

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
Département : Génie de l'environnement
Laboratoire des Sciences et
Techniques de l'Environnement

Thèse de Doctorat en Sciences en Génie de l'Environnement

Présenté par :

ALI Oumessaad

Magister en génie de l'environnement de l'ENP

Intitulé

Biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans des billes d'alginate en modes batch et continu

Soutenu devant le jury composé de :

Président :	Mr. KERBACHI Rabah	Professeur	ENP d'Alger
Rapporteur :	Mme HELLAL Amina	Professeur	ENP d'Alger
Examineurs :	Mme HARIK Djamilia	Professeur	ENP d'Alger
	Mr. SABAOU Nasserline	Professeur	ENS d'Alger (Kouba)
	Mr. NACEUR Wahib	Professeur	Université de Blida
	Mr. AOUABED Ali	Professeur	Université de Blida

ENP 2016

Remerciements

Le présent travail, a été réalisé au laboratoire des sciences et techniques de l'environnement (LSTE) du département de génie de l'environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et ma reconnaissance à Madame Amina HELLAL, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, pour la confiance qu'elle m'a accordée en me proposant cette étude, l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, tout au long de son évolution, pour son investissement, son encadrement et sa rigueur scientifique. Merci madame.

Je tiens à remercier Monsieur Rabah KERBACHI Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

J'exprime mes profonds remerciements aux membres du jury, Madame Djamila HARIK, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, Monsieur Nasseridine SABAOU, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Kouba, et Messieurs Wahib NACEUR et Ali AOUABED, Professeurs à l'Université de Blida d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je désire également exprimer toute ma gratitude à Monsieur Abdelkader NAMANE, Maitre de Conférence à l'Ecole Nationale Polytechnique, pour son soutien, ses encouragements constants et sa disponibilité.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Madame Jazia ARRAR, Maitre de Conférence à l'Ecole Nationale Polytechnique, pour toute l'aide qu'elle m'a fournie.

Je souhaite remercier l'ensemble des enseignants, doctorants, ingénieurs et personnel administratif que j'ai eu le privilège de côtoyer depuis 2005 et qui ont permis, par leurs encouragements et leur assistance aussi bien morale que matérielle, de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Que tous mes collègues, ami(e)s et tous ceux et celles qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

Mes remerciements vont également à Mr Redouane LABADI, Technicien au laboratoire de pédologie à l'INA et à Mr Abderrahmane ALLALOU (Ami Allalou) chef du laboratoire à l'entreprise du verre SOMIVER.

Je remercie également Mme Hamida BOUAAM, notre secrétaire au département génie de l'Environnement pour son divertissement, sa joie et sa bonne humeur qu'elle apporte au département.

Enfin, je ne saurais terminer cette liste sans adresser un remerciement particulier à ceux qui m'ont soutenu dans l'ombre, mes parents, mes frères et sœurs, sans qui ce travail n'aurait jamais pu voir le jour. Je leur dédie ce travail en témoignage de ma profonde reconnaissance pour toute la patience et les sacrifices qu'ils ont consentis pour moi et dont je leur serai à jamais redevable.

Sommaire

Liste des tableaux	i
Liste des figures	iii
Liste des abréviations	viii
Introduction	01
Chapitre I Revue bibliographique	
Volet 1 : Le phénol : Pollution et Traitement	
I.1.1. Présentation	04
I.1.2. Propriétés du phénol	05
I.1.2.1. Propriétés physico-chimiques	05
I.1.2.2. Propriétés oxydantes	06
I.1.3. Principales sources d'exposition	06
I.1.4. Toxicité et écotoxicité du phénol	08
I.1.4.1. Sur la santé humaine	08
I.1.4.2. Sur l'environnement	09
I.1.5. Techniques de traitement des rejets phénoliques	10
Volet 2 : La biodégradation du phénol	
I.2.1. Les voies de la biodégradation du phénol	13
I.2.1.1. Voie aérobie	13
I.2.1.2. Voie anaérobie	15
I.2.2. Facteurs influençant la biodégradation	17
Volet 3 : Immobilisation : Concept & Applications	
I.3.1. Définition	19
I.3.2. Avantages et inconvénients de la technique des cellules immobilisées	19
I.3.3. Les techniques d'immobilisation cellulaire	21
I.3.3.1. L'attachement à une surface	23
I.3.3.2. Inclusion dans des matrices poreuses	24
I.3.3.3. Cellules immobilisées derrière une barrière	27
I.3.3.4 Flocculation	27
I.3.4. Effet physiologique et morphologique de l'immobilisation	28
I.3.5. Distribution de la biomasse dans les billes d'alginate	29

I.3.6. Phénomène de transfert dans des billes	30
I.3.7. Relargage cellulaire des billes	33
I.3.8. Applications de cellules immobilisées dans le traitement des rejets industriels liquides	34
I.3.9. Immobilisation des cellules dans un gel d'alginate	36
I.3.9.1. Les Alginates : des polysaccharides naturels	38
I.3.9.1.1. Présentation de l'alginate	38
I.3.9.1.2. Applications générales d'alginate	39
I.3.9.1.3. Structure et propriétés de l'alginate	40
I.3.9.1.3.1. Structure de la chaîne	40
I.3.9.1.3.2. Propriétés des alginate	42
I.3.9.1.4. Stabilité des hydrogels	46
I.3.9.1.4.1. Dissolution du gel en présence d'un sel chélatant	46
I.3.9.1.4.2. Propriétés mécaniques des gels d'alginate	47
I.3.10. Mise en œuvre de microorganismes immobilisés	47
I.3.10.1. Cellules immobilisées sur un support fixe	48
I.3.10.2. Cellules immobilisées sur support mobiles	48
I.3.10.2.1. Lit fluidisé	49
I.3.10.2.1.1. Régimes de fluidisation	51
I.3.10.2.1.2. Fluidisation triphasique	53
I.3.10.2.1.3. Les facteurs influençant la fluidisation	54
I.3.10.2.1.4. Effet des propriétés physico-chimiques des particules	57
I.3.10.2.1.5. Avantages et inconvénients des lits fluidisés	58
I.3.10.2.2. Réacteurs agités	59
I.3.10.2.2.1. Réacteur mécaniquement agité	60
I.3.10.2.2.2. Réacteur mécaniquement agité aéré	60
I.3.10.2.3. Types de réacteurs utilisés dans la dégradation du phénol	60

Volet 4 : La méthodologie des plans d'expériences

I.4.1. Notions d'espace expérimental	63
I.4.2. Notion de modélisation mathématique	66
I.4.3. Analyse de la variance et validation du modèle linéaire	67
I.4.4. Différents types de plans d'expériences	70
I.4.5. Les Plans d'expérience appliqués	70
I.4.6. Les logiciels de plans d'expériences	73
Références bibliographiques	74

Etude expérimentale

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Matériel	87
II.1.1. Matériel biologique	87
II.1.2. L'alginate de sodium	87
II.1.2.1. Analyse spectroscopique de l'alginate de sodium	87
II.1.2.2. Préparation de la solution d'alginate de sodium	89
II.2. Méthode d'immobilisation	90
II.2.1. Développement de la méthode au laboratoire LSTE	90
II.2.2. L'immobilisation proprement dite	90
II.3. Essais de biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en discontinu	93
II.3.1. Réacteur biologique	93
II.3.2. Milieu de culture	94
II.3.3. Conditions opératoires des cinétiques de biodégradation	95
II.3.4. Modèles cinétiques de dégradation du phénol en mode batch	96
II.3.4.1. Détermination de la vitesse de biodégradation	96
II.3.4.2. Description des modèles	96
II.4. Essais de biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en continu	97
II.4.1. Réacteur Agité	97
II.4.2. Lit fluidisé	98
II.5. Dosage du phénol	99
II.6. Mesure de la biomasse microbienne	99
II.7. Dénombrement microbien	99
II.8. Observation de l'état de la surface des billes d'alginate	100
II.9. Analyse statistique	100
Références bibliographiques	101

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. La biodégradation du phénol en mode batch	102
III.1.1. Cellules libres	102
III.1.2. Cellules immobilisées	108
III.1.2.1. Essai d'adsorption du phénol sur les billes d'alginate	108
III.1.2.2. Mise au point de la méthode d'immobilisation	109
III.1.2.3. Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisé dans des billes d'alginate	111
III.1.2.3.1. Effet du diamètre des billes sur la biodégradation	111
III.1.2.3.2. Effet de la concentration en biomasse sur la biodégradation	114
III.1.2.3.3. Effet de la concentration de l'alginate de calcium	116
III.1.2.3.4. Effet de la température sur la biodégradation du phénol	119
III.1.2.3.5. Effet du pH sur la biodégradation	123
III.1.2.3.6. Effet de la concentration initiale du phénol sur la biodégradation	126
III.1.2.4. Détermination des paramètres de diffusion dans les cellules immobilisées	133
III.1.2.4.1. Facteur d'efficacité et Module de Thiele	133
III.1.2.4.2. Coefficient de diffusion	134
III.1.2.5. La modélisation par le plan factoriel complet de la biodégradation du phénol	137
III.1.2.5.1. Définition des niveaux des facteurs	137
III.1.2.5.2. Expérimentation	138
III.1.2.5.3. Calcul des effets et des interactions	138
III.1.2.5.4. Analyse statistique	139
III.1.2.5.5. Les effets simples et les interactions des facteurs	141
III.1.2.5.6. Optimisation	143
III.1.2.5.7. Etat de surface des billes	144
III.1.2.7. Stabilité des billes d'alginate	149
III.1.2.7.1 Recyclage des billes	150
III.1.2.7.1.1. Recyclage des billes pour les mêmes concentrations de phénol	150
III.1.2.7.1.2. Recyclage des billes pour des concentrations croissantes de phénol	152
III.1.2.7.2. Stabilité du biocatalyseur en présence de sels chélatants	155
III.2. La biodégradation du phénol en mode continu : Conception de réacteur de biodégradation du phénol en continu par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisés dans des billes d'alginate à l'échelle laboratoire	166
III.2.1. Colonne verticale à lit fixe	166

III.2.2. Lit fluidisé	167
III.2.2.1. Description du montage expérimental	167
III.2.2.2. Calcul de la vitesse minimale de fluidisation	168
III.2.2.3. Détermination du temps de passage	171
III.2.3. Réacteur Agité	175
Références bibliographiques	176
Conclusion	180
Annexes	184

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques du phénol	05
Tableau I.2 : Teneur en phénol dans des rejets d'eau usée issue de quelques industries algériennes	07
Tableau I.3 : Concentration des phénols dans les différents sites de prélèvement	08
Tableau I.4 : Application d'alginate dans les différents secteurs industriels	39
Tableau I.5 : Comparaison des réacteurs à lit fluidisé recensés dans la littérature et utilisés pour le traitement des eaux usées	56
Tableau I.6 : Les différents réacteurs utilisés dans la biodégradation du phénol	61
Tableau I.7 : Analyse de la variance	68
Tableau I.8 : Plan factoriel à 3 facteurs	71
Tableau I.9 : Plan de Box- Behnken pour trois facteurs	72
Tableau I.10: Principaux logiciels de plans d'expériences	73
Tableau II.1 : Groupements fonctionnels caractéristiques de la poudre d'alginate de sodium.	88
Tableau II.2: Viscosité des solutions d'alginate	89
Tableau II.3 : Détermination du diamètre des billes	90
Tableau II.4: Les conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch	95
Tableau III.1: Constantes cinétiques de la biodégradation du phénol par des cultures pures et mixtes (Modèle Haldane)	107
Tableau III.2: Valeurs des différents paramètres de diffusion	136
Tableau III.3 : Facteurs et domaine d'étude	137
Tableau III.4 : Plan d'expériences et résultats expérimentaux et prévus	138
Tableau III.5 : Effets et interactions des facteurs	139
Tableau III.6 : Estimations des coefficients	140
Tableau III.7 : Analyse de la variance	140
Tableau III.8 : Facteurs et domaine d'étude	156
Tableau III.9: Matrice d'expériences des plans de Box-Behnken et résultats expérimentaux	157
Tableau III.10: Estimations des coefficients	158

Tableau III.11: Analyse de la variance	158
Tableau III.12: Estimations des coefficients	162
Tableau III.13 : Analyse de la variance pour la réponse en excluant le terme X_3X_3	163
Tableau III.14: Estimations des coefficients	163
Tableau III.15: Analyse de la variance pour la réponse en excluant le terme X_2X_3	163
Tableau III.16 : Paramètres descriptifs de la colonne utilisée en lit fixe	166
Tableau III.17 : Valeur des paramètres de la fluidisation	171
Tableau III.18 : Paramètres hydrodynamiques influençant la fluidisation pour 50 mg.L ⁻¹ de phénol	172
Tableau III.19 : Paramètres hydrodynamiques influençant la fluidisation pour 100 mg.L ⁻¹ de phénol	173

Liste des figures

Figure I.1 : Structure de la molécule de phénol	04
Figure I.2: Les voies de dégradation du phénol	14
Figure I.3: Voie de dégradation anaérobie pour le phénol	16
Figure I.4 : Classification des systèmes d'immobilisation	22
Figure I.5 : Alginate de sodium	40
Figure I.6 : Monomères de la chaîne alginate	41
Figure I.7 : Conformation d'alginate	41
Figure I.8 : Coordination d'un cation de Ca^{2+} avec deux unités d'acide guluronique	43
Figure I.9 : Etapes de formation du gel Ca-Alginate	45
Figure I.10: Réacteur à lit fixe	48
Figure I.11: Réacteur à lit fluidisé	50
Figure 1.12 : Changement d'état d'un lit de particules au fur et à mesure que la vitesse de fluidisation croît	51
Figure I.13 : Évolution de la perte de charge totale d'un lit de particules en fonction de la vitesse de fluidisation	52
Figure I.14 : Fluidisation triphasique	53
Figure I.15: Réacteur agité	59
Figure I.16 : L'effet de facteur sur la réponse	63
Figure I.17 : Le domaine du facteur	64
Figure I.18 : L'espace expérimental	64
Figure I.19 : Les niveaux des facteurs définissent le domaine d'étude	65
Figure I.20 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse	65
Figure I.21: Domaine expérimental du plan 2^3	71
Figure I.22 : Domaine expérimental du plan 2^3	72
Figure II.1 : Spectre infrarouge de la poudre d'alginate de sodium	87
Figure II.2: Poudre de l'alginate de sodium	89
Figure II.3 : Principe de la méthode d'immobilisation	91
Figure II.4 : Billes d'alginate	92

Figure II.5: Réacteur biologique renfermant des cellules de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisées dans des billes d'alginate.	94
Figure II.6 : Système continu à réacteur agité	97
Figure II.7: Système continu à lit fluidisé	98
Figure III.1: Effet de la concentration initiale du phénol sur le rendement de biodégradation et la croissance bactérienne	103
Figure III.2 : Linéarisation de l'équation de Monod	105
Figure III.3: Linéarisation de l'équation de Haldane	106
Figure III.4 : Cinétique d'adsorption du phénol sur des billes vierges à différents diamètres	108
Figure III.5: Echange des ions Na^+ et Ca^{2+} durant la formation de la bille d'alginate	109
Figure III.6: Concentration des ions Na^+ et Ca^{2+} pendant la phase du repos	109
Figure III.7 : Cinétique de dégradation pour le diamètre de bille =1mm	110
Figure III.8 : Cinétique de dégradation pour le diamètre de bille =2mm	110
Figure III.9 : Cinétique de dégradation pour le diamètre de bille =3mm	110
Figure III.10 : Cinétique de dégradation pour le diamètre de bille =4mm	110
Figure III.11: Cinétique de biodégradation du phénol pour différents diamètres des billes	112
Figure III.12: Variation du temps de biodégradation du phénol en fonction du diamètre des billes des billes	113
Figure III.13: Evolution de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction de diamètre des billes	113
Figure III.14 : Cinétique de biodégradation du phénol pour différentes tailles du culot	114
Figure III.15 : Variation du temps de biodégradation du phénol en fonction de la biomasse immobilisée.	115
Figure III.16: Evolution de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction de la biomasse	116
Figure III.17: Influence de la concentration d'alginate sur la cinétique de biodégradation du phénol par des cellules immobilisées	117
Figure III.18: Evolution de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des concentrations d'alginate	118

Figure III.19: Variation du temps de biodégradation du phénol en fonction des concentrations d'alginate	119
Figure III.20: Variation de la concentration du phénol en fonction du temps pour les différentes températures.	120
Figure III.21 : Variation du temps de biodégradation du phénol en fonction de la température	121
Figure III.22 : Variation la vitesse de biodégradation du phénol en fonction de la température	122
Figure III.23 : Influence du pH sur la biodégradation du phénol	123
Figure III.24 : Evolution de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction de pH	124
Figure III.25 : Evolution du temps de biodégradation du phénol en fonction de pH	125
Figure III.26: Cinétique de biodégradation du phénol par des cellules de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisés dans des billes d'alginate de calcium pour différentes concentrations initiales du phénol	127
Figure III.27: Evolution du pH pour différentes concentrations initiales du phénol	129
Figure III.28: Effet de la concentration initiale sur la vitesse de biodégradation du phénol par les cellules de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> libres et immobilisés.	134
Figure III.29 : Analyse graphique des effets principaux et interactifs	139
Figure III.30 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévue	139
Figure III.31 : Diagramme des effets simples	142
Figure III.32 : Diagramme des interactions	143
Figure III.33: Evolution du nombre de bactéries relarguées dans le milieu réactionnel en fonction de la concentration initiale du phénol	148
Figure III.34 : Evolution de la DO ₆₀₀ en fonction de la concentration initiale du phénol	148
Figure III.35 : Recyclage des billes d'alginate (d=3 mm, m= 0,087 g.L ⁻¹ , 100 mg.L ⁻¹ phénol)	150
Figure III.36 : Evolution du rendement d'élimination et de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des cycles de biodégradation.	151
Figure III.37 : Recyclage des billes d'alginate	

(d=2 mm, m =0,26 g.L ⁻¹ , 500 mg.L ⁻¹ phénol)	151
Figure III.38 : Evolution du rendement d'élimination et de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des cycles de biodégradation.	152
Figure III.39 : Recyclage des billes d'alginate (d=2 mm, m= 0,390 g.L ⁻¹).	153
Figure III.40 : Evolution du rendement d'élimination et de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des concentrations initiales du phénol.	153
Figure III.41 : Recyclage des billes d'alginate (d=3 mm, m= 0,087 g.L ⁻¹)	154
Figure III.42 : Evolution du rendement d'élimination et de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des concentrations initiales du phénol	155
Figure III.43 : Représentation graphique des réponses observées en fonction des réponses prévue	159
Figure III.44 : Diagramme des effets linéaires	160
Figure III.45 : Diagramme des interactions	160
Figure III.46 : Surface de réponses de temps de biodégradation du phénol en fonction de (X ₁) et (X ₂)	161
Figure III.47 : Surface de réponses de temps de biodégradation du phénol en fonction de (X ₁) et (X ₃)	161
Figure III.48 : Surface de réponses de temps de biodégradation du phénol en fonction du (X ₂) et (X ₃)	161
Figure III.49 : Evolution de la DO ₆₀₀ en fonction du temps en présence des différents sels chélatants	165
Figure III.50 : Evolution de concentration du phénol en fonction du temps en présence des différents sels chélatants	165
Figure III.51 : Evolution du taux d'abattement et du temps de séjour en fonction du débit d'alimentation contenant 50 mg.L ⁻¹ du phénol	173
Figure III.52 : Evolution du taux d'abattement et du temps de séjour en fonction du débit d'alimentation contenant 100 mg.L ⁻¹ du phénol	174
Figure III.53 : Evolution de la concentration du phénol dans l'affluent et l'effluent en réacteur agité.	175

Liste des photos

Photo 1 : Coupe d'une bille d'alginate vierge ([Biomasse]=0 g.L ⁻¹ , [phénol]= 0 mg.L ⁻¹)	130
Photo 2: Bille d'alginate avant utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,154 g.L ⁻¹)	130
Photo 3 : Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,26 g.L ⁻¹ , [phénol]=100 mg.L ⁻¹ , d = 2 mm)	131
Photo 4 : Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,26 g.L ⁻¹ , [phénol]=(300 et 700 mg.L ⁻¹), d = 2 mm)	132
Photo 5: Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,26 g.L ⁻¹ , [phénol]= 1200mg.L ⁻¹)	133
Photo 6 : Bille d'alginate avant utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,13 g.L ⁻¹ , d = 4 mm)	144
Photo 7 : Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,13 g.L ⁻¹ , [phénol]=900 mg.L ⁻¹ , d = 4 mm)	145
Photo 8 : Bille d'alginate avant utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,13 g.L ⁻¹ , d = 2 mm)	145
Photo 9 : Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,13 g.L ⁻¹ , [phénol]=900 mg.L ⁻¹ , d = 2 mm)	146
Photo 10 : Bille d'alginate (coupée et séchée) après utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,13 g.L ⁻¹ , [phénol]=900 mg.L ⁻¹ , d = 2 mm)	147
Photo 11: Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation en système continu ([Biomasse]=0,260 g.L ⁻¹ , d _p = 2 mm)	174

Liste des abréviations

- INRS:** Institut national de la recherche et de sécurité;
- ETSC:** Expertise Toxicologique des Substances Chimiques;
- INERIS:** Institut national de l'environnement industriel et des risques ;
- ATSDR:** Agency for Toxic Substances and Disease Registry;
- DRC:** Direction des Risques Chroniques;
- EPS:** Exopolysaccharide ;
- NADPH :** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- Da :** Dalton
- η :** Facteur d'efficacité ;
- v :** Vitesse de biodégradation du substrat ($\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ;
- C :** Concentration du substrat à une distance « r » du centre de la particule (mg.L^{-1}) ;
- r :** Distance par rapport au centre de la particule (cm) ;
- D_e :** Coefficient effectif de diffusion (diffusivité effective) du substrat à l'intérieur de la particule ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) ;
- R :** Rayon de la particule immobilisée (cm) ;
- C_s :** Concentration de substrat sur la surface des billes;
- ϕ :** Module de Thiele pour une particule sphérique;
- k :** Constante de vitesse de réaction ;
- X :** Concentration en biomasse (masse sèche des bactéries) (g.L^{-1});
- μ_{max} :** Taux de croissance maximal (h^{-1}) ;
- K_S :** Constante de demi-saturation (mg.L^{-1});
- K_i :** Constante d'inhibition (mg.L^{-1});
- G :** Acide α -L guluronique;
- M :** Acide β -D-mannuronique;
- DCO :** Demande chimique en oxygène ($\text{mg d'O}_2.\text{L}^{-1}$);
- COT :** Carbone organique total (mg.L^{-1}) ;
- μ :** Viscosité dynamique ($\text{Kg.m}^{-1}.\text{S}^{-1}$) ;
- ϕ :** Facteur de Sphéricité ;
- ε_{mf} :** Porosité du lit à la vitesse minimale de fluidisation ;
- ρ_f :** Masse volumique du fluide (Kg.m^{-3}) ;

- Re_p** : Nombre de Reynolds ;
- d_p** : Diamètre de la particule;
- U_{mf}** : Vitesse minimale de fluidisation ($m.s^{-1}$) ;
- τ** : Temps de passage d'un effluent (h);
- V** : Volume total de fluide dans le réacteur (m^3);
- Q** : Débit de fluide ($m^3.h^{-1}$);
- ρ_p** : Masse volumique particules ($kg.m^{-3}$);
- μ** : Viscosité dynamique ($Kg.m^{-1}.S^{-1}$);
- ϵ_{mf}** : Porosité du lit à la vitesse minimale de fluidisation;
- Ga** : Nombre de Galilée;
- Re** : Nombre de Reynolds;
- U_{mf}** : Vitesse minimale de fluidisation ($m.s^{-1}$);
- Q_{mf}** : Débit minimal de fluidisation ($L.h^{-1}$);

Introduction

La production de déchets dangereux provenant des industries est devenue un grave problème partout dans le monde. Sous la pression des autorités gouvernementales, les industriels sont obligés de prendre des mesures pour limiter la quantité et la toxicité des effluents industriels. Parmi ces déchets, figurent les composés phénoliques.

Ces derniers sont des éléments bien présents dans les eaux usées notamment ceux des industries de l'acier, des procédés de conversion du charbon, de cokerie, des raffineries de pétrole, des industries pharmaceutiques et des industries du textile. L'accumulation de ces composés conduit à la contamination de l'environnement contribuant à de nombreux effets néfastes sur les systèmes vivants. En effet, les phénols sont toxiques pour les micro-organismes, les animaux et les êtres humains. Ils ont été classés comme polluants dangereux.

L'Agence de la Protection Environnementale (EPA) recommande la diminution des teneurs en phénol dans les eaux usées à des concentrations inférieures à 1 mg.L^{-1} ce qui est en accord avec la réglementation algérienne qui tolère une concentration maximale des phénols de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ pour les rejets industriels (décret exécutif n°93-163 du 10 juillet 1993). Par conséquent l'élimination du phénol à partir des eaux usées et des lixiviats de décharge est indispensable afin de protéger la santé publique et l'environnement.

Le traitement des eaux phénolées fait appel à différents procédés physico-chimiques qui sont limités par leur coût ou leur impact secondaire sur l'environnement, et souvent ces voies de dégradation ne font que transférer la pollution d'un milieu à un autre en la concentrant. Les traitements biologiques quant à eux, sont des procédés qui prennent de plus en plus de place surtout qu'ils ne sont pas coûteux, et ils permettent une minéralisation totale des composés phénoliques. Cependant, à un certain niveau de concentration, le phénol a un effet inhibiteur sur la croissance microbienne et peut provoquer la lyse cellulaire.

Pour surmonter cette inhibition, l'immobilisation des micro-organismes s'avère être la solution. Elle présente l'avantage de protéger les cellules de l'effet toxique du polluant et le maintien de leur activité de dégradation. Les matériaux les plus utilisés comme matrice d'immobilisation sont l'alginate, le κ -carraghénane, la chitine et les dérivés de la cellulose.

Le développement, l'amélioration et l'application de cette technique dans le traitement des eaux polluées par le phénol représentent les plus importants axes de recherche de notre équipe. Ce travail s'inscrit justement dans l'optique de ces orientations. Il a pour but d'étudier la biodégradation du phénol par les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées dans des billes d'alginate de calcium en mode batch et continu. Cette étude a pour objectifs :

- ❖ La mise au point d'une nouvelle technique d'immobilisation ;
- ❖ L'optimisation des paramètres influençant cette biodégradation en mode batch (méthode intuitive et plan d'expérience) ;
- ❖ L'étude des phénomènes accompagnant l'immobilisation cellulaire : phénomène de diffusion, relargage cellulaire et dissolution du biocatalyseur ;
- ❖ La conception de réacteur de biodégradation du phénol en mode continu.

Pour cela, cette thèse sera structurée en trois chapitres :

Le premier chapitre est une revue bibliographique, il est subdivisé en quatre volets. Le premier volet portera sur le phénol, la pollution engendrée par ce dernier et les différents traitements appliqués aux rejets phénoliques. La biodégradation du phénol fera l'objet du deuxième volet.

Le troisième volet présentera des notions relatives à l'immobilisation, ses différentes techniques, les matériaux utilisés comme matrice d'immobilisation en mettant l'accent sur l'alginate et l'application de cette technique dans le traitement des eaux ainsi que les réacteurs utilisés.

Dans le quatrième volet, des rappels sur les plans d'expériences seront évoqués.

Les considérations développées dans les volets précédents seront appliquées dans la partie expérimentale. Cette dernière débutera par la description du matériel, des méthodes analytiques utilisées ainsi que le protocole expérimental. Tous ces éléments feront l'objet du deuxième chapitre.

Le chapitre trois présentera l'ensemble des résultats expérimentaux ainsi que leur interprétation.

Ce manuscrit s'achèvera par une conclusion synthétisant les principaux résultats obtenus à l'issue de cette étude et des perspectives seront suggérées.

Chapitre I

Revue bibliographique

Les polluants toxiques ont des impacts non seulement sur l'environnement, mais aussi sur la santé humaine, avec des conséquences économiques non négligeables. La pollution peut avoir des effets irréversibles sur les écosystèmes et les conséquences sanitaires peuvent être importantes, voire même mortelles. Parmi ces polluants figure le phénol. L'objectif de ce chapitre est donc de présenter ce composé, la pollution engendrée par les rejets phénoliques et les traitements appliqués pour son élimination en mettant l'accent sur la biodégradation, l'immobilisation des microorganismes et les différents réacteurs utilisés. Nous finirons ce chapitre par des notions sur le plan d'expériences.

Volet 1

Le phénol : Pollution et Traitement

I.1.1. Présentation :

Le phénol est un alcool aromatique. A l'état pur, c'est un solide à température ambiante mais il reste le plus souvent liquide en solution.

Sa formule chimique est C_6H_5OH (figure I.1). Il est connu aussi sous le nom de : hydroxybenzène, acide carbolique, acide phénique, hydroxyde de phényle, benzénole, alcool de phényle, acide phénylique et hydrate de phényle (INRS, 2011).

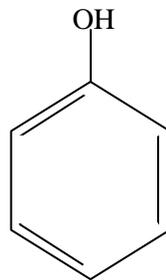


Figure I.1 : Structure de la molécule de phénol

Cependant, le phénol est un polluant très répandu dans de nombreux effluents industriels (Messrouk et al., 2014). En effet, les phénols sont employés dans l'industrie comme antioxydants, intermédiaires de synthèse, désinfectants, agents de tannage (Mahmood, 2007), révélateurs photographiques et additifs des lubrifiants et des essences. Ils sont largement utilisés en photographie, dans les industries du pétrole (Mamatha et al., 2012), de textiles (Nuhoglu and Yalcin, 2005), de pesticides (Rudel et al., 2008), des explosifs, du caoutchouc, des matières plastiques, des industries papetières (Bessam et al., 2010) et dans les industries pharmaceutique et agroalimentaire.

Les trois principales applications des phénols se situent dans la fabrication des résines phénoliques, du bisphénol A et du caprolactame.

Il intervient dans la fabrication de divers composés: produits pharmaceutiques (Mseddi et al., 2014), colorants et résines synthétiques incolores ou légèrement colorées (El Cadi et al., 2012; Vicens et al., 1986). C'est un désinfectant à usage général utilisé pour les toilettes, les écuries, les fosses septiques, les sols et les égouts; on l'emploie également comme solvant d'extraction dans le raffinage du pétrole. Le phénol trouve des applications dans les peintures germicides, vermicides et les colles.

I.1.2. Propriétés du phénol :

I.1.2.1. Propriétés physico-chimiques :

Le phénol se présente sous forme de petits cristaux blancs, ou légèrement roses s'il est quelque peu impur (même très peu) ; Il est hygroscopique et a une odeur âcre. Sa limite olfactive est égale à $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ (ETSC et DRC, 2008). Au contact de l'air ou sous l'influence de l'humidité, le phénol s'oxyde légèrement pour donner des traces de quinone. Il prend alors une couleur rose, puis rouge. Le tableau suivant résume ses principales propriétés physico-chimiques.

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques du phénol (INERIS, 2005).

Paramètres	Valeur	Etendue
Facteur de conversion (dans l'air à 20°C)	1 ppm = $3,91 \text{ mg.m}^{-3}$ 1 mg.m^{-3} = 0,26 ppm	-
Masse molaire (g.mole^{-1})	94,11	94,11 – 94,144
Point d'ébullition (°C) (à pression normale)	181,8	181,75 – 182
Pression de vapeur (Pa)	28,7 à 20°C	20 – 47,6
	54,4 à 25°C	46,8 – 69,9
Solubilité dans l'eau (mg.L^{-1})	83500 à 20°C	82000 – 84000
	85700 à 25°C	70000 – 93000
Constante de Henry ($\text{Pa. m}^{-3}. \text{mole}^{-1}$)	$4,56 \cdot 10^{-2}$ à 20°C	-
	$4,02 \cdot 10^{-2}$ à 25°C	-
Coefficient de diffusion dans l'air (cm.s^{-1})	$8,2 \cdot 10^{-2}$	-
Coefficient de diffusion dans l'eau (cm.s^{-1})	$8,8 \cdot 10^{-6}$	$8,5 \cdot 10^{-6}$ - $9,1 \cdot 10^{-6}$
Coefficient de diffusion à travers le PEHD ($\text{m}^2.\text{j}^{-1}$)	$8,5 \cdot 10^{-10}$	-
Perméabilité cutanée une solution aqueuse (cm.h^{-1})	$8,2 \cdot 10^{-3}$	-

I.1.2.2. Propriétés oxydantes :

Le phénol réagit vivement avec des oxydants puissants comme les peroxydes. Vers 800°C et en présence de zinc, la molécule du phénol se réduit en benzène. A haute température, le phénol pur se décompose entièrement en oxyde de carbone, carbone et hydrogène. A chaud, le phénol liquide attaque certains métaux, tels que le plomb, le zinc, l'aluminium... et aussi certains plastiques, comme le polyéthylène (INRS, 2011).

I.1.3. Principales sources d'exposition :

La présence de phénol dans l'environnement provient des eaux résiduaires et des flux d'air rejetés lors de la production, de la transformation ou de l'utilisation du phénol.

Les échappements des moteurs thermiques, la dégradation photochimique du benzène, la décomposition de déchets organiques divers, le métabolisme humain et animal sont également responsables de la présence de phénol dans l'environnement. Il en est de même pour les usines de cokéfaction et de carbonisation à basse température, de la combustion du bois et du tabac. Chaque année 1,3 tonnes de composés phénoliques sont rejetées par les pays européens (Rubalcaba et al., 2007).

En Algérie, la pollution par le phénol a été détectée par l'Observatoire National de l'Environnement et du Développement Durable (ONEDD) dans différents secteurs industriels. Les résultats qui sont reportés sur le tableau I.2, montrent que certaines industries génèrent des rejets dont la teneur en phénol dépasse largement la norme de rejet fixée à 0,5 mg.L⁻¹. Ces phénols proviennent essentiellement des huiles de machines, des produits détergents, des bactéricides ou bactériostatiques utilisés en désinfection, l'acier et la peinture. En effet, les plus hautes valeurs enregistrées (3,2, 4,6, 20 mg.L⁻¹) correspondent aux industries de la maintenance des engins de travaux publics, des produits phytosanitaires (Rudel et al., 2008) et de la peinture (Camail et al., 1997).

Tableau I.2 : Teneur en phénol dans des rejets d'eau usée issue de quelques industries algériennes (ONEDD, 2014).

Wilaya	Type d'industrie	Indice de phénol (mg.L ⁻¹)					
		1 ^{er} trimestre 2014		2 ^{ème} trimestre 2014		3 ^{ème} trimestre 2014	
Alger	Phytosanitaire	4,6	-	-	-	-	-
	Maintenance engins de travaux publics	0,2	1,1	0,93	0,78	3,20	-
Bouira	Peinture	0,8	1,04	< 0,1	< 0,1	6	20
	Détergent et produits d'entretien ménager et et automobile en plus des produits d'hygiène corporelle.	0,6	< 0,1	0,26	-	-	-
Tizi Ouzou	Electromécanique	0,46	-	-	-	-	-
	Fabrication et commercialisation des transformateurs de distribution, moteurs électriques et groupes électrogènes.	0,68	-	-	-	-	-
Blida	Agroalimentaire	< 0,1	-	-	-	-	-
	Production d'eau minérale et boisson diverses non alcoolisées	< 0,1	-	-	-	-	-
Tipaza	Cosmétique	0,13	-	-	-	-	-

(-) pas d'analyse

L'étude de Messrouk (2010) qui portait sur le suivi de l'analyse des composés phénoliques dans les eaux usées de la région de Ouargla révèle elle aussi la présence de ces composés à des concentrations dépassant les normes de rejets. Valeurs qui varient de 0,63 à 5,889 mg.L⁻¹ comme le montre le tableau suivant :

Les sites qui ont été visés sont un hôpital (ST1), des stations de lavages (ST2, ST3 et ST4), un abattoir (ST5) et une usine de transformation du plastique (ST6) (Messrouk et al., 2014). Les prélèvements ont été effectués durant la période de juin 2010 – décembre 2010.

Tableau I.3 : Concentration des phénols dans les différents sites de prélèvement.

Site de prélèvement	Indice de phénol (mg.L ⁻¹)					
	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6
Juin 2010	0,6314	0,97	1,6337	1,0676	1,4155	0,393
Octobre 2010	1,0364	3,331	2,9615	5,8892	1,5361	-
Décembre 2010	0,63	2,6972	1,9583	2,938	1,9222	-

(-) pas de prélèvement, ST1 : hôpital, ST2, ST3 et ST4 : stations de lavages, ST5 : abattoir et ST6 : usine de transformation du plastique

Pour le rejet de l'hôpital, la forte teneur en phénol est due probablement à l'utilisation des détergents, des désinfectants et des produits pharmaceutiques.

Pour les différentes stations de lavage, le phénol provient des huiles de machines, des produits détergents utilisés en désinfection et de la peinture.

Pour l'abattoir, les valeurs de l'indice de phénol sont aussi considérables, elles varient de 1,3 à 2 mg.L⁻¹. Ces phénols résultent selon les littératures (Messrouk et al., 2014), d'urine et des déchets (matières fécales) des animaux (herbivores), ces derniers avaleraient l'herbe contaminée par les pesticides (Rudel et al., 2008).

Les eaux usées de site (ST6) (l'usine de transformation du plastique) montrent une faible concentration en composés phénoliques 0,393 mg.L⁻¹. Cette valeur est conforme à la norme. Les eaux de ce site ne sont que des eaux de refroidissement et généralement non polluées, car elles n'ont aucun contact avec les produits fabriqués.

I.1.4. Toxicité et écotoxicité du phénol :

I.1.4.1. Sur la santé humaine :

Le phénol est une substance irritante et fortement corrosive. Il a une forte capacité à pénétrer dans l'organisme en traversant la peau et les muqueuses. Les systèmes cardiovasculaire et nerveux sont également des cibles. Il est à signaler que les phénols synthétiques sont plus toxiques que ceux existant à l'état naturel.

Il est classé par l'Union Européenne comme mutagène catégorie III (Ehtash et al., 2014). La majorité des phénols et de leurs dérivés sont des substances toxiques. Beaucoup d'entre eux sont classés comme des déchets dangereux, et certains sont connus ou soupçonnés d'être cancérogènes. Aussi le phénol est répertorié sur la liste prioritaire des substances dangereuses identifiées par ATSDR (2007).

Les vapeurs sont également toxiques. Quand du phénol est inhalé, différents symptômes apparaissent : une soif intense, des vomissements, une respiration profuse, une hypotension, des nausées, des douleurs abdominales, des diarrhées, une hémolyse, une cyanose, des convulsions et dans certains cas, un coma (ETSC et DRC, 2008).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a donc limité la concentration du phénol dans l'eau potable à $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ (Barrios-Martinez et al., 2006). L'Union Européenne (UE) impose par la directive 80/778/EC, une concentration totale du phénol inférieure à $0,0005 \text{ mg.L}^{-1}$ dans l'eau potable (Jiang et al., 2003).

I.1.4.2. Sur l'environnement :

Le phénol présent dans l'environnement conduit à de nombreux effets indésirables. Dans l'atmosphère, les vapeurs de ce composé sont plus lourdes que l'air et forment des mélanges explosifs sous l'effet de la chaleur. Le phénol s'oxyde à l'air, et ce processus d'oxydation est accéléré par la lumière ou par des impuretés à effet catalytique (INERIS, 2005).

Dans le sol, le phénol subit une dégradation microbienne aérobie ou anaérobie, de sorte que l'effet d'accumulation reste limité. L'accumulation est fonction de la présence de minéraux argileux (forte affinité avec l'oxyde d'aluminium) (INERIS, 2005).

Les études sur le phénol et ses dérivés révèlent qu'ils sont aussi toxiques et très dangereux pour la vie aquatique (Pan and Kurumada, 2008). Il peut notamment modifier les écosystèmes aquatiques et causer des dommages aux ressources précieuses (Babich and Davis, 1981; Huang et al., 2007). En effet, le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer. Il se dissout lentement et, même dilué, continue de former des solutions toxiques. En raison de sa forte toxicité dans l'eau, le phénol figure dans la catégorie des risques de pollution de l'eau.

De plus, lorsqu'il est présent dans l'eau ou dans des aliments, il entre dans l'organisme par le tube digestif. Il est ensuite rapidement distribué dans tous les tissus et exerce une action corrosive. Les organes cibles sont le cerveau et les reins (INERIS, 2005).

La bioaccumulation du phénol d'une concentration de 2 mg.L^{-1} ou plus dans l'environnement aquatique peut déjà provoquer des effets secondaires sur le développement de certains poissons. Des concentrations entre 10 et 100 mg.L^{-1} entraînent la disparition de la vie aquatique dans les 96 heures (Huang et al., 2007; Peng et al., 2008). Pour cela, des législations ont donc été mises en place pour réguler la teneur en phénol des eaux résiduaires.

Ainsi, pour l'Agence américaine de Protection Environnementale (US EPA), la limite maximale acceptable de la concentration du phénol dans les eaux usées est estimée à moins de 1 mg.L^{-1} (Huang et al., 2007; Peng et al., 2008), ce qui est en accord avec la réglementation algérienne qui tolère une concentration maximale des phénols de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ pour les rejets industriels (décret exécutif n°93-163 du 10 juillet 1993).

I.1.5. Techniques de traitement des rejets phénoliques :

En raison de la forte toxicité du phénol dans l'eau, il est nécessaire de traiter les solutions phénolées, avant de les jeter dans le milieu naturel. C'est d'ailleurs une des priorités environnementales de tous les pays industrialisés.

Le traitement peut être effectué par des procédés physiques, chimiques ou biologiques. Le choix des technologies à utiliser dépend principalement de la concentration des polluants (en amont et en aval du traitement) et de critères économiques.

Pour le traitement des rejets industriels, il existe deux grands types des procédés : ceux qui permettent la récupération des phénols et ceux qui les détruisent. Les techniques récupératrices comprennent : la distillation, l'extraction, l'évaporation, et l'adsorption. En générale la récupération de phénols conduit seulement à une épuration partielle des eaux résiduaires et il est nécessaire alors d'utiliser des méthodes d'élimination. Les traitements destructifs concernent : l'incinération, l'oxydation par l'ozone, l'oxydation photocatalytique dont les principaux systèmes oxydants sont les couples : UV/TiO₂, hv visible/CdS et UV/H₂O₂ et les traitements biologiques (Alfonso Duran, 1997).

Cependant, les traitements physico-chimiques sont limités par leur tendance à former des produits intermédiaires (secondaires) plus toxiques que le polluant lui-même. La combustion incomplète, par exemple, du 2,4,5-trichlorophénol peut donner naissance à la dioxine TCDD (2,3,7,8 tetrachlorodibenzodioxine) qui est très toxique.

Ce sont aussi des procédés coûteux qui consomment beaucoup d'énergie. De plus les effluents issus de ces procédés, nécessitent des traitements supplémentaires.

Le principal inconvénient de la méthode d'échange d'ions est le coût élevé des résines sélectives pour éliminer un seul type de contaminant et qui sont sensibles aux variations du pH. Selon Caetano et al. (2009) l'élimination du phénol par des résines échangeuses d'ions a été obtenue uniquement dans un milieu alcalin.

Dans le cas de l'adsorption, l'élimination du phénol par cette technique n'est qu'un déplacement de la pollution du milieu liquide vers un milieu solide (adsorbant) en générant une nouvelle fois de grandes quantités de déchets solides. De plus, comme mentionné précédemment du point de vue économique, l'utilisation du charbon et sa régénération ne sont pas rentables (Banat et al., 2000).

Il existe aussi de nombreux inconvénients associés au procédé d'oxydation chimique du phénol, comme le coût élevé des différents agents oxydants. Le peroxyde d'hydrogène lorsqu'il est utilisé seul a une faible réactivité et provoque l'oxydation incomplète de nombreux contaminants organiques (Ikehata and El-Din, 2006; Ikehata et al., 2006; Preis et al., 1995).

Le développement de technologie qui met l'accent sur l'élimination du phénol sans les inconvénients mentionnés ci-dessus, est devenu le centre d'intérêt de notre équipe de recherche. La biodégradation du phénol, par des souches microbiennes est considérée comme une alternative efficace pour le traitement des eaux usées, contaminées par des substances récalcitrantes telles que les composés phénoliques.

Sachant que le procédé biologique est le cœur même de notre étude, nous allons présenter en détail cette technique dans le prochain volet.

Volet 2

La biodégradation du phénol

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. Le traitement biologique est, incontestablement, la technique de dépollution de référence, basée sur les propriétés digestives de certains micro-organismes (bactéries, champignons, ...) dont la croissance s'effectue par l'oxydation du carbone qui est utilisé comme source d'énergie. Elle peut être opérée en présence d'oxygène (voie de dégradation aérobie) ou en son absence (voie de dégradation anaérobie) où il sera remplacé par les nitrates, sulfates ou méthane. C'est un phénomène naturel, sa popularité tient, essentiellement, à son faible coût, sa facilité de mise en œuvre et son applicabilité à presque tous les types d'effluents.

I.2.1. Les voies de la biodégradation du phénol :

I.2.1.1. Voie aérobie :

La biodégradation aérobie a été étudiée au début du 19^{ème} siècle. Dans la biodégradation aérobie du phénol, l'oxygène est utilisé comme accepteur final d'électrons. Les enzymes qui sont impliquées dans le métabolisme aérobie des composés aromatiques définissent généralement la gamme de substrats qui peuvent être transformés par certaines voies métaboliques. La première étape dans le métabolisme aérobie du phénol, est l'hydroxylation de ce dernier par la catéchol hydroxylase. Les bactéries oxydent initialement le phénol par l'incorporation de l'oxygène moléculaire dans le noyau aromatique pour former le catéchol. Cette réaction nécessite la présence de NADPH. Généralement cette oxydation est suivie par un clivage ortho (rupture de la liaison entre les deux groupements hydroxyle) qui est catalysé par la catéchol 1,2-dioxygénase. Le produit de cette réaction serait l'acide cis,cis muconique ou l'un de ses dérivés (Kotresha and Vidyasagar, 2014).

Cette oxydation peut être aussi suivie par un clivage méta (rupture d'une liaison entre un carbone portant un groupement hydroxyle et le carbone immédiatement voisin ne portant pas de groupement hydroxyle) du cycle qui est assuré, par la catéchol 2,3-dioxygénase (Ahuatzi-Chacón et al., 2004) où le métabolite serait le 2-hydroxy muconique semi-aldéhyde, comme le montre la figure I.2 correspondant à la dégradation du phénol (Basha et al., 2010; Karim and Fakhruddin, 2012; Sridevi et al., 2012).

Les étapes de dégradation se poursuivent et donnent des produits qui vont rejoindre le cycle de Krebs.

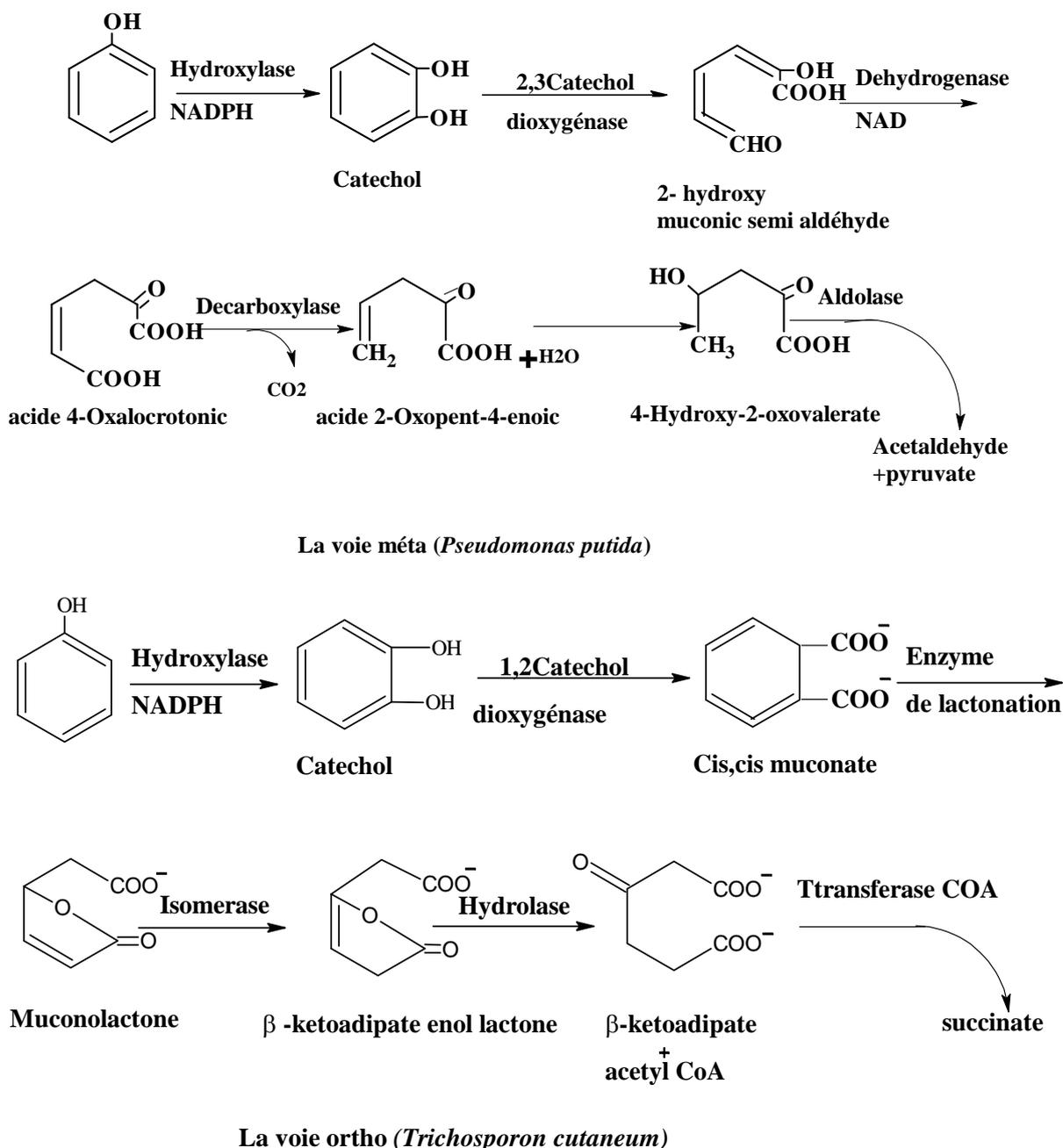


Figure I.2: Les voies de dégradation du phénol (Der Yang and Humphrey, 1975)

Il est à signaler que la voie ortho est la plus fréquente. Selon Bajaj (2009) sur 41 souches de *Pseudomonas putida*, seulement 8 souches étaient capables de dégrader le phénol par la voie de méta.

La dégradation du phénol par les cultures pures et mixtes (Cheela et al., 2014; Hao et al., 2002) a été sujet dans plusieurs études, telles que *Pseudomonas sp.* (Kotresha and Vidyasagar, 2008; Nweke and Okpokwasili, 2014), *Arthrobacter sp.* (Scheublin et al., 2014), *Acinetobacter sp.* (Wang et al., 2007), *Rhodococcus sp.* (Paisio et al., 2012), *Moraxella sp.* (Karim and Fakhruddin, 2012) et *Bacillus sp.* (Arutchelvan et al., 2006; Basha et al., 2010) qui peuvent utiliser le phénol comme source de carbone et d'énergie (Basha et al., 2010).

Le genre *Pseudomonas* a fait l'objet de diverses études: *Pseudomonas cepacia* (Silva et al., 2014), *Pseudomonas pictorum* (Awan et al., 2013), *Pseudomonas putida* (Yin et al., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Agarry and Aremu, 2012; Kotresha and Vidyasagar, 2008; Mukherjee and Bordoloi, 2012),... et sa capacité à utiliser une large gamme de substrats aromatiques le rend, le plus abondant comme genre bactérien dans le traitement des eaux usées (Rosselló-Mora et al., 1994).

I.2.1.2. Voie anaérobie :

Le phénol peut également être dégradé en l'absence d'oxygène, cependant cette biodégradation est moins efficace que celle en présence d'oxygène. C'est un processus similaire à celui du benzoate proposé pour *Paracoccus denitrificans*.

Il a été démontré que la dégradation anaérobie des différents composés aromatiques se base sur la carboxylation du cycle aromatique. De la même manière, le phénol subit une carboxylation, comme première étape de dégradation, en position para par 4-hydroxy benzoate carboxylase pour former 4-hydroxy benzoate (figure I.3).

Plus tard, il a été reporté que la dégradation des composés phénoliques (o-crésol, catéchol et le phénol halogéné en position ortho) via la carboxylation est suivie par une déhydroxylation (Sridevi et al., 2012).

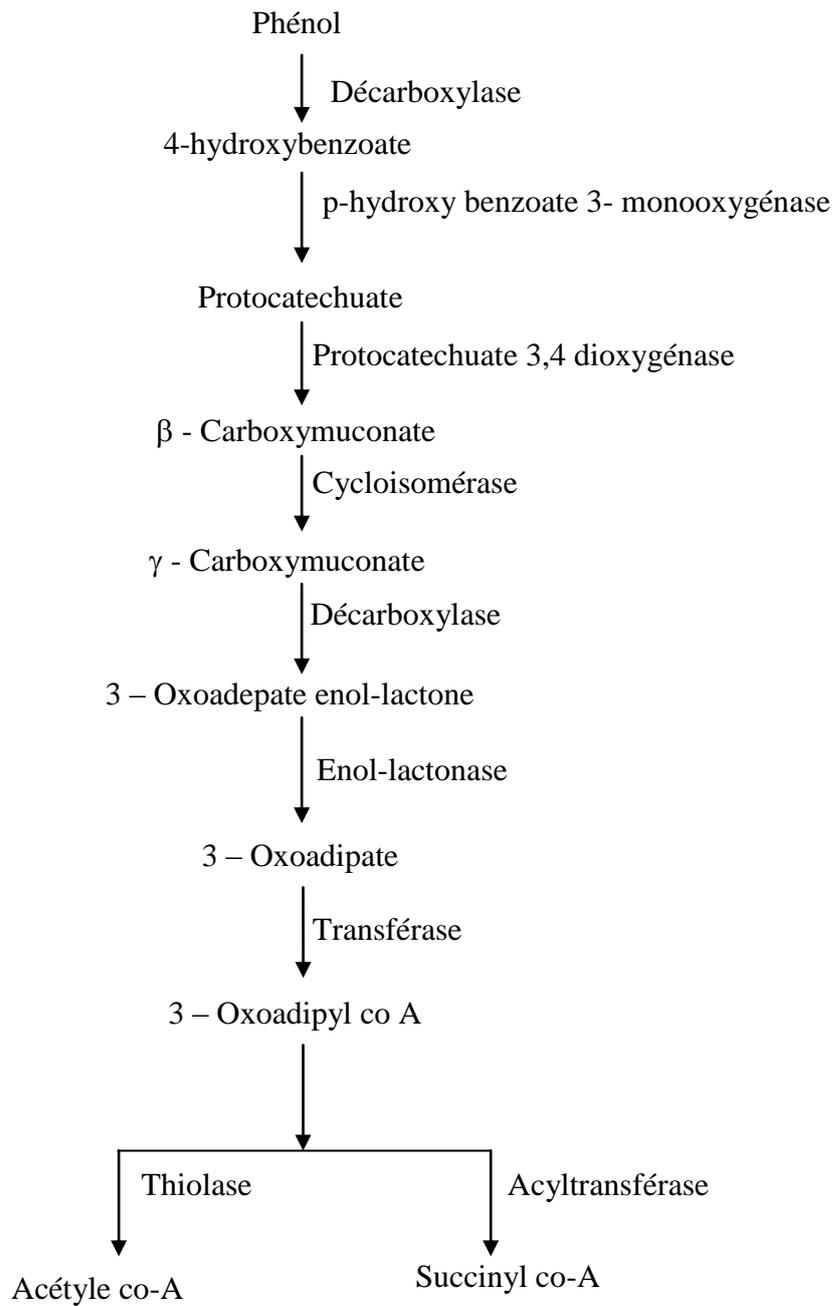


Figure I.3: Voie de dégradation anaérobie pour le phénol (Sridevi et al., 2012)

I.2.2. Facteurs influençant la biodégradation :

L'élimination biologique d'un substrat, dépend d'un certain nombre de facteurs physiologiques. De ce fait, il est important de comprendre comment ces derniers ont une influence sur le profil de la biodégradation.

En effet, sachant que l'environnement est un facteur déterminant dans une réaction de biodégradation. Les conditions environnementales doivent être appropriées pour que cette réaction s'effectue à une vitesse optimale et de sorte qu'aucun facteur ne devient limitant au cours du traitement. D'ailleurs, le choix de meilleures conditions physiologiques a toujours été l'une des principales préoccupations des scientifiques.

Dans la biodégradation du phénol, plusieurs facteurs peuvent intervenir : il s'agit essentiellement de la concentration du polluant ainsi que celle des nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes, de la source de carbone supplémentaire (glucose, extrait de levure, peptone,...), de l'aération, du pH et de la température du milieu (Basha et al., 2010).

Pendant à un certain niveau de concentration, le phénol a un effet inhibiteur sur la croissance microbienne et peut provoquer la lyse cellulaire (Hao et al., 2002; Nweke and Okpokwasili, 2010). En effet, les fortes concentrations du phénol dans l'effluent conduisent rapidement à l'absence de croissance des micro-organismes (Liu et al., 2009).

Afin de surmonter cette inhibition et protéger les cellules libres, l'immobilisation de ces dernières serait l'une des approches proposées dans les procédés de traitement des eaux contaminées par les hydrocarbures.

L'utilisation de l'immobilisation cellulaire fait largement augmenter la concentration en biomasse dans les réacteurs en mode batch ou en mode continu. Avec cette technique, on peut obtenir un rendement et une stabilité des cellules plus élevés qu'avec des cellules libres. Au cours de la réaction, les cellules sont protégées des forces de cisaillement et elles peuvent être récupérées et réutilisées (Bucke and Brown, 1983). Cette technique sera traitée en détail dans ce qui suit.

Volet 3

Immobilisation:

Concept & Applications

L'immobilisation de cellules viables est un outil versatile utilisé pour accroître la stabilité d'un système microbien, permettant son application dans des conditions environnementales extrêmes, sa réutilisation et la mise au point de bioprocédés continus. Cette technologie fournit une méthode novatrice, pour l'immobilisation des bactéries qui peut être employée en vue d'améliorer la performance et la stabilité de systèmes de traitements biologiques, conçus pour la biorestauration des eaux contaminées par des solvants chlorés (PCE, TCE, etc.), des hydrocarbures, des nitrates et d'autres composés biologiquement dégradables.

La technologie des cellules immobilisées n'est pas récente. C'est un procédé qui peut être utilisée dans les systèmes de fermentation pour la biosynthèse de certains composés d'intérêt (enzymes, acides organiques, protéines, biomasse, etc.) (Freeman and Lilly, 1998). L'immobilisation cellulaire a tout d'abord été utilisée dans les systèmes de fermentation (production du vinaigre par des bactéries acétiques immobilisées sur des copeaux de bois (Ramakrishna and Prakasham, 1999) ou dans la production du Kéfir avec des levures coimmobilisées avec des bactéries lactiques (Champagne et al., 1994). car cette technique permettait d'obtenir une haute densité cellulaire et de séparer facilement les cellules en fin de procédé afin de pouvoir les réutiliser pour des biosynthèses subséquentes.

De plus, grâce à l'immobilisation cellulaire il est possible d'avoir une plus grande flexibilité pour la conception et la mise œuvre des cultures continues.

I.3.1. Définition :

La définition des cellules immobilisées découle directement de celle des enzymes immobilisées qui fut établie à la première conférence mondiale du génie des enzymes.

Le terme d'immobilisation a été défini par Karel et al. (1985) comme « le confinement ou localisation physique de cellules intactes dans une certaine région de l'espace tout en préservant certaines activités catalytiques souhaitées et qui peuvent être utilisées de façon continue et répétée ». L'immobilisation permet donc de disposer d'une population microbienne dense, active et facilement utilisable.

Contrairement aux cellules planctoniques cultivées dans un milieu liquide, l'immobilisation cellulaire correspond à un état dans lequel les cellules ne peuvent pas se déplacer librement sous l'effet d'un mouvement Brownien ou par sédimentation. Cette définition générale englobe la formation naturelle de biofilms et d'agrégats par certains microorganismes et les procédés qui consistent à retenir ou à inclure volontairement dans une matrice des cellules bactériennes (Grattepanche, 2005; Lacroix et al., 2005).

I.3.2. Avantages et inconvénients de la technique des cellules immobilisées :

Les procédés d'immobilisation des microorganismes sont des techniques biotechnologiques de plus en plus développées notamment en vue du traitement des eaux ou pour l'industrie car les microorganismes sont ainsi plus faciles à manipuler. Ces techniques d'immobilisation copient la nature où les bactéries sont rarement en suspension et forment au contraire des agrégats, des flocs, des biofilms qui sont des structures qui les protègent.

De très nombreuses études, pour la mise en place de procédés industriels, ont été menées ces dernières années sur les systèmes immobilisés synthétiques ou naturels et ont mis en évidence les avantages et les inconvénients de cette technique. L'avantage majeur est, sans doute, la haute densité cellulaire qui est 10 fois plus élevée qu'en fermentation batch classique (Corre et al., 1992; Prigent et al., 1988) d'où une bioconversion plus rapide.

D'autres avantages lui sont associés :

- ❖ Facilité de récupération/de séparation et une réutilisation possible des cellules ;
- ❖ Une protection contre des forces de cisaillement et certains effets inhibiteurs dans le milieu ;
- ❖ Stabilité biologique et physique des cellules plus élevée en raison de la protection par le support ;
- ❖ Stimulation de la production et de la sécrétion des métabolites ;
- ❖ Stabilité plasmidique (Rétention élevée des plasmides chez les cellules qui en possèdent) ;
- ❖ Il est possible que les systèmes avec des cellules immobilisées soient moins susceptibles aux attaques des bactériophages (Champagne et al., 1994) et à la contamination microbienne (Navratil and Sturdik, 1999) ;
- ❖ Travail en continu.

Cependant, les inconvénients liés à cette technique sont :

- ❖ Possibilité de détachement des cellules du support entraînant une contamination du milieu ;
- ❖ Stabilité mécanique et chimique de certains supports parfois insuffisante (décomposition par le produit, dissolution) ;
- ❖ Possibilité de destruction du support par les cellules qui prolifèrent induisant la libération de ces dernières ;
- ❖ Bioconversion parfois ralentie du fait d'une limitation de la diffusion ;
- ❖ Nécessité d'entreposer les cellules ou de prévenir leur mortalité lors des périodes d'arrêt de production ;

I.3.3. Les techniques d'immobilisation cellulaire :

La méthode d'immobilisation est également un paramètre important. En effet, la diffusion des différents substrats va être fortement modifiée par rapport aux systèmes homogènes mais également en fonction de la méthode d'immobilisation.

En fonction de l'application et des caractéristiques des cellules à immobiliser, différentes techniques ont été développées. Toutes ces techniques imitent ce qui se passe dans la nature, où les cellules des microorganismes croissent presque toujours dans un biofilm, associées entre elles et avec des surfaces (Dunne, 2002).

Suivant la plupart des auteurs (Karel et al., 1985; Kourkoutas, 2004; Verbelen et al., 2006; Willaert and Baron, 1996), elles sont regroupées en 4 catégories : on peut les attacher à des surfaces, les inclure dans des matrices poreuses, les retenir derrière des barrières ou les faire flocculer (figure I.4). Nous avons concentré notre travail sur les systèmes dans lesquels les cellules sont immobilisées par inclusion. Cependant un aperçu de toutes les techniques citées ci-dessus sera donné.

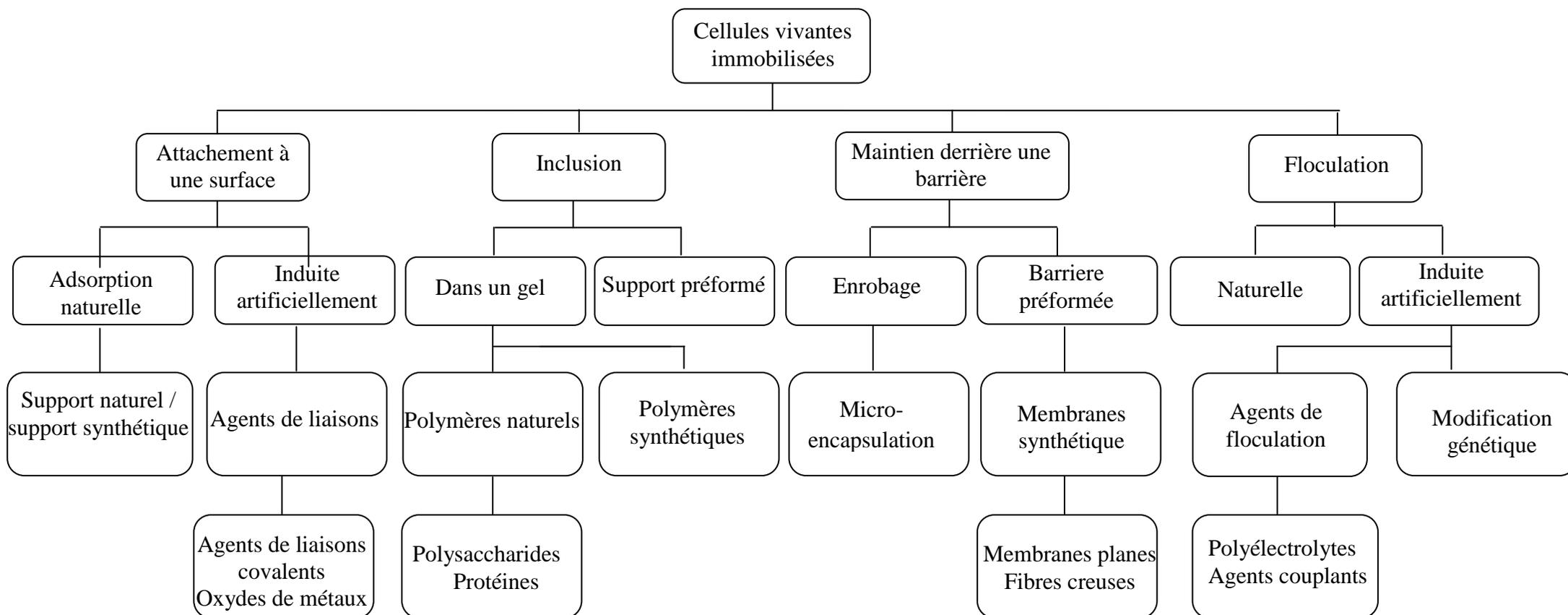


Figure I.4 : Classification des systèmes d'immobilisation, d'après Willaert and Baron (1996).

I.3.3.1. L'attachement à une surface :

L'attachement à une surface peut se faire suivant deux phénomènes : l'adsorption et l'utilisation de liaisons covalentes.

Les systèmes dans lesquels les cellules sont immobilisées par adsorption sont courants du fait de la simplicité de cette technique. Elle résulte d'une attraction électrostatique entre le support et la membrane cellulaire, chargée négativement (Kolot, 1980; Kourkoutas, 2004). L'immobilisation est alors due à des interactions faibles de type Van der Waals, liaisons hydrogène, transfert de charges (liaisons ioniques), échanges d'ions ou encore à des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles) (Kourkoutas, 2004).

La force d'attachement des cellules sur le support est variable et dépend non seulement du microorganisme mais également des supports utilisés qui peuvent être des matériaux de nature très diverse : bois, PVC, brique, silice, bentonite, fragments végétaux... (Strehaiano et al., 2006). En général, la plupart des microorganismes sont chargés négativement. Également, un grand nombre d'EPS (exopolysaccharide) et ainsi de capsules portent une charge légèrement négative. Pour cette raison, il est préférable d'utiliser des supports chargés positivement (Grattepanche, 2005; Strehaiano et al., 2006). Pour des supports non poreux, l'immobilisation des cellules se fait grâce à la formation naturelle d'un biofilm ce qui signifie que l'utilisation de ce type de support n'est pas propice à tous les microorganismes. Groboillot et al. (1994) ont par ailleurs montré, que le biofilm peut se séparer du support lorsque les interactions sont faibles (Chorao, 2008).

L'adsorption est un phénomène réversible, fonction de l'âge des cellules, de la composition de la membrane cellulaire, du pH et de la composition ionique du milieu. Un processus de désorption peut donc avoir lieu lors de variations des conditions du milieu. Bien que ce phénomène puisse être compensé par une croissance des microorganismes immobilisés sur le support, ce risque de désorption existant constitue un inconvénient majeur de cette technique.

La deuxième méthode d'attachement existante utilise les liaisons covalentes qui peuvent s'établir entre les cellules et le support par l'intermédiaire d'un agent de liaison. Cette technique a été développée pour supprimer le phénomène de désorption décrit ci-dessus. Ainsi, l'immobilisation est irréversible et le biocatalyseur présente une grande stabilité.

Le glutaraldéhyde constitue l'agent de liaison le plus utilisé pour l'établissement de liaisons covalentes avec divers supports et convient particulièrement pour les supports de nature protéique. Cependant, les réactifs utilisés sont souvent toxiques pour les microorganismes et peuvent induire une perte de viabilité ou d'activité importante. C'est pourquoi, cette technique n'est plus utilisée pour l'immobilisation de microorganismes mais pour l'immobilisation d'enzymes (Strehaiano et al., 2006) .

I.3.3.2. Inclusion dans des matrices poreuses :

Le procédé d'inclusion dans une matrice poreuse est le procédé d'immobilisation le plus répandu. Les cellules sont incorporées dans une matrice de polymère qui peut être soit un gel, soit un support préformé. Ces polymères sont soit de nature synthétique comme le polyacrylamide ou le cellophane, soit de nature protéique comme la gélatine et le collagène, soit de nature polysaccharidique comme la cellulose, l'alginate, l'agar ou encore le κ -carraghénane (Ela Eroglu et al., 2015).

Elle conduit le plus souvent à des produits de 1 à 5 mm de diamètre, d'une grande stabilité mais présentant une résistance mécanique relativement faible ce qui peut être considéré comme un inconvénient. D'autre part, la matrice polymérique peut être un facteur limitant la diffusion des solutés et/ou gaz nécessaires au microorganisme (Hannoun and Stephanopoulos, 1986). Il est généralement admis que pour les produits de faible poids moléculaire inférieur à 5000 Dalton, la diffusion n'est pas limitée.

a. Inclusion des cellules dans un gel :

Dans ce cas, la matrice poreuse est formée *in situ* autour de la cellule. Avec cette technique, les cellules sont incluses dans un polymère. Ensemble, ils forment le biocatalyseur avec lequel la fermentation est exécutée. Les cellules sont alors piégées par gélification d'une matrice polymère poreuse permettant le transport des substrats et des produits.

Les gels sont de nature polysaccharides, de polymères naturels (polyacrilamide) ou de protéines. Lorsque l'application est pour l'alimentaire, ces gels ne doivent présenter aucune toxicité. Les plus couramment employés sont l'alginate et le κ -carraghénane pour leur faible coût, leur biocompatibilité et leurs propriétés mécaniques, mais nous retrouvons également la gomme de gellan, l'agarose, la gélatine et le chitosan.

Les billes peuvent être obtenues selon divers procédés :

- **Par extrusion** : une solution liquide de polymère mélangée aux microorganismes est extrudée par une seringue engendrant des gouttes sphériques qui tombent dans une solution de durcissement.
- **Par émulsion** : la solution aqueuse de polymère mélangé aux microorganismes est dispersée dans une phase organique donnant une émulsion eau dans huile. Les gouttes dispersées sont alors durcies soit par abaissement de la température soit par ajout d'un gélifiant.

La technique de l'émulsion permet d'obtenir des billes de plus petit diamètre que par extrusion. Une bonne vue d'ensemble de ces procédés est donnée par Groboillot et al. (1994).

L'inclusion de bactéries dans une matrice composée de polysaccharides crée un microenvironnement particulier pour les bactéries modifiant la physiologie et l'activité cellulaires. En effet, de la surface vers le centre de la bille de gel vont se former des gradients chimiques et physicochimiques (nutriments, pH, oxygène, etc.) (Freeman and Lilly, 1998). Les conditions de croissance cellulaire sont, en général, plus favorables à la périphérie des billes qu'au centre notamment car l'accès aux substrats et l'évacuation des produits métaboliques sont plus faciles à la périphérie qu'au cœur des billes, ce qui explique que la biomasse soit plus forte dans la partie périphérique des billes (Arnaud and Lacroix, 1991; Lamboley et al., 1997). Au cours de la colonisation des billes qui a lieu lors de la fermentation une couche cellulaire dense se forme donc à la périphérie des billes.

Lorsque la colonisation des billes est achevée, l'épaisseur de ce biofilm varie suivant divers facteurs comme le type de cellules, la vitesse de diffusion des composés dans la couche cellulaire ainsi que d'autres paramètres de fermentation tels que le pH, la concentration en substrats, l'agitation, la température, etc.

b. Inclusion des cellules dans un support préformé :

La matrice d'immobilisation est ajoutée en début de fermentation. Les cellules diffusent dans les espaces libres du support puis elles s'y développent. Afin d'obtenir des densités de biomasse élevées, des supports de haute porosité sont préférables car ils permettent aux microorganismes d'accéder aux surfaces intérieures et extérieures.

Le diamètre idéal des pores est celui pour lequel les pores sont assez grands pour permettre la diffusion et la croissance des microorganismes dans la matrice mais aussi suffisamment petits pour empêcher la libération des cellules en croissance. Messing and Oppermann (1979) ont déterminé la grandeur optimale des pores pour plusieurs microorganismes. Ils ont trouvé un rapport optimal pour les bactéries de 4 à 5 entre la taille du pore et celle de la cellule. L'utilisation des supports avec des pores plus grands que 100 µm représente une forme d'immobilisation se situant entre la floculation et l'inclusion (Karel et al., 1985).

La matrice préformée protège les cellules contre les forces de cisaillement à l'extérieur du biocatalyseur tout en permettant une bonne diffusion des nutriments et des produits métaboliques (De Backer, 1996). Ce procédé d'immobilisation n'est pas nuisible pour la prolifération des cellules. Cependant, les densités de cellules sont en général moins élevées qu'avec l'inclusion *in situ*.

La méthode d'immobilisation par inclusion semble être simple et douce ; cependant le support doit répondre à certains critères :

- ✓ La polymérisation doit se faire dans des conditions douces, sans utilisation de produits chimiques pouvant être toxiques pour les cellules ;
- ✓ Le support doit prouver une stabilité mécanique ;
- ✓ La taille des pores du support doit être suffisamment grande pour laisser passer les substances à transformer tout en empêchant la libération des cellules ;
- ✓ Le coût de préparation ne doit pas être élevé.

Les supports solides sont en général physiquement et chimiquement résistants envers l'usure par la croissance des microorganismes, ils sont souvent stérilisables par la vapeur et réutilisables. La simplicité du procédé et le faible coût rendent l'immobilisation par adsorption sur des supports solides poreux très intéressante pour l'application industrielle.

Les avantages de la technique d'immobilisation des cellules par inclusion sont :

- ❖ Une réaction de polymérisation ou de gélification connues ;
- ❖ L'applicables à toutes les cellules ;
- ❖ L'obtention de supports à formes adaptables (fibres, billes, ...etc).

Parmi ses inconvénients :

- ❖ Un problème de transfert de matière (inaccessibilité de certains substrats) ;
- ❖ Des propriétés mécaniques des gels insuffisantes.

Comme les matrices d'immobilisation résultent des limitations de transfert de masse, les billes sont en général préférées aux films grâce à leur géométrie sphérique augmentant la surface (Groboillot et al., 1994).

I.3.3.3. Cellules immobilisées derrière une barrière (confinement) :

Le maintien des cellules derrière une barrière peut se faire soit par l'utilisation de filtres avec une membrane microporeuse, soit par le piégeage des cellules dans une microcapsule, soit par immobilisation des cellules sur une surface d'interaction entre deux liquides non miscibles (Kourkoutas, 2004). L'avantage de ces systèmes d'immobilisation est la quantité de biomasse qu'ils permettent de mettre en œuvre, quantité 7 à 10 fois plus élevée qu'en système à cellules libres (Prigent et al., 1988). En revanche, les plus gros inconvénients présentés par l'immobilisation des cellules entre des membranes microporeuses sont la limitation de transfert de masse (Lebeau, 1998) et la possibilité d'encrassement des membranes due à la croissance des cellules.

I.3.3.4 Flocculation :

Il est aussi possible d'augmenter la concentration cellulaire en utilisant le phénomène naturel de flocculation. Cette technique est basée sur la capacité naturelle des microorganismes à adhérer entre eux.

La flocculation peut effectivement être considérée comme une technique d'immobilisation puisque la taille importante des agrégats formés permet une utilisation potentielle dans des réacteurs. Cette faculté à former des agrégats est observée chez les moisissures, les champignons et les cellules végétales. Des agents de flocculation artificiels peuvent également être utilisés pour améliorer l'agrégation dans des cultures cellulaires qui ne flocculent pas naturellement (Karel et al., 1985).

Les méthodes existantes pour immobiliser les microorganismes sont donc nombreuses. Le choix de la méthode est largement gouverné par la nature du microorganisme et l'application auquel il est destiné. (Bucke and Brown, 1983) ont ainsi établi une liste de critères à prendre en compte pour le développement d'une méthode acceptable à l'échelle industrielle. Elle doit (Kourkoutas, 2004; Margaritis and Kilonzo, 2005).

- ✓ être simple et non dangereuse ;
- ✓ être réalisable avec un petit nombre d'étapes et d'ingrédients ;
- ✓ ne pas générer de sous-produits ;
- ✓ être stable sur le temps de conservation
- ✓ être adaptable à l'automatisation ;
- ✓ conduire à des édifices stables à différents pH et températures ;
- ✓ permettre de travailler avec de grandes concentrations de biomasses ;
- ✓ et surtout être peu coûteuse.

I.3.4. Effet physiologique et morphologique de l'immobilisation :

L'immobilisation des microorganismes peut provoquer une modification de leur croissance, de leur physiologie ou de leur activité métabolique (Kourkoutas, 2004; Rong et al., 2007; Shi et al., 1987). Plusieurs travaux ont confirmé ces changements lors des fermentations avec des cellules immobilisées, notamment une tolérance accrue envers l'inhibition par le produit (Grattepanche, 2005; Krisch and Szajani, 1997). En effet, ces dernières semblent être plus tolérantes envers les composés toxiques (alcools, phénols, antibiotiques) et les produits d'inhibition (Doleyres et al., 2004; Gilbert, 2002) ou même envers d'autres facteurs de stress environnementaux (Doleyres, 2002; Jouenne et al., 1994; Keweloh et al., 1990; Lebrun et al., 1994). Junter and Jouenne (2004) ont montré que des cellules immobilisées sont moins sensibles aux variations de pH qui peuvent intervenir au cours d'une fermentation.

L'accumulation des produits métaboliques peut diminuer aussi le taux de croissance et changer la physiologie et la morphologie des bactéries immobilisées (Cachon et al., 1997; Champagne et al., 1994; Krishnan et al., 2001).

Karel et al. (1985) ont déjà constaté que la voie métabolique des cellules attachées à des surfaces peut être différente de celle des cellules libres. Des travaux plus récents ont démontré l'existence de mécanismes de reconnaissance de surface pour les bactéries (Prigent-Combaret et al., 1999; Wen and Burne, 2002) et des changements physiologiques dus à la présence de surfaces (O'Toole et al., 2000).

La physiologie des microorganismes varie aussi suivant leur localisation dans la bille, ceci à cause des limitations de transfert de masse (Junter and Jouenne, 2004). En effet, une limitation du transfert de masse crée un micro-environnement autour des cellules affectant ainsi la diffusion de nutriments vers la cellule (Champagne et al., 1994). Les propriétés du support, les conditions hydrodynamiques dans le réacteur, mais aussi la production et l'excrétion de substances extracellulaires, en particulier des EPS, sont des facteurs qui affectent la résistance à la diffusion (Karel et al., 1985).

Melzoch et al. (1994) ont notamment observé des différences entre levures libres et levures incluses, dans la forme des cellules. Ces différences ont été attribuées au manque de place disponible dans le support pour une croissance des levures immobilisées.

L'immobilisation cellulaire permet aussi d'augmenter la stabilité plasmidique (D'angio et al., 1994; Huang et al., 1996). Elle assure aussi une protection aux microorganismes contre le stress oxydatif et les forces de cisaillements dues à l'agitation et diminue aussi les risques de contamination de la culture comparée aux fermentations avec les cellules libres (Champagne et al., 1994).

I.3.5. Distribution de la biomasse dans les billes d'alginate :

La performance de la biomasse immobilisée dans une matrice de gel dépend des cinétiques de réaction cellulaires, des transferts de masse interne et externe des substrats et des produits, ainsi que du relargage cellulaire de la surface des billes dans le milieu externe.

Dans le cas des bactéries lactiques qui sont sensibles aux produits d'inhibition, les substrats, la concentration des produits et le profil de pH jouent un rôle prépondérant sur la productivité et sur la croissance des cellules immobilisées dans des billes (Sayles and Ollis, 1990).

Le phénomène compétitif de diffusion-réaction explique la croissance cellulaire non uniforme dans les billes colonisées (Monbouquette et al., 1990; Yabannavar and Wang, 1991). Une région de haute densité bactérienne est ainsi formée à la périphérie des billes où les conditions de croissance sont plus favorables (Arnaud and Lacroix, 1991).

L'épaisseur et la concentration bactérienne de cette couche dépendent de la bactérie, de l'effet d'obstruction et des vitesses de diffusion dans la couche cellulaire ainsi que d'autres paramètres de fermentation tels que le pH, la concentration en substrats et en produits et la température.

I.3.6. Phénomène de transfert dans des billes :

Lorsque les microorganismes sont immobilisés par inclusion dans une matrice microporeuse tels que les gels d'alginate, le substrat (phénol) diffuse dans les micropores des billes d'alginate et subit une biodégradation par les cellules immobilisées. Dans ce cas, les réactions de biodégradation et de diffusion sont simultanées et la vitesse globale de biodégradation dépend principalement de la diffusivité dans la matrice microporeuse. Pour cela, il est important de déterminer certains coefficients qui sont (Aksu and Bülbül, 1999; Chen et al., 2013; Chung et al., 2003; Massalha et al., 2010):

- ❖ Facteur d'efficacité : η
- ❖ Module de Thiele : ϕ
- ❖ Coefficient effectif de diffusion: D_e

En supposant que les microorganismes sont répartis uniformément dans des particules de forme sphérique, l'équation suivante peut être écrite en se basant sur la loi de Fick qui indique que la vitesse de diffusion est égale à la vitesse de réaction, à l'état d'équilibre.

$$\frac{3600 D_e}{1000 \rho_p} \left[\frac{d^2 C}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC}{dr} \right] = v \quad (1)$$

Où :

v : vitesse de biodégradation du substrat ($\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ;

C : concentration du substrat à une distance « r » du centre de la particule (mg.L^{-1}) ;

r : distance par rapport au centre de la particule (cm) ;

D_e : coefficient effectif de diffusion (diffusivité effective) du substrat à l'intérieur de la particule ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$) ;

ρ_p : masse volumique des cellules sèches (g.L^{-1})

En supposant que la cinétique de biodégradation du phénol par les cellules immobilisées est une cinétique du premier ordre (en particulier pour les faibles concentrations de phénol), la vitesse de biodégradation peut être définie comme suit :

$$v = kC \quad (2)$$

Où k : est la constante de vitesse pour une réaction supposée d'ordre un (h^{-1})

Alors :

$$\frac{3600 D_e}{1000 \rho_p} \left[\frac{d^2 C}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC}{dr} \right] = kC$$

$$\left[\frac{d^2 C}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC}{dr} \right] = \frac{1000 \rho_p}{3600 D_e} kC \quad (3)$$

Aux conditions limites :

$$\begin{cases} C = C_s; \\ r = R \text{ (rayon de la particule : cm) ;} \\ \frac{dC}{dr} = 0 \text{ à } r = 0 \text{ (centre de la particule).} \end{cases}$$

L'intégration de l'équation (3) donne la variation de la concentration C avec la position radiale R (en négligeant la résistance externe de transfert de masse) :

$$\frac{C}{C_s} = \frac{\sinh(\phi r / R)}{(r / R) \sinh \phi} \quad (4)$$

où

R : rayon de la particule immobilisée (cm),

C_s : concentration de substrat sur la surface des billes,

ϕ : est défini comme étant le module de Thiele pour une particule sphérique, qui est une unité sans dimension exprimée par l'équation suivante :

$$\phi = R \sqrt{\frac{k'}{D_e}} \quad (5)$$

où k' est la constante de vitesse de réaction définie comme l'unité de cm^3 de solution par cm^3 de cellules sèches par secondes dans l'équation suivante :

$$k' = k \rho_p \frac{1000}{3600} \quad (6)$$

Le facteur d'efficacité (η) est une grandeur adimensionnelle, qui est définie comme le rapport de la vitesse globale de la réaction avec des limitations diffusionnelles (v) (cellules immobilisées) à la vitesse de la réaction sans contraintes de diffusion (v_s) (cellules libres).

$$\eta = \frac{v}{v_s} \quad (7)$$

En supposant que la vitesse de biodégradation est égale à la vitesse de diffusion du substrat dans la particule au rayon R , l'équation (8) peut être écrite comme suit :

$$v = 4\pi R^2 D_e \left(-\frac{dC}{dr} \right)_{r=R} \quad (8)$$

La vitesse de biodégradation évaluée dans les conditions de surface extérieure peut être écrite comme suit :

$$v_s = \frac{4}{3} \pi R^2 k' C_s \quad (9)$$

Après plusieurs étapes de simplification, η est donnée par l'équation (10), elle est fonction de ϕ :

$$\eta = \frac{3}{\phi} \left(\frac{1}{\tanh \phi} - \frac{1}{\phi} \right) \quad (10)$$

Le module de Thiele est un indicateur pour savoir si la réaction est soumise à un régime chimique ou diffusionnel.

Lorsque ϕ tend vers 0 et η tend vers 1, la limitation de diffusion n'a pas d'effet sur la vitesse de dégradation, et la réaction de biodégradation contrôle principalement la vitesse globale. Mais lorsque ϕ est grande, la diffusion intraparticulaire a un effet significatif sur la vitesse de biodégradation, et c'est l'étape de diffusion qui contrôle la vitesse globale (Dursun and Tepe, 2005).

I.3.7. Relargage cellulaire des billes :

La croissance cellulaire très active à la surface des billes est contrebalancée par une libération des microorganismes dans le milieu liquide, ce relargage cellulaire assure l'inoculation continue du milieu réactionnel (Doleyres et al., 2002; Lamboley et al., 1999). L'immobilisation cellulaire permet ainsi d'obtenir de hautes densités cellulaires aussi bien dans les billes que dans le milieu réactionnel.

Différents paramètres peuvent influencer le relargage des cellules dans le milieu comme (Champagne et al., 1994; Lamboley et al., 2001):

- ✓ Le type et les caractéristiques de croissance des microorganismes immobilisés ;
- ✓ Les conditions hydrodynamiques dans le réacteur (forces de cisaillements, agitation) ;
- ✓ L'épaisseur et la densité du biofilm à la surface des billes ;
- ✓ La composition et la géométrie des billes.

Le relargage cellulaire dépend de la taille des billes ainsi que de l'agitation du milieu (Sodini-Gallot et al., 1995). En effet, l'agitation favorise les phénomènes de diffusion vers la bille mais, par son effet mécanique, favorise également l'ouverture des cavités vers l'extérieur par l'augmentation des forces de cisaillement (Arnaud et al., 1993). Lors de fermentations en continu avec des cellules de *Lactobacillus casei* ssp. *casei* immobilisées dans des billes, des observations au microscope ont montré qu'il y a abrasion et rupture de la surface de la bille. Ces tensions résultant de la croissance bactérienne ainsi que des effets du cisaillement et des collisions dans les réacteurs agités mécaniquement, provoquent la fuite des bactéries des cavités ouvertes vers le milieu de culture (Arnaud et al., 1992).

Par contre, le relargage cellulaire est peu influencé par la densité cellulaire initiale dans les billes (Champagne et al., 1992).

I.3.8. Applications de cellules immobilisées dans le traitement des rejets industriels liquides :

L'immobilisation cellulaire apporte des avantages dans les processus de fermentation ce qui lui confère un intérêt pour l'industrie agroalimentaire notamment dans :

- ✓ L'utilisation dans les différents procédés de fermentation, comme la production de bière, de vin et autres boissons alcoolisées.
- ✓ La fermentation du lait (production de yaourts, fromages, kéfir...)
- ✓ La production de bio-carburants (bioéthanol).

Une autre application de l'immobilisation des microorganismes réside dans le traitement des eaux usées. En effet, les cellules immobilisées ont été utilisées avec succès pour la biorestauration de nombreux produits chimiques toxiques.

Lu et al. (1996) ont étudié la dégradation de chlorophénols en utilisant des cellules libres et des cellules immobilisées dans des billes d'alginate. Ils ont constaté que les cellules immobilisées dégradent les chlorophénols beaucoup plus rapidement que les cellules libres.

L'immobilisation de microalgues *Chlorella sorokiniana* sur *Luffa cylindrica* pour la décontamination des eaux polluées en métaux lourds a été étudiée par l'équipe d'Akhtar et al. (2003). Ils ont constaté que les microalgues immobilisées fixent 97,9% de cadmium (10 mg.L⁻¹) contre 92,7% avec les microalgues libres (Akhtar et al., 2003b).

De même que pour l'élimination du nickel où les microalgues *Chlorella sorokiniana* immobilisées ont pu éliminer 60,38 mg de nickel par gramme de biomasse, alors qu'elles ne pouvaient éliminer que 48,08 mg de nickel par gramme de biomasse lorsqu'elles étaient en suspension (Akhtar et al., 2003a). Une autre application de *Luffa* en tant que support, est l'immobilisation de consortiums pour la biodégradation de certains herbicides et fongicides polluants. Les résultats montrent que par rapport aux cellules planctoniques, l'immobilisation du consortium sur *Luffa* a réduit de moitié le temps de biodégradation de ces polluants environnementaux (Pattanasupong et al., 2004).

Les cellules immobilisées ont été aussi utilisées pour le traitement des eaux usées chargées en ammonium et en phosphates tel que les cellules de *Chlorella vulgaris*. En effet, Tam and Wong (2000) ont obtenu des taux d'abattement élevés de 78% et de 94% d'ammonium et de phosphate respectivement par des cellules de *C. vulgaris* immobilisées dans des billes d'alginate comparativement à ceux obtenus par les cellules libres qui sont de l'ordre de 40% pour l'ammonium et 59% pour les phosphates.

Sharma and Gupta (2012) ont étudié la biodégradation du phénol présent dans des effluents industriels par *Aspergillus niger* immobilisé dans des billes d'alginate. Leurs résultats montrent qu'ils ont pu dégrader 50% de la charge initiale qui était de 268 mg.L⁻¹. Appliquant le même procédé sur des effluents synthétiques, ces mêmes auteurs ont pu atteindre les 28 mg.L⁻¹ de phénol avec la même concentration initiale.

Ce même microorganisme a été utilisé pour la biorestauration des eaux chargées en métaux lourds (Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺, Pb²⁺, Cd²⁺). En effet, Tsekova et al. (2010) ont immobilisé *Aspergillus niger* dans deux matrices différentes : le gel PVA et l'alginate de calcium. Leurs résultats montrent que la capacité de biosorption des métaux est maximale dans le cas où les cellules sont immobilisées dans des billes d'alginate avec un taux de 44,6 mg.g⁻¹ de biomasse avec un rendement d'élimination de 96,2% pour Cd²⁺; 90% pour Pb²⁺; 80% pour Fe³⁺; 72,8% pour Cu²⁺; 55,4% pour Zn²⁺; 54,4% pour Ni²⁺ et 52,3% pour Mn²⁺.

Des levures ont été utilisées aussi dans le traitement des eaux contaminées par les hydrocarbures. Les études de Lan et al. (2009) ont montré la capacité de *Yarrowia lipolytica* W29 immobilisée dans des billes d'alginate à dégrader 2000 mg d'O₂.L⁻¹ de DCO. De plus les billes ont été stockées pendant 30 jours à 4°C et réutilisées 12 fois. Le taux de biodégradation a été maintenu à 82% après le sixième cycle.

De même que Nair et al. (2007) qui ont utilisé *Alcaligenes sp.* Immobilisée dans des billes d'alginate pour le traitement des effluents de papeterie. Ils ont pu atteindre des taux d'abattement maximum de l'ordre de 99% pour le phénol et 92% pour la DCO en mode continu avec un temps de séjour de 8h et un débit d'alimentation de 2,5 ml.h⁻¹.

À l'aide des bactéries méthanogènes immobilisées dans un gel d'agar de polyacrylamide ou de collagène, il est possible de produire du méthane à partir d'eaux usées. La production de gaz par cette technique peut atteindre $450 \text{ mmol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de matière sèche.

L'immobilisation de *Clostridium butyricum* sur un substrat à base de glucose forme une cellule de combustible, capable de générer 1,2 mA durant 15 jours. En présence d'eaux usées contenant de l'alcool, il est possible de générer un courant qui peut atteindre 8-9 mA durant 20 jours. Dans ce cas, *Clostridium butyricum* est immobilisé sur un lit de polyacrylamide. Pour la production anaérobie de H_2 , un bioréacteur à lit bactérien solide est conçu. La production de courant dans la cellule électrochimique, provient d'une modification des potentiels suite à l'abaissement des valeurs de pH (Rainer, 1999).

I.3.9. Immobilisation des cellules dans un gel d'alginate :

L'alginate a fait l'objet de plusieurs études tout comme le chitosan ou le polyacrylamide. Ces polymères permettent la formation d'objets massiques homogènes facilement utilisables dans des cinétiques de biodégradation. Notre choix s'est orienté vers les alginates, en raison de leurs propriétés intéressantes :

- ❖ l'alginate est neutre vis-à-vis des micro-organismes et n'affecte pas leur activité ;
- ❖ La formation du gel est facile par réticulation des chaînes de polymère ;
- ❖ Les billes obtenues sont assez stables chimiquement et mécaniquement pour une utilisation en suspension dans une phase liquide ;
- ❖ Les pores du gel sont suffisamment grands pour ne pas limiter la diffusion des substrats et des produits de la réaction à l'intérieur de la matrice.
- ❖ De plus, le genre *Pseudomonas aeruginosa* (utilisé dans notre étude) synthétise l'alginate en réponse aux conditions environnementales. Elle sert à protéger les bactéries dans leur environnement et améliore également leur adhérence sur des surfaces solides. La transcription des gènes biosynthétiques d'alginate est induite lors de la fixation, ce qui conduit à une production accrue d'alginate. En conséquence, le biofilm se développe (Boyd and Chakrabarty, 1995; Cotton et al., 2009).

D'ailleurs, la littérature montre qu'un certain nombre d'études a déjà été réalisé avec ce composé et donne des résultats prometteurs.

Cependant, avant de présenter cette matrice et ses propriétés, nous avons jugé utile de donner quelques définitions.

a. Les hydrogels :

L'hydrogel est un type particulier de gel formé par un réseau tridimensionnel de polymères hydrophiles dans lequel le solvant de gonflement est l'eau (Hoffman, 2002). Sa principale caractéristique est sa capacité à gonfler en présence d'eau et à se contracter lorsque celle-ci s'évapore. Suivant la nature des pontages mis en œuvre dans le réseau, il est possible de distinguer les hydrogels « chimiques » des hydrogels « physiques ».

Dans les hydrogels **chimiques**, des liaisons covalentes assurent la cohésion du gel et l'équilibre de gonflement est déterminé par le taux de réticulation.

Les hydrogels « **physiques** » présentent des pontages ioniques et des interactions de type Van der Waals. Ils sont plus hétérogènes en termes de structure chimique que les hydrogels chimiques en raison de la présence de larges domaines d'enchevêtrement des chaînes. Un cas particulier est celui des polyélectrolytes qui, combinés avec un ion multivalent de charge opposée, peuvent former un hydrogel physique connu sous le nom de « **gel ionotropique** » et dont l'alginate de calcium est un exemple (Donati and Paoletti, 2009).

b. La transition sol-gel:

Un **gel** est un solide mou qui peut se déformer facilement sous l'action d'une faible pression. Pour obtenir un gel, il faut partir de deux constituants distincts : un solvant et un soluté.

La formation du gel passe par une étape appelée **transition sol-gel**, correspondant au passage de l'état liquide à l'état solide obtenu quand le réseau tridimensionnel formé par la structuration de la matière dispersée est de taille infinie.

La phase initiale est constituée par un **liquide** (de l'eau dans le cas d'un hydrogel) dans laquelle est dissout un **composé moléculaire** qui est le plus souvent un polymère. Cet état fluide constitue une **solution vraie** où les macromolécules ne sont pas organisées les unes par rapport aux autres : c'est **l'état sol** (solution). Dans certaines conditions (température, pH, réticulant) le sol subit **une transition de phase** et passe à **l'état gel**. Ce dernier apparaît quand suffisamment de chaînes se sont associées pour former un réseau ou un gel de consistance élastique. C'est ce qu'on appelle la **transition sol-gel**.

Dans l'état gel, le solvant et le soluté forment un réseau tridimensionnel. On peut caractériser un **gel** de la façon suivante (Papon et al., 1999):

- ❖ Un gel constitue une phase homogène à deux composants : un soluté dissout dans une phase liquide.
- ❖ Le constituant dissout ou dispersé et le solvant occupent tout le volume de la phase gel : ils sont interconnectés sous forme d'un réseau tridimensionnel.
- ❖ La phase gel a un comportement de solide sous l'action de forces microscopiques.

Dans les parties suivantes, nous présenterons en détail l'alginate, sa structure et ses propriétés de gélification. Ensuite, nous nous intéresserons à la stabilité de l'hydrogel d'alginate en présence de sels.

I.3.9.1. Les Alginates : des polysaccharides naturels

I.3.9.1.1. Présentation de l'alginate :

Les alginates sont des polysaccharides linéaires contenus dans les laminaires, genre d'algues brunes (*Laminaria digitata*). Sous la forme d'acide alginique, elle constitue une part importante de la structure membranaire des cellules des algues. Néanmoins, dans la nature, cette famille de polymères est également produite par des bactéries du genre *Azobacter* et *Pseudomonas* (polysaccharide de la capsule). La biosynthèse bactérienne des alginates a principalement été étudiée chez *Pseudomonas aeruginosa*.

La production à partir d'algues brunes est beaucoup plus courante de par son prix beaucoup plus attractif qu'à partir des bactéries. Cependant cette technique est dépendante des conditions climatiques et de pollution ; c'est pourquoi la commercialisation d'alginates bactériens se développe. De plus, la production bactérienne permet une parfaite maîtrise de la structure de la chaîne polymère grâce au progrès de la génomique (Goldberg and Ohman, 1984; Perez et al., 1984).

La production d'alginate par les bactéries présente pour les bactéries elles-mêmes un rôle très important de protection. Le polysaccharide forme une capsule visqueuse, composée majoritairement d'alginate et d'un autre expopolysaccharide qui entoure par exemple *P. aeruginosa* et lui permet de se protéger de l'action non spécifique des cellules phagocytaires, de la déshydratation et des antibiotiques (Goldberg and Ohman, 1984).

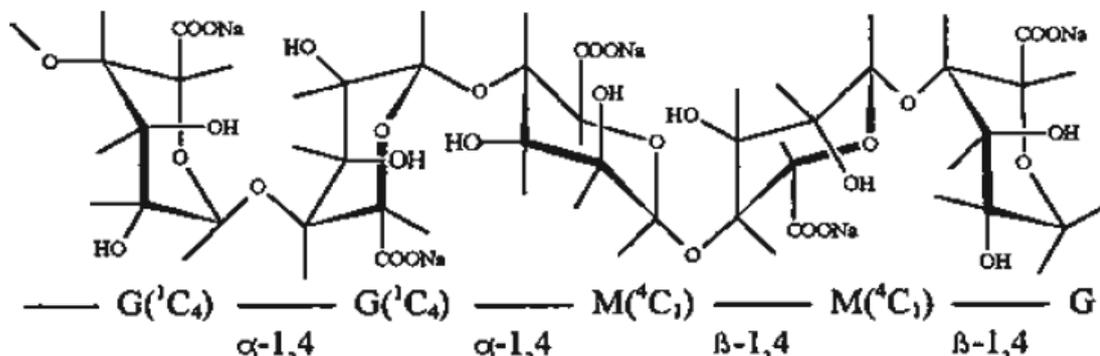
I.3.9.1.2. Applications générales d'alginate :

Grâce à leurs propriétés physico-chimiques, les alginate sont exploités dans différentes filières industrielles : pharmaceutique, agroalimentaire, industrie de papier, et de textile.... Le tableau I.4 regroupe les principales applications d'alginate dans les différents secteurs industriels (Amer, 2013).

Tableau I.4 : Application d'alginate dans les différents secteurs industriels

Secteurs industriels	Application des alginate
Industrie pharmaceutique et biotechnologies	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Encapsuler et contrôler la diffusion et la libération des principes actifs et d'autres produits chimiques. ❖ Epaissir des pommades. ❖ Gélifiant dans les pâtes à empreinte dentaire. ❖ Stabilisateur d'émulsion. ❖ Agglomérant dans les comprimés.
Industrie agroalimentaire	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Agent texturant (épaississant ou gélifiant) : confitures, jus de fruits, sauces (moutarde, mayonnaise), potages, produits laitiers, stabilisateur dans les crèmes glacées (empêche la formation de cristaux).
Industrie du papier	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Agents filmogènes (freinent l'évaporation de l'eau à la surface). ❖ Amélioration de l'uniformité de surface. ❖ Amélioration de la prise d'encre et d'imprimabilité.
Industrie textile	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Epaissir la pâte qui contient le colorant. ❖ Fixer des colorants, inerte, bons contrastes et couleurs des motifs imprimés.
Industrie cosmétique	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Soins de visage, dentifrice.

L'alginate le plus couramment utilisé est l'alginate de sodium (figure I.5) vu qu'il est disponible commercialement.



G : acide α -L guluronique M : acide β -D-mannuronique

Figure I.5 : Alginate de sodium

L'**alginate de sodium** ou **polymannuronate sodique**, de formule $(\text{C}_6\text{H}_7\text{Na}_{1/2}\text{O}_6)_n$, est un additif alimentaire (E401), utilisé dans les boissons, constitué d'alginate et de sodium. Il se présente sous forme de poudre blanche à blanc crème, inodore et sans saveur, très soluble dans l'eau. Il s'agit d'une longue molécule synthétisée à partir de l'acide alginique, extraite d'algues brunes, constituée d'unités glucidiques formant une chaîne.

I.3.9.1.3. Structure et propriétés de l'alginate :

I.3.9.1.3.1. Structure de la chaîne :

Les alginates sont constitués d'unités acide β -D-mannuronique (M) et acide α -L guluronique (G) (figure I.6) qui peuvent être associés dans différentes séquences. Ces deux acides qui sont liés par des liaisons glycosidiques β -(1-4) et α -(1-4) possèdent des propriétés très intéressantes qu'ils confèrent aux algues. L'acide D-mannuronique (M) a la propriété d'être mou et souple contrairement à l'acide L guluronique (G) qui a un caractère ferme. La teneur en acide guluronique et en acide mannuronique est variable (Le rapport acide mannuronique/acide guluronique varie de 0,5 à 2,5) (Palluault, 2010).

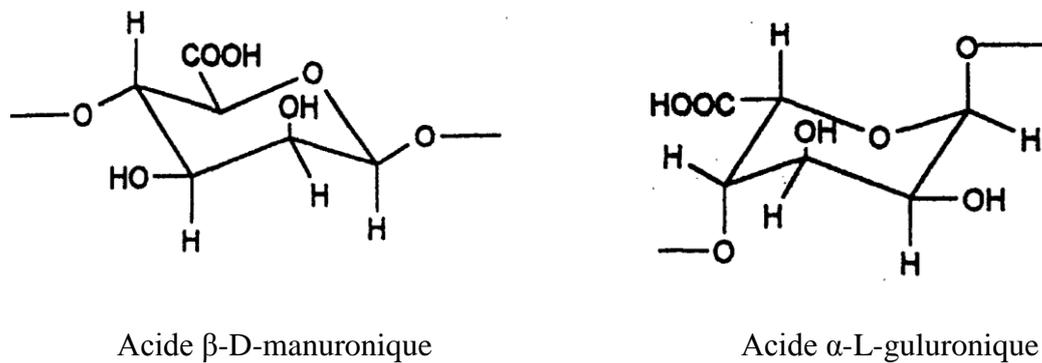


Figure I.6 : Monomères de la chaîne alginate

Les motifs M et G sont organisés en blocs, formant ainsi des séquences répétitives donnant leurs propriétés aux chaînes d'alginate. Comme présenté sur la figure I.7, ces blocs forment des régions homopolymériques de motifs M (appelés blocs M), de motifs G (appelés blocs G) ou des régions de structure alternée (blocs MG). Une hydrolyse partielle suivie d'un fractionnement peut permettre de séparer ces blocs (Haug et al., 1966).

La plupart des alginates industriels ont un degré de polymérisation variant de 100 à 1000 soit un poids moléculaire compris entre 20 000 et 200 000 Da. Dans le cas de l'alginate de sodium, il peut varier de 35 000 à 1 500 000 Da.

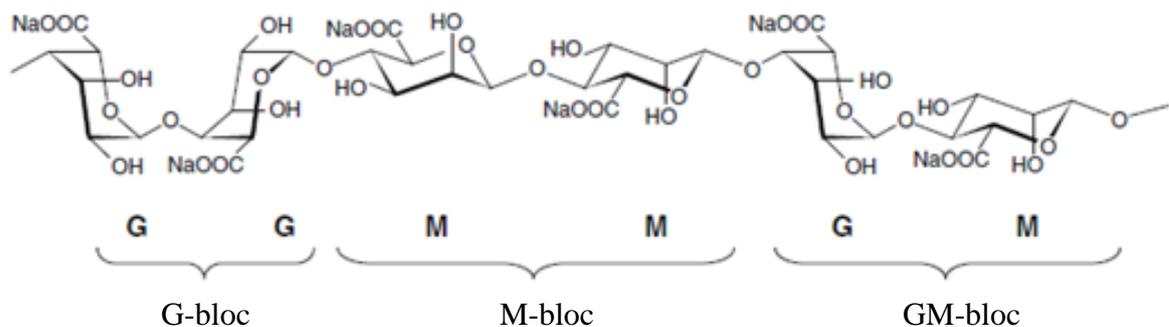


Figure I.7 : Conformation d'alginate

La composition en monomères G et M de l'alginate influe directement sur ses propriétés physiques. Or, cette composition peut varier selon l'espèce d'algue dont il est tiré mais aussi par l'application de traitements biochimiques, comme par exemple l'action d'épiméras, enzymes transformant un type de monomère en son isomère (Rocher, 2008).

I.3.9.1.3.2. Propriétés des alginates :

I.3.9.1.3.2.1. Propriétés thermodynamiques :

I.3.9.1.3.2.1.1. Solubilité :

Les alginates sont solubles à froid et permettent ainsi d'obtenir facilement des solutions visqueuses. Grâce à sa solubilité dans l'eau, c'est l'alginate de sodium qui est le plus utilisé bien qu'insoluble dans l'éthanol et les solvants organiques.

Cependant, la solubilité est inversement proportionnelle à la longueur des chaînes. L'alginate de sodium, comme tous les sels d'alginate monovalents, est soluble dans l'eau pour des valeurs de force ionique faibles. Lorsque la salinité du milieu augmente, la solubilisation du polyanion est compromise (Rolland, 2013).

L'alginate forme un gel lorsqu'il est mis en solution avec des cations di- et polychargés à l'exception de Mg^{2+} . De plus, les cations monovalents n'induisent pas de gélification

En effet une des particularités les plus intéressantes des alginates est qu'ils présentent une affinité sélective, c'est-à-dire qu'ils se lient plus ou moins facilement aux cations divalents en fonction de la nature de ceux-ci (Haug and Smidsrod, 1970). Par exemple, l'affinité augmente dans l'ordre :



Cette affinité dépend des forces électrostatiques mais aussi en grande partie de l'encombrement stérique. Elle varie aussi fortement en fonction de la composition de l'alginate, en augmentant avec la quantité de blocs G présents dans le polymère (Palluault, 2010).

Les cations Ba^{2+} et Sr^{2+} produisent des gels d'alginate très résistants. Le cation Ca^{2+} est le plus souvent utilisé ; lorsqu'il est mis en solution avec de l'alginate de sodium, il s'échange avec deux ions Na^+ et se lie avec les groupements hydroxyle des unités G de l'alginate (figure I.8). De cette manière, la résistance du gel dépend du nombre d'unités G présentes dans le polymère par rapport au nombre d'unités M (Chorao, 2008).

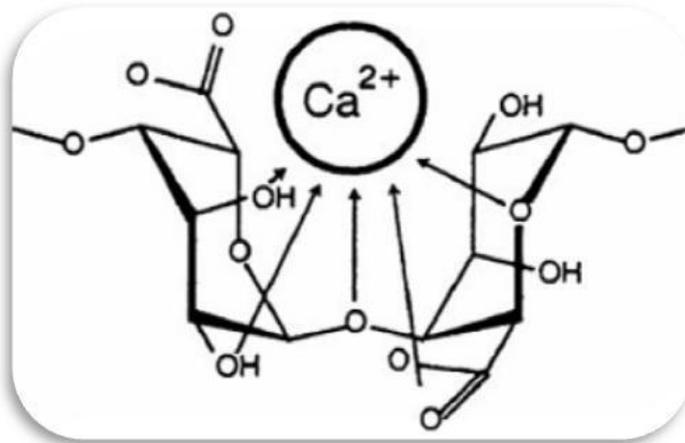


Figure I.8 : Coordination d'un cation de Ca^{2+} avec deux unités d'acide guluronique

Le pH de la solution joue aussi un rôle dans la solubilisation des alginate. Si le pH de la solution contenant l'alginate est inférieur au pKa de l'acide mannuronique (pKa=3,38) ou de l'acide guluronique (pKa = 3,65), alors il peut y avoir séparation de phases voire formation d'un hydrogel (Haug et al., 1963). La sensibilité des alginate vis-à-vis du pH de la solution dépend non seulement de la masse molaire mais aussi de la composition chimique et de la séquence des blocs. Les alginate contenant plus de sections alternées (blocs MG) précipiteront à des valeurs de pH plus faibles que les alginate contenant plus de blocs homogènes (M et G) (Haug et al., 1967).

I.3.9.1.3.2.1.2. Viscosité :

La viscosité d'une solution d'alginate dépend essentiellement du volume hydrodynamique des chaînes polymères. Ainsi, elle varie fortement en fonction de la longueur moyenne des chaînes (masse molaire) et des conditions opératoires (solvant, température, force ionique) qui ont une influence à la fois sur la conformation et la flexibilité des chaînes. Une augmentation de la masse molaire d'un alginate implique naturellement une augmentation de la viscosité de la solution d'alginate, ce qui peut être bénéfique pour plusieurs applications dans l'industrie alimentaire ou les impressions textiles (Palluault, 2010).

I.3.9.1.3.2.1.3. Formation des hydrogels d'alginate de calcium (Gélification) :

Les propriétés physiques de l'alginate ont été principalement découvertes dans les années 1960 et 1970. A la différence des autres polysaccharides gélifiants, la principale caractéristique de l'alginate est sa gélification avec des cations bivalents. De plus, sa transition sol-gel n'est pas influencée par un changement de température.

L'hydrogel d'alginate de calcium est un gel physique formé par les interactions électrostatiques entre les ions bivalents Ca^{2+} et les groupes carboxylates COO^- présents dans le polysaccharide. Lorsqu'une solution d'alginate entre en contact avec des ions calcium, une précipitation très rapide s'opère et donne lieu à la formation d'un gel. On peut donc parler de transition sol-gel d'alginate de calcium qui s'effectue en trois étapes consécutives (Fang et al., 2007) (figure I.9).

La première étape est l'interaction des ions Ca^{2+} avec une simple chaîne guluronate pour former un monocomplexe. Deux blocs G de deux chaînes de polymères adjacentes peuvent être réticulés par un cation bivalent Ca^{2+} , par une interaction électrostatique entre les deux groupes carboxyliques COO^- du polysaccharide. Cette complexation non covalente donne lieu à la formation d'un réseau à trois dimensions.

La deuxième étape consiste en la propagation et la formation de dimères de type « boîte à œufs » *via* l'association de ces monocomplexes. En effet, lorsque deux brins de polymère sont face à face, la conformation des blocs G forment des cavités dans lesquelles viennent se loger les ions Ca^{2+} . Cette dimerisation des blocs G est communément appelée structure type "boite d'œufs".

La troisième et dernière étape est l'association latérale des dimères « boîte à œufs », qui forment ainsi des multimères (Braccini et al., 1999).

Un schéma représentatif de la gélification des chaînes d'alginate est représenté dans la figure I.9.

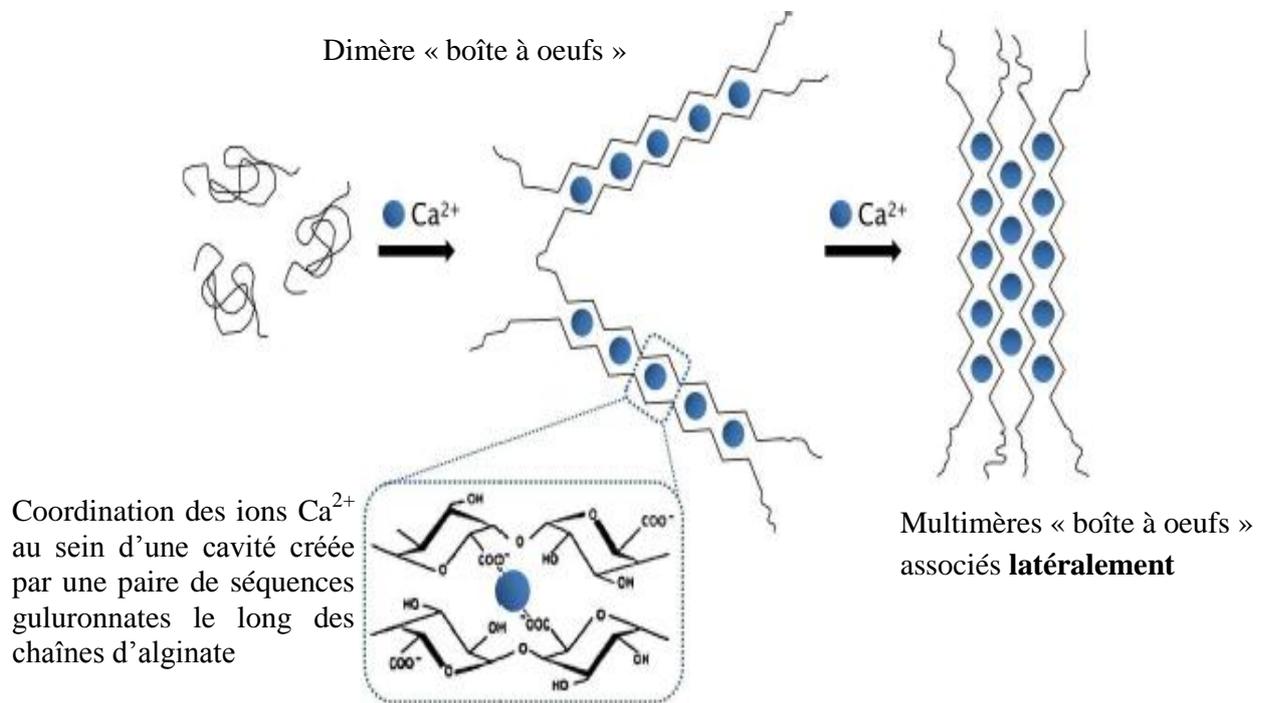


Figure I.9 : Etapes de formation du gel Ca-Alginate (Braccini et al., 1999)

Pour des solutions d'alginate très concentrées subissant une exposition rapide aux ions calcium, il y aura une gélification rapide, forte et irréversible, provoquant ainsi la formation de gels hétérogènes. Il est alors impossible de distinguer les trois étapes d'association alors que les valeurs théoriques de stœchiométrie restent valables.

La rigidité du gel obtenu dépend du ratio entre les blocs G et les blocs M contenus dans le polymère (ration G/M). De façon générale, les alginates composés d'un faible ratio G/M forment des gels plus mous et élastiques, alors que les alginates avec ratio G/M élevé donnent plutôt des gels durs et cassants (Draget et al., 1994).

Il existe deux méthodes fondamentales de gélification de l'alginate :

- **Une technique de gélification interne** : cette technique consiste à reléguer des ions calcium de manière contrôlée (par réaction chimique, changement de pH, changement de solubilité...) à partir d'une source de calcium initialement présente à l'intérieur de l'alginate (mélange de CaCO_3 dans la solution d'alginate, qui libère des ions Ca^{2+} par réaction chimique).

- **Une technique de diffusion externe** : qui consiste quant à elle à faire diffuser dans la solution d'alginate des ions calcium à partir d'un réservoir infini (une goutte d'alginate est plongée dans un bain contenant un sel de calcium). Cette méthode, caractérisée par une cinétique très rapide de gélification, est largement utilisée pour l'immobilisation d'actifs biologiques dans une bille de gel (Rolland, 2013).

Dans ce cas, on constate que la distribution des zones de réticulation est très hétérogène au sein de la bille, avec une forte concentration de ces zones à la surface de cette dernière et une très faible concentration (qui tend vers zéro) au centre du gel. L'alginate présente alors un gradient de concentration en points de réticulation, ce qui entraîne la formation d'une coque très réticulée entourant un cœur presque liquide. Ce gradient de concentration de gel réticulé est dépendant de la masse molaire de l'alginate, de la nature du contre ion (Ca^{2+} par exemple) ainsi que de leur concentration (Thu et al., 2000). De manière générale, l'utilisation d'un alginate à forte masse molaire et d'un contre-ion concentré permettra l'obtention d'un hydrogel homogène (Palluault, 2010).

I.3.9.1.4. Stabilité des hydrogels :

I.3.9.1.4.1. Dissolution du gel en présence d'un sel chélatant :

Dans l'eau pure, la barrière énergétique est trop grande pour casser les liaisons électrostatiques entre le calcium et l'alginate. Mais la présence d'un ion chélatant abaisse cette barrière et rend le gel réversible. En effet, l'énergie des interactions entre la chaîne alginate et les cations divalents sont très sensibles aux variations de composition du milieu. La sensibilité des hydrogels à des espèces capables de chélater les ions divalents (citrate, lactate, EDTA...) et des espèces ioniques gênant l'action du cation divalent (Na^+ , ...) est l'une des principales entraves à sa stabilité. En effet, le gel peut être détruit si les ions calcium sont déplacés par un agent chélateur (PO_4^{3-}) ou par d'autres cations (Mg^{2+} , K^+) (Bucke and Brown, 1983; Ela Eroglu et al., 2015; Groboillot et al., 1994).

Le citrate de sodium $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, par exemple, possède 3 sites carboxyliques et peut donc chélater les ions calcium. La barrière énergétique est abaissée, les ions calcium précipitent avec les ions citrate pour former un complexe (citrate de calcium), et le gel d'alginate est dissout.

Le traitement des gels d'alginate avec l'une de ces espèces peut entraîner le gonflement du gel, une variation de sa porosité ou bien encore sa complète dissolution.

La présence de ces cations dans le milieu, ainsi que d'agents chélatants, contribue au gonflement du réseau de deux façons différentes :

- ❖ Les ions calcium, captés par les agents chélatants, sont éliminés des sites de jonctions, ce qui a pour effet de diminuer le nombre de points de réticulation physique, réduisant ainsi la force élastique de contraction du réseau
- ❖ Le remplacement des ions réticulants divalents par des ions monovalents augmente le nombre de contre-ions dissociables (un ion calcium est remplacé par deux ions sodium par exemple), ce qui a pour effet d'augmenter la pression osmotique (Palluault, 2010).

I.3.9.1.4.2. Propriétés mécaniques des gels d'alginate :

Le type de cation utilisé a aussi une influence notable sur les propriétés mécaniques des hydrogels d'alginate. Stokke et al. (1991) a montré que la longueur nécessaire d'unités G pour former une jonction inter-chaînes diminue lorsque l'affinité du cation envers les alginate augmente. Les cations ayant une affinité plus forte forment un plus grand nombre de jonctions (et donc un plus grand nombre de chaînes élastiques actives) par unité de volume. La rigidité des gels d'alginate diminue dans l'ordre :



La composition de la chaîne d'alginate a de ce fait une influence sur les propriétés mécaniques de l'hydrogel (Palluault, 2010).

I.3.10. Mise en œuvre de microorganismes immobilisés :

Afin d'éviter le recours à l'étape de séparation (micro-organisme-effluent traité), des technologies plus avancées ont été développées, ce sont les réacteurs à cellules immobilisées. Les microorganismes, en présence d'un solide (ou un support), vont progressivement coloniser sa surface et former un biofilm au sein duquel la chaîne trophique peut s'organiser d'une manière plus efficace qu'en suspension.

De ce fait, différents réacteurs à cellules immobilisées ont été mis en œuvre dans le traitement biologique des eaux usées. Le choix de la configuration de ces réacteurs est lié à la méthode d'immobilisation, au métabolisme cellulaire et aux transferts de masse et de chaleur nécessaires.

I.3.10.1. Cellules immobilisées sur un support fixe :

Dans la configuration lit fixe (figure I.10), l'ensemble du réacteur est rempli par le biocatalyseur, et l'alimentation passe à travers ce lit. Ce type de réacteur a un fonctionnement semblable au réacteur de type piston, qui permet de mimer théoriquement les différentes phases de la réaction fermentation en batch. Ses avantages sont, sa facilité de mise en œuvre et son faible coût. Cependant, dans la pratique, ce type de fonctionnement n'est pas idéal, du fait du problème d'accumulation de biomasse, d'évacuation des gaz et de limitations de transferts de masse qui peuvent éventuellement être observés (Kassim, 2012).

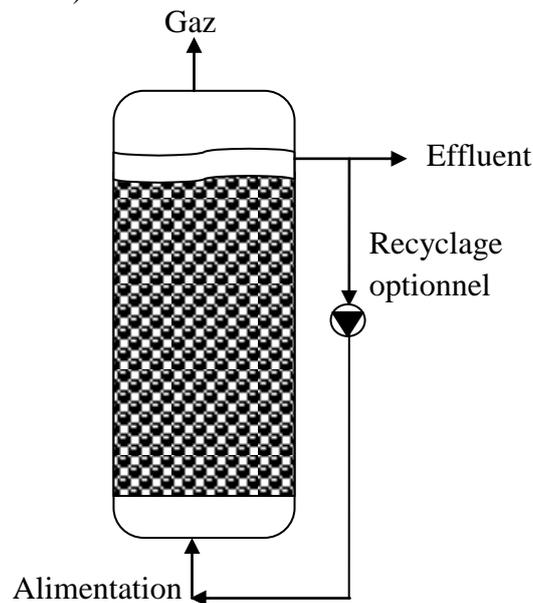


Figure I.10: Réacteur à lit fixe

I.3.10.2. Cellules immobilisées sur support mobiles :

Dans ces réacteurs, les micro-organismes sont immobilisés sur un support granulaire mis en suspension par un courant de liquide (ou de gaz) ascendant ou descendant, suivant la densité du support.

Les avantages des réacteurs à lit mobile résident dans le fait d'avoir une meilleure homogénéité du milieu, une moindre sensibilité au colmatage, et une meilleure activité biologique du biofilm (Michaud, 2001).

Les résultats d'études pilotes en laboratoire et sur site ont rapporté les lits mobiles par rapport à la plupart des autres systèmes biologiques à culture libre ou fixée présentent, principalement, une meilleure efficacité, jusqu'à dix fois celle d'un procédé à boues activées et ils nécessitent moins d'espace (Rabah and Dahab, 2004).

Les principaux réacteurs utilisés dans la biodégradation sont : réacteurs mécaniquement agités, aérés ou non, les colonnes à bulles et les airlifts et, enfin, les réacteurs à lit fixe ou fluidisé.

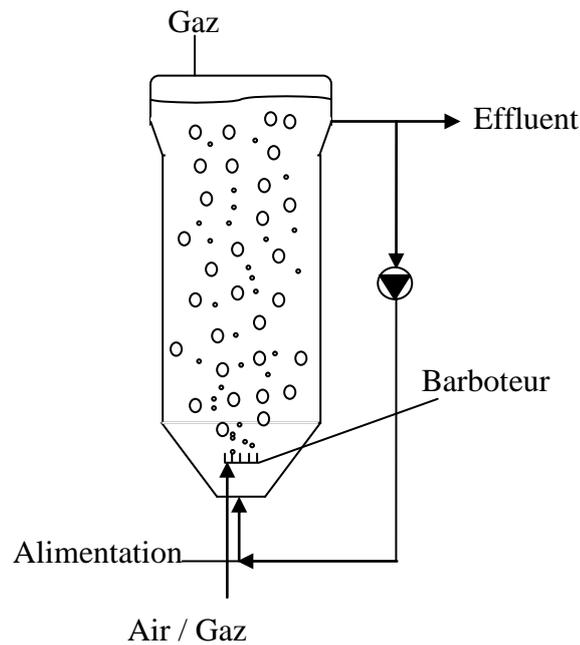
Pour le traitement des eaux résiduaires, les réacteurs triphasiques gaz/liquide/solide sont des procédés très prometteurs où :

- ❖ la phase liquide, continue, est l'eau à traiter,
- ❖ la phase gazeuse (air), dispersée sous forme de bulles assure l'apport de l'oxygène nécessaire au processus biologique,
- ❖ la phase solide, constituée de particules, sert de support pour la fixation et la croissance de la biomasse.

Dans la présente étude, nous nous intéresserons à la mise en œuvre des cellules immobilisées dans deux types de réacteurs : réacteur à lit fluidisé et réacteur agité. Les notions que nous allons introduire ci-dessous seront utiles pour une bonne compréhension du phénomène de biodégradation du phénol par des cellules immobilisées sur un support mobile.

I.3.10.2.1. Lit fluidisé :

Ce réacteur consiste en une colonne dans laquelle les cellules immobilisées sont maintenues en suspension les unes par rapport aux autres grâce à un flux continu et important, de substrat liquide ou de gaz (figure I.11). Ce mode de fonctionnement permet un mélange important des phases liquide/solide et gaz. Avec un fonctionnement de type piston dispersé, la fluidisation permet un meilleur transfert de masse, l'évacuation de cellules en suspension (limitation de l'accumulation de biomasse). Mais la limitation réside dans le fait que pour assurer la fluidisation un débit important de liquide ou gaz est nécessaire. Il s'agit donc d'un procédé intéressant pour des biodégradations à vitesse de réaction élevée ou qui nécessitent une forte aération (Antonini, 2008).



- o Support d'immobilisation
- ° Bulles d'air / Gaz

Figure I.11: Réacteur à lit fluidisé

Ce sont des procédés dans lesquels l'expansion du lit est supérieure à 30% et se caractérisent par une fluidisation plus facile à définir. L'avantage majeur des lits fluidisés provient de la mobilité des particules qui permet d'assurer un bon mélange du milieu réactionnel et réduit les possibilités de colmatage.

Le faible diamètre des particules utilisées (sable, basalte, pierre ponce), entre 0,5 et 2 mm, permet d'atteindre des surfaces spécifiques offertes pour la colonisation très importantes de 3000 à 5000 $\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ de réacteur (Nicolella et al., 2000). Ainsi, les concentrations en biomasse dans le réacteur se situent couramment entre 15 et 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Nicolella et al., 2000) et peuvent atteindre 50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Van Loosdrecht and Heijnen, 1993).

I.3.10.2.1.1. Régimes de fluidisation :

Pour un lit de particules donné, l'état de la suspension change en fonction de la vitesse de fluidisation. En augmentant de façon progressive le débit de fluidisation (en pratique nous utiliserons la notion de **vitesse de fluidisation** qui correspond à la vitesse en fût vide), nous observons les phénomènes suivants (figure I.12) :

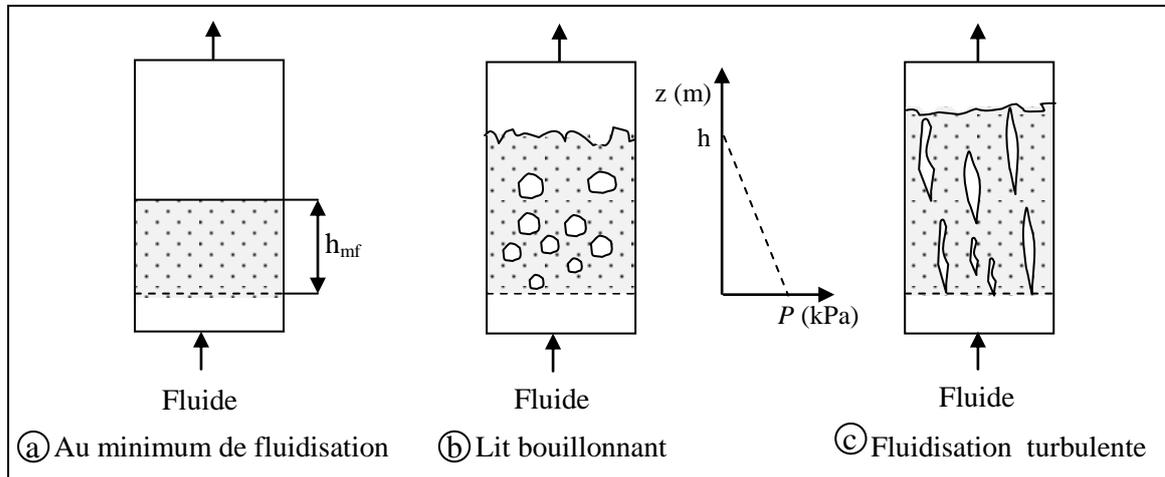


Figure 1.12 : Changement d'état d'un lit de particules au fur et à mesure que la vitesse de fluidisation croît

Aux très faibles vitesses de gaz, les particules sont immobiles. Aucune fluidisation ne se produit (Antonini, 2008);

- ❖ A une vitesse U_{mf} que nous appellerons **vitesse minimale de fluidisation**, les particules bougent légèrement et se mettent en suspension. La suspension reste homogène et aucune bulle n'apparaît sous cette condition ;
- ❖ A une vitesse légèrement supérieure à U_{mf} , des bulles apparaissent. Nous l'appellerons la **vitesse de bullage** U^o . Sauf pour les particules de grosse taille, cette vitesse est très proche de U_{mf} et peut être confondue avec celle-ci. En pratique industrielle, on considère que le bullage commence pratiquement au minimum de fluidisation ;
- ❖ En augmentant la vitesse de fluidisation et sur une plage opératoire relativement large, le lit reste fluidisé. Dans ce régime, les bulles ont une forme régulière, souvent sphérique mais avec une calotte inférieure remplie de particules solides (**la traînée**). Ce régime de fonctionnement est appelé **la fluidisation bouillonnante** et correspond à celui qui est le plus souvent utilisé ;

- ❖ Au fur et à mesure que la vitesse de fluidisation augmente, la taille et le nombre des bulles croissent progressivement et l'agitation de la suspension devient de plus en plus violente. Cette agitation est produite par l'ascension des bulles et par le fait qu'elles entraînent dans leur sillage une partie de la suspension. À des vitesses importantes, la forme des bulles devient irrégulière. On appelle ce régime **la fluidisation turbulente** ;
- ❖ Quand on dépasse la **vitesse terminale de chute libre des particules** (U_t), celles-ci quittent le lit fluidisé avec le courant gazeux. Si l'on empêche la vidange du lit en récupérant les particules dans des dispositifs annexes, pour les réintroduire dans le lit fluidisé, un nouveau régime de fluidisation s'établit. On appelle ce régime **le lit transporté**.

Un solide mis en suspension possède des propriétés d'écoulement similaire à celles d'une phase liquide. Ainsi, le profil de pression suivant la hauteur de la suspension dans un lit fluidisé est en général parfaitement linéaire (figure I.12).

Cette propriété permet de définir le niveau de la surface du lit (pour un système fermé et opaque), par extrapolation de la droite du profil de pression. Si l'on étudie les variations du gradient total de la pression (entre le fond et la surface du lit), en fonction de la vitesse de fluidisation, on obtient le diagramme de la figure I.13. On constate que ce gradient de pression reste constant dans la plage des vitesses comprises entre U_{mf} et U_t . Ce phénomène est dû au fait que la pression nécessaire pour maintenir le lit fluidisé en suspension correspond au poids de la suspension par unité de surface du lit.

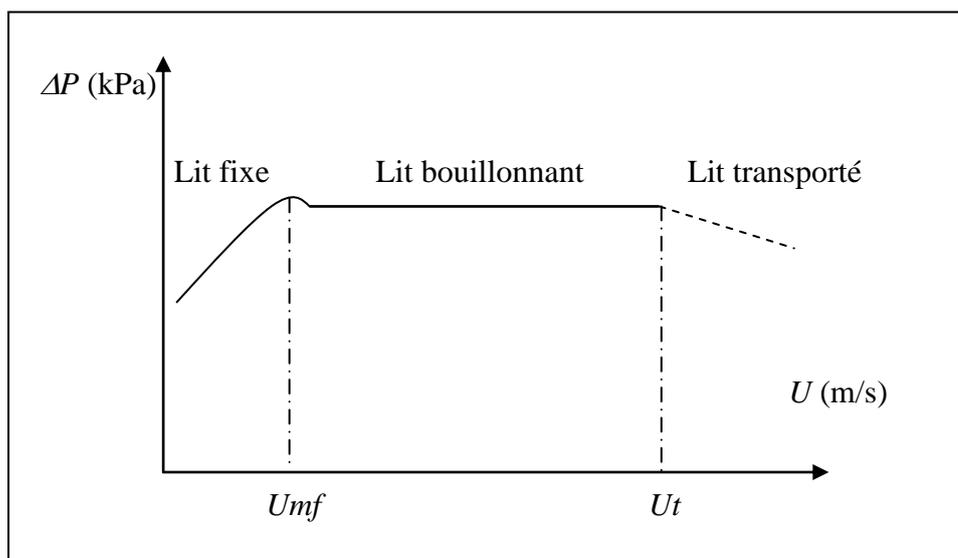


Figure I.13 : Évolution de la perte de charge totale d'un lit de particules en fonction de la vitesse de fluidisation

Le courant de fluide peut être liquide ou gazeux (fluidisation diphasique) ou composé d'une émulsion liquide-gaz (fluidisation triphasique). Cette dernière est une méthode des plus utiles afin de contrôler précisément les facteurs qui régulent tout échange chimique entre les fluides et les solides (Cathala, 1953).

I.3.10.2.1.2. Fluidisation triphasique:

La fluidisation triphasique permet de maintenir en suspension un lit de particules dans une émulsion gaz-liquide. Il existe différents modes de fluidisation triphasique à co-courant ou bien à contre courant, se différenciant par le choix de la phase continue et le sens de la fluidisation (Figure I.14).

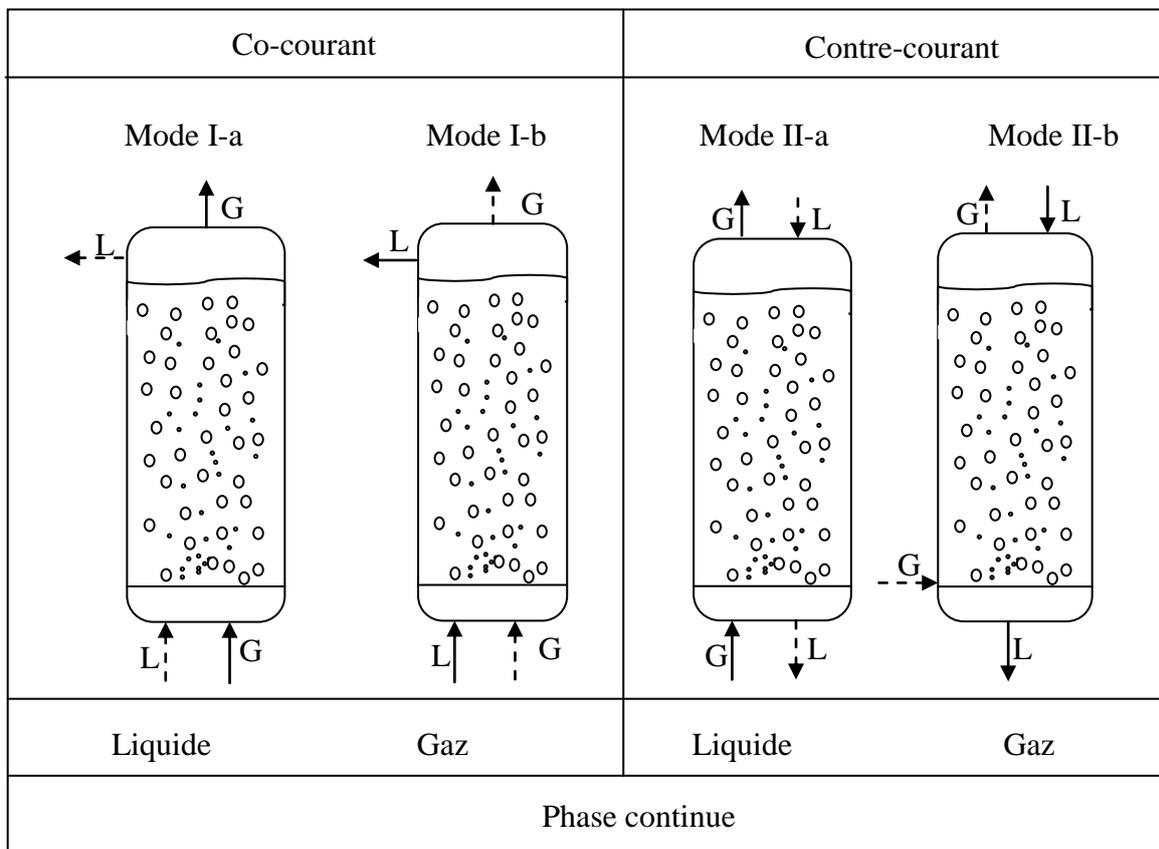


Figure I.14 : Fluidisation triphasique (David, 2013)

Pour la fluidisation à co-courant (Modes I-a et I-b), le liquide et le gaz circulent dans la même direction ascendante. Dans le mode I-a, la phase continue est liquide et le gaz est introduit sous la forme de bulles traversant le lit. Pour I-b, la phase continue est gazeuse et le liquide est la phase dispersée et se présente sous la forme d'un film liquide ou de fines gouttelettes.

Dans la fluidisation à contre courant (Modes II-a et II-b), le liquide et le gaz ont des directions opposées. Le lit de particules est fluidisé par un courant descendant de liquide opposé à la force ascensionnelle des particules (II-a) ou un courant ascendant de gaz (II-b).

La phase gazeuse est différente selon le mode de fonctionnement du réacteur. Si le réacteur fonctionne en anaérobiose (absence d'oxygène dans le milieu), la phase gazeuse est créée par la biomasse. Lorsque les bactéries épuratrices traitent l'eau, elles produisent divers gaz (méthane, mercaptans...) qui sont libérés dans le milieu. Dans le cas d'un réacteur fonctionnant en anaérobiose, les gaz produits font souvent l'objet d'une valorisation énergétique. Cependant, ce mode de fonctionnement comporte quelques désavantages : circuit fermé, maintenance plus élevée, odeur...

A l'inverse, les traitements aérobies permettent l'obtention d'un effluent de bonne qualité avec des temps de séjour relativement faibles (Chan et al., 2009). Si le réacteur fonctionne en aérobiose (présence d'oxygène dans le milieu), l'air constitue la phase gazeuse.

Ce dernier joue un rôle primordial dans le traitement des eaux usées par lit fluidisé en aérobiose. Il apporte l'oxygène nécessaire au développement et au maintien des microorganismes dans le réacteur mais il permet aussi la fluidisation du garnissage. Un débit trop élevé peut causer un accroissement significatif du biofilm allant jusqu'au lessivage du réacteur. Un débit trop faible dans le réacteur empêche la fluidisation du garnissage et peut conduire à la dégénérescence de la biomasse, voire au passage du réacteur en anaérobiose. Selon Tavares et al. (1995), le rendement du réacteur ne serait pas influencé par le débit d'air.

I.3.10.2.1.3. Les facteurs influençant la fluidisation :

Le contrôle de la formation et de la croissance du biofilm est un facteur clé dans le succès de ce type de réacteur, de nombreux paramètres hydrodynamiques et physico-chimiques pouvant influencer sa structure et son activité :

- ✓ Nature et concentration de l'effluent à traiter (Rabah and Dahab, 2004);
- ✓ Vitesse du fluide (Kloep et al., 2000);
- ✓ Vitesse superficielle de l'air dans les procédés aérobies (Tavares et al., 1995);
- ✓ Quantité de particules (Kargi and Karapinar, 1997) ;
- ✓ Temps de séjour (González et al., 2001; Kargi and Karapinar, 1997).

Le Tableau I.5 présente les caractéristiques de réacteurs à lit fluidisé retrouvés dans la littérature et utilisés pour traiter des eaux usées industrielles. Le flux de pollution en entrée ainsi que l'abattement et les caractéristiques des garnissages de chaque réacteur sont aussi présentés dans le tableau.

Il semble que la conception soit très variée selon les auteurs. Les diamètres, hauteurs et volumes sont très disparates ; aucune corrélation directe n'apparaît entre chaque paramètre pour un débit donné. Toutefois, lors du dimensionnement, deux principaux paramètres ont été pris en compte : la concentration de la biomasse dans le réacteur, *i.e* le volume de garnissage mis en œuvre et le temps de séjour des eaux dans le réacteur (David, 2013).

Tableau I.5 : Comparaison des réacteurs à lit fluidisé recensés dans la littérature et utilisés pour le traitement des eaux usées (David, 2013)

	Paramètres	(Haroun and Idris, 2009)	(Kumaresan et al., 2009)	(Sokol et al., 2009)	(Lohi et al., 2008)	(Alvarado-Lassman et al., 2008)	(Ochieng et al., 2002)
Industries		Textile	Distillerie	Raffinerie	Raffinerie	Brasserie	Brasserie
Réacteur	Diamètre (m)	0,08	0,05	0,20	0,17	0,0448	0,16
	Hauteur (m)	0,75	1	6	3	1,37	5,5
	Volume (10^{-3} m^3)	3,75	1,96	188	NI	1,9	110
	Matériau	Acrylique	Acrylique	NI	NI	Plexiglas	Verre
	Temps de séjour (h)	4-12	8	30	4	96	24
Garnissage	Matériau	Charbon actif	Alginate de sodium	Polypropylène	Roche volcanique	Polyéthylène	Polyéthylène
	Diamètre (10^{-3} m)	NI	4	NI	6	0,169	11
	Masse volumique ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)	NI	NI	910	1790	700	960
	Surface spécifique ($\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$)	2,51	NI	400	NI	NI	500
	Ensemencement (jours)	20	5	24	90	225	50
Diffuseur d'air	Débit d'air ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)	NI	0,3	2,7	81	0,57	NI
Flux de pollution	mg DCO.L ⁻¹	810	4000	36650	547-4025	2083	NI
	Abattement %	98	45	95	97	90	80

DCO : Demande chimique en oxygène ; NI : Non indiqué

I.3.10.2.1.4. Effet des propriétés physico-chimiques des particules :

La variété des installations industrielles utilisant la technique de fluidisation est impressionnante. La taille des particules mises en fluidisation peut varier de 15 à 6000 μm . Il est évident que la vitesse nécessaire à la fluidisation de fines particules est nettement inférieure à celle employée pour la fluidisation de grosses particules. Par ailleurs, l'état de la fluidisation dépend fortement de la nature des particules.

Afin de classer les particules de nature diverse selon leur aptitude à la fluidisation, Geldart propose un diagramme empirique dans lequel les solides sont répartis en quatre catégories (Antonini, 2008) :

❖ **Poudres fines et cohésives, fluidisation difficile (catégorie C)**: est constituée de particules fines ($d_p < 30 \mu\text{m}$) et cohésives, qui fluidisent très difficilement (Shakourzadeh, 2002).

❖ **Particules fines à fluidisation relativement facile (catégorie A)**: regroupe les solides divisés de faible diamètre moyen ($< 50 \mu\text{m}$) et/ou de faible masse volumique ($< 1400 \text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) : par exemple, des catalyseurs de cracking. Ces poudres s'expansent fortement et la vitesse de gaz, correspondant à l'apparition de bulles, y est supérieure à la vitesse minimale de fluidisation, de sorte qu'ils peuvent être fluidisés de manière homogène, ou particulière (Shakourzadeh, 2002).

❖ **Particules à fluidisation très facile (du type sable – catégorie B)**: regroupe la majeure partie des solides fluidisables, de type sableux, de diamètre appartenant à l'intervalle : $40 \mu\text{m} < d_p < 500 \mu\text{m}$, et de masse volumique dans la gamme : $1400 \text{kg}\cdot\text{m}^{-3} < \rho_s < 4000 \text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (Shakourzadeh, 2002).

❖ **Grosses particules** dont la fluidisation nécessite une vitesse relativement importante, avec des bulles d'une forme aplatie et irrégulière (**catégorie D**): concerne les grosses particules ($d_p > 500 \mu\text{m}$) et/ou celles de masse volumique élevée, formant des poudres granuleuses. Leur vitesse minimale de fluidisation est élevée, et le courant gazeux y pénètre sous forme de jets (lit geyser / spouted bed), avec explosion de bulles en surface haute du lit. Avec l'augmentation de la vitesse du gaz, les particules atteignent, quel que soit leur groupe, un régime de fluidisation turbulente, puis, à vitesse croissante, un régime de fluidisation rapide, suivi d'un régime de transport pneumatique (Shakourzadeh, 2002).

Lorsque la densité des particules est inférieure à celle de l'eau et que le liquide est la phase continue, la fluidisation peut être réalisée par un écoulement descendant de liquide à contre-courant d'un écoulement ascendant de gaz. Ce type d'opération est appelé fluidisation inverse.

Dans le cas de particules d'une taille de l'ordre du millimètre et de densité proche de l'eau, la mise en mouvement du solide est le résultat de deux phénomènes qui interagissent (Comte et al., 1997) :

- ❖ La variation de la densité du mélange eau-gaz considérée comme une pseudo-phase va favoriser la flottation ou la décantation des particules et entraîner un gradient axial de concentration en solide.
- ❖ Les circulations liquides générées par l'ascension des bulles vont permettre de conserver le support en mouvement. Les bulles générées par le distributeur montent dans la colonne et sont suivies d'un sillage liquide. Il se crée des courants de liquide ascendants mais également des courants descendants dans les zones pauvres en bulles (parois de la colonne).

I.3.10.2.1.5. Avantages et inconvénients des lits fluidisés :

Les principaux avantages des lits fluidisés sont leur simplicité de construction et leur échange inter faciaux biofilm-liquide élevé (Ochieng et al., 2002; Sokoł et al., 2009). Selon Sokoł and Halfani (1999), le lit fluidisé surclasse les autres procédés biologiques dans le traitement des eaux grâce au taux élevé de biomasse fixée sur le garnissage. Hirata et al. (2000) indiquent un regain d'intérêt pour cette technologie grâce à ce taux élevé qui permet une meilleure dégradation des polluants.

De plus, comparés aux autres procédés biologiques tels que les boues activées, les lits fluidisés sont compacts et produisent moins de boues à traiter. En effet, Nicoletta et al. (2000) indiquent qu'un lit fluidisé occupe seulement 10% de l'espace requis par un bassin d'épuration. De plus, selon Cooper and Wheeldon (1980), ce procédé est idéal pour le traitement des eaux ayant une forte variation de charge.

L'un des paramètres importants du lit fluidisé est la croissance de la biomasse sur le matériau support (Ochieng et al., 2002). Le taux de croissance est un facteur crucial, sans quoi les performances du lit fluidisé peuvent fortement diminuer. L'utilisation d'un garnissage fluidisé comme support de biofilm permet d'entretenir le traitement et d'ajuster la quantité de biomasse présente dans le réacteur en jouant sur la quantité de support.

Cependant, ce développement élevé peut devenir un problème. Une trop forte croissance du biofilm sur le support peut totalement changer sa densité et les transferts de matière entre le liquide et la biomasse. Ce phénomène peut alors fortement diminuer l'efficacité du traitement et modifier l'hydrodynamique du réacteur (Pareek et al., 2001) et donc les performances de traitement. En effet, l'augmentation de la concentration de biomasse induit une augmentation de la quantité d'oxygène nécessaire à leur survie, et peut modifier les conditions aérobies du procédé. Il est alors possible qu'une partie du réacteur devienne anaérobie.

En jouant sur la quantité de support de biomasse, les lits fluidisés permettent de traiter les eaux usées avec de faibles temps de séjour et des équipements de petites tailles (Souza et al., 2004). De plus, contrairement au lit fixe, il est possible d'ajouter ou de soustraire une partie de garnissage sans devoir arrêter le procédé (Sokoł, 2001). Cela permet d'ajuster la quantité de biomasse dans le réacteur ainsi que le traitement. Cependant, il est nécessaire d'effectuer un suivi régulier de l'eau traitée obtenue.

I.3.10.2.2. Réacteurs agités :

L'objectif de ces réacteurs est d'augmenter les transferts de masse au moyen d'une agitation forcée (figure I.15). Leur utilisation est simple mais coûteuse et des précautions doivent être prises lors de leur utilisation avec des cellules immobilisées, puisque l'agitation peut endommager le support (Kassim, 2012).

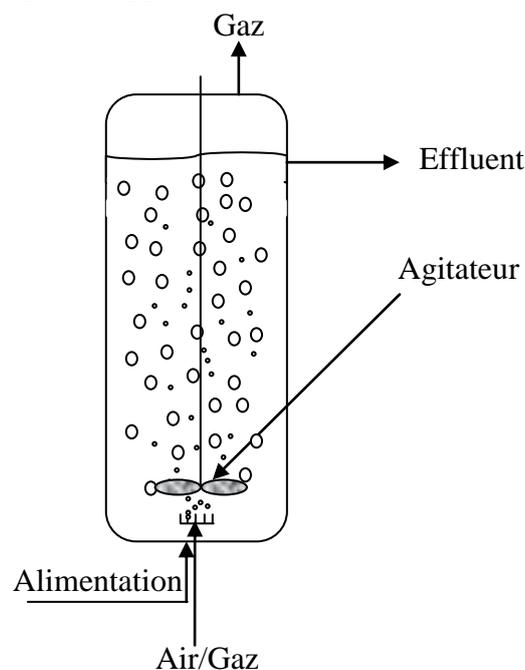


Figure I.15: Réacteur agité

I.3.10.2.2.1. Réacteur mécaniquement agité :

Ce type de réacteur est choisi lorsque tous les acteurs d'une réaction biologique (substrats, enzymes, micro-organismes) sont dans une phase liquide unique. Sous réserve d'une agitation suffisante pour que la phase liquide soit parfaitement mélangée, le seul phénomène à prendre en compte dans le dimensionnement et la conduite du bioréacteur est la vitesse de la réaction.

Il est employé pour effectuer des réactions enzymatiques avec des enzymes en solution ou encore des fermentations anaérobies. Dans ce dernier cas, le gaz carbonique produit se désorbe du milieu de culture sous forme de bulles, mais sa concentration en phase liquide, constante et donnée par la loi de Henry, n'intervient pas, en général, dans l'expression de la vitesse de croissance du micro-organisme (Riba, 1998).

I.3.10.2.2.2. Réacteur mécaniquement agité aéré :

Le réacteur mécaniquement agité aéré est utilisé pour des réactions biologiques en aérobiose. La puissance mécanique consommée sert à la fois à mélanger la phase liquide et à générer une aire interfaciale importante entre les bulles de gaz et le milieu de fermentation (Riba, 1998).

I.3.10.2.3. Types de réacteurs utilisés dans la dégradation du phénol :

Différents réacteurs biologiques ont été utilisés pendant de nombreuses années pour traiter les eaux usées phénoliques. Le tableau I.6 montre quelques réacteurs utilisés dans la biodégradation du phénol et les résultats obtenus.

Tableau I.6 : Les différents réacteurs utilisés dans la biodégradation du phénol

Réacteurs	Bactérie utilisée	Résultats	Références
Réacteur à lit garni	<i>Ralstonia eutropha</i> NRRL B-14690	Augmentation de la concentration du phénol de 25 à 150 mg.L ⁻¹ conduit à l'augmentation de la vitesse de biodégradation de 0,036 à 0,152 mg.g ⁻¹ .h ⁻¹ .	(Tepe and Dursun, 2008)
Réacteur à lit fixe	Boues activées	Après 405 jours de traitement, la vitesse de biodégradation était de l'ordre 2,3g.L ⁻¹ .j ⁻¹ pour une concentration initiale du phénol de 4,9 g.L ⁻¹ et un rapport phénol / DCO= 0,8.	(Bajaj et al., 2008)
Bioréacteur à membrane à fibres creuses	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 11172	1000 mg.L ⁻¹ de phénol ont été complètement dégradés dans les 12 heures à un taux de croissance spécifique de 0,73 h ⁻¹ avec un rendement de biomasse égale à 0,31 g.g ⁻¹ et un taux de biodégradation moyenne de 86 mg.L ⁻¹ .h ⁻¹ .	(Praveen and Loh, 2013)
Réacteur agité aéré couplé à un clarificateur	<i>Rhodococcus erythropolis</i> UPV-1	Dégradation complète du phénol avec un taux de 11,5 kg.m ⁻³ .j ⁻¹ et 0,5 kg.m ⁻³ .j ⁻¹ pour une eau usée synthétique et un rejet réel (WW1) respectivement. Pour un autre rejet réel (WW2), les cellules immobilisées ont pu dégrader partiellement le phénol avec un taux de 0,1 kg.m ⁻³ .j ⁻¹	(Prieto et al., 2002)
Pulsed Plate Bioreactor	<i>Nocardia hydrocarbonoxydans</i> NCIM 2386	Dégradation complète de 300 et 500 mg.L ⁻¹ de phénol avec un taux de dilution 0,4094h ⁻¹ . Pour 800 et 900 mg.L ⁻¹ de phénol, augmentation du taux jusqu'à 1,0235 h ⁻¹ et un rendement de 94 et 93% respectivement.	(Shetty et al., 2007)
Contacteur biologique rotatif	Boues activées	l'efficacité optimale d'élimination totale en phénol de 99,9% a été observée pour une charge hydraulique 4.10 ⁻³ m ⁻³ .m ⁻² par jour et une DCO de 800 mg.L ⁻¹	(Alemzadeh et al., 2002)
Réacteur à lit fluidisé	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17484	Le bioréacteur a montré l'efficacité de la dégradation de phénol par <i>Pseudomonas putida</i> immobilisées dans des billes d'alginate supérieur à 90%, même pour un taux de charge de phénol de 0,5 g de phénol.L ⁻¹ .j ⁻¹ (correspondant à 0,54 g COT.L ⁻¹ .j ⁻¹).	(Gonzalez et al., 2001)

Volet 4

La méthodologie des plans d'expériences

Dans toutes les disciplines, il est fréquent de souhaiter étudier un phénomène dépendant de différents paramètres. La méthode intuitive n'est pas toujours la meilleure. Elle consiste généralement à fixer le niveau de toutes les variables sauf une et de mesurer la réponse pour plusieurs valeurs de la variable mobile.

Si plusieurs paramètres doivent être étudiés, il faut répéter cette technique pour chaque paramètre. Par exemple, si l'on souhaite étudier 7 paramètres à 4 niveaux, il faut donc réaliser 16384 (4^7) expériences. Ce nombre d'expériences représente un travail gigantesque et souvent irréalisable (Gillon, 1997).

Pour résoudre ce problème, il faut adopter une démarche rigoureuse dans la réalisation des essais. La méthode des plans d'expériences repose sur des bases statistiques. La différence principale avec la méthode intuitive vient du fait que l'on fait varier tous les niveaux à la fois à chaque expérience. Cette méthode conduit à établir un plan comportant le minimum d'expériences, tout en apportant le maximum de précisions dans les résultats (Gillon, 1997).

Les principaux avantages de cette méthode sont :

- ❖ Diminution de nombre d'essais ;
- ❖ Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs ;
- ❖ Détection des interactions entre facteurs ;
- ❖ Modélisation des réponses étudiées ;
- ❖ Une précision optimum des résultats ;
- ❖ La méthode des plans d'expériences permet une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant un modèle expérimental précis du système étudié.

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'**espace expérimental** et celle de **modélisation mathématique** des grandeurs étudiées (Goupy and Creighton, 2006).

I.4.1. Notions d'espace expérimental :

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur s'appelle la **réponse**, c'est la grandeur d'intérêt. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs variables ou **facteur** (Goupy and Creighton, 2006).

La réponse dépend donc de un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (figure I.16). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée **niveau**. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes, borne inférieure (bas) et supérieure (hauts) désignés successivement par les signes (-1) et (+1).

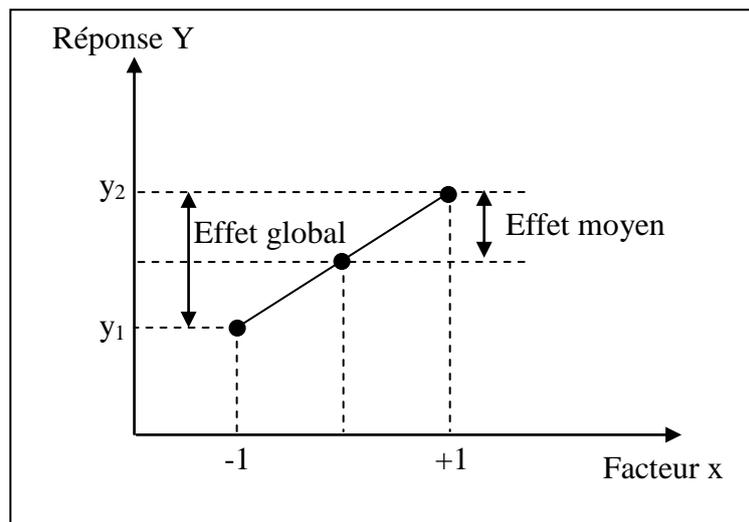


Figure I.16 : L'effet de facteur sur la réponse

L'**effet** d'un facteur X correspond à la variation de la réponse Y lorsque X passe d'une valeur (-1) à une autre valeur (+1) comme présente la figure I.16. Graphiquement, plus l'inclinaison est forte, plus l'effet est important, on distingue :

- ❖ L'effet global $Y_2 - Y_1$
- ❖ L'effet moyen $(Y_2 - Y_1) / 2$

La notation de YATE permet une représentation simple des combinaisons des niveaux et permet un calcul aisé des effets et des interactions. Grâce à cette modélisation les différentes variables se transforment en **variables centrées réduites**, ce qui permet de comparer des variables de grandeurs totalement différentes. La formule qui permet le passage des variables courantes aux variables centrées réduites est la suivante :

$$X = \frac{A - A_0}{\text{pas}} \quad (11)$$

X : est la variable centrée réduite

A : est la variable courante

A₀ : est la valeur moyenne des variables courantes

pas : est la variation entre la position moyenne de la variable et une extrémité du domaine

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le **domaine** du facteur (figure I.17). S'il y a un second facteur, il est représenté, lui aussi, par un axe gradué et orienté. On définit, comme pour le premier facteur, son niveau haut, son niveau bas et son domaine de variation. Ce second axe est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé *l'espace expérimental* (figure I.18).

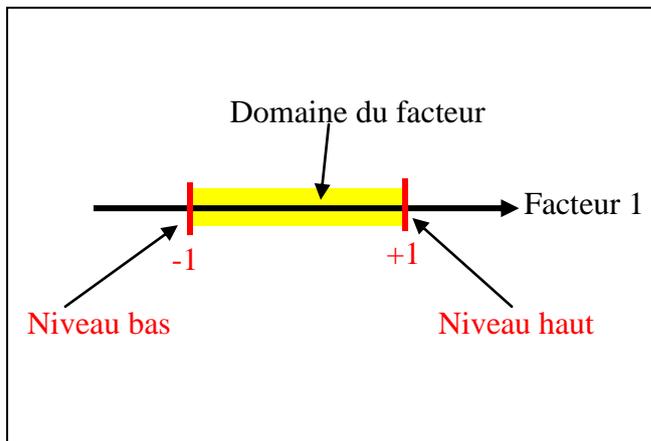


Figure I.17 : Le domaine du facteur

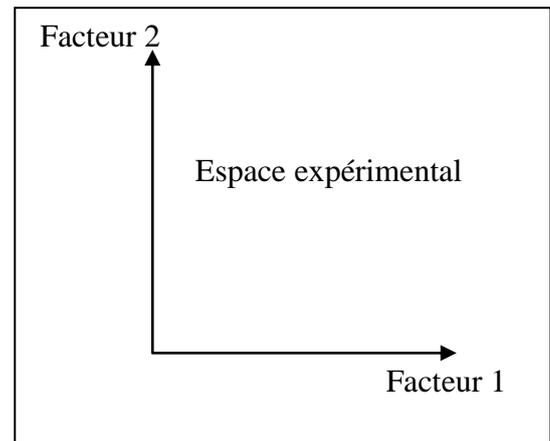


Figure I.18 : L'espace expérimental

Le regroupement des domaines des facteurs définit le «**domaine d'étude**». Ce domaine d'étude est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais. Une étude, c'est-à-dire plusieurs expériences bien définies, est représentée par des points répartis dans le domaine d'étude (figure I.19).

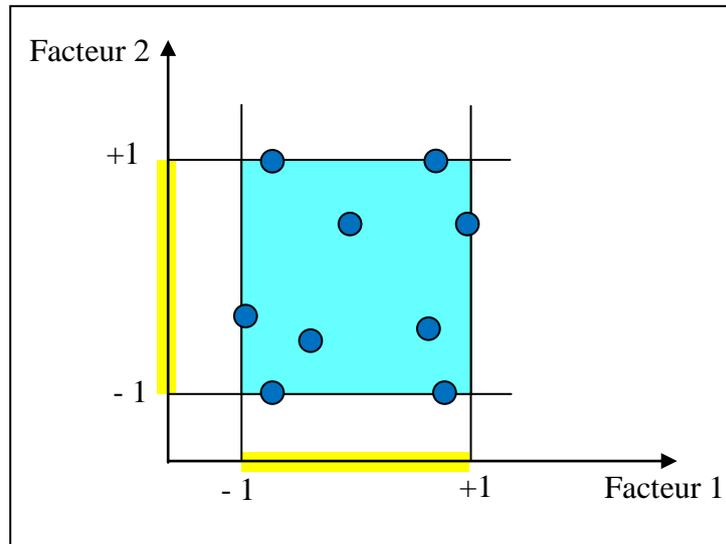


Figure I.19 : Les niveaux des facteurs définissent le domaine d'étude.

A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée **la surface de réponse** (Figure I.20). Selon les valeurs des paramètres, la surface prend des formes diverses. Par exemple, pour un modèle de 2^e degré, la surface présente une courbe mais peut prendre des allures différentes.

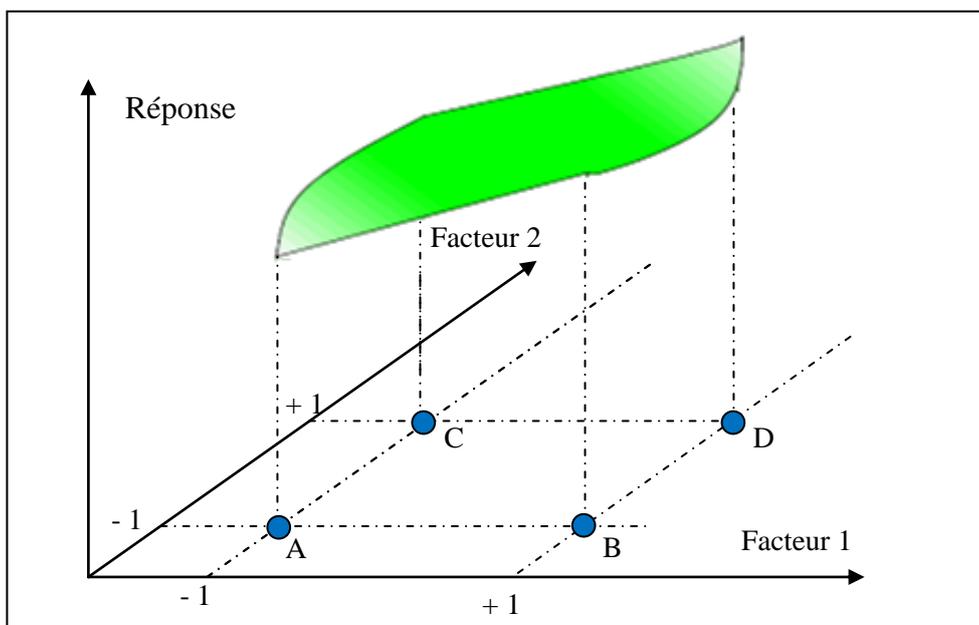


Figure I.20 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse.

I.4.2. Notion de modélisation mathématique :

La **matrice d'expérience** est un objet mathématique qui représente, sous forme codée ou non codée, l'ensemble des expériences à réaliser. C'est un tableau constitué de n lignes correspondant aux n expériences à réaliser et de k colonnes, correspondant aux k variables étudiées. L'élément X_{ij} de la matrice ainsi formé correspond à la valeur des niveaux que prend la $j^{\text{ème}}$ variable à la $i^{\text{ème}}$ expérience.

On choisit à priori une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs. On prend un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin. Les dérivées sont supposées constantes et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé. **Le modèle de l'expérimentateur** s'écrit alors :

$$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \dots + \sum a_{ii} X_{ii}^2 + \sum a_{ijk} X_i X_j X_k + e \quad (12)$$

❖ Y est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.

❖ X_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue. On suppose même que ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).

❖ a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté à priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

❖ e réunit les deux écarts, manque d'ajustement et erreur expérimentale

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences. Ce modèle est appelé "**modèle postulé**" ou "**modèle à priori**" (Goupy and Creighton, 2006).

I.4.3. Analyse de la variance et validation du modèle linéaire :

L'analyse de la variance est appelé « Analysis of Variance » dans la littérature anglosaxonne ; son appellation est couramment abrégée en ANOVA. Cette méthode doit son nom au fait qu'elle utilise des mesures de variance afin de juger du caractère significatif ou non, c'est-à-dire de la significativité des différences de moyenne mesurées entre populations.

Il s'agit de vérifier si le modèle estimé explique correctement les variations de la réponse observée. Le modèle sera considéré comme adéquat (approprié) si pour une combinaison donnée, l'écart entre la réponse moyenne observée et la réponse moyenne prédite par le modèle est acceptable (Sado and Sado, 2000).

Le coefficient de corrélation R^2 , nous renseignera sur la validité du modèle. Plus ce coefficient est loin de l'unité plus il sera considéré médiocre, et donc le modèle qui le fournit est moins représentatif.

$$R^2 = \frac{\text{Somme des carrés des réponses calculés corrigées de la moyenne}}{\text{Somme des carrés des réponses mesurées corrigées de la moyenne}} \quad (13)$$

$$0 < R^2 < 1$$

Le coefficient R^2 ajusté :

$$R^2_{\text{ajusté}} = 1 - \frac{(n-1)(1-R^2)}{(n-p)} \quad (14)$$

n : le nombre d'expériences réalisées ;

p : le nombre de coefficients du modèle.

Le nombre de degrés de liberté (DF) d'un modèle correspond au nombre de variables indépendantes qui le composent. Ainsi, le nombre de degré de liberté d'un modèle à k variables est de $k-1$.

L'hypothèse H_0 , appelée hypothèse nulle, consiste à vérifier l'absence d'influence du facteur étudié. Les valeurs de p sont souvent utilisées dans les tests d'hypothèses où on rejette ou on ne peut pas rejeter une hypothèse nulle. Plus la valeur de p est petite, plus la probabilité de faire une erreur est faible en rejetant l'hypothèse nulle.

Les résultats qui seront fournis après application de la régression linéaire seront justes à 95%, 0,05 étant le seuil de confiance généralement adopté.

❖ Les tests statistiques

Le test *t - student* est employé pour évaluer l'importance d'un coefficient, la théorie des statistiques compare ce coefficient à son écart-type en faisant le rapport :

$$\frac{a_1}{\sigma_{a1}} \quad (15)$$

A partir de *t-student*, on peut évaluer la probabilité que le coefficient soit sans importance ou peu significatif. Si cette probabilité (*la p-valeur*) est proche de 0 le coefficient est influent, si la probabilité est proche de 1 le coefficient est négligeable. Si la p-valeur possède une valeur intermédiaire, le coefficient est peut être légèrement significatif.

Le test de Fisher est le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus. Ce rapport permet de calculer la probabilité que ces deux carrés ne soient pas égaux. En d'autres termes, si le *F de Fisher* est élevé, les variations des réponses mesurés sont bien dues aux variations des facteurs. Si le *F de Fisher* proche de 1, les variations des réponses mesurés sont comparables à celles des résidus (Goupy and Creighton, 2006).

Tableau I.7 : Analyse de la variance

Source	Degré(s)de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	p-1	$\sum_{I=1}^N (\hat{Y}_I - \bar{Y})^2$	$\sum_{I=1}^N \frac{(\hat{Y}_I - \bar{Y})^2}{p-1}$	$\frac{\sum_{i=1}^n \frac{(\hat{Y}_I - \bar{Y})^2}{p-1}}{\sum_1^n \frac{(Y_I - \hat{Y}_I)^2}{n-p}}$
Résidus	n-p	$\sum_{I=1}^N (Y_I - \hat{Y}_I)^2$	$\sum_1^N \frac{(Y_I - \hat{Y}_I)^2}{n-p}$	
Total	n-1			

n : le nombre d'expériences

p : le nombre de coefficients, il est égal à 8 ;

Y_i : Réponse mesurée ;

\hat{Y}_I : Réponse calculée ;

\bar{Y} : Réponse moyenne.

$$CM_a = \sum_{i=1}^n \frac{(\hat{Y}_i - \bar{Y})^2}{p-1} \quad (16)$$

$$CM_R = \sum_{i=1}^n \frac{(Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-p} \quad (17)$$

Le test consiste à comparer le rapport entre CM_a et CM_R , noté F_{obs} avec la valeur $F_{\text{théorique}}$ en fonction du :

- Degrés de liberté du facteur étudié et de la résiduelle.
- Risque que l'on choisit.

❖ **L'erreur expérimentale** est la variabilité observée sur les essais répétés. Les causes d'erreur sont multiples. On distingue les erreurs accidentelles, systématiques et aléatoires. Les deux premiers conduisent à des résultats faux et doivent être évités autant que faire se peut. Les dernières augmentent l'incertitude d'un plan d'expérience. Parmi les solutions suggérées, le jalonnement de l'expérimentation par des points au centre, où tous les facteurs sont réglés au niveau 0 (Sado and Sado, 2000).

❖ **La fonction désirabilité** (d_i) permet d'optimiser la réponse. Les valeurs de cette fonction sont comprises entre 0 et 1. La valeur de 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse inacceptable et celle de 1 lorsque la réponse représente la performance maximale désirée pour les facteurs considérés (Wang and Wan, 2009).

$$d_i = \left\{ \begin{array}{l} \mathbf{0} \\ \left| \frac{y_i - y_{i \min}}{y_{i \max} - y_{i \min}} \right| \\ \mathbf{1} \end{array} \quad \left| \begin{array}{l} y_i \leq y_{i \min} \\ y_{i \min} < y_i < y_{i \max} \\ y_i \geq y_{i \max} \end{array} \right. \right\} \quad (18)$$

I.4.4. Différents types de plans d'expériences :

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur :

- ✓ Plans factoriels complets.
- ✓ Plans factoriels fractionnaires.
- ✓ Plans pour surfaces de réponse (Plans de Box-Behnken, Plans composites...)
- ✓ Plans de mélanges.
- ✓ Plans booléens.
- ✓ Plans optimaux.
- ✓ Plans pour simulations numériques.

I.4.5. Les Plans d'expérience appliqués :

Pour notre étude nous nous sommes intéressés au *plan factoriel complet* et au *plan de Box-Behnken* pour surfaces de réponse.

I.4.5.1. Plans factoriels complets 2^k :

Les plans factoriels à 2 niveaux sont les plus simples, ils permettent de bien comprendre le principe de la méthode, et ont de nombreuses applications. La dénomination 2^k a la signification suivante : le chiffre 2 représente les deux niveaux haut et bas des facteurs, et k indique le nombre de facteurs. Le nombre d'expériences à réaliser se calcule par : 2^k

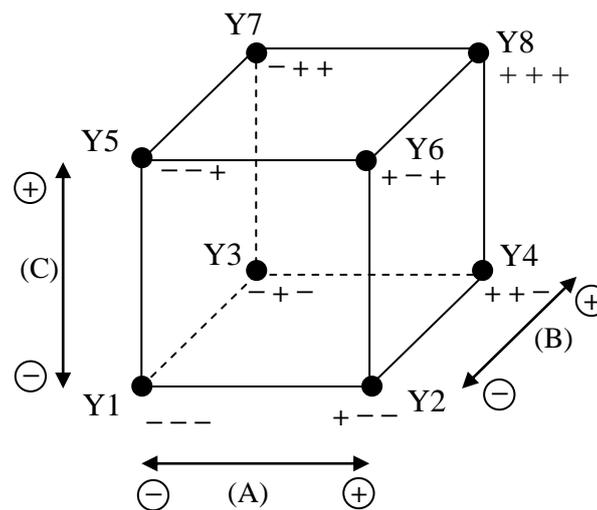
Nous prendrons le cas de trois facteurs étudiés ayant chacun deux niveaux 2^3 . Dans ce cas, le modèle mathématique utilisé est du premier degré par rapport à chaque facteur, ils conduisent à une modélisation simple mais suffisante.

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{123}X_1X_2X_3 \quad (19)$$

Il est très facile d'estimer les paramètres à partir de la matrice d'expériences, il suffit de construire le tableau suivant :

Tableau I.8: Plan factoriel à 3 facteurs

Essai	x_1	x_2	x_3	Réponses
1	-1	-1	-1	Y_1
2	+1	-1	-1	Y_2
3	-1	+1	-1	Y_3
4	+1	+1	-1	Y_4
5	-1	-1	+1	Y_5
6	+1	-1	+1	Y_6
7	-1	+1	+1	Y_7
8	+1	+1	+1	Y_8
C	0	0	0	Y_{10}
C	0	0	0	Y_{11}
C	0	0	0	Y_{12}

**Figure I.21:** Domaine expérimental du plan 2^3 **I.4.5.2. Les plans de Box-Behnken :**

Le plus connu des plans de Box-Behnken est celui qui permet d'étudier trois facteurs. Les points expérimentaux sont au milieu des arêtes de chacun des côtés du cube (figure I.22). Ce plan comporte douze essais auxquels on peut ajouter un (ou plusieurs) point(s) central (aux). La matrice du tableau I.8 indique ces douze essais accompagnés de trois points au centre (Goupy and Creighton, 2006).

Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan de Box-Behnken pour 3 facteurs est un modèle du second degré :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 \quad (20)$$

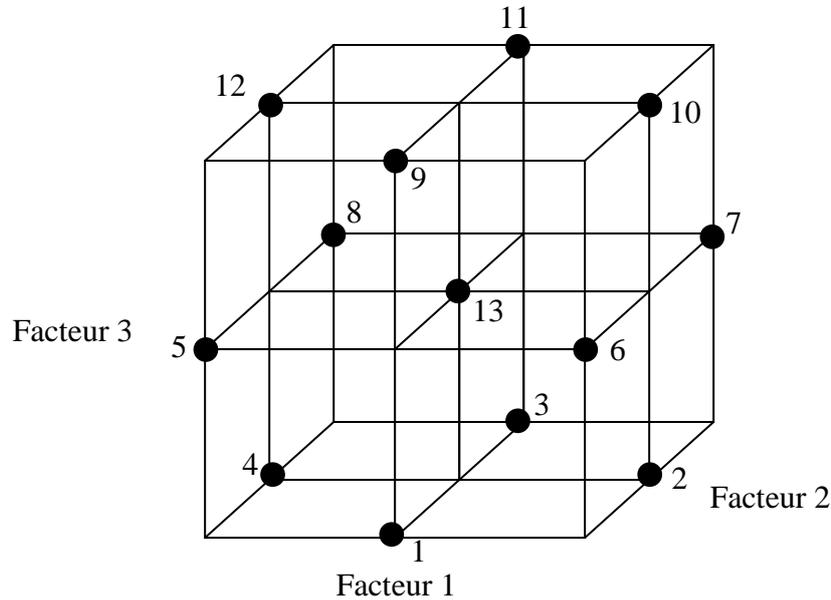


Figure I.22 : Domaine expérimental du plan 2^3

Tableau I.9 : Plan de Box- Behnken pour trois facteurs (Ferreira et al., 2007)

Essai	X_1	X_2	X_3	Reponses
1	-1	-1	0	Y_1
2	1	-1	0	Y_2
3	-1	1	0	Y_3
4	1	1	0	Y_4
5	-1	0	-1	Y_5
6	1	0	-1	Y_6
7	-1	0	1	Y_7
8	1	0	1	Y_8
9	0	-1	-1	Y_9
10	0	1	-1	Y_{10}
11	0	-1	1	Y_{11}
12	0	0	1	Y_{12}
C	0	0	0	Y_{13}
C	0	0	0	Y_{14}
C	0	0	0	Y_{15}

I.4.6. Les logiciels de plans d'expériences :

On peut réaliser le calcul des coefficients avec un tableur, mais cela nécessite de la programmation et du temps. Il est donc préférable d'utiliser un logiciel adapté qui effectue non seulement le calcul des coefficients mais aussi tous les calculs statistiques permettant d'évaluer la qualité du modèle mathématique (Coefficient de détermination, écarts-types des réponses et des coefficients, la valeur de p, etc.).

Les logiciels de plans d'expériences sont aussi programmés pour calculer des réponses dans tout le domaine d'étude, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer des courbes d'isoreponses, pour construire les surfaces de réponse et pour déterminer les zones d'intérêt. Cet ensemble de possibilités permet d'effectuer rapidement de multiples analyses et de regarder ses données sous tous les angles.

Les logiciels de plans d'expériences sont devenus des outils absolument indispensables pour la construction de plans complexes et l'interprétation approfondie des résultats du plan (Goupy and Creighton, 2006).

Nous indiquons ci-dessous les principaux logiciels de plans d'expériences et les sites internet correspondants.

Tableau I.10: Principaux logiciels de plans d'expériences

JMP	http://www.jmpdiscovery.com
Minitab	http://www.minitab.fr
Statistica	http://www.intesoft.com/produits/tech/statistica
Statgraphics	http://www.sigmaplus.fr
Unscrambler	http://www.camo.no
Pirouette	http://www.infometrix.com
Modde	http://www.umetrics.com

Références bibliographiques

- Agarry, S, Aremu, M, 2012. Batch equilibrium and kinetic studies of simultaneous adsorption and biodegradation of phenol by pineapple peels immobilized *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950. British biotechnology journal, 2:26-48.
- Ahuatz-Chacón, D, Ordorica-Morales, G, Ruiz-Ordaz, N, Cristiani-Urbina, E, Juárez-Ramírez, C, Galíndez-Mayer, J, 2004. Kinetic study of phenol hydroxylase and catechol 1, 2-dioxygenase biosynthesis by *Candida tropicalis* cells grown on different phenolic substrates. World journal of microbiology and biotechnology, 20:695-702.
- Akhtar, N, Iqbal, J, Iqbal, M, 2003a. Microalgal-luffa sponge immobilized disc: a new efficient biosorbent for the removal of Ni (II) from aqueous solution. Letters in applied microbiology, 37:149-153.
- Akhtar, N, Saeed, A, Iqbal, M, 2003b. *Chlorella sorokiniana* immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrica*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. Bioresource technology, 88:163-165.
- Aksu, Z, Bülbül, G, 1999. Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in Ca-alginate-immobilized *Pseudomonas putida* beads. Enzyme and microbial technology, 25:344-348.
- Alemzadeh, I, Vossoughi, F, Houshmandi, M, 2002. Phenol biodegradation by rotating biological contactor. Biochemical Engineering Journal 11:19-23.
- Alfonso Duran, M, 1997. Contribution à l'étude de l'adsorption et la biodégradation de composés organiques sur charbon actif: cas du phénol et dérivés phénoliques. Thèse de doctorat, Université de rennes p. 158.
- Alvarado-Lassman, A, Rustrían, E, García-Alvarado, M, Rodríguez-Jiménez, G, Houbroun, E, 2008. Brewery wastewater treatment using anaerobic inverse fluidized bed reactors. Bioresource technology, 99:3009-3015.
- Amer, W, 2013. Phosphate nanostructuré à mésoporosité contrôlée préparé à l'aide d'agents structurants bas-coût et phosphates hybrides organiques-inorganiques obtenus via la gélification de biopolymère: Elaboration, caractérisation et application en catalyse. Thèse de doctorat, Université Mohammed V, p. 176.
- Antonini, G, 2008. Lits fluidisés: Caractéristiques générales et applications. Techniques de l'ingénieur. Génie énergétique (BE8255):1-22.
- Arnaud, J-P, Lacroix, C, Choplin, L, 1992. Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continuous fermentation with entrapped growing. Biotechnology techniques, 6:265-270.
- Arnaud, J, Lacroix, C, 1991. Diffusion of lactose in k-carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped growing lactic acid bacteria. Biotechnology and bioengineering, 38:1041-1049.

- Arnaud, J, Lacroix, C, Fousereau, C, Choplin, L, 1993. Shear stress effects on growth and activity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Journal of biotechnology, 29:157-175.
- Arutchelvan, V, Kanakasabai, V, Elangovan, R, Nagarajan, S, Muralikrishnan, V, 2006. Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*. Journal of hazardous materials, 129:216-222.
- ATSDR, 2007. Notice of the revised priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Fed Regist 73:12178-12179.
- Awan, Z U R, Shah, A, Amjad, M, 2013. Microbial degradation of phenol by locally isolated soil bacteria. Global advances research journal microbiology, 2:072-079.
- Babich, H, Davis, D, 1981. Phenol: A review of environmental and health risks. Regulatory toxicology and pharmacology, 1:90-109.
- Bajaj, M, 2009. Treatment of Phenolic Wastewater in Suspended and Fixed Bed Bioreactors. Universitätsverlag Karlsruhe,.
- Bajaj, M, Gallert, C, Winter, J, 2008. Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. Bioresource technology, 99:8376-8381.
- Banat, F, Al-Bashir, B, Al-Asheh, S, Hayajneh, O, 2000. Adsorption of phenol by bentonite. Environmental pollution 107:391-398.
- Barrios-Martinez, A, Barbot, E, Marrot, B, Moulin, P, Roche, N, 2006. Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. Journal of membrane science, 281:288-296.
- Basha, K M, Rajendran, A, Thangavelu, V, 2010. Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. Asian journal of experimental biology science, 1:219-234.
- Bessam, F Z, Mehdadi, Z, Hassiba, M B, Marouf, A, 2010. Effets de quelques prétraitements physiques sur l'amélioration des performances germinatives de *Stipa tenacissima* L. et caractérisation des substances inhibitrices. Acta botanica gallica, 157:349-360.
- Boyd, A, Chakrabarty, A, 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. Journal of industrial microbiology, 15:162-168.
- Braccini, I, Grasso, R P, Pérez, S, 1999. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation. Carbohydrate research, 317:119-130.
- Bucke, C, Brown, D E, 1983. Immobilized Cells [and Discussion]. Industrial and diagnostic enzymes, 300:369-389.
- Cachon, R, Lacroix, C, Divies, C, 1997. Mass transfer analysis for immobilized cells of *Lactococcus lactis* sp. using both simulations and in-situ pH measurements. Biotechnology technique, 11:251-256.

- Caetano, M, Valderrama, C, Farran, A, Cortina, J L, 2009. Phenol removal from aqueous solution by adsorption and ion exchange mechanisms onto polymeric resins. *Journal of colloid and interface science*, 338:402-409.
- Camail, M, Essaoudi, H, Margaillan, A, Vernet, J L, 1997. Synthèse et étude physico-chimique de matériaux a finalité thermomécanique spécifique. *European polymer journal*, 33:1153-1160.
- Cathala, J, 1953. Fluidization and the research methods of chemical engineering science. *Chemical engineering science*, 2:273-281.
- Champagne, C P, Gaudy, C, Poncelet, D, Neufeld, R, 1992. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. *Applied and environmental microbiology*, 58:1429-1434.
- Champagne, C P, Lacroix, C, Sodini-Gallot, I, 1994. Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Critical reviews in biotechnology*, 14:109-134.
- Chan, Y J, Chong, M F, Law, C L, Hassell, D, 2009. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. *Chemical engineering journal*, 155:1-18.
- Cheela, V, Kumar, G S, Padma, D, Subbarao, C V, 2014. Biodegradation of phenol using pure and mixed Culture Bacteria. *E-journal of science & technology*, 9:91-95.
- Chen, D-Z, Fang, J-Y, Shao, Q, Ye, J-X, Ouyang, D-J, Chen, J-M, 2013. Biodegradation of tetrahydrofuran by *Pseudomonas oleovorans* DT4 immobilized in calcium alginate beads impregnated with activated carbon fiber: Mass transfer effect and continuous treatment. *Bioresource technology*, 139:87-93.
- Choraio, C, 2008. Etude du métabolisme de *Rhodococcus rhodochrous* lors de la photobiodegradation du 2-Aminobenzo-thiazole: effet de l'immobilisation des cellules et role du fer. . Thèse doctorat, Université blaise pascal, p. 216
- Chung, T-P, Tseng, H-Y, Juang, R-S, 2003. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process biochemistry*, 38:1497-1507.
- Cooper, P, Wheeldon, D, 1980. Fluidized- and Expanded-Bed Reactors for Waste-Water Treatment. *Water pollution control*, 79.
- Corre, C, Madec, M N, Boyaval, P, 1992. Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 53:189-194.
- Cotton, L A, Graham, R J, Lee, R J, 2009. The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* PAOI biofilm structural resistance to gentamicin and ciprofloxacin. *Journal of experimental microbiology and immunology*, 13:58-62.
- D'angio, C, Béal, C, Boquien, C-Y, Corrieu, G, 1994. Influence of dilution rate and cell immobilization on plasmid stability during continuous cultures of recombinant strains of *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Journal of biotechnology*, 34:87-95.
- David, P-L, 2013. Traitement des eaux grises par réacteur à lit fluidisé et dangers liés à leur utilisation pour l'irrigation d'espaces verts urbains. Thèse de doctorat d'état, Université Nantes Angers Le Mans, p. 217.

- De Backer, L, 1996. Immobilisation of cells in porous carriers. Immobilised living cell systems: Modelling and experimental methods. John Wiley & Sons, :237-254.
- Der Yang, R, Humphrey, A E, 1975. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. Biotechnology and bioengineering, 17:1211-1235.
- Doleyres, Y, Fliss, I, Lacroix, C, 2002. Quantitative determination of the spatial distribution of pure-and mixed-strain immobilized cells in gel beads by immunofluorescence. Applied microbiology and biotechnology, 59:297-302.
- Doleyres, Y, Fliss, I, Lacroix, C, 2004. Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactococcus lactis* produced during continuous mixed-strain immobilized-cell fermentation. Journal of applied microbiology, 97:527-539.
- Doleyres, Y P, C LeRoy, M Lacroix, C, 2002. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 cell production during free-and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. Applied microbiology and biotechnology, 60:168-173.
- Donati, I, Paoletti, S, 2009. Material properties of alginates, Alginates: biology and applications. Springer, pp. 1-53.
- Draget, K, Bræk, G S, Smidsrod, O, 1994. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. Carbohydrate polymers, 25:31-38.
- Dunne, W M, 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clinical microbiology reviews, 15:155-166.
- Dursun, A Y, Tepe, O, 2005. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*. Journal of hazardous materials, 126:105-111.
- Ehtash, M, Fournier-Salaün, M-C, Dimitrov, K, Salaün, P, Saboni, A, 2014. Phenol removal from aqueous media by pertraction using vegetable oil as a liquid membrane. Chemical engineering journal, 250:42-47.
- El Cadi, M A, Bouslimane, Y, El Jaoudi, R, Bouklouze, A, Cherrah, Y, 2012. Bisphénol A: à nouveau risque, nouveau défi! Médecine thérapeutique/Médecine de la reproduction, 14:151-155.
- Ela Eroglu, Steven M. Smith, Raston, C L, 2015. Chapter 2: Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses. Springer International Publishing, : Switzerland, p. 25.
- ETSC et DRC, 2008. Seuils de toxicité aiguë - phénol, p. 20.
- Fang, Y, Al-Assaf, S, Phillips, G O, Nishinari, K, Funami, T, Williams, P A, Li, L, 2007. Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. The journal of physical chemistry b, 111:2456-2462.
- Ferreira, S C, Bruns, R, Ferreira, H, Matos, G, David, J, Brandao, G, da Silva, E P, Portugal, L, Dos Reis, P, Souza, A, 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. Analytica chimica acta, 597:179-186.

- Freeman, A, Lilly, M D, 1998. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and microbial technology*, 23:335-345.
- Gilbert, P A, DG McBain, AJ, 2002. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of applied microbiology*, 92:98S-110S.
- Gillon, F, 1997. Modélisation et optimisation par plans d'expériences d'un moteur à commutations électroniques. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologie de Lille, p. 160.
- Goldberg, J B, Ohman, D E, 1984. Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate. *Journal of bacteriology*, 158:1115-1121.
- Gonzalez, G, Herrera, G, Garcí, M T, Pena, M, 2001. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresource technology* 80:137-142.
- González, G, Herrera, M G, García, M T, Peña, M M, 2001. Biodegradation of phenol in a continuous process: comparative study of stirred tank and fluidized-bed bioreactors. *Bioresource technology*, 76:245-251.
- Goupy, J, Creighton, L, 2006. Introduction aux plans d'expériences, 3 ed. Dunod.
- Grattepanche, F, 2005. Étude d'un système de préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle. Thèse de doctorat, Université Laval, p. 156.
- Groboillot, A, Boadi, D, Poncelet, D, Neufeld, R, 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical reviews in biotechnology*, 14:75-107.
- Hannoun, B J, Stephanopoulos, G, 1986. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes. *Biotechnology and bioengineering*, 28:829-835.
- Hao, O J, Kim, M H, Seagren, E A, Kim, H, 2002. Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter species*. *Chemosphere*, 46:797-807.
- Haroun, M, Idris, A, 2009. Treatment of textile wastewater with an anaerobic fluidized bed reactor. *Desalination* 237:357-366.
- Haug, A, Larsen, B, Smidsrod, O, 1963. The degradation of alginates at different pH values. *Acta chemica scandinavica*, 17:1466-1468.
- Haug, A, Larsen, B, Smidsrod, O, 1966. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta chemica scandinavica*, 20:183-190.
- Haug, A, Larsen, B, Smidsrod, O, 1967. Alkaline degradation of alginate. *Acta chemica scandinavica*, 21:2859-&.
- Haug, A, Smidsrod, O, 1970. Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. *Acta chemica scandinavica*, 24:843-854.
- Hirata, A, Takemoto, T, Ogawa, K, Auresenia, J, Tsuneda, S, 2000. Evaluation of kinetic parameters of biochemical reaction in three-phase fluidized bed biofilm reactor for wastewater treatment. *Biochemical engineering journal*, 5:165-171.

- Hoffman, A S, 2002. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 54:3-12.
- Huang, J, Lacroix, C, Daba, H, Simard, R, 1996. Pediocin 5 production and plasmid stability during continuous free and immobilized cell cultures of *Pediococcus acidilactici* UL5. *Journal of applied bacteriology*, 80:635-644.
- Huang, J, Wang, X, Jin, Q, Liu, Y, Wang, Y, 2007. Removal of phenol from aqueous solution by adsorption onto OTMAC-modified attapulgate. *Journal of environmental management*, 84:229-236.
- Ikehata, K, El-Din, M G, 2006. Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and Fenton-type advanced oxidation processes: a review. *Journal of environmental engineering and science*, 5:81-135.
- Ikehata, K, Jodeiri Naghashkar, N, Gamal El-Din, M, 2006. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review. *Ozone: science and engineering*, 28:353-414.
- INERIS, 2005. Phénol Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, 2-1:47.
- INRS, 2011. Phénol,. Fiche toxicologique, FT 15:8.
- Jiang, H, Fang, Y, Fu, Y, Guo, Q-X, 2003. Studies on the extraction of phenol in wastewater. *Journal of hazardous materials*, 101:179-190.
- Jouenne, T, Tresse, O, Junter, G-A, 1994. Agar-entrapped bacteria as an in vitro model of biofilms and their susceptibility to antibiotics. *Fems microbiology letters*, 119:237-242.
- Junter, G-A, Jouenne, T, 2004. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. *Biotechnology advances*, 22:633-658.
- Karel, S F, Libicki, S B, Robertson, C R, 1985. The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical engineering science*, 40:1321-1354.
- Kargi, F, Karapinar, I, 1997. Performance of fluidized bed bioreactor containing wire-mesh sponge particles in wastewater treatment. *Waste management*, 17:65-70.
- Karim, F, Fakhruddin, A, 2012. Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review. *Reviews in environmental science and biotechnology*, 11:261-274.
- Kassim, C, 2012. Vinification continue avec levures immobilisées: analyse du système et conception du réacteur industriel. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, p. 199.
- Keweloh, H, Weyrauch, G, Rehm, H-J, 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 33:66-71.
- Kloep, F, Röske, I, Neu, T R, 2000. Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor. *Water research*, 34:311-319.
- Kolot, F, 1980. New trends in yeast technology--immobilized cells. *Process biochemistry*,:1512.

- Kotresha, D, Vidyasagar, G, 2008. Isolation and characterisation of phenol-degrading *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996. World journal of microbiology and biotechnology, 24:541-547.
- Kotresha, D, Vidyasagar, G, 2014. Chromosomally encoded phenol hydroxylase gene for degradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996. International journal of microbial resource technology, 2:2278 - 3822.
- Kourkoutas, Y B, A Banat, I Mm Marchant, Roger Koutinas, AA, 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food microbiology, 21:377-397.
- Krisch, J, Szajani, B, 1997. Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. Biotechnology letters, 19:525-528.
- Krishnan, S, Gowda, L R, Misra, M, Karanth, N, 2001. Physiological and morphological changes in immobilized *L. plantarum* NCIM 2084 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. Food biotechnology, 15:193-202.
- Kumaresan, R, Ramakrishnan, N S, Premalatha, C, 2009. Aerobic treatment of distillery wastewater in a three phase fluidized bed biofilm reactor. International journal of chemical engineering research, 1:13-20.
- Lacroix, C, Grattepanche, F, Doleyres, Y, Bergmaier, D, 2005. Immobilised cell technologies for the dairy industry, Applications of cell immobilisation biotechnology. Springer, pp. 295-319.
- Lamboley, L, Lacroix, C, Artignan, J, Champagne, C, Vuilleumard, J, 1999. Long-Term Mechanical and Biological Stability of an Immobilized Cell Reactor for Continuous Mixed-Strain Mesophilic Lactic Starter Production in Whey Permeate. Biotechnology progress, 15:646-654.
- Lamboley, L, Lacroix, C, Champagne, C, Vuilleumard, J, 1997. Continuous mixed strain mesophilic lactic starter production in supplemented whey permeate medium using immobilized cell technology. Biotechnology and bioengineering, 56:502-516.
- Lamboley, L, Lacroix, C, Sodini, I, Lemay, M, Champagne, C, 2001. Effect of Inoculum Composition and Low KCl Supplementation on the Biological and Rheological Stability of an Immobilized-Cell System for Mixed Mesophilic Lactic Starter Production. Biotechnology progress, 17:1071-1078.
- Lan, W, Gang, G, Jinbao, W, 2009. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. Journal of environmental sciences, 21:237-242.
- Lebeau, T J, T Junter, G-A, 1998. Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cells. Enzyme and microbial technology, 22:434-438.
- Lebrun, L, Junter, G-A, Jouenne, T, Mignot, L, 1994. Exopolysaccharide production by free and immobilized microbial cultures. Enzyme and microbial technology, 16:1048-1054.

- Liu, Y J, Zhang, A N, Wang, X C, 2009. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter sp. XA05* and *Sphingomonas sp. FG03*. *Biochemical engineering journal*, 44:187-192.
- Lohi, A, Cuenca, M A, Anania, G, Upreti, S, Wan, L, 2008. Biodegradation of diesel fuel-contaminated wastewater using a three-phase fluidized bed reactor. *Journal of hazardous materials*, 154:105-111.
- Lu, C-J, Lee, C-M, Huang, C-Z, 1996. Biodegradation of chlorophenols by immobilized pure-culture microorganisms. *Water science and technology*, 34:67-72.
- Mahmood, A, 2007. Radiation induced decontamination of Cr (VI), Cu (II) and phenol in some tannery effluents. *Nuclear science and techniques*, 18:212-217.
- Mamatha, J, Vedamurthy, A, Shruthi, S, 2012. Degradation of phenol by turnip root enzyme extract. *Journal of microbiology and biotechnology research* 2:426-430.
- Margaritis, A, Kilonzo, P M, 2005. Production of ethanol using immobilised cell bioreactor systems, *Applications of cell immobilisation biotechnology*. Springer, pp. 375-405.
- Massalha, N, Shaviv, A, Sabbah, I, 2010. Modeling the effect of immobilization of microorganisms on the rate of biodegradation of phenol under inhibitory conditions. *Water research*, 44:5252-5259.
- Melzoch, K, Rychtera, M, Hábová, V, 1994. Effect of immobilization upon the properties and behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of biotechnology*, 32:59-65.
- Messing, R, Oppermann, R, 1979. Pore dimensions for accumulating biomass. I. Microbes that reproduce by fission or by budding. *Biotechnology and bioengineering*, 21:49-58.
- Messrouk, H, 2010. Contribution à l'évaluation et au traitement des eaux usées dans la région de Ouargla: Cas des composés phénoliques. Thèse Magister, Université Kasdi Merbah de Ouargla, p. 110.
- Messrouk, H, Mahammed, M h, Touil, Y, Amrane, A, 2014. Physico-chemical Characterization of Industrial Effluents from the Town of Ouargla (South East Algeria). *Energy procedia*, 50:255-262.
- Michaud, S, 2001. Etude hydrodynamique et biologique d'un procédé de méthanisation à biofilm: le réacteur à lit turbulent inverse. Thèse doctorat, Université Toulouse, p. 174.
- Monbouquette, H, Sayles, G, Ollis, D, 1990. Immobilized cell biocatalyst activation and pseudo-steady-state behavior: Model and experiment. *Biotechnology and bioengineering*, 35:609-629.
- Mseddi, M, Mesrati, H, Ktaari, S, Amouri, M, Chaaben, H, Boudaya, S, Turki, H, 2014. La phénolisation: un nouveau traitement des chéloïdes, *Ann. Dermatol. Venereol. Elsevier*, pp. 493-499.

- Mukherjee, A K, Bordoloi, N K, 2012. Biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains and a formulated *bacterial consortium*. Environmental science and pollution research, 19:3380-3388.
- Nair, I C, Jayachandran, K, Shashidhar, S, 2007. Treatment of paper factory effluent using a phenol degrading *Alcaligenes sp.* under free and immobilized conditions. Bioresource technology, 98:714-716.
- Navratil, M, Sturdik, E, 1999. Bioactive components in productions using immobilized biosystems. Biologia (Slovak Republic), 54:635-648.
- Nicoletta, C, Van Loosdrecht, M, Heijnen, J, 2000. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. Journal of biotechnology, 80:1-33.
- Nuhoglu, A, Yalcin, B, 2005. Modelling of phenol removal in a batch reactor. Process Biochemistry 40:1233-1239.
- Nweke, C, Okpokwasili, G, 2010. Influence of exposure time on phenol toxicity to refinery wastewater bacteria. Journal of environmental chemistry and ecotoxicology, 2:20-27.
- Nweke, C, Okpokwasili, G, 2014. Kinetics of growth and phenol degradation by *Pseudomonas species* isolated from petroleum refinery wastewater. International journal of biosciences, 4:28-37.
- O'Toole, G, Kaplan, H B, Kolter, R, 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual reviews in microbiology, 54:49-79.
- Ochieng, A, Ogada, T, Sisenda, W, Wambua, P, 2002. Brewery wastewater treatment in a fluidised bed bioreactor. Journal of hazardous materials, 90:311-321.
- Paisio, C E, Talano, M A, González, P S, Busto, V D, Talou, J R, Agostini, E, 2012. Isolation and characterization of a *Rhodococcus strain* with phenol-degrading ability and its potential use for tannery effluent biotreatment. Environmental science and pollution research, 19:3430-3439.
- Palluault, V, 2010. Nouveaux traitements de surface respectueux de l'environnement par des gels polymères réticulables: application à la préparation des surfaces d'usage dans le secteur aéronautique. Thèse de doctorat, université de Bordeaux, p. 171.
- Pan, G, Kurumada, K-I, 2008. Hybrid gel reinforced with coating layer for removal of phenol from aqueous solution. Chemical engineering journal, 138:194-199.
- Papon, P, Leblond, J, Meijer, P H, 1999. Physique des transitions de phases: Concepts et applications. Dunod Paris.
- Pareek, V, Yap, Z, Brungs, M, Adesina, A, 2001. Particle residence time distribution (RTD) in three-phase annular bubble column reactor. Chemical engineering science, 56:6063-6071.
- Pattanasupong, A, Nagase, H, Sugimoto, E, Hori, Y, Hirata, K, Tani, K, Nasu, M, Miyamoto, K, 2004. Degradation of carbendazim and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. Journal of bioscience and bioengineering 98:28-33.

- Peng, X, Yu, Y, Tang, C, Tan, J, Huang, Q, Wang, Z, 2008. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the total environment*, 397:158-166.
- Perez, R, Kaas, R, Barbaroux, O, 1984. Culture expérimentale de l'algue *Undaria pinnatifida* sur les côtes de France. *Science et pêche*, 343:3-16.
- Praveen, P, Loh, K-C, 2013. Two-phase biodegradation of phenol in trioctylphosphine oxide impregnated hollow fiber membrane bioreactor. *Biochemical engineering journal* 79:274-282.
- Preis, S, Kamenev, S, Kallas, J, Munter, R, 1995. Advanced oxidation processes against phenolic compounds in wastewater treatment. *Ozone: science & engineering*, 17:399-418.
- Prieto, M, Hidalgo, A, Rodriguez-Fernandez, C, Serra, J, Llama, M, 2002. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* upv-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier. *Applied microbiology and biotechnology*, 58:853-860.
- Prigent-Combaret, C, Vidal, O, Dorel, C, Lejeune, P, 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 181:5993-6002.
- Prigent, C, Corre, C, Boyaval, P, 1988. Production of concentrated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by coupling continuous fermentation and ultrafiltration. *Journal of dairy research*, 55:569-577.
- Rabah, F K, Dahab, M F, 2004. Biofilm and biomass characteristics in high-performance fluidized-bed biofilm reactors. *Water research*, 38:4262-4270.
- Rainer, S, 1999. Comportements des matériaux dans les milieux biologiques applications en médecine et biotechnologie, presses polytechniques et universitaires romandes ed: Lausanne.
- Ramakrishna, S, Prakasham, R, 1999. Microbial fermentations with immobilized cells. *Current science*, 77:87-100.
- Riba, J-P, 1998. Réacteurs enzymatiques et fermenteurs. *Techniques de l'ingénieur, Agroalimentaire (F3600)*, 2:1- 23.
- Rocher, V, 2008. Synthèse et caractérisation de billes d'alginate magnétiques pour l'élimination de polluants organiques dans les effluents par séparation magnétique. Thèse de doctorat, Université de Pierre et Marie Curie.
- Rolland, L, 2013. Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à cœur liquide. Thèse de doctorat, École supérieure de physique et de chimie industrielles de Paris, p. 210.
- Rong, X, Huang, Q, Chen, W, 2007. Microcalorimetric investigation on the metabolic activity of *Bacillus thuringiensis* as influenced by kaolinite, montmorillonite and goethite. *Applied Clay Science*, 38:97-103.

- Rosselló-Mora, R, Lalucat, J, García-Valdés, E, 1994. Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains. Applied and environmental microbiology, 60:966-972.
- Rubalcaba, A, Suárez-Ojeda, M E, Carrera, J, Font, J, Stüber, F, Bengoa, C, Fortuny, A, Fabregat, A, 2007. Biodegradability enhancement of phenolic compounds by hydrogen peroxide promoted catalytic wet air oxidation. Catalysis today, 124:191-197.
- Rudel, R, Dodson, R, Newton, E, Zota, A, Brody, J, 2008. Correlations between urinary phthalate metabolites and phthalates, estrogenic compounds 4-butyl phenol and o-phenyl phenol, and some pesticides in home indoor air and house dust. Epidemiology, 19:3-32.
- Sado, G, Sado, M-C, 2000. Les plans d'expériences: de l'expérimentation à l'assurance qualité, 3 ed. AFNOR technique: France.
- Sayles, G D, Ollis, D F, 1990. Product inhibition influence on immobilized cell biocatalyst performance. Biotechnology progress, 6:153-158.
- Scheublin, T R, Deusch, S, Moreno-Forero, S K, Müller, J A, Meer, J R, Leveau, J H, 2014. Transcriptional profiling of Gram-positive *Arthrobacter* in the phyllosphere: induction of pollutant degradation genes by natural plant phenolic compounds. Environmental microbiology, 16:2212-2225.
- Shakourzadeh, K, 2002. Techniques de fluidisation. Techniques Ingénieur, Génie mécanique (J 3390):1-20
- Sharma, N, Gupta, V C, 2012. Batch Biodegradation of Phenol of Paper and Pulp Effluent by *Aspergillus Niger*. International journal of chemical engineering and applications, 3:182-186.
- Shetty, K V, Ramanjaneyulu, R, Srinikethan, G, 2007. Biological phenol removal using immobilized cells in a pulsed plate bioreactor: Effect of dilution rate and influent phenol concentration. Journal of hazardous materials, 149:452-459.
- Shi, D-J, Brouers, M, Hall, D O, Robins, R J, 1987. The effects of immobilization on the biochemical, physiological and morphological features of *Anabaena azollae*. Planta, 172:298-308.
- Silva, E J, e Silva, N M P R, Rufino, R D, Luna, J M, Silva, R O, Sarubbo, L A, 2014. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. Colloids and surfaces b: biointerfaces 117:36-41.
- Sodini-Gallot, I, Corrieu, G, Boquien, C, Latrille, E, Lacroix, C, 1995. Process performance of continuous inoculation and acidification of milk with immobilized lactic acid bacteria. Journal of dairy science, 78:1407-1420.
- Sokół, W, 2001. Operating parameters for a gas-liquid-solid fluidised bed bioreactor with a low density biomass support. Biochemical engineering journal, 8:203-212.

- Sokoł, W, Ambaw, A, Woldeyes, B, 2009. Biological wastewater treatment in the inverse fluidised bed reactor. *Chemical engineering journal*, 150:63-68.
- Sokoł, W, Halfani, M R, 1999. Hydrodynamics of a gas–liquid–solid fluidised bed bioreactor with a low density biomass support. *Biochemical engineering journal*, 3:185-192.
- Souza, R, Bresolin, I, Bioni, T, Gimenes, M, Dias-Filho, B, 2004. The performance of a three-phase fluidized bed reactor in treatment of wastewater with high organic load. *Brazilian journal of chemical engineering*, 21:219-227.
- Sridevi, V, Chandana Lakshami, M, Manasa, M, Sravani, M, 2012. Metabolic pathways for the biodegradation of phenol. *International journal engineering science advanced technology*, 2:695-705.
- Stokke, B T, Smidsroed, O, Bruheim, P, Skjaak-Braek, G, 1991. Distribution of uronate residues in alginate chains in relation to alginate gelling properties. *Macromolecules*, 24:4637-4645.
- Strehaiano, P, Ramon-Portugal, F, Taillandier, P, 2006. Yeasts as biocatalysts, *Yeasts in food and beverages*,. Springer, pp. 243-283.
- Tam, N, Wong, Y, 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental pollution*, 107:145-151.
- Tavares, C, Sant'Anna, G, Capdeville, B, 1995. The effect of air superficial velocity on biofilm accumulation in a three-phase fluidized-bed reactor. *Water research*, 29:2293-2298.
- Tepe, O, Dursun, A Y, 2008. Combined effects of external mass transfer and biodegradation rates on removal of phenol by immobilized *Ralstonia eutropha* in a packed bed reactor. *Journal of hazardous materials*, 151:9-16.
- Thu, B, Gaserod, O, Paus, D, Mikkelsen, A, Skjak-Bræk, G, Toffanin, R, Vittur, F, Rizzo, R, 2000. Inhomogeneous alginate gel spheres: An assessment of the polymer gradients by synchrotron radiation-induced x-ray emission, magnetic resonance microimaging, and mathematical modeling. *Biopolymers*, 53:60-71.
- Tsekova, K, Todorova, D, Ganeva, S, 2010. Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. *International biodeterioration & biodegradation* 64:447-451.
- Van Loosdrecht, M C, Heijnen, S J, 1993. Biofilm bioreactors for waste-water treatment. *Trends in biotechnology*, 11:117-121.
- Verbelen, P J, De Schutter, D P, Delvaux, F, Verstrepen, K J, Delvaux, F R, 2006. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology letters*, 28:1515-1525.
- Vicens, J, Pilot, T, Gamet, D, Lamartine, R, Perrin, R, 1986. Synthèse et caractérisation de précurseurs de résines phénoliques produits à partir de l'isopropyl-4 phénol. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 302:15-20.
- Wang, J, Wan, W, 2009. Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process. *International journal of hydrogen energy*, 34:1253-1259.

- Wang, Y, Tian, Y, Han, B, Zhao, H-b, Bi, J-n, Cai, B-l, 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter sp. strain PD12*. Journal of environmental sciences, 19:222-225.
- Wen, Z T, Burne, R A, 2002. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. Applied and environmental microbiology, 68:1196-1203.
- Willaert, R G, Baron, G V, 1996. Gel entrapment and micro-encapsulation: methods, applications and engineering principles. Reviews in chemical engineering, 12:1-205.
- Yabannavar, V, Wang, D, 1991. Analysis of mass transfer for immobilized cells in an extractive lactic acid fermentation. Biotechnology and bioengineering, 37:544-550.
- Yin, Y, Xu, Z, Xu, Y, Kang, W, Lu, C, 2012. Degradation of phenol by free and immobilized *Pseudomonas putida*. Technology of water treatment 38:34-36.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Ce chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés au cours de cette étude : les différents protocoles opératoires mis en œuvre, les dispositifs ayant servi à l'immobilisation et à l'étude de la biodégradation du phénol et enfin les méthodes analytiques utilisées.

Dans un premier temps, nous avons élaboré une nouvelle technique d'immobilisation et ce, en surmontant les inconvénients que présentait la méthode classique déjà utilisée au laboratoire LSTE.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la biodégradation du phénol par les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées dans des billes d'alginate de calcium en mode batch par l'optimisation des paramètres influençant et ce en utilisant la méthode classique et la méthode des plans d'expérience.

Nous finalisons notre travail par l'étude de biodégradation du phénol en mode continu en réalisant un réacteur agité et une colonne à lit fluidisé.

II.1. Matériel :

II.1.1. Matériel biologique :

La souche utilisée dans notre étude, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, est fournie par l'institut Pasteur d'Alger (IPA).

II.1.2. L'alginate de sodium :

L'alginate de sodium utilisé dans l'immobilisation des cellules est de formule $(C_6H_7Na_{1/2}O_6)_n$.

II.1.2.1. Analyse spectroscopique de l'alginate de sodium:

La poudre d'alginate de sodium a été caractérisée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, à l'aide d'un spectromètre SHIMADZU, FTIR-8400 avec une résolution de 2 cm^{-1} et un domaine de fréquence de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. L'échantillon est ajouté au KBr à raison de 1 mg pour 200 mg de KBr.

Le spectre infrarouge représenté sur la figure II.1 permet d'identifier un certain nombre de bandes caractéristiques des groupements fonctionnels de l'alginate de sodium utilisée dans cette étude et que nous avons résumés dans le tableau II.1 en nous basant sur les données de la littérature (Belattmania et al., 2015; Fenoradosoa et al., 2010; Papageorgiou et al., 2010).

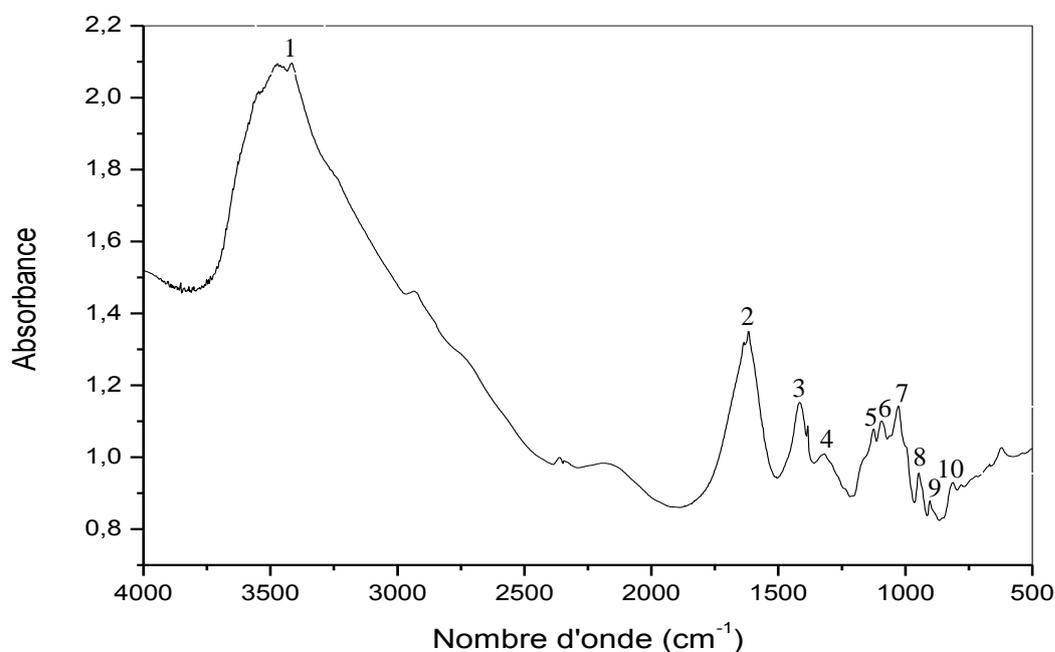


Figure II.1 : Spectre infrarouge de la poudre d'alginate de sodium

Tableau II.1 : Groupements fonctionnels caractéristiques de la poudre d'alginate de sodium.

N°	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Groupe fonctionnel
1	3417	O-H
2	1616	O-C=O
3	1415	C-OH
4	1326	C-C-H et O-C-H
5	1124	C-O
6	1089	C-O
7	1022	C-O
8	945	C-O
9	902	C-H (-CH=CH ₂)
10	811	C-H (CH ₃ -CH-CH ₃)

Le spectre IR de l'alginate de sodium met en évidence la présence d'une large bande à 3428 cm⁻¹ attribuée à des vibrations d'élongation d'hydrogène lié O-H et une bande à 1600 cm⁻¹ relative à l'élongation asymétrique du carboxylate (COO⁻) ce qui confirme la teneur en acide mannuronique de ce biopolymère (Belattmania et al., 2015).

La bande à 1415 cm⁻¹ est attribuée à une vibration de déformation C-OH et à une vibration d'élongation symétrique du groupe (COO⁻) (Fenoradosoa et al., 2010; Papageorgiou et al., 2010).

La bande évaluée à 1326 cm⁻¹ peut être attribuée à la déformation de C-C-H et de O-C-H.

L'alginate présente aussi, à 1124, 1089 et 1022 cm⁻¹, des bandes correspondant à une vibration d'élongation du groupement C-O (Fenoradosoa et al., 2010).

La bande à 946 cm⁻¹ indique la présence d'acide mannuronique par la vibration d'élongation C-O (Papageorgiou et al., 2010). Deux autres bandes à 900 et 815 cm⁻¹ sont affectés à la vibration asymétrique cyclique du α -L-gulopyranuronic et aux résidus d'acide mannuronique, respectivement (Papageorgiou et al., 2010).

II.1.2.2. Préparation de la solution d'alginate de sodium:

Une masse variable de poudre d'alginate est ajoutée graduellement à 100 mL d'eau sous agitation pour éviter toute formation de grumeaux jusqu'à la dissolution totale de la poudre et homogénéisation de la solution. La solution visqueuse est autoclavée à 110°C pendant 10 mn puis conservée au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à l'utilisation.



Figure II.2: Poudre de l'alginate de sodium

Une analyse au viscosimètre Ubbehode « à capillaire » de constante 1,36 Cst.s⁻¹, a été effectuée à une température 20°C, sur des solutions d'alginate de sodium (1%, 2%, 3% et 4%) (poids/volume) préparées pour l'élaboration des billes d'alginate. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau II.2: Viscosité des solutions d'alginate

% Alginate	1	2	3	4
Viscosité (Cst)	72	745.3	3680	-

II.2. Méthode d'immobilisation :

II.2.1. Développement de la méthode au laboratoire LSTE :

Les méthodes d'immobilisation utilisées jusqu'à présent au niveau de notre laboratoire LSTE sont des méthodes classiques qui se basent sur l'utilisation de la burette, la seringue, ...etc. Cependant, ces dernières présentent des inconvénients liés à leur utilisation et qui sont les suivants :

- ❖ Elles ne sont pas automatiques (fabrication manuelle) (difficulté d'entreprendre) ;
- ❖ Elles fonctionnent en système discontinu (pas d'application industrielle) ;
- ❖ Elles sont lentes (des heures pour former des billes à partir de 100 ml de solution d'alginate) ;
- ❖ Utilisation de plusieurs orifices pour avoir différents diamètres de billes ;
- ❖ Conditions d'asepsie difficilement réalisables.

Nous nous sommes fixés donc, comme premier objectif de notre travail, de développer une technique qui prendra en considération tous les inconvénients cités précédemment. Cette méthode présentera les avantages suivants :

- ❖ Elle est rapide et automatique ;
- ❖ Elle fonctionne en système continu (application industrielle) ;
- ❖ Utilisation d'un seul et même orifice pour avoir différents diamètres ;
- ❖ Facilité de travail dans des conditions stériles.

II.2.2. L'immobilisation proprement dite :

La préculture des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* est centrifugée à 6000 tpm pendant 10 min puis remise en suspension dans une solution tampon phosphate (pH = 7) et recentrifugée une seconde fois. Après récupération du culot, ce dernier est lavé et remis en suspension dans une solution d'alginate de sodium préalablement stérilisée pendant 10 min à 110°C, avec un rapport de 2% (v/v).

Le mélange (inoculum/alginate) est extrudé goutte à goutte par pompage à travers une installation destinée à former des billes (figure II.3) où la variation du débit d'air, contrôle et détermine le diamètre de ces dernières selon le tableau II.3.

Tableau II.3 : Détermination du diamètre des billes

Pression de l'air (bar)	0	0,175	0,250	0,300
Diamètres des billes (mm)	4	3	2	1

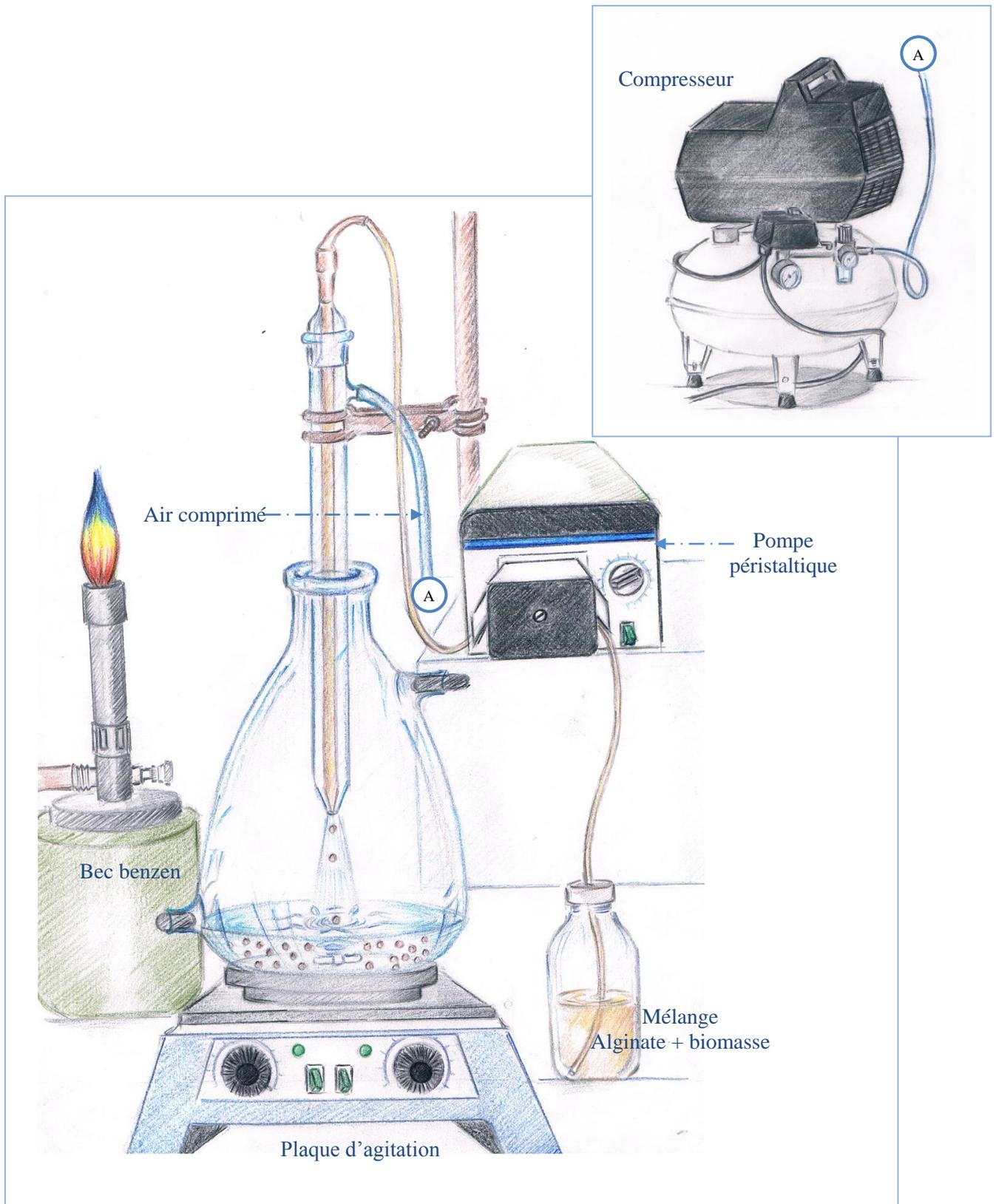


Figure II.3 : Principe de la méthode d'immobilisation

La formation des billes s'effectue par dispersion de la solution d'alginate de sodium contenant l'inoculum dans une solution de réticulant ; les gouttes de la solution d'alginate tombent dans la solution de chlorure de calcium CaCl_2 0,1M. Une fois les billes formées (figure II.4), ces dernières sont transférées dans une solution de CaCl_2 0,2M et laissées au repos pendant une heure dans une étuve à 37°C .

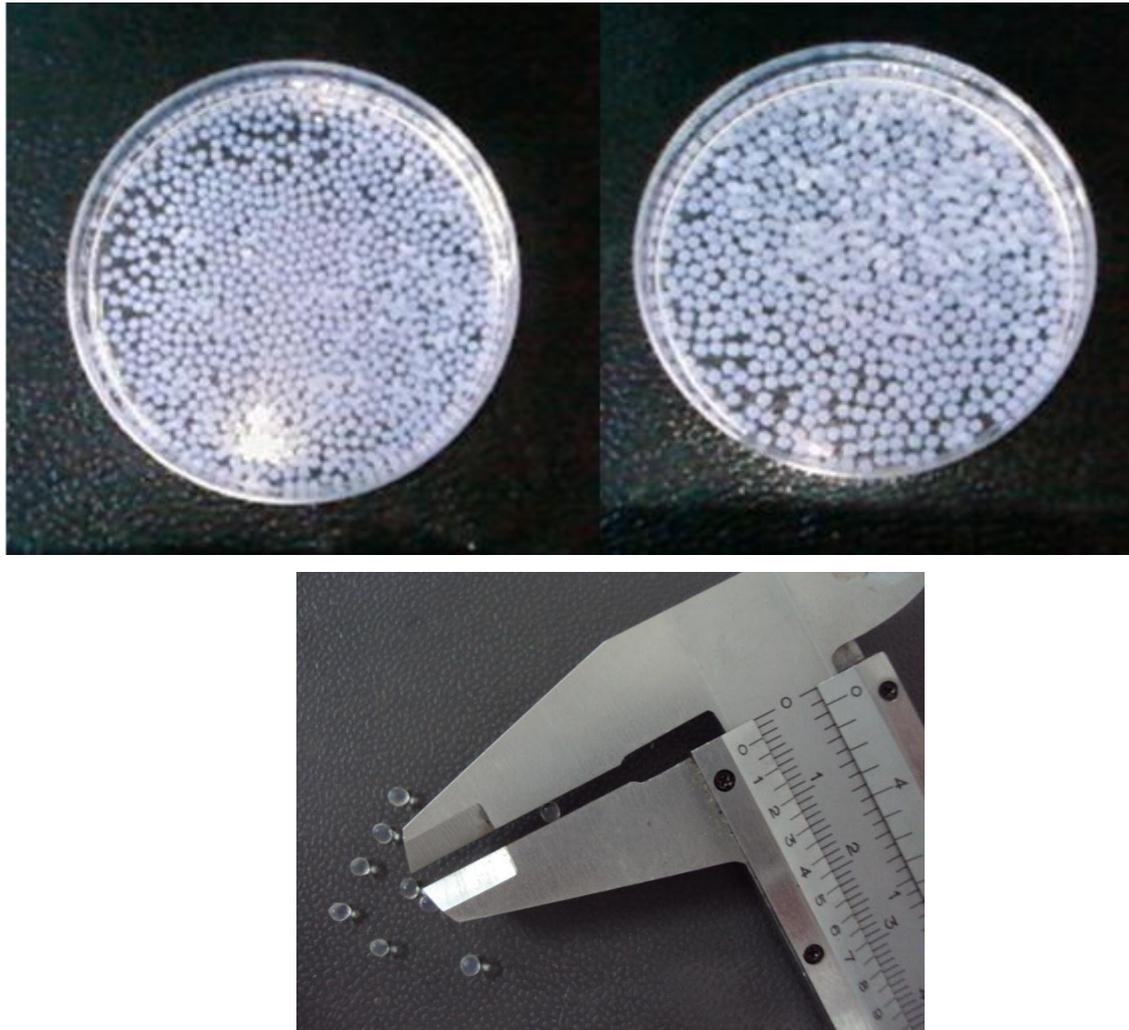


Figure II.4 : Billes d'alginate

A la fin, ces billes sont lavées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de calcium, puis égouttées et conservées à 4°C dans de l'eau distillée jusqu'au moment de l'expérience.

II.3. Essais de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en discontinu « mode batch » :

Une fois les billes formées, elles sont utilisées, pour tester leur efficacité, dans une série d'expériences en mode batch dans un réacteur d'un volume total d'un litre avec un milieu nutritif composé de phénol comme source unique de carbone et d'énergie et d'autres éléments indispensables à la croissance bactérienne.

Pour chaque facteur étudié, des prélèvements horaires d'échantillons liquides sont effectués à partir du réacteur, afin de réaliser le suivi de la concentration du phénol, la croissance bactérienne et le pH.

II.3.1. Réacteur biologique :

Le réacteur biologique qui est représenté dans la figure II.5 et utilisé lors de nos expériences a été conçu et fabriqué au niveau du laboratoire LSTE. Il se compose d'un système d'aération et de prélèvement d'échantillon. Il est hermétiquement fermé afin de maintenir l'asepsie et placé sous agitation au moyen d'un barreau aimanté. Il fonctionne à température optimale de biodégradation (37°C).

Afin de maintenir l'asepsie et éviter toute contamination, tout le matériel utilisé ainsi que les milieux de culture ont été stérilisés. Les prélèvements, de même, s'effectuent dans la zone stérile.

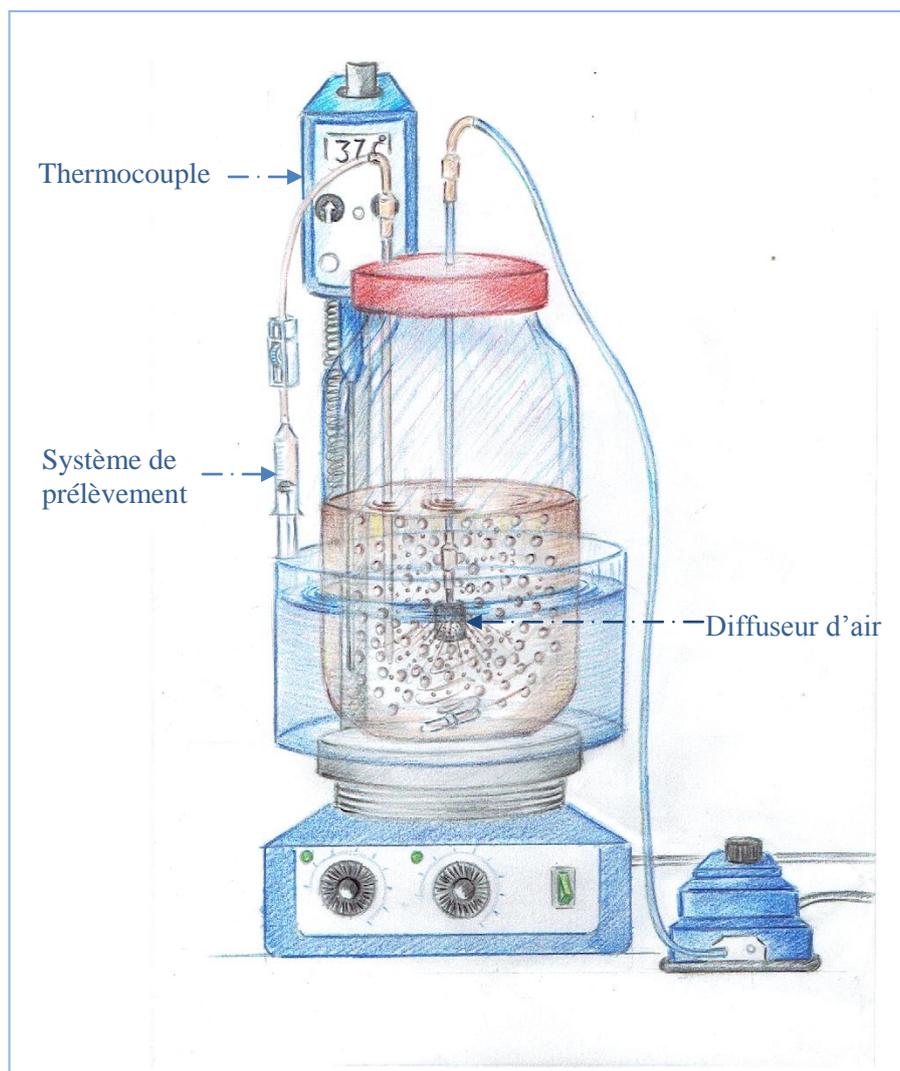


Figure II.5: Réacteur biologique renfermant des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées dans des billes d'alginate.

II.3.2. Milieu de culture :

Le milieu minimum de culture (MM) contient les substances nutritives indispensables à la croissance des microorganismes (Sheeja and Murugesan, 2002).

II.3.3. Conditions opératoires des cinétiques de biodégradation :

Les conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans des billes d'alginate de calcium sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.4: Les conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6
	Effet du diamètre des billes	Effet du culot	Effet de la concentration d'alginate	Effet de la température	Effet du pH	Effet de la concentration initiale du phénol
Diamètre des billes (mm)	1 - 4	Diamètre optimal (essai 1)	Diamètre optimal (essai 1)	Diamètre optimal (essai 1)	Diamètre optimal (essai 1)	Diamètre optimal (essai 1)
culot (biomasse immobilisée) (g.L⁻¹)	0,13	0,13 – 0,39	Culot optimal (essai 2)	Culot optimal (essai 2)	Culot optimal (essai 2)	Culot optimal (essai 2)
Concentration initiale du phénol (mg.L⁻¹)	100	100	100	100	100	100 - 1200
Concentration d'alginate (g/100ml d'eau distillée)	3	3	2 – 4	Concentration optimale d'alginate (essai 3)	Concentration optimale d'alginate (essai 3)	Concentration optimale d'alginate (essai 3)
Température (°C)	37 **	37 °	37 °	25-45	Température optimale (essai 4)	Température optimale (essai 4)
pH du milieu minéral	7*	7	7	7	3-9	pH optimal (essai 5)

* données théoriques ; ** données théoriques et qui ont été confirmées dans la pratique par les travaux de (Ali et al., 2012)

II.3.4. Modèles cinétiques de dégradation du phénol en mode batch (système fermé) :

II.3.4.1. Détermination de la vitesse de biodégradation :

A partir des cinétiques de biodégradation du phénol en fonction du temps, la valeur de la vitesse de biodégradation v ($\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) a été définie comme suit :

$$v = -\frac{1}{X} \left(\frac{dC_s}{dt} \right) \quad (21)$$

Où :

C_s : concentration en phénol dans le milieu (mg.L^{-1})

X : concentration en biomasse (masse sèche des bactéries) (g.L^{-1})

t : temps d'incubation (h)

II.3.4.2. Description des modèles :

L'application des méthodes mathématiques à l'étude cinétique a permis de faire progresser considérablement la connaissance de ces phénomènes et de ce fait, de mieux les maîtriser et les exploiter (Kumaran and Paruchuri, 1997).

Il existe de nombreux modèles empiriques :

Le modèle de Monod donne une relation entre le taux de croissance μ d'une population de micro-organismes et la concentration S en substrat limitant (Bakhshi et al., 2011).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{K_s + [S]} \quad (22)$$

Où K_s c'est concentration en substrat qui correspond à un taux de croissance demi maximal.

Le modèle de Haldane est un des modèles le plus généralement utilisé pour décrire la cinétique d'inhibition de croissance des micro-organismes (Bakhshi et al., 2011) représenté par l'équation suivante.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + (S^2/K_i)} \quad (23)$$

Où K_i représente la constante d'inhibition.

II.4. Essais de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en continu :

II.4.1. Réacteur Agité :

Une fois que tous les paramètres de l'étude de biodégradation du phénol en mode batch ont été optimisés, nous avons ouvert le système et ce en réalisant le dispositif expérimental représenté sur la figure II.6.

Le réacteur qui contient des billes, est alimenté à un débit de $7,5 \text{ ml.h}^{-1}$, à l'aide d'une pompe péristaltique, par une solution contenant du phénol, du NO_3NH_4 en raison de 3g.L^{-1} et $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de NaCl . Le tout préparé dans de l'eau de robinet.

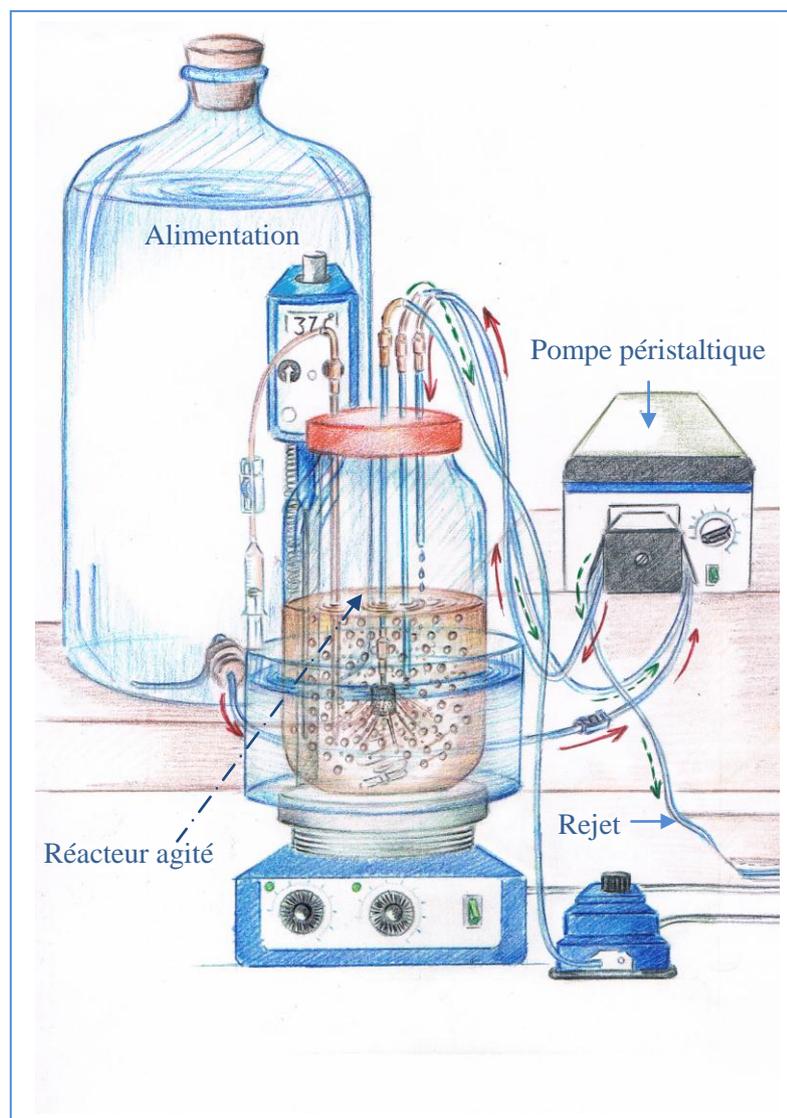


Figure II.6 : Système continu à réacteur agité

II.4.2. Lit fluidisé

La colonne utilisée dans cette partie d'étude est représentée sur la figure II.7. Elle est équipée de 6 points de prélèvement à 5 cm d'intervalle permettant la collecte des échantillons. La hauteur du lit est de 10 cm qui subit une expansion jusqu'à une hauteur de 30 cm soit une expansion de 200%.

Le débit d'air fourni est de $1,8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. La distribution uniforme de ce dernier se fait à l'aide d'un verre frité placé à la base de la colonne.

Les conditions de fluidisation imposent une valeur minimale du rapport entre le diamètre de la colonne D_c et le diamètre des particules de l'ordre de 10. Cette colonne est alimentée par la même solution que celle utilisée en réacteur agité.

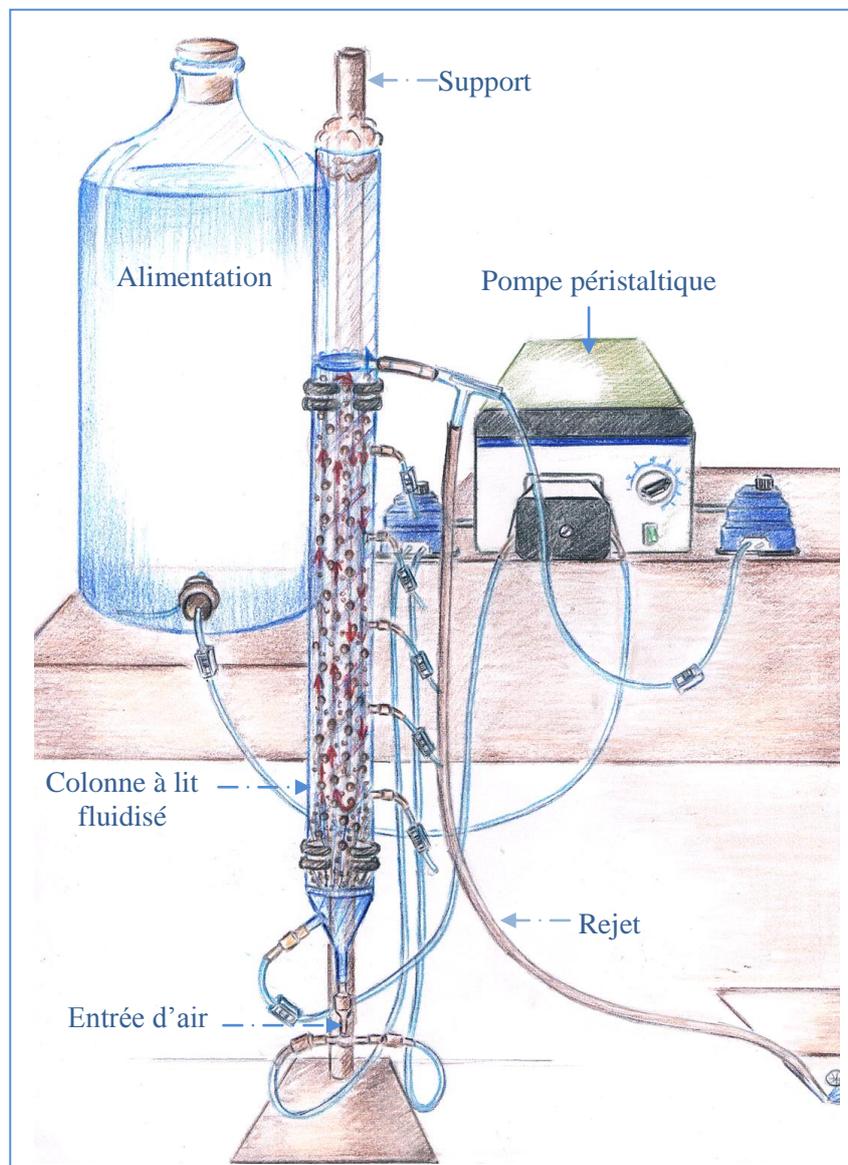
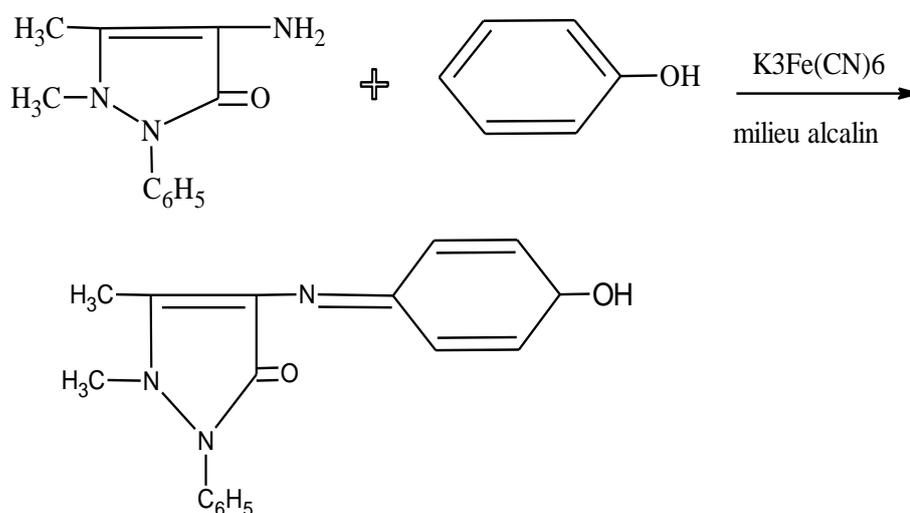


Figure II.7: Système continu à lit fluidisé

II.5. Dosage du phénol :

Le phénol est quantifié par méthode colorimétrique basée sur la condensation du 4-amino-antipyrine avec le phénol en présence d'un agent oxydant ferricyanure de potassium dans un milieu alcalin pour donner un complexe de couleur rouge, l'intensité de cette dernière dépend de la concentration du phénol NF (T 90-204) (1986). L'absorbance est déterminée par un spectrophotomètre (Shimadzu 1601) à une longueur d'onde de 510 nm et la concentration en phénol est déduite par le biais de la courbe d'étalonnage.

La réaction de condensation du 4-amino-antipyrine avec le phénol est présentée ci-dessous :



II.6. Mesure de la biomasse microbienne :

La détermination de la matière sèche cellulaire est la méthode la plus rigoureuse. La biomasse microbienne est récupérée généralement par centrifugation, lavée afin d'éliminer le milieu de culture retenu entre les cellules puis séchée à 105°C jusqu'à poids constant. L'absorbance de l'échantillon est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu 1601) à 600 nm.

II.7. Dénombrement microbien:

Afin d'estimer le nombre de bactéries relarguées dans le milieu réactionnel au cours des cinétiques de biodégradation du phénol par des cellules immobilisées dans des billes d'alginate, nous avons choisi la technique de numération en milieu solide (Joffin and Leyral, 2006) (annexe 1).

II.8. Observation de l'état de la surface des billes d'alginate :

L'observation de l'état de la surface des différentes billes a été effectuée par deux Microscopes Electroniques à Balayage (MEB) l'un environnemental de type Philips ESEM XL30 à filament de tungstène couplé à un système complet de microanalyse par dispersion d'énergie (EDS X). L'autre classique de type Philips de la série XL 20.

II.9. Analyse statistique :

Le logiciel JMP[®] a été utilisé pour réaliser l'analyse statistique des résultats expérimentaux obtenus. JMP est un logiciel d'analyse statistique doté de puissantes fonctions graphiques permettant d'explorer et d'interpréter les données en toute simplicité. JMP offre des fonctionnalités de pointe pour la création de plans d'expériences optimaux. Il inclut en outre des fonctions d'analyse faciles à utiliser, ainsi que de nombreuses méthodes de modélisation (Kim et al., 2008).

Références bibliographiques

- Ali, O, Namane, A, Hellal, A, 2012. Microbial degradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* : Operating conditions and kinetic study. *Revue de microbiologie industrielle sanitaire et environnementale*, 6:35-53.
- Bakhshi, Z, Najafpour, G, Kariminezhad, E, Pishgar, R, Mousavi, N, Taghizade, T, 2011. Growth kinetic models for phenol biodegradation in a batch culture of *Pseudomonas putida*. *Environmental technology*, 32:1835-1841.
- Belattmania, Z, Zrid, R, Reani, A, Elatouani, S, Sabbar, E, Mourtadi, A, El Moznine, R, Cherkaoui, O, Bentiss, F, Sabour, B, 2015. Spectroscopic and rheological characterization of sodium alginate extracted from three Phaeophyceae seaweeds (*Dictyopteris polypodioides*, *Dilophus ligulatus* and *Halopteris scoparia*) from El Jadida shoreline–Morocco (Caractérisation spectroscopique et rhéologique des alginates de sodium extraits de trois algues marines Phaeophyceae (*Dictyopteris polypodioides*). *Journal of material environmental science*, 6:1654-1662.
- Chung, T-P, Tseng, H-Y, Juang, R-S, 2003. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process Biochemistry* 38:1497-1507.
- Fenoradosoa, T A, Ali, G, Delattre, C, Laroche, C, Petit, E, Wadouachi, A, Michaud, P, 2010. Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* grunow. *Journal of applied phycology*, 22:131-137.
- Joffin, J, Leyral, G, 2006. *Microbiologie technique ” Dictionnaire des techniques”* Tome 1. CRDP Aquitaine. Bordeaux
- Kim, T Y, Jin, H J, Park, S S, Kim, S J, Cho, S Y, 2008. Adsorption equilibrium of copper ion and phenol by powdered activated carbon, alginate bead and alginate-activated carbon bead. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 14:714-719.
- Kumaran, P, Paruchuri, Y L, 1997. Kinetics of phenol biotransformation. *Water research*, 31:11-22.
- NF (T 90-204), 1986. *Essais des eaux effluents aqueux des raffineries de pétrole.* : Paris, 464-467.
- Papageorgiou, S K, Kouvelos, E P, Favvas, E P, Sपालidis, A A, Romanos, G E, Katsaros, F K, 2010. Metal–carboxylate interactions in metal–alginate complexes studied with FTIR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 345:469-473.
- Sheeja, R, Murugesan, T, 2002. Mass transfer studies on the biodegradation of phenols in up-flow packed bed reactors. *Journal of hazardous materials*, 89:287-301.

Chapitre III

Résultats et discussion

Rappelons que la présente étude se propose de tester l'efficacité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 immobilisées dans des billes d'alginate pour dégrader le phénol. Le choix de ce polluant résulte de sa fréquence dans les eaux résiduaires issues d'industries diverses. C'est un produit toxique généralement considéré comme indice de pollution industrielle.

Ce chapitre présente donc les résultats obtenus à l'issue de cette étude. Cette présentation est synthétisée en deux parties :

La première partie sera consacrée à la biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans des billes d'alginate en mode batch. Nous commencerons cette partie par la mise au point de la méthode d'immobilisation.

Une fois les billes formées, ces dernières seront utilisées dans des cinétiques de biodégradation où certains paramètres (pH, Température, masse d'alginate, diamètre des billes et concentration du polluant) seront optimisés et ce par la méthode intuitive.

Une modélisation de la biodégradation sera établie par l'utilisation d'un plan d'expérience.

Sachant que la compréhension du phénomène compétitif de diffusion-réaction de biodégradation du phénol par des cellules immobilisées dans des billes d'alginate présente une amélioration certaine du procédé de biodégradation, certains facteurs relatifs au phénomène de diffusion seront déterminés

Afin de tester la stabilité et l'efficacité du biocatalyseur, deux phénomènes seront étudiés :

- ✓ Recyclage des billes ;
- ✓ Influence de la présence de certains sels chélatants dans le milieu réactionnel sur la dissolution des billes et le relargage des cellules.

Dans la seconde partie de notre étude, nous nous intéresserons à l'étude de la biodégradation du phénol en mode continu et ce par la conception de réacteurs (à lit agité et à lit fluidisé) où certains paramètres hydrodynamiques seront déterminés.

III.1. La biodégradation du phénol en mode batch:

III.1.1. Cellules libres :

Sachant que le genre *Pseudomonas* est un organisme très polyvalent, avec une capacité connue à métaboliser même les polymères les plus complexes, il est capable d'utiliser le phénol comme source de carbone et d'énergie. Mais, au delà d'une certaine concentration, le phénol peut avoir un effet toxique.

Des essais de biodégradation du phénol par des cellules libres à différentes concentrations ont été réalisés pour déterminer la concentration maximale à partir de laquelle il y a une inhibition du processus de dégradation. Donc, les bactéries ont été soumises à des concentrations variant de 100 à 800 mg.L⁻¹.

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que dans un intervalle de [100 – 500] mg.L⁻¹, les micro-organismes ont pu dégrader totalement le phénol et n'ont montré aucune inhibition pour ce substrat ce qui est en accord avec les travaux de Saravanan et al. (2008).

Cependant, au-delà de 500 mg.L⁻¹, l'effet d'inhibition apparaît (Ali et al., 2012). Zheng et al. (2010) ont rapporté que *Pseudomonas aeruginosa* HSD38 est capable de dégrader jusqu'à 500 mg.L⁻¹ de phénol, contrairement aux travaux de Mohanty (2012) où *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2074 n'a pu dégrader que 72% d'une concentration initiale en phénol égale à 500 mg.L⁻¹ en un temps relativement long (144 h) par rapport à notre souche qui n'a pris que 50 h pour dégrader totalement la même concentration. Cependant, cette même souche (*Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2074) peut tolérer une concentration allant jusqu'à 750 mg.L⁻¹ en ne dégradant que 48% alors que la souche utilisée pour notre étude n'a pu tolérer que 600 mg.L⁻¹ en ne dégradant que 10%.

Nous avons reporté sur la figure III.1 le taux de croissance ainsi que le taux de biodégradation en fonction de la concentration initiale en phénol. Il ressort de cette figure que dans un intervalle de 100 à 400 mg.L⁻¹, le taux de biodégradation augmente en fonction de la concentration initiale en phénol mais au-delà de 400 mg.L⁻¹ ce taux diminue.

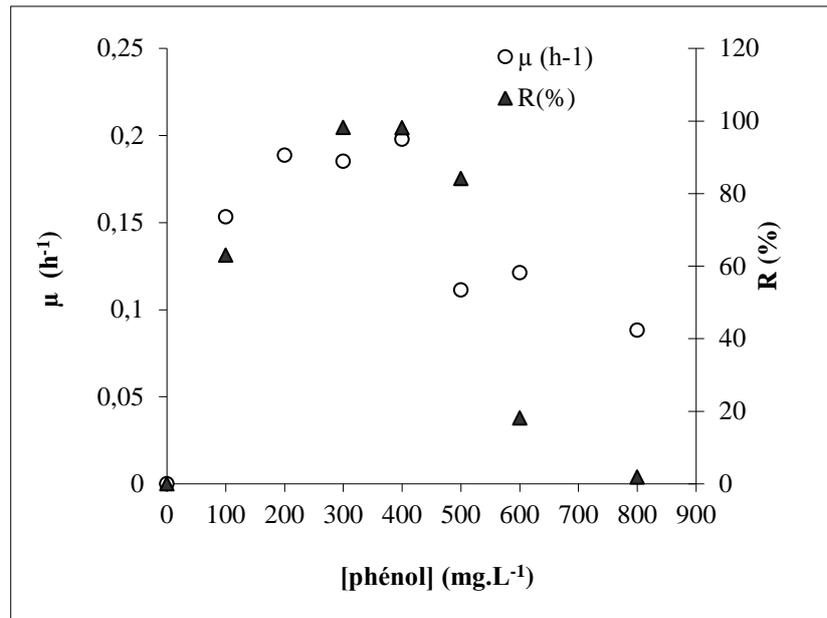


Figure III.1: Effet de la concentration initiale du phénol sur le rendement de biodégradation et la croissance bactérienne

Sur cette même figure, nous constatons que le taux de croissance (μ) augmente au fur et à mesure que la concentration du phénol augmente jusqu'à ce qu'il atteigne une valeur de $0,198 \text{ (h}^{-1}\text{)}$. À partir de cette valeur, le taux de croissance devient inversement proportionnel à la concentration initiale du phénol.

En effet, des concentrations initiales de phénol supérieures à 500 mg.L^{-1} ont provoqué des inhibitions notables. Ceci est dû au fait, qu'une quantité importante de ce polluant peut empêcher tout développement bactérien, inhibant ainsi son métabolisme. Les composés phénoliques ont la capacité de se répartir dans les membranes, de perturber de ce fait les fonctions membranaires et provoquer ainsi la lyse cellulaire. Whiteley et al. (2001) ont trouvé que les isolats de *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* étaient effectivement insensibles au phénol et n'ont montré pratiquement aucune diminution de la réponse respiratoire pour des concentrations allant jusqu'à 400 mg.L^{-1} de phénol.

L'étape critique dans la biodégradation des composés aromatiques est l'hydroxylation de ces derniers. (Mohanty, 2012) qui a étudié l'identification des gènes cataboliques responsables de la dégradation du phénol par plusieurs souches, a conclu que *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas pictorum* contiennent le gène de la phénol-hydroxylase (PH).

En effet, Kotresha and Vidyasagar (2014) en étudiant les voies métaboliques de dégradation du phénol par *P. aeruginosa* MTCC 4996 ont constaté la présence des enzymes clé de cette dégradation (phénol hydroxylase et catéchol 1,2-dioxygénase).

Le phénol a été hydroxylé en catéchol, qui à son tour a été clivé par l'action de la 1,2-dioxygénase conduisant à la formation de l'acide cis-cis-muconique. Ce résultat confirme le clivage du catéchol par la voie ortho. En outre il n'y avait pas d'activité de catéchol 2,3-dioxygénase indiquant l'absence de la voie méta du clivage dans *P. aeruginosa* MTCC 4996, lorsqu'il est cultivé sur du phénol. De ce fait, la phénol-hydroxylase est l'enzyme clé du catabolisme du phénol.

Selon Powlowski and Shingler (1990) l'enzyme (phénol-hydroxylase) ainsi que les gènes codant la voie meta de clivage sont localisés dans des locaux operons situés sur le plasmide TOL de *Pseudomonas spp*, alors que Shingler et al. (1993) indiquent leur emplacement sur le chromosome. Cette constatation est aussi confirmée par les travaux de Kotresha and Vidyasagar (2014). En effet, ils affirment la présence du gène responsable de la phénol-hydroxylase sur le chromosome dans leur étude sur *P. aeruginosa* MTCC 4996. Ils concluent alors que cette propriété va conférer à cette souche un potentiel remarquable pour son application dans la biorestauration et l'épuration des eaux usées, en particulier celles chargées en déchets phénoliques.

D'après Nweke and Okpokwasili (2010), l'exposition des bactéries à des concentrations suffisantes de phénol allant de 200-1400 mg.L⁻¹ a provoqué l'inhibition progressive de l'activité déshydrogénase chez *Pseudomonas sp. RWW2* et *Escherichia sp. DISK2* pour tous les temps d'expositions.

Par contre, chez *Bacillus sp. DISK1* et *Pseudomonas sp. DAF1* une augmentation du temps d'exposition a provoqué une stimulation de l'activité déshydrogénase à de faibles concentrations en phénol. Le seuil de toxicité varie donc en fonction des espèces bactériennes et du temps d'exposition. Nweke and Okpokwasili (2010) indiquent qu'il pourrait y avoir adaptation des bactéries au phénol en augmentant le temps d'exposition.

D'autre part, la présence et la nature d'une autre source de carbone et d'énergie avec le phénol dans le milieu influe sur le degré de tolérance de la bactérie vis-à-vis du phénol.

Bared et al. (2010) qui ont étudié la biodégradation du phénol et de l'acide benzoïque à différentes concentrations [10-80] mg.L⁻¹ par *Pseudomonas aeruginosa* (les deux substrats ont été utilisés simultanément comme source de carbone et d'énergie) ont constaté que *Pseudomonas aeruginosa* est capable de dégrader complètement le phénol et l'acide benzoïque pour des concentrations inférieures à 80 mg.L⁻¹.

Cependant le résultat est meilleur pour le phénol que pour l'acide benzoïque ; le temps de biodégradation de 10 et 50 mg.L⁻¹ de phénol était de 96 et 120 h respectivement alors que le temps mis pour dégrader 10 et 50 mg.L⁻¹ d'acide benzoïque était de 120 et 140 h respectivement. Ceci est dû au fait que le groupement fonctionnel COOH de l'acide benzoïque influe négativement sur la capacité de dégradation de la bactérie.

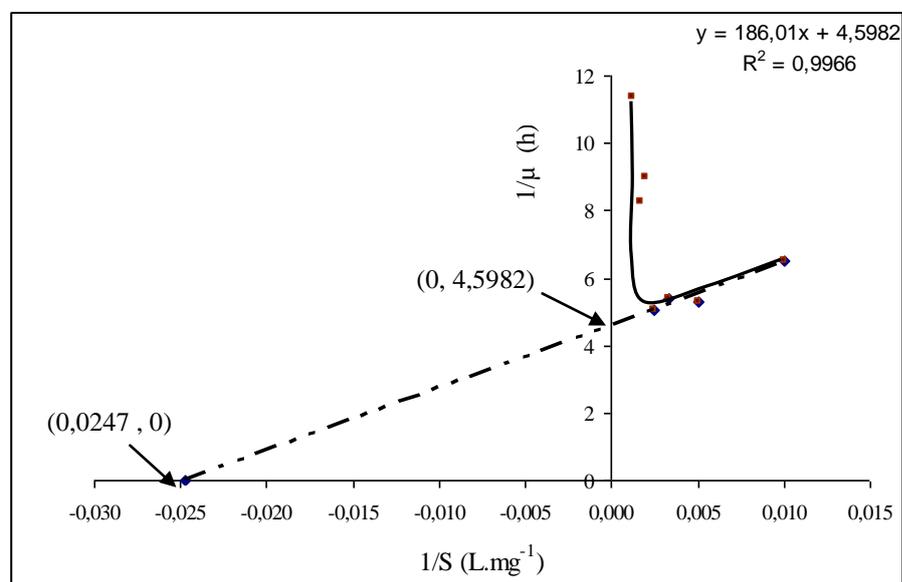
❖ Modèles cinétiques de dégradation du phénol:

L'utilisation du Modèle de Monod a pour but de déterminer les paramètres cinétiques (K_S , μ_{max}) de notre bactérie. Nous constatons, d'après l'allure de la courbe dans la figure 2 qu'il existe une inhibition par le substrat (phénol), ce qui nous a poussé à utiliser le modèle de Haldane pour déterminer les paramètres cinétiques d'inhibition (K_i et μ_{max}).

• Modèle de Monod :

Dans la gamme de concentration 100 – 400 mg.L⁻¹, la dégradation augmente avec la concentration initiale de phénol.

La représentation de l'inverse du taux de croissance ($1/\mu$) en fonction de l'inverse de la concentration dans le modèle de Monod permet la détermination du taux de croissance maximal $\mu_{max}=0,217 \text{ h}^{-1}$ et la constante de demi-saturation $K_S= 40,59 \text{ mg.L}^{-1}$ (figure III.2).



- **Modèle de Haldane :**

Pour une concentration initiale de phénol de 500 mg.L^{-1} , une diminution de la dégradation due à une inhibition provoquée par le phénol à concentration élevée a été observée. Ainsi, le modèle de Haldane a été utilisé pour décrire l'inhibition par le substrat. Les paramètres du modèle ont été déterminés par régression non linéaire (figure III.3), $\mu_{\max} = 0,254 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 40,59 \text{ mg.L}^{-1}$, $K_i = 491,56 \text{ mg.L}^{-1}$.

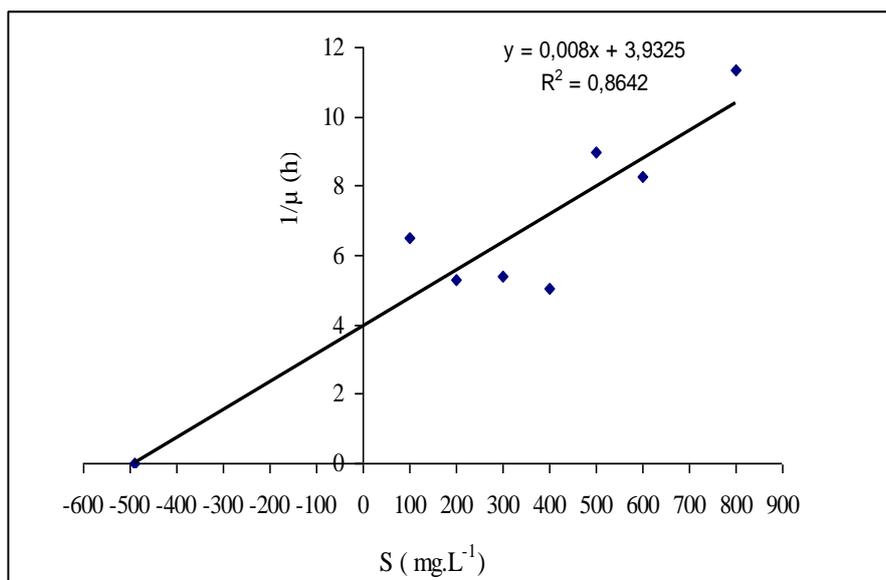


Figure III.3: La linéarisation de l'équation de Haldane

Agarry et al. (2010) ont constaté que le modèle d'inhibition de Haldane peut être considéré comme étant le meilleur pour décrire la dégradation du phénol dans des monocultures de *Pseudomonas aeruginosa*. Der Yang and Humphrey (1975) et Agarry et al. (2010) ont obtenu des résultats similaires avec l'équation de Haldane dans leur description de la dégradation du phénol par *Pseudomonas putida*, *T.cutaneum*, et *Pseudomonas fluorescens* respectivement.

Sokol and Howell (1981) ont obtenu pour les mêmes concentrations de phénol, des valeurs plus élevées du taux de croissance spécifique μ pour des inocula plus jeunes exposés à des concentrations plus faibles de phénol. Selon Rigo and Alegre (2004), les paramètres du modèle de Haldane pour la croissance de *Condida parapsilopsis* dans un milieu contenant du phénol étaient $\mu_{\max} = 0.174 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 11,2 \text{ mg.L}^{-1}$, et $K_i = 298 \text{ mg.L}^{-1}$. Cette variation des paramètres cinétiques peut être expliquée par la différence d'âge de l'inoculum.

Les valeurs des constantes cinétiques obtenues dans ce travail sont comparées à celles trouvées dans d'autres publications, et qui sont présentées dans le tableau III.1. Nos coefficients cinétiques se trouvent dans la gamme retrouvée dans la littérature.

Cependant, la comparaison des paramètres cinétiques est difficile car les conditions de pH et de température sont différentes. Nous avons donc comparé les rapports K_i/K_s et constaté que plus le rapport est bas, plus l'inhibition par le substrat est prononcée.

Tableau III.1: Constantes cinétiques de la biodégradation du phénol par des cultures pures et mixtes (Modèle Haldane)

Culture	μ_{\max} (h ⁻¹)	K_s (mg.L ⁻¹)	K_i (mg.L ⁻¹)	K_i/K_s	Références
<i>Pseudomonas putida</i>	0,438	21,460	477,640	22,257	(Vijayagopal and Viruthagiri, 2005)
Culture mixte (MC-1)	0,379	18,821	449,150	23,864	(Vijayagopal and Viruthagiri, 2005)
<i>Nocardia Sp</i>	0,423	26,770	261,720	9,777	(Vijayagopal and Viruthagiri, 2005)
<i>Bacillus circulans</i>	0,274	1,753	1743,090	994,347	(Vijayagopal and Viruthagiri, 2005)
<i>Pseudomonas putida</i> CCRC14365	0,330	13,900	669,000	48,129	(Chung et al., 2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,0165	-	29,700	-	(Agarry et al., 2010)
<i>Candida parapsilopsis</i>	0,174	11,200	298,000	26,607	(Rigo and Alegre, 2004)
<i>Candida tropicalis</i>	0,385	7,100	185,000	26,056	(Adav et al., 2007)
<i>Trichosporon cutaneum</i>	0,464	1,660	380,000	228,916	(Der Yang and Humphrey, 1975)
Culture mixte	0,150	51,800	404,040	7,800	(Dey and Mukherjee, 2010)
Boue activée	0,438	29,500	72,400	2,454	(Marrot et al., 2006)
Boue activée	0,119	11,130	250,88	22,541	(Ucun et al., 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	0,250	40,590	491,560	12,110	Notre étude

Les résultats obtenus pour cette partie d'étude nous ont permis de constater que *Pseudomonas aeruginosa* était capable de dégrader le phénol jusqu'à une concentration de 500 mg.L⁻¹. Au-delà de cette concentration, la croissance bactérienne s'inhibe.

Plusieurs méthodes ont été proposées par divers chercheurs pour palier à ce problème. L'une des solutions proposées est la technologie des cellules immobilisées. Elle présente l'avantage de protéger les cellules de l'effet toxique du polluant et le maintien de leur activité de dégradation. De plus, elle offre la possibilité de dégrader des concentrations plus élevées de polluants toxiques.

III.1.2. Cellules immobilisées :

Afin d'améliorer notre procédé, nous allons immobiliser les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* dans des billes d'alginate de calcium. L'élaboration et l'optimisation de cette technique feront l'objet de cette partie d'étude. Cependant, avant d'immobiliser les cellules dans les billes d'alginate, il est important de vérifier si le phénol peut s'adsorber sur ces dernières.

III.1.2.1. Essai d'adsorption du phénol sur les billes d'alginate :

Plusieurs cinétiques d'adsorption de 100 mg.L^{-1} de phénol sur des billes d'alginate vierges (sans cellules bactériennes) à différents diamètres (2, 3 et 4 mm) ont été effectuées. Les résultats qui sont représentés sur la figure III.4 indiquent clairement qu'il n'y a pas de changement dans la concentration en phénol durant tous les essais. Ce qui implique qu'il n'y a eu ni évaporation ni adsorption du phénol sur les billes d'alginate.

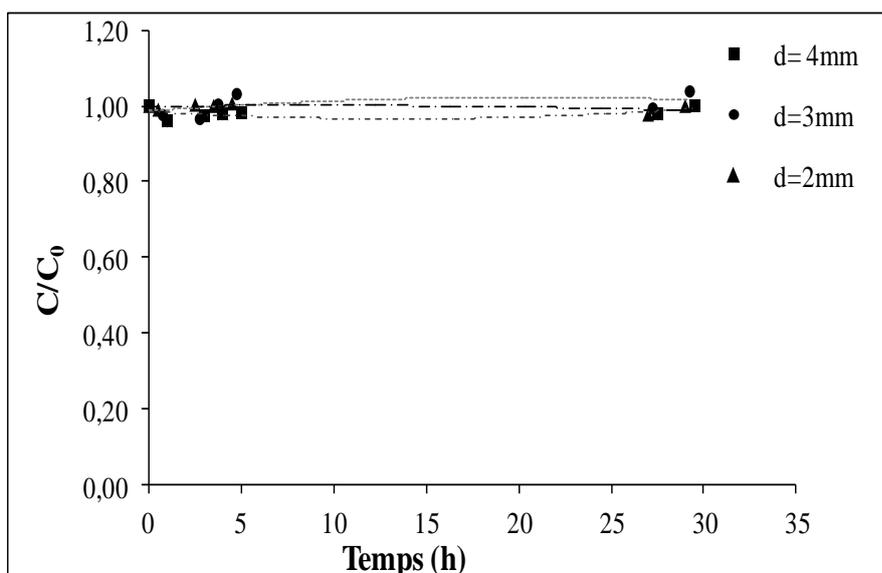
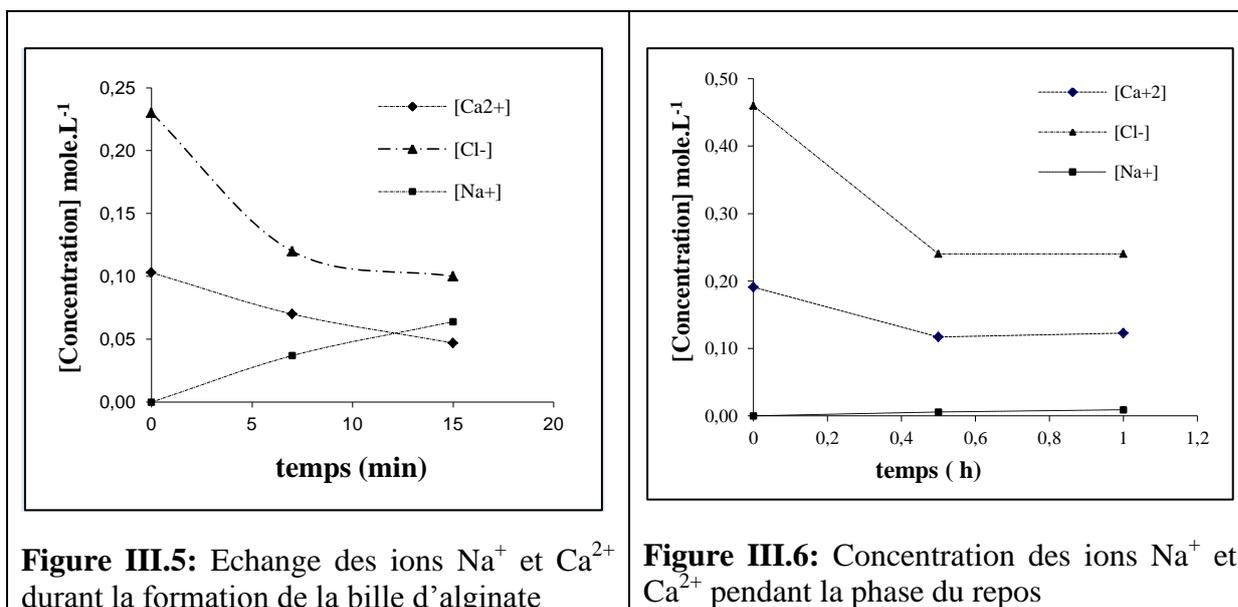


Figure III.4 : Cinétique d'adsorption du phénol sur des billes vierges à différents diamètres

III.1.2.2. Mise au point de la méthode d'immobilisation :

La formation des billes décrite précédemment dans la section matériel et méthode, s'effectue par dispersion de la solution d'alginate de sodium contenant l'inoculum dans une solution de chlorure de calcium CaCl_2 0,1M ; dans cette étape les ions sodium contenus dans l'alginate seront remplacés par le calcium (figure III.5). Une fois les billes formées, ces dernières sont transférées dans une solution de CaCl_2 0,2M et laissées au repos pendant une heure (Chung et al., 2003) dans une étuve à 37°C qui permet le remplacement total des ions de Na^+ par Ca^{2+} afin d'assurer une meilleure stabilité (figure III.6) (Kotresha and Vidyasagar, 2008).



A la fin, ces billes sont lavées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de calcium, puis égouttées et conservées à 4°C dans de l'eau distillée jusqu'au moment de l'expérience.

Une fois le biocatalyseur synthétisé, il est utilisé dans des cinétiques de biodégradation du phénol en batch pour tester son efficacité.

Les premiers essais réalisés ont montré, une lenteur dans l'activité de biodégradation par les billes d'alginate obtenues par cette méthode dans les conditions décrites plus haut. En effet, les résultats obtenus montrent qu'il y a eu une élimination totale du phénol et ce pour les différents diamètres utilisés. Nous remarquons que pour le diamètre ($d_p=1$ mm), les bactéries ont mis 3 jours pour dégrader le phénol, pour le diamètre $d=2$ mm, il a été de 5 jours, tandis que pour les diamètres $d_p=3$ mm et $d_p=4$ mm, elles ont consommé le phénol en 4 jours (figures III.7, III.8, III.9 et III.10).

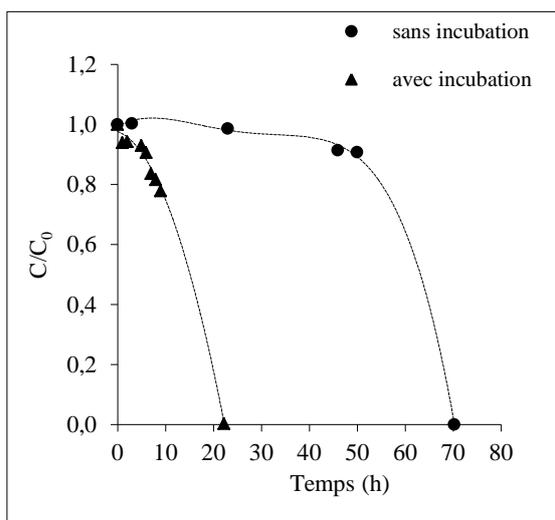


Figure III.7 : Cinétique de dégradation pour le diamètre de bille = 1 mm

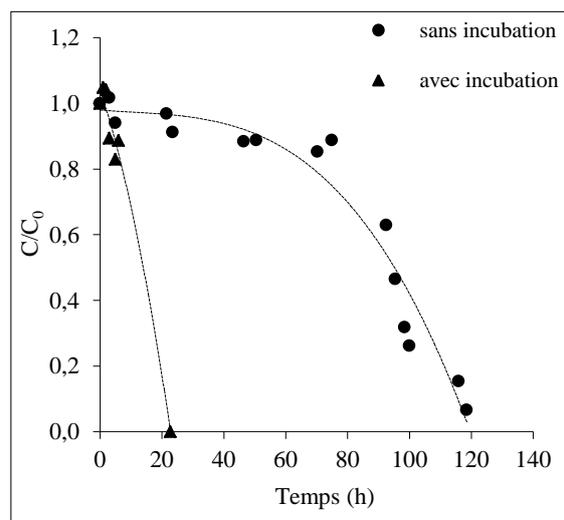


Figure III.8 : Cinétique de dégradation pour le diamètre de bille = 2 mm

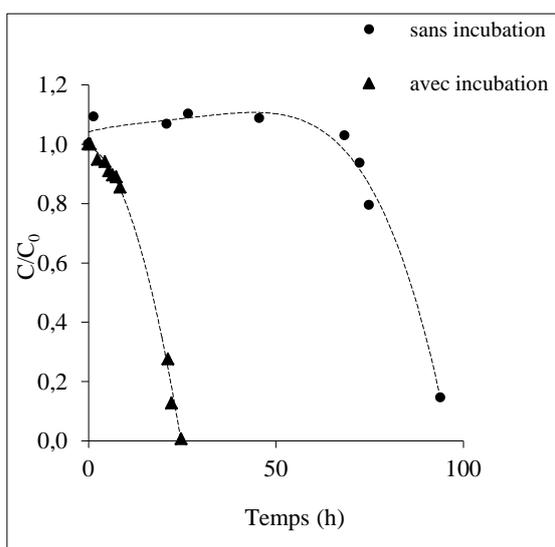


Figure III.9 : Cinétique de dégradation pour le diamètre de bille = 3 mm

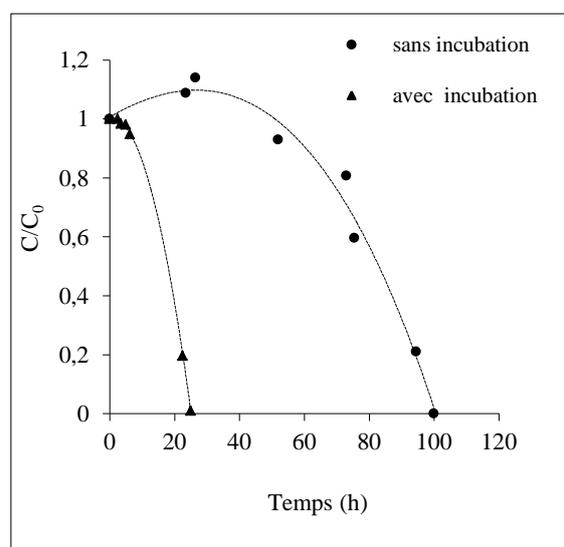


Figure III.10 : Cinétique de dégradation pour le diamètre de bille = 4 mm

Afin de réduire ce temps et améliorer de ce fait notre technique, le mélange (solution d'alginate et cellules bactériennes) a été incubé pendant 16 h à 37 C° avant la synthèse des billes. D'autres essais de biodégradation du phénol ont été effectués avec les nouvelles billes formées. Comme le montre les figures III.7, III.8, III.9 et III.10, effectivement le temps a été réduit de quelques jours à quelques heures.

Ceci montre que la température ainsi que la durée d'incubation ont un effet positif sur le temps de la biodégradation du phénol. En effet, sachant que la température optimale de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* est de 37°C, l'incubation du mélange (solution d'alginate + culot) à cette température pendant 16 h a permis la multiplication des bactéries au sein des billes (augmentation du nombre) ce qui a induit à la réduction du temps de biodégradation au cours des cinétiques.

III.1.2.3. Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans des billes d'alginate:

Les paramètres physiologiques jouent un rôle essentiel dans la croissance de tout micro-organisme ainsi que pour la biodégradation. Les micro-organismes se développent dans une gamme de paramètres mais la croissance maximale n'est atteinte que dans des conditions optimales de ces derniers. Ainsi la détermination de la plage optimale pour une dégradation maximale est le but de cette partie.

Sachant que l'activité bactérienne est influencée par divers facteurs environnementaux tels que le diamètre des billes, la taille de l'inoculum, le pH, la température et la concentration initiale du polluant, nous entamons notre travail par l'étude des différents paramètres influençant la biodégradation du phénol par la méthode classique puis par l'utilisation de plan d'expériences.

III.1.2.3.1. Effet du diamètre des billes sur la biodégradation :

Afin d'évaluer l'influence du diamètre des billes, une série d'expériences a été réalisée en variant le diamètre des billes de 1 à 4 mm. Ces dernières ont été utilisées dans un réacteur en mode batch pour dégrader 100 mg.L⁻¹ de phénol sous une température de 37°C et un pH qui avoisine la neutralité. La biomasse contenue dans les billes est de l'ordre de 0,130 g.L⁻¹. Les résultats obtenus sont représentés sur les figures suivantes.

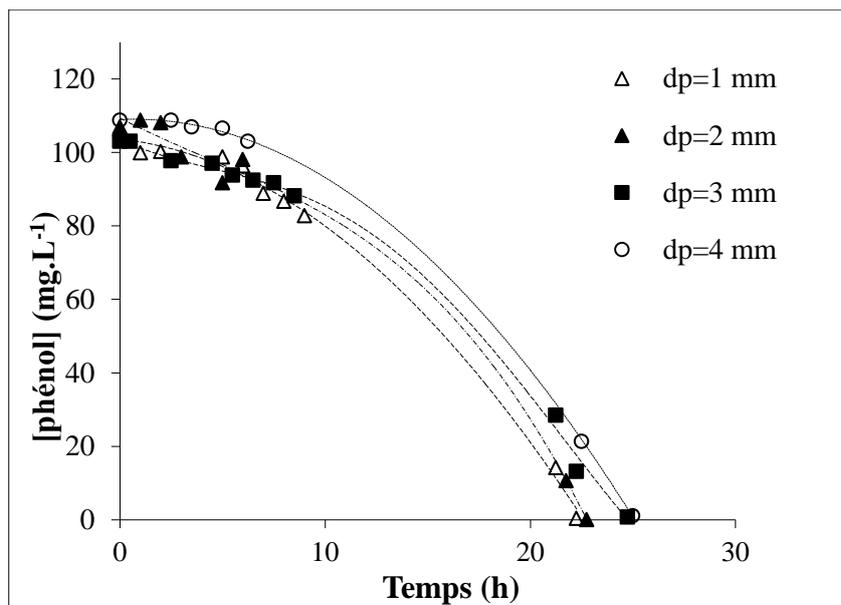


Figure III.11: Cinétique de biodégradation du phénol pour différents diamètres des billes ([Biomasse]=0,13 g.L⁻¹, [phénol]=100 mg.L⁻¹)

D'après l'allure des courbes qui sont représentées sur la figure III.11, nous constatons qu'il y a eu effectivement une élimination totale du phénol et ce pour les 4 diamètres utilisés et la variation du diamètre des billes n'a pas affecté le temps de biodégradation du phénol qui avoisine les 22 h.

Basak et al. (2014) ont étudié l'influence du diamètre sur la biodégradation de 2400 mg.L⁻¹ de phénol par *Candida tropicalis* PHB5 immobilisé dans des billes d'alginate et ce en utilisant différents diamètres allant de 2 à 6 mm. Ils ont montré que le meilleur rendement d'élimination et la vitesse maximale de dégradation ont été obtenus pour un diamètre égal à 3 mm. Ces valeurs sont légèrement supérieures à celles trouvées pour le diamètre 2 mm. Ce qui est en accord avec les résultats trouvés durant notre étude et qui sont illustrés dans les figures III.12 et III.13 représentant la variation du temps de biodégradation du phénol en fonction du diamètre des billes, ainsi que la variation de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction du diamètre des billes respectivement. En effet, selon ces mêmes figures nous obtenons une vitesse maximale de biodégradation de l'ordre de 35 mg.g.h⁻¹ pour les petits diamètres (1 et 2 mm) qui correspond à un temps de biodégradation avoisinant les 22 h. Une vitesse de biodégradation proche de celle obtenue par Dursun and Tepe (2005) pour dégrader 100 mg.L⁻¹ de phénol par *Ralstonia eutropha* immobilisée dans des billes de diamètre 2 mm et qui est de l'ordre de 24,4 mg.g.h⁻¹.

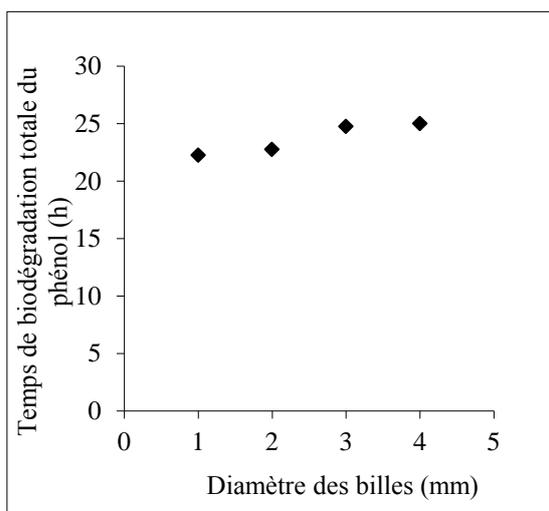


Figure III.12: Variation du temps de biodégradation du phénol en fonction du diamètre des billes des billes

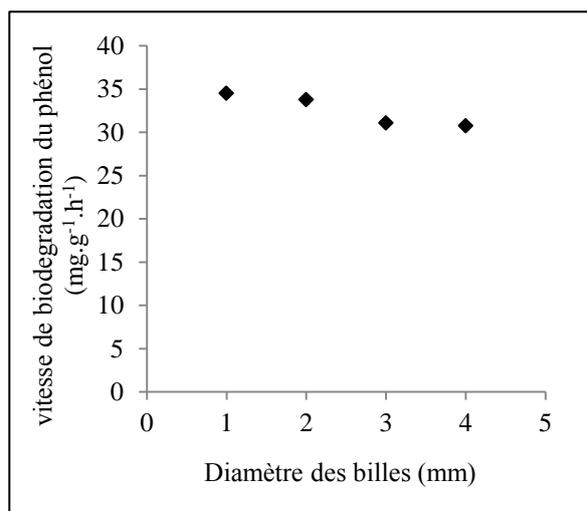


Figure III.13: Evolution de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction de diamètre des billes

Des résultats similaires ont été obtenus par Chung et al. (2003) pour leurs travaux sur l'effet de la taille des billes de diamètre 3 et 4 mm sur la biodégradation du phénol par *Pseudomonas putida*. Ils optent pour un diamètre de 3 mm car, selon ces mêmes chercheurs, des billes de plus grand diamètre provoquent une limitation de transfert de matières. Ceci a été confirmé par la détermination des coefficients de transfert de masse.

Aksu and Bülbül (1999) trouvent un optimum de biodégradation pour un diamètre $d=2,4$ mm lors de leur étude sur la détermination du coefficient de diffusion de 100 mg.L^{-1} de phénol dans des billes d'alginate où *Pseudomonas putida* était immobilisé. Ils constatent que pour tous les diamètres étudiés (2,4, 3,6 et 5,2 mm), la biodégradation du phénol était lente pour les grandes billes. Ils attribuent cela eux aussi au phénomène de diffusion. De même que Bandhyopadhyay et al. (2001) qui ont étudié l'effet de trois valeurs de diamètre des billes (2,5, 5 et 7 mm) sur l'élimination du phénol par *Pseudomonas putida* MTCC 1194 immobilisé dans de l'alginate de calcium, trouvent que le taux de biodégradation est plus élevé pour les particules de plus petite taille avec un optimum égal à 2,5mm.

Dursun and Tepe (2005) quant à eux, ont utilisé trois diamètres différents (2, 3 et 4mm) et ont constaté eux aussi qu'une augmentation de la taille de particule entraîne une augmentation de limitation de diffusion de phénol dans les particules et les faibles taux d'élimination du substrat ont été trouvés pour des particules plus grosses.

Toutes ces constatations nous ont permis d'utiliser le diamètre $d=1\text{ mm}$ pour la suite de notre étude. Cependant, lors de la conception des billes de ce diamètre, il y a eu beaucoup de perte de matériau : formation de billes avec un diamètre inférieur à 1 mm qui sont produites en même temps, ce qui n'a pas été observé pour les autres diamètres utilisés. Ceci nous a conduit à choisir le diamètre $d_p=2\text{ mm}$ pour continuer l'étude de l'influence des autres paramètres sur la biodégradation du phénol.

III.1.2.3.2. Effet de la concentration en biomasse sur la biodégradation :

La quantité de biomasse est un paramètre très important pour l'analyse et le contrôle d'un système de biodégradation. Pour étudier l'effet de ce paramètre sur la biodégradation de 100 mg.L^{-1} de phénol, plusieurs expériences ont été réalisées en variant la taille du culot qui s'exprime en densité optique de 0,3, 0,6 et 0,9 correspondant à des concentrations de biomasses égales à 0,130, 0,260 et 0,390 mg.L^{-1} respectivement. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure III.14.

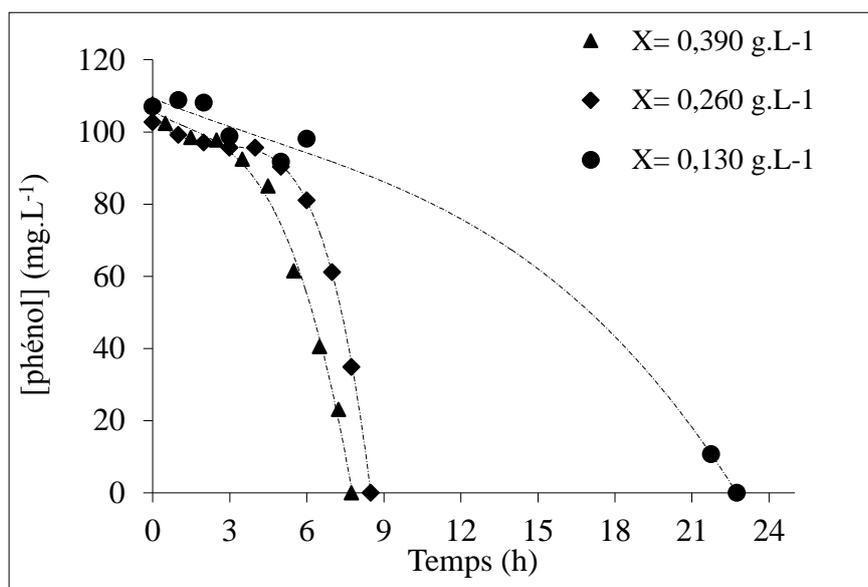


Figure III.14 : Cinétique de biodégradation du phénol pour différentes tailles du culot
([phénol]= 100 mg.L^{-1} , $d_p = 2\text{ mm}$)

Selon la figure III.14, nous constatons que plus la taille du culot augmente plus le temps de la biodégradation du phénol diminue. En effet, en passant d'une biomasse de 0,130 à 0,260 mg.L^{-1} le temps de biodégradation est réduit de 23 h à 8,5 h soit une diminution de 14 h. Alors qu'en passant d'une biomasse de 0,260 à 0,390 mg.L^{-1} il n'y a pratiquement pas de différence dans le temps de biodégradation.

Ces observations sont confirmées par le tracé de la variation du temps de biodégradation en fonction des différentes biomasses immobilisées (figure III.15).

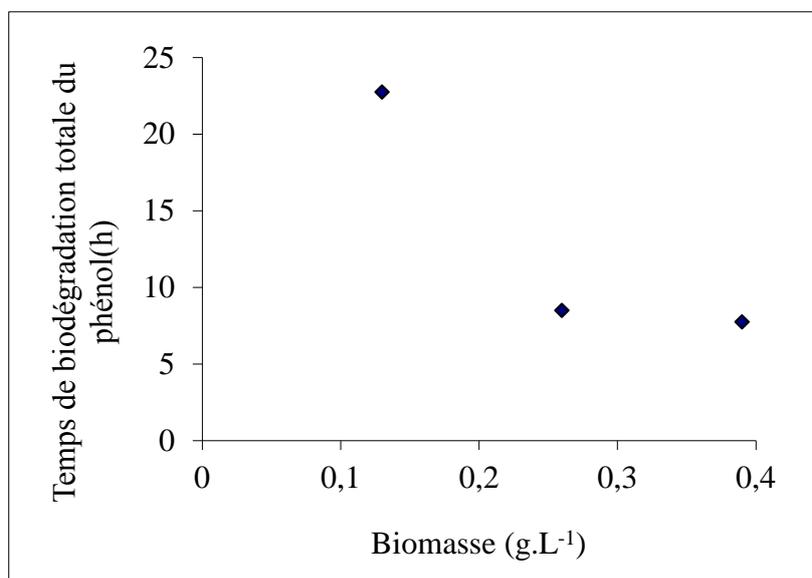


Figure III.15 : Variation du temps de biodégradation du phénol en fonction de la concentration de la biomasse immobilisée.

Nous avons calculé aussi la vitesse de biodégradation du phénol pour les trois masses utilisées. Les résultats sont reportés sur la figure III.16 où nous remarquons une augmentation de la vitesse de biodégradation au fur et à mesure que la biomasse augmente jusqu'à atteindre une valeur de $46,47 \text{ mg.g.h}^{-1}$ qui correspond à une biomasse égale à $0,26 \text{ g.L}^{-1}$. Au-delà, la vitesse diminue malgré que la biomasse soit relativement plus grande. Ceci peut être expliqué par le fait qu'un nombre plus important de bactéries ainsi que la présence des métabolites de dégradation, à l'intérieur de la bille, entraînent un encombrement et par conséquent une limitation de transfert de matière.

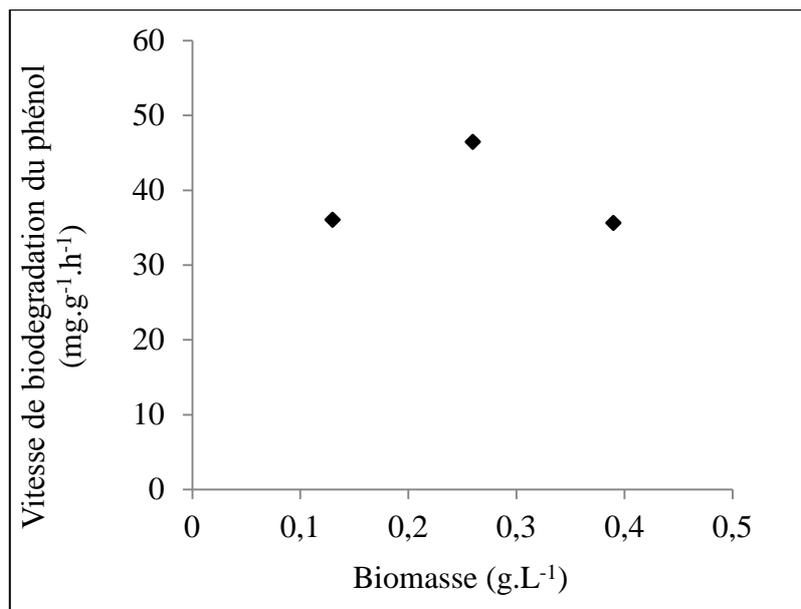


Figure III.16: Evolution de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction de la biomasse

III.1.2.3.3. Effet de la concentration de l'alginate de calcium :

La concentration d'alginate de sodium utilisée dans la préparation de billes où les cellules vont être immobilisées, affecte les propriétés de la solution d'alginate. Cependant, peu de recherches ont été effectuées sur l'effet de la concentration d'alginate de sodium sur la dégradation du phénol.

Afin de déterminer la concentration optimale d'alginate correspondant à une vitesse maximale de biodégradation, différentes expériences ont été effectuées à diverses concentrations d'alginate de sodium (2, 3 et 4%) pour préparer des billes de diamètre 2 mm. Ces dernières ont été utilisées dans des cinétiques de biodégradation de 100 mg.L⁻¹ de phénol. Pour chaque concentration d'alginate utilisée, nous avons suivi l'évolution de la concentration du phénol en fonction du temps. Les résultats sont représentés sur la figure III.17.

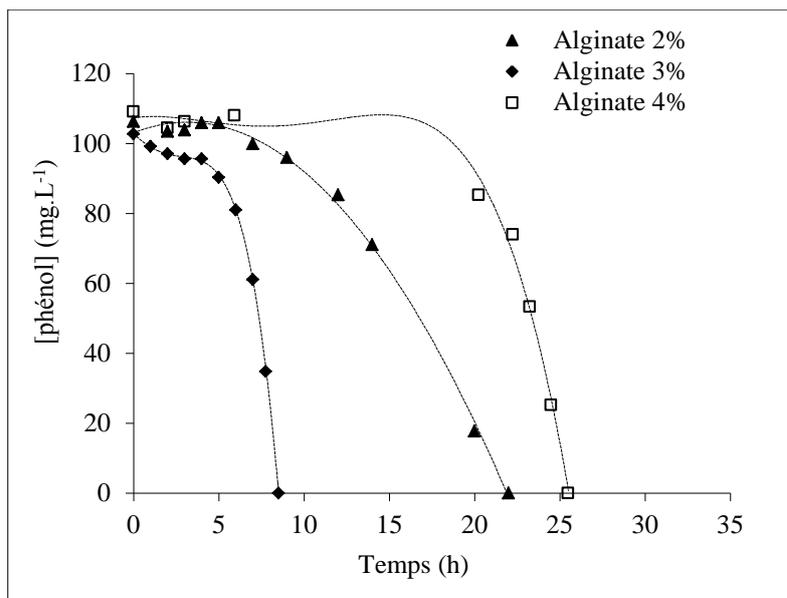


Figure III.17: Influence de la concentration d'alginate sur la cinétique de biodégradation du phénol par des cellules immobilisées ([Biomasse]=0,26 g.L⁻¹, [phénol]=100 mg.L⁻¹, d_p = 2 mm)

Nous constatons que pour toutes les concentrations d'alginate utilisées, les bactéries ne dépassent pas les 25 h pour dégrader la totalité du phénol. En utilisant 3% d'alginate, *Pseudomonas aeruginosa* a consommé totalement 100 mg.L⁻¹ de phénol en 8 h de temps.

La vitesse de biodégradation du phénol calculée pour les différentes concentrations d'alginate (figure III.18) donne des valeurs de l'ordre de 23,14, 46,47 et 16,45 mg.g⁻¹h⁻¹ pour des concentrations de 2, 3 et 4% d'alginate respectivement. Les résultats montrent que la vitesse de dégradation du phénol augmente initialement avec l'augmentation de la concentration d'alginate et atteint ensuite la valeur maximale (46,47 mg.g⁻¹h⁻¹) à une concentration de 3% d'alginate. Ce même résultat a été obtenu par Basak et al. (2014); Banerjee and Ghoshal (2011) et Mollaei et al. (2010)

Selon ces mêmes chercheurs, la faible vitesse de dégradation du phénol en dessous de 46,47 mg.g⁻¹h⁻¹ est attribuée à la réduction de la stabilité des billes d'alginate à des concentrations inférieures à 3%. Cette instabilité détériore les billes et expose ainsi les cellules directement au phénol entraînant une réduction de la croissance ainsi que les vitesses de dégradation. Hannaford and Kuek (1999) suggèrent l'utilisation des concentrations d'alginate supérieures à 2% afin d'augmenter l'endurance des billes et éviter leur détérioration si celles-ci sont utilisées dans des réactions longues.

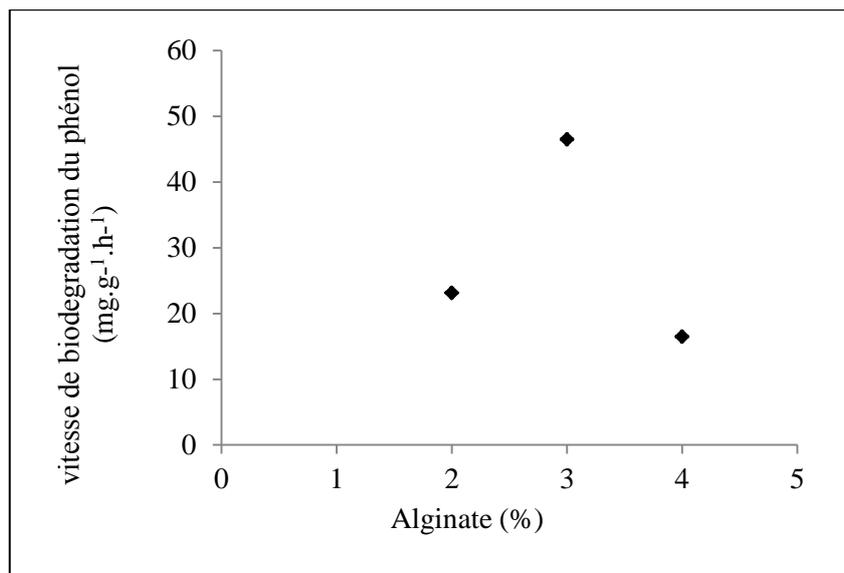


Figure III.18: Evolution de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des concentrations d'alginate

D'autre part, la réduction de la vitesse de dégradation à des concentrations plus élevées d'alginate (4%) est due à une mauvaise diffusion à travers la matrice compacte et rigide des billes. Ce même constat a été mentionné par Mollaei et al. (2010) dans leurs travaux sur l'effet de la variation de la concentration d'alginate sur la biodégradation du phénol par *Pseudomonas* sp. SA01 et Banerjee and Ghoshal (2011) pour leurs travaux sur la biodégradation du phénol par des souches isolées d'un site de raffinerie dites *Bacillus cereus* immobilisées dans des billes d'alginate.

Nous avons reporté sur la figure III.19 l'évolution du temps de biodégradation en fonction des différentes concentrations d'alginate. Il ressort de cette figure que le temps nécessaire à la dégradation complète de 100 mg.L⁻¹ de phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans 3% d'alginate est inférieur, à celui des billes d'alginate de 2%, et que ce dernier est presque identique à celui de 4% d'alginate. Il apparaît que l'augmentation de la concentration d'alginate de 2% à 3% conduit à une réduction du temps de dégradation. Ces résultats concordent avec ceux de Basak et al. (2014), Banerjee and Ghoshal (2011) et Mollaei et al. (2010).

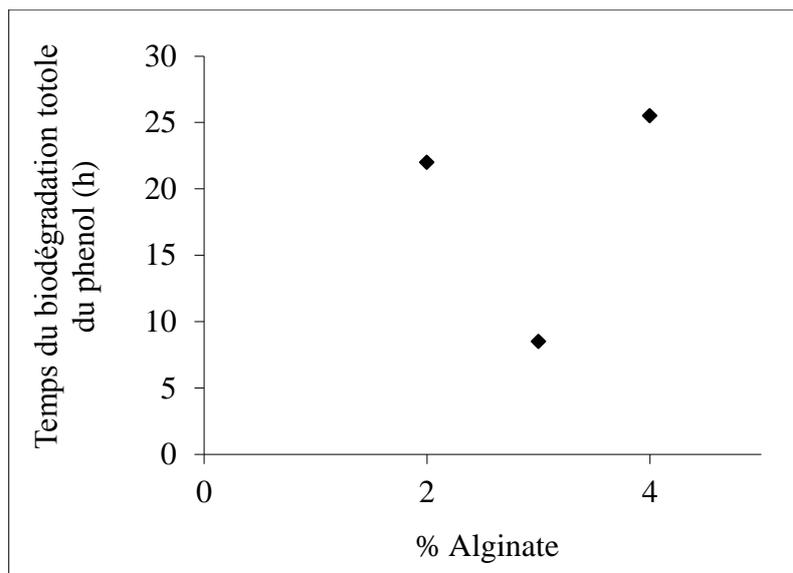


Figure III.19: Variation du temps de biodégradation du phénol en fonction des concentrations d'alginate

Nous concluons donc que la variation de la concentration d'alginate influe sur le temps ainsi que la vitesse de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé avec un optimum de 3%. De ce fait, cette concentration (3%) sera choisie pour la suite de notre étude.

III.1.2.3.4. Effet de la température sur la biodégradation du phénol

La température est un paramètre important pouvant influencer la biodégradation du phénol et l'activité physiologique des micro-organismes, et par conséquent la vitesse de biodégradation ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes.

L'influence de la température a été étudiée pour la dégradation de 100 mg.L^{-1} de phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans des billes d'alginate de 2 mm de diamètre et une masse d'alginate de 3%. Six valeurs de température ont été choisies à savoir : 20, 25, 30, 37, 40 et 45°C . Au cours de ces expériences, la quantité initiale de biomasse était de $0,26 \text{ g.L}^{-1}$. La variation de la concentration du phénol en fonction du temps pour les différentes températures étudiées est représentée sur la figure III.20.

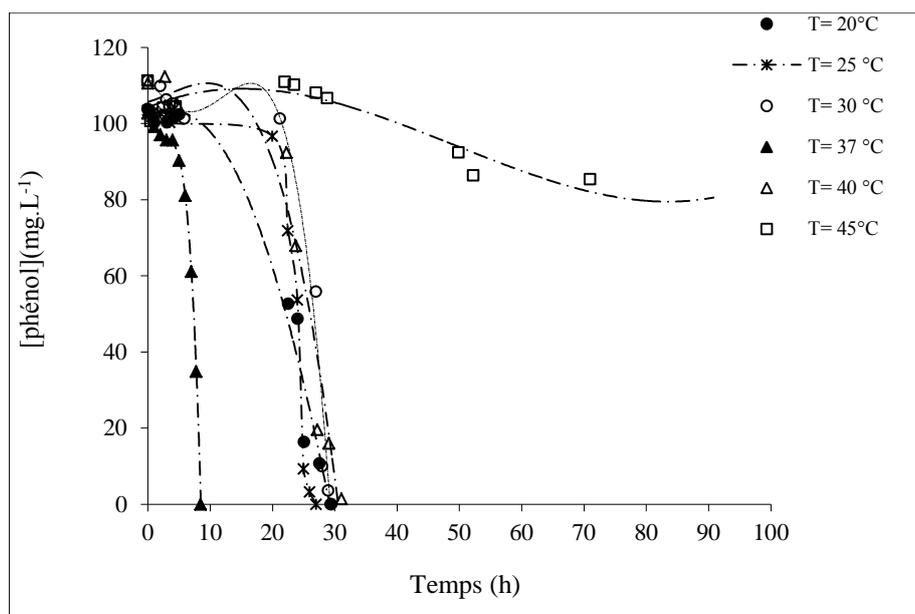


Figure III.20: Variation de la concentration du phénol en fonction du temps pour les différentes températures.

($[\text{Biomasse}] = 0,26 \text{ g.L}^{-1}$, $[\text{phéno}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $d_p = 2 \text{ mm}$)

Les résultats expérimentaux indiquent qu'une dégradation complète du phénol a été observée pour toutes les températures utilisées à l'exception de la température de 45°C où la bactérie n'a pu dégrader que 15% de la concentration initiale.

Lorsque la température varie de 20 à 40°C, les cellules immobilisées consomment la totalité du polluant en 30 h. En revanche, pour une température de 37°C, les cellules dégradent complètement le phénol en 10 h seulement. Ceci nous permet de constater que la température de 37°C est la température optimale de la biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* d'autant plus que 37°C est la température optimale de croissance de cette bactérie (Bared et al., 2010).

Des résultats similaires ont été obtenus par Mohanty (2012) qui a étudié l'influence de la température sur la biodégradation du phénol par *Pseudomonas sp.NBM11*. Le rendement de biodégradation était maximal pour une température optimale de 30°C qui correspondait à la température optimale de croissance de cette bactérie. Cette même constatation a été confirmée par Basak et al. (2014) qui ont étudié eux aussi la biodégradation du phénol par *Candida tropicalis PHB5* immobilisée dans des billes d'alginate. Ils ont rapporté qu'une diminution du taux spécifique maximum de dégradation et du rendement d'élimination ont été observés au-delà de la température optimale (30°C).

Ying et al. (2007) ont étudié la biodégradation du phénol par *Acinetobacter* sp. PD12 libre et immobilisée dans des particules d'alcool polyvinylique (PVA). Ils ont constaté que bien que la température optimale de biodégradation soit la même (30°C) dans les deux cas (cellules libres et immobilisées), les taux de dégradation étaient de 0.9696 et 1.249 h⁻¹ pour les cellules libres et les cellules immobilisées respectivement. Au-delà de cette température une chute rapide de la courbe a été observée pour les cellules libres par rapport à celle des cellules immobilisées jusqu'à atteindre un taux de dégradation de 0.011 et 0.829 h⁻¹ à une température de 45°C respectivement. Ils concluent alors que l'immobilisation fait augmenter la stabilité thermique des cellules sous la protection du support PVA.

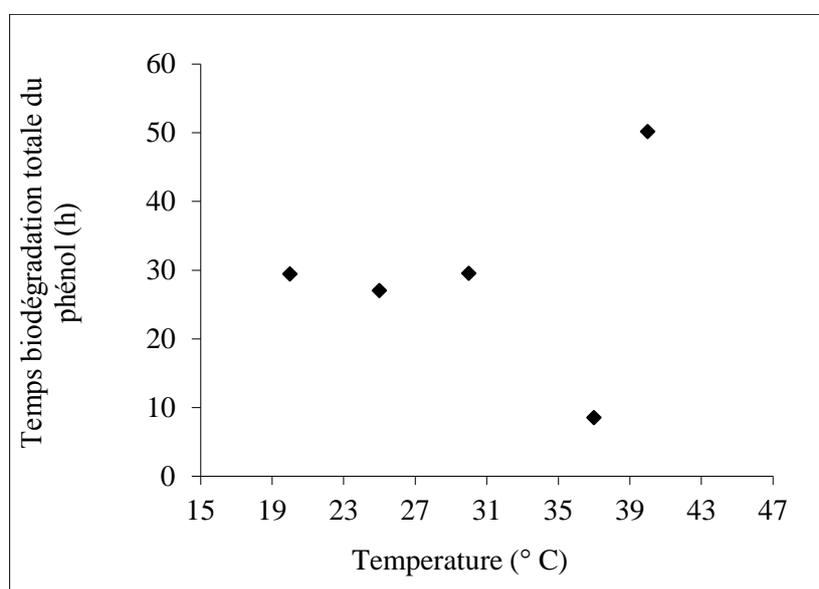


Figure III.21 : Variation du temps de biodégradation du phénol en fonction de la température

D'après la figure III.21 qui représente la variation du temps de biodégradation en fonction des différentes températures étudiées, nous obtenons une température optimale égale à 37°C.

Bossert and Bartha (1984) indiquent que le maximum de l'activité métabolique des micro-organismes, est généralement remarqué à une température de croissance comprise entre 30 et 40°C, au delà de cette température, une augmentation de la toxicité des xénobiotiques et une diminution de l'activité métabolique sont observées.

De même que De Ory et al. (1998) qui expliquent qu'aux températures supérieures à l'optimum, il se produit une désactivation de la croissance bactérienne par la dénaturation des enzymes essentielles au métabolisme bactérien et la détérioration de la membrane qui provoque la dispersion des constituants cellulaires rendant ainsi le micro-organisme sensible à la toxicité du polluant. En effet, nous avons constaté une chute du taux de biodégradation (15%) pour la température de 45°C, et nous avons remarqué une détérioration des billes.

Nous avons déterminé la vitesse de biodégradation du phénol pour chaque température étudiée. Les résultats qui sont illustrés sur la figure III.22 confirment les observations précédentes. En effet, la vitesse de biodégradation augmente avec la température d'incubation jusqu'à atteindre une valeur optimale de 46,47 mg.g⁻¹.h⁻¹ correspondant à une température de 37°C. Au-delà de cette température, une chute de la vitesse est observée avoisinant 1 mg.g⁻¹.h⁻¹ pour la température de 45°C.

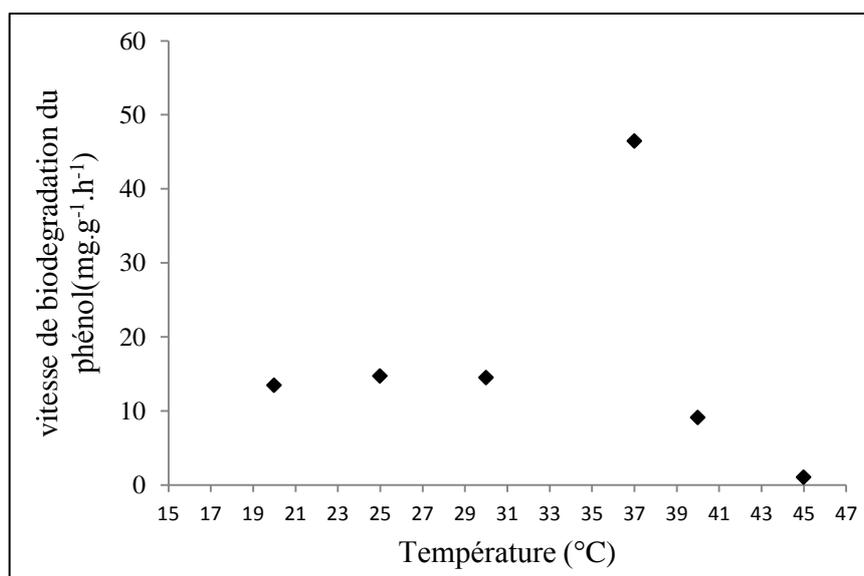


Figure III.22 : Variation de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction de la température

Surkatti and El-Naas (2014) qui ont étudié la biodégradation du p-crésol par *Pseudomonas putida* immobilisé dans des particules d'alcool polyvinylique (PVA) constatent que l'augmentation de la température d'incubation de 25 à 40°C semble améliorer la capacité de biodégradation de *Pseudomonas putida* en atteignant un optimum entre 30 et 40°C. Cependant, des températures supérieures à 40°C ou inférieures à 25°C ont tendance à avoir un effet négatif sur le taux de biodégradation.

Les basses températures entraînent habituellement un ralentissement de l'activité des bactéries et des températures élevées (plus de 40°C) et conduisent à la désactivation des principales enzymes de biodégradation.

A partir de ces résultats, nous avons fixé la température de 37°C comme température optimale pour la suite de notre étude.

III.1.2.3.5. Effet du pH sur la biodégradation :

Le suivi du pH du milieu peut être un indicateur de la dégradation du phénol et l'un des facteurs importants pour l'efficacité du traitement biologique. Le pH affecte de manière significative les réactions biochimiques nécessaires à la dégradation de phénol (Chung et al., 2003; Uzun et al., 2010).

Pour ces raisons une série d'expériences a été effectuée dans un intervalle de pH allant de 3 à 9 pour étudier l'influence de ce paramètre sur l'élimination de 100 mg.L⁻¹ de phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans des billes d'alginate de diamètre 2mm. La température du milieu réactionnel a été maintenue à 37°C. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure III.23.

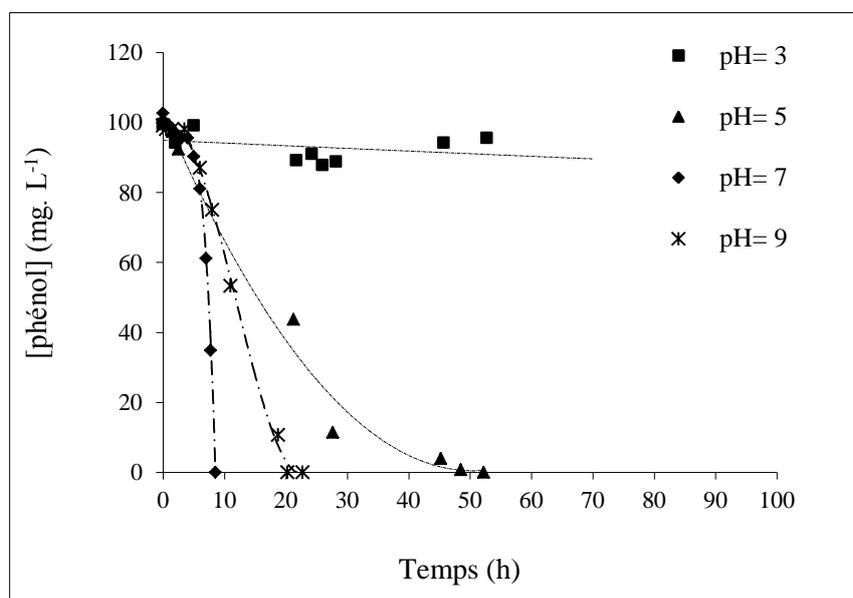


Figure III.23 : Influence du pH sur la biodégradation du phénol

([Biomasse]=0,26 g.L⁻¹, [phénol]=100 mg.L⁻¹, $d_p = 2$ mm, T=37°C)

De prime abord, il est important de signaler que chaque enzyme qui intervient dans la biodégradation du phénol possède une activité enzymatique optimale pour un pH optimal. Ce dernier varie d'une bactérie à une autre (Dursun and Tepe, 2005). De plus, le meilleur intervalle de pH pour une totale biodégradation du phénol se situe entre 6,5 et 7,5.

Nos résultats montrent que pour des valeurs de pH allant de 5 à 9, une biodégradation totale du phénol est observée. Cependant le temps mis pour dégrader la totalité du polluant diffère d'un pH à un autre. Pour un pH neutre par exemple, le microorganisme a dégradé le phénol en 8,5 h de temps. Tandis que pour un pH = 9, le temps était de 20,25 h. Pour un pH acide (=5) le temps était de 48,5 h avec une vitesse de dégradation égale à $7,46 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (figure III.24).

Cependant pour un pH=3, l'activité de *Pseudomonas aeruginosa* était inhibée. En effet, l'environnement interne de toutes les cellules vivantes est considéré comme à peu près neutre. La plupart des organismes ne peuvent pas tolérer des pH inférieurs à 4 ou supérieur à 9, car dans ces conditions, les acides ou les bases peuvent pénétrer dans les cellules plus facilement, parce qu'ils ont tendance à exister sous forme non dissociée et donc les forces électrostatiques ne peuvent pas les empêcher de pénétrer dans les cellules. Ceci est confirmé par le tracé de l'évolution de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des différentes valeurs de pH où pour un pH=3 la vitesse avoisine $0 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

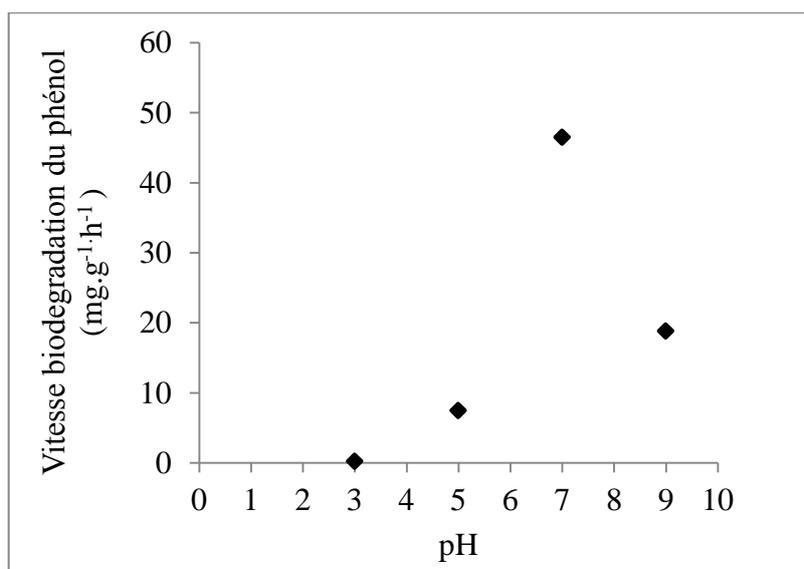


Figure III.24 : Evolution de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction de pH

De plus, le pH pourrait avoir un effet sur l'ionisation et contraindre l'interaction d'une multitude de processus moléculaires, qui à leur tour affectent la voie métabolique. Il pourrait aussi provoquer la dénaturation des protéines et même causer la toxicité létale (Shah (2014) et (Annadurai et al., 1999)).

Ying et al. (2007) qui ont étudié l'influence du pH sur la biodégradation de 500 mg.L⁻¹ de phénol par *Acinetobacter* sp. PD12 libre et immobilisée dans des particules d'alcool polyvinylique (PVA), obtiennent un optimum de dégradation pour un pH=7,2. Pour des pH inférieurs à cette valeur surtout à pH=5,5, l'activité de dégradation par les cellules libres était complètement inhibée alors que les cellules immobilisées ont maintenu un taux de dégradation acceptable. Ceci indique que les cellules immobilisées ont une plus grande capacité de tolérance des conditions acides que les cellules libres. Ces mêmes constatations ont été soutenues par Dursun and Tepe (2005) dans leurs travaux de biodégradation du phénol par *Ralstonia eutropha* immobilisée dans des billes d'alginate.

Basak et al. (2014) obtiennent un pH optimal de 6 dans leur étude sur l'élimination de 2400 mg.L⁻¹ de phénol par *Candida tropicalis* PHB5 immobilisée dans des billes d'alginate dans une gamme de pH allant de 5 à 8. Au-delà de cet optimum, les taux diminuent nettement. Ils attribuent cela au fait que le pH du milieu (acide ou basique) peut modifier les formes ioniques ou bien les structures tridimensionnelles des sites actifs des enzymes responsables de la biodégradation.

Comme le montre la figure III.25 qui représente l'évolution du temps de biodégradation du phénol en fonction des différentes valeurs de pH, nous obtenons un temps de biodégradation minimal pour un pH égal à 7 (pH optimal). Cet optimum a été confirmé par les travaux de Shah (2014), (Bared et al., 2010), (Ying et al., 2007) et (Dursun and Tepe, 2005). Le pH a donc une grande influence sur la biodégradation du phénol, il est nécessaire de le maintenir à des valeurs qui avoisinent la neutralité.

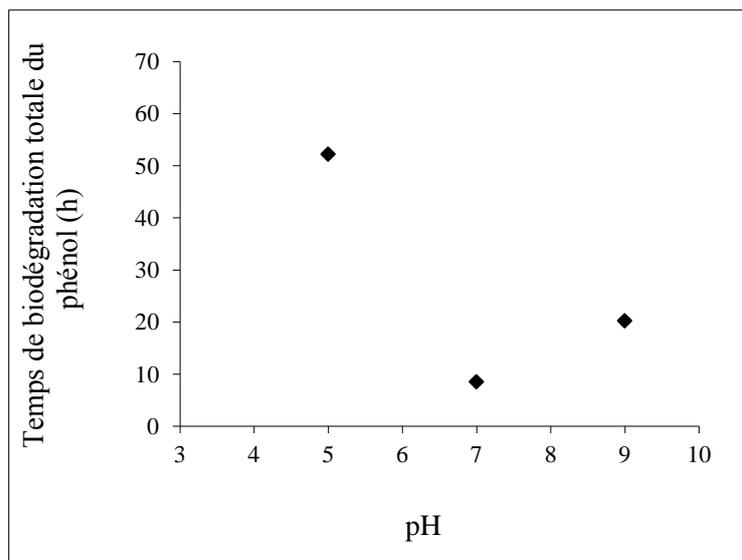


Figure III.25 : l'évolution du temps de biodégradation du phénol en fonction de pH

III.1.2.3.6. Effet de la concentration initiale du phénol sur la biodégradation :

Une fois toutes les conditions opératoires (T° , pH, diamètre des billes, taille du culot, etc ...) optimisées, nous appliquerons ces paramètres dans des cinétiques de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé pour des concentrations du phénol allant de 100 à 1500 mg.L⁻¹.

Les résultats obtenus montrent que les cellules immobilisées ont pu dégrader totalement 100 mg.L⁻¹ du phénol au bout de 8 heures, alors que les cellules libres n'ont pu dégrader la même concentration qu'après 48 heures de culture.

Pour montrer l'efficacité du procédé, plusieurs expériences ont été effectuées avec différentes concentrations initiales en phénol allant de 300 à 1200 mg.L⁻¹. Les résultats sont plus que prometteurs (figure III.26), puisque les cellules ont non seulement pu dégrader des quantités de phénol qui dépassent la concentration inhibitrice (500 mg.L⁻¹ pour les cellules libres), mais, elles ont consommé la totalité de la quantité (700, 900 et 1200 mg.L⁻¹) en un temps relativement réduit.

En effet, le temps mis pour dégrader 300, 500, 700 et 900 mg.L⁻¹ est de 30 h, 50 h, 68 h et 78.5 h respectivement. Selon Ahamad and Kunhi (2011), *Pseudomonas sp. CP4* dégrade 1000 mg.L⁻¹ de phénol en 80 h.

Pour la concentration de 1200 mg.L⁻¹, les cellules immobilisées ont mis beaucoup plus de temps (240 h) pour une dégradation totale. Ceci peut être expliqué par le fait que le matériau de support de la cellule immobilisée pourrait agir comme un abri protecteur contre la toxicité du phénol (Namane et al., 2014). En outre, il a été démontré que l'immobilisation de cellules viables pourrait altérer leurs caractéristiques physiologiques et métaboliques telles que le renforcement de l'induction enzymatique, la réduction de la croissance cellulaire spécifique et le rendement de la cellule (Chung et al., 2003; Ying et al., 2007).

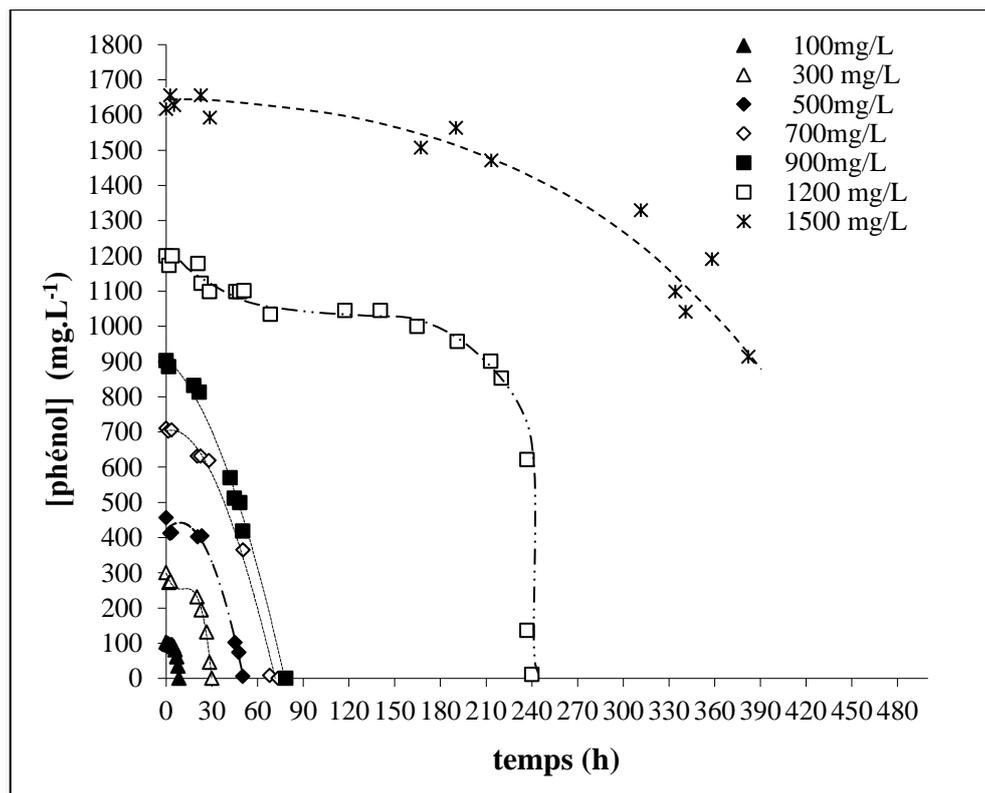


Figure III.26: cinétique de biodégradation du phénol par des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées dans des billes d'alginate de calcium pour différentes concentrations initiales du phénol ($[Biomasse]=0,26 \text{ g.L}^{-1}$, $d_p = 2 \text{ mm}$, $T=37^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7$)

Une étude récente indiqua que *Pseudomonas aeruginosa* adsorbé sur les billes de terre de diatomées (Célite R-635) et utilisées dans des bioréacteurs en colonne à lit fixe ont pu dégrader le phénol jusqu'à 1200 mg.L^{-1} dans un milieu défini inorganique (Basha et al., 2010).

La figure III.26 montre qu'en augmentant la concentration à 1500 mg.L^{-1} , les cellules immobilisées ne dégradent que 45% du polluant en 380 h.

Sheeja and Murugesan (2002) ont indiqué que *Pseudomonas pictorum* immobilisé dans des billes d'alginate a pu dégrader 2000 mg.L^{-1} de phénol, alors que les cellules libres ont été incapables de tolérer plus de 1000 mg.L^{-1} .

Mohanty (2012) a effectué plusieurs essais de biodégradation du phénol par plusieurs espèces de *Pseudomonas* immobilisées dans des billes d'alginate de calcium. Ses travaux ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2074 était capable de dégrader 500 mg.L^{-1} de phénol en 30 h et 1000 mg.L^{-1} en 70 h, alors que *Pseudomonas pictorum* a pris 40 h pour éliminer 500 mg.L^{-1} de phénol et 84 h pour dégrader le double de cette concentration.

Cependant, selon ce même auteur, le potentiel de biodégradation du phénol par *Pseudomonas sp.NBM11* isolé d'un sol contaminé par les eaux usées (contenant des rejets phénoliques) d'un hôpital était meilleur. Cette souche a pu dégrader 500 mg.L⁻¹ de phénol en 20 h et 1000 mg.L⁻¹ en 50 h. Ceci prouve que ces bactéries se sont adaptées à la présence du polluant avant même les essais de biodégradation.

Annadurai et al. (2000) ont rapporté que *Pseudomonas pictorum* immobilisé sur du charbon actif est une excellente possibilité de réduction du coût de traitement d'élimination du phénol. Ils ont rapporté que le système immobilisé est capables de dégrader jusqu'à 99 % de la concentration initiale de phénol de 600 mg.L⁻¹.

Puerto-Tello et al. (2009) ont comparé le comportement de biodégradation de *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans deux types de charbon actif différents. Ils ont indiqué que les cellules immobilisées ont été capable de dégrader 972 mg.L⁻¹ d'une concentration initiale du phénol de 1000 mg.L⁻¹ en 3 jours.

Pai et al. (1995) ont comparé la biodégradation du phénol par *Rhodococcus SPS* immobilisé dans des billes d'alginate de calcium d'une part, et sur le charbon actif en grain d'autre part. Ils ont constaté que lorsque la concentration initiale de phénol était inférieure à 1200 mg.L⁻¹, les cellules immobilisées dans des billes d'alginate ont donné de meilleurs rendements d'élimination. Alors que lorsque la concentration initiale du phénol dépassait les 1200 mg.L⁻¹, la bioadsorption sur CAG l'emportait. Ils attribuaient ceci aux phénomènes de transfert. Etant donné que la résistance des billes aux transferts du phénol est faible pour des concentrations supérieures à 1200 mg.L⁻¹, les cellules immobilisées ne seront pas protégées contre la toxicité de ce polluant.

Dans notre cas, l'allure des courbes de biodégradation change à partir de la concentration de 900 mg.L⁻¹. Une phase de latence prolongée a été observée. Ceci est dû au fait que, des concentrations élevées de phénol altèrent la structure de la bille d'alginate et rendent les cellules immobilisées plus exposées à cette toxicité. Alors que pour des concentrations inférieures ou égales à 900 mg.L⁻¹, cette phase était absente. La raison la plus probable est que ces concentrations n'affecteraient pas l'état physique de la bille. Ainsi les bactéries sont protégées contre l'effet toxique du polluant et peuvent l'utiliser plus rapidement et uniformément.

Nous avons suivi aussi l'évolution du pH au cours des cinétiques des différentes concentrations (figure III.27). Une diminution des valeurs de pH en fonction du temps prouve qu'il y a eu effectivement une biodégradation du phénol.

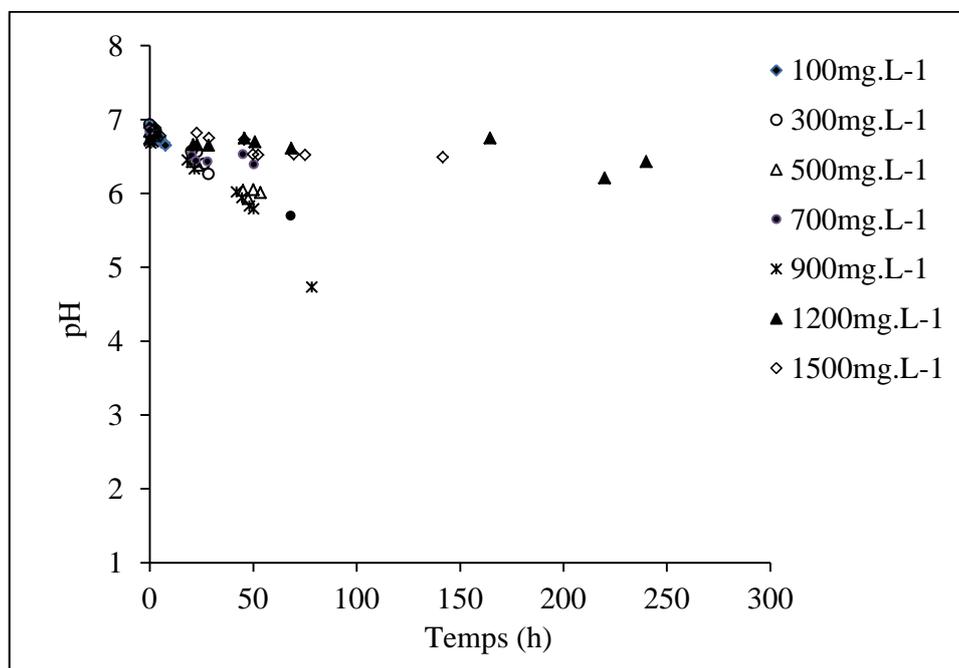


Figure III.27: Evolution du pH pour différentes concentrations initiales du phénol

([Biomasse]=0,26 g.L⁻¹, d_p = 2 mm, T=37°C, pH=7)

Cette diminution peut être attribuée à la production d'acides organiques à partir de produits intermédiaires, qui se sont formés durant la dégradation du phénol (Ucun et al., 2010). Nous avons constaté aussi que la variation de pH pour les faibles concentrations de phénol (100 et 300 mg.L⁻¹) a été plus faible que pour les plus élevées (500, 700 et 900 mg.L⁻¹).

L'observation des billes aux MEB confirme les constatations précédentes. En effet, la photo 1 révèle une surface lisse et opaque pour des billes vierges sans inclusion des bactéries. Alors que la photo 2 qui représente l'état de surface des billes contenant des bactéries non encore utilisées dans des cinétiques de biodégradation révèle une surface perforée due au déplacement des bactéries.

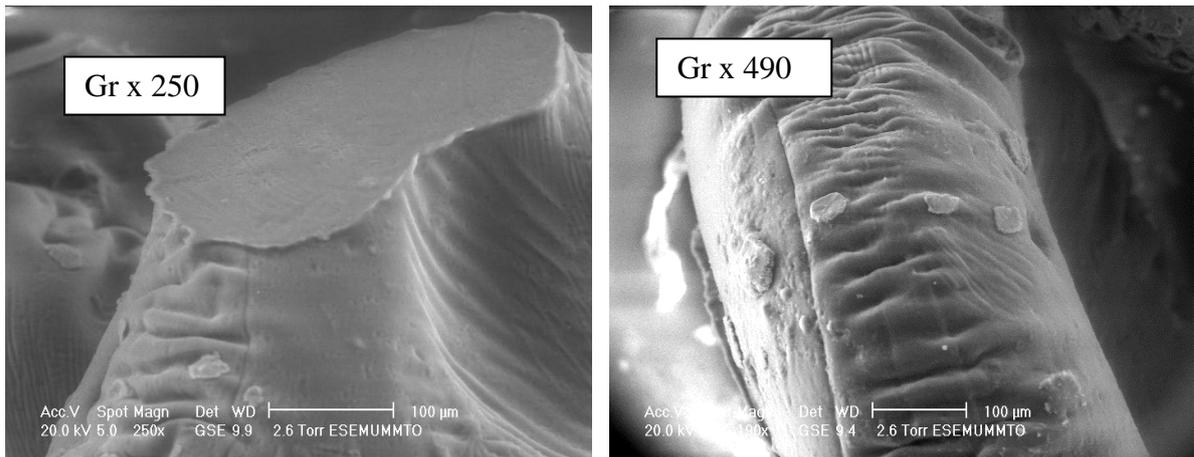


Photo 1 : Coupe d'une bille d'alginate vierge
 [Biomasse]=0 g.L⁻¹, [phénol]= 0 mg.L⁻¹

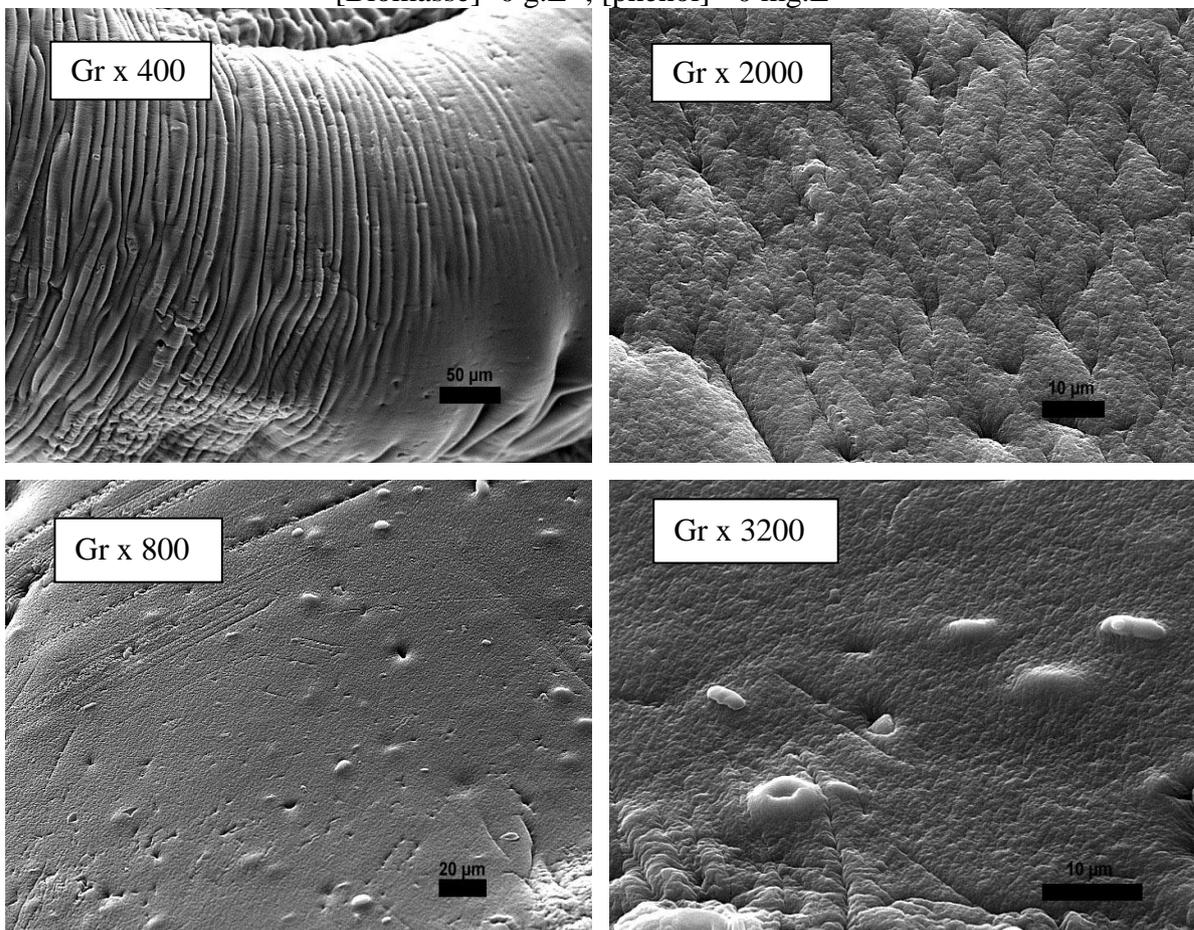


Photo 2: Bille d'alginate avant utilisation dans des cinétiques de biodégradation
 ([Biomasse]=0,154 g.L⁻¹)

La photo 3 confirme la forme sphérique des billes avec une surface présentant des ondulations et la découpe de la bille révèle la présence des bactéries à l'intérieur de cette dernière.

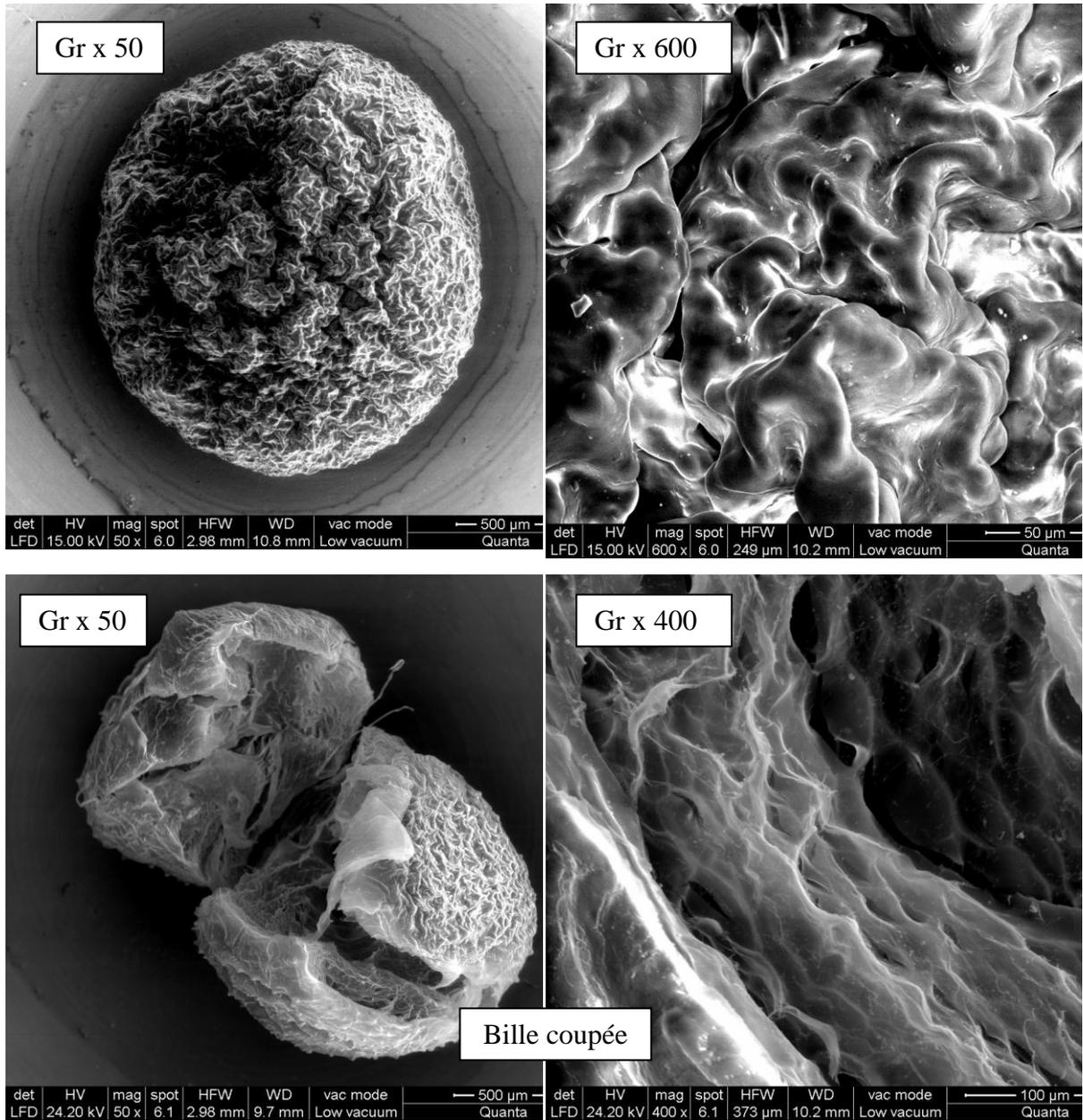


Photo 3 : Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation

([Biomasse]=0,26 g.L⁻¹, [phénol]=100 mg.L⁻¹, d_p = 2 mm)

Sur la photo 4, nous remarquons la présence des bactéries à la surface des billes qui ont été utilisées dans des cinétiques de biodégradation de phénol à différentes concentrations (300 et 700 mg.L⁻¹) bien que 700 mg.L⁻¹ soit une concentration inhibitrice dans le cas des cellules libres. Ceci montre l'effet protecteur de la bille pour les bactéries vis-à-vis des grandes concentrations du phénol.

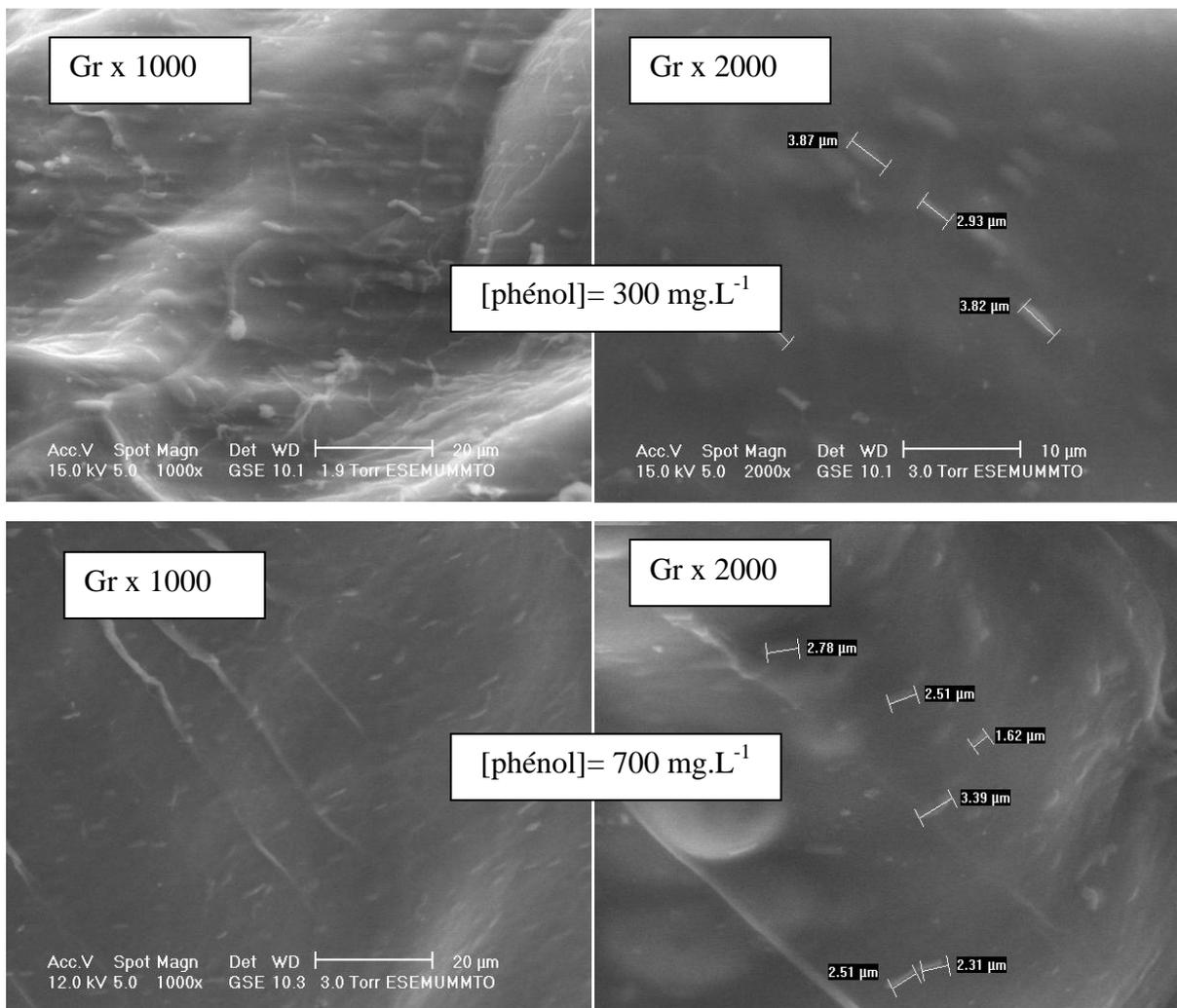


Photo 4 : Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation ([Biomasse]=0,26 g.L⁻¹, [phénol]=(300 et 700 mg.L⁻¹), d_p = 2 mm)

Enfin la photo 5 montre une bille avec une surface relativement détériorée qui est due à son exposition pour une longue durée (10 jours) à des concentrations élevées en phénol (1200 mg.L^{-1}).

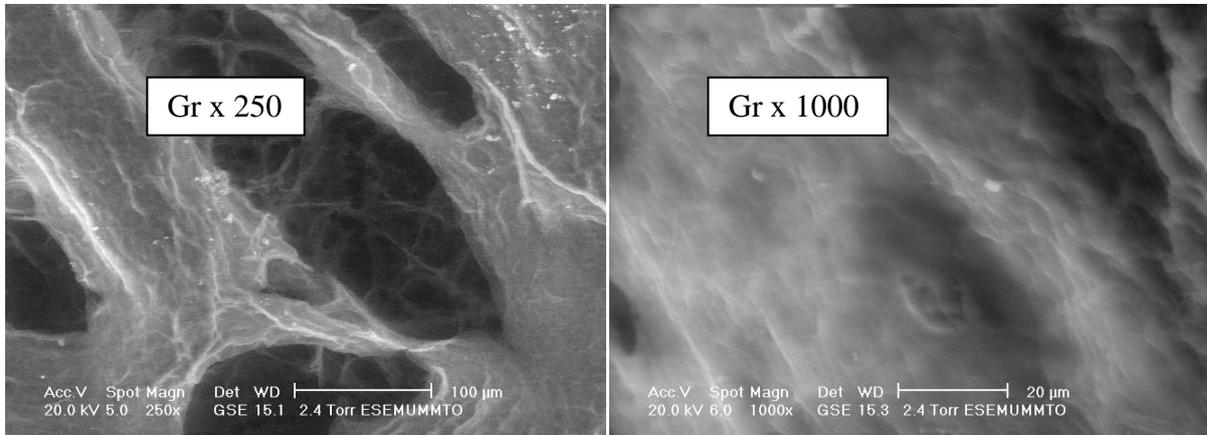


Photo 5: Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation
 ([Biomasse]= $0,26 \text{ g.L}^{-1}$, [phénol]= 1200 mg.L^{-1})

III.1.2.4. Détermination des paramètres de diffusion dans les cellules immobilisées:

III.1.2.4.1. Facteur d'efficacité et Module de Thiele :

Nous avons déterminé le facteur d'efficacité à partir de l'équation (7) et ce en utilisant les vitesses de biodégradation obtenues pour les cellules immobilisées $v = 46,47 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (limitation de diffusion) et pour les cellules libres $v_s = 73,42 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (sans limitation de diffusion) qui sont représentées sur la figure III.28 représentant l'effet de la concentration initiale sur la vitesse de biodégradation du phénol par les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* libres et immobilisées.

En négligeant la résistance externe au transfert de masse, nous pouvons supposer que la concentration en phénol dans le milieu est égale à la concentration à la surface de la bille d'alginate. Pour la concentration de 100 mg.L^{-1} , nous obtenons $\eta = 0,6$

Nous avons calculé aussi le module de Thiele à partir des facteurs d'efficacité expérimentaux et ce afin d'évaluer la résistance au transfert de masse intraparticulaire. Par la méthode essai-erreur et ayant la valeur de $\eta = 0,6$, nous pouvons estimer la valeur de ϕ à partir de l'équation (10). La valeur ainsi obtenue est $\phi = 3,629$.

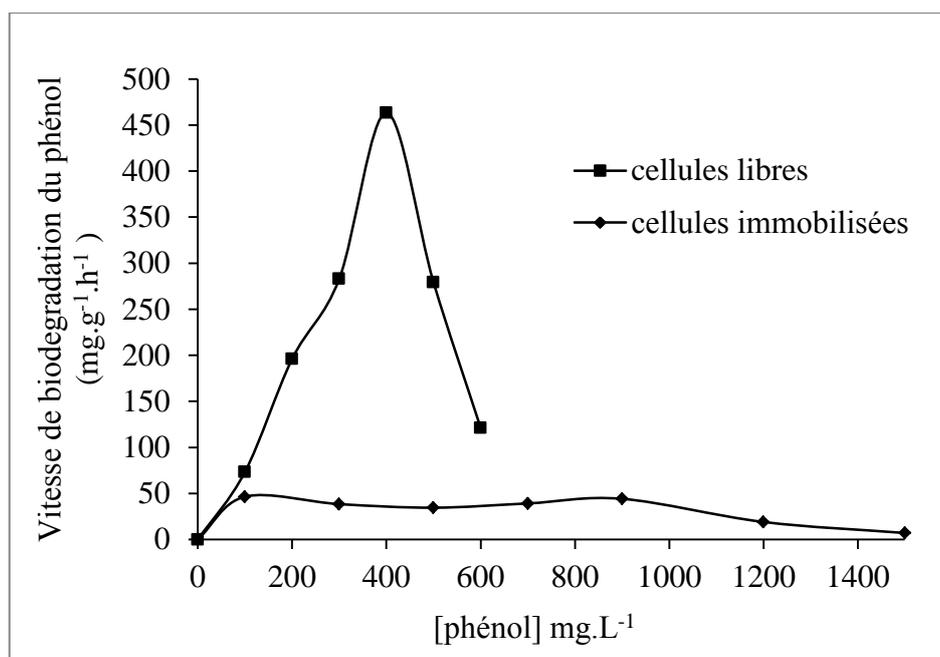


Figure III.28: Effet de la concentration initiale sur la vitesse de biodégradation du phénol par les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* libres et immobilisées.

Les résultats obtenus nous permettent de constater que la valeur du facteur d'efficacité ($\eta=0,6$) n'est pas loin de 1, donc la biodégradation est affectée par la diffusion du phénol dans la bille d'alginate à une certaine limite. De plus la valeur du module de Thiele obtenue ($\phi=3,629$) est proche de 5 indiquant l'effet combiné entre la diffusion intraparticulaire et la réaction de biodégradation. Ces mêmes constatations ont été rapportées par Chung et al. (2003)

III.1.2.4.2. Coefficient de diffusion :

Une fois le module de Thiele déterminé, nous avons calculé la valeur du coefficient de diffusion (D_{eff}) du phénol à partir de l'équation (5). $D_{\text{eff}} = 0,10 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. En comparant cette valeur au coefficient de diffusion du phénol dans l'eau ($6,46 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à 37°C) déterminé par la relation de Wilk et Chang (Wilke and Chang, 1955), nous constatons que le coefficient de diffusion de phénol dans les billes d'alginate est nettement plus petit que son coefficient de diffusion dans l'eau. Ce qui implique que la bille d'alginate présente une certaine résistance à la diffusion. Le processus de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans les billes d'alginate est donc limité par la diffusion.

Par conséquent, la diffusion du phénol dans la particule est relativement lente, ce qui indique que sa biodégradation a lieu à la surface extérieure de la bille près de la périphérie avant même qu'il ne diffuse plus profondément dans la particule car la majeure partie de la biomasse est localisés à cet endroit.

Selon Arnaud and Lacroix (1991) une région de haute densité bactérienne est formée à la périphérie des billes où les conditions de croissance sont plus favorables.

Cachon and Divies (1993) ont constaté que lors de la dissolution progressive des couches périphériques des billes d'alginate dans un tampon citrate, 95% de la biomasse se situait dans une couche de 125 μm d'épaisseur à la périphérie des billes dont la concentration (350 g.L^{-1}) était 20 à 30 fois plus élevée qu'au centre des billes.

D'autres recherches ont démontré la formation progressive d'une couche cellulaire dense à la périphérie des billes durant des fermentations continues ou non avec des bactéries lactiques immobilisées dans des billes d'alginate. L'épaisseur de cette couche lors de l'immobilisation de *Lactobacillus casei*, estimée en microscopie optique, fut proche de 0,4 mm, ce qui représentait approximativement 84% du volume total des billes de 1,75 mm de diamètre (Arnaud and Lacroix, 1991).

Le tableau III.2 résume les résultats des différentes études relatives au phénomène de transfert de matière dans des billes d'alginate. Il ressort que nous obtenons des résultats comparables à ceux obtenus par ces recherches.

Tableau III.2: Valeurs des différents paramètres de diffusion

Matrice	d_p (mm)	ν (mg.g ⁻¹ .L ⁻¹)	η	K' (dm ³ .dm ⁻³ .s ⁻¹)	ϕ	D_e (cm ² .s ⁻¹)	Conditions opératoires	Références
Alginate	Cellules libres 2	73,42 47,46	1 0,6	3,35 10 ⁻⁵	3,629	0,10 10 ⁻⁶	m=0,260 g [phénol]=100mg.L ⁻¹ T°(C)=37 pH=7	Notre étude
Alginate	Cellules libres 2	216 24,4	1 0,113	0,014	8,85	0,19 10 ⁻⁶	m=0,121 g [phénol]=100mg.L ⁻¹ T°(C)=30 pH=7	(Dursun and Tepe, 2005)
Alginate	Cellules libres 2,4 3,6 5,2	41,9 13,7 9,1 7,4	1 0,290 0,217 0,166	0,035 0,026 0,022	9 12 17	6,31 10 ⁻⁶ 5,8510 ⁻⁶ 5,2010 ⁻⁶	m=0,68 g [phénol]=100mg.L ⁻¹ T°(C)=30 pH=6.5	(Aksu and Bülbül, 1999)
Alginate	Cellules libres 3 4	60,7 40,3 32,5	1 0,67 0,54	0,040 0,031	3,1 4,3	9,67 10 ⁻⁶ 6,6810 ⁻⁶	m=0,154 g [phénol]=100mg.L ⁻¹ T°(C)=30 pH=6,8	(Chung et al., 2003)
Alginate	Cellules libres 2 3 4	4,517 10 ⁺³ 1,31 10 ⁺³ 1,385 10 ⁺³ 0,949 10 ⁺³	1 0,29 0,21 0,18	0,052 0,045 0,034	9,20 13,08 15,53	6,14 10 ⁻⁶ 5,92 10 ⁻⁶ 5,64 10 ⁻⁶	m=2.99 10 ⁷ UFC g ⁻¹ [phénol]=100mg.L ⁻¹ T°(C)=30 pH=6	(Basak et al., 2014)

III.1.2.5. La modélisation par le plan factoriel complet de la biodégradation du phénol :

L'objectif de cette partie d'étude est de rechercher les conditions optimales de la biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans des billes d'alginate et étudier l'influence des facteurs et leurs éventuelles interactions sur la réponse.

Pour cela, nous avons opté pour le plan factoriel complet exploitant une matrice factorielle à 2^3 expériences.

Nous avons considéré que la réponse Y mesurée est le temps d'élimination totale du phénol (heure) et X_1 , X_2 et X_3 sont les trois facteurs continus et contrôlés :

- X_1 : concentration initiale du phénol (mg.L^{-1}).
- X_2 : Diamètre des billes (mm)
- X_3 : inoculum (g.L^{-1})

Les trois facteurs de notre étude sont des facteurs quantitatifs, nous attribuons à chacun d'eux deux niveaux dont les valeurs sont citées dans le tableau 3.

On peut écrire l'équation suivante :

$$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \sum a_{ijk} X_i X_j X_k \quad (24)$$

Y : est la réponse, elle est mesurée au cours de l'expérimentation

X_i : valeur centrée réduite du paramètre étudié,

a_0 : moyenne des réponses au centre,

a_i : coefficient donnant l'effet du facteur x_i sur la réponse

a_{ij} : coefficient donnant l'effet de l'interaction entre les paramètres x_i et x_j sur la réponse,

a_{ijk} : coefficient donnant l'effet de l'interaction entre les trois paramètres

III.1.2.5.1. Définition des niveaux des facteurs :

En se basant sur les résultats obtenus par des essais préliminaires, les niveaux hauts (+1) et bas (-1) sont attribués à chaque facteur.

Tableau III.3 : Facteurs et domaine d'étude

Les facteurs étudiés	Niveaux de variation des facteurs		
	Niveau bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
X_1 : C_0 du phénol (mg.L^{-1})	100	500	900
X_2 : Diamètre des billes (mm)	2	3	4
X_3 : Inoculum (g.L^{-1})	0,13	0,26	0,39

III.1.2.5.2. Expérimentation :

Le domaine expérimental défini pour les trois facteurs retenus pour cette étude (tableau III.3), permet d'établir la matrice d'expérience factorielle complète de trois facteurs à deux niveaux chacun, notée 2^3 , formée des 8 combinaisons décrites dans le tableau III.4.

Les essais sont menés conformément au plan d'expérience et les résultats sont consignés dans la matrice d'expériences. La réponse expérimentale mesurée est le temps d'élimination totale du phénol.

Tableau III.4 : Plan d'expériences et résultats expérimentaux et prévus

Essai	X ₁	X ₂	X ₃	Y _{exp} (heure)	Y _{prévu} (heure)
+++	1	1	1	102	102,9625
---	-1	1	1	30,5	31,4625
+-+ (*)	1	-1	-1	58	58,9625
---	-1	-1	-1	9	9,9625
000	0	0	0	68	56,15
000	0	0	0	52	56,15
++- (*)	1	1	-1	62	62,9625
--+	-1	-1	1	6	6,9625
+-+	1	-1	1	167	167,9625
-+-	-1	1	-1	7	7,9625

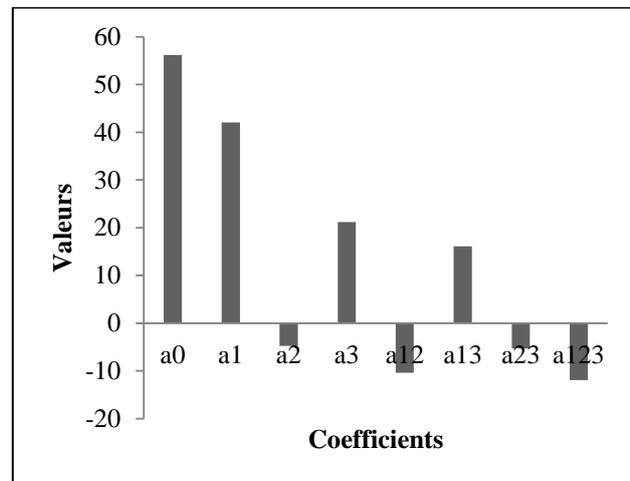
(*) Échantillon observé par MEB

III.1.2.5.3. Calcul des effets et des interactions

A partir des résultats expérimentaux obtenus (tableau III.4), nous calculons la valeur des coefficients de chaque facteur en utilisant le modèle mathématique (équation 24) ces valeurs figurent sur le tableau III.5.

Tableau III.5 : Effets et interactions des facteurs

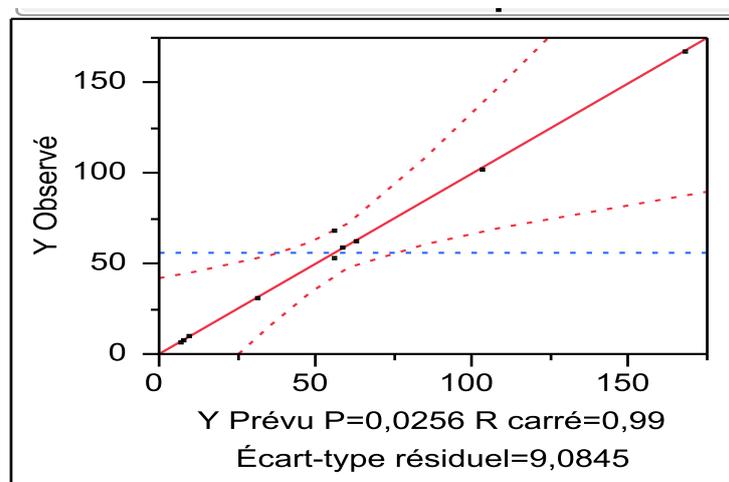
Effets interactions des coefficients	Valeurs
(a ₀)	56,15
(a ₁)	42,0625
(a ₂)	-4,8125
(a ₃)	21,1875
(a ₁₂)	-10,4375
(a ₁₃)	16,0625
(a ₂₃)	-5,315
(a ₁₂₃)	-11,937

**Figure III.29** : Analyse graphique des effets principaux et interactifs**III.1.2.5.4. Analyse statistique**

L'analyse statistique permet d'évaluer l'influence des différents facteurs ainsi que leurs interactions et de vérifier la validité du modèle mathématique.

a. Coefficient de détermination R^2 :

Le coefficient de détermination ($R^2 = 0,99263$) a indiqué que 99.26% de la variable totale a été exprimée par le modèle. De plus le modèle présente un coefficient de détermination ajusté ($R^2_{aj} = 0.9668$) proche de 1. Ces deux paramètres indiquent la bonne qualité d'ajustement du modèle.

**Figure III.30** : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues

Les coefficients de modèle calculés sont affichés dans le tableau III.6, la valeur de chaque coefficient est accompagnée par le rapport **t** et **p-valeurs**. Le logiciel *jmp 8.0* utilise le test de **t-student** et la probabilité (**p- valeur**) ($P < 0,05$) pour déterminer l'importance de chaque terme dans les équations du modèle. Il suffit de comparer la **p- valeur** au seuil α tel que $\alpha=0,05$.

Tableau III.6 : Estimations des coefficients

Terme	Estimate	Rapport t	Prob> t
X ₁	42,0625	13,10	0,0058*
X ₃	21,1875	6,60	0,0222*
X ₁ *X ₃	16,0625	5,00	0,0377*
X ₂ *X ₃ *X ₁	-11,9375	-3,72	0,0654
X ₁ *X ₂	-10,4375	-3,25	0,0831
X ₂ *X ₃	-5,3125	-1,65	0,2399
X ₂	-4,8125	-1,50	0,2728

(*) Valeurs répondant à des tests significatifs

b. Test de Student :

Les résultats indiqués dans le tableau III.7 révèle que la probabilité **p-valeur** pour que les facteurs soient négligeables est très faible pour les deux coefficients (a_1 , a_3) ainsi que leur interaction (a_{13}). Tandis que la probabilité **p-valeur** pour les autres coefficients est supérieure à 0,05, ce qui nous permet de retenir les trois coefficients a_1 , a_3 , a_{13} .

Tableau III.7 : Analyse de la variance

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	7	22231,969	3176,00	38,4838
Résidus	2	165,056	82,53	Prob> F
C. Total	9	22397,025		0,0256

c. Analyse de la variance (test de Fisher):

Le tableau III.7 résume l'analyse de la variance (test de Fisher) pour la réponse **Y**. En effet, la faible valeur de probabilité (<0,025) indique que le modèle est significatif. La réponse peut être exprimée en utilisant l'équation suivante:

$$Y = 56,15 + 42,0625X_1 - 4,81 X_2 + 21,1875X_3 + 16,0625 X_1X_3 - 5,31 X_2X_3 - 11,93 X_1X_2X_3 \quad (25)$$

Cette fonction décrit la façon dont les variables expérimentales et leurs interactions influencent le temps d'élimination du phénol.

III.1.2.5.5. Les effets simples et les interactions des facteurs:

En examinant le diagramme des effets, nous remarquons que le facteur le plus influençant sur la réponse est la concentration initiale du phénol X_1 , suivie par la taille d'inoculum X_3 .

L'importance de la pente de chaque paramètre donne une information sur l'effet de ce paramètre. La concentration initiale du phénol X_1 et la taille d'inoculum X_3 ont un effet positif significatif sur la réponse car leur passage de niveau bas au niveau haut augmente le temps de biodégradation du phénol mais pas autant que la concentration. En outre, l'effet simple négatif de diamètre des billes X_2 (-4.1825) n'est pas significatif.

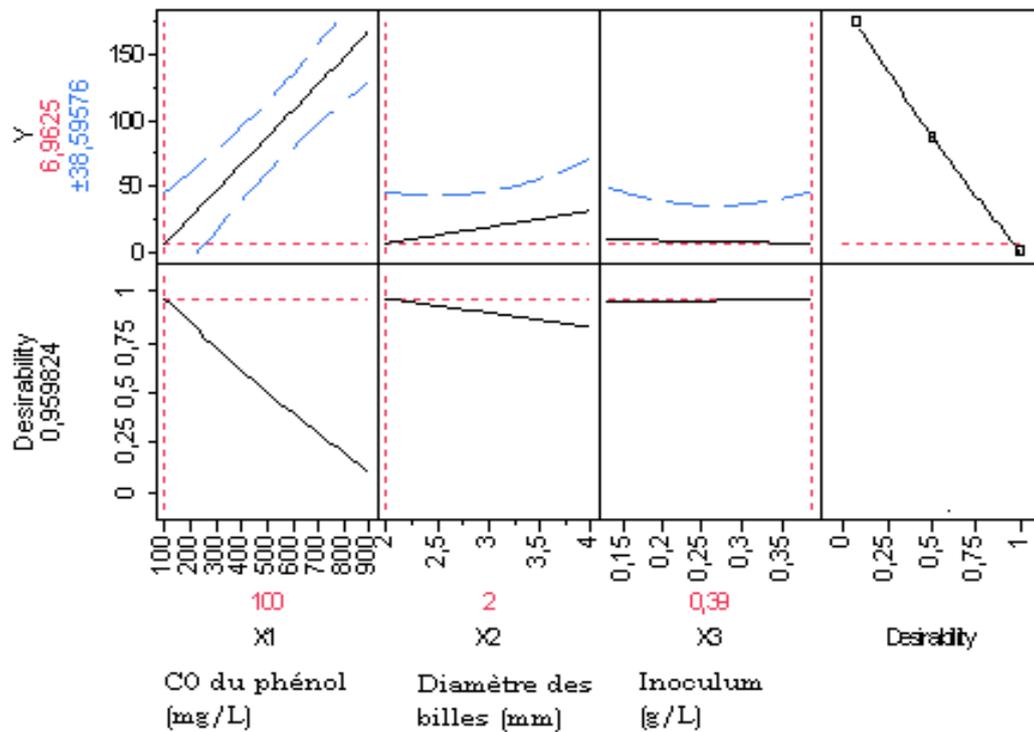


Figure III.31 : Diagramme des effets simples

Les effets d'interactions sont présentés dans la figure III.32, le diagramme confirme l'analyse statistique quant aux interactions qui sont négligeables (X_2X_3 , X_1X_2 , $X_2X_3X_1$), car les droites des interactions sont presque parallèles.

L'interaction entre la concentration initiale du phénol et l'inoculum est positive de (16,0625). Cela signifie, que l'effet de la concentration est plus élevé quand la taille d'inoculum est élevée.

Le temps de dégradation du phénol est d'autant plus grand quand la concentration du phénol et la taille des particules sont grandes. L'effet simple de diamètre des billes n'est pas significatif. Cependant, pour avoir une interprétation complète, il faut tenir compte des interactions qui ne sont pas négligeables.

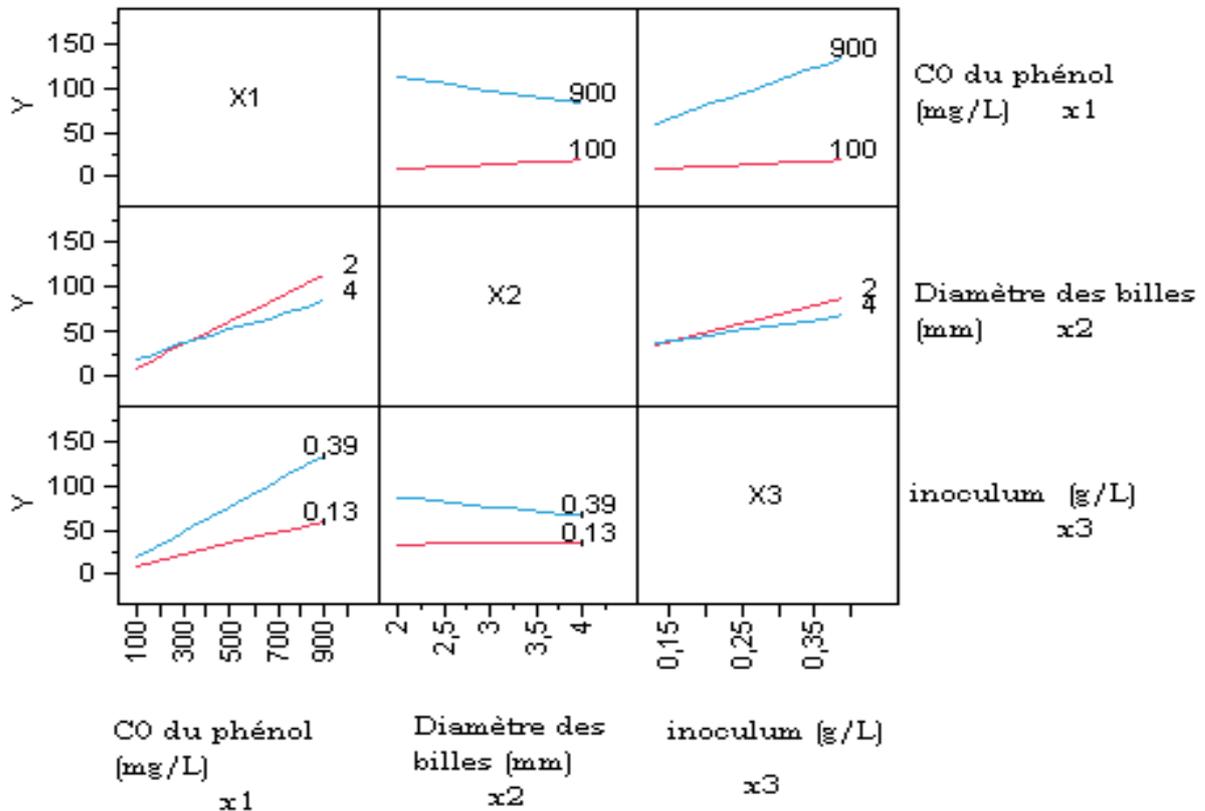


Figure III.32 : Diagramme des interactions

III.1.2.5.6. Optimisation:

Comme le montre le diagramme des effets simples (figure III.31), la fonction désirabilité diminue linéairement avec la réponse Y . La désirabilité maximale qui correspond à l'optimum étant d'environ 0,9598 était obtenue au niveau bas des deux facteurs, la concentration initiale de phénol (100 mg.L^{-1}) et le diamètre des billes (2 mm) et le niveau haut de la taille d'inoculum ($0,39 \text{ g.L}^{-1}$).

III.1.2.5.7. Etat de surface des billes :

Une observation au microscope électronique à balayage MEB a été effectuée pour des échantillons de billes ayant été utilisées dans des cinétiques de biodégradation pour cette partie du plan d'expérience. Le résultat présenté sur les photos suivantes montre que le nombre de bactéries immobilisées dans les billes de différents diamètres augmente après leur utilisation dans les cinétiques de biodégradation. Ceci prouve que les bactéries utilisent le phénol pour leur croissance et qu'elles sont localisées à la surface extérieure de la bille près de la périphérie (photo 7) ce qui confirme les constatations de la section détermination du coefficient de diffusion. Cette même observation a été rapportée par de nombreux auteurs (Bettmann and Rehm, 1984; Gòdia et al., 1987; Godia et al., 1985; Nagashima et al., 1984; Vives et al., 1993) qui constatent une colonisation différentielle des billes d'alginate avec une croissance plus marquée dans les couches externes qu'au centre des billes.

De plus la présence de ces bactéries montre que la concentration utilisée dans ces essais (900 mg.L^{-1}) n'inhibe pas les cellules immobilisées (photo 7, 9 et 10).

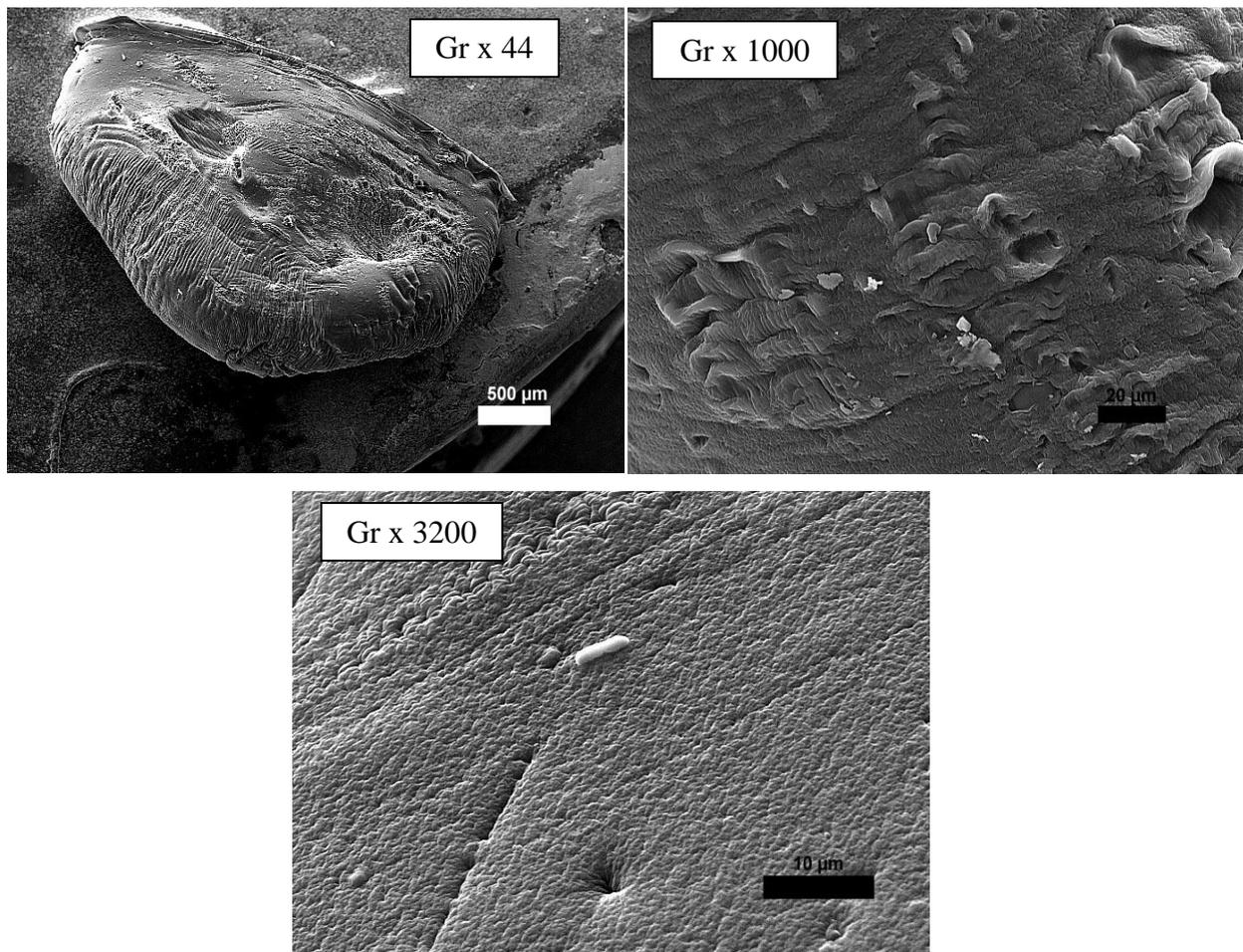


Photo 6 : Bille d'alginate avant utilisation dans des cinétiques de biodégradation

($[\text{Biomasse}] = 0,13 \text{ g.L}^{-1}$, $d_p = 4 \text{ mm}$)

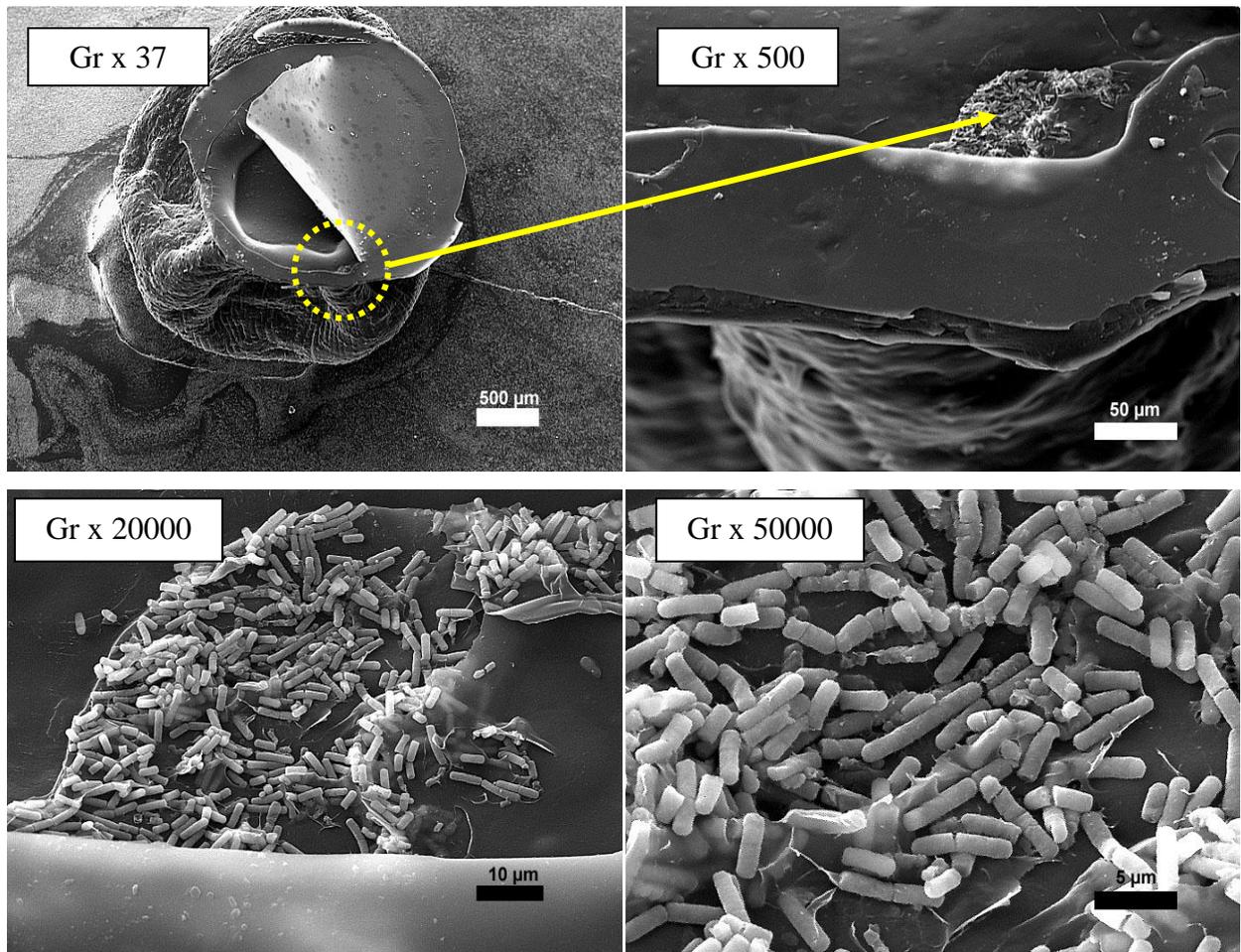


Photo 7 : Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation
([Biomasse]=0,13 g.L⁻¹, [phénol]=900 mg.L⁻¹, d_p = 4 mm)

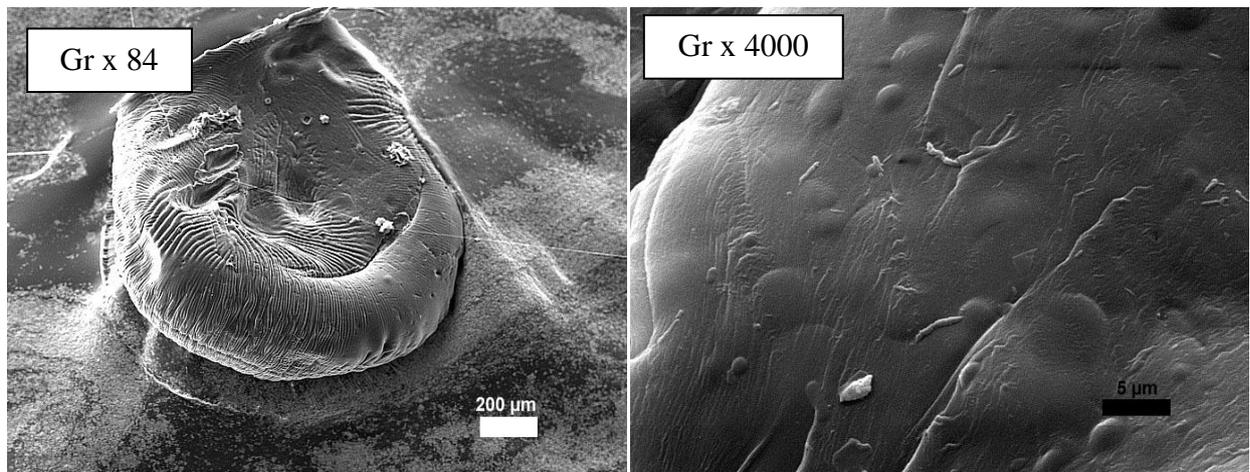


Photo 8 : Bille d'alginate avant utilisation dans des cinétiques de biodégradation
([Biomasse]=0,13 g.L⁻¹, d_p = 2 mm)

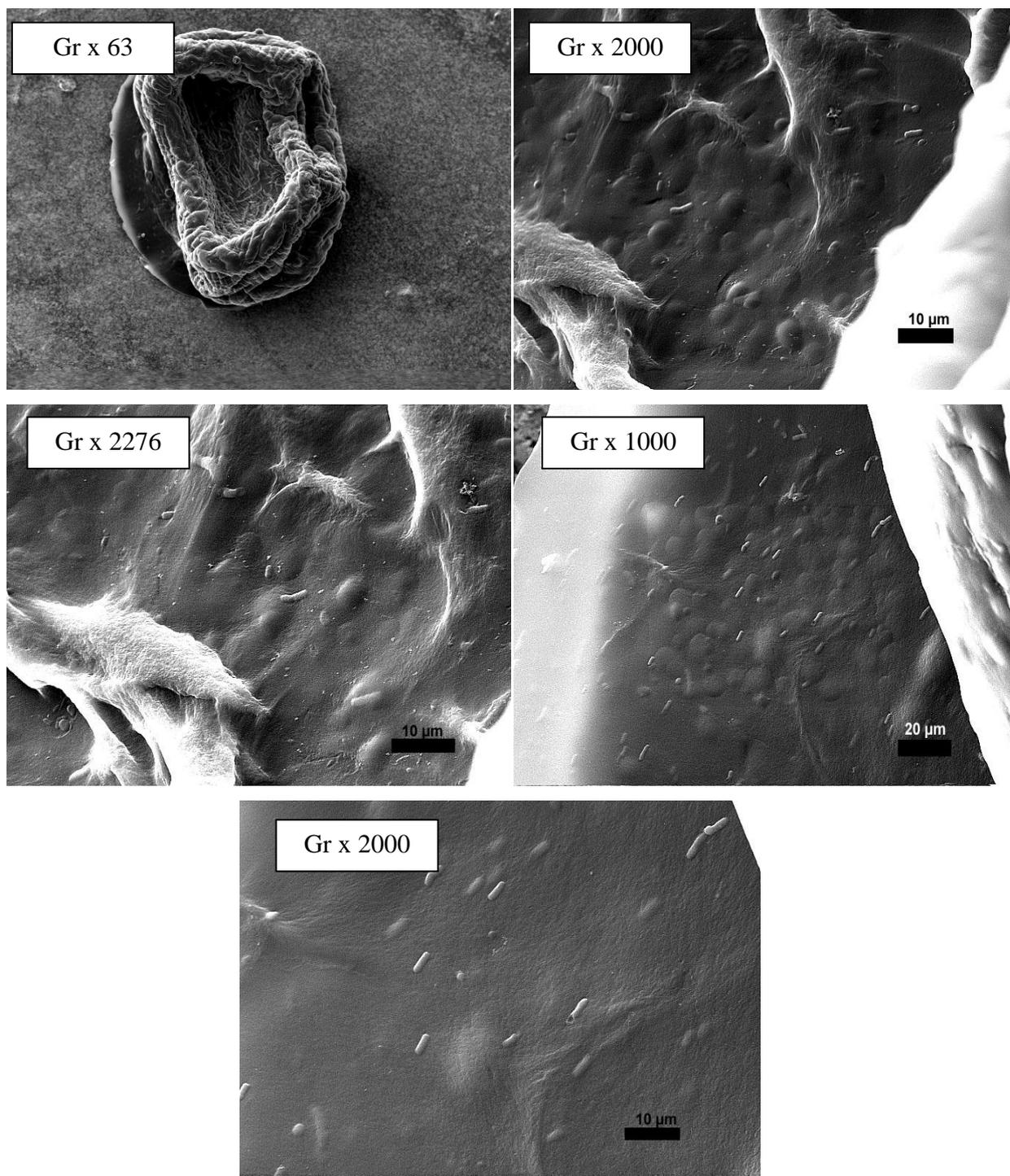


Photo 9 : Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation
([Biomasse]=0,13 g.L⁻¹, [phénol]=900 mg.L⁻¹, d_p = 2 mm)

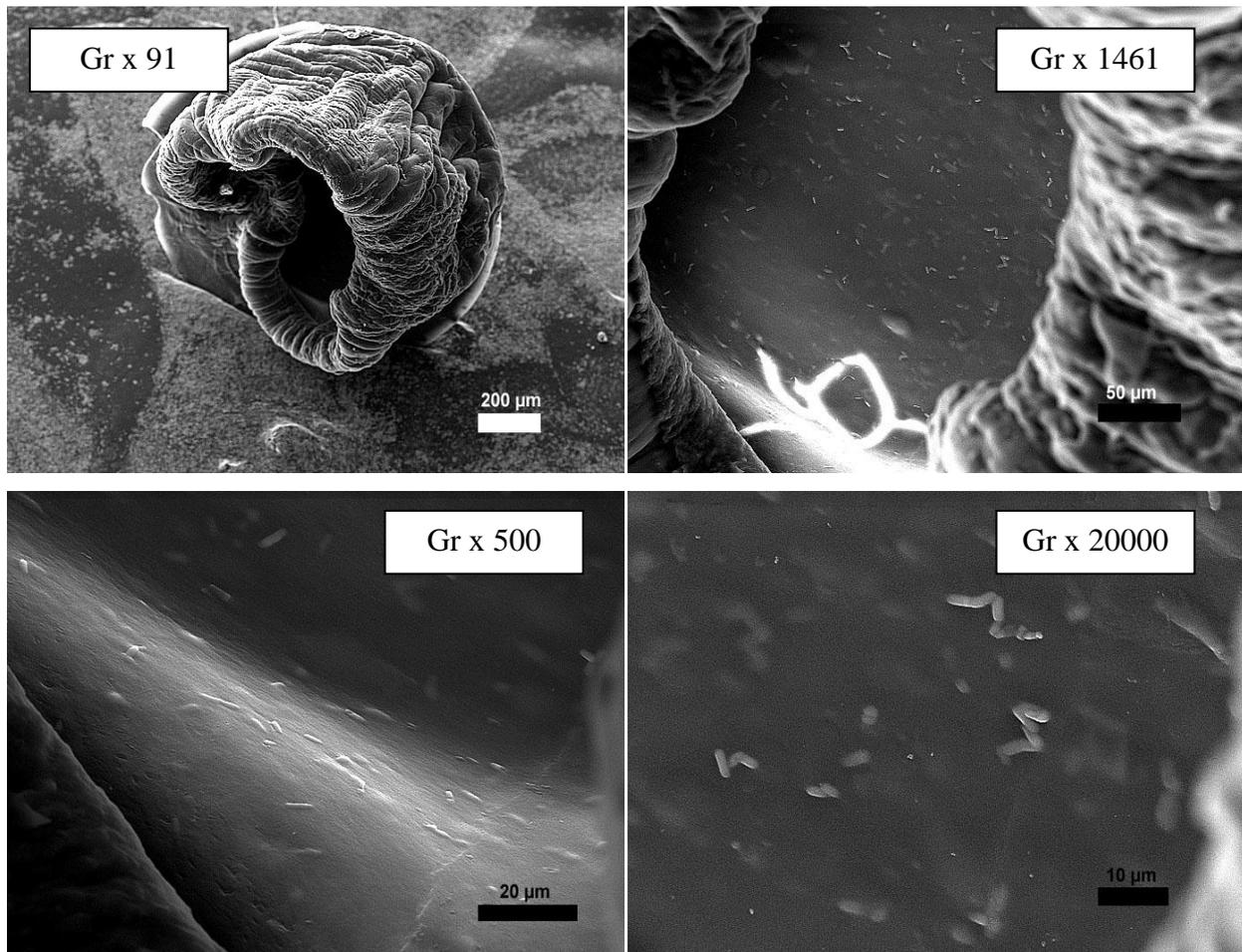


Photo 10 : Bille d'alginate (coupée et séchée) après utilisation dans des cinétiques de biodégradation ($[Biomasse]=0,13 \text{ g.L}^{-1}$, $[phénol]=900 \text{ mg.L}^{-1}$, $d_p = 2 \text{ mm}$)

III.1.2.6. Etude du phénomène du relargage cellulaire :

Lors des cinétiques de biodégradation par des cellules immobilisées, le phénomène de relargage cellulaire apparaît. Ce dernier dépend de plusieurs facteurs (pH, T° , composition du milieu,...etc). Afin d'évaluer l'effet de ces facteurs, une série d'expériences a été effectuée en utilisant des bactéries immobilisées dans des billes de diamètre de 2mm pour dégrader 100 et 900 mg.L^{-1} de phénol avec des pH 3 et 9 et des températures de 25 et 45°C.

Pour chaque expérience effectuée, nous avons noté la DO_{600} (la dissolution des billes et le relargage des bactéries) et dénombré les bactéries présentes dans le milieu réactionnel après 48h de manipulation.

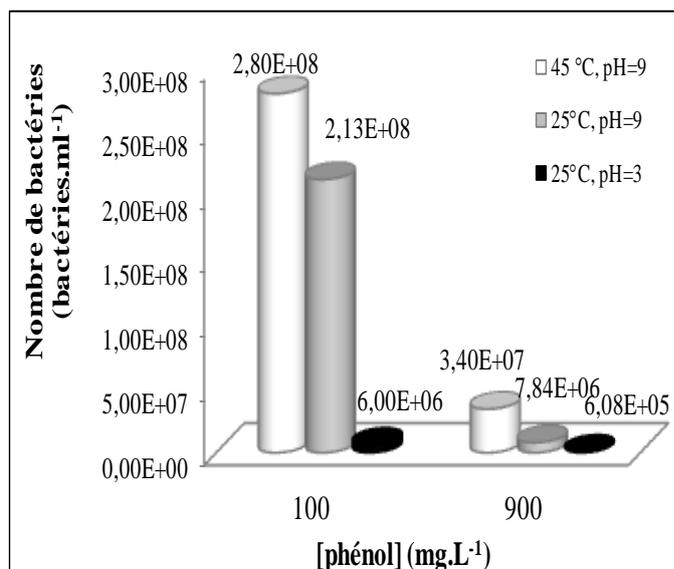


Figure III.33: Evolution du nombre de bactéries relarguées dans le milieu réactionnel en fonction de la concentration initiale du phénol.

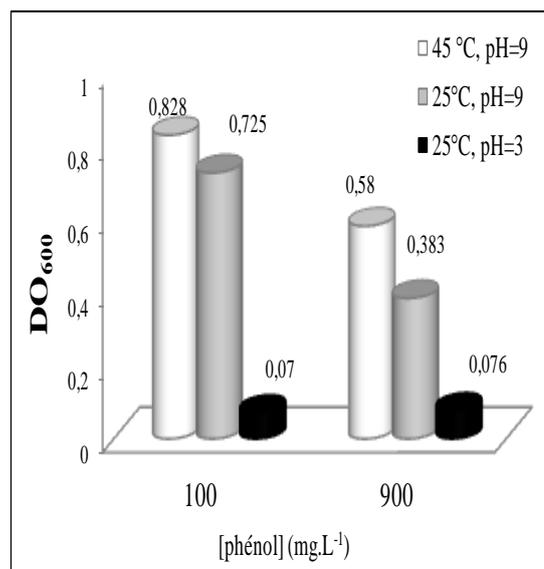


Figure III.34 : Evolution de la DO₆₀₀ en fonction de la concentration initiale du phénol

D'après les histogrammes présentés sur la figure III.33, nous constatons qu'il y a eu effectivement un relargage des bactéries dans le milieu réactionnel et ce pour tous les essais effectués.

Cependant, le nombre de bactéries relarguées dans un milieu où la concentration est de 100mg.L⁻¹ est toujours supérieur à celui où la concentration est de 900mg.L⁻¹ et ce quelque soit les conditions opératoires citées ci dessus. Ces mêmes observations, ont été constatées pour la DO₆₀₀ (figure III.34) mais dans ce cas, l'écart entre les concentrations 100 et 900 mg.L⁻¹ (pour tous les essais) n'est pas aussi important que celui observé dans la figure III.33 (nombre de bactéries).

Ceci a été confirmé par la détermination des rapports X₁ et X₂ :

$$X_1 = \frac{\text{nombre de bactéries relarguées pour } 100 \text{ mg. L}^{-1}}{\text{nombre de bactéries relarguées pour } 900 \text{ mg. L}^{-1}} \quad (26)$$

$$X_2 = \frac{\text{DO}_{600} \text{ pour } 100 \text{ mg. L}^{-1}}{\text{DO}_{600} \text{ pour } 900 \text{ mg. L}^{-1}} \quad (27)$$

Dans le cas par exemple de l'essai pH=9 et T = 45°C, X₁ = 8,24 et X₂ = 1,42, cette différence est due à la dissolution des billes car la DO₆₀₀ représente le trouble résultant du relargage cellulaire et de la dissolution des billes d'alginat.

Selon la figure III.33, nous constatons aussi que pour la concentration de 100 mg.L⁻¹ de phénol, le nombre de bactéries relarguées dans un milieu basique (pH=9) est 35 fois et demie plus grand que celui trouvé dans un milieu acide (pH=3). De même que pour la concentration 900 mg.L⁻¹, où le nombre est 13 fois plus important. Donc un milieu acide (pH=3) limite le relargage des bactéries.

Pour voir l'effet de la température sur le relargage cellulaire, nous avons comparé les valeurs de X_1 à différentes températures. Pour 45°C, ce rapport est égal à 8,24, alors que pour une température de 25°C, il est trois fois plus grand ($X_1=27$). En effet, la température de 25°C favorise le relargage des bactéries, alors qu'à 45°C, la détérioration de la matrice d'immobilisation (bille d'alginate) provoque la dispersion des bactéries qui seront inhibées par cette température élevée.

III.1.2.7. Stabilité des billes d'alginate :

La stabilité à long terme durant l'utilisation des billes est importante pour des applications pratiques des systèmes à cellules immobilisées. Cette stabilité dépend non seulement du nombre de cycle de la réutilisation du biocatalyseur, mais aussi de la nature des sels présents dans le milieu réactionnel. C'est pour cette raison, que nous avons décidé d'étudier le phénomène du recyclage des billes d'alginate et l'influence de la présence des sels chélatants sur la biodégradation du phénol.

III.1.2.7.1 Recyclage des billes:

Afin d'évaluer la réutilisation des billes et de déterminer si les cellules sont désactivées après une utilisation répétée, des expériences successives de cycles de biodégradation ont été effectuées en utilisant les mêmes billes :

- Pour une même concentration du phénol ;
- En augmentant les concentrations du phénol.

III.1.2.7.1.1. Recyclage des billes pour les mêmes concentrations de phénol :

Des expériences de biodégradation ont été effectuées avec des billes de diamètre 3 mm, une biomasse initiale de $0,087 \text{ g.L}^{-1}$ et une concentration initiale en phénol égale à 100 mg.L^{-1} . A la fin de chaque cinétique, les billes sont récupérées, lavées et réutilisées dans une autre cinétique pour dégrader la même concentration du phénol (100 mg.L^{-1}). Pour chaque cinétique nous avons suivi l'évolution de la concentration du phénol.

Les résultats reportés sur la figure III.35 nous ont permis d'observer qu'à des concentrations initiales de 100 mg.L^{-1} , nous avons pu réutiliser les billes six fois (6 cycles) et que cette réutilisation n'a pas affecté de manière significative la cinétique de biodégradation, l'efficacité était de 99 % après un temps compris entre 20 et 27 h de manipulation.

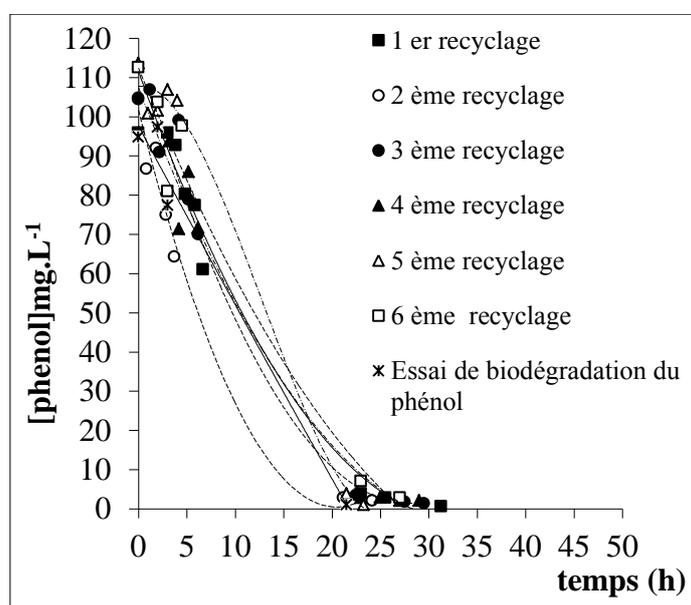


Figure III.35 : Recyclage des billes d'alginate ($d_p=3 \text{ mm}$, $m=0,087 \text{ g.L}^{-1}$, 100 mg.L^{-1} phénol)

Toutes ces constatations ont été confirmées par la détermination des rendements d'élimination du phénol ainsi que la vitesse de biodégradation pour chaque cycle. Les résultats qui sont représentés sur la figure suivante montrent que les rendements avoisinent les 100% avec une légère augmentation de la vitesse de $35,03$ à $46,74 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ due à l'adaptation des bactéries.

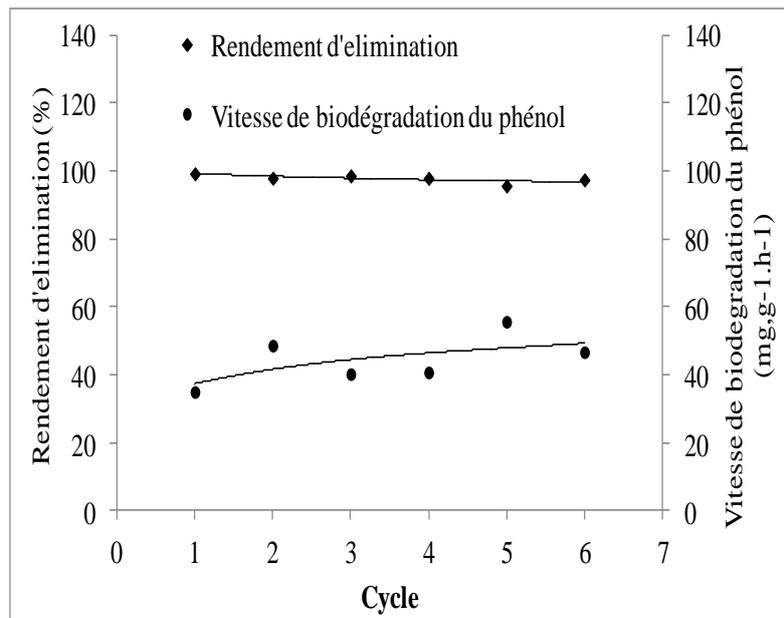


Figure III.36 : Evolution du rendement d'élimination et de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des cycles de biodégradation.

De la même manière, nous avons procédé aux mêmes expériences de biodégradation avec des billes de diamètre 2 mm, une biomasse initiale de $0,26 \text{ g.L}^{-1}$ mais avec une concentration initiale du phénol égale à 500 mg.L^{-1} . Nous constatons toujours que les billes ont pu être réutilisées neuf fois avec une efficacité de 99 % pour des cinétiques qui durent 17 à 27 h (figure III.37).

Il est à noter que dans la plupart des cas, les cinétiques sont les mêmes et une dégradation totale du phénol est observée après 22-24 h de manipulation, sauf pour les deux premiers cycles. Ce qui prouve que les bactéries s'adaptent au milieu.

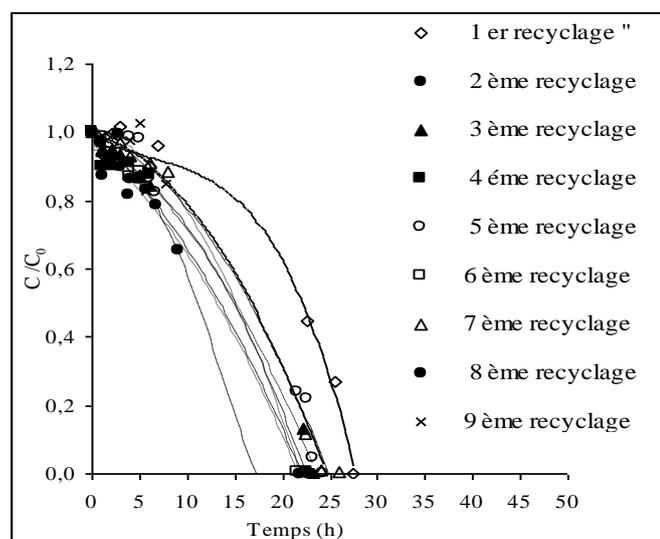


Figure III.37 : Recyclage des billes d'alginate ($d_p=2 \text{ mm}$, $m=0,26 \text{ g.L}^{-1}$, 500 mg.L^{-1} phénol)

Abd-El-Haleem et al. (2003) n'ont pu avoir que 5 cycles pour les mêmes concentrations, alors que Basak et al. (2014) ont pu atteindre 10 cycles consécutifs de biodégradation de 2400 mg.L^{-1} de phénol avec un rendement d'élimination de 100 % pour les deux premiers cycles qui diminue progressivement jusqu'à atteindre un rendement de 4% au dernier cycle. Alors que dans notre étude, le rendement se stabilise aux environs de 100% pour tous les cycles avec une légère augmentation de la vitesse de biodégradation ($61,43 - 81,52 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (figure III.38).

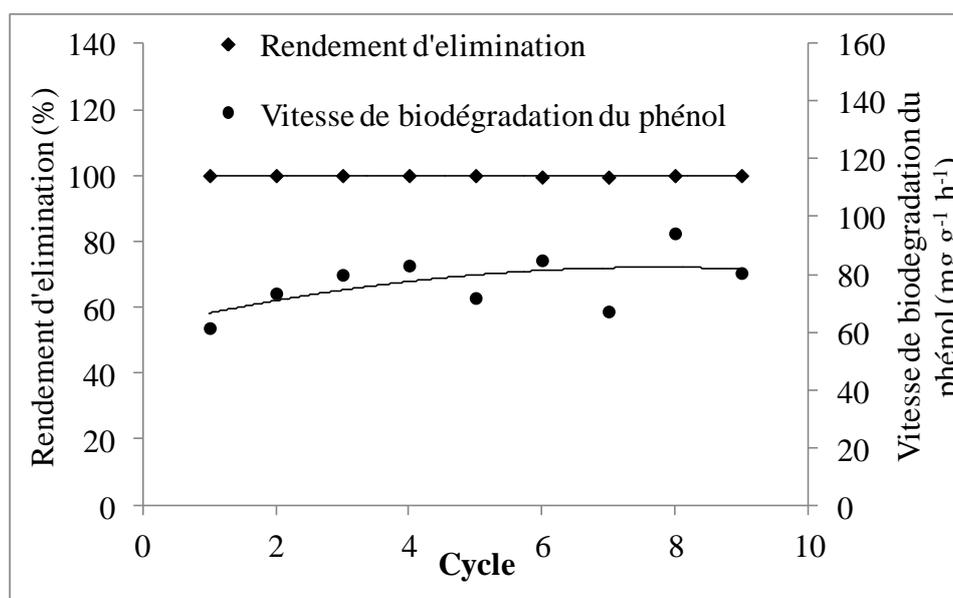


Figure III.38 : Evolution du rendement d'élimination et de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des cycles de biodégradation.

III.1.2.7.1.2. Recyclage des billes pour des concentrations croissantes de phénol:

Pour déterminer l'effet des concentrations initiales de phénol sur les vitesses de dégradation, une série d'expériences avec des billes de diamètre 2 mm contenant une biomasse de concentration égale à $0,39 \text{ g.L}^{-1}$, a été réalisée en augmentant la concentration après chaque cycle. Cette dernière varie entre 100 et 900 mg.L^{-1} . La figure III.39 montre que les microorganismes immobilisés peuvent être exposés à des concentrations élevées de phénol sans qu'il y ait perte de viabilité. Le temps de dégradation du phénol augmente avec la concentration, sans dépasser 70 h.

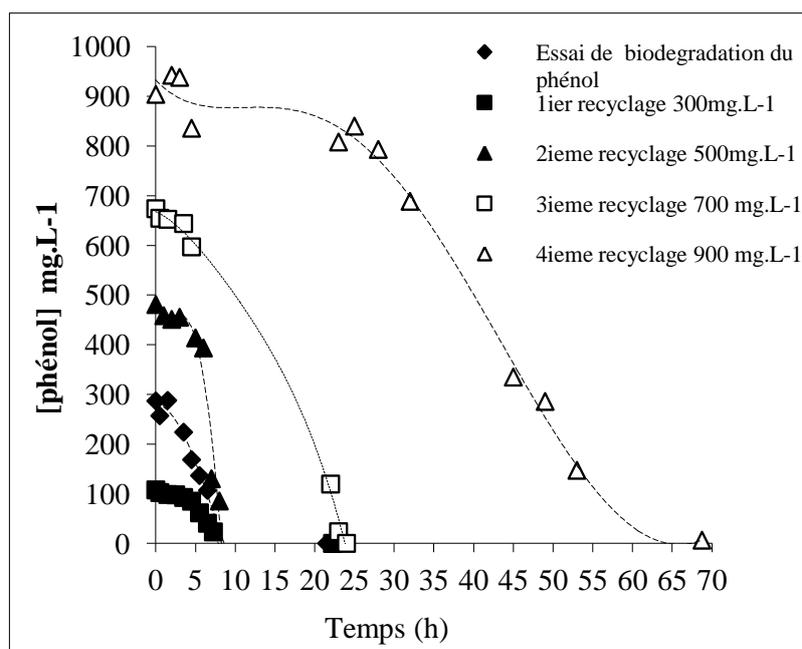


Figure III.39 : Recyclage des billes d'alginate ($d_p=2$ mm, $m= 0,390$ g.L⁻¹).

En comparant les temps de biodégradation du phénol pour une même concentration, nous constatons que les billes recyclées ont mis moins de temps à dégrader le phénol que celles qui ne le sont pas. Pour des concentrations de 300, 500, 700 et 900 mg.L⁻¹, le temps était de 30, 50, 68 et 78,5h respectivement. Tandis que pour les mêmes concentrations (cas des billes réutilisées) le temps était de 8, 8, 24 et 65 h respectivement.

Sur la figure III.40, nous avons reporté les rendements d'élimination et la vitesse de biodegradation du phénol en fonction des concentrations du phénol. Nous constatons toujours que le rendement est de 100% pour toutes les concentrations.

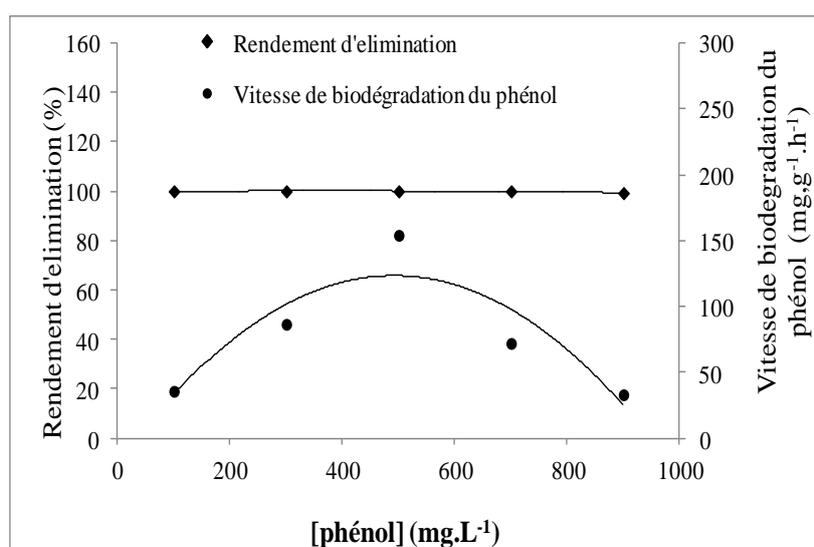


Figure III.40 : Evolution du rendement d'élimination et de la vitesse de biodegradation du phénol en fonction des concentrations initiales du phénol.

Cependant la valeur de la vitesse de biodégradation augmente au fur et à mesure que la concentration augmente jusqu'à atteindre une valeur de $120 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ qui correspond à une concentration de 500 mg.L^{-1} de phénol (effet d'adaptation). Au-delà, une diminution remarquable de la vitesse a été observée probablement due à l'encombrement des billes de diamètre 2 mm par une forte concentration en biomasse (limitation diffusionnelle).

L'expérience a été réalisée une deuxième fois dans les mêmes conditions, avec une densité de biomasse égale à 0,087 et un diamètre des billes égal à 3 mm. Le résultat présenté sur la figure III.41 montre une réduction significative du temps de dégradation pour des concentrations de 100, 300 et 500 mg.L^{-1} .

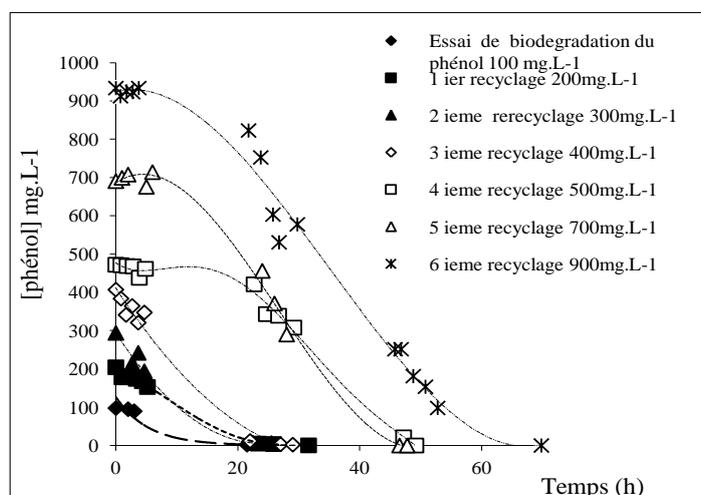


Figure III.41 : Recyclage des billes d'alginate ($d_p=3 \text{ mm}$, $m= 0,087 \text{ g.L}^{-1}$)

Pour la concentration de 700 mg.L^{-1} , les mêmes résultats ont été obtenus. Cependant, à la fin de l'expérience, une détérioration des billes a été observée, ce qui a conduit à une libération des cellules et un ralentissement des cinétiques de dégradation. Malgré l'état des billes, elles ont pu être réutilisées durant un 5^{ème} cycle, et ont pu dégrader 900 mg.L^{-1} de phénol en 65 h avec une vitesse de $153,89 \text{ mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ce qui confirme que le recyclage a permis aux cellules de s'adapter à l'environnement dans lequel elles se trouvent. Ces remarques sont confirmées par la détermination de la vitesse de biodégradation du phénol (figure III.42) où une augmentation de la valeur de cette dernière est observée jusqu'à atteindre un palier.

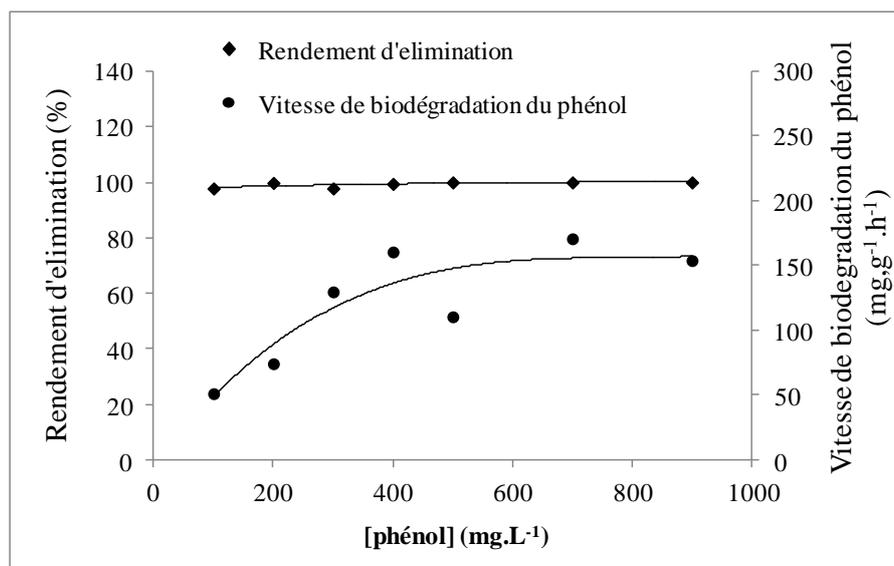


Figure III.42 : Evolution du rendement d'élimination et de la vitesse de biodégradation du phénol en fonction des concentrations initiales du phénol.

III.1.2.7.2. Stabilité du biocatalyseur en présence de sels chélatants:

La sensibilité du biocatalyseur à des espèces capables de chélater les ions divalents (citrate, lactate, EDTA, PO_4^{3-} , Mg^{2+} , K^+ ...) et des espèces ioniques gênant l'action du cation divalent (Na^+ ,...), est l'une des principales entraves à sa stabilité.

Sachant que, le milieu réactionnel contient des sels tels que KH_2PO_4 , K_2HPO_4 et $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et que ces derniers peuvent modifier le biocatalyseur, ce qui aura une influence directe sur l'efficacité de la biodégradation du phénol et sur la dissolution des billes.

a. Effet des sels chélatants sur la biodégradation du phénol : pour évaluer l'influence de ces sels, nous avons établi un plan d'expériences « surface de réponse RSM ».

a.1. Optimisation par la méthodologie de surface de réponse (RSM)

La méthodologie de surface de réponse en utilisant le **plan Box-Benhken** a été appliquée pour étudier les effets et les interactions de trois facteurs, à savoir la concentration des sels suivants : KH_2PO_4 , K_2HPO_4 et $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Cela consiste à mettre en contact des cellules immobilisées dans des billes d'alginate de diamètre 2 mm dans un milieu nutritif contenant 100 mg.L^{-1} de phénol. La composition du milieu est identique à celle déjà utilisée durant toutes nos expériences mis à part les sels cités ci-dessus.

a.1.1. Définition des facteurs et domaine d'étude :

Le choix du domaine d'étude est issu des travaux de recherche antérieurs (Bucke and Brown, 1983; Ela Eroglu et al., 2015; Groboillot et al., 1994). Selon la concentration de chaque composant dans le milieu utilisé, nous avons choisi un domaine d'étude un peu plus large autour de ces valeurs. Les niveaux hauts (+1) et bas (-1) et le centre (0) sont attribués à chaque facteur.

Tableau III.8 : Facteurs et domaine d'étude

Les facteurs étudiés	Niveaux de variation des facteurs		
	Niveau bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
KH_2PO_4 (mg.L ⁻¹) X ₁	0	0,75	1,5
K_2HPO_4 (mg.L ⁻¹) X ₂	0	0,25	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg.L ⁻¹) X ₃	0	0,25	0,5

a.1.2. Choix de Modèle polynomial du deuxième degré

Un polynomial du deuxième degré avec interactions, associée, au plan Box-Behnken à l'aide d'un logiciel JMP sera utilisé pour modéliser la réponse en fonction de trois facteurs (X₁, X₂ et X₃). L'équation théorique du modèle est la suivante :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 \quad (28)$$

- Y étant la réponse;
- a₀ constante;
- a₁, a₂ et a₃ les effets principaux de ces facteurs;
- a₁₁, a₂₂ et a₃₃, leurs effets quadratiques;
- a₁₂, a₁₃ et a₂₃ les effets d'interaction entre deux facteurs et ε l'erreur résiduelle;
- X₁, X₂, X₃, sont les variables d'entrée qui influence la réponse.

a.1.3. Les essais de biodégradation du phénol suivant le plan Box-Behnken :

La matrice des variables codées et réelles ainsi que la réponse expérimentale sont représentées dans le tableau III.9. Quinze essais ont été évalués selon la méthode de Box-Behnken avec trois facteurs à trois niveaux. Douze formulations différentes ont été produites et le centre a été évalué trois fois. La réponse (Y) est déterminée expérimentalement selon ce plan d'expériences, et elle est exprimée par le *temps de la biodégradation totale du phénol (heure)*.

Tableau III.9 : Matrice d'expériences des plans de Box-Behnken et résultats expérimentaux

		Variables codées			Variables réelles			
Essais		X ₁	X ₂	X ₃	KH ₂ PO ₄ (mg.L ⁻¹)	K ₂ HPO ₄ (mg.L ⁻¹)	MgSO ₄ .7H ₂ O (mg.L ⁻¹)	Y(Heure)
1	0++	0	1	1	0,75	0,5	0,5	50,3
2	+0-	1	0	-1	1,5	0,25	0	49,8
3	+-0	1	-1	0	1,5	0	0,25	21,8
4	000	0	0	0	0,75	0,25	0,25	43,3
5	-0-	-1	0	-1	0	0,25	0	69,8
6	++0	1	1	0	1,5	0,5	0,25	46
7	-+0	-1	1	0	0	0,5	0,25	77
8	+0+	1	0	1	1,5	0,25	0,5	43
9	000	0	0	0	0,75	0,25	0,25	47,5
10	0+-	0	1	-1	0,75	0,5	0	29
11	000	0	0	0	0,75	0,25	0,25	43
12	--0	-1	-1	0	0	0	0,25	91
13	-0+	-1	0	1	0	0,25	0,5	121,5
14	0--	0	-1	1	0,75	0	0,5	27,7
15	0--	0	-1	-1	0,75	0	0	25,3

Les résultats figurant sur le tableau III.9 ont montré que le temps de biodégradation du phénol a varié clairement avec les niveaux des facteurs étudiés dans le domaine. Cette variation reflète l'importance de l'optimisation.

a.1.4. Calcul de modèle et Analyse statistique :

Le traitement statistique des données du tableau III.9 à l'aide du logiciel JMP, permet d'estimer les coefficients du modèle. La signification de chaque coefficient est déterminée en utilisant le **test t-student** et la **p-valeur** (tableau III.10).

Tableau III.10 : Estimations des coefficients

Terme	Estimation	Erreur	t-student	p- valeur
constante	44,6	2,394906	18,62	<0,0001
X ₁	-26,26875	1,796179	-14,62	0,0001
X ₂	4,5625	1,466574	3,11	0,0358
X ₃	7,14375	1,796179	3,98	0,0164
X ₁ *X ₂	9,55	2,074049	4,60	0,0100
X ₁ *X ₃	-17,4875	2,933148	-5,96	0,0040
X ₂ *X ₃	4,725	2,074049	2,28	0,0850
X ₁ *X ₁	24,71875	2,394906	10,32	0,0005
X ₂ *X ₂	-10,36875	2,394906	-4,33	0,0124
X ₃ *X ₃	-1,15625	2,394906	-0,48	0,6545

Le modèle suivant tient compte des effets linéaires, des effets quadratiques et des interactions du premier ordre:

$$Y = 44,599 - 26,268X_1 + 4,562X_2 + 7,143X_3 + 24,718X_1^2 - 10,368X_2^2 - 1,156X_3^2 + 9,55X_1X_2 - 17,48X_1X_3 + 4,725X_2X_3 \quad (29)$$

Les résultats obtenus sont analysés statistiquement par l'étude de la variance

Tableau III.11 : Analyse de la variance

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	9	10219,844	1135,54	56,9654
Résidus	4	99,669	19,93	Prob > F
C. Total	13	10319,513		0,0002*
$R^2 = 0,9909$ $R^2_{\text{adj}} = 0,9909$				

D'après le graphe obtenu dans la figure III.43, nous constatons que l'ajustement est presque parfait car la constante de corrélation est égale à 0,99 et les points sont répartis autour de la droite. En effet, le coefficient de détermination de l'équation de modèle polynomial $R^2 = 0,9909$ (proche de l'unité) indique que seulement 1% de la variation totale n'est pas expliquée par le modèle.

Le test de *Fisher F* a montré également une signification élevée pour le modèle de régression et que tous les facteurs et les interactions pris en compte dans la conception expérimentale sont statistiquement significatifs ($P < 0,05$).

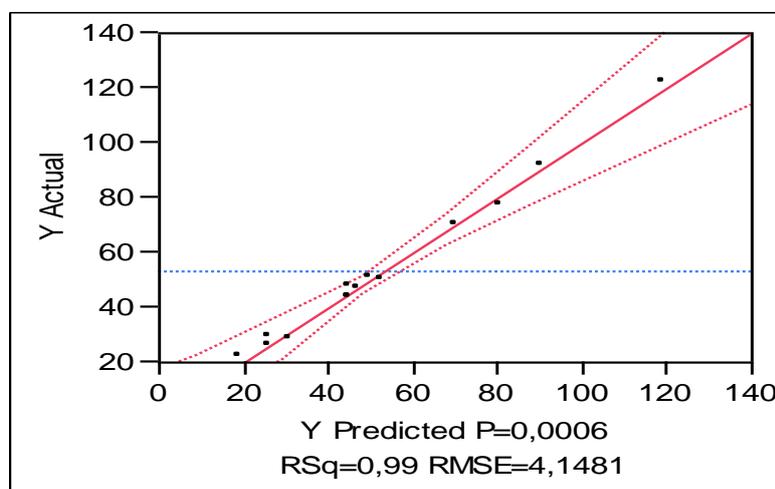


Figure III.43 : Représentation graphique des réponses observées en fonction des réponses prévues

a.1.5. Evaluation des effets :

a.1.5.1. L'effet linéaire et effets au carré des facteurs :

La **p-valeur** pour les trois facteurs KH_2PO_4 , K_2HPO_4 et $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ est inférieure à 0,05. Donc nous pouvons dire qu'il existe un effet linéaire significatif pour les trois facteurs.

L'étude du graphique des effets principaux (figure III.44) montre que l'augmentation de la concentration de KH_2PO_4 provoque une diminution importante de temps de biodégradation. Cette même figure, montre une légère variation et les courbes sont presque constantes pour K_2HPO_4 et MgSO_4 . Ce qui indique, que l'effet de ces deux facteurs est moins important que celui du KH_2PO_4 .

Les termes aux carrés sont utilisés pour évaluer s'il existe ou non une courbure (quadratique) dans la surface de réponse. Le modèle contient trois effets aux carrés des KH_2PO_4 , K_2HPO_4 et $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$.

Les **p-vleurs** pour des effets au carré de KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , sont respectivement 0,005, 0,0124. Elles sont toutes les deux inférieures à 0,05. Donc, il existe un effet quadratique significatif c'est-à-dire que la relation entre le rapport au carré et la réponse suit une ligne courbée. Mais pour la valeur de p 0,6545 de l'effet au carré de $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$, elle est supérieure à 0,05 et dans ce cas il n'y a pas d'effet au carré de ce sel et donc pas d'effet significatif.

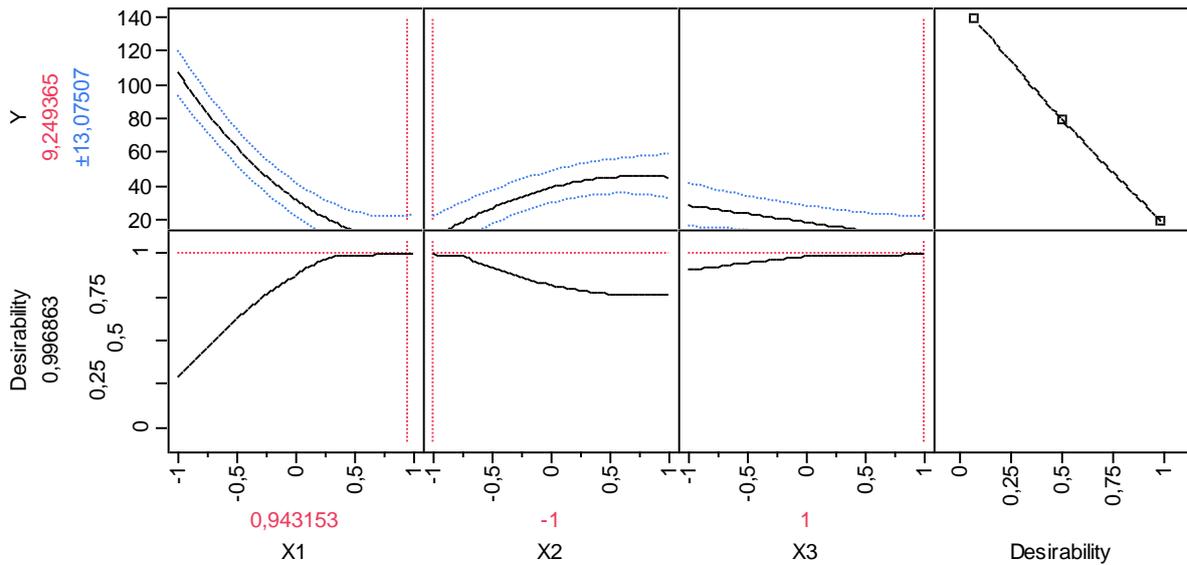


Figure III.44 : Diagramme des effets linéaires

a.1.5.2. Effets d'interactions:

Selon le tableau III.10, la **p-valeur** des trois effets d'interactions ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{K}_2\text{HPO}_4$), ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) sont respectivement 0,0100, 0,0040 et 0,085. Cela indique que les deux premières interactions ont un effet significatif alors que la troisième interaction est sans effet significatif (figure III.45).

A un seuil de signification de 5% (niveau de confiance 95%), seuls les coefficients a_0 , a_1 , a_2 , a_3 , a_{11} , a_{22} et a_{12} , a_{13} peuvent être retenus.

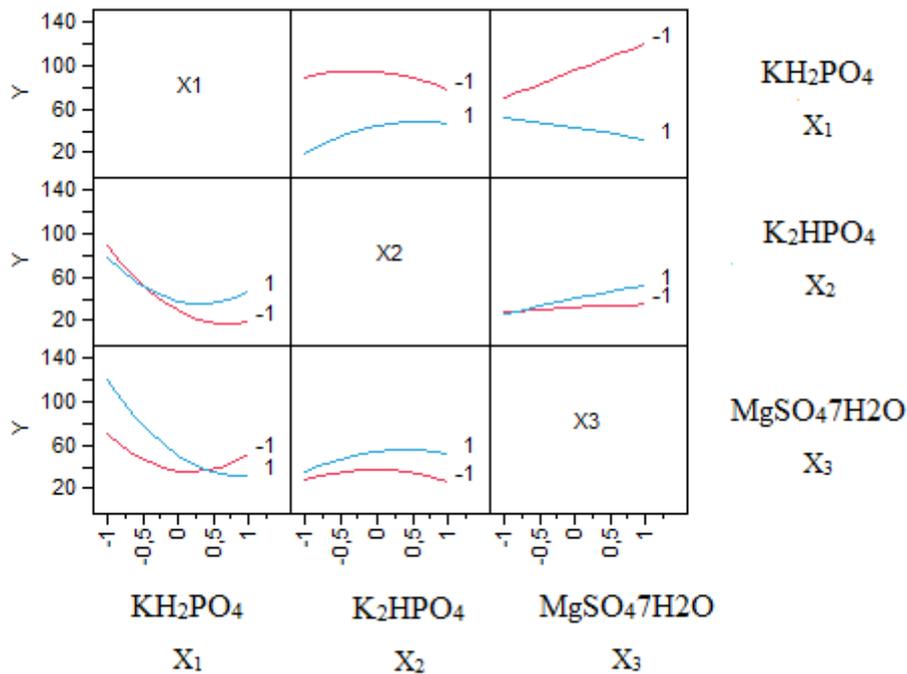


Figure III.45 : Diagramme des interactions

a.1.6. Surfaces de réponses :

Le diagramme de surface, qui est une grille graphique en trois dimensions, représente la relation fonctionnelle entre la réponse et les facteurs expérimentaux.

Les surfaces de réponses représentées par les figures III.46, III.47 et III.48, montrent l'effet des trois facteurs KH_2PO_4 , K_2HPO_4 et $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ sur la réponse. Chaque surface de réponse, représente l'effet des deux variables indépendantes.

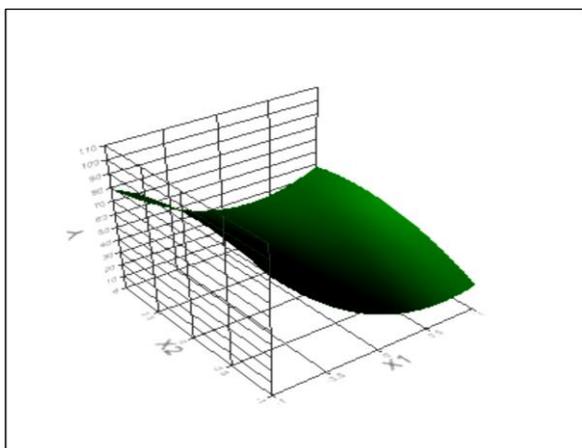


Figure III.46 : Surface de réponses de temps de biodégradation du phénol en fonction de (X_1) et (X_2)

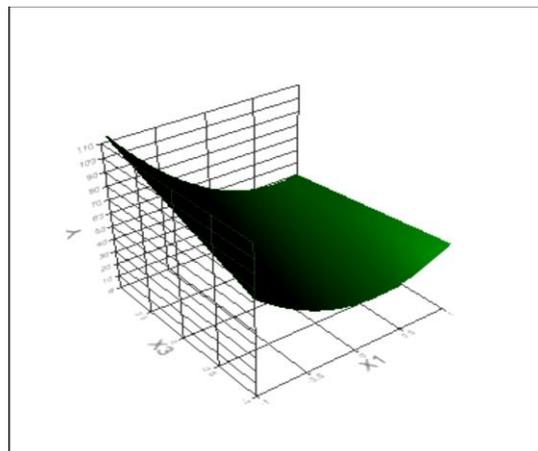


Figure III.47 : Surface de réponses de temps de biodégradation du phénol en fonction de (X_1) et (X_3)

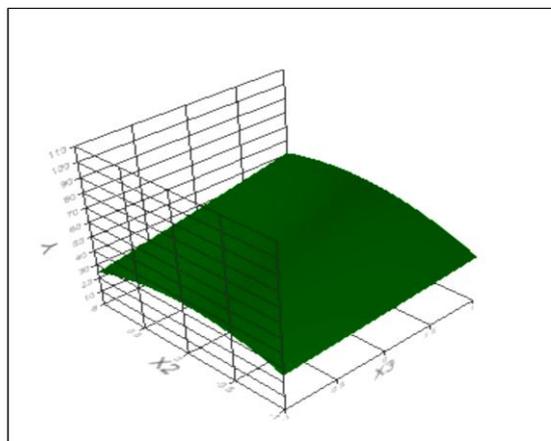


Figure III.48 : Surface de réponses de temps de biodégradation du phénol en fonction du (X_2) et (X_3)

La figure III.46 montre la présence d'effets linéaires pour KH_2PO_4 et K_2HPO_4 . Nous notons également la présence d'effet quadratique et l'effet d'interaction entre ces deux variables.

La surface de réponse dans la figure III.47 est de forme concave inclinée. La surface montre que les effets linéaires et l'interaction des facteurs KH_2PO_4 et $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ sont significatifs, alors que l'effets quadratiques de facteur $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ est absent.

D'après la figure III.48 nous constatons l'absence d'effet quadratique de $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$ et l'effet d'interaction entre K_2HPO_4 et $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$.

a.1.7. Optimisation et fonction désirabilité :

La fonction désirabilité (d_i) permet d'optimiser la réponse Y . Le temps de biodégradation du phénol minimum, correspondant à une désirabilité maximale qui vaut 0,996 est obtenu avec les variables codées suivantes : ($X_1= 0,945$, $X_2= -1$ et $X_3= 1$) correspondant aux variables réelles suivantes:

- Concentration de $\text{KH}_2\text{PO}_4= 1,414 \text{ mg. L}^{-1}$;
- Concentration de $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0 \text{ mg. L}^{-1}$;
- Concentration de $\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}=0,5\text{mg. L}^{-1}$.

a.1.8. Simplification de modèle de surface de réponse :

Les termes X_2X_3 et X_3^2 du modèle ne sont pas significatifs car leurs **p-valeur** sont supérieures à 0,05 ; ils seront ainsi éliminés un à un par une régression pas à pas afin de simplifier le modèle. Dans un premier temps on élimine l'interaction X_3^2 , on obtient les tableaux III.12 et III.13.

Tableau III.12: Estimations des coefficients

Terme	Estimation	Erreur	t -student	p-valeur
Constante	45	1,95834	22,98	<0,0001
X_1	-24,8375	1,441299	-17,23	<0,0001
X_2	4,5625	1,441299	3,17	0,0194
X_3	8,575	1,441299	5,95	0,0010
$X_1 * X_2$	9,55	2,038305	4,69	0,0034
$X_1 * X_3$	-14,625	2,038305	-7,18	0,0004
$X_2 * X_3$	4,725	2,038305	2,32	0,0596
$X_1 * X_1$	25,975	2,115249	12,28	<0,0001
$X_2 * X_2$	-11,975	2,115249	-5,66	0,0013

Tableau III.13 : Analyse de la variance pour la réponse en excluant le terme X_3X_3

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Model	8	10219,801	1277,48	76,8695
Erreur	6	99,713	16,62	Prob > F
C. Total	14	10319,513		<,0001
		R^2	0,990337	
		R^2_{Adj}	0,977454	

Dans une deuxième étape on élimine l'interaction $X_2 X_3$, on obtient alors les tableaux III.14 et III.15.

Tableau III.14: Estimations des coefficients

Terme	Estimation	Erreur	t -student	p-valeur
Constante	45	2,49625	18,03	<0,0001
X_1	-24,8375	1,83719	-13,52	<0,0001
X_2	4,5625	1,83719	2,48	0,0420
X_3	8,575	1,83719	4,67	0,0023
$X_1 * X_2$	9,55	2,598179	3,68	0,0079
$X_1 * X_3$	-14,625	2,598179	-5,63	0,0008
$X_1 * X_1$	25,975	2,696258	9,63	<0,0001
$X_2 * X_2$	-11,975	2,696258	-4,44	0,0030

L'analyse de la variance présentée dans le Tableau III.15 a montré que le modèle simplifié obtenu est significatif car le p (rapport F_{obs}) est inférieur 0,005, et que la corrélation entre les valeurs réelles et les valeurs ajustées ($R^2 = 98,16\%$ et $R^2_{adj} = 96,37\%$) est satisfaisante.

Tableau III.15: Analyse de la variance pour la réponse en excluant le terme X_2X_3

Source	Degré de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Model	7	10130,498	1447,21	53,5963
Erreur	7	189,015	27,00	Prob > F
C. Total	14	10319,513		<0,0001
		R^2	0,981684	
		R^2_{Adj}	0,963367	

De plus la constante de corrélation obtenue après exclusion des paramètres ($R^2 = 0,9816$) est légèrement inférieure à celle obtenue avant l'exclusion ($R^2=0,9909$).

Le modèle simplifié est donné donc par l'équation optimale suivante :

$$Y = 45 - 24,83X_1 + 4,562X_2 + 8,57X_3 + 25,975X_1^2 - 11,97X_2^2 + 9,55X_1X_2 - 14,62X_1X_3 \quad (30)$$

b. Effet des sels chélatants sur la dissolution des billes d'alginate et le relargage cellulaire :

Nous avons étudié aussi l'effet de ces sels sur la dissolution des billes et le relargage cellulaire représentés par la DO_{600} pour un temps de biodégradation fixé à 25 h. Les résultats qui sont présentés sur les figures III.49 et III.50 nous ont permis d'aboutir aux constatations suivantes:

Dans les figures III.49 (a) et III.50 (a), nous avons reporté l'évolution de la DO_{600} ainsi que la concentration du phénol en fonction du temps où chaque courbe indique l'effet de chaque sel.

Pour 25h de manipulation, nous constatons que la présence de K_2HPO_4 ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$), entraîne l'obtention de faibles valeur de DO_{600} (la dissolution des billes et le relargage des bactéries) ($DO_{600} = 0,164$) supérieures à celles causées par la même concentration en $MgSO_4$ ($DO_{600} = 0,07$), alors que la présence de KH_2PO_4 ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$) influe significativement sur la DO_{600} ($0,394$) et sur la biodégradation (100%).

Nous constatons aussi, que la présence des trois sels en même temps conduit une forte DO_{600} (1,2) avec un taux d'abattement de phénol de 22% (figure III.49 (b) et III.50 (b)). Selon ces mêmes figures, l'élimination du K_2HPO_4 du milieu réactionnel améliore le taux de biodégradation (100%) en 2 2h de manipulation et ce pour une concentration de KH_2PO_4 égale à $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, ce qui a été prouvé par les résultats du plan.

La présence du KH_2PO_4 à $0,75 \text{ g.L}^{-1}$, conduit toujours aux meilleurs taux de dégradation qui avoisinent les 100% mais à des valeurs de DO_{600} relativement faibles (figure III.49 (c) et III.50 (c)) et ce quelque soit la nature du sel présent dans le milieu réactionnel ($MgSO_4$ ou K_2HPO_4). Cependant le double de la quantité KH_2PO_4 ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) en présence de $MgSO_4$ conduit à de fortes valeurs de DO_{600} (1,2) et 100% de dégradation (figure III.49 (b) et III.50 (b)).

Sachant que notre but est de minimiser la dissolution des billes ainsi que le relargage cellulaire (DO_{600}) et de maximiser le taux d'abattement, il serait intéressant d'utiliser un milieu nutritif contenant du KH_2PO_4 avec une concentration ne dépassant pas $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ et le sel $MgSO_4$.

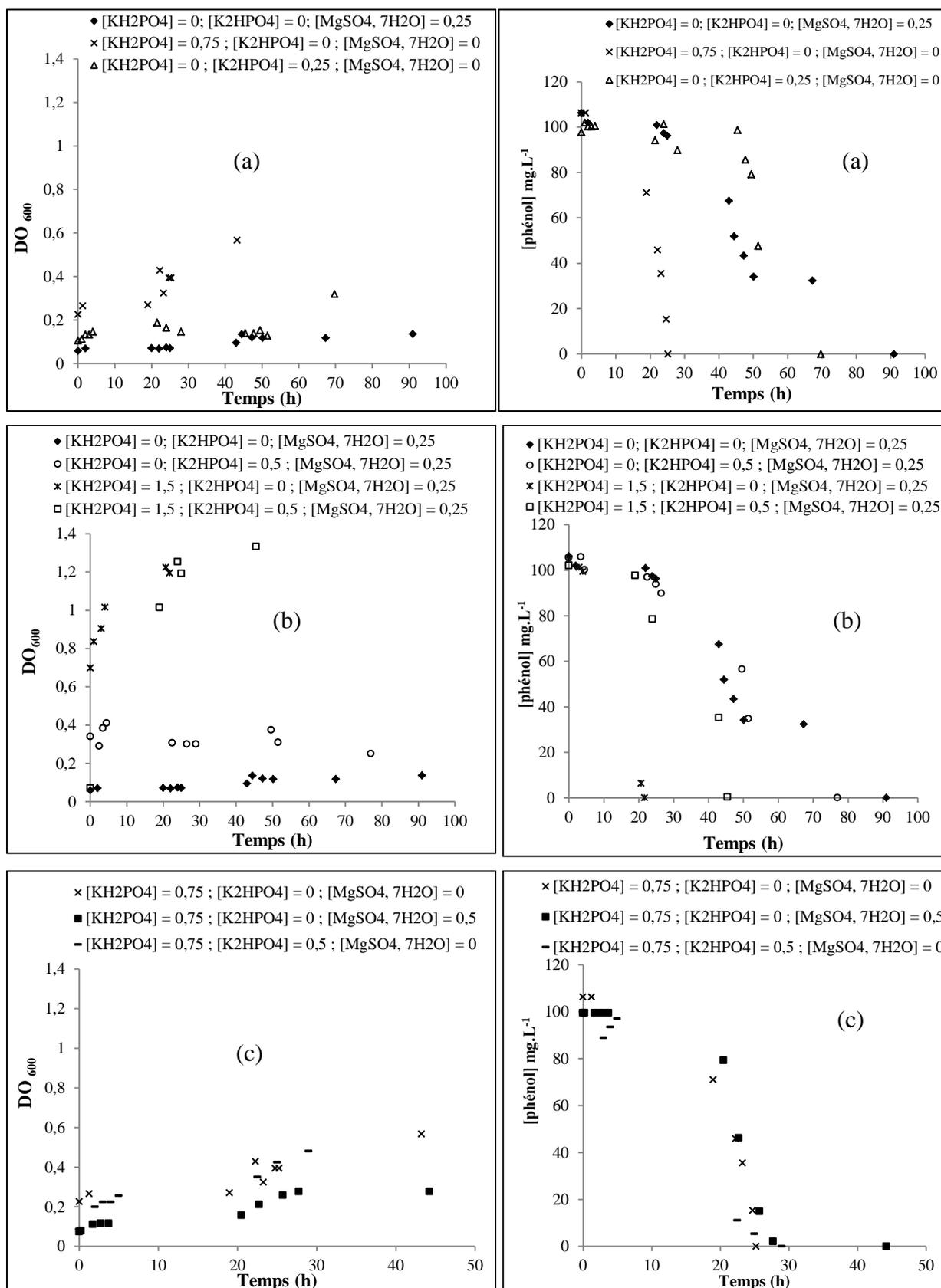


Figure III.49 : Evolution de la DO_{600} en fonction du temps en présence des différents sels chélatants ($[Biomasse]=0,26g.L^{-1}$, $d_p=2$ mm), $[phénol]=100$ $mg.L^{-1}$)

Figure III.50 : Evolution de concentration du phénol en fonction du temps en présence des différents sels chélatants ($[biomasse]=0,26$ $g.L^{-1}$, $d_p= 2$ mm), $[phénol]=100$ $mg.L^{-1}$)

III.2. La biodégradation du phénol en mode continu : Conception de réacteur de biodégradation du phénol en continu par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisés dans des billes d'alginate à l'échelle laboratoire

Une fois que tous les paramètres de biodégradation du phénol par des *Pseudomonas aeruginosa* immobilisés dans les billes d'alginate en mode batch ont été optimisés. Nous passerons à l'étude en mode continu par la conception d'un réacteur le plus adapté pour la biodégradation du phénol. Nous avons cherché à définir un procédé réunissant un taux maximal de biodégradation et une conservation de l'état des billes le plus longtemps possible. Pour cela nous avons sélectionné les configurations suivantes :

- ❖ Colonne verticale à lit fixe;
- ❖ Colonne verticale à lit fluidisé ;
- ❖ réacteur agité continu

III.2.1. Colonne verticale à lit fixe :

Le montage en lit fixe est constitué d'une colonne en verre et d'une pompe péristaltique type Masterflex. La hauteur totale de la colonne est de 50 cm utilisée à hauteur de 45 cm afin de limiter les risques de débordement. Les données caractéristiques sont récapitulées dans le Tableau III.16.

Tableau III.16 : Paramètres descriptifs de la colonne utilisée en lit fixe

Volume de la colonne (mL)	350
Hauteur (cm)	50
Diamètre (cm)	3
H/D _c	16,66
Section de la colonne (cm ²)	7,1

La colonne est équipée de 6 points de prélèvement à 5 cm d'intervalle permettant la collecte des échantillons. Nous avons introduit dans la colonne, des billes de 2 mm qui ont été adaptées pour dégrader 500 mg.L⁻¹ de phénol en système discontinu (batch).

L'alimentation et l'aération de la colonne sont assurées respectivement par une pompe péristaltique et des diffuseurs d'air fonctionnant à flux ascendant. La distribution uniforme d'air se fait à l'aide d'un verre fritté placé à la base de la colonne.

Après un certain temps de manipulation, nous avons constaté qu'il y a une diminution de la hauteur du lit due à la dissolution des billes et création de chemin préférentiel, ce qui conduit à une distribution non uniforme de la source d'oxygène pour les bactéries. Afin d'améliorer le contact entre la phase solide (billes d'alginate), la phase liquide (l'alimentation) et la phase gazeuse (air), notre choix s'est porté sur un lit fluidisé.

III.2.2. Lit fluidisé :

La fluidisation est un procédé de mise en contact d'une phase granulaire et d'une phase fluide qui permet de maintenir les particules en suspension. Cette technique, connue depuis fort longtemps, permet de réaliser de nombreuses opérations unitaires. Elle connaît actuellement un regain d'intérêt dans les industries de transformation de la matière, de la production d'énergie et de l'environnement.

En plus des caractéristiques des particules, d'autres paramètres influent sur la qualité de fluidisation, notamment la géométrie de la colonne de fluidisation et le mode de distribution du débit gazeux (Kunii et Levenspiel, 1991).

Notre deuxième montage a tout simplement été, une colonne à lit fluidisé. En effet, compte tenu des inconvénients que comportait la colonne à lit fixe par l'impossibilité d'éviter la dissolution des billes, cette configuration s'est imposée d'elle même.

III.2.2.1. Description du montage expérimental :

La colonne utilisée en lit fluidisé est la même que celle utilisée en lit fixe dont les caractéristiques ont été données précédemment (Tableau III.16). La hauteur du lit est de 10cm qui subi une expansion jusqu'à une hauteur de 30 cm soit une expansion de 200%. Le débit d'air fourni est de $1,8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les billes utilisées pour cette partie d'étude ont un diamètre de 2 mm et contiennent une biomasse de $0,26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Cette colonne est alimentée par une solution contenant du phénol, du NO_3NH_4 à raison de $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl. Le tout préparé dans de l'eau de robinet.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'éliminer tous les sels chélatants qui participent à la dissolution des billes.

Avant d'entamer nos manipulations avec la colonne en lit fluidisé, il est important de déterminer la vitesse minimale de fluidisation et la vitesse terminale.

III.2.2.2. Calcul de la vitesse minimale de fluidisation :

La détermination de la vitesse minimale de fluidisation du lit (méthode classique proposée par Davidson et al. (1985) est généralement déduite de la courbe donnant la perte de pression (mesurée à l'aide de capteurs de pression) en fonction de la vitesse apparente du fluide dans la colonne de fluidisation pour un empilement de billes d'alginate de hauteur initiale. Cette vitesse est obtenue par diminution progressive de la vitesse du gaz.

L'application des relations d'Ergun et que la force développée par le courant de fluide sert à contre balancer le poids volumique apparent de la phase granulaire au minimum de fluidisation; illustrée par l'équation (31); permettent de prédire la vitesse minimale de fluidisation (32) dans le cas d'un Reynolds (33) particulière inférieur à 20.

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{150\mu}{(\phi d_p)^2} \frac{(1-\varepsilon_{mf})^2}{\varepsilon_{mf}^3} u_{mf} + \frac{1,75\rho_f}{\phi d_p} \frac{(1-\varepsilon_{mf})}{\varepsilon_{mf}^3} u_{mf}^2 = (1 - \varepsilon_{mf})(\rho_p - \rho_f)g \quad (31)$$

Avec

$$U_{mf} = \frac{(\phi_p \cdot d_p)^2}{150} \left[\frac{\rho_p - \rho_f}{\mu_g} \right] g \frac{\varepsilon_{mf}^3}{(1-\varepsilon_{mf})} \quad (32)$$

$$Re_p = \frac{\rho_f d_p U_{mf}}{\mu_f} \quad (33)$$

Avec :

μ : Viscosité dynamique ($\text{Kg.m}^{-1}.\text{S}^{-1}$) ;

ϕ : Facteur de Sphéricité ;

ε_{mf} : Porosité du lit à la vitesse minimale de fluidisation ;

ρ_f : Masse volumique du fluide (Kg.m^{-3}) ;

ρ_d : Masse volumique de la particule (Kg.m^{-3}) ;

Re_p : Nombre de Reynolds ;

d_p : Diamètre de la particule (m) ;

U_{mf} : Vitesse minimale de fluidisation (m.s^{-1}) ;

$g = 9.81 \text{ m.s}^{-2}$.

Le régime de fluidisation bouillonnante est courant dans beaucoup d'applications industrielles. Le régime bouillonnant apparaît juste après la fluidisation minimale et couvre une plage de vitesses assez importantes [U_{mf} , U_f et U_t].

$$U_t = 0,7806 \frac{\left((\rho_p / \rho_f) - 1 \right)^{0,714} d_p^{1,14}}{\gamma^{0,429}} \quad (34)$$

$$U_f = \left(Q_v / \frac{\pi D_c^2}{4} \right) \quad (35)$$

Avec :

Q_v : Débit de fluide ($m^3 \cdot s^{-1}$) ;

D_c : Diamètre de la colonne (m).

Calcul des vitesses :

En appliquant les relations d'Ergun (32) et (33) :

$$U_{mf} = \frac{(1 \times 0,002)^2}{150} \left[\frac{1074 - 1,204}{1,8 \times 10^{-5}} \right] 9,81 \frac{0,52^3}{(1 - 0,52)} = 4,57 m/s \quad Re_{mf} = 611$$

$Re_{mf} = 611 \gg \gg 20$, l'équation (31) ne peut être appliquée. Cependant, la bibliographie met à notre disposition un nombre important de corrélations (annexe 2) pour estimer la vitesse minimale de fluidisation. Néanmoins, l'intérêt de l'existence de ces corrélations est de permettre de multiplier les évaluations et de fournir un domaine de vitesse minimale de fluidisation et de prévenir les tendances associées à un changement quelconque des conditions expérimentales ou de fonctionnement.

Sachant que les billes d'alginate appartiennent au groupe D de la classification de Geldart et relatif aux poudres denses et de fort diamètre ($> 800 \mu m$).

Toutefois, la fluidisation des billes d'alginate par de l'air dans un fluide pratiquement au repos $U_{air} \gg U_{eau}$ requiert la connaissance de la masse volumique qui rend compte du rapport des forces opposées lors du choc entre le fluide et la phase dense et la porosité de la phase dense et des effets de flottabilité sur les effets visqueux.

C'est pourquoi nous avons appliqué les relations citées par Davidson et al. (1985), de Babu et al. (1978), Wen and Yu (1966) et Bourgeois et Grenier (1968).

$$Re_{mf} = \sqrt{(25,25)^2 + 0,0651.Ga} - 25,25 \quad (36)$$

pour $256 < \rho_p < 3920 \text{ kg.m}^{-3}$ et $0,05 < d_p < 2,87 \text{ (mm)}$

$$Re_{mf} = \sqrt{(33,7)^2 + 0,0408.Ga} - 33,7 \quad (37)$$

$$Re_{mf} = \sqrt{(25,46)^2 + 0,03824.Ga} - 25,46 \quad (38)$$

Le nombre de Galilée Ga est utilisé pour quantifier le rapport des effets de flottabilité sur les effets visqueux. Il intervient notamment dans la détermination de la vitesse de chute libre d'un corps dans un fluide et est donné par l'équation (39).

$$Ga = \sqrt{\frac{d_p^3 g \rho_g (\rho_p - \rho_g)}{\mu_g^2}} \quad (39)$$

$Ga=559,343774$ avec $\rho_p=1074 \text{ Kg.m}^{-3}$ ($\varepsilon=0,52$)

A partir de l'équation (33) nous avons déterminé la vitesse minimale de fluidisation U_{mf}

$$U_{mf} = Re_{mf} \frac{\mu_f}{\rho_f d_p} = 0,00745 Re_{mf}$$

$$(36) \Rightarrow Re_{mf} = 0,711 \quad U_{mf} = 0,00522 \text{ m/s}$$

$$(37) \Rightarrow Re_{mf} = 0,337 \quad U_{mf} = 0,002473 \text{ m/s}$$

$$(38) \Rightarrow Re_{mf} = 0,416 \quad U_{mf} = 0,00306 \text{ m/s}$$

A partir de l'équation (34) et (35) nous avons déterminé la vitesse terminale U_t :

$$U_t = 0,7806 \frac{\left(\left(\frac{1074}{1000} \right) - 1 \right)^{0,714} 0,002^{1,14}}{\left(\frac{0,001}{1000} \right)^{0,429}} = 0,0382 \text{ m/s}$$

$$U_f = \left(\frac{Q_v}{\frac{\pi D_c^2}{4}} \right) \quad Q_v = 1,8 \text{ L/min} \quad D_c = 3 \text{ cm} \quad U_f = 0,0424 \text{ m/s}$$

A partir des résultats obtenus, nous remarquons que quelque soit la corrélation appliquée (36, 37 et 38) pour calculer la vitesse minimale de fluidisation U_{mf} , cette dernière est toujours inférieure à la vitesse de fluidisation U_f ; $U_{mf} < U_f$. Cependant la valeur de la vitesse de fluidisation semble être égale à la vitesse terminale, ce qui implique que nous sommes à la limite de la fluidisation.

III.2.2.3. Détermination du temps de passage :

Le temps de passage d'un effluent (τ) (h), également appelé temps de séjour, indique le temps théorique que met une molécule de fluide pour traverser le réacteur (David, 2013). Il est défini par la relation suivante :

$$\tau = V/Q$$

V: volume total de fluide dans le réacteur (m^3);

Q : Débit de fluide ($m^3.h^{-1}$) ;

Nous avons regroupé dans le tableau III.17, la valeur des différents paramètres régissant la fluidisation.

Tableau III.17 : Valeur des paramètres de la fluidisation

Paramètres de fluidisation	Valeurs
Diamètre des billes d_p (mm)	2
Masse volumique particules ρ_p ($kg.m^{-3}$)	1074
Viscosité dynamique μ ($Kg.m^{-1}.S^{-1}$)	$1,84 \cdot 10^{-5}$
Porosité du lit à la vitesse minimale de fluidisation (ϵ_{mf})	0,52
Nombre de Galilée Ga	559,343774
Nombre de Reynolds Re	0,337-0,711
Vitesse minimale de fluidisation U_{mf} ($m.s^{-1}$)	[0,002473 - 0,00522]
Débit minimal de fluidisation Q_{mf} ($L.h^{-1}$)	[6,29 - 13,27]

Les conditions de fluidisation imposent une valeur minimale du rapport entre le diamètre de la colonne D_c et le diamètre des particules de l'ordre de 10. Etant donné que le diamètre de la colonne est de 30 cm et celui des billes est de 2 mm, le rapport est largement supérieur à 10.

La dégradation du phénol dans un réacteur à lit fluidisé dépend du temps de séjour de l'effluent et de la concentration du polluant à l'entrée du réacteur (Ochieng et al., 2002). Ainsi, l'optimisation de ces deux paramètres permet d'améliorer les performances épuratoires du procédé.

Pour cela, nous avons procédé à une première manipulation où nous avons introduit dans la colonne une concentration de 50 mg.L^{-1} de phénol avec différents débits d'alimentation.

Pour chaque débit utilisé, nous avons déterminé le temps de passage et nous avons relevé aussi la concentration de phénol résiduel à la sortie de la colonne. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau III.18 : Paramètres hydrodynamiques influençant la fluidisation pour 50 mg.L^{-1} de phénol

Débit (ml.h^{-1})	72	63	10
τ (h)	3,47	3,96	25
$[\text{phénol}]_{\text{entrée}}$ (mg.L^{-1})	47,97	51,70	47,97
$[\text{phénol}]_{\text{sortie}}$ (mg.L^{-1})	22	6,75	2,48
Taux d'abattement (%)	54,14	86,94	94,83

D'après les résultats présentés dans le Tableau III.18, nous remarquons que les temps de séjours varient de 3,47 h pour le plus court et 25 heures pour le plus long, et ce pour un intervalle de débit allant de 72 ml.h^{-1} à 10 ml.h^{-1} .

Nous avons présenté sur la figure III.51, l'évolution du temps de séjours et du taux d'abattement en fonction des débits d'alimentation où nous constatons aussi que plus le temps de séjours augmente plus le taux d'abattement est meilleur. Un maximum de rendement d'élimination du phénol (94,83%) est obtenu pour un temps de 25h. En effet, plus le débit est faible, plus le temps de contact entre la bactérie et le polluant est grand et meilleur sera le rendement de dégradation.

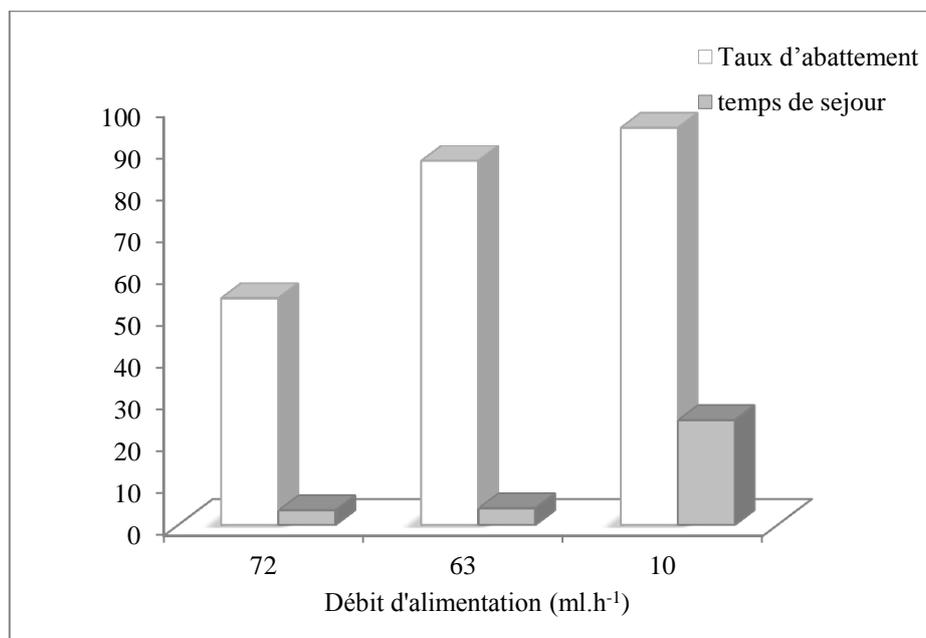


Figure III.51: Evolution du taux d'abattement et du temps de séjour en fonction du débit d'alimentation contenant 50 mg.L⁻¹ du phénol ([Biomasse]=0,26 g.L⁻¹, d_p = 2 mm)

A partir des résultats obtenus pour ces essais, nous avons doublé la concentration du phénol (100 mg.L⁻¹) en utilisant le débit optimal de l'expérience précédente (10 ml.h⁻¹). Cependant le taux d'abattement était faible (< 20%), ce qui nous a incité à travailler avec des débits plus faibles. Les résultats sont présentés dans le tableau III.19.

Tableau III.19 : Paramètres hydrodynamiques influençant la fluidisation pour 100 mg.L⁻¹ de phénol

Débit (ml.h ⁻¹)	8,53	8,16	7,5	5,3
τ (h)	29,30	30,64	33,33	47,20
[phénol] _{entrée} (mg.L ⁻¹)	106,6	89,01	127	127
[phénol] _{sortie} (mg.L ⁻¹)	58,28	22,92	24,87	17,05
Taux d'abattement (%)	45,33	74,25	80,42	86,57

La figure III.52 qui représente l'évolution du temps de séjours et du taux d'abattement en fonction des débits d'alimentation contenant 100 mg.L^{-1} de phénol indique que la faible variation du débit entraine une augmentation dans les taux d'abattement pour atteindre un maximum de 86,57% correspondant à un débit de $5,3 \text{ ml.h}^{-1}$.

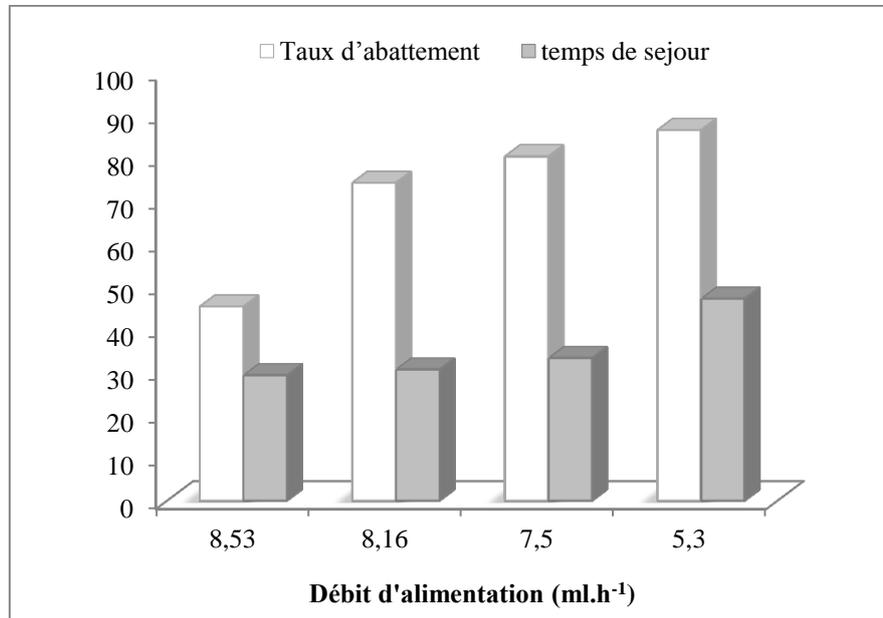


Figure III.52 : Evolution du taux d'abattement et du temps de séjour en fonction du débit d'alimentation contenant 100 mg.L^{-1} du phénol ($[\text{Biomasse}] = 0,26 \text{ g.L}^{-1}$, $d_p = 2 \text{ mm}$)

Une observation au microscope électronique à balayage MEB a été effectuée pour un échantillon de billes ayant été utilisées dans des cinétiques de biodégradation du phénol à lit fluidisé. Le résultat présenté sur les photos montre la présence d'un biofilm à la surface de la bille.

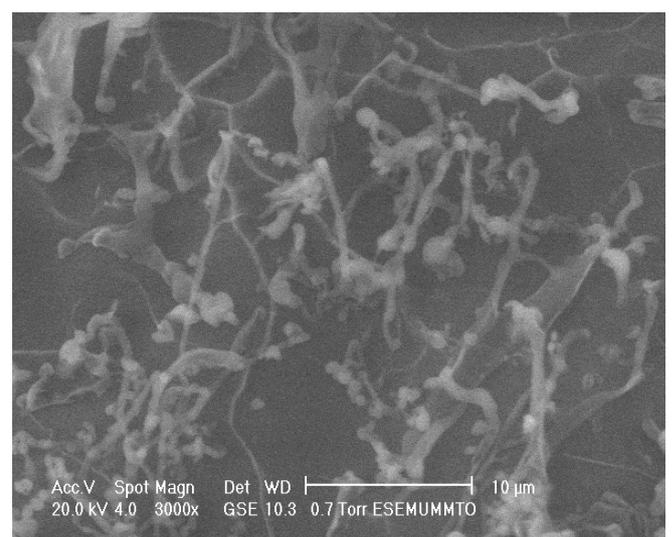
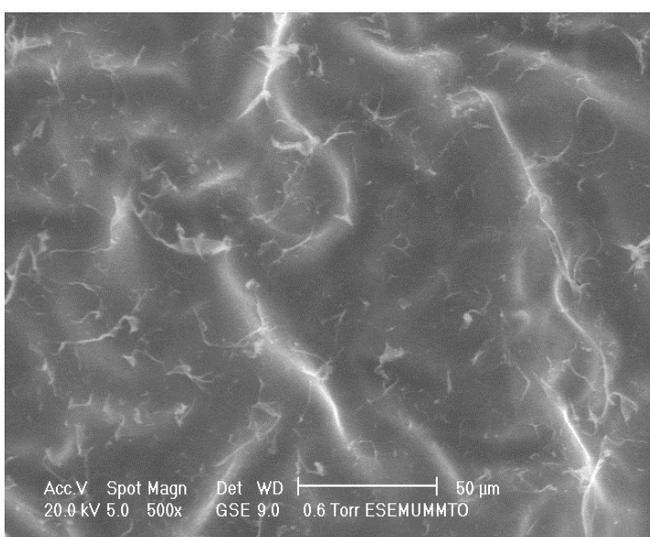


Photo 11: Bille d'alginate après utilisation dans des cinétiques de biodégradation en système continu ($[\text{Biomasse}] = 0,260 \text{ g.L}^{-1}$, $d_p = 2 \text{ mm}$)

III.2.3. Réacteur Agité :

Nous avons ouvert le système fermé utilisé lors des essais en batch, ce réacteur est alimenté avec la même alimentation que celle du lit fluidisé avec un débit de $7,5 \text{ L.h}^{-1}$. Nous avons commencé par traiter une solution contenant 100 mg.L^{-1} de phénol et dès que la concentration avoisine 0 mg.L^{-1} , nous renouvelons l'alimentation en augmentant la charge initiale. La figure III.53 présente les résultats issus de cette étude.

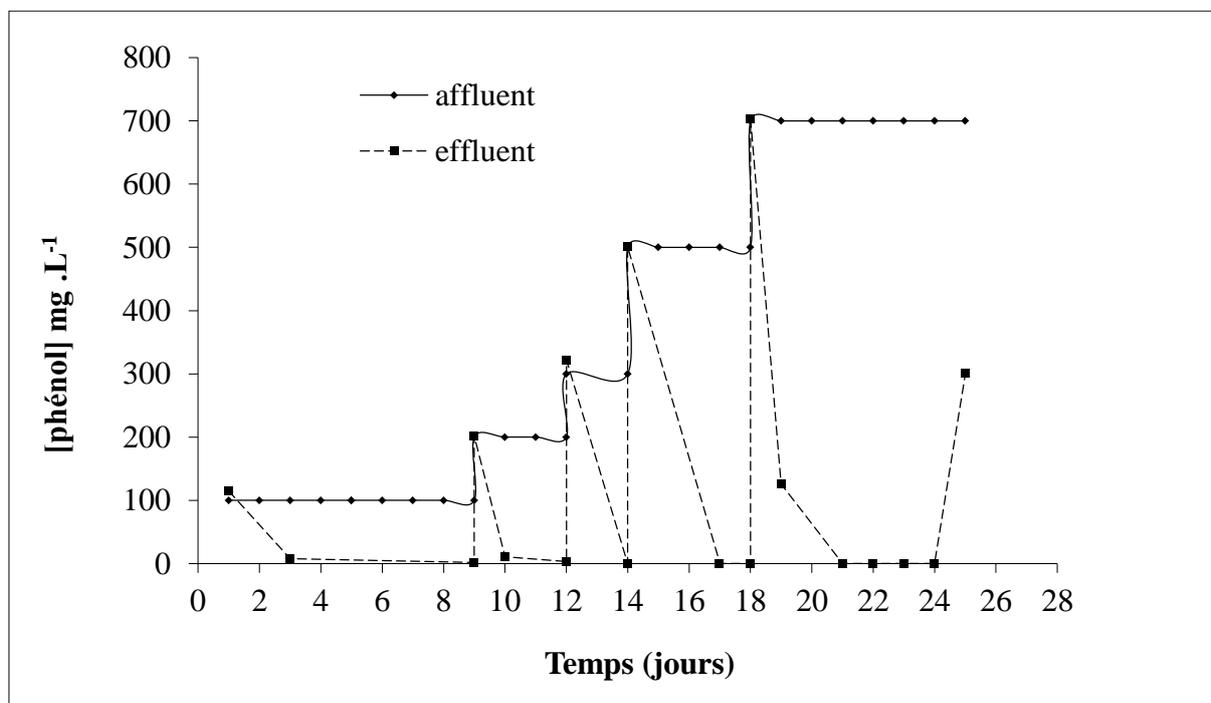


Figure III.53 : Evolution de la concentration du phénol dans l'affluent et l'effluent en réacteur agité ($[\text{Biomasse}] = 0,26 \text{ g.L}^{-1}$, $d_p = 2 \text{ mm}$)

Selon la figure III.53, nous constatons que quelque soit la concentration initiale en phénol, nous obtenons toujours un rendement d'élimination de 100%. De plus avec ce type de réacteur nous arrivons à traiter jusqu'à 700 mg.L^{-1} de phénol.

Pour des concentrations de 100, 200, 300, 500 et 700 mg.L^{-1} , nous avons pu traiter des volumes de 1620, 720, 360, 1440 et 1080 ml en 9, 4, 2, 4 et 6 jours respectivement.

D'après la même figure toujours, nous remarquons une augmentation de la concentration de l'effluent au bout du 24^{ème} jour, ceci est dû à la détérioration des billes.

Références bibliographiques

- Abd-El-Haleem, D, Beshay, U, Abdelhamid, A O, Moawad, H, Zaki, S, 2003. Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter sp. strain W-17*. African journal of biotechnology, 2:8-12.
- Adav, S S, Chen, M Y, Lee, D J, Ren, N Q, 2007. Degradation of phenol by aerobic granules and isolated yeast *Candida tropicalis*. Biotechnology and bioengineering, 96:844-852.
- Agarry, S E, Audu, T O, Solomon, B O, 2010. Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous binary mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. International journal of environment and pollution, 43:177-189.
- Ahamad, P A, Kunhi, A M, 2011. Enhanced degradation of phenol by *Pseudomonas sp. CP4* entrapped in agar and calcium alginate beads in batch and continuous processes. Biodegradation, 22:253-265.
- Aksu, Z, Bülbül, G, 1999. Determination of the effective diffusion coefficient of phenol in Ca-alginate-immobilized *Pseudomonas putida* beads. Enzyme and microbial technology, 25:344-348.
- Ali, O, Namane, A, Hellal, A, 2012. Microbial Degradation of Phenol by *Pseudomonas Aeruginosa*: Operating Conditions and Kinetic Study,. Revue de microbiologie industrielle sanitaire et environnementale, 6.
- Annadurai, G, Balan, S M, Murugesan, T, 1999. Box-Behnken design in the development of optimized complex medium for phenol degradation using *Pseudomonas putida (NICM 2174)*. Bioprocess engineering, 21:415-421.
- Annadurai, G, Balan, S M, Murugesan, T, 2000. Design of experiments in the biodegradation of phenol using immobilized *Pseudomonas pictorum (NICM-2077)* on activated carbon. Bioprocess engineering, 22:101-107.
- Arnaud, J, Lacroix, C, 1991. Diffusion of lactose in k-carrageenan/locust bean gum gel beads with or without entrapped growing lactic acid bacteria. Biotechnology and bioengineering, 38:1041-1049.
- Bandhyopadhyay, K, Das, D, Bhattacharyya, P, Maiti, B, 2001. Reaction engineering studies on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida MTCC 1194* immobilized on calcium alginate. Biochemical engineering journal, 8:179-186.
- Banerjee, A, Ghoshal, A K, 2011. Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate. International biodeterioration & biodegradation, 65:1052-1060.
- Bared, R, Boucheta, A, Chaib, M, Kacimi, S, 2010. Phenol and benzoic acid degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of water resource and protection, 2:788-791.
- Basak, B, Bhunia, B, Dey, A, 2014. Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis PHB5* for phenol biodegradation. International biodeterioration & biodegradation, 93:107-117.

- Basha, K M, Rajendran, A, Thangavelu, V, 2010. Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. *Asian journal of experimental biology science*, 1:219-234.
- Bettmann, H, Rehm, H, 1984. Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 20:285-290.
- Bossert, I, Bartha, R, 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York, pp. 440-445.
- Bucke, C, Brown, D E, 1983. Immobilized Cells [and Discussion]. *Industrial and diagnostic enzymes*, 300:369-389.
- Cachon, R, Divies, C, 1993. Localization of *Lactococcus lactis ssp lactis* by *diacetylactis* in alginate gel beads affects biomass density and synthesis of several enzymes involved in lactose and citrate metabolism. *Biotechnology techniques*, 7:453-456.
- Chung, T-P, Tseng, H-Y, Juang, R-S, 2003. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process biochemistry*, 38:1497-1507.
- David, P-L, 2013. Traitement des eaux grises par réacteur à lit fluidisé et dangers liés à leur utilisation pour l'irrigation d'espaces verts urbains. Thèse de doctorat d'état, Université Nantes Angers Le Mans, p. 217.
- Davidson, J F, Harrison, D, Richardson, J F, 1985. *Fluidization*, 2nd ed. Academic Press: London.
- De Ory, I, Romero, L E, Cantero, D, 1998. Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. *Applied microbiology and biotechnology*, 49:189-193.
- Der Yang, R, Humphrey, A E, 1975. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 17:1211-1235.
- Dey, S, Mukherjee, S, 2010. Performance and kinetic evaluation of phenol biodegradation by mixed microbial culture in a batch reactor. *International journal of water resources and environmental engineering*, 2:40-49.
- Dursun, A Y, Tepe, O, 2005. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*. *Journal of hazardous materials*, 126:105-111.
- Ela Eroglu, Steven M. Smith, Raston, C L, 2015. Chapter 2: Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses. Springer International Publishing, : Switzerland, p. 25.
- Gòdia, F, Casas, C, Castellano, B, Solà, C, 1987. Immobilized cells: behaviour of carrageenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 26:342-346.
- Godia, F, Casas, C, Sola, C, 1985. Alcoholic fermentation by immobilised yeast cells. *Journal of chemical technology and biotechnology*. *Biotechnology*, 35:139-144.
- Groboillot, A, Boadi, D, Poncelet, D, Neufeld, R, 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical reviews in biotechnology*, 14:75-107.

- Hannaford, A M, Kuek, C, 1999. Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 22:121-126.
- Kotresha, D, Vidyasagar, G, 2008. Isolation and characterisation of phenol-degrading *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996. World journal of microbiology and biotechnology, 24:541-547.
- Kotresha, D, Vidyasagar, G, 2014. Chromosomally encoded phenol hydroxylase gene for degradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4996. International journal of microbial resource technology, 2:2278 - 3822.
- Marrot, B, Barrios-Martinez, A, Moulin, P, Roche, N, 2006. Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. Biochemical engineering journal, 30:174-183.
- Mohanty, S S, 2012. Microbial degradation of phenol: A comparative study, Department of Biotechnology & Medical Engineering, Master of technology (research). Thèse de doctorat, National Institute of Technology, Rourkela, INDIA, p. 137.
- Mollaei, M, Abdollahpour, S, Atashgahi, S, Abbasi, H, Masoomi, F, Rad, I, Lotfi, A S, Zahiri, H S, Vali, H, Noghabi, K A, 2010. Enhanced phenol degradation by *Pseudomonas* sp. SA01: Gaining insight into the novel single and hybrid immobilizations. Journal of Hazardous Materials, 175:284-292.
- Nagashima, M, Azuma, M, Noguchi, S, Inuzuka, K, Samejima, H, 1984. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. Biotechnology and bioengineering, 26:992-997.
- Namane, A, Amrouche, F, Hamdi, H, Ali, O, Hank, D, Hellal, A, 2014. Biodegradation of phenolic wastewaters. Environmental engineering and management journal, 13:1-6.
- Nweke, C, Okpokwasili, G, 2010. Influence of exposure time on phenol toxicity to refinery wastewater bacteria. Journal of environmental chemistry and ecotoxicology, 2:20-27.
- Ochieng, A, Ogada, T, Sisenda, W, Wambua, P, 2002. Brewery wastewater treatment in a fluidised bed bioreactor. Journal of hazardous materials, 90:311-321.
- Pai, S-L, Hsu, Y-L, Chong, N-M, Sheu, C-S, Chen, C-H, 1995. Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus* sp. immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. Bioresource technology, 51:37-42.
- Powlowski, J, Shingler, V, 1990. In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. Journal of bacteriology, 172:6834-6840.
- Puerto-Tello, A, Moreno-Piraján, J C, Guzmán, A M, Escudero, M E, Velázquez, L, Giraldo, L, Sapag, K, 2009. Decomposition of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized on activated carbons. Journal of environmental engineering and management, 19:73-78.

- Rigo, M, Alegre, R M, 2004. Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from industrial wastewaters and kinetics of the biodegradation. *Folia microbiologica*, 49:41-45.
- Saravanan, P, Pakshirajan, K, Saha, P, 2008. Biodegradation of phenol and m-cresol in a batch and fed batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly *Pseudomonas sp.* *Bioresource Technology*, 99:8553-8558.
- Shah, M P, 2014. Microbiological Removal of Phenol by an Application of *Pseudomonas spp.* ETL-: An Innovative Biotechnological Approach Providing Answers to the Problems of FETP. *Journal of applied & environmental microbiology*, 2:6-11.
- Sheeja, R, Murugesan, T, 2002. Mass transfer studies on the biodegradation of phenols in up-flow packed bed reactors. *Journal of hazardous materials*, 89:287-301.
- Shingler, V, Bartilson, M, Moore, T, 1993. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVII50 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. *Journal of bacteriology*, 175:1596-1604.
- Sokol, W, Howell, J, 1981. Kinetics of phenol oxidation by washed cells. *Biotechnology and bioengineering symposium*, 23:2039-2049.
- Surkatti, R, El-Naas, M H, 2014. Biological treatment of wastewater contaminated with p-cresol using *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of water process engineering*, 1:84-90.
- Uzun, H, Yildiz, E, Nuhoglu, A, 2010. Phenol biodegradation in a batch jet loop bioreactor (JLB): Kinetics study and pH variation. *Bioresource technology*, 101:2965-2971.
- Vijayagopal, V, Viruthagiri, T, 2005. Batch kinetic studies in phenol biodegradation and comparison. *Indian journal of biotechnology*, 4:565.
- Vives, C, Casas, C, Gòdia, F, Solà, C, 1993. Determination of the intrinsic fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in Ca-alginate beads and observations on their growth. *Applied microbiology and biotechnology*, 38:467-472.
- Whiteley, A S, Wiles, S, Lilley, A K, Philp, J, Bailey, M J, 2001. Ecological and physiological analyses of *Pseudomonad species* within a phenol remediation system. *Journal of microbiological methods*, 44:79-88.
- Wilke, C, Chang, P, 1955. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *Aiche journal* 1:264-270.
- Ying, W, Ye, T, Bin, H, Zhao, H-b, Bi, J-n, Cai, B-l, 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter sp. strain PD12*. *Journal of environmental sciences*, 19:222-225.
- Zheng, Y, Gan, J, Xiang, J, Fang, Y, Liu, D, Fang, J, 2010. Biodegradation of higher concentration phenol by *Pseudomonas aeruginosa HS-D38*, *Bioinformatics and biomedical engineering (icbbe)*, 2010 4th international conference on. IEEE, pp. 1-4.

Conclusion

La pollution de l'environnement est l'un des grands enjeux de notre temps et le phénol présente l'un des principaux polluants industriels. Par conséquent la dégradation de l'environnement est devenue une préoccupation mondiale. A cet effet, beaucoup de méthodes physico-chimiques ont été utilisées pour la dégradation du phénol. Cependant, l'élimination complète de ce dernier par ces procédés est impossible. D'où l'utilisation des traitements biologiques qui s'avère être une alternative favorable. En effet, l'évaluation critique de la littérature révèle que le traitement biologique est économique, pratique et le plus prometteur.

Le défi actuel est de sélectionner des espèces efficaces et de trouver les meilleures conditions à cet égard. L'immobilisation de micro-organismes dans des supports inertes représente un intérêt croissant de cette stratégie qui permet d'obtenir beaucoup d'avantages.

Notre étude a consisté donc en la biodégradation du phénol par des *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 immobilisés dans des billes d'alginate de calcium par inclusion, elle a été réalisée en mode batch et continu. Les résultats obtenus à l'issue de cette étude nous ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

La biodégradation du phénol avec des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* libres a montré que des concentrations initiales de phénol supérieures à 500 mg.L⁻¹ provoqueraient une inhibition notable chez ces bactéries et pour surmonter cette inhibition, la technologie des cellules immobilisées a été adoptée.

Sachant que l'activité bactérienne est influencée par divers facteurs environnementaux tels que le diamètre des billes, la taille de l'inoculum, le pH, la température et la concentration initiale du polluant, nous avons étudié l'influence de ces facteurs sur la biodégradation par la méthode intuitive et par la méthode des plans d'expériences. Les résultats obtenus nous ont mené à déduire que :

La vitesse optimale de biodégradation du phénol (46,47 mg.g⁻¹.h⁻¹) est obtenue à un pH de 7, une température de 37°C et 0,260 mg.L⁻¹ de biomasse immobilisée dans 3% d'alginate. Toutefois, cette vitesse a été peu affectée par la taille des billes d'alginate dans un intervalle de diamètre compris entre 1 et 4 mm.

L'étude de la biodégradation du phénol à différentes concentrations initiales en phénol allant de 100 à 1500 mg.L⁻¹ a montré que les cellules immobilisées ont pu dégrader la totalité des concentrations 100, 300, 500, 700, 900 et 1200 mg.L⁻¹ du phénol et 45% de 1500 mg.L⁻¹.

L'utilisation d'un plan factoriel à trois niveaux (2³) nous a permis d'obtenir le modèle linéaire suivant :

$$Y = 56,15 + 42,0625X_1 - 4,81 X_2 + 21,1875X_3 + 16,0625 X_1X_3 - 5,31 X_2X_3 - 11,93 X_1X_2X_3$$

Ce modèle décrit la façon dont les variables expérimentales et leurs interactions influent sur le temps d'élimination du phénol. En effet, les facteurs les plus influents sont; la concentration initiale du phénol X₁ et la taille de l'inoculum X₃, ainsi que leurs interactions.

Ce plan a fait ressortir les conditions optimales suivantes qui correspondent à un temps de dégradation minimal:

- ❖ Une concentration en phénol de 100 mg.L⁻¹ ;
- ❖ Une taille de l'inoculum de 0,39 ;
- ❖ Un diamètre des billes de 2 mm.

D'autre part, la réutilisation de ces billes dans différentes concentrations du phénol a montré que les cellules immobilisées conservent leur capacité de dégradation pouvant atteindre 900 mg.L⁻¹ de phénol en 65 heures avec un rendement d'élimination de 99%.

De même, la réutilisation du biocatalyseur dans la même concentration initiale de phénol (500 mg.L⁻¹), nous a permis d'atteindre neuf cycles de biodégradation en utilisant les mêmes billes, avec un rendement d'élimination de 99% pour des cinétiques qui durent 17 à 27 h. Nous pouvons conclure que le recyclage a permis aux cellules de s'adapter à l'environnement dans lequel elles se trouvent.

La diffusivité de phénol dans la bille d'alginate a été déterminée en ajustant un modèle cinétique de premier ordre aux données expérimentales, fondées sur les principes de génie chimique de la diffusion et de la réaction de la biodégradation de la matière organique dans la bille. Les résultats obtenus nous ont permis de constater que la valeur du facteur d'efficacité ($\eta=0,6$) n'est pas loin de 1, donc la biodégradation est affectée par la diffusion du phénol dans la bille d'alginate à une certaine limite. De plus la valeur du

module de Thiele obtenue ($\phi=3,629$) est proche de 5 ce qui indique l'effet combiné entre la diffusion intraparticulaire et la réaction de biodégradation.

L'étude portait aussi sur l'influence de la présence des sels chélatants dans le milieu réactionnel KH_2PO_4 (X_1), K_2HPO_4 (X_2), et $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (X_3) sur la biodégradation du phénol et ce par l'application d'un plan de surface Box-Benhken. Le modèle établi est le suivant :

$$Y = 44,599 - 26,268X_1 + 4,562X_2 + 7,143X_3 + 24,718X_1^2 - 10,368X_2^2 + 9,55X_1X_2 - 17,48X_1X_3$$

Avec des conditions optimales :

- Concentration de $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1,414 \text{ mg. L}^{-1}$;
- Concentration de $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0 \text{ mg. L}^{-1}$;
- Concentration de $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O} = 0,5 \text{ mg. L}^{-1}$.

Les résultats tirés de l'étude parallèle de l'influence de ces sels sur la dissolution des billes ont montré que :

- La présence de KH_2PO_4 ($0,75 \text{ g.L}^{-1}$) influe significativement sur la DO_{600} ($0,394$) et sur la biodégradation (100%).
- La présence du KH_2PO_4 ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) avec le MgSO_4 conduit à de fortes valeurs de DO_{600} ($1,2$) et 100% de dégradation.
- La présence des trois sels en même temps conduit à une forte DO_{600} ($1,2$) mais un taux faible d'abattement de phénol (22%). Ce taux est amélioré significativement par l'élimination du K_2HPO_4 du milieu réactionnel.

Le phénomène du relargage cellulaire a aussi été étudié. Il apparaît lors des cinétiques de biodégradation par des cellules immobilisées. Son apparition est importante dans un milieu à faible concentration en phénol. Un milieu réactionnel basique le favorise alors qu'un milieu acide l'inhibe. Une haute température influe aussi sur ce phénomène. En effet, à 45°C , la matrice d'immobilisation (bille d'alginate) se détériore ce qui provoque la dispersion des bactéries qui seront inhibées par cette température.

L'étude de biodégradation du phénol par des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées dans des billes d'alginate de calcium en mode continu, nous a permis d'obtenir un rendement d'élimination de 94% pour une concentration initiale de 50 mg.L^{-1}

en lit fluidisé pour un débit d'alimentation de 10 ml.h^{-1} . Tandis qu'en réacteur agité, nous avons pu atteindre les 700 mg.L^{-1} avec un taux d'abattement qui avoisine les 100 %.

Dans la perspective de compléter et d'enrichir cette étude, il serait intéressant :

- De remplacer l'ion Calcium par un ion dont le pouvoir de liaison est beaucoup plus grand, tel que le Baryum Ba^{2+} et le Strontium Sr^{2+} ;
- D'améliorer les propriétés mécaniques du gel d'alginate par le mélange avec d'autres polymères : Utilisation de gels hybrides ;
- De déterminer la DTS dans les systèmes continus: distribution du temps de séjours pour l'analyse et la caractérisation du comportement hydrodynamique (valider l'absence d'un court circuit et de volume mort) d'un réacteur réel et le comparer à celui d'un réacteur idéal.

Techniques analytiques

I. Mesure de la biomasse microbienne :

La mesure de l'opacification du milieu de culture est une technique très prisée pour mesurer la biomasse, c'est la masse bactérienne sèche présente par unité de volume. Il est en effet possible d'utiliser une loi, analogue à celle de Beer-Lambert, exprimant la proportionnalité entre la contribution bactérienne à l'absorbance du milieu A et la biomasse B présente en solution,

$$A = \text{Log} \frac{I_0}{I_2} - \text{Log} \frac{I_0}{I_1} = \text{Log} \frac{I_1}{I_2} = \alpha dB$$

Où :

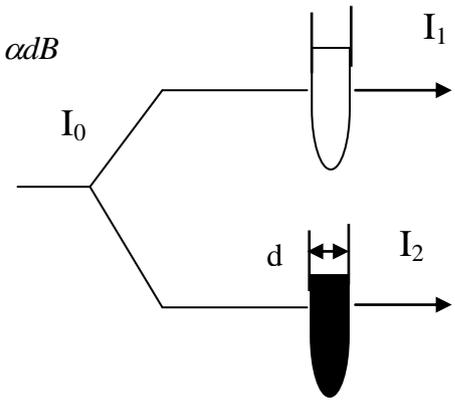
I_0 : intensité lumineuse du rayon incident ;

I_1 : intensité du rayon transmis en l'absence de biomasse ;

I_2 : intensité du rayon transmis en présence de biomasse ;

d : longueur du trajet optique ;

α : Coefficient de proportionnalité.



L'absorbance est rapportée conventionnellement à un trajet optique de 1 cm pour définir la densité optique (DO) du milieu :

$$DO = \frac{1}{d} \text{Log} \frac{I_1}{I_2} = \alpha B$$

La détermination de la matière sèche cellulaire est la méthode la plus rigoureuse. La biomasse microbienne est récupérée généralement par centrifugation, lavée afin d'éliminer le milieu de culture retenu entre les cellules et séchée à 105°C jusqu'à poids constant. Cette technique s'applique aux suspensions assez denses et dans lesquelles les micro-organismes sont les seules particules en suspension.

Relation entre la densité optique et l'extrait sec :

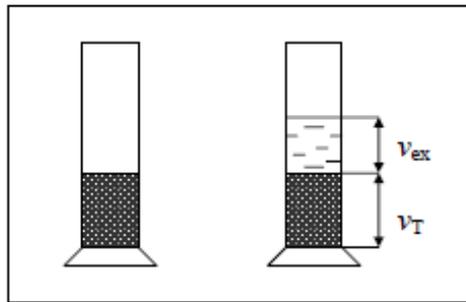
La technique utilisée consiste en :

- ❖ 200 ml de culture bactérienne sont centrifugés puis lavés avec de l'eau distillée 3 fois ;
- ❖ Le culot est remis en suspension dans 60 ml d'eau distillée ;
- ❖ La DO est lue à 600 nm d'un spectrophotomètre ;
- ❖ 50 ml de cette suspension est séchée à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant
- ❖ (m - mo), et on a : **Co = (m - mo) / 50 ml ;**

- ❖ Le reste (10 ml) sont utilisés pour la préparation des dilutions, la prise de D.O est effectuée à 600 nm ;
- ❖ La courbe des DO en fonction des concentrations est établie.

II. Détermination de la masse volumique du solide:

La masse volumique du solide est déterminée à partir de la méthode pycnométrique dont le principe consiste à introduire une masse m_T bien déterminée du solide dans une éprouvette graduée et à combler les interstices à un certain volume. La masse totale du système ainsi obtenue est :



$$m_T = m_S + m_P + m_{ex}$$

Et le volume total du solide immergé est :

$$v_T = v_S + v_P$$

avec:

m_S : la masse du solide ;

m_P : la masse de l'eau dans les pores ;

m_{ex} : la masse d'eau en excès ;

v_P : le volume d'eau emprisonné dans les pores ;

v_{ex} : le volume d'eau en excès.

La masse volumique du solide est définie comme étant le rapport de la masse du solide sur son volume, elle s'écrit :

$$\rho = \frac{m_S}{V_S} = \frac{m_S}{V_T - V_P}$$

Avec :

$$V_P = \frac{m_T - m_S - m_{ex}}{\rho_{eau}}$$

Et

$$m_{ex} = V_{ex} \cdot \rho_{eau}$$

La porosité est calculée à partir de l'expression suivante : $\varepsilon = \frac{V_P}{V_T}$

Calcul de la vitesse minimale de fluidisation selon différentes corrélations

Auteur	Corrélation	Commentaire Référence
Ergun (1952)	$Ga = 150 \frac{(1 - \varepsilon_{mf})}{\psi^2 \cdot \varepsilon_{mf}^3} \text{Re}_{mf} + \frac{1,75}{\psi \cdot \varepsilon_{mf}^3} \text{Re}_{mf}^2$	Davidson et al. (1985)
Leva et al. (1956)	$U_{mf} = \frac{7,39 \cdot d_p^{1,82} (\rho_p - \rho_g)^{0,94}}{\rho_g^{0,06}}$	$\text{Re}_{mf} < 5$ Davidson et al. (1985)
Goroshko et al. (1958)	$\text{Re}_{mf} = \frac{Ga}{1400 + 5,2 \sqrt{Ga}}$	Davidson et al. (1985)
Leva (1959)	$U_{mf} = \frac{7,169 \cdot 10^{-4} \cdot d_p^{1,82} (\rho_p - \rho_g)^{0,94} \cdot g}{\rho_g^{0,06} \cdot \mu_g^{0,88}}$	$\text{Re}_{mf} < 10$ Air, He, CO ₂ 0,05 < d _p < 0,097 (mm) Sable, Charbon, Catalyseur Davidson et al. (1985) Wen et al. (1982)
Bena (1960)	$\text{Re}_{mf} = \frac{1,38 \cdot 10^{-3} Ga}{(Ga + 19)^{0,11}}$	$\text{Re}_{mf} < 39$ $Ga < 10^5$
Miller et Logwinuk (1961)	$U_{mf} = 0,00125 \frac{d_p^2 (\rho_p - \rho_g)^{0,9} \rho_g^{0,1} g}{\mu_g}$	0,097 < d _p < 0,249 (mm) Air, He, CO ₂ , C ₂ H ₆ Al ₂ O ₃ , SiC, SiO ₂ , silicagel Davidson et al. (1985)
Rowe et Henwood (1961)	$\text{Re}_{mf} = 8,1 \cdot 10^{-3} Ga$	Davidson et al. (1985)
Davies et Richardson (1966)	$\text{Re}_{mf} = 7,8 \cdot 10^{-4} Ga$	Catalyseur, pvc, diakon. 0,055 < d _p < 0,142 (mm) Davidson et al. (1985)
Frantz (1966)	$\text{Re}_{mf} = 1,065 \cdot 10^{-3} Ga$	$\text{Re}_{mf} < 32$ 0,046 < d _p < 0,305 (mm) H ₂ , N ₂ , Ar, C ₂ H ₆ Sable, Catalyseur Davidson et al. (1985)
Wen et Yu (1966)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(33,7)^2 + 0,0408 \cdot Ga} - 33,7$	Billes de verre, eau. 2,2 < d _p < 6,4 (mm) Davidson et al. (1985)
Bourgeois et Grenier (1968)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(25,46)^2 + 0,03824 \cdot Ga} - 25,46$	Sphères : Lucite, verre, plomb, tungstène Davidson et al. (1985) Dounit, 2001
Kunii et Levenspiel (1969)	$\text{Re}_{mf} = \frac{\psi^2 \varepsilon_{mf}^3}{150(1 - \varepsilon_{mf})} Ga$	$\text{Re}_{mf} < 20$ Davidson et al. (1985) Thonglimp et al. (1984)
Pillai et Raja Rao (1971)	$U_{mf} = 7,01 \cdot 10^{-4} \frac{d_p^2 (\rho_p - \rho_g) g}{\mu_g}$	$\text{Re}_{mf} < 20$ 0,058 < d _p < 1,1 (mm) Air, Solides : Sable, Al, Polystyrène Thonglimp et al. (1984)

Auteur	Corrélation	Commentaire
Geldart et Baeyens (1973)	$Ga = 1823 \text{Re}_{mf}^{1,07} + 21,27 \text{Re}_{mf}^2$ $U_{mf} = \frac{9,125 \cdot 10^{-4} \cdot d_p^{1,8} (\rho_p - \rho_g)^{0,934} \cdot g^{0,934}}{\rho_g^{0,006} \cdot \mu_g^{0,87}}$	0,05 < d _p < 4 (mm) Air 850 < ρ _p < 8810 kg.m ⁻³ Davidson et al. (1985)
Broadhurst et Becker (1975)	$\text{Re}_{mf} = Ga^{0,5} \left[2,42 \cdot 10^5 Ga^{-0,85} \left(\frac{\rho_p}{\rho_g} \right)^{0,13} + 37,7 \right]^{-0,5}$	0,07 < d _p < 1 (mm) Air, >Freon 12 1000 < ρ _p < 8000 kg.m ⁻³ Davidson et al. (1985) Thonglimp (1981)
Saxena et Vogel (1977)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(25,28)^2 + 0,0571 \cdot Ga} - 25,28$	6 < Re _{mf} < 102 Air ρ _p = 3190 kg.m ⁻³ 0,088 < d _p < 1,41 (mm) Davidson et al. (1985)
Babu et al. (1978)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(25,25)^2 + 0,0651 \cdot Ga} - 25,25$	256 < ρ _p < 3920 kg.m ⁻³ 0,05 < d _p < 2,87 (mm) Davidson et al. (1985)
Riba et al. (1978)	$\text{Re}_{mf} = 1,54 \cdot 10^{-2} \cdot \frac{d_p^{1,98} g^{0,66} \rho_g^{0,62} (\rho_p - \rho_g)^{0,7}}{\mu_g^{1,32}}$	Sphères 10 < Re < 1000 Davidson et al. (1985)
Doichev et Akhmakov (1979)	$\text{Re}_{mf} = 1,08 \cdot 10^{-3} Ga^{0,947}$	Billes de verre, Air ρ _p = 2650 kg.m ⁻³ 0,09 < d _p < 2,2 (mm) Davidson et al. (1985)
Richardson et Jeronimo (1979)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(25,7)^2 + 0,0365 \cdot Ga} - 25,7$	Davidson et al. (1985)
Thonglimp et al. (1981)	$\text{Re}_{mf} = 7,54 \cdot 10^{-4} Ga^{0,98}$ $\text{Re}_{mf} = 1,95 \cdot 10^{-2} Ga^{0,66}$	Re _{mf} < 30 30 < Re _{mf} < 180 Thonglimp (1981)
Thonglimp (1984)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(31,6)^2 + 0,0425 \cdot Ga} - 31,6$	Thonglimp et al. (1984)
Nakamura et al. (1985)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(33,95)^2 + 0,0465 \cdot Ga} - 33,95$	Dounits (2001)
Lucas et al. (1986)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(29,5)^2 + 0,0357 \cdot Ga} - 29,5$	20 °C < T < 900 °C Dounits (2001)
Chyang et Huang (1988)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(33,3)^2 + 0,0333 \cdot Ga} - 33,3$	Dounits (2001)
Fatah (1991)	$\text{Re}_{mf} = \left[-7,987 \cdot 10^{-3} + \frac{16,058}{T} \right] Ga^{0,5547 + \frac{2,0841 \cdot 10^{-4}}{T}}$	T = 20°C Dounits (2001)
Tannous et al. (1993)	$\text{Re}_{mf} = \sqrt{(25,83)^2 + 0,043 \cdot Ga} - 25,83$	Dounits (2001)
Erkova et Smirnov	$\text{Re}_{mf} = 5,44 \cdot 10^{-4} Ga$	Dounits (2001)
Hartman et al. (2000)	$Ga = 1608 \text{Re}_{mf} + 46,4 \text{Re}_{mf}^2$	Dolomite Gaz de houille ou de cheminée Hartman et al. , 2000

Travaux réalisés dans le cadre de la thèse

Publications Internationales

- Ali, O, Namane, A, Hellal, A, 2013. Use and recycling of Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol from wastewater. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19:1384-1390.
- Ali, O, Namane, A, Hellal, A, 2012. Microbial degradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* : Operating conditions and kinetic study. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*, 6:35-53.
- Namane, A, Ali, O, Cabana, H, Hellal, A, 2012. Evaluation of biological treatments for the adsorption of phenol from polluted waters. *Adsorption Science & Technology*, 30:521-532.
- Namane, A, Amrouche, F, Ali, O, Hank, D, Hellal, A, 2014. Biodegradation of phenolic wastewaters by calcium alginate immobilized *Aeromonas* species. *Environmental Engineering and Management Journal*, 13:1-6.

Communications nationales et internationales

- O. ALI, A. NAMANE et A. HELLAL, « “Enhanced phenol degradation by free cells of *Pseudomonas aeruginosa* in batch processes” », **Economic Sustainability and Environmental Protection in Mediterranean Countries through Clean Manufacturing Methods, 3 – 7 octobre 2011, Huelva-Spain**
- O. ALI, A. NAMANE et A. HELLAL, « Biodégradation du phénol par des cellules des *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées dans l’alginate de sodium », **Deuxième colloque international de microbiologie les biotechnologies microbiennes de l’eau et développement durable ,2 et 3 juin 2010, fès-MAROC**
- O. ALI, A. NAMANE et A. HELLAL, « Paramètres du choix d’une technique biologique d’élimination du phénol en milieu aqueux », **Congrès international MICROBIOD, 02-05 Novembre 2009, Marrakech-MAROC.**
- O. ALI, A. NAMANE et A. HELLAL, « Etude de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en batch : Influence de la composition du

milieu »**Premier séminaire national sur les bioprocédés (SNBP1) , Médéa, 12 et 13 octobre 2008.**

- O. ALI, A. NAMANE et A. HELLAL, «Traitement des eaux contaminées par les hydrocarbures aromatiques : Biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en batch »**International symposium on biotechnology ,Sfax, TUNISIA May 4th-8th, 2008.**
- A. HELLAL, O. ALI et A. NAMANE « Optimization and kinetics of phenolic industrial wastewaters biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* »**The Egyptian First International Conference in Chemistry (The 17th Egyptian Chemical Conference) Chemistry for Human Needs in Developing Countries 11-14th September 2006, Sharm el-Sheikh. Egypt.**
- O. ALI, A. NAMANE et A. HELLAL, « *Étude de l'influence de la concentration du phénol sur la biodégradation des eaux phénoliques par Pseudomonas aeruginosa en batch* », **3^{ème} Séminaire Scientifique et Technique sur l'Environnement, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, les 05 et 06 Juin 2006.**
- O. ALI, A. NAMANE et A. HELLAL, « *Influence des paramètres opératoires sur la biodégradation du phénol par Pseudomonas aeruginosa en batch* », **Semaine Mondiale de l'Environnement, Ecole Nationale Polytechnique, 31 Mai au 06 Juin 2006**
- O. ALI, A. NAMANE et A. HELLAL, « *Etude de la biodégradation du phénol par Pseudomonas aeruginosa en batch : influence de la concentration initiale du phénol* », **Journée Mondiale de l'Environnement, Ecole Nationale de Santé Militaire, le 05 Juin 2006.**
- O. ALI, A. NAMANE et A. HELLAL, «*Influence de la température dans la biodégradation du phénol par Pseudomonas aeruginosa* », **2^{ème} journées Nationales de Biologie, Université M'hamed BOUGARA de Boumerdès, Faculté des Sciences, Département de Biologie, les 15 et 16 novembre 2005.**



Use and recycling of Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol from wastewater

Oumessaad Ali*, Abdelkader Namane, Amina Hellal

National Polytechnic School, Environmental Engineering Department, Laboratory of Sciences and Environmental Techniques, 10 Avenue Hacem Badi, BP182 El Harrach, 16200 Algiers, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2012

Accepted 28 December 2012

Available online 8 January 2013

Keywords:

Phenol

Biodegradation

Pseudomonas aeruginosa

Immobilization

Ca-alginate biocatalyst

ABSTRACT

The objective of the current work is the exhaustive study of the phenol degradation potential in both free cell and immobilized bacterium (*Pseudomonas aeruginosa*) in calcium alginate beads (biocatalyst) was investigated for its ability to grow and degrade phenol as its sole source of carbon and energy.

The biodegradation assays were performed in liquid medium with phenol being the only substrate. It was found that *P. aeruginosa* is able to degrade phenol up to 500 mg L⁻¹ in 50 h as free cell and 900 mg L⁻¹ in 80 h when immobilized in the calcium alginate beads. However, for 1200 mg L⁻¹ concentration, the immobilized cells took much more time (290 h) for a complete degradation.

The reuse of these beads in different concentrations of phenol (100–900 mg L⁻¹) showed that the cells keep their phenol degradation ability up to 900 mg L⁻¹ in 78.5 h with 99% removal efficiency.

Similarly, the reuse of the biocatalyst in the same initial phenol concentration (500 mg L⁻¹), allows us to get 9 cycles.

© 2013 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phenol compounds are well known elements present in a wide range of wastewater industries including steel, conversion processes of coal [1], coke, petroleum refineries [2,3], metallurgical industries [4], pharmaceutical industries and textile industries [5]. The accumulation of these compounds leads to the contamination of the environment and causes many deleterious effects on the living systems. In fact, phenols are toxic to microorganisms, animals and humans [6]. They have been classified as dangerous pollutants. According to the recommendation of World Health Organization (WHO), the permissible concentration of phenolic contents in potable waters is 1 µg L⁻¹ [7] and the regulations by the Environmental Protection Agency (EPA) [8] call for lowering phenol content in wastewaters to concentrations below 1 mg L⁻¹. Therefore, removal of phenols from waters and wastewaters is an important issue in order to protect public health and environment.

Nowadays, biological methods are widely used as low-cost alternative treatment methods, they offer the possibility of complete mineralization of organic compounds [9]. Phenol degradation by pure and mixed cultures has been the subject of many studies. Several phenol-degrading bacterial strains such as *Pseudomonas* sp. [10,11], *Arthrobacter* sp. [12], *Acinetobacter* sp.

[13], *Rhodococcus* sp. [14], *Moraxella* sp. [15] and *Bacillus* sp. [16] are able to use phenol as a source of carbon and energy [17].

The aerobic genus *Pseudomonas* has been the subject of various studies, and its ability to utilize a wide range of aromatic substrates makes it an attractive organism for use in wastewater treatment applications [15].

After the diffusion of phenol into bacterial cells, molecular oxygen is used by the enzyme phenol hydroxylase to add a second hydroxyl group, to the one already present, in the ortho-position. The reaction requires a reduced pyridine nucleotide (NADH₂). The resulting catechol (1,2-dihydroxybenzene) intermediate is then degraded via one of two pathways.

In the ortho or β-ketoadipate pathway (Fig. 1), the aromatic ring is cleaved between the catechol hydroxyls by a catechol 1,2-dioxygenase (intradiol fission). The resulting *cis,cis*-muconate is further metabolized, via β-ketoadipate, to carbon dioxide as well as succinate and acetyl-CoA, both of which can be further degraded in the TCA cycle [1,18].

The organisms which utilize phenol by aerobic pathways are *Acentobacter calcoeticus*, *Pseudomonas* species and *Candida tropicalis* and most of the eukaryotes typically employ the ortho pathway [15].

In the meta-pathway (Fig. 2), ring fission occurs adjacent to the two hydroxyl groups of catechol (extradiol fission). The enzyme catechol 2,3-dioxygenase transforms catechol to 2-hydroxymuconic semialdehyde. This compound is metabolized further to form acetaldehyde and pyruvate in the Krebs cycle. The meta-pathway

* Corresponding author. Tel.: +213 554 29 27 87.
E-mail address: oumessaad@gmail.com (O. Ali).

Notation

S	substrate concentration (phenol) (mg L^{-1})
S_0	initial Substrate concentration (phenol) (mg L^{-1})
K_S	the half-saturation coefficient (mg L^{-1})
K_I	the inhibition coefficient (mg L^{-1})
μ_{\max}	maximum specific growth rate (h^{-1})
μ	specific growth rate (h^{-1})
IPA	Pasteur Institute of Algiers
MM	minimal medium culture
WHO	World Health Organization

appears to allow the metabolism of a variety of substituted phenolic compounds [1,18], whereas the ortho pathway is more specific, and is used in the catabolism of catechol and precursors of catechol. The ortho pathway is also more common.

Phenol degradation can be achieved in batch [19], fed batch or continuous mode [20]. Batch reactor processes employing either suspended or immobilized cultures are used for the degradation of toxic compounds [21].

The choice of the initial concentration of phenol in the degradation system is of great concern [22]. At a certain concentration, phenol has an inhibitory effect on microbial growth [23,24] and can cause cell lysis. The immobilization of microorganisms offers the privilege of protecting cells from the pollutant's toxic effect and keeps them in a state of continued phenol degradation activity [25–27].

The immobilized cells can be tested in several consecutive phenol-degradation processes (recycling); a recent study indicates that there was no deactivation of cells after repeated use [28].

Immobilizing the cells on a solid-based biomaterial such as alginate could allow the obtention of the maximum degradation capability. Various materials have been used as a matrix for the immobilization of cells, such as calcium alginate [25,29,30], chitin [31,32] and cellulose derivatives [33].

In this study, the phenol biodegradation by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells in alginate beads has been carried out in a batch system. Successive experiments for biodegradation cycles were performed with the same beads. To this day, no studies that have investigated the recycling of biocatalysts in the way it was done in our study were made (to this day, no other study has investigated the recycling of biocatalysts in the way it was done in ours).

2. Materials and methods

2.1. Biological material

The strain used in the present study is *P. aeruginosa* ATCC27853, it was provided by Pasteur Institute of Algiers (IPA).

2.2. Culture medium

A minimal culture medium (MM) that contains the necessary nutrients for the growth of microorganisms was used. Its composition (L^{-1}) is: KH_2PO_4 : 1.5 g, K_2HPO_4 : 0.5 g, NaCl : 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g, NH_4NO_3 : 3.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.02 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.02 g, the final medium pH is maintained at 7 [34]. The solutions of phenol, CaCl_2 , FeSO_4 were added through a sterile filter ($0.45 \mu\text{m}$) in a medium that was previously sterilized by autoclaving.

The phosphate buffer solution (pH = 7) contains 8 g L^{-1} NaCl , 0.2 g L^{-1} KCl , 1.15 g L^{-1} K_2HPO_4 , and 0.2 g L^{-1} KH_2PO_4 in distilled water [25].

2.3. Kinetic models of phenol degradation for free cells

Evaluation of the biokinetic constants has its significance for understanding the degradation capacities of microorganisms as well as for the operation of biological reactors. Kinetic studies on bacterial growth have given rise to considerable amounts of literature, particularly concerning the application of Monod's and Haldane's equations on batch growth results [35].

The Monod model shows a relationship between the growth rate μ of the population of micro-organisms and limiting substrate concentration S ,

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}$$

where: μ_{\max} is the maximum specific growth rate (h^{-1}), S the concentration of substrate (mg L^{-1}) and K_S the half-saturation coefficient or the substrate affinity constant (mg L^{-1}) (the affinity of a bacterium for a substrate) this constant is defined as the substrate concentration at which μ is equal to half μ_{\max} [1,6].

Haldane is one of the most used models to describe the inhibition kinetics of micro-organisms' growth [1,33] represented in the following equation.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + (S^2/K_I)}$$

where K_I is the inhibition coefficient.

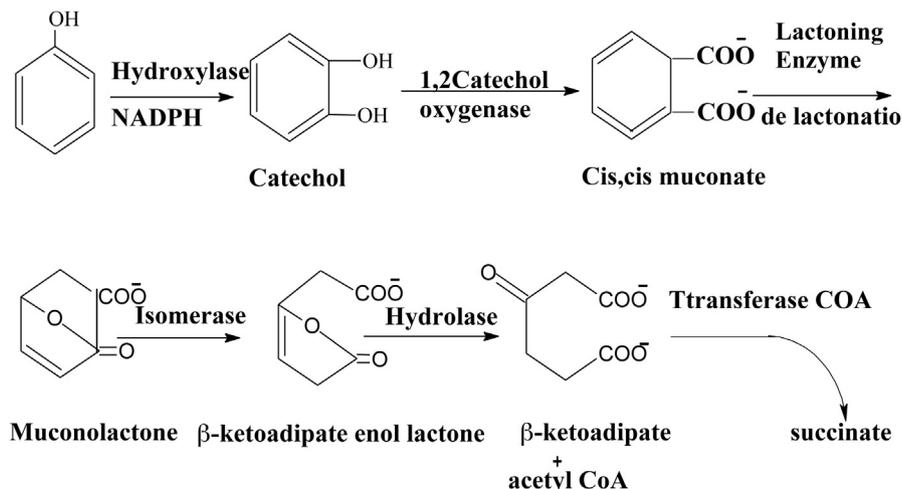


Fig. 1. Ortho pathway (*Trichosporon cutaneum*).

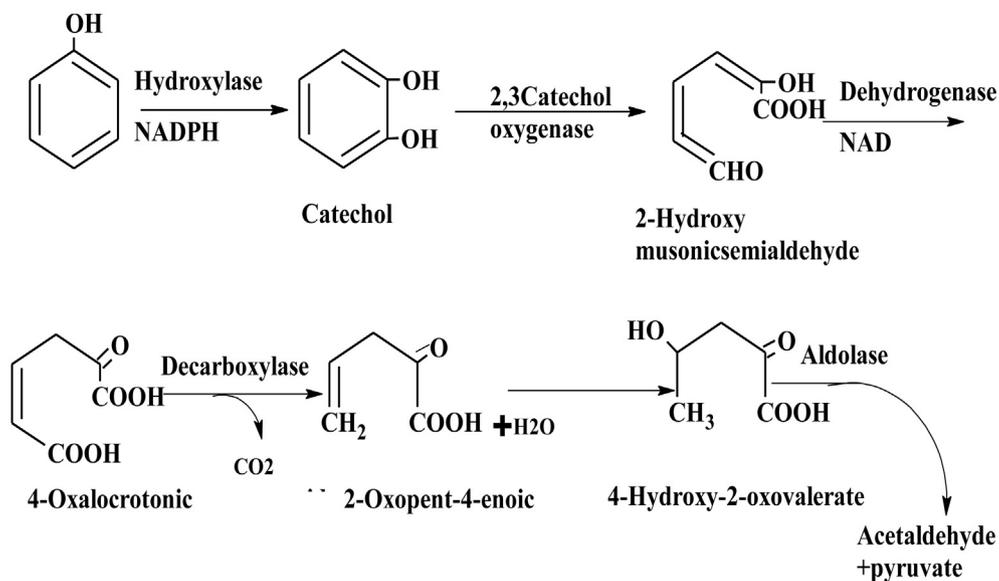


Fig. 2. Meta-pathway (*Pseudomonas putida*).

2.4. Method of immobilization

Cell precultures of *P. aeruginosa* are centrifuged at 6000 rpm for 10 min and then resuspended in phosphate buffer solution (pH = 7) and recentrifuged for a second time. After recovering the pellet, it is washed and resuspended in a (3%) sodium alginate solution previously sterilized for 10 min at 110 °C, with a ratio of 2% (v/v).

The beads were prepared with a pumping facility through which the inoculum/alginate mixture was extruded. The diameter of the beads was controlled by varying the air pressure of the flow using a compressor according to the following values in Table 1 (this method was developed in our laboratory, unpublished data).

The suspension containing the cells with the sodium alginate solution was extruded as drops into a 100 ml calcium chloride solution 0.1 M. The formed beads were transferred into a solution of 0.2 M CaCl₂ and incubated at 37 °C for 1 h to allow the complete replacement of the sodium ions by calcium to ensure a better stability. After washing with sterile distilled water, the beads (Fig. 3) were stored at 4 °C for preservation. All immobilization steps are performed under sterile conditions.

2.5. Measurement of microbial biomass

Microbial biomass is recovered by centrifugation, washed to remove culture medium kept between cells then dried at 105 °C until reaching a constant weight [36]. The sample absorbance is determined by a spectrophotometer (Shimadzu 1601) at 600 nm.

2.6. Phenol dosage

Phenol is quantified by a colorimetric method based on the condensation of 4-aminoantipyrine with phenol in the presence of an oxidizing agent, potassium ferricyanide, in an alkaline medium to give a red complex [37].

The absorbance is determined by a spectrophotometer (Shimadzu 1601) at a 510 nm wavelength.

2.7. Biodegradation tests

Phenol degradation experiments were performed in batch bioreactors at 37 °C under aerobic conditions with immobilized and free cells.

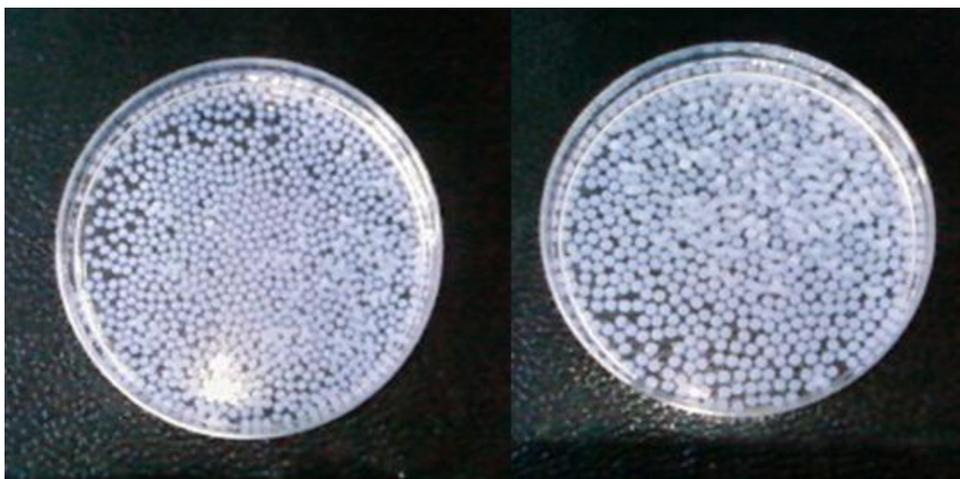


Fig. 3. Alginate beads on which cells were immobilized.

First, phenol biodegradation tests by free cells at different concentrations were carried out in order to determine the maximum concentration from which the degradation process was inhibited.

Then, to prove the effectiveness of the immobilization process, additional tests of biodegradation of phenol have been carried out with immobilized cells.

Finally, and to assess beads reuse, successive experiments of biodegradation cycles have been done using the same beads for the same phenol concentration and increasing phenol concentrations.

3. Results and discussion

3.1. Free cells

Concerning free cells, the bacteria were exposed to phenol concentrations ranging from 100 to 800 mg L⁻¹. The degradation of phenol with pure *P. aeruginosa*, at different initial phenol concentrations is shown in Fig. 4. It is found that the degradation increases with increasing the initial phenol concentration. Phenol was almost completely degraded at low initial concentrations below 400 mg L⁻¹ resulting in no phenol inhibition effects at these concentrations. Initial phenol levels above 500 mg L⁻¹ caused significant inhibitions [38]. This is due to the fact that with a strong amount, the toxicity of the pollutant can prevent any bacterial development and thus inhibit its metabolism, in addition according to Nweke and Okpokwasili [24], exposing bacterial cells to sufficient concentrations of phenol resulted in the inhibition of dehydrogenase activity. In *Pseudomonas* sp. RWW2 and *Escherichia* sp. DISK2, phenol progressively inhibited dehydrogenase activity at 200–1400 mg h⁻¹ at all the exposure times. However, in *Bacillus* sp. DISK1, *Pseudomonas* sp. DAF1 and microbial community, an increase in exposure time resulted in stimulation of dehydrogenase activity at lower concentrations of phenol. The toxicity threshold concentrations of phenol vary among the bacterial strains and the exposure time and indicate that bacteria could acclimate to phenol with an increase in exposure time.

3.1.1. Kinetic models of phenol degradation

3.1.1.1. Monod model. In the range of 100–400 mg L⁻¹, the degradation increases with the initial concentration of phenol. The representation of the inverse growth rate (1/ μ) versus the inverse of the concentration (1/S) in the Monod model, allows determination of $\mu_{\max} = 0.217$ h⁻¹ and $K_S = 40, 59$ mg L⁻¹ (Fig. 5).

3.1.1.2. Haldane model. From an initial phenol concentration of 500 mg L⁻¹, a decrease in the degradation rate due to an inhibitory effect caused by the phenol at high concentrations was observed.

Thus, the Haldane model was used to describe the substrate inhibition. The model parameters were determined as $\mu_{\max} = 0.254$ h⁻¹, $K_S = 40.59$ mg L⁻¹, $K_I = 491.56$ mg L⁻¹ by nonlinear regression analysis (Fig. 6), however according to Rigo et al. [39], the Haldane's parameters for *C. parapsloopsis* grown on phenol were $\mu_{\max} = 0.174$ h⁻¹, $K_S = 11.2$ mg L⁻¹ and $K_I = 298$ mg L⁻¹, this variation of kinetic parameters may be explained by the different inoculum's history. Sokol and Howell obtained, for the same initial phenol concentration, greater values of specific growth rate μ , for younger inocula exposed to lower phenol concentration [40].

Agarry et al. [41] have reported that the Haldane inhibition model may be proposed as one of the best models to describe the phenol degradation behavior of monocultures of *P. aeruginosa*. Yang and Humphrey [37] and Agarry et al. [42] have reported similar observations with Haldane's equation in describing phenol degradation by *P. putida*, *T. cutaneum* and *Pseudomonas fluorescens*, respectively.

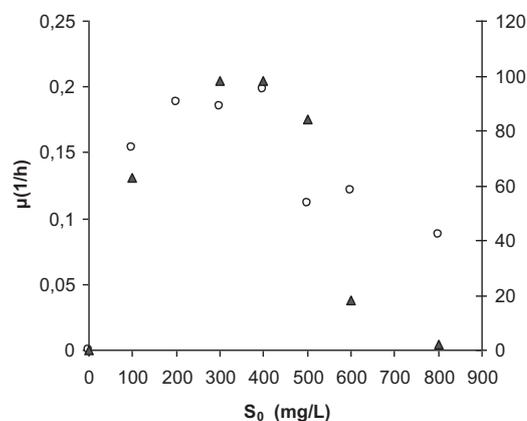


Fig. 4. Concentration effect on phenol degradation and bacterial growth (free cells case). (\diamond) μ (h⁻¹); (\blacktriangle) R (%).

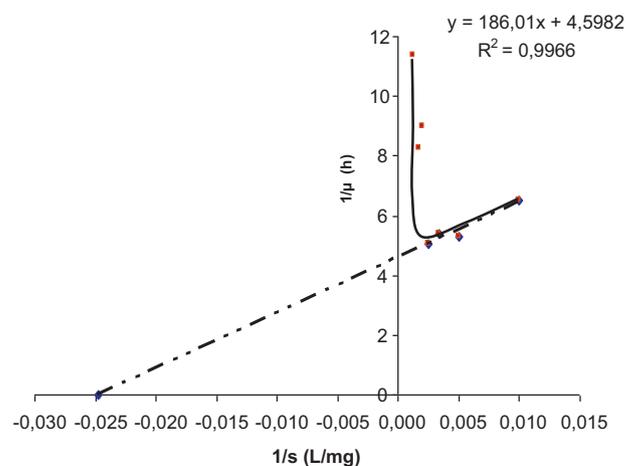


Fig. 5. The kinetic constants determined by Monod model.

Values of the kinetic constants obtained in this work are compared with other published data in Table 2; our kinetic coefficients are within the range of literature references.

However, the comparison of the kinetic parameters is difficult since the pH and temperature conditions are different. As a result, we compared the K_I/K_S ratio. The lower the ratio, the more significant is the inhibition by the substrate.

3.2. Immobilized cells

3.2.1. The effect of initial phenol concentration on phenol degradation rate

In the case of immobilized cells, 100 mg L⁻¹ phenol has been completely removed after 8 h, whereas free cells could not degrade the same concentration after 48 h of treatment. To show the process effectiveness, several experiments have been performed at different phenol initial concentrations ranging from 100 to 1200 mg L⁻¹. The results are very promising (Fig. 7), because not only the cells were able to degrade phenol amounts that exceed the inhibitory concentration (500 mg L⁻¹ for free cells), the carrier material of the immobilized cell could act as a protective shelter

Table 1
Determination of beads diameter in function of the pressure.

Air pressure (bar)	0	0.175	0.25	0.3
Diameter beads (mm)	4	3	2	1

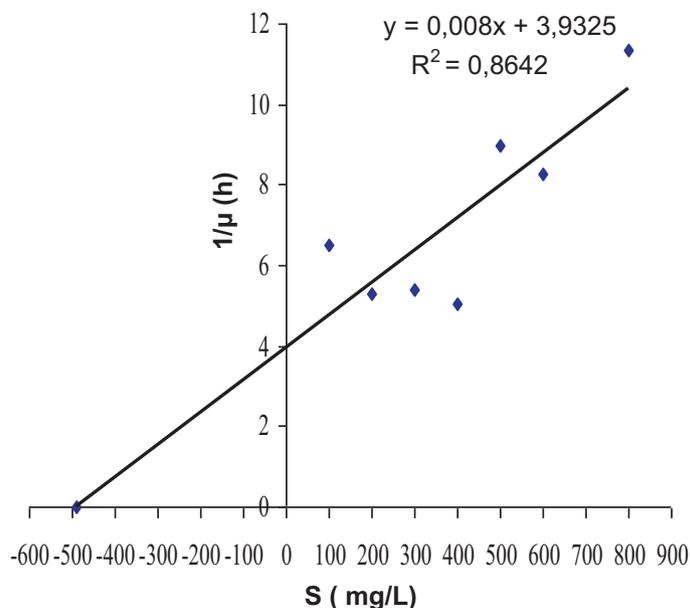


Fig. 6. Kinetic constants determined by Haldane model.

Table 2

Kinetic constants for phenol biodegradation by a pure and mixed culture in batch reactor (Haldane equation).

Culture	μ_{\max} (h^{-1})	K_S (mg L^{-1})	K_I (mg L^{-1})	K_I/K_S	References
<i>Pseudomonas putida</i>	0.438	21.460	477.640	22.257	[43]
MC-1	0.379	18.821	449.150	23.864	[43]
<i>Nocardia</i> sp.	0.423	26.770	261.720	9.777	[43]
<i>Bacillus circulans</i>	0.274	1.753	1743.090	994.347	[43]
<i>Pseudomonas putida</i> CCRC14365	0.330	13.900	669.000	48.129	[25]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0165	–	29.700	–	[42]
<i>Conidia parapsilopsis</i>	0.174	11.200	298.000	26.607	[44]
Yeast <i>Candida tropicalis</i>	0.385	7.100	185.000	26.056	[45]
<i>Trichosporon cutaneum</i>	0.464	1.660	380.000	228.916	[37]
Mixed culture	0.150	51.800	404.040	7.800	[46]
Activated sludge	0.438	29.500	72.400	2.454	[47]
Activated sludge	0.119	11.130	250.88	22.541	[48]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	0.250	40.590	491.560	12.110	This study

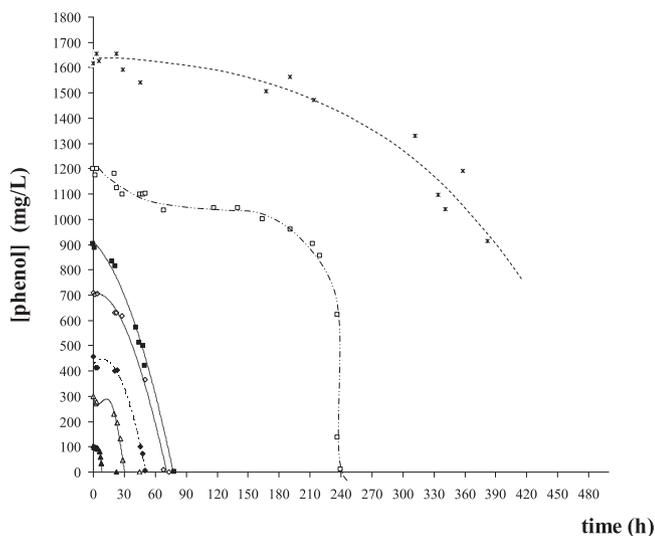


Fig. 7. Kinetics of phenol degradation (100–1200 mg L^{-1}) by cells immobilized in alginate beads ($d = 2$ mm, $\text{DO}_{600} = 0.6$). (Δ) 100 mg L^{-1} ; (\blacktriangle) 300 mg L^{-1} ; (\blacklozenge) 500 mg L^{-1} ; (\diamond) 700 mg L^{-1} ; (\blacksquare) 900 mg L^{-1} ; (\square) 1200 mg L^{-1} ($*$) 1600 mg L^{-1} .

against the toxicity of phenol. In addition, it has been demonstrated that immobilization of viable cells could alter their physiological and metabolic features such as enhanced enzyme induction, reduced specific cell growth and cell yield [13,25]. The immobilized cells consumed the entire quantity in a relatively short time as well. Indeed, it took about 80 h to degrade 700 and 900 mg L^{-1} of phenol. The same period of time was necessary to degrade 1000 mg L^{-1} of phenol by *Pseudomonas* sp. CP4, according to Aneez Ahmad and Mohammad Kunhi [29]. However, for a concentration of 1200 mg L^{-1} , the cells took much more time (290 h) for a complete degradation.

A recent study indicates that *P. aeruginosa* adsorbed on diatomaceous earth pellets (celite R-635) and packed in column bioreactors were used to degrade phenol up to 1200 ppm in inorganic defined medium [1]. Whereas once the concentration was increased to 1500 mg L^{-1} , the cells were inhibited.

3.3. Recycling of beads

Stability during long-term operation is important for practical applications of the immobilized cell system. In order to determine if there was a deactivation of the cells after repeated use, the immobilized cells were tested in several consecutive cycles of phenol-degradation processes.

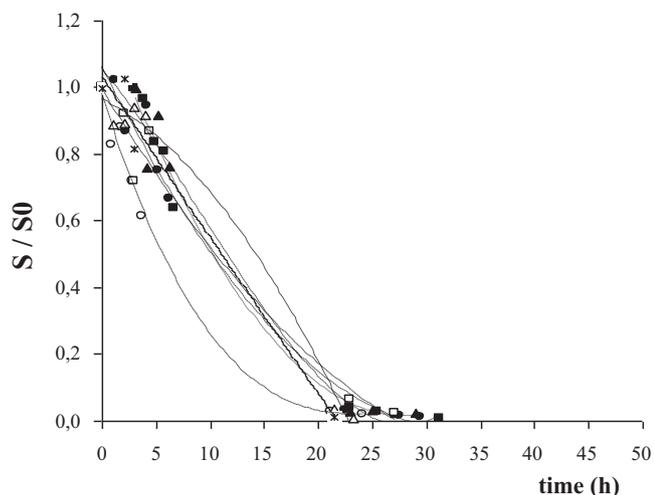


Fig. 8. Alginate beads recycling ($d = 3$ mm, $DO_{600} = 0.2$, 100 mg L^{-1} phenol). (■) 1st recycling; (◇) 2nd recycling; (◆) 3rd recycling; (▲) 4th recycling; (△) 5th recycling; (□) 6th recycling; (*) phenol biodegradation test.

3.3.1. Recycling of beads for the same phenol concentration

The results obtained by recycling the beads, allowed us to observe that at an initial concentration of 100 mg L^{-1} , the reuse of beads (6 cycles) did not significantly affect the kinetics of biodegradation (Fig. 8), the efficiency was 100% after 20–27 h.

Similarly, for a 500 mg L^{-1} initial concentration, recycling (9 cycles) does not affect the kinetics of biodegradation, the efficiency is 100% after a period of time between 17 h and 27 h (Fig. 9), while Abd-El-Haleem et al. [49] could only get 5 cycles for the same concentration.

We have to note that the majority of cases follow the same kinetics and a total removal of phenol is observed after 22–24 h, except for the 1st and 2nd recycling (adaptation effect).

3.3.2. Recycling of beads for increasing phenol concentrations

To determine the effect of initial concentration on phenol degradation rate, a series of experiments have been carried out by increasing the concentration in each cycle. The latter varies between 100 and 900 mg L^{-1} , with a biomass density of 0.6 . Fig. 10 shows that immobilized microorganisms could be exposed to high

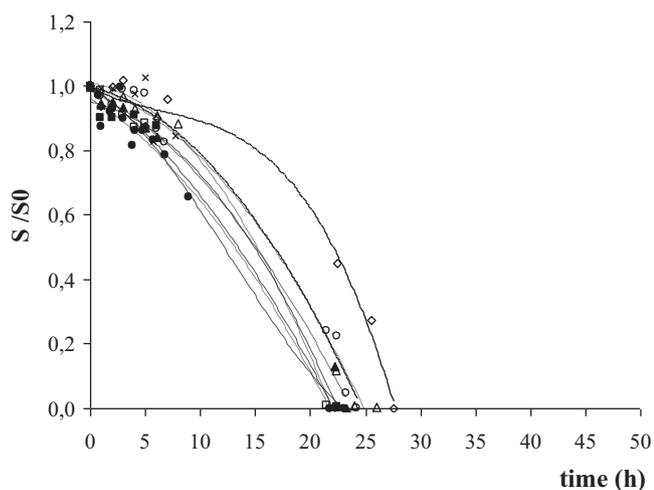


Fig. 9. Alginate beads recycling ($d = 2$ mm, $DO_{600} = 0.6$, 500 mg L^{-1} phenol). (◇) 1st recycling; (◆) 2nd recycling; (▲) 3rd recycling; (■) 4th recycling; (○) 5th recycling; (□) 6th recycling; (△) 7th recycling; (+) 8th recycling; (×) 9th recycling.

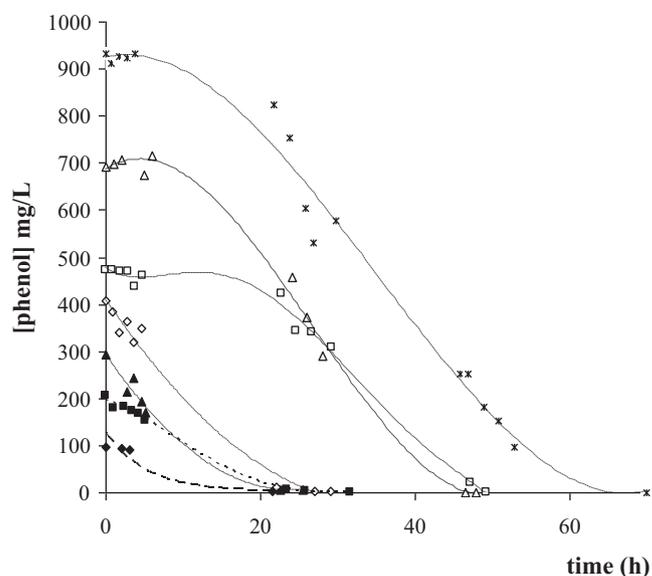


Fig. 10. Alginate beads recycling ($d = 3$ mm, $DO_{600} = 0.2$). (◆) Phenol biodegradation test (100 mg L^{-1}); (■) 1st recycling for 200 mg L^{-1} ; (▲) 2nd recycling for 300 mg L^{-1} ; (◇) 3rd recycling for 400 mg L^{-1} ; (□) 4th recycling for 500 mg L^{-1} ; (△) 5th recycling for 700 mg L^{-1} ; (*) 6th recycling 900 mg L^{-1} .

phenol concentrations without losing their cell viability, however the phenol degradation time increases with the concentration without exceeding 70 h.

Once the experiment was redone under the same conditions and using biomass $OD = 0.9$ diameter of $d = 2$ mm beads (Fig. 11), a significant reduction in the degradation time has been observed for concentrations 100 , 300 and 500 mg L^{-1} .

For 700 mg L^{-1} concentration, the same results were obtained. However, near the end of the experiment, shearing of the beads was observed which led to the release of the cells and thus slowing the degradation kinetics. Despite the beads' physical state (shearing) they have been reused for a 9th cycle and were able to degrade 900 mg L^{-1} of phenol in 65 h, which confirms that recycling has allowed the cells to adapt to the environment in which it is located: adaptation effect.

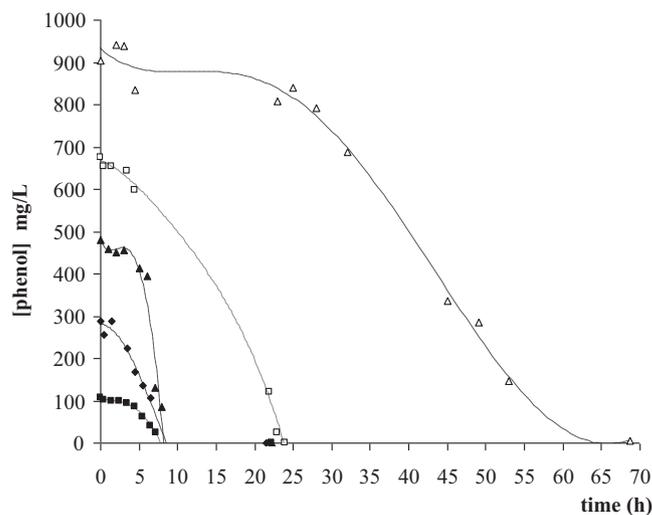


Fig. 11. Recycling alginate beads ($d = 2$ mm, $DO_{600} = 0.9$). (■) Phenol biodegradation test (100 mg L^{-1}); (◆) 1st recycling for 300 mg L^{-1} ; (▲) 2nd recycling for 500 mg L^{-1} ; (□) 3rd recycling for 700 mg L^{-1} ; (△) 4th recycling for 900 mg L^{-1} .

4. Conclusion

Environmental pollution is one of the major issues of our time, phenol has become one of the major industrial effluents and the environmental degradation has become a hectic problem. Many physical and chemical methods have been used for phenol degradation, but biological treatments have turned out to be favorable alternatives. It is a relatively cheaper and effective process and releases less harmful products. The current challenge is to select effective species and find the best conditions in this regard.

Immobilization of microorganisms on inert supports shows an increasing interest since this strategy allows obtaining much more benefits from the process. Immobilization may improve microbial performance, and provide good operational stability.

The main advantages in the use of immobilized cells in comparison with suspended ones include retention in the reactor of higher concentrations of microorganisms, protection of cells against toxic substances, and the elimination of the costly processes of cell recovery and recycling.

The biodegradation assays were performed in liquid medium with phenol as the single substrate. It is found that *P. aeruginosa* ATCC27853 immobilized in calcium alginate beads is able to degrade high concentrations of phenol.

The phenol biodegradation study with free microorganisms has shown that 500 mg L⁻¹ is the growth inhibitory concentration illustrated by the Haldane model. The Haldane equation described cell growth adequately, with kinetic constants specific growth rates ($\mu_{\max} = 0.250 \text{ h}^{-1}$), half-saturation coefficient ($K_S = 40.59 \text{ mg L}^{-1}$) and substrate inhibition constant (491.56 mg L⁻¹).

The immobilization improved the performance of free cells process, 900 mg L⁻¹ of phenol was degraded in a very short time.

In addition, recycling the immobilized cells in different phenol concentrations (100–900 mg L⁻¹) shows a degradation of high phenol concentration, the degradation time is proportional to phenol concentration without deactivation of cells after repeated use.

References

- [1] K.M. Basha, A. Rajendran, V. Thangavelu, *Asian Journal of Experimental Biology* 1 (2010) 219.
- [2] A. Bódalo, E. Gómez, A.M. Hidalgo, M. Gómez, M.D. Murcia, I. López, *Desalination* 246 (2009) 307.
- [3] J. Mamatha, A.B. Vedamurthy, S.D. Shruthi, *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2 (2012) 426.
- [4] F. Zhang, M. Li, W. Li, C. Feng, Y. Jin, X. Guo, J. Cui, *Chemical Engineering Journal* 175 (2011) 349.
- [5] A. Nuhoglu, B. Yalcin, *Process Biochemistry* 40 (2005) 1233, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.003>.
- [6] B. Marrot, A. Barrios-Martinez, P. Moulin, *Biochemical Engineering Journal* 30 (2006) 174, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2006.03.006>.
- [7] World Health Organization, *Guidelines for Drinking Water Quality. Vol. II: Health Criteria and Supporting Information*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1984.
- [8] Environmental Protection Agency EPA method 604, *Phenols in Federal Register, Part VIII*, 40 CFR Part 136 Washington, DC, 1984, p. 58.
- [9] R. Pishgar, G. Najafpour, B.N. Neya, N. Mousavi, Z. Bakhshi, *Iranica Journal of Energy and Environment* 2 (2011) 348, <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.ijee.02.04.2361>.
- [10] D. Kotresha, Æ.G.M. Vidyasagar, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (2008) 541, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9508-2>.

- [11] A. Al-Mahin, M.A.Z. Chowdhury, A.N.M. Fakhruddin, in: *Proceedings of the International Conference on Future Environment and Energy, IPCBEE*, vol. 28, IACSIT Press, Japan, 2010.
- [12] P.A. Sujith, N.K. Sahoo, K. Pakshirajan, P.K. Ghosh, *International Conference on Future Environment and Energy, IPCBEE*, vol. 28, 2012, p. 134.
- [13] Y. Wang, Y. Tian, B. Han, H.B. Zhao, J. Bi, B.L. Cai, *Journal of Environmental Sciences* 19 (2007) 222.
- [14] C.E. Paisio, M.A. Talano, P.S. González, V.D. Busto, J.R. Talou, E. Agostini, *Environmental Science and Pollution Research* 19 (2012) 3430.
- [15] K. Fahmida, A.N.M. Fakhruddin, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 11 (2012) 261.
- [16] V. Arutchelvan, V. Kanakasabai, R. Elangovan, S. Nagarajan, V. Muralikrishnan, *Journal of Hazardous Materials* 129 (2006) 216.
- [17] S. Chakraborty, T. Bhattacharya, T.N. Patel, K.K. Tiwari, *Journal of Environmental Biology* 31 (2010) 293.
- [18] V. Sridevi, M.V.V. Chandana Lakshmi, M. Manasa, M. Sravani, *International Journal of Advanced Science and Technology* 2 (2012) 695.
- [19] M.H. El-Naas, S. Al-Zuhair, S. Makhlof, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 16 (2010) 267.
- [20] J. Galíndez-Mayer, J. Ramón-Gallegos, N. Ruiz-Ordaz, C. Juárez-Ramírez, A. Salmerón-Alcocer, H.M. Poggi-Varaldo, *Biochemical Engineering Journal* 38 (2008) 147.
- [21] Z. Duan, *Environment Protection Engineering* 37 (2011) 53.
- [22] A.M. Hannaford, C. Kuek, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 22 (1999) 121.
- [23] O.J. Hao, M.H. Kim, E.A. Seagren, H. Kim, *Chemosphere* 46 (2002) 797.
- [24] C.O. Nweke, G.C. Okpokwasili, *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 2 (2010) 020.
- [25] T.P. Chung, H.Y. Tseng, R.S. Juang, *Process Biochemistry* 38 (2003) 1497, [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00038-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00038-4).
- [26] Jagannath C. Kadakol, Chandrapa M. Kamanavalli, Y. Shouche, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (2011) 25, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0422-7>.
- [27] F. Wang, Y. Hu, C. Guo, W. Huang, C.Z. Liu, *Bioresource Technology* 110 (2012) 120, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.184>.
- [28] Z. Leilei, H. Mingxin, Z. Suiyi, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 26 (2012) 137.
- [29] P.Y. Aneez Ahamad, A.A. Mohammad Kunhi, *Biodegradation* 22 (2011) 253, <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-010-9392>.
- [30] A. Banerjee, A.K. Ghoshal, *International Biodeterioration and Biodegradation* 65 (2011) 1052.
- [31] Y.M. Chen, T.F. Lin, C. Huangb, J.C. Lin, F.M. Hsieh, *Journal of Hazardous Materials* 148 (2007) 660.
- [32] S.K. Nadavala, K. Swayampakula, V.M. Boddu, K. Abburi, *Journal of Hazardous Materials* 162 (2009) 482, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.070>.
- [33] G. Annadurai, L.Y. Ling, J.F. Lee, *African Journal of Biotechnology* 6 (2007) 296.
- [34] R.Y. Sheeja, T. Murugesan, *Journal of Hazardous Materials* 89 (2002) 287, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3894\(01\)00319-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3894(01)00319-3).
- [35] P. Kumaran, Y.L. Paruchuri, *Water Research* 31 (1997) 11, [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)80001-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(99)80001-3).
- [36] R. Scribon, *Biotechnology*, 5th ed., Tech et Doc, Paris, France, 1999.
- [37] R.D. Yang, A.E. Humphrey, *Biotechnology and Bioengineering* 17 (1975) 1211.
- [38] I. Banerjee, M. Jayant, Modak, K. Bandopadhyay, D. Das, B.R. Maiti, *Journal of Biotechnology* 87 (2001) 211, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00235-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00235-8).
- [39] M. Rigo, R.M. Alegre, J.R. Mazile, V. Bezerra, N. Coelho, R.G. Bastos, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53 (2010) 481.
- [40] Á.A.M.G. Monteiro, R.A.R. Boaventura, A.E. Rodrigues, *Biochemical Engineering Journal* 6 (2000) 45.
- [41] S.E. Agarry, B.O. Solomon, T.O.K. Audu, *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research* 1 (2010) 22.
- [42] S.E. Agarry, B.O. Solomon, S.K. Layokun, *African Journal of Biotechnology* 7 (2008) 2417.
- [43] V. Vijayagopal, T. Viruthagiri, *Indian Journal of Biotechnology* 4 (2005) 565.
- [44] M. Rigo, R.M. Alegre, *Folia Microbiologica* 49 (2004) 41.
- [45] S.A. Sunil, M.-Y. Chen, D.-J. Lee, N.-Q. Ren, *Biotechnology and Bioengineering* 96 (2007) 844.
- [46] S. Dey, S. Mukherjee, *International Journal of Water Resources and Environmental Engineering* 2 (2010) 40.
- [47] B. Marrot, A. Barrios-Martinez, P. Moulin, N. Roche, *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 6 (2008) 174.
- [48] H. Ucin, E. Yildiz, A. Nuhoglu, *Bioresource Technology* 101 (2010) 2965, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.005>.
- [49] D. Abd-Ehaleem, U. Beshay, A.O. Abdelhamid, H. Moawad, S. Zaki, *African Journal of Biotechnology* 2 (2003) 8.

المخلص:

الهدف من العمل الحالي هو دراسة مستفيضة للإمكانات التخلص من الفينول بواسطة استعمال بكتيريا حرة وأخرى مثبتة في حبيبات الألبينات. استعملت (*Pseudomonas aeruginosa*) المثبتة في حبيبات الألبينات في التفاعلات بيولوجيا لتحليل الفينول لقدرتها على النمو باستخدامه كمصدر وحيد للكربون والطاقة وذلك في مفاعلات ذات تشغيل مستمر وغير مستمر. لذلك تم دراسة تأثير العديد من الظروف المخبرية على تحليل البيولوجي للفينول فنتج عن ذلك ان افضل سرعة لهذا تحلل كانت في وسط ذو درجة حموضة 7 وتحت درجة حرارة 37° لبيكتيريا مثبتة في حبيبات ذات نسبة الجينات 3 بالمئة وتركيز كتلي للبيكتيريا المثبتة 0.260 ملغ.ل⁻¹ فيما لوحظ تأثير بسيط لقطر حبيبات الألبينات على هذه السرعة. زيادة على ذلك اثبتت قدرة البكتريا على التخلص من 500 ملغ.ل⁻¹ في مدة 50 ساعة وهي حرة بينما عندما ثبتت استطاعت تحليل 900 ملغ.ل⁻¹ في مدة 80 ساعة. اثبتت النتائج المخبرية ان خلايا البكتريا المثبتة تحتفظ بقدرتها على تحليل الفينول وتعودها على المحيط الذي توجد فيه خلال مختلف دورات الرسكة (حتى 9 دورات).

تم تحديد انتشارية الفينول في حبيبات الألبينات بتعديل البيانات التجريبية بنموذج حركي من الدرجة الاولى باستعمال اسس مبادئ الهندسة الكيميائية في الانتشار وتفاعل المواد العضوية في حبيبة الألبينات. وبمقارنة معامل الفعالية التي تم الحصول عليه سمح لنا تأكيد مقاومة انتشار الفينول من طرف الحبيبات الى حد ما والذي اكدته قيمة معامل الانتشار $0.1 \cdot 10^{-6}$.

مكنتنا دراسة التحلل البيولوجي المستمر باستعمال مفاعل السرير المميع بواسطة البكتريا المثبتة في حبيبات ألبينات الكلسيوم من تحقيق كفاءة ازالة بنسبة 94 بالمئة وذلك بالنسبة لتركيز 50 ملغ.ل⁻¹ بينما تم الحصول على معدل التحلل 100 بالمئة وذلك بالنسبة لكل التراكيز حتى بلوغنا تركيز 700 ملغ.ل⁻¹ عند استعمالنا لمفاعل محرك.

كلمات مفاتيح

ألبينات الكالسيوم , التحلل البيولوجي , سرير مميع , الفينول .

Résumé:

Le but de ce travail est d'étudier la biodégradation du phénol par des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* libres et immobilisées dans des billes d'alginate de calcium. Ces microorganismes vont utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie pour des cinétiques en batch et en système continu. L'influence des paramètres expérimentaux, ont permis de constater que la vitesse optimale de biodégradation du phénol a été obtenue à un pH de 7, une température de 37°C et 0,260 mg.L⁻¹ de biomasse immobilisée dans 3% d'alginate. Toutefois, cette vitesse a été peu affectée par la taille des billes d'alginate dans un intervalle de diamètre compris entre 1 et 4 mm.

De plus, il a été constaté que *Pseudomonas aeruginosa* été capable de dégrader 500 mg.L⁻¹ de phénol en 50h en culture libre et 900 mg.L⁻¹ en 80h lorsqu'elle était immobilisée.

L'étude du recyclage a permis d'avoir plusieurs cycles (9 cycles) et a montré que les cellules immobilisées conservent leur capacité de dégradation et peuvent s'adapter à l'environnement dans lequel elles se trouvent.

La détermination des coefficients de transfert de masse a permis de constater que le processus de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisée dans les billes d'alginate est limité par la diffusion avec un coefficient de diffusivité $D_{eff} = 0,10 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

L'étude de biodégradation du phénol par de *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées dans des billes l'alginate de calcium en mode continu a permis d'obtenir un rendement d'élimination de 94% pour une concentration initiale de 50 mg.L⁻¹ en lit fluidisé. Tandis qu'en réacteur agité, un taux d'abattement qui avoisine les 100% a été obtenu pour des concentrations pouvant aller jusqu'à 700 mg.L⁻¹.

Mots clé : phénol, biodégradation, immobilisation, alginate de calcium, transfert de masse, lit fluidisé.

Abstract :

The objective of the current work is the exhaustive study of the phenol degradation potential in both free and immobilized bacterium (*Pseudomonas aeruginosa*) in calcium alginate beads. *P.aeruginosa* immobilized in these beads were used in phenol biodegradation; for its ability to grow and to degrade phenol as its sole source of carbon and energy in batch and continuous reactors. The effect of the numerous reaction conditions for phenol degradation by immobilized *P.aeruginosa*, have been investigated so the optimum biodegradation Rate of phenol was obtained at pH 7, T°C) 37, 3% alginate and 0,260 mg.L⁻¹ of biomass immobilized. However this rate was little affected by size of alginate beads between 1and4mm.In addition, It was found that *P. aeruginosa* is able to degrade phenol up to 500 mg.L⁻¹ in 50 h as free cell and 900 mg.L⁻¹ in 80 h when immobilized in the calcium alginate beads. However, for 1200 mg.L⁻¹ concentration, the immobilized cells took much more time (290 h) for a complete degradation.

The reuse of these beads in different concentrations of phenol (100 – 900 mg.L⁻¹) showed that the cells keep their phenol degradation ability up to 900 mg.L⁻¹ in 65h with 99% removal efficiency. Similarly, the reuse of the biocatalyst in the same initial phenol concentration (500 mg.L⁻¹), allows us to get 9 cycles.

The phenol biodegradation study of *Pseudomonas aeruginosa* immobilized in calcium alginate beads in continuous mode provided a removal efficiency of 94% for an initial concentration of phenol 50 mg.L⁻¹ by bed fluidized. While in stirred reactor, an abatement rate of around 100% was obtained for concentration up to 700 mg L⁻¹.

Keywords: phenol, biodegradation, immobilization, Calcium alginate, mass transfer, fluidised bed.