui prend en considération l'effet de ces métabolites intermédiaires. Ils ont trouvé que ce modèle peut simuler avec succès les profils de dégradation de phénol dans toute la gamme des concentrations initiales en phénol explorée. Ces auteurs sont arrivés à la conclusion suivante : l'inhibition du substrat, due à la présence des métabolites intermédiaires, joue un rôle crucial dans la modélisation de la dégradation du phénol, en particulier lorsqu'une large gamme de concentrations en phénol est examinée.

2. Conclusion

Cette revue de la littérature vient confirmer l'importance de l'acclimatation des cultures bactériennes pour la dégradation des composés toxiques tel que le phénol et la nécessité d'optimiser les paramètres opératoires pour obtenir de meilleurs rendements d'élimination. D'autres part, la dégradation bactérienne du phénol en particulier par la souche *Pseudomonas* Sp. est largement décrite par le modèle d'inhibition de Haldane. Cependant, celui-ci présente quelques imperfections d'autant plus marquées qu'une large gamme des concentrations en phénol est examinée. Plusieurs chercheurs ont attribué l'inadaptation du modèle de Haldane avec les résultats expérimentaux à l'inhibition du substrat liée à la formation de métabolites intermédiaires. Ainsi, de nouveaux modèles ont été proposés par plusieurs chercheurs qui ont apporté des facteurs correctifs au modèle de Haldane liés à cette inhibition.

Tableau 4 : Micro-organismes dans la biodégradation des composés phénoliques [37].

Type de phénol	Micro-organisme	Références
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Allsop et coll. (1993)
2-chlorophénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Overmeyer and Rehm (1995)
Phénol	<i>Pseudomonas sp</i>	Bodzek et coll. (1996)
Phénol	<i>Pseudomonas sp</i>	Gotz and Reuss. (1997)
Phénol	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Torres et coll. (1998)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Mordocco et coll (1999)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Loh and Wang (1999)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Wang and Loh (1999)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Zumriye and Gultac (1999)
Phénol	<i>Pseudomonas pictorium</i>	Annadurai et coll. (2000)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i> DSM 548	Monteiro et coll. (2000)
Phénol	<i>Pseudomonas sp</i>	Gonzalez et coll. (2001)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Loh and Jun (2001)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Petruschka et coll (2001)
Chlorophénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Farighian (2003)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Hamed et coll. (2007)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i> MTCC 1194	Arinjay et coll. (2004)
Phénol	<i>Pseudomonas sp</i>	Prpich and Dougliis (2005)
Phénol	<i>Pseudomonas sp</i>	Rodrigo et coll. (2005)
Phénol	<i>Bacillus brevis</i>	Arutchelvan et coll. (2006)
Phénol	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sgountzos et coll. (2006)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i> CECT 324	Ballesteros et coll. (2007)
Phénol	<i>Pseudomonas putida</i>	Feng-Ming et coll. (2007)
Phénol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>pseudomonas pseudomallei</i>	Muhammad et coll. (2007)

Partie II

Etude Expérimentale

I. Introduction

La présente étude est composée de cinq parties principales :

1- Acclimatation des souches de *Pseudomonas sp.* : Ces bactéries sont connues pour leur utilisation du carbone organique comme source principale de nutriments et leur résistance aux concentrations élevées en phénol et ne nécessitant pas des conditions spéciales pour leur croissance.

2- Détermination des paramètres optimaux de croissance : Cela se traduit par l'étude de l'influence des paramètres physico-chimiques tels que le pH, la nature et la concentration de la source d'azote sur la croissance des bactéries et la biodégradation du phénol.

3- Etude des cinétiques de croissance des bactéries acclimatées et de biodégradation du phénol pour différentes valeurs de concentrations initiales.

4- Modélisation : Examiner l'application des modèles théoriques existants (Monod et Haldane) aux résultats expérimentaux obtenus afin de déterminer le mode de biodégradation du phénol par la bactérie isolée.

5- Simulation : Confronter le profil des concentrations du phénol au cours de la biodégradation, obtenu expérimentalement au profil déterminé à partir du modèle théorique approprié.

II. Matériels et Méthodes

II.1 Les caractéristiques de la souche utilisée : [43]

La souche utilisée dans notre étude est l'espèce *Pseudomonas sp.* qui nous a été livrée par M^{elle} Taguett du laboratoire de biologie des sols de la faculté des sciences biologiques (USTHB).

Les résultats des examens morphologiques et biochimiques de cette souche sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Résultats des tests morphologiques et biochimiques des *Pseudomonas sp.*

Tests	Résultats		
Examen macroscopique 	Milieu	<i>King A</i>	<i>King B</i>
	Taille	$\Phi = 3\text{mm}$	$\Phi < 1\text{mm}$
	Forme	convexe	convexe
	Aspect de surface	lisse	Lisse
	Opacité	translucide	translucide
	Consistance	gluante	muqueuse
	Pigmentation	Jaune verdâtre bleu	Jaune verdâtre
Examen microscopique Coloration de Gram 	Gram ⁻		
Caractérisation biochimique			
Catalase	+		
Oxydase	+		
Citrate Utilisation de citrate	+		
ADH Arginine dihydrolase	+		
Glucose (milieu MEVAG)	+		
Saccharose	+		
Mannitol -Mobilité	Mannitol (+)/mobilité (-)		

II.2 Acclimatation de la souche bactérienne au phénol

II.2.1 Préparation d'inoculum

L'inoculum qui a servi à l'ensemencement des cultures est préparé de la façon suivante :

La souche bactérienne a été cultivée dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de bouillon nutritif. La suspension bactérienne obtenue est incubée à 30°C pendant 24h sur un agitateur orbital (Wisesshake) à une vitesse de 80 rpm. Après cette période d'incubation, nous avons obtenu une biomasse bactérienne importante. Les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation (Hettich-EBA 20) à 5000 rpm pendant 20 min et sont remises en suspension dans le milieu minéral de base stérile (MMB).

II.2.2 Composition du milieu MMB [44]

Nous avons utilisé le milieu minéral de base suivant :

▪ $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{ H}_2\text{O}$	1.6245g/L
▪ $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0.2000g/L
▪ KCl	0.2000g/L
▪ NH_4Cl	1.3375g/L
▪ $\text{K}_2\text{HPO}_4, 3\text{H}_2\text{O}$	1.0000g/L
▪ Extrait de levure	0.0200g/L

Le pH du milieu est ajusté à 7.

II.2.3 Description du protocole expérimental

Le protocole d'acclimatation des bactéries est illustré sur la **Figure 8**. Nous avons réalisé nos expériences d'acclimatation dans des Erlenmeyers de 1L munis de cotons cardés contenant 200 mL de MMB. Ce dernier estensemencé par 8 mL d'inoculum.

Au départ, les cultures bactériennes ont été cultivées dans un MMB avec 2g/L de glucose qui constitue un substrat facilement biodégradable. Par la suite, les bactéries ont été acclimatées à des concentrations croissantes en phénol jusqu'à 200 mg/L, sachant qu'à chaque augmentation de la concentration du phénol, nous diminuons celle de glucose et cela pendant une période de deux semaines.

Durant cette période, le transfert d'inoculum se fait dans la phase exponentielle et pour chaque transfert, la mesure de la concentration de la biomasse bactérienne a été effectuée par spectrophotométrie à 600 nm [45] (**tableau 6**).

La concentration résiduelle du phénol a été mesurée par la même méthode à une longueur d'onde de 510 nm [46] [47].

Les méthodes analytiques sont citées en **annexe I**.

Le pourcentage de biodégradation du phénol est illustré dans la **figure 10**.

A la fin de la période d'acclimatation, des échantillons sont prélevés afin de repiquer la suspension bactérienne sur boîte de Petri contenant la gélose nutritive (**figure 9**). Les boîtes de Petri ont été incubées à 30°C. Après 24h d'incubation, les colonies bactériennes qui apparaissent sont celles adaptées à utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie. Ces bactéries sont conservées dans des tubes contenant un milieu solide (GN) incliné à une température de 4°C.

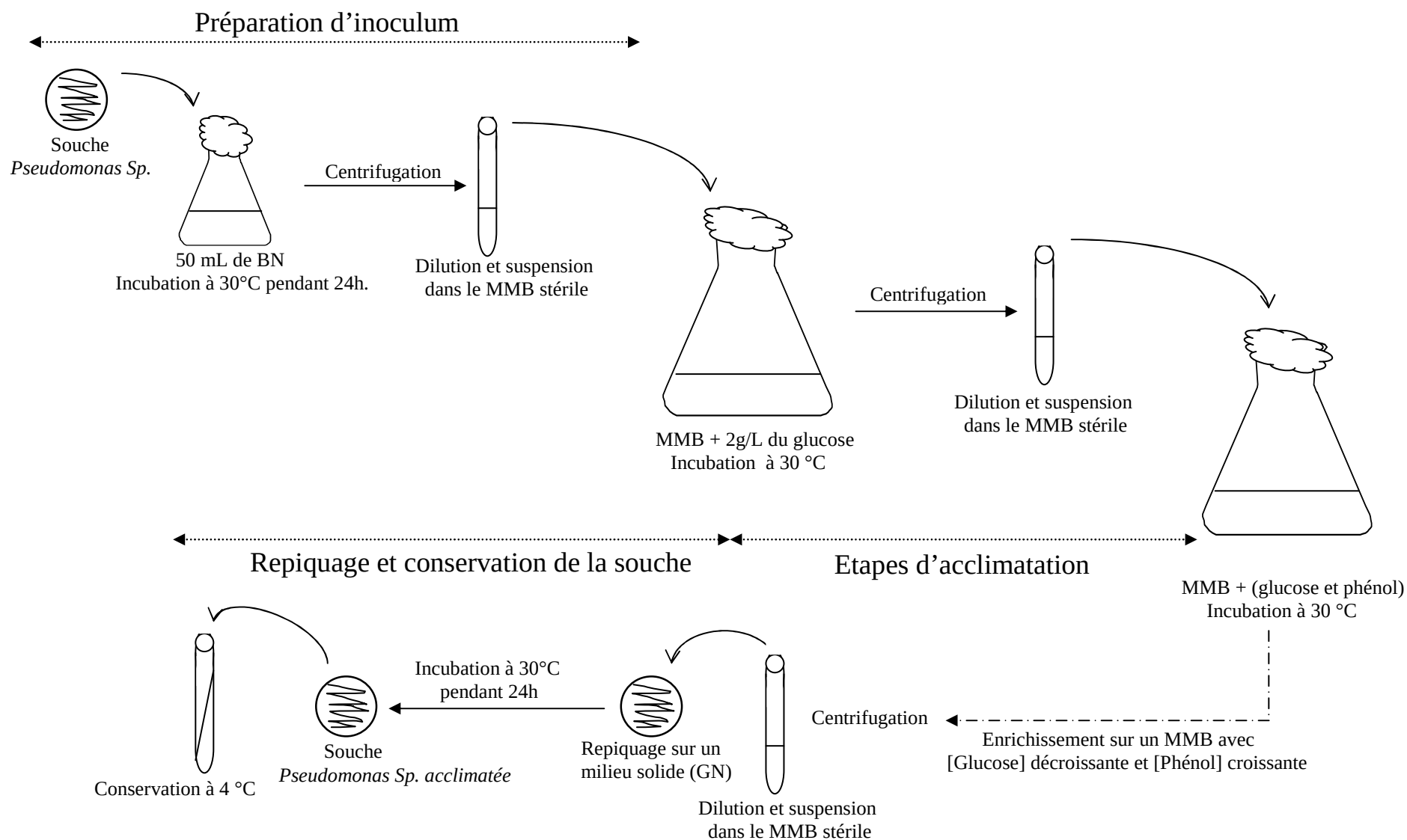


Figure 8 : Protocole expérimental de l'acclimation des *Pseudomonas sp* au phénol.



Figure 9 : Souche *Pseudomonas* sp. acclimatée

Remarque :

- Toutes les opérations ont été effectuées dans une zone stérile en utilisant deux becs bunsen pour éviter toute contamination.
- Toute la verrerie a été stérilisée avant et après utilisation dans l'autoclave (nëve-OT 012) à 120°C pendant 20 min.
- Des repiquages systématiques sont effectués afin de préserver les cultures de *Pseudomonas*.

Tableau 6 : Croissance bactérienne durant la phase d'acclimatation

Expérience (1) : (DO)_{suspension mère} = 0.959 ; MMB avec [glucose] = 2000 mg/L		
Date	Temps (h)	DO (600 nm)
16/04/08	0	0,025
	2	0,033
	4	0,027
17/04/08	22	0,143
	24	0,144
	26	0,145

Expérience (2) : (DO)_{suspension mère} = 0,466 ; MMB avec [glucose] = 2000 mg/L, [phénol] = 10 mg/L

Date	Temps (h)	DO (600 nm)
17/04/08	0	0,020
	2	0,018
	4	0,019
18/04/08	22	0,059
	24	0,065
	26	0,064

Expérience (3) : (DO)_{suspension mère} = 0,305 ; MMB avec [glucose] = 1500 mg/L, [phénol] = 20 mg/L

Date	Temps (h)	DO (600 nm)
18/04/08	0	0,012
	2	0,019
19/04/08	20	0,060
	24	0,069
	26	0,074

Expérience (4) : (DO)_{suspension mère} = 0,412 ; MMB avec [glucose] = 1000 mg/L, [phénol] = 40 mg/L

Date	Temps (h)	DO (600 nm)
19/04/08	0	0,022
21/04/08	44	0,560
	46	0,593
	48	0,600

Expérience (5) : (DO)_{suspension mère} = 1,025 ; MMB avec [glucose] = 750 mg/L, [phénol] = 80 mg/L

Date	Temps (h)	DO (600 nm)
21/04/08	0	0,048
	2	0,049
23/04/08	44	0,255
	46	0,259
	48	0,265

Expérience (6) : (DO)_{suspension mère} = 1,463 ; MMB avec [glucose] = 500 mg/l, [phénol] = 120 mg/L		
Date	Temps (h)	DO (600 nm)
23/04/08	0	0,092
24/04/08	20	0,157
	24	0,161
	26	0,161

Expérience (7) : (DO)_{suspension mère} = 1,100 ; MMB avec [glucose] = 250 mg/l, [phénol] = 160 mg/L		
Date	Temps (h)	DO (600 nm)
24/04/08	0	0,058
	2	0,082
26/04/08	46	0,276
	48	0,284

Expérience (8) : (DO)_{suspension mère} = 0,982 ; MMB avec [glucose] = 100mg/l, [phénol] = 200 mg/L		
Date	Temps (h)	DO (600 nm)
26/04/08	0	0,044
28/04/08	44	0,098
	46	0,102
	48	0,106

Expérience (9) : (DO)_{suspension mère} = 0,704 ; MMB avec [phénol] = 200 mg/L		
Date	Temps (h)	DO (600 nm)
28/04/08	0	0,037
29/04/08	22	0,119
	24	0,128
	26	0,148

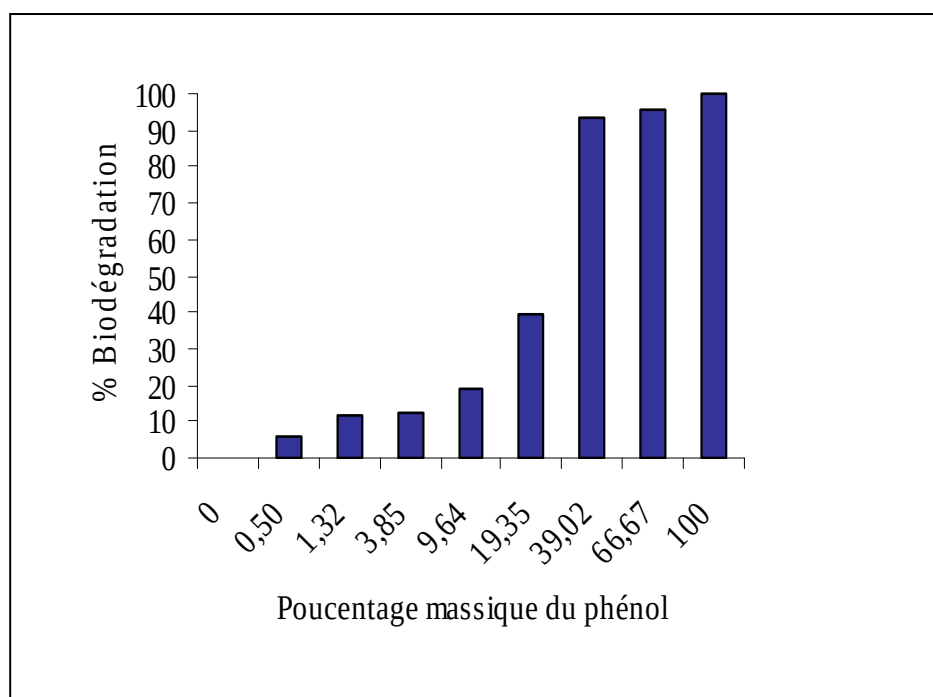


Figure 10 : Pourcentage de biodégradation du phénol durant la phase d'acclimation

II.4 Détermination des paramètres optimaux de croissance

Pour une concentration initiale en phénol de 50mg/L, nous avons étudié l'influence de certains paramètres opératoires tels que le pH, la nature et la concentration de la source d'azote, sur la croissance des bactéries et la biodégradation du phénol. La température et la vitesse d'agitation ont été maintenues constantes et égales respectivement à 30°C et 80 rpm.

Des cultures d'enrichissement sont réalisées dans des erlenmeyers de 500mL munis de cotons cardés et contenant 100mL de MMB. L'inoculum servant à l'ensemencement des cultures est préparé de la même manière que précédemment. Pour chaque série d'expérience, nous avonsensemencé la même quantité d'inoculum à raison de 2mL/50mL de MMB. Les cultures ont été maintenues sous agitation pendant 48h.

II.4.1 Effet du pH

Pour déterminer le pH optimal de la croissance des *Pseudomonas sp*, nous avons examiné la dégradation du phénol par des cultures bactériennes en suspension, pour une concentration en substrat de 50mg/L pendant 48h dans une gamme de pH comprise entre 5 et 9.

D'après les résultats illustrés sur les **figures 13 et 14**, nous remarquons qu'une élévation du pH entraîne une augmentation du taux de croissance et du pourcentage de biodégradation du phénol, des valeurs maximales sont atteintes aux environs d'un pH compris entre 7 et 8. Cependant, pour les valeurs extrêmes de pH, la dénaturation des enzymes peut avoir lieu, ce qui explique la diminution de la densité optique et le faible pourcentage d'élimination du phénol.

Pour la suite de notre étude, un pH optimal de $7,5 \pm 0,2$ à été adopté [49] [50].

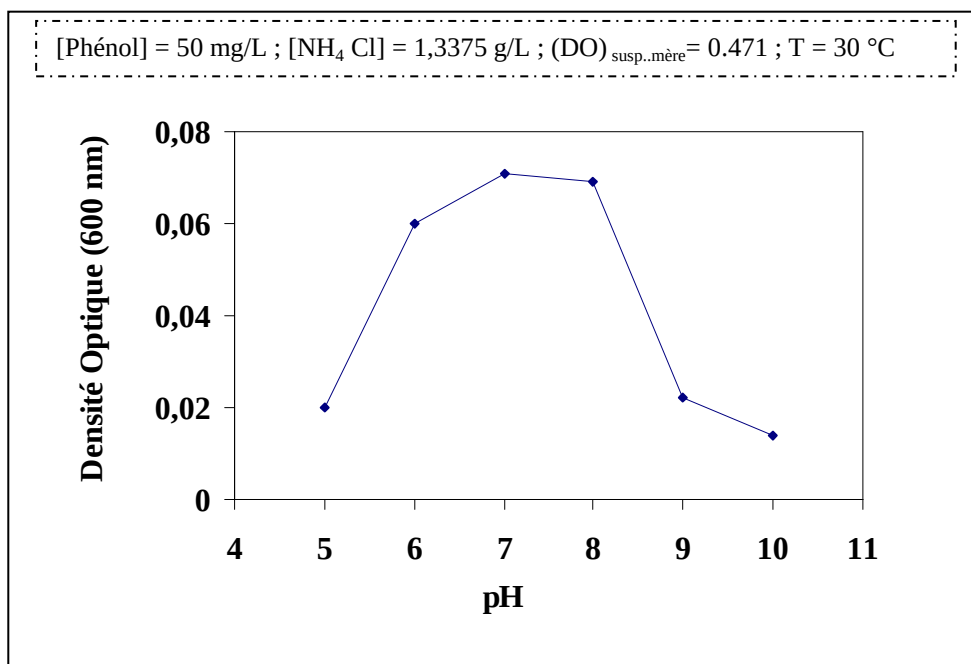


Figure 13 : Effet du pH sur la croissance du *Pseudomonas* sp.

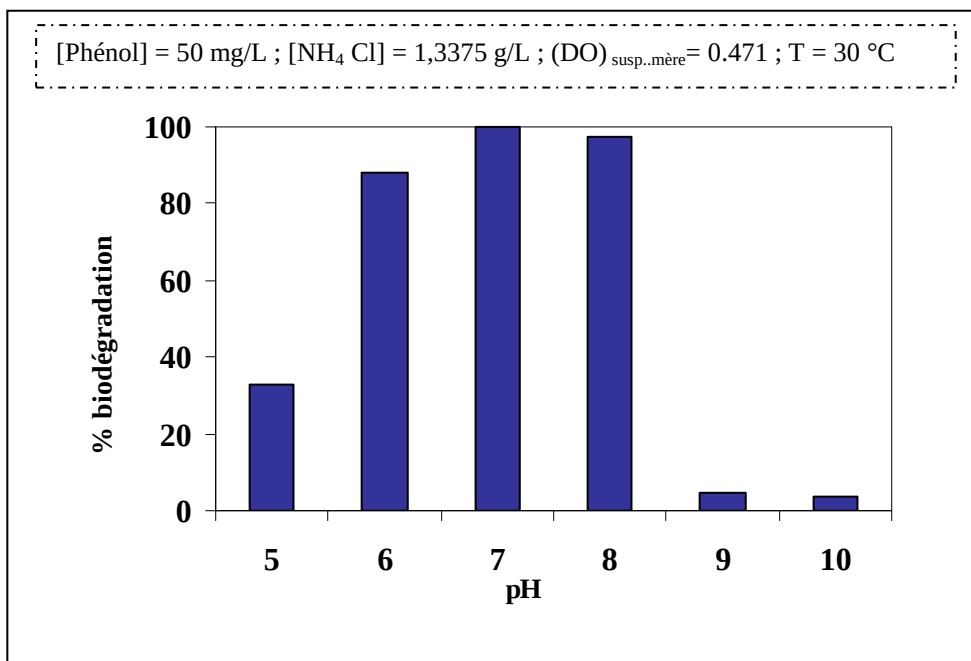


Figure 14 : Effet du pH sur la biodégradation du Phénol.

II.4.2 Effet de la source d'azote

L'azote est la deuxième source de nutrition après le carbone, indispensable pour la croissance bactérienne, ainsi nous avons tenté d'examiner l'influence de la nature de cette source sur la croissance de la souche *Pseudomonas sp.* Les composés testés sont classiques, à savoir le nitrate de potassium KNO_3 et le chlorure d'ammonium NH_4Cl pour une concentration d'azote 0,35g/L. Les autres paramètres sont maintenus constants au cours de l'expérience. Les résultats obtenus et qui sont illustrés sur les **figures 15 et 16**, montrent clairement que l'azote issu des deux composés est assimilé par la bactérie pratiquement de la même manière puisque le taux de croissance ainsi que le pourcentage de biodégradation du phénol sont quasiment identiques.

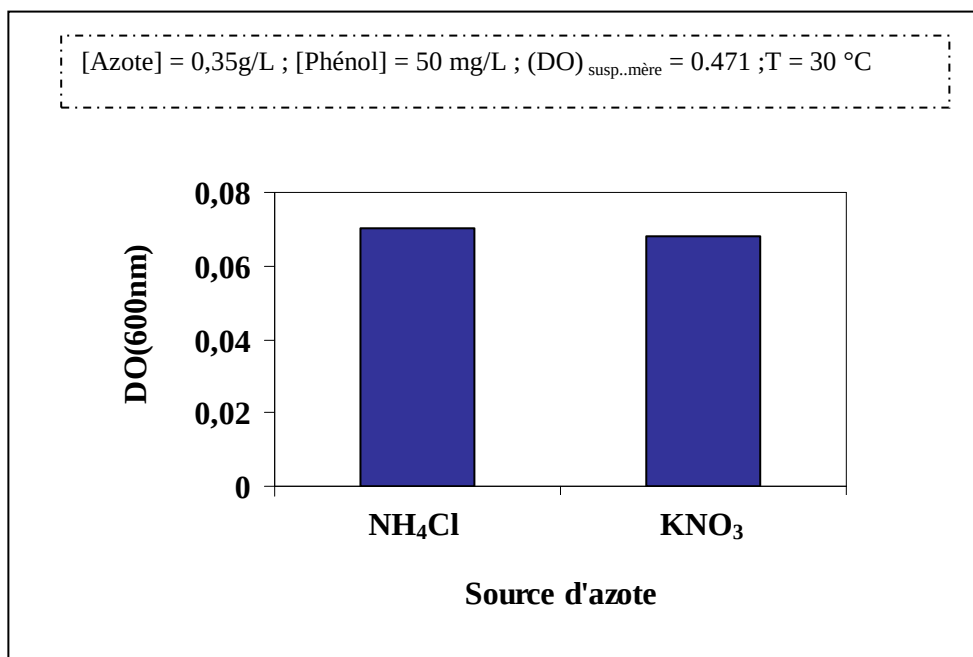


Figure 15 : Effet de la nature de la source d'azote sur la croissance du *Pseudomonas sp.*

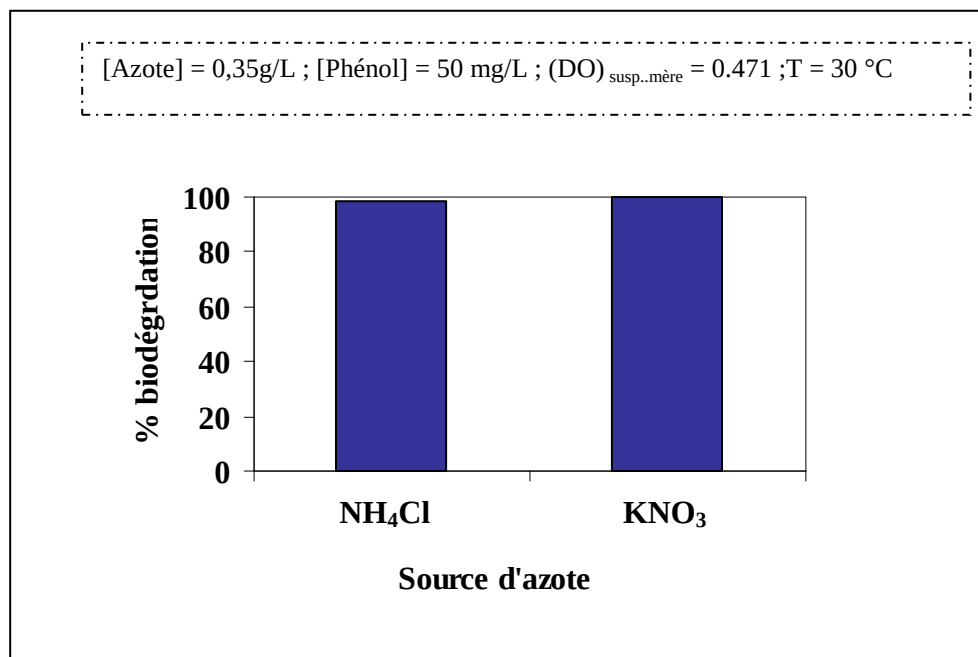


Figure 16 : Effet de la nature de la source d'azote sur la biodégradation du Phénol

II.4.3 Effet de la concentration d'azote

A la suite de l'étude précédente, nous avons utilisé le NH₄Cl comme source d'azote pour la nutrition de la bactérie et nous avons examiné l'effet de la concentration d'azote sur les performances de la biodégradation du phénol. La gamme des concentrations étudiées se situe entre 0,005 et 0,5g/L. La **figure 17** rend compte de l'effet non négligeable de la concentration d'azote sur la croissance bactérienne. En effet, l'augmentation de celle-ci de 0,005 à 0,20g/L conduit à une légère élévation de la densité optique et qui devient très importante lorsque la concentration d'azote passe de 0,2 à 0,35g/L. Un maximum de croissance est obtenu pour une concentration de 0,35g/L. Au delà de cette concentration optimale, une diminution de la densité optique est constatée. Les résultats de la **figure 18** corroborent parfaitement ceux présentés dans la **figure 17**, le pourcentage de biodégradation du phénol est maximal pour la même concentration optimale d'azote

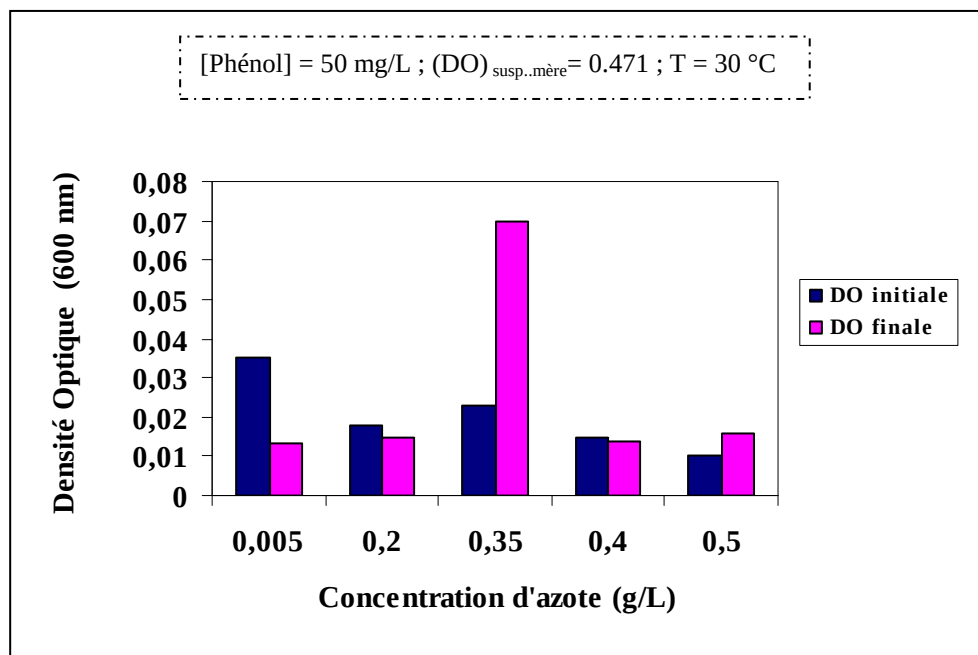


Figure 17 : Effet de la concentration d'azote sur la croissance du *Pseudomonas* sp.

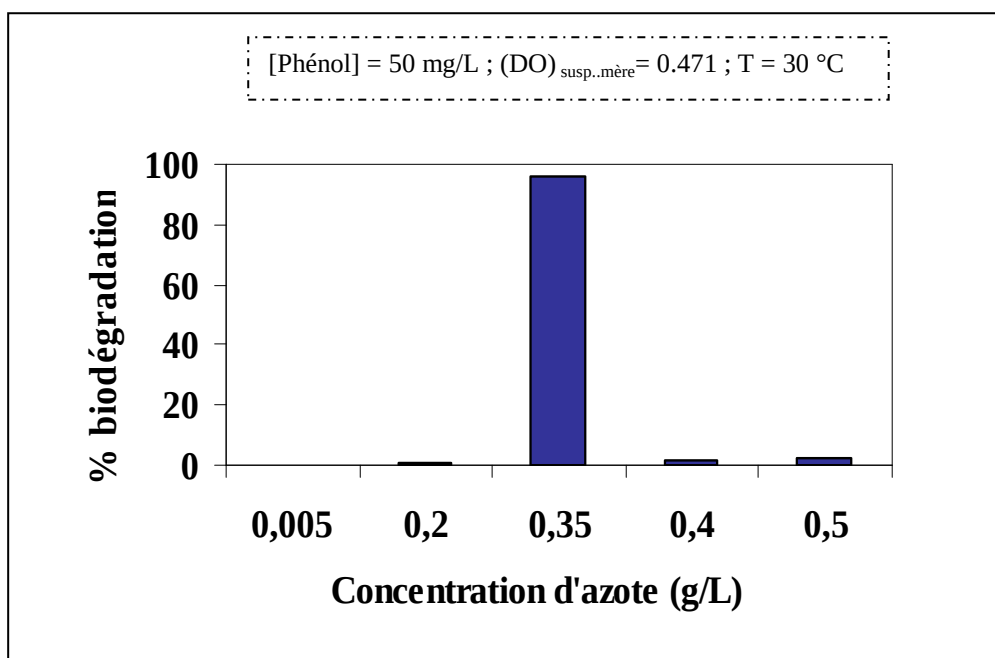


Figure 18 : Effet de la concentration d'azote sur la biodégradation du Phénol

II.5 Etude de la cinétique de dégradation du phénol par les bactéries acclimatées de *Pseudomonas sp*

II.5.1 Milieu et conditions de culture

Un milieu de culture doit contenir la source de carbone, la source d'azote, les sels minéraux et les principaux facteurs de croissance nécessaires à la souche microbienne. Le milieu de culture (**MC**) utilisé dans cette étude est composé de MMB optimisé avec des concentrations initiales de phénol variant de 50 à 400 mg/L.

Afin de suivre la cinétique de dégradation du phénol et la croissance des *Pseudomonas sp*, des cultures d'enrichissement en Batch ont été réalisées dans des erlenmeyers de 1L munis de cotons cardés contenant 200mL de milieu de culture. Ce dernier estensemencé par 8mL d'inoculum.

En parallèle des essais similaires, mais sans inoculation sont effectués (tests témoins), permettant d'évaluer la dégradation abiotique (évaporation, dégradation photochimique...etc.). Les cultures ont été incubées à 30°C sous une vitesse d'agitation de 80rpm. A des intervalles de temps bien déterminés, des prélèvements sont effectués à l'aide des embouts stériles.

Pour un volume donné de milieu de culture, il faut prélever un maximum de 10%, ce qui nous donne dans notre cas un volume de 20 mL pour le total des prélèvements. Pour cela, 8 prélèvements de 2,5mL ont été effectués pour chaque expérience. Ce volume sert à mesurer la densité optique de la suspension bactérienne à 600nm qui peut être convertie en biomasse sèche en se basant sur la courbe d'étalonnage et à déterminer la concentration du phénol après centrifugation en dosant le surnageant par la méthode d'amino-4-antipyrine.



Figure 19 : Photographique du dispositif Expérimental

Pour chaque concentration initiale en phénol, soit 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 mg/L, les résultats de la cinétique de croissance et du pourcentage de biodégradation sont illustrés sur les figures suivantes :

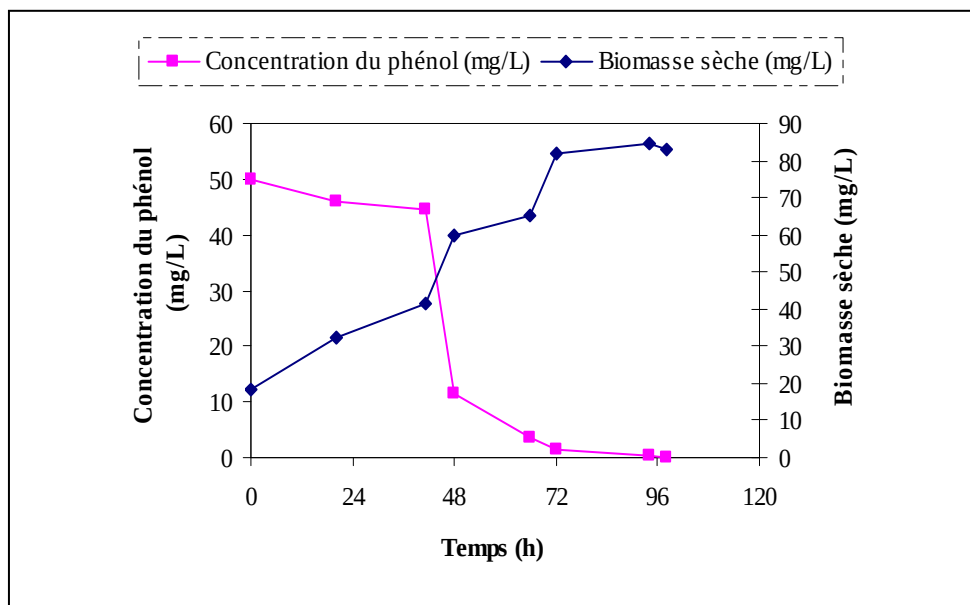


Figure 20 : Cinétique de croissance du *Pseudomonas* sp. et de biodégradation du Phénol à 50 mg/L du phénol

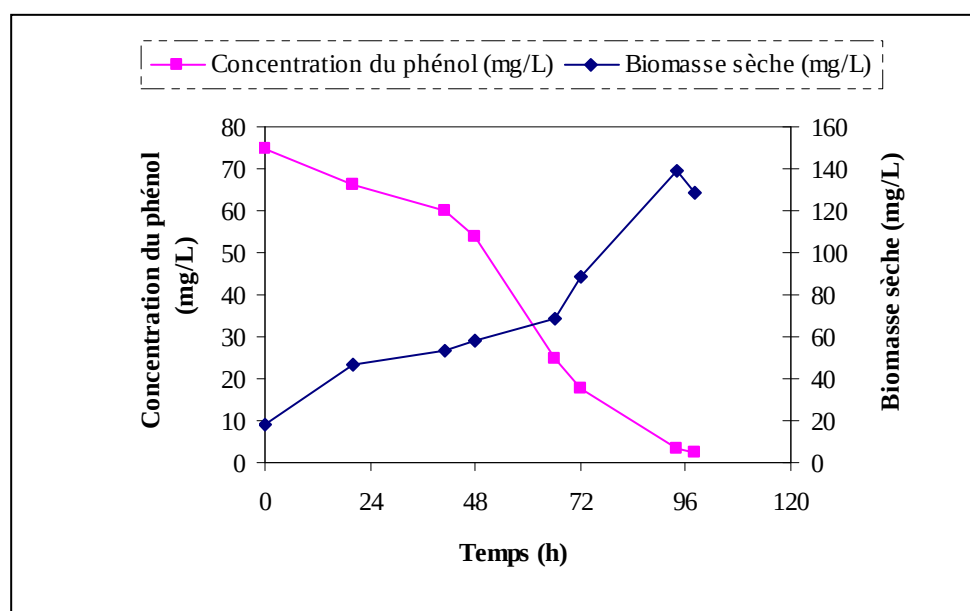


Figure 21 : Cinétique de croissance du *Pseudomonas* sp. et de biodégradation du Phénol à 75 mg/L du phénol

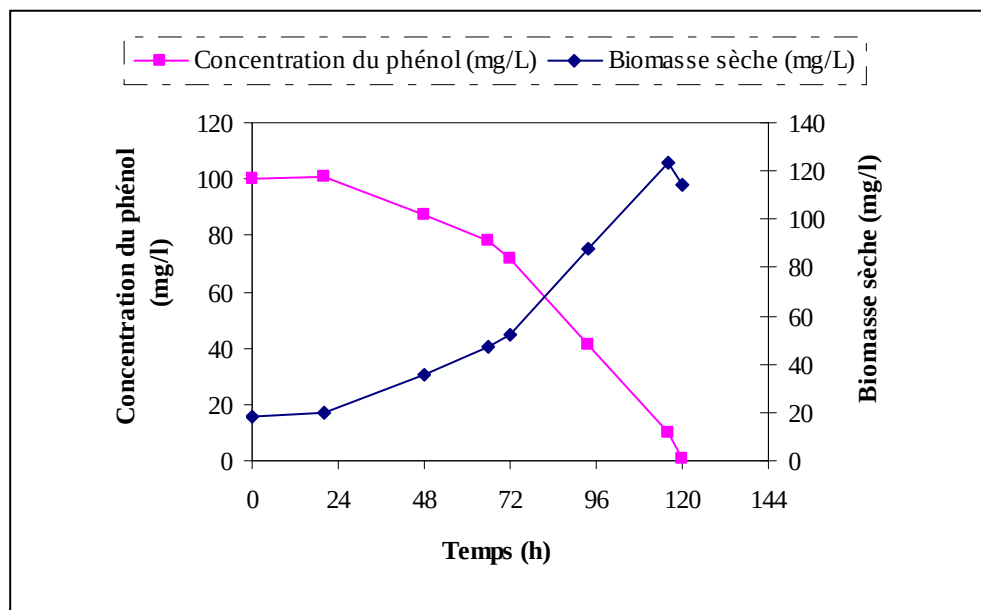


Figure 22 : Cinétique de croissance du *Pseudomonas* sp. et de biodégradation du Phénol à 100 mg/L du phénol

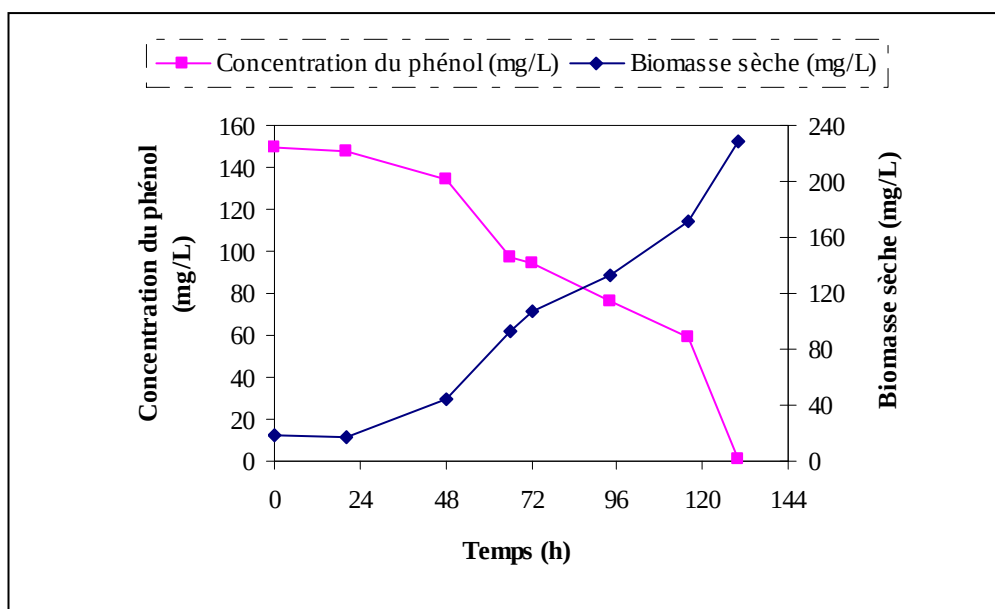


Figure 23 : Cinétique de croissance du *Pseudomonas* sp. et de biodégradation du Phénol à 150 mg/L du phénol

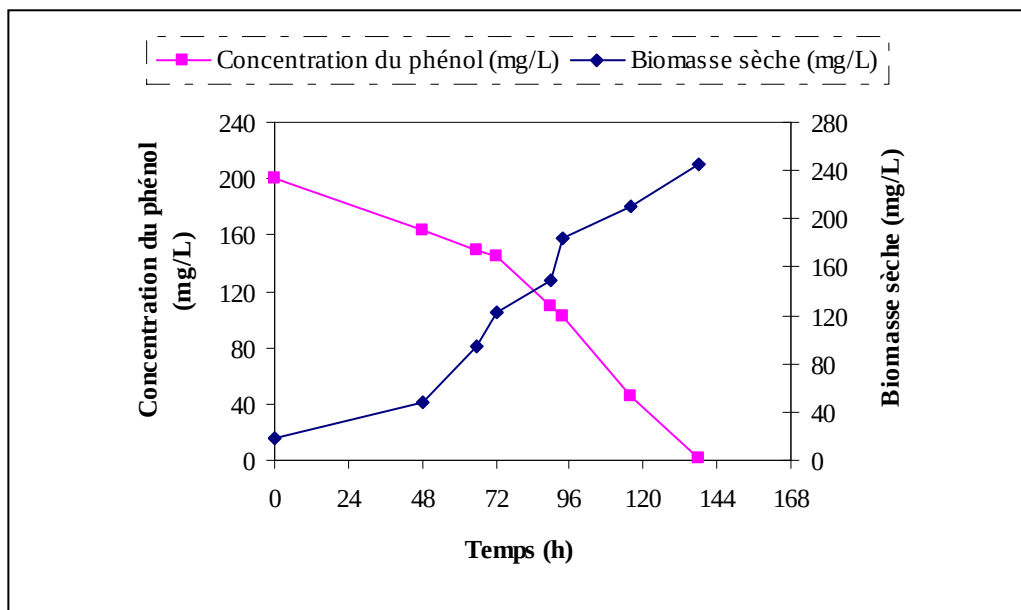


Figure 24 : Cinétique de croissance du *Pseudomonas* sp. et de biodégradation du Phénol à 200 mg/L du phénol

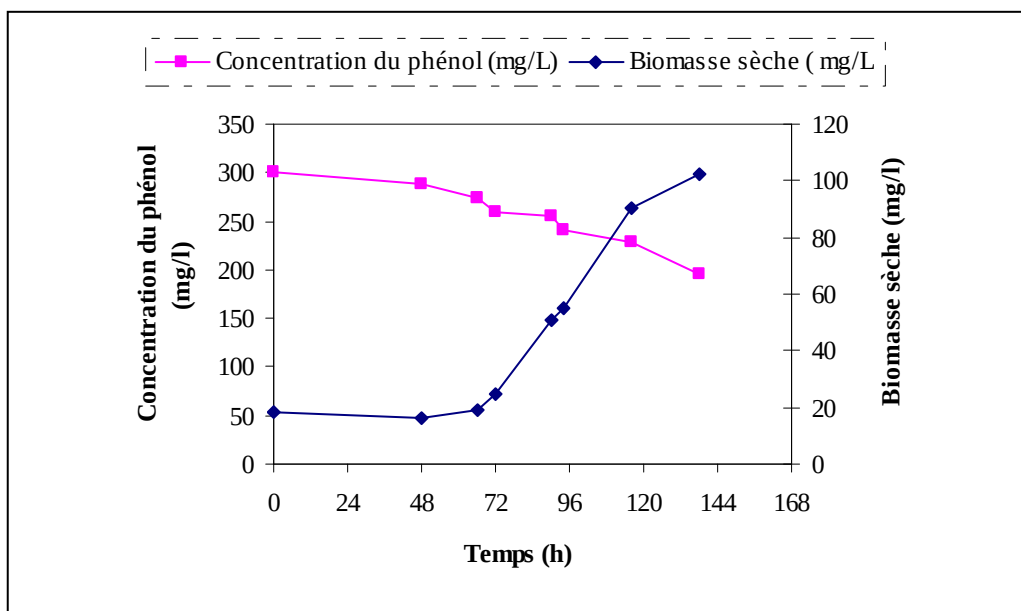


Figure 25 : Cinétique de croissance du *Pseudomonas* sp. et de biodégradation du Phénol à 300 mg/L du phénol

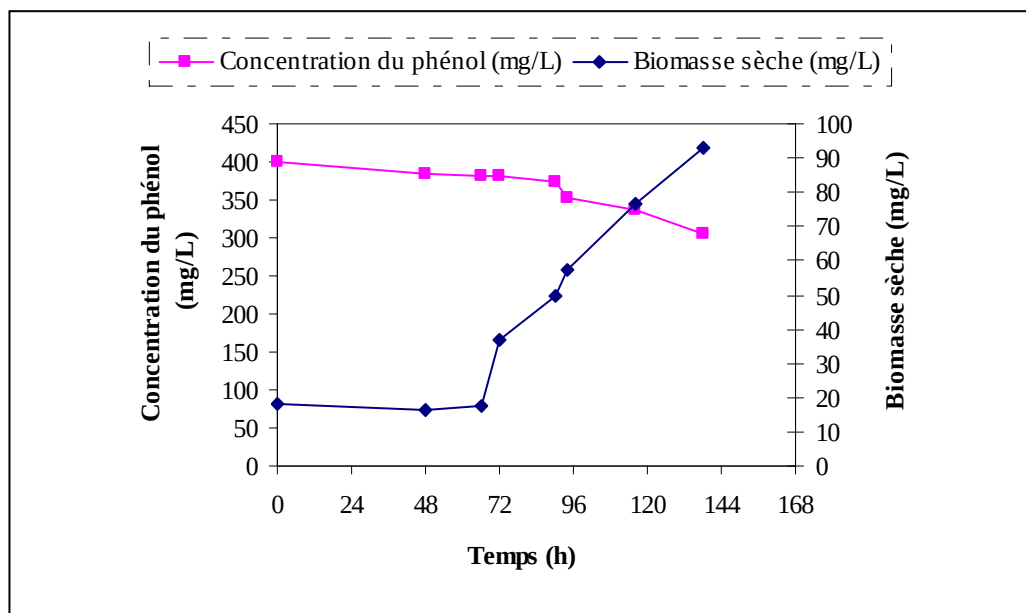


Figure 26 : Cinétique de croissance du *Pseudomonas* sp. et de biodégradation du Phénol à 400 mg/L du phénol

Les figures suivantes regroupent les résultats de la cinétique de croissance et du pourcentage de biodégradation pour différentes concentrations initiales du phénol.

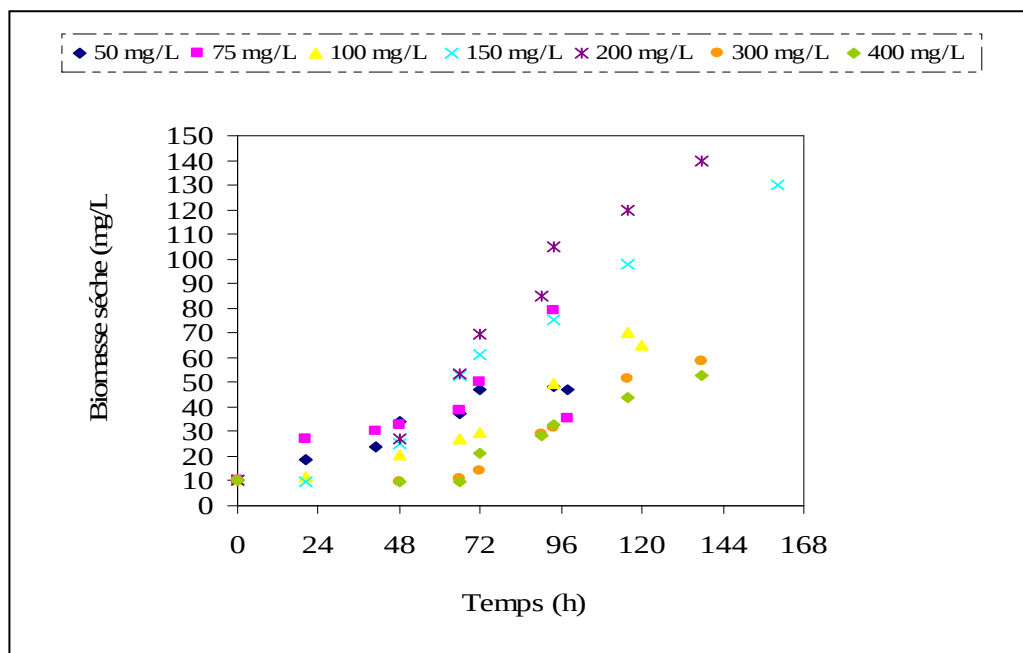


Figure 27: Cinétique de croissance du *Pseudomonas sp.*

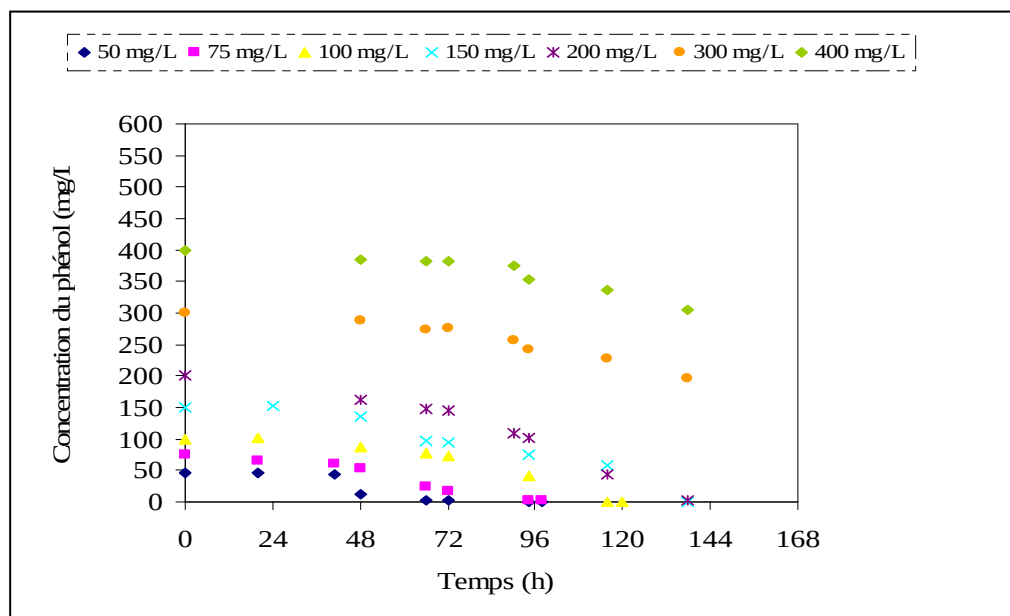


Figure 28 : Cinétique de biodégradation du Phénol par la souche *Pseudomonas sp.*

II.5.2 Interprétation des résultats

Les résultats de ces cinétiques montrent que plus la concentration initiale du phénol est élevée plus le temps nécessaire pour la dégradation complète du phénol est long.

Aux concentrations élevées, nous observons un temps de latence relativement important bien que l'inoculum employé dans ces expériences a été acclimaté [9]. Le temps de latence a été observé jusqu'à 66h pour les concentrations 300 et 400 mg/L. **Hill et Robinson** [51]. Ont conclu que non seulement l'effet inhibiteur de substrat peut être à l'origine de ce temps de latence mais également la quantité d'inoculum pourra affecter la durée de ce temps. Par conséquent, pour éviter la phase de latence, une grande quantité d'inoculum devra être utilisée.

Après la phase de latence, nous observons la phase de croissance exponentielle, au cours de laquelle la vitesse de croissance et de biodégradation augmente avec la concentration de substrat jusqu'à un certain seuil. Aux concentrations initiales en phénol allant de 50 à 200 mg/L, le rendement de biodégradation atteint 100 % au bout de 3 à 6 jours d'incubation. Tandis que, pour les concentrations élevées, au delà de 200 mg/L, le rendement d'élimination du phénol varie entre 26 et 17 %, cela est attribué à l'effet d'inhibition par excès de substrat.

D'autres part, durant la période d'incubation (6 jours), nous constatons l'absence de la phase de déclin. Différentes explications ont été formulées par les chercheurs pour expliquer ce constat, ils attribuent l'absence de la phase de déclin à la résistance et à la peu exigence des pseudomonas dans les milieux appauvris en nutriments (source de carbone ; source d'azote ; oxygène) [24]. **Reardon et coll.**, [52]. expliquent la croissance bactérienne après la consommation totale du phénol par la formation des métabolites intermédiaires qui sont utilisés comme source de nutriment par les bactéries.

III. Détermination des paramètres cinétiques de croissance

III.1 Vitesse spécifique de croissance [54]

La vitesse spécifique de croissance est un paramètre qui correspond à l'augmentation de la population bactérienne par unité de temps, il est déterminé lors de la phase exponentielle de croissance. Sa valeur varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance.

Cette grandeur est obtenue à partir de l'équation suivante :

$$\mu = \frac{\text{Ln} \left(\frac{X}{X_0} \right)}{t} \quad (1)$$

Avec :

X : Concentration en biomasse sèche (mg/L)
 X_0 : Concentration initiale en biomasse sèche (mg/L)
 t : Temps d'incubation (h)

Pour chaque concentration initiale du phénol, des valeurs de μ sont déterminées en mesurant la pente de la courbe $\ln(X/X_0) = f(t)$ dans la phase de croissance (**Figure 29**). Le coefficient de corrélation de ces droites se situe entre 0.96 et 0.99.

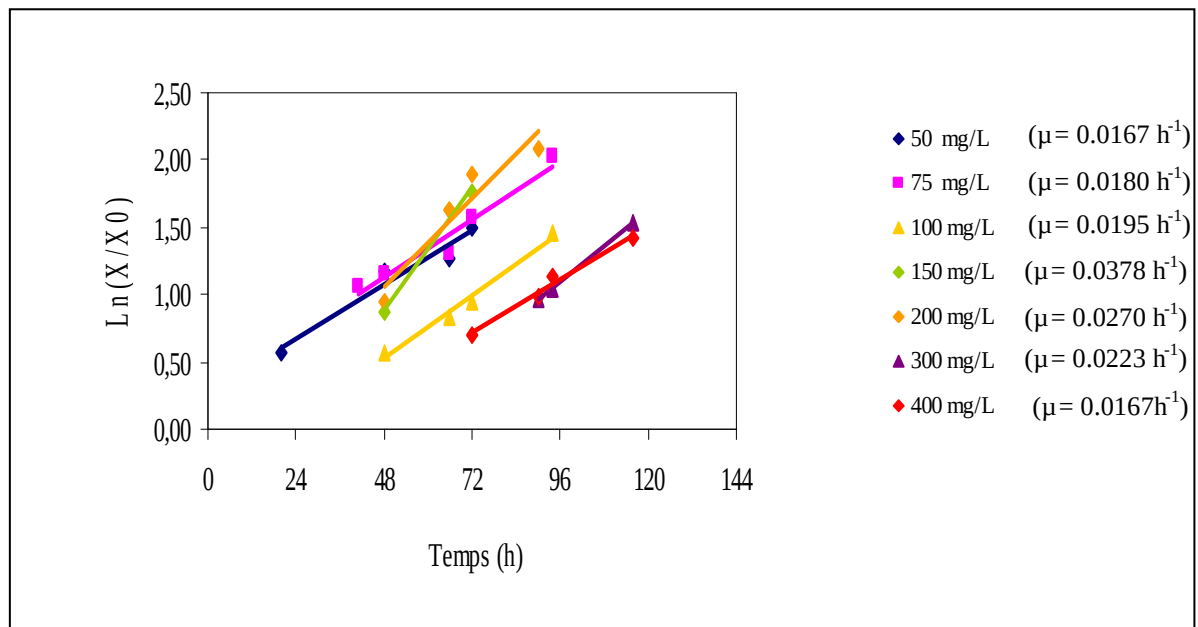


Figure 29: Détermination de la vitesse spécifique de croissance μ .

Sur la **Figure 30**, Nous avons représenté la vitesse spécifique de croissance en fonction de la concentration initiale du phénol. Nous remarquons que la courbe obtenue présente un maximum d'une valeur de 0.0378 h^{-1} vers une concentration en phénol de 150 mg/L et au-delà de celle-ci, la vitesse décroît, ce qui peut se traduire par un effet d'inhibition dû à un excès de substrat. En effet, l'effet inhibiteur par le phénol pour l'espèce *Pseudomonas* a été rapporté par plusieurs chercheurs. En particulier, **Kumar et coll., [48]**, **Monteiro et coll., [59]** ont étudié la biodégradation du phénol par la souche *Pseudomonas putida* dans des cultures en batch dont la gamme de concentration se situe entre 10 et 1000 mg/L . Ils ont trouvé que le taux de croissance spécifique augmente avec l'augmentation de la concentration en phénol jusqu'à une certaine valeur seuil (100 mg/L) puis diminue pour les concentrations élevées.

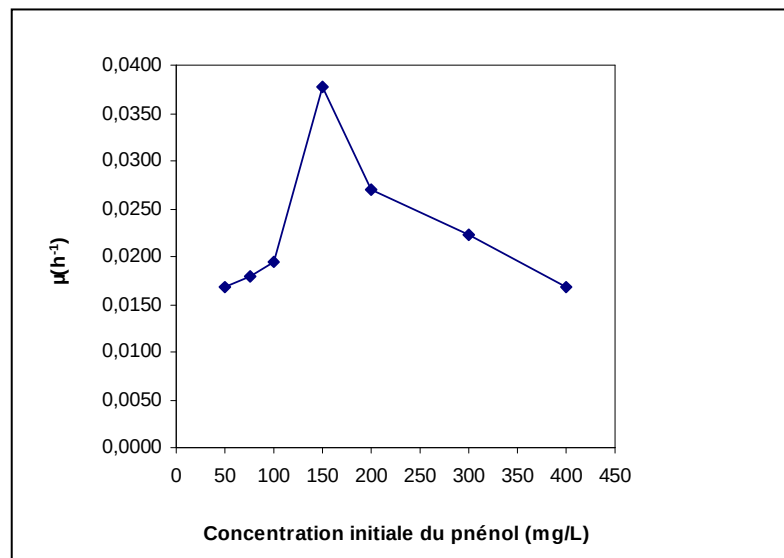


Figure 30 : Influence de la concentration du phénol sur la vitesse spécifique de croissance

III.2 Temps de doublement [56]

Le temps de doublement correspond au temps nécessaire pour qu'une population de cellules double en nombre, il est donné par l'expression suivante :

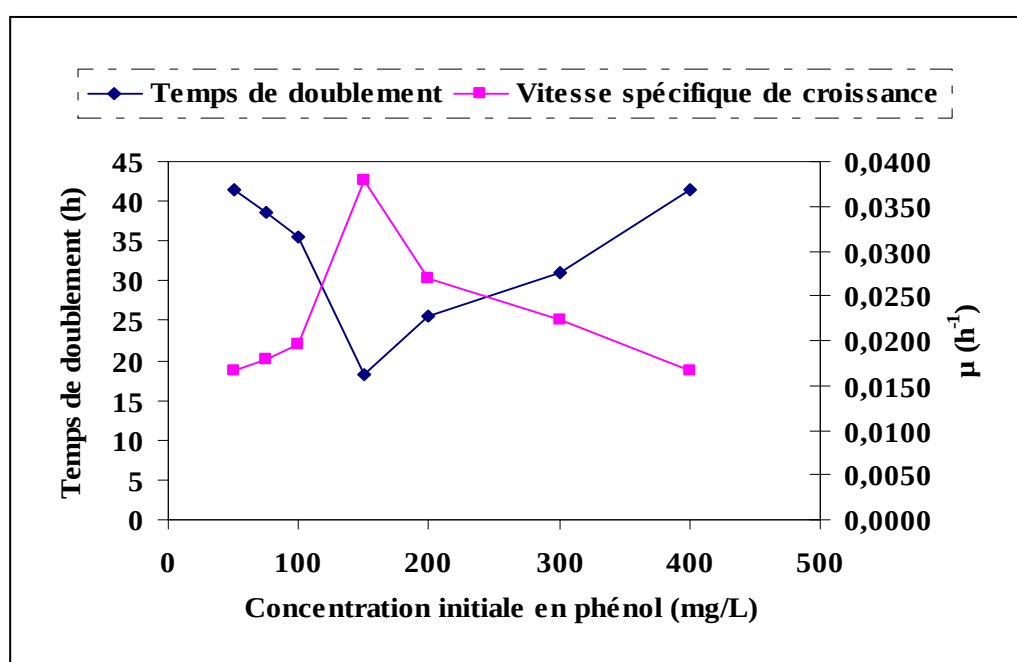
$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

Les valeurs du temps de doublement obtenues sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Temps de doublement en fonction de la concentration initiale en phénol.

Concentration du phénol (mg/L)	Temps de doublement (h)
50	42
75	39
100	36
150	18
200	26
300	31
400	42

D'après les résultats consignés dans ce tableau et illustrés dans la **figure 31**, nous remarquons que le temps de doublement des bactéries diminue avec la concentration du phénol. Pour la concentration de 150 mg/L, pour laquelle la vitesse de croissance trouvée est maximale, le temps de doublement de population est minimal (18h). Au delà de cette concentration, le doublement de population augmente et devient plus lent. En effet, pour les faibles concentrations en substrat (phénol), la croissance bactérienne est faible et au-delà de la concentration optimale, le phénomène d'inhibition par excès de substrat freine la croissance bactérienne et donc le temps de doublement devient important.

**Figure 31 :** Influence de la concentration du phénol sur le temps de doublement d'une population bactérienne et la vitesse spécifique de croissance

III.3 Coefficient de rendement en biomasse [54]

Le rapport entre la quantité de biomasse produite et la quantité du substrat consommée est mesuré par un coefficient connu sous le nom de coefficient de rendement en biomasse noté par $Y_{X/S}$, durant la phase exponentielle.

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

Avec :

X_0 :	Concentration initiale en biomasse sèche	(mg/L)
X_f :	Concentration finale en biomasse sèche	(mg/L)
S_0 :	Concentration initiale en substrat	(mg/L)
S_f :	Concentration finale en substrat	(mg/L)

Le rendement est un indice de l'efficacité de conversion des éléments nutritif en matériel cellulaire et dépend de :

- Divers paramètres physiques de culture.
- Degré de polymérisation de substrat.
- Voies métaboliques.
- Vitesse spécifique de croissance.
- Etat d'oxydation de la source de carbone et des éléments nutritifs.

Si on trace $(X_f - X_0)$ en fonction de $(S_0 - S_f)$, on obtient bien une droite de pente égale au rendement comme le montre la **figure 32**.

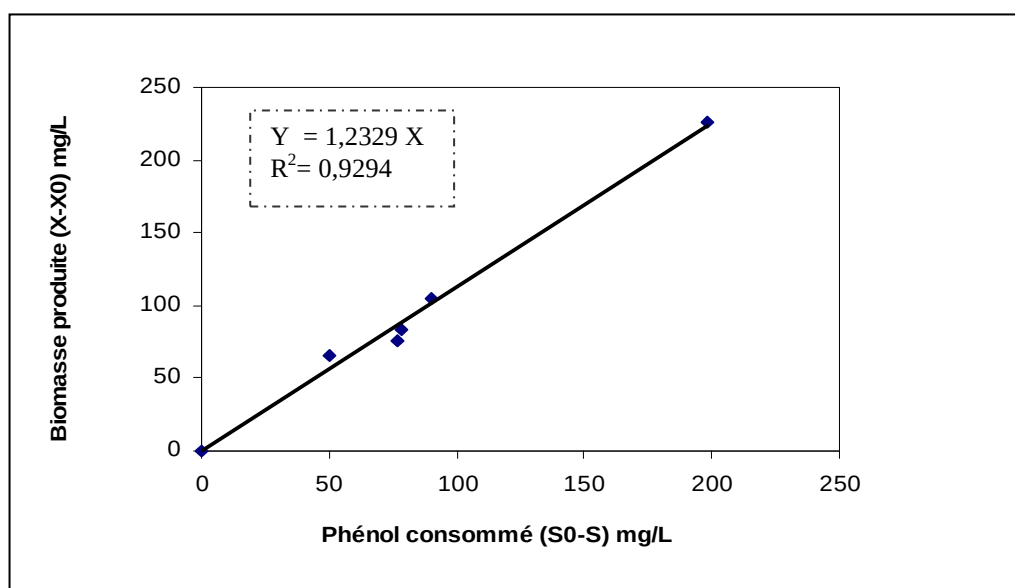


Figure 32 : Evolution de la quantité de biomasse produite en fonction de la quantité de phénol consommé

D'après les résultats représentés dans la figure ci-dessus, on constate que la quantité de biomasse produite est proportionnelle à la quantité du substrat consommée. Ceci rend compte de la bonne assimilation du substrat (phénol) par les bactéries. La valeur du coefficient de rendement trouvée est de 1,23. Ce résultat a été déjà trouvé par *Bor -Yann et coll.*, [53].

III.4 Vitesse de biodégradation [57]

A partir de la vitesse spécifique de croissance et le rendement en biomasse, on peut déterminer la vitesse de biodégradation du substrat à partir de l'équation suivante :

$$V = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad (4)$$

Avec :

X : Concentration en biomasse sèche (mg/L)

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

$Y_{X/S}$: Rendement en biomasse (mg de biomasse produite/mg de phénol consommé)

Pour $X = X_0$, la vitesse initiale de biodégradation V_0 est représentée dans la **figure 33** pour chaque concentration initiale du phénol.

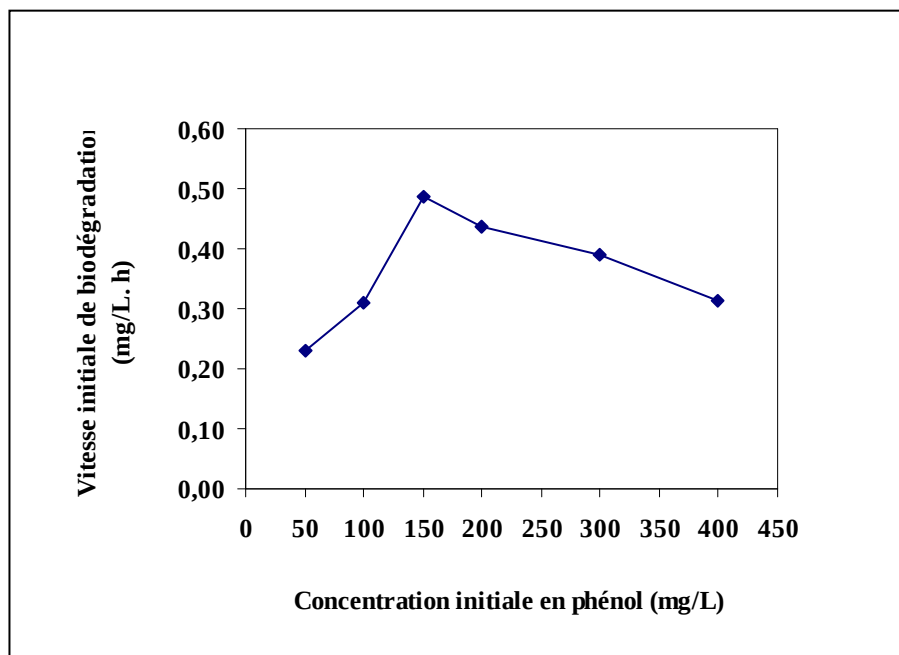


Figure 33 : Variation de la vitesse initiale de biodégradation du phénol en fonction de la concentration initiale.

La courbe de la **figure 33** montre que la vitesse initiale de biodégradation du phénol par les *Pseudomonas* sp. augmente avec la concentration initiale du phénol et atteint un maximum pour une concentration de 150mg/L pour laquelle la vitesse spécifique de croissance est importante. Au delà de cette concentration, une élévation de la concentration en phénol entraîne une diminution de la vitesse initiale de biodégradation. Ceci peut s'expliquer par le phénomène d'inhibition par excès de substrat.

IV. Modèles mathématiques [55]

Modéliser un processus consiste à établir des équations mathématiques qui représentent à tout instant, avec une certaine approximation, le comportement réel du système. Dans le cas du processus de dégradation bactérienne du substrat, plusieurs modèles ont été proposés pour décrire ce comportement, les plus classiques et surtout fréquemment utilisés dans la littérature sont les modèles de Monod et Haldane.

1. Modèle de MONOD

Le modèle de Monod (Monod, 1949) est basé sur l'équation de Michaelis et Menten de dégradation de substrat par des enzymes [60].

L'équation de la cinétique non-inhibitrice de Monod est comme suit :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (5)$$

Avec :

$\mu_{\max}$:	Vitesse spécifique maximale de croissance	(h ⁻¹)
S :	Concentration en substrat	(mg/L)
K_s :	Constante de saturation (appelée également constante de Michaelis)	(mg/L).

Comme la croissance cellulaire repose sur un grand nombre de réaction enzymatique, donc on peut dire que la constante de Monod (**K_s**) mesure l'affinité de l'enzyme pour le substrat qui est d'autant plus grande que la valeur de cette constante est faible [61].

2. Modèle de HALDANE

2.1 Principe et équation du modèle

Le modèle de Haldane (Haldane, 1930), à l'origine proposé pour décrire l'effet de l'inhibition compétitive de substrat d'une réaction enzymatique, a été adopté pour décrire l'inhibition de la croissance microbienne (Andrews.J.F., 1968) [55].

L'équation de la cinétique inhibitrice de Haldane s'exprime comme suit :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (6)$$

Avec :

K_I : Constante d'inhibition (mg/L)

L'analyse qualitative des résultats expérimentaux fournit un cadre sur le quel un modèle mathématique approprié est établi.

- Premièrement, le phénol peut être utilisé par les *Pseudomonas* sp. comme seule source de carbone et d'énergie.
- Deuxièmement ; la croissance cellulaire sur le phénol montre des effets d'inhibition aux concentrations élevées en substrat, supérieures à 150 mg/L.

Pour représenter la cinétique de croissance des composés inhibiteurs, plusieurs modèles cinétiques ont été proposés et qui sont regroupés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Modèles d'inhibition du substrat [55].

Référence	Modèle
<i>Haldane (1930)</i>	$\mu = \frac{\mu_{\max}}{\left(K_s + S + \left(\frac{S^2}{K_i} \right) \right)}$
<i>Webb (1963)</i>	$\mu = \frac{\mu_{\max} S \left(1 + \left(\frac{S}{K} \right) \right)}{\left(S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_i} \right) \right)}$
<i>Aiba et al (1968)</i>	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{\left(S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_i} \right) \left(1 + \frac{S}{K} \right) \right)}$
<i>Yano et al. (1969)</i>	$\mu = \mu_{\max} S \frac{\exp\left(\frac{-S}{K_i}\right)}{(S + K_s)}$
<i>Yang et Humphrey (1975)</i>	$\mu = \frac{\mu_{\max}}{\left(1 - \frac{K_s}{S} - \left(\frac{S}{K_i} \right)^2 \right)}$

Parmi ces modèles, le modèle de Haldane décrit précédemment, a été choisi pour sa simplicité mathématique et son application large dans la littérature.

2.2 Détermination des constantes du modèle de Haldane

La détermination des constantes du modèle s'effectue par une estimation non linéaire basée sur la technique des moindres carrés itérative en utilisant la méthode de Levenberg-Marquardt à l'aide du logiciel **Statistica 6.0 [74]**. Cependant, pour appliquer cette méthode, il faut introduire des valeurs de ces constantes que le logiciel considérera comme valeurs initiales dans la régression. Ainsi, une méthode approximative a été appliquée pour accéder à ces valeurs.

Pour les concentrations élevées en substrat ($S \gg K_s$), l'équation **(6)** peut être simplifiée :

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{1 + \frac{S}{K_I}} \quad (6)$$

Après la linéarisation de l'équation (7), on obtient l'équation suivante :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{S}{K_I \mu_{\max}} \quad (7)$$

Le tracé de la courbe $1/\mu$ en fonction de la concentration initiale en substrat (phénol) dans la zone d'inhibition (concentration en phénol comprises entre 200 et 400mg/L) donne une droite de pente $(1/K_I \cdot \mu_{\max})$ et d'ordonnée à l'origine $1/\mu_{\max}$.

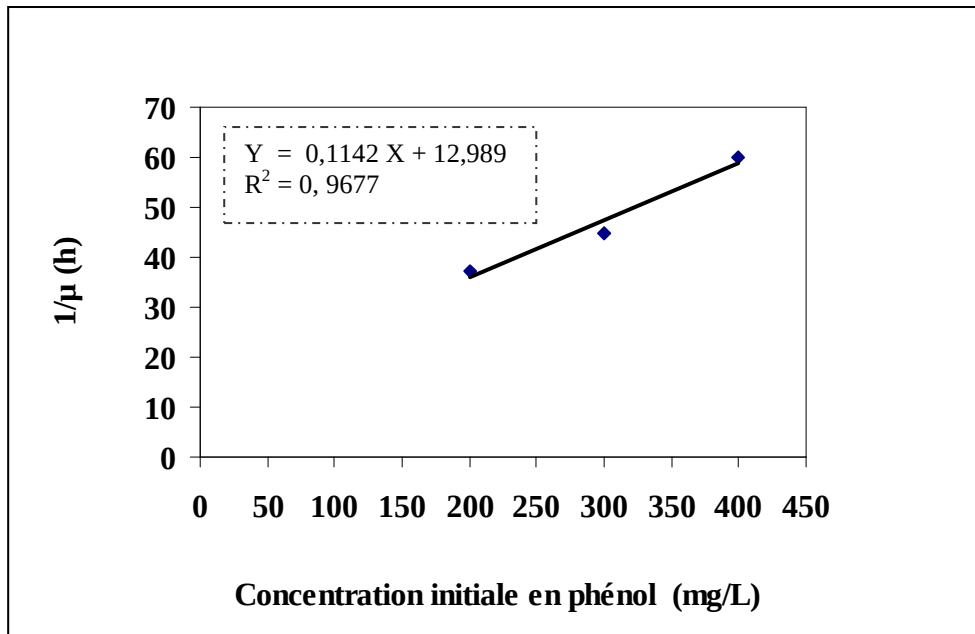


Figure 34 : Linéarisation de l'équation de Haldane

On obtient les valeurs suivantes :

- $\mu_{\max} = 0,077 \text{ h}^{-1}$
- $K_I = 114 \text{ mg/L}$

La vitesse spécifique maximale (μ^*) peut être déterminée à partir de la première dérivée de l'équation (6), ce qui conduit à l'équation (9) :

$$\mu^* = \frac{\mu_{\max}}{1 + 2\sqrt{\frac{K_s}{K_i}}} \quad (9)$$

La concentration en substrat pour laquelle la vitesse spécifique de croissance est maximale (S^*) est égal à 150 mg/L.

La valeur de la constante de saturation K_s est calculée à partir de l'expression suivante :

$$S^* = \sqrt{K_s K_i} \quad (10)$$

D'où :

$$K_s = \frac{(S^*)^2}{K_i} \quad (11)$$

On obtient :

- $K_s = 198 \text{ mg/L}$.

L'analyse par estimation non linéaire a permis d'évaluer les valeurs des constantes du modèle de Haldane. Les valeurs obtenues sont :

- $\mu_{\max} = 0,114 \text{ h}^{-1}$
- $K_s = 288,97 \text{ mg/L}$
- $K_i = 97,88 \text{ mg/L}$

Après substitution des ces valeurs dans l'équation **(6)** de la vitesse de croissance, on obtient :

$$\mu = \frac{0,114 S}{288,97 + S + \frac{S^2}{97,88}} \quad (12)$$

2.3 Interprétation des résultats

La comparaison des valeurs de ces constantes cinétiques avec celles rapportées dans la littérature est illustrée dans le **tableau 9**.

A l'observation des données du **tableau 9**, on remarque que les valeurs du taux de croissance spécifique maximum $\mu_{\max}$ et du coefficient d'inhibition de substrat K_i sont dans la gamme des valeurs trouvées pour le système (phénol / *Pseudomonas*). Cependant, la valeur du coefficient de saturation de substrat K_s obtenue dans notre étude est supérieure à celles évoquées dans la littérature. Ce qui se traduit par une valeur élevée du rapport $K_s/K_i = 2.95$.

D'après **Alper et coll., [42]**. L'équation (9) montre que le degré d'inhibition est déterminé par le rapport K_s/K_i et non par la valeur de K_i seule. En effet, plus ce rapport est grand, plus la vitesse spécifique maximale μ^* sera faible relativement à $\mu_{\max}$, ainsi le degré d'inhibition sera important [70].

Comparativement aux valeurs rapportées dans la littérature (**tableau 9**), la valeur du degré d'inhibition trouvée dans notre étude est plus importante (2.95). Cette variabilité peut être due soit aux divers facteurs tels que : [71] [72].

- La quantité d'inoculum.
- La composition du MMB.
- Les espèces microbiennes prédominantes.
- Les différents facteurs environnementaux.

Soit à la concentration en phénol utilisée pour acclimater la bactérie. En effet, la souche *Pseudomonas* sp. a été acclimatée à une concentration de 200mg/L dans notre étude, cependant dans la plus part des travaux de recherches publiés, la concentration en phénol est de l'ordre de 1 à 2g/L.

Tableau 12 : Comparaison des paramètres cinétiques de croissance déterminés par plusieurs chercheurs.

Souche utilisée	Système	Gamme de Concentration (mg/L)	Modèle de Haldane			Autres paramètres		Réf.
			$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	K _S (mg/L)	K _I (mg/L)	T (°C)	pH	
Pseudomonas Sp.	Batch	50 – 400	0,114	288,97	97,88	30	7,5±0.2	Présente Etude
Pseudomonas Sp.	Batch	-	0,270	56,70	249,08	30	-	[61]
Pseudomonas Sp.	Batch	0 – 170	0,325	8,20	170,00	21	6,7	[66]
Pseudomonas putida F1.	Batch	50	0,051	18,00	430	30	7	[67]
Pseudomonas putida	Batch	100 - 1000	0,060	191	800	30	-	[68]
Pseudomonas fluorescent.	Batch	20 – 170	0,074±0.002	1,019±0,811	350±35	25	-	[69]
Pseudomonas putida Q5.	Batch	≤ 200	0,119	5,27	377	10	6,7	[71]
Pseudomonas putida (CCRC 14365)	Batch	25 - 400	0,245	0,129	12,6	30	7	[47]
Pseudomonas putida (ATCC 17484)	Batch	< 200	0,388	1,06	903	30	6,5 - 6,8	[72]
Pseudomonas putida (DSM 548)	Batch	10 - 100	0,436	6,19	54,1	26	6,8 - 6,3	[62]
Culture mixte	Batch	-	0,143	87,45	107,06	25	-	[74]
Culture mixte	Batch	-	0,190	75	449	25	-	[75]

2.4 Comparaison des résultats expérimentaux avec ceux du modèle

La confrontation des résultats expérimentaux avec ceux obtenus à partir du modèle de Haldane est représentée dans la **figure 33**.

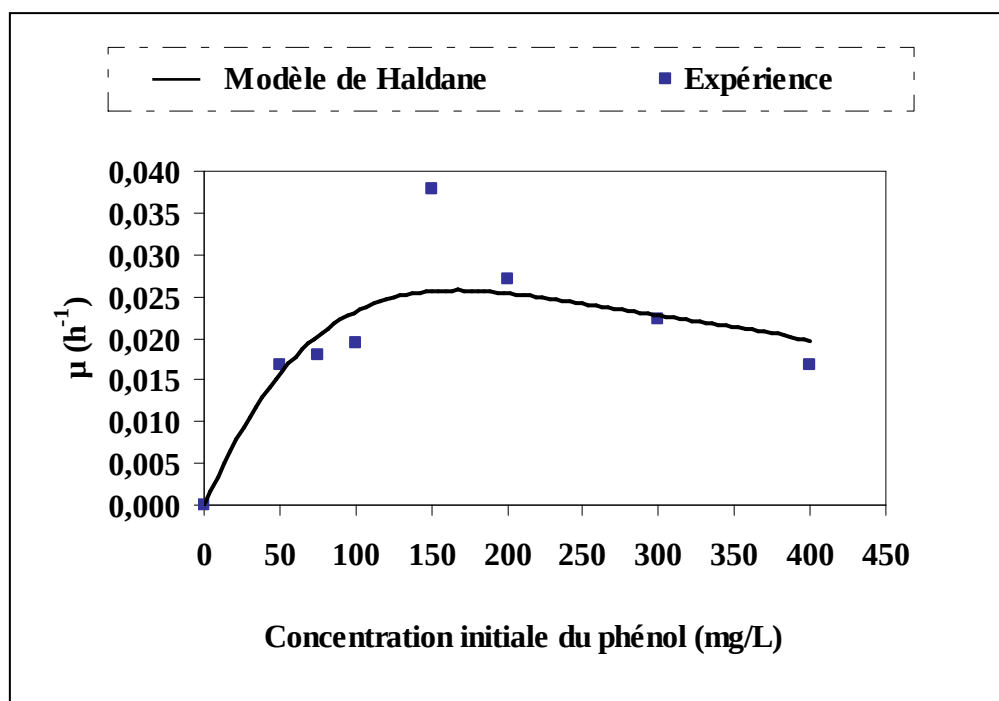


Figure 33 : Evolution de la vitesse spécifique de croissance de la souche *Pseudomonas sp.* avec La concentration initiale du phénol.

Comme il est montré dans la **figure 33**, le modèle de Haldane décrit d'une manière plus ou moins satisfaisante les données expérimentales dans l'intervalle de concentrations en phénol étudié. En effet, nous observons un écart important entre les valeurs expérimentales et calculées au voisinage immédiat de la concentration en phénol de 150mg/L pour laquelle la vitesse de croissance est optimale. A cette concentration, la valeur de la vitesse spécifique estimée par le modèle de Haldane ($\mu_{\max} = 0,026 \text{ h}^{-1}$) est inférieure à la valeur maximale réelle ($0,0378 \text{ h}^{-1}$). Ce résultat a été obtenu par d'autres chercheurs avec une intensité plus faible [24] [27] [62]. En dehors de cet intervalle, le modèle décrit convenablement les résultats expérimentaux.

Pour pouvoir estimer la vitesse de croissance spécifique dans cet intervalle de concentration, plusieurs auteurs ont proposé d'introduire dans l'équation de Haldane un paramètre correctif qui prend en considération l'effet d'inhibition par les métabolites intermédiaires de la dégradation de phénol [33] [37] [70].

V. Validation du modèle

En utilisant le modèle établi, les profils de concentration peuvent être déterminés pour différentes concentrations initiales en phénol.

Cette cinétique de dégradation est estimée par la résolution de l'équation (13) couplée à l'équation (6) comme suit : [76]

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (13)$$

D'où :

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \right) \left(\frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \right) X \quad (14)$$

Sachant qu'il n'y a pas de lyse de bactéries (absence de la phase de déclin), l'équation de la cinétique de croissance de biomasse dans une culture en batch peut être exprimée comme :

$$\frac{dX}{dt} = -Y_{X/S} \left(\frac{dS}{dt} \right) \quad (15)$$

L'intégration de l'équation (15) donne :

$$X = Y_{X/S} (S_0 - S) + X_0 \quad (16)$$

En Substituant l'expression de X de l'équation (16) dans l'équation (14), on obtient :

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \left[\frac{S [Y_{X/S} (S_0 - S) + X_0]}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \right] \quad (17)$$

La résolution numérique de cette équation a été effectuée en proposant un programme en langage Fortran powerstation 4.0 qui est présenté ci dessous :

```

program Profil
real s, s0,a,b,t,dt,eps,amu,aki,aks,y,x0
open(2,file='result.dat',status='unknown')
amu=0.077
aks=198
aki=114
y=1.23
x0=18.41
C   print*, 's0='
C   read*, s0
   print*, 'dt='
   read*, dt
   print*, 'eps='
   read*, eps
   S0=50
   TMAX=100
   a=s0
   b=0.01
   t=0
C   s=s0
   print*, t,s0
   write(2,*)t,s0
   t=dt
   do t=dt,tmax,dt
C   do while (t.LE.TMAX)
C3  T=t+dt
   niter=0
1   niter=niter+1
   s=(a+b)/2
   fa=((aki*aks+aki*(s0+x0/y)+(s0+x0/y)**2)/(aki*(s0+x0/y)))*
   +alog((y*(s0-a)+x0)/x0)+(aks/(s0+x0/y))*alog(s0/a)-(1/aki)*
   +(s0-a)-amu*t
   fb=((aki*aks+aki*(s0+x0/y)+(s0+x0/y)**2)/(aki*(s0+x0/y)))*
   +alog((y*(s0-b)+x0)/x0)+(aks/(s0+x0/y))*alog(s0/b)-(1/aki)*
   +(s0-b)-amu*t
   f=((aki*aks+aki*(s0+x0/y)+(s0+x0/y)**2)/(aki*(s0+x0/y)))*
   +alog((y*(s0-s)+x0)/x0)+(aks/(s0+x0/y))*alog(s0/s)-(1/aki)*
   +(s0-s)-amu*t
   if((fa*f).lt.0)b=s
   if((fb*f).lt.0)a=s
   if(f.Gt.eps)GOTO 1
   s0=s
   a=s0
   b=0.01
   print*, t,s
   write(2,*)t,s
   enddo
end.

```

Les résultats obtenus sont illustrés sur les **figures 34 à 40**.

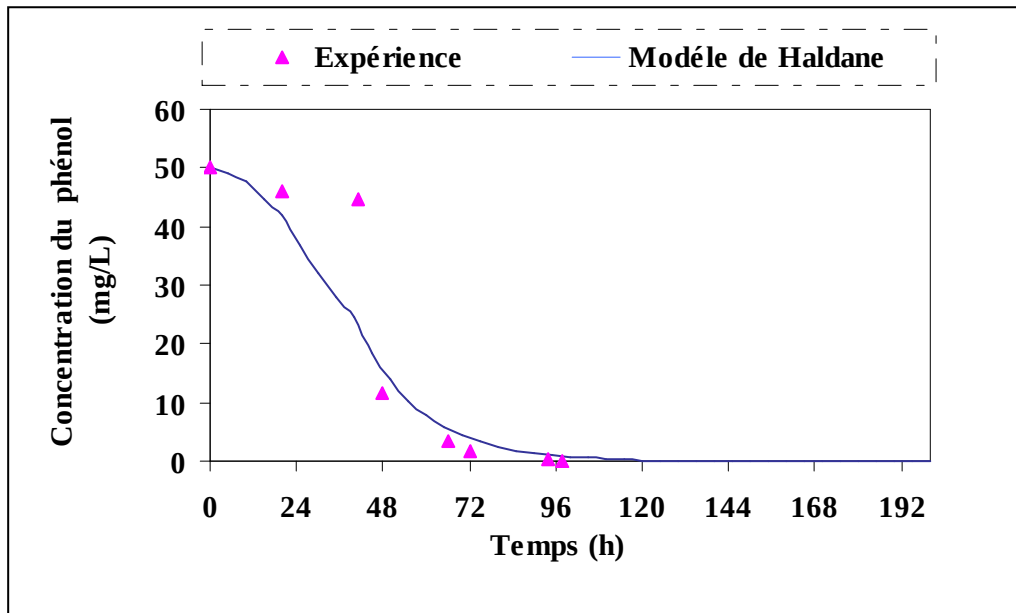


Figure 34 : Profil de concentrations du phénol pour une concentration initiale de 50mg/L.

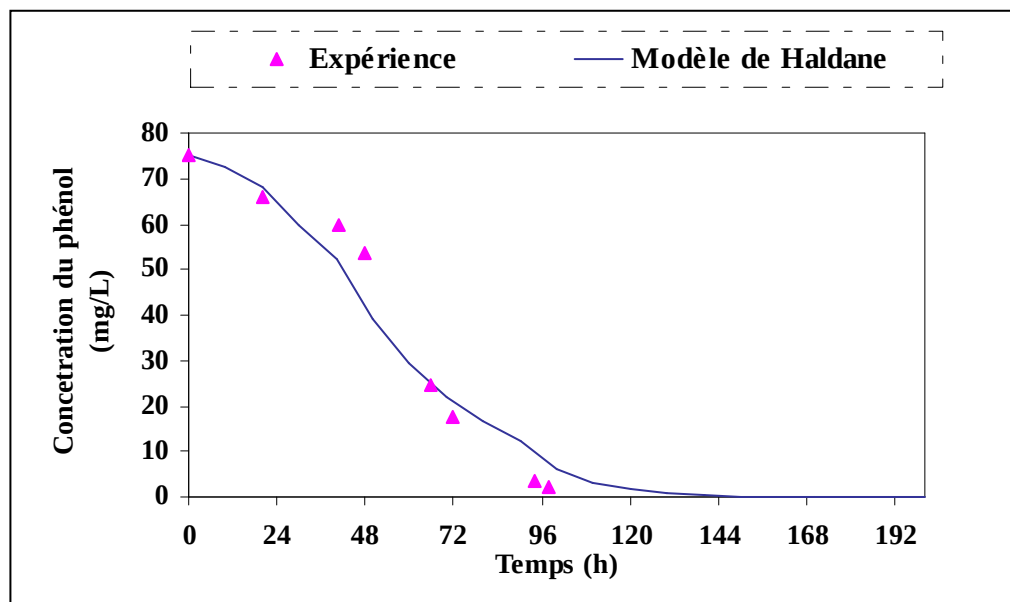


Figure 35 : Profil de concentrations du phénol pour une concentration initiale de 75mg/L.

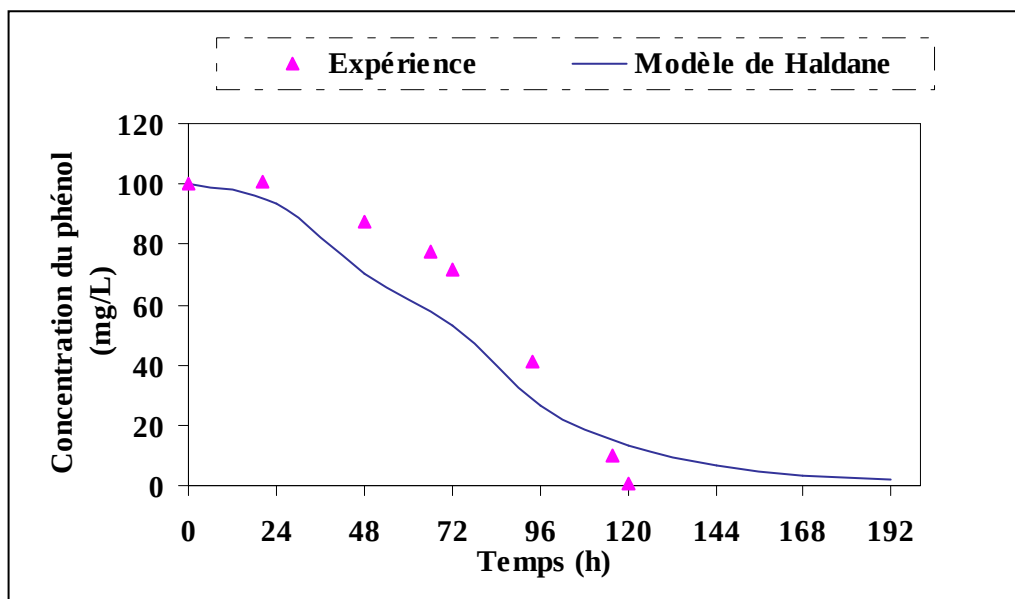


Figure 36 : Profil de concentrations du phénol pour une concentration initiale de 1000mg/L.

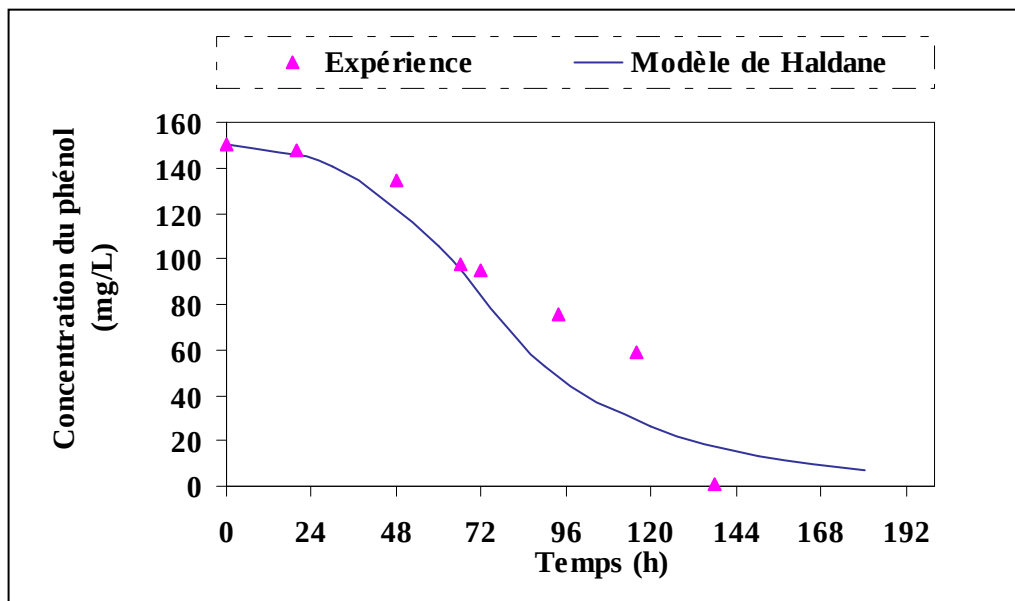


Figure 37 : Profil de concentrations du phénol pour une concentration initiale de 150mg/L.

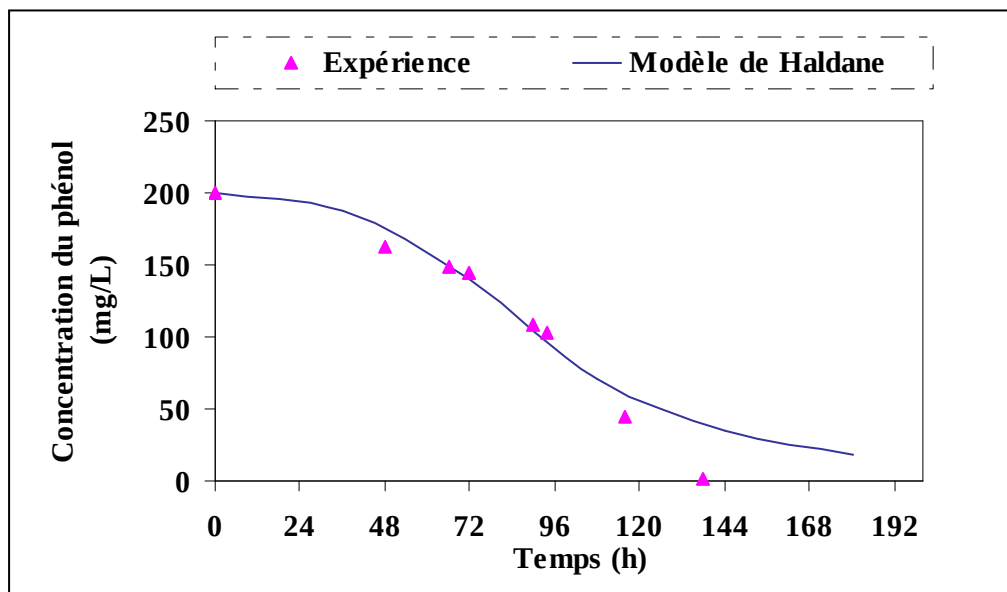


Figure 39 : Profil de concentrations du phénol pour une concentration initiale de 200mg/L.

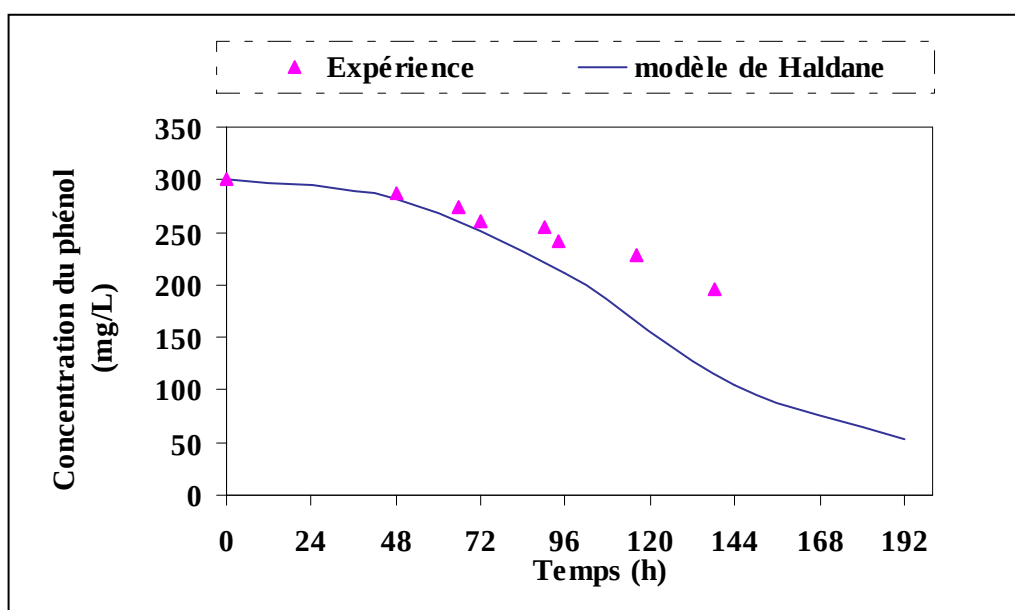


Figure 40 : Profil de concentrations du phénol pour une concentration initiale de 300mg/L.

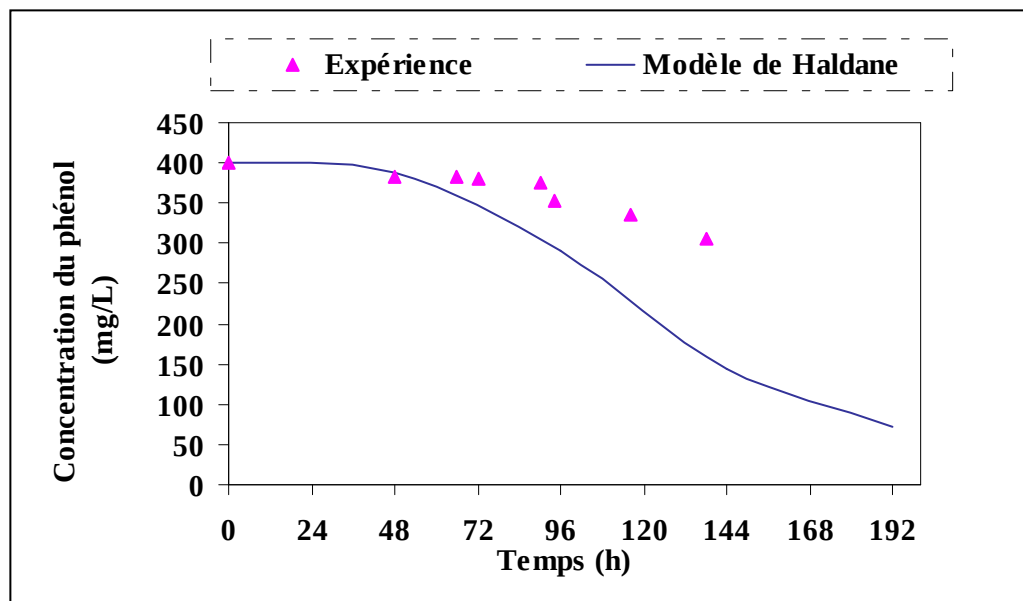


Figure 41 : Profil de concentrations du phénol pour une concentration initiale de 400mg/L.

D'après les résultats des profils de concentrations du phénol au cours du temps, on constate que les profils établis à partir de l'expérience et ceux obtenus à partir du modèle sont quasiment semblables pour les concentrations initiales en phénol inférieures à 300mg/L. A partir de cette concentration, on observe un écart qui est d'autant plus important que la concentration en phénol est élevée. On peut expliquer cet écart par la formation de métabolites intermédiaires de la dégradation du phénol qui peuvent inhiber l'activité des enzymes. L'effet de ces métabolites n'étant pas pris en compte dans le modèle ce qui se traduit par un profil de concentration ayant une pente plus importante que celle du profil obtenu expérimentalement.

En outre, pour les concentrations élevées il est nécessaire de modifier l'équation du modèle de façon à prendre en compte qu'après un certain temps, le métabolisme de croissance s'arrête et il est remplacé par un métabolisme de maintien consommant moins de substrat et conduisant à une vitesse de dégradation assez faible [77].

Conclusion Générale

La présente étude avait pour objectif principal la biodégradation du phénol contenu dans une solution aqueuse par une bactérie pure appartenant au genre *Pseudomonas*.

Dans un premier temps, nous avons acclimatée la souche *Pseudomonas* Sp., a des concentrations croissantes en phénol (10 - 200mg/l). Cette souche pure a prouvé sa capacité d'utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie.

L'étude d'optimisation des paramètres opératoires a été réalisée pour une concentration en phénol de 50mg/L, la température et la vitesse d'agitation ont été maintenues constantes respectivement à 30°C et 80 tr/min. Les résultats obtenus ont révélé un pH optimal de $7,5 \pm 0,2$ et une source d'azote sous forme de NH_4Cl à une concentration en azote de 0,35g/L.

Dans ces conditions optimales, une étude cinétique a été entreprise pour différentes concentrations initiales en phénol : 50 à 400mg/L. Les résultats expérimentaux obtenus font apparaître d'excellents rendements d'élimination du phénol qui ont atteint 100% selon la concentration initiale du substrat. A partir de ces résultats expérimentaux, nous avons déterminé les paramètres de ces deux cinétiques à savoir : la vitesse spécifique de croissance et de biodégradation, le temps de doublement et le coefficient de rendement en biomasse. Il s'est avéré que la vitesse de croissance des bactéries est maximale (0.0378 h^{-1}) et le temps de doublement des bactéries est minimal (18h) pour une concentration en phénol de 150mg/L.

D'autres part, on a constaté que la quantité de biomasse produite est proportionnelle à la quantité du substrat consommée. Ceci rend compte de la bonne assimilation du substrat (phénol) par les bactéries. La valeur du coefficient de rendement trouvée est de 1,23.

Par ailleurs, le phénomène d'inhibition par excès de substrat a été observé pour des concentrations supérieures à 150mg/L. Une vitesse de croissance et un taux de biodégradation optimaux ont été obtenus pour cette concentration.

Le modèle de Haldane a été adopté pour décrire la relation entre la vitesse spécifique de croissance μ et la concentration initiale en substrat S_0 . Les constantes cinétiques déterminées à partir du modèle sont $\mu_{\max} = 0.114 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 288.97 \text{ mg.L}^{-1}$, $K_i = 97.88 \text{ mg.L}^{-1}$. Le modèle de Haldane décrit d'une manière plus ou moins satisfaisante les données expérimentales dans les intervalles de concentrations en phénol explorés. Cependant, on a observé un écart entre les

valeurs expérimentales et calculées au voisinage immédiat de la concentration en phénol de 150mg/L pour laquelle la vitesse de croissance est optimale. A cette concentration, la valeur de la vitesse spécifique estimée par le modèle de Haldane ($\mu_{\max} = 0.026 \text{ h}^{-1}$) est inférieure à la valeur maximale réelle (0.0378 h^{-1}). Cette inadéquation du modèle peut être attribuée, d'après plusieurs chercheurs, à l'effet d'inhibition par les métabolites intermédiaires de la dégradation de phénol.

Les résultats de la simulation des profils des concentrations du phénol au cours de la biodégradation ont montré que le modèle choisi décrit convenablement le phénomène de biodégradation du phénol par la souche bactérienne acclimatée pour des concentrations initiales inférieures à 300mg/L. Par conséquent, le modèle pourra être exploité pour la prévision des données de biodégradation, l'optimisation et pour la conception d'un procédé de biotraitement.

Pour conclure, cette présente étude, à travers les résultats obtenus, montre que la biodégradation du phénol par la souche bactérienne acclimatée est une technique de dépollution efficace, écologique et économique. Des perspectives de ce travail de recherche sont nombreuses et qui consistent à approfondir l'étude par la réalisation d'autres essais expérimentaux dans l'objectif :

- ✱ de confirmer la voie métabolique de biodégradation du phénol par la souche *Pseudomonas* Sp.,
- ✱ d'améliorer le modèle de Haldane en introduisant des paramètres supplémentaires qui vont tenir compte de l'effet d'inhibition par les métabolites intermédiaires de la dégradation de phénol.
- ✱ d'utiliser des cellules immobilisées comme solution envisageable pour limiter l'effet d'inhibition par le substrat et également pour extrapoler le procédé à l'échelle continue.
- ✱ de réaliser une étude technico-économique du procédé de dépollution.

Références Bibliographiques

- [1] C. Kennes, F. Thalasso, Waste gas biotreatment technology. J. Chem. Technol. Biotechnol. , 72 (1998) 303-319
- [2] Y.B.Choi, J.Y. Lee, H.S. Kim, A novel bioreactor for the biodegradation of inhibitory aromatic solvents: experimental results and mathematical analysis. Biotechnol. Bioeng. 40 (1992) 1403-1411.
- [3] S.Ghané, Les applications des biotechnologies environnementales, Envirotech, 3 (1996) 15-17.
- [4] H. Babich, D.L. Davis, Phenol: a review of environmental and health risks, Regul.Toxicol. Pharmacol. 1 (1981) 90–109.
- [5] INERIS (Institut National de L'environnement et des Risques Industriels), Fiche de données toxicologiques environnementales des substances chimiques. Mai 2005.
- [6] NITRES (Encyclopédie de sécurité et de santé au travail), Phénols et composés Phénoliques. 104-417
- [7] C. E. Cemiglia, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, Biodegradation. 3 (1992) 351-368.
- [8] G.Fuchs, M.M. El Said, U. Alteaichmidt, J.Koch, Am. Lack, R.Brackmann, C.Lochmeyer, B. Oswald, Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic Compounds, Biochemistry of microbial degradation. (1994) 513-553.
- [9] P. Juteau, R Beaudet, G. McSween, F. Lcpiae, S. Milot, Ge. Bisailon, Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. Applied Microbiology and Biotechnology. 44 (1995) 218-224.
- [10] INRS (Institut National de Recherche et de sécurité), Fiche toxicologique N° 15-Phénol. (1997). [http:// www.inrs.fr/index_fla.html](http://www.inrs.fr/index_fla.html).

-
- [11] J. Letowski, Isolement et étude d'une souche bactérienne transformant le phénol en benzoate en conditions anaérobies, Thèse de doctorat. Département de microbiologie et immunologie, Faculté des études supérieures, Université de Montréal. (2000)

 - [12] M.R Noahgalil, Inhibition by hazarons compounds in an integrated oil refinery, Wat.sci.pollut.conrol.fed. 60 (1988) 1953 – 1959.

 - [13] J.P. Duguet, B.R.Kim, W.Wesley-Eckenfelder, A technique to determine unsteady-state inhibition kinetics in the activated sludge process, Wat.sci.tech. 21 (1989) 593-602.

 - [14] Dictionnaire de l'environnement, Enregistré à la CNIL n°893989, RecyConsult. 2000.
 - [15] J. Rordier, L'Analyse de l'eau, 8^{ème} éd., Dunod, Paris.2005.

 - [16] F.Kaci, Conception et réalisation d'un réacteur annuaire photochimique : Application a la dégradation du phénol en milieu aqueux et dilué. Mémoire de Magistère en Génie des Procédés chimiques et Environnement, USTHB.2002.

 - [17] A.M. Brawn, MT. Maurette, E. oliveros, photochemical Technology, Wiley, Chichester,1991.

 - [18] H. Leclerc, J.L.Gaillard, M. Simonet, Microbiologie générale : La Bactérie et le monde bactérien, Edition DOIN.1995.

 - [19] J.Nicklin, K.Graeme-Cook, T. Paget, L'essentiel en microbiologie, Edition Berti, Paris. 2000

 - [20] S.Lantz, J.E.Lin, J.G.Mueller, P.H. Pritchard, Effects of surfactants on fluoranthene mineralization by *Sphingomonas pauchobiiis* strain EPA 505, Microbial processes for bioremediation. (1995) 7-14.

 - [21] S.Ali, R. Femandez-Lafuente, D.A.Cowin, Meta-pathway degradation of phenolics by thermophilic *Bacilli*. Enz.Mic.Tech. 23 (1998) 462-468.

- [22] B.L.Boyle, K.M.Scow, G.E. Fogg, J.L. Darby, Effect of carbon: nitrogen ratio on kinetics of phenol biodegradation by *Acinetobacter johnsonii* in saturated sand. Biodegradation. 6 (1995) 283-293.
- [23] K.C. Jeong, E.Y. Jeong, T.E. Hwang, S. H. Cboi, Identification and chanicterization of *Acinetobacter* sp. CNU961 able to grow with phenol at high concentrations Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 62 (1998)1830- 1833.
- [24] M. Abousoud, Biodégradation du naphtalène par cellules libres et immobilisées de pseudomonas Sp., Thèse de doctorat en Génie de L'environnement,USTHB, 2007.
- [25] R. POULENC, Manuel environnement à l'usage des industriels, édition AFNOR,1994
- [26] W.C. Evans, G. Fuchs, Anaerobic degradation of aromatic compounds, Annual Reviews in Microbiology. 42 (1988) 289-317.
- [27] W. Si-jing, L. Kai-chee, Modelling the role of metabolic intermediaries in kinetics of phenol biodegradation, Enz.Mic.Tech.25 (1999) 177-184.
- [28] C. Evans, Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic cornpounds in anaerobic environrnents. Nature.270 (1977) 17-22.
- [29] S.H. Zinder, Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane, recent developments. ASM News. 50 (1984) 294-298.
- [30] M.V. Walter, R.L. Cranford, Overview: Biotransfonnation and Biodegradation, Manual of environmental microbiology, C. I. Hum. ASM Press, Washington. (1997) 707-708.
- [31] B. Schiak, Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation, Microbiology and Molecular Biology Reviews. 61(1997)262-280.
- [32] M.T.Balba, W.C. Evans, The methanogenic biodegradation of catechol by a microbial consortium: evidence for the production of phenol through cis-benzenediol, Biochemical Society Transactions. 8 (1980) 452- 453.

-
- [33] J.G. Bisaillon, R. Beaudet, F. Lépine, M. Sylvestre, Microbiological study of the carboxylation of phenols by methanogenic fermentation, *Water Pollution Research* 29 (1994) 117-127.
- [34] C. Gallert, G. Knoll, J. Winter, Anaerobic carboxylation of phenol to benzoate: use of deuterated phenols revealed carboxylation exclusively in the C₄-position, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36(1991) 124- 129.
- [35] X. Zhang, L. Mandelco, J. Wiegel, *Clostridium hydroxybenzoicum* sp. nov., an amino acid-utilizing, hydroxybenzoate-decarboxylating bacterium isolated from methanogenic freshwater pond sediment. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44(1994) 214-222.
- [36] G. Knoll, J. Winter, Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 25(1987) 384-391.
- [37] C. Indu Nair, K. Jayachandran, Sh. Shashidhar, Biodegradation of phenol, *African Journal of Biotechnology*. Review. 7 (25) (2008) 4951- 4958.
- [38] A. Muhammad, I. Samina, R. Sakandar, M.Kh. Zafar, Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*, *J. Hazard. Mater.* 149 (2007) 60–66.
- [39] M.El-Sayed Abd El-Hameid Shalaby, Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4, Thesis, Kafr El-Sheikh province, Egypt. 2003.
- [40] H.Yoon, G. Klinzing, H.W. Blanch, Competition for mixed substrates by microbial Populations, *Biotechnol Bioeng.* 19 (2001) 1193–1210.
- [41] F.M Hsieh, Ch. Huang, T.F Lin, Y.M. Chen, J.Ch. Lin, Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation, *Process Biochemistry*. 43 (2008) 83–92.

- [42] V. Arutchelvan, V. Kanakasabai, R. Elangovan, S. Nagarajan, V. Muralikrishnan, Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*, J. Hazard. Mater. B129 (2006) 216–222.
- [43] M.A. Rais, A.Toubal, Isolement et caractérisation des souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère du blé dur, mémoire de DES en microbiologie, Université de Blida.2008
- [44] Y.M. Chen, T.F. Lin, Ch. Huang, J.Ch. Lin, F.M. Hsieh, Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*, J. Hazard.Mater 148 (2007) 660–670.
- [45] M.H. Labrecque, Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène, Maître en sciences, Université Laval, Canada, 2003.
- [46] R.Sh. Juang, Sh.Y. Tsai, Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in the Biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate, Biochem. Eng. J. 31 (2006) 133 – 140.
- [47] APHA-AWWA-WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th ed., American Public Health Association, Washington, DC, 1989.
- [48] A. Kumar, Sh. Kumar, S. Kumar, Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194, Biochem. Eng. J. 22 (2005) 151–159.
- [49] Kh.M. Khleifat, Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions, Process Biochem. 41 (2006) 2010–2016.
- [50] M.M. Ballesteros Martin a, J.A. S´anchez P´erez, F.G. Acien Fernandez, J.L. Garcia Sanchez , J.L. Casas Lopez , S. Malato Rodriguez , A kinetics study on the biodegradation of synthetic wastewater simulating effluent from an advanced oxidation process using *Pseudomonas putida* CECT 324, J. Hazard. Mater. 151 (2008) 780–788.
- [51] G.A. Hill, C.W. Robinson, Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*, Biotechnol. Bioeng. 17 (1975) 1599–1615.

- [52] K.F. Reardon, D.C. Mosteller, J.D. Bull Rogers, Biodegradation Kinetics of Benzene, Toluene, and Phenol as Single and Mixed Substrates for *Pseudomonas putida* F1, *biotechnology and bioengineering*.69(4) (2000) 385-400.
- [53] B.Y.chen, J.W. You, Y.T. Hsein, J.Sh. Chang, feasibility study exponential feeding strategy in fed-batch cultures for phenol degradation using *cupriavidus taiwanensis*, 41 (2008) 175-180.
- [54] M.M. Rahmane, Treatment of refinery wastewater using crossflow membrane bioreactor (CF-MBR), Master of Science in Civil engineering , King fahd university of petroleum and minerals, Saudi Arabia, 2004.
- [55] K.A. Onysko, Unsteady-state behaviour of an immobilized-cell fluidized-bed bioreactor for phenol biodegradation, Thesis,Waterloo,Ontario, Canada. 1999.
- [56] A. Boivin, Bactéries et Virus, Presses Universitaires de France, Collection La Science Vivante.1941.
- [57] A.A.M.G. Monteiro, R.A.R. Boaventura, A.E. Rodrigues, Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor, *Biochem. Eng. J.* 6 (2000) 45–49.
- [58] C.P. Lesllie Grady, G.T. Daigger, H.C. Lim, Biological wastewater treatment, New York, USA: Marcel Dekker Inc. 1999.
- [59] A. Nuhoglu, B.Yalcin, Modelling of phenol removal in a batch reactor, *Process Biochemistry*. 40 (2005) 1233–1239.
- [60] PDD. Adamo, AF. Rozich, Jr.AF. Gaudy, Analysis of growth data with inhibitory carbon sources, *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 397– 402.
- [61] U. Pawlowsky, JA. Howell, Mixed culture biooxidation of phenol, Determination of kinetic parameters, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 89–96.
- [62] S.J. Wang, K.Ch Loh, Modelling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation, *Enzyme and Microbial Technology*. 25 (1999) 177–184.

- [63] G.C. Okpokwasili, C.O. Nweke, Microbial growth and substrate utilization kinetics, *African Journal of Biotechnology*. 5 (4) (2005) 305-317.
- [64] T. Abuhamed, E. Bayraktar, T. Mehmetoglu, U. Mehmetoglu, Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation, *Process Biochem.* 39 (2004) 983–988.
- [65] I. Banerjee, J.M. Modak, K. Bandopadhyay, D. Das, B.R. Maiti, Mathematical model for evaluation of mass transfer limitations in phenol biodegradation by immobilized *Pseudomonas putida*, *Journal of Biotechnology* 87 (2001) 211–223.
- [66] I.N. Sgountzos, S. Pavlou, C.A. Paraskeva, A.C. Payatakes, Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* in sand beds during biodegradation of phenol, *Biochem. Eng. J.* 30 (2006) 164–173.
- [67] G. Kotturi, C.W. Robinson, W.E. Inniss, Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34 (1991) 539–543.
- [68] D.H. Hutchinson, C.W. Robinson, A microbial regeneration process for granular activated carbon II. Regeneration studies, *Water Res.* 24 (1990) 1217–1223.
- [69] C.P. Leslie Grady, G.T. Daigger, H.C. Lim, *Biological wastewater treatment*, New York, USA: Marcel Dekker Inc. 1999.
- [70] A. Nuhoglu, B.Yalcin, Modelling of phenol removal in a batch reactor, *Process Biochemistry*. 40 (2005) 1233–1239.
- [71] PDD. Adamo, AF. Rozich, Jr.AF. Gaudy, Analysis of growth data with inhibitory carbon sources, *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 397– 402.
- [72] U. Pawlowsky, JA. Howell, Mixed culture biooxidation of phenol, Determination of kinetic parameters, *Biotechnol. Bioeng.* 15 (1973) 89–96.

- [73] S.J. Wang, K.Ch Loh, Modelling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation, *Enzyme and Microbial Technology*. 25 (1999) 177–184.
- [74] G.C. Okpokwasili, C.O. Nweke, Microbial growth and substrate utilization kinetics, *African Journal of Biotechnology*. 5 (4) (2005) 305-317.
- [75] G. Bakker, Anaerobic degradation of aromatic compounds in the presence of nitrate. *FEMS Microbiology Letters* 1 (1977) 103-108.
- [76] E. A. Seagren, H. Kim, B. F. Smets, Identifiability and retrievability of unique parameters describing intrinsic Andrews kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61 (2003) 314–322.
- [77] K. Arinjay, K. Shashi, S. Kumar, Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*. 22 (2005) 151-159.

Annexes

Annexe I

Méthodes analytiques

I.1 Mesure de la biomasse bactérienne

Durant la croissance bactérienne en culture discontinue « Batch », où les conditions opératoires sont variables au cours du temps, différentes méthodes sont utilisées pour suivre cette croissance.

Détermination de la concentration en biomasse

Cette méthode consiste à déterminer le poids du culot bactérien après centrifugation à 5000 rpm pendant 20min et séchage à 105°C jusqu'à obtention d'une masse constante (biomasse sèche). Le mode opératoire suivi pour déterminer cette biomasse est le suivant :

1. Préparation de la suspension mère

Nous avons prélevé un fragment de colonie sur boîte de Petri contenant la souche *Pseudomonas sp.* Ce dernier est dilué dans un tube contenant 5mL de bouillon nutritif et homogénéisé au vortex (Vortex Genie 2). La suspension bactérienne obtenue est incubée à 30°C pendant 24h sur un agitateur orbital à une vitesse de 80 rpm. L'inoculum estensemencé dans un erlen de 500 mL contenant 100 mL de bouillon nutritif et incubé à 30°C pendant 48h d'agitation.

La biomasse bactérienne obtenue est centrifugée dans des tubes stériles à 5000 rpm pendant 20 min .Le surnageant est éliminé et une solution saline (0,9% NaCl) est ajoutée au culot. On agite au vortex et les tubes sont centrifugés à nouveau. On répète une fois de plus la même opération puis on ajoute le MMB stérile afin de récupérer le culot composé de bactéries.

2. Mesure de la densité optique

Un volume de 4mL est prélevé de la suspension mère pour mesurer sa densité optique à une longueur d'onde de 600 nm. Il a été montré que la densité de cette suspension doit être inférieure à 0.8 pour que la loi de Beer-Lambert soit vérifiée.

3. Mesure de la biomasse sèche

Un volume de 10 mL de culture est mis dans une thermo-balance (Sartorius) à une température de 105°C afin d'obtenir la biomasse sèche.

4. Dilution de la suspension mère

Une courbe d'étalonnage (densité optique - biomasse sèche) a été établie (**Figure I.1**). Pour cela, plusieurs dilutions de la suspension mère sont effectuées pour lesquelles des mesures de la densité optique et de la biomasse sèche ont été réalisées.

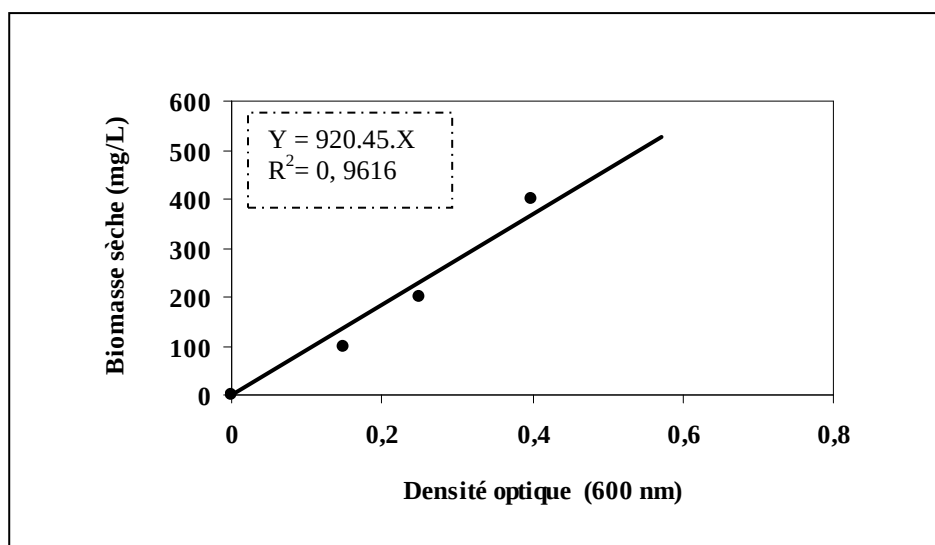


Figure I.1 : Courbe d'étalonnage de la biomasse sèche en fonction de la densité optique

I.2. Analyse du phénol

La concentration résiduelle en phénol est déterminée par spectrophotométrie UV-Visible (Optizen 2120UV) à une longueur d'onde de 510 nm.

Nous avons suivi la méthodologie citée ci-dessous :

Principe

Le phénol donne avec l' amino-4-antipyrine en milieu alcalin et en présence de ferricyanure de potassium, une coloration marron rougeâtre susceptible d'un dosage colorimétrique.

Réactifs

1. Solution d' amino-4-antipyrine à **2%**.
2. Solution de ferricyanure de potassium à **8%**.
3. Solution tampon à **pH=10** (dissoudre 6.76g de NH_4Cl dans 57.2 mL de NH_4OH , et compléter à 100 mL avec de l'eau déminéralisée)

Mode opératoire

Pour une prise d'essai de 100 mL d'eau à analyser :

- ❖ Ajouter 2 mL de solution tampon ;
- ❖ Ajouter 2 mL de solution d' amino-4-antipyrine, agiter immédiatement ;
- ❖ Ajouter 2 mL de solution ferricyanure de potassium, agiter ;
- ❖ Laisser la coloration se développer pendant 15 min ;
- ❖ Faire la lecture de la densité optique à 510 nm au spectrophotomètre.

Remarque :

Cette méthode est utilisée pour des mesures de concentrations en phénol n'excédant pas 10mg/L.

Courbe d'étalonnage

La gamme des concentrations des étalons utilisés pour le tracé de la courbe d'étalonnage se situe entre 1-10 mg/L de phénol. On fait passer chaque solution au spectrophotomètre à 510 nm et on lit l'absorbance. Les résultats sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau I.1 : Evolution de la densité optique des solutions étalons en fonction de la concentration en phénol

[Phénol] (mg/L)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO (510 nm)	0	0,115	0,232	0,342	0,467	0,568	0,676	0,793	0,905	1,017	1,135

L'allure de la courbe d'étalonnage (concentration du phénol –densité optique) est représentée par la **Figure I.2**.

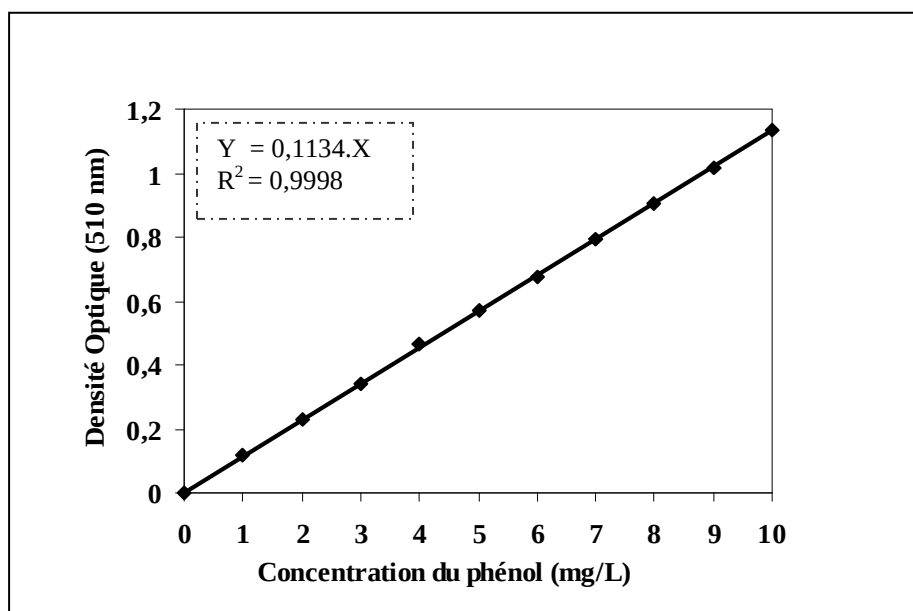


Figure I.2 : Courbe d'étalonnage du phénol

Annexe II

Tableau II.1 : Evolution de la biomasse sèche en fonction de la concentration en phénol

50 mg/L								
Temps (h)	0	20	41	48	66	72	94	98
Biomasse sèche (mg/L)	18,41	32,22	41,42	59,83	65,35	81,92	84,68	82,84

75 mg/L								
Temps (h)	0	20	41	48	66	72	94	98
Biomasse sèche (mg/L)	18,41	46,94	53,39	57,99	68,11	88,36	138,99	128,86

100 mg/L								
Temps (h)	0	20	48	66	72	94	116	120
Biomasse sèche (mg/L)	18,41	20,25	35,90	46,94	52,47	87,44	123,34	114,14

150 mg/L								
Temps (h)	0	20	48	66	72	94	116	130
Biomasse sèche (mg/L)	18,41	16,57	44,18	92,97	106,77	132,54	171,20	228,27

200 mg/L								
Temps (h)	0	48	66	72	90	94	116	138
Biomasse sèche (mg/L)	18,41	47,86	93,89	122,42	149,11	184,09	209,86	244,84

300 mg/L								
Temps (h)	0	48	66	72	90	94	116	138
Biomasse sèche (mg/L)	18,41	16,57	19,33	24,85	50,62	55,23	90,20	102,17

400 mg/L								
Temps (h)	0	48	66	72	90	94	116	138
Biomasse sèche (mg/L)	18,41	16,57	17,49	36,82	49,70	57,07	76,40	92,97

Tableau II.2 : Pourcentage de biodégradation du phénol

50 mg/L								
Temps (h)	0	20	41	48	66	72	94	98
C _T (mg/L)	50	48,94	48,06	47,4	48,06	46,96	46,52	46,3
C _S (mg/L)	50	45,86	44,53	11,46	3,53	1,54	0,22	0
% Biodégradation	0	6,16	7,06	71,88	89,06	90,84	92,6	92,6

75 mg/L								
Temps (h)	0	20	41	48	66	72	94	98
C _T (mg/L)	75	73,19	72,75	72,75	74,74	73,41	73,19	73,41
C _S (mg/L)	75	66,14	59,96	53,79	24,69	17,42	3,31	2,20
% Biodégradation	0	9,40	17,05	25,28	66,73	74,66	93,18	94,94

100 mg/L								
Temps (h)	0	20	48	66	72	94	116	120
C_T (mg/L)	100	104,28	102,07	100,97	109,35	107,58	107,60	107,14
C_S (mg/L)	100	100,97	87,52	77,82	71,65	41,23	9,92	0,44
% Biodégradation	0	3,31	14,55	23,15	37,70	66,36	97,68	100

150 mg/L								
Temps (h)	0	20	48	66	72	94	116	138
C_T (mg/L)	150	148,37	148,15	148,15	146,38	149,69	148,37	149,03
C_S (mg/L)	150	147,93	134,48	97,44	94,58	75,84	59,08	0,66
% Biodégradation	0	0,29	9,11	33,80	34,54	49,24	59,52	98,91

200 mg/L								
Temps (h)	0	48	66	72	90	94	116	138
C_T (mg/L)	200	197,31	192,90	191,58	189,59	189,37	188,93	188,49
C_S (mg/L)	200	162,70	148,59	144,40	108,69	102,29	44,75	1,76
% Biodégradation	0	17,31	22,16	23,59	40,45	43,54	72,09	93,36

300 mg/L								
Temps (h)	0	48	66	72	90	94	116	138
C_T (mg/l)	300	299,82	295,41	282,86	279,54	275,79	276,46	275,57
C_S (mg/l)	300	287,48	274,47	260,15	255,29	241,62	227,73	195,77
% Biodégradation	0	4,12	6,98	7,57	8,08	11,39	16,24	26,60

400 mg/L								
Temps (h)	0	48	66	72	90	94	116	138
C _T (mg/L)	400	397,00	397,00	396,40	393,15	385,16	379,41	374,56
C _S (mg/L)	400	383,82	382,00	381,15	375,00	352,95	336,42	305,11
% Biodégradation	0	3,30	3,75	3,81	4,54	8,05	10,75	17,36

Le pourcentage de biodégradation du phénol est déterminé en tenant compte des pertes abiotiques obtenues à partir des tests témoins, selon l'équation suivante :

$$\% \text{biodégradation} = \frac{(C_T - C_S)}{C_0} * 100$$

Avec :

C_T : Concentration du phénol dans le témoin. (mg/L)

C_S : Concentration du phénol dans l'échantillon. (mg/L)

C₀ : Concentration initiale du phénol (mg/L)