

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



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
Ecole Nationale Polytechnique

Ecole Nationale supérieur Polytechnique  
Département de Génie de l'environnement

Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Présenté par :

*M<sup>lle</sup> SAIDANI NAWEL*

Pour l'obtention du diplôme  
D'Ingénieur en Génie de l'Environnement

Thème :

*Modélisation de la biodégradation du phénol dans l'eau en batch  
par application des plans d'expériences*

*Proposé par :* M<sup>lle</sup> D. HANK

M<sup>me</sup> S. ZEBOUDJ

*Soutenu devant le jury suivant :*

**Présidente :** M<sup>me</sup> A. HELLAL    Professeur    ENSP

**Examineurs :** Mr A. NAMANE    Maître de conférences    ENSP

Mr A. CHERGUI    Chargé de cours    ENSP

**Promotion : 2009**

**ENP, AVENUE HASSAN BADI, EL-HARRACH, ALGER**

*Dédicace*

*À celui qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la science et la volonté forgent les grands esprits*

*À mon père*

*À celle qui m'a appris que la patience est la clé du succès et de la Victoire.*

*À ma mère*

*À ceux qui m'ont toujours soutenu et encouragé psychologiquement*

*À mes frères et sœurs*

*Tous m'ont couvert avec la chaleur de leurs amours et leurs soutiens*

*Je leur dédie les premiers fruits de ma réussite et prie dieu le tout puissant de leur donner santé et longue vie*

*Ainsi à tous les amis (e) qui ont répondu à notre invitation.*

*Nawel*

## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier **Dieu** le tout puissant pour m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour aboutir à la réalisation de ce travail.*

*Ce travail a été réalisée au laboratoire des sciences et techniques de l'environnement du département de Génie de l'environnement de L'ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUES d'Alger.*

*Je remercie, vivement et profondément, ma promotrice M<sup>lle</sup>. HANKE DALILA, pour sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse qui n'a cessé de m'aider, de me soutenir et de me prodiguer les précieux conseils. Je Lui suis fortement reconnaissante.*

*Mes remerciements s'adressent également à M<sup>me</sup> S. ZEBOU DJ, qui a bien voulu encadrer ce mémoire.*

*Je remercie vivement madame A.HELAL, professeur à l'ENSP, pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire des sciences et techniques de l'environnement de l'ENSP et mis à notre disposition tout le matériel et réactifs nécessaires à la réalisation de ce travail. et pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.*

*Je remercie également monsieur A.CHERGUI Chargé de cours à l'ENSP, monsieur A.NAMANE, maître de conférences à l'ENSP Pour avoir accepté d'examiner le présent mémoire.*

*Ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements s'adressent à à toute personne ayant contribué à la réalisation de ce travail, particulièrement les ingénieurs et étudiants en post graduation du département du Génie de l'Environnement (Oum-Essaad, Latifa, Saida, Wafa) pour leur soutien et toute l'aide qui m'ont apportée.*

*Je tiens également à remercier mes amis et camarades de promotion pour leur sincère Amitié et leur précieux soutien.*

## **LISTE DES TABLEAUX :**

<i>Tableau N° I-1</i>	principales propriétés physico-chimiques du phénol.....	5
<i>Tableau N° I-2</i>	Principaux producteurs du phénol.....	11
<i>Tableau N° III-1</i>	la matrice des expériences et des réponses.....	37
<i>Tableau N° III-2</i>	Analyse de la variance.....	42
<i>Tableau N° V-5</i>	les niveaux de variation des facteurs.....	59
<i>Tableau N° V-5-1</i>	Les essais de plan d'expérience.....	59
<i>Tableau N° V-5-3</i>	Plan d'expérimentation utilisé.....	61
<i>Tableau N° V-5-4</i>	Détermination des coefficients du modèle .....	61
<i>Tableau N° V-6-1</i>	Statistique de la régression du modèle .....	62
<i>Tableau N° V-6-2</i>	comparaison des réponses expérimentales et estimées .....	63
<i>Tableau N° V-6-3</i>	Analyse des résidus .....	64
<i>Tableau N° V-6-4</i>	Intervalle de confiance des coefficients du modèle .....	66
<i>Tableau N° V-6-5</i>	Analyse de la variance .....	67

## **LISTE DES FIGURES :**

<b>Figure N° I-1</b>	<i>structure du phénol.....</i>	4
<b>Figure N° I-2</b>	<i>Mécanisme de la biodégradation aérobie des phénols par la voie méta. ....</i>	9
<b>Figure N° II-1</b>	<i>cellules bactériennes.....</i>	14
<b>Figure N° II-2.a</b>	<i>La duplication de l'ADN pendant la reproduction cellulaire.....</i>	14
<b>Figure N° II-2.b</b>	<i>Bactérie en phase de croissance prête à se diviser.....</i>	15
<b>Figure N° II-3.a</b>	<i>pseudomonas aeruginosa (Coloration de Gram).....</i>	15
<b>Figure N° II-3.b</b>	<i>profil d'une bactérie du genre Pseudomonas.....</i>	15
<b>Figure N° II-4.a</b>	<i>Bactérie Pseudomonas aeruginosa (au microscope électronique à balayage).....</i>	17
<b>Figure N° II-5</b>	<i>Caractères culturels des Pseudomonas aeruginosa.....</i>	19
<b>Figure N° II-6</b>	<i>Les phases de la croissance bactérienne en milieu liquide.....</i>	20
<b>Figure N° III-1</b>	<i>schéma représentant les facteurs et les réponses.....</i>	27
<b>Figure N° IV -1</b>	<i>Dosage du phénol par la 4-amino antipyrine. ....</i>	47
<b>Figure N° V.1</b>	<i>comparaison de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol dans deux milieux minéraux M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub>.....</i>	51
<b>Fig. V.1-1</b>	<i>les rendements d'élimination du phénol dans les deux milieux de cultures (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>).....</i>	52

<b>Figure V-2</b>	<i>Influence de la variation de la température sur la cinétique bactérienne et la biodégradation du phénol.....</i>	54
<b>Figure V-3</b>	<i>Influence de la nature des bactéries (jeune et vieille) sur la dégradation du phénol.....</i>	55
<b>Figure V-4-1</b>	<i>Evolution de la croissance bactérienne et de la dégradation du phénol dans le cas de bactéries non adaptés au phénol.....</i>	57
<b>Figure V-4-2</b>	<i>Evolution de la croissance bactérienne et de la dégradation du phénol dans le cas de bactéries adaptés au phénol.....</i>	58
<b>Figure V-5-2</b>	<i>L'évolution de la dégradation du phénol et de la croissance bactérienne pour les quatre essais du plan d'expérience .....</i>	60
<b>Figure V-6-2</b>	<i>Courbes de régression.....</i>	63
<b>Figure V-7-1</b>	<i>Résultats de l'essai confirmatif au centre du domaine d'étude des variables.....</i>	68

# Sommaire

## SOMMAIRE

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	II
Liste des abréviations.....	III
Liste des figures.....	IV
Introduction générale.....	1
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PHENOL.....	4
I-1 Définition du phénol : .....	4
I-2 Caractéristiques du phénol : .....	4
I-3 Principes de production du phénol : .....	6
I-4 Domaine d'utilisation .....	7
I-5 Comportement du phénol dans l'environnement.....	7
I-6 Dégradation, produits de décomposition : .....	8
I-7 La biodégradation du phénol .....	8
I-7-1 Définition de la biodégradation .....	8
I-7-2 La biodégradation du phénol. ....	9
I-7-3 Les principales bactéries pouvant dégrader le phénol: .....	10
I-8 Toxicité du phénol .....	10
I-9 Production .....	11
I-10 Normes de rejets de phénol .....	12
CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES PSEUDOMONAS.....	14
II-1 Généralités sur les bactéries .....	14
II-2 Généralité sur les Pseudomonas .....	15
II-3 Caractéristiques des PSEUDOMONAS :.....	16
II-4 PRINCIPALES ESPÈCES DES PSEUDOMONAS [31,32] : .....	16
II-5 Pseudomonas aeruginosa.....	17
II-5-1 Caractères bactériologiques :.....	17
II-5-2 Pouvoir pathogène : .....	19
II-5-3 Caractères biochimiques .....	19
II-5-4 Caractères Génétique .....	19
II-5-5 Sensibilité aux antibiotiques : .....	20
II-6 La croissance bactérienne.....	20
II-6-1 Courbe de croissance : .....	20
II-6-2 Les paramètres de la croissance bactérienne : .....	21
II-6-3 Modélisation de la croissance bactérienne.....	22
II-6-4 Mesure de la biomasse bactérienne : .....	23
CHAPITRE III : METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES.....	25
III-1 Introduction.....	25
III-2 Définition des plans d'expérience.....	25
III-2.1 L'intérêt des plans d'expériences.....	26
III-2.2 Les Stratégies des plans d'expériences.....	26
III-3 Notions de base .....	27
III-3-1 Expérience : .....	27

III-3-2	Facteur et réponse .....	27
III-3-3	Variables codées ou variables centrées réduites d'un facteur : .....	28
III-3-4	Domaine du facteur et Espace expérimental .....	28
III-3-5	Domaine d'étude : .....	29
III-3-6	Surface de réponse : .....	29
III-3-7	Notion d'interaction : .....	30
III-3-8	Effet global et effet moyen d'un facteur .....	30
III-4	Etapes d'une étude par plan d'expérience [46] : .....	30
III-4-1	détermination de la réponse et des facteurs d'étude: .....	30
III-4-2	choix d'un modèle mathématique ou modélisation mathématique .....	31
III-5	Les plans factoriels : .....	32
III-5-1	Introduction .....	32
III-5-2	Les plans factoriels complets : .....	33
III-5-3	Plans factoriels complets à deux niveaux et à k facteurs : $2^k$ .....	33
III-6	Construction des plans factoriels complets à deux niveaux .....	33
III-6-1	Matrice d'expériences .....	33
III-6-2	Calcul des effets .....	34
III-6-3	Calcul de l'interaction .....	35
III-6-4	Détermination des effets par une méthode matricielle .....	36
III-7	Tests de significativité des effets et validation du modèle .....	38
III-8	Avantages d'un plan factoriel complet .....	43
III-9	Les logiciels des plans d'expériences .....	44
CHAPITRE IV	MATERIELS ET METHODES .....	46
IV-1	Matériels .....	46
IV-1-1	Matériel biologique : .....	46
IV-1-2	Milieu de culture: .....	46
IV-1-3	Produits et matériels utilisés .....	46
IV-2	Méthodes d'analyse: .....	46
IV-2-1	Dosage du phénol .....	46
IV-2-2	Mesure de la croissance bactérienne .....	47
IV-3	Mise en marche du bioréacteur .....	48
IV-3	Dispositif experimental .....	49
CHAPITRE V	RESULTATS ET DISCUSSION .....	51
V-1	Influence de la concentration du milieu en minéraux sur la dégradation du phénol .....	51
V-2	Influence de la température du milieu sur la dégradation du phénol .....	54
V-3	Influence de la nature des bactéries sur la dégradation du phénol : .....	55
V-4	Influence de l'adaptation des bactéries sur la dégradation du phénol .....	56
V-5	plan d'expérience et modélisation .....	59
V-5-1	Construction de la matrice d'expérience (La matrice d'Hadamard) : .....	59
V-5-2	Expression des résultats : .....	60
V-5-3	Interprétation des résultats : .....	61
V-6	Statistique de la régression du modèle .....	62
V-6-1	Coefficient de détermination : .....	62
V-6-2	Analyse de la régression : .....	63
V-6-3	Analyse des résidus .....	64
V-6-4	La significativité des coefficients du modèle postulé .....	64
V-6-5	Validation du modèle mathématique ( l'analyse de la variance) .....	66
V-7	Essai confirmatif de la validité du modèle postulé .....	68
V-7-1	la vérification au centre du domaine d'étude .....	68
V-7-2	Application du modèle en un point à l'intérieur de l'intervalle d'étude .....	69

CONCLUSION GENERALE ..... 71

*Références bibliographiques*

*Annexe*

# Introduction Générale

## **INTRODUCTION GENERALE**

Le développement économique et industriel ainsi que l'accroissement démographique conduit à une demande en eau de plus en plus élevée qui implique une exploitation naturelle de l'eau pour satisfaire les besoins liés aux activités humaines, agricoles et industrielles.

La dégradation de la qualité d'eau engendré par la persistance des éléments toxiques et nuisant issus essentiellement des activités industrielles, représente un problème écologique sérieux qui cause des dégâts sur la flore et la faune. Il en résulte de même un déficit d'eau et donc limiter la capacité de satisfaire les besoins des populations en eau, ce qui impose une épuration des eaux et un traitement des eaux usées pour réduire les causes et les effets néfastes sur les êtres vivants ainsi dans le but de la dépollution et de la protection de l'environnement en général, et de l'eau en particulier.

La pollution des eaux est causée par divers composés toxiques, tel que métaux lourds et polluants organiques ...ect.

Le phénol et ses dérivés représentent des polluants organiques majeurs qui forment un groupe de composés toxiques et potentiellement cancérigènes qui sont déversés dans l'environnement par des effluents de nombreuses activités industrielles et humaine tel que chimique, pétrochimique, pharmaceutique, métallurgique et produits du pesticide. Les phénols peuvent exister à l'état naturel dans les milieux aquatiques, étant produits par la décomposition de la végétation aquatique [1,2].

Afin d'éliminer ce produit néfaste dans l'eau, plusieurs techniques ont été proposées: entre autres, l'adsorption sur charbon actif, l'ozonation et procédés d'oxydation avancés.

Les méthodes physico- chimiques pour l'élimination du phénol sont très coûteuses et ne font que transférer la pollution en la concentrant.

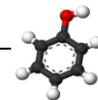
Le traitement biologique par la dégradation microbienne constitue un processus biologique majeur, efficace et rentable d'élimination du phénol présent dans l'eau ainsi que la possibilité d'une minéralisation totale du phénol ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) [3].

Des études ont montré que le phénol était la seule source de carbone pour un certain nombre de micro-organismes isolés et adaptés principalement du genre *Pseudomonas*[1].

.Le présent travail est basé sur trois étapes :

- La première étape, porte sur l'étude de quelques paramètres influençant la biodégradation du phénol
- La deuxième étape porte sur la modélisation par application du plan d'expérience, et validation du modèle (détermination du coefficient de détermination, analyse des résidus, Tests de Student et Fisher).
- La troisième étape, porte sur la vérification du modèle par application des essais supplémentaires à l'intérieur du domaine d'étude.

***Chapitre I***  
***Etudes bibliographiques***  
***sur le phénol***

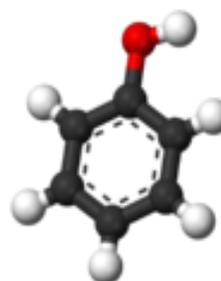
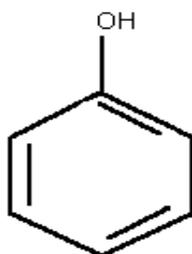


## CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE PHENOL

### I-1 Définition du phénol :

Les phénols sont des composés chimiques aromatiques, de formule  $C_6H_5OH$  portant une fonction hydroxyle  $-OH$ , c'est la plus simple molécule de la famille des phénols [4,5]. Le phénol figure néanmoins dans la catégorie des substances présentant un risque de pollution des eaux en raison de sa forte toxicité [6], il porte aussi les noms de hydroxybenzène, acide phénique, acide carbolique

Les dérivés du phénol portant plusieurs fonctions  $-OH$  sont appelées des **polyphénols**.



*FigI-1 : structure du phénol.*

### I-2 Caractéristiques du phénol :

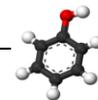
Le phénol est un des premiers termes de la grande famille des composés aromatiques, cycliques [4,7]. Sa carcasse est en effet formée d'un cycle à six atomes de carbone liés entre eux alternativement par une liaison simple et par une liaison double.

Chacun des atomes de carbone supporte, de plus, un atome d'hydrogène. L'atome d'hydrogène d'un des six carbones du cycle benzénique a été substitué par un groupement hydroxyle ( $-OH$ ) [8].

Les phénols sont donc les pendants aromatiques des alcools ; ils ont des propriétés communes, mais différent néanmoins par de nombreux caractères physico-chimiques.

Le phénol se présente sous forme de petits cristaux blancs, ou légèrement roses s'il est impur (même très peu); son odeur est forte, caractéristique et désagréable; il est de saveur brûlante. Il est assez soluble dans l'eau (84 g/litre, à  $20^\circ C$ ), et est hygroscopique, c'est-à-dire qu'il a tendance à absorber la vapeur d'eau de l'atmosphère.

Anciennement, on désignait le phénol sous le nom d'acide phénique, il a un comportement semblable à celui des acides (les phénols ont un caractère acide plus marqué que les alcools). Il est



en effet, dans ces conditions, capable de former des sels, que l'on appelle des phénolates (ou phénates). Par exemple, avec la soude (NaOH), qui est une base forte, le phénol donne du phénolate de sodium (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>ONa) :



Le PKa (constante d'acidité) du couple C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH/C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sup>-</sup> est de 9,9 : donc le phénol est un acide très faible. Il réagit en bleu noir sur les acides, les aldéhydes et les phénoloxydases [5,8].

### Propriétés physico- chimiques :

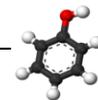
**Tableau I-1 : principales propriétés physico-chimiques du phénol**

Paramètre	Valeur	Etendue	Référence
Facteur de conversion (dans l'air à 20 °C)	1 ppm = 3,91 (mg/m <sup>3</sup> ) 1 mg/m <sup>3</sup> = 0,26(ppm)	/	[9]
Masse molaire (g/mol)	94,11 <sub>(1)</sub>	94,11 - 94,144	[10]
Point d'ébullition (°C) (à pression normale)	181,8 <sub>(1)</sub>	181,75 - 182	[9]
Point de fusion (°C)	41	40 - 43 [7]	[9]
Solubilité dans l'eau (mg/L)	83 500 à 20 °C <sub>(2)</sub> 85 700 à 25 °C <sub>(2)</sub>	82 000 - 84 000 70 000 - 93 00	[9]
une constante de dissociation (pKa)	9,89 à 20 °C	/	[10]
Constante de Henry (Pa.m <sup>3</sup> /mol)	4,56.10 <sup>-2</sup> à 20 °C 4,02.10 <sup>-2</sup> à 25 °C	/	[10]
Coefficient de diffusion dans l'air (cm <sup>2</sup> /s)	8,2.10 <sup>-2</sup>	/	[10]
Coefficient de diffusion dans l'eau (cm <sup>2</sup> /s)	8,8.10 <sup>-6</sup> <sub>(2)</sub>	8,5.10 <sup>-6</sup> 9,1.10 <sup>-6</sup>	[9]
Perméabilité cutanée à une solution aqueuse (cm/h)	8,2.10 <sup>-3</sup> <sub>(3)</sub>	/	[6]

(1) Valeur la plus fréquemment citée.

(2) Moyenne arithmétique de plusieurs valeurs.

(3) Déterminé expérimentalement in vitro sur peau humaine.



➤ Conservation du phénol:

La conservation du phénol, en solution ou non, exige certaines précautions. En effet, la présence de trois liaisons doubles dans la molécule du phénol la rend sensible aux radiations ultraviolettes.

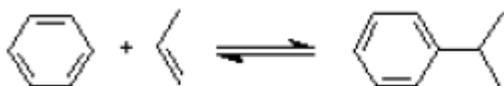
Il convient donc de conserver le phénol à l'abri de la lumière, dans un flacon de verre brun foncé [11].

I-3 Principes de production du phénol :

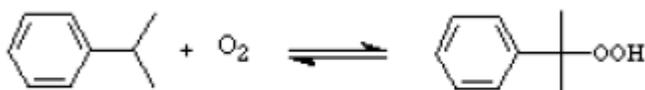
Il existe plusieurs méthodes de production du phénol, mais seules deux d'entre elles sont mises en oeuvre industriellement :

- La méthode de « **Hock** » qui comporte trois phases :

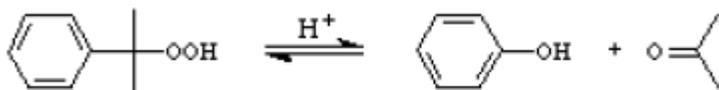
Alkylation du benzène avec du propène pour former de l'isopropylbenzène (Cumène)



Oxydation du cumène donnant naissance à du tert-hydroperoxyde,



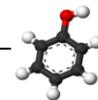
Séparation en phénol et acétone.



- La méthode « **Dow** » qui consiste à oxyder du toluène pour former de l'oxyde benzoïque puis à procéder à une décarboxylation oxydante permettant d'obtenir du phénol [12,13].

La méthode de Hock représentait, en 1989, 93 % de la production de phénol d'Europe de l'ouest, le reste était obtenu en grande partie avec le second procédé ou secondairement à partir des fractions de distillation de goudron de houille [9].

Le phénol commercial obtenu à partir de la méthode de Hock est pur à plus de 99,8 %. Il contient de l'eau à la concentration maximale de 0,05 % et les substances suivantes à des concentrations de l'ordre du ppm : oxyde de mésityl, 2-méthylbenzofurane, cumène, acétophénone, diméthylphénylcarbinol, acétone, alpha-éthylstyrène, cyclohexanol, hydroxyacétone, sec-butanol, isopropanol, 2-phénylbutène-2[9].



#### I-4 Domaine d'utilisation

Environ deux millions de tonnes de phénol sont utilisées dans la Communauté européenne annuellement [13].

Les phénols sont utilisés pour la fabrication des produits tels que les résines synthétiques, les colorants, les produits pharmaceutiques, les matières tannantes, les lubrifiants, les huiles essentielles et solvants [9,14].

Le phénol trouve aussi une large gamme d'applications, notamment comme matière première de la fabrication des substances organiques (notamment le bisphénol A (**2,2-bis-1 hydroxyphénylpropane**) utilisé dans la fabrication des résines phénoliques, le caprolactame utilisé dans la fabrication du nylon, l'aniline, l'acide adipique, les alkylphénols et d'autres) ainsi que d'adhésifs, d'explosifs, du coke, d'engrais, de gaz d'éclairage, de peintures et de décapants, de caoutchouc, d'articles renfermant de l'amiante, d'agents de préservation du bois, de textiles, de médicaments, de préparations pharmaceutiques, de parfums et de bakélite. Le phénol sert aussi de désinfectant, d'anesthésiant et d'antiseptique généraux, et on le trouve dans un certain nombre de produits de consommation [10].

Le phénol peut entrer dans la composition des pesticides et il peut aussi être formé par la dégradation de certains d'entre eux dans le sol [12].

#### I-5 Comportement du phénol dans l'environnement

##### ○ Milieu aquatique:

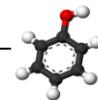
Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer. Il se dissout lentement et, même dilué, continue de former des solutions toxiques. Au dessus de 68,4 °C, le phénol est complètement miscible à l'eau. En raison de sa forte toxicité dans l'eau, le phénol figure dans la catégorie de risque WGK 2 (= polluant pour l'eau) en République fédérale d'Allemagne [15,16].

##### ○ Atmosphère:

Les vapeurs de phénol 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 [15].

##### ○ Sols:

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 des minéraux argileux (forte affinité avec l'oxyde d'aluminium) [15,16].



### **I-6 Dégradation, produits de décomposition :**

Les phénols de synthèse sont plus toxiques et moins dégradables que ceux existant à l'état naturel [11].

La biodégradation des phénols d'origine naturelle est en général très bonne, de sorte qu'une accumulation dans la flore ou la faune est peu probable. La dégradation par des bactéries est intégrale jusqu'à formation de dioxyde de carbone [7,9].

Dans le sol, une condensation avec formation d'acide humique peut se produire. En revanche, la dégradation des phénols synthétiques est plus faible, car nombre d'entre eux ont une action bactéricide. Plus les phénols contiennent d'atomes de chlore ou d'azote, plus leur toxicité est forte. Ainsi, le 'pentachlorophénol' est le plus toxique des chlorophénols, et le trinitrophénol (acide picrique) est le plus toxique des nitrophénols.

La dégradation dans les eaux de surface est de 90% en 7 jours environ (eaux stagnantes), et de 1 jour environ dans le sol sous l'effet de la microflore; dégradation intégrale au bout de plus de 2 jours dans les suspensions terreuses [4,10].

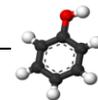
Les métabolites des phénols peuvent également être très toxiques: la combustion incomplète de 2,4,5-trichlorophénol peut donner naissance à la dioxine TCDD. En règle générale, la dégradation biologique entraîne d'abord la formation de pyrocatechine, de o-quinone et d'acide dicarboxylique, puis d'acide acétique et de CO<sub>2</sub> [4] .

### **I-7 La biodégradation du phénol**

#### **I-7-1 Définition de la biodégradation**

Le terme biodégradation signifie tout simplement la transformation biologique d'un composé organique en une autre forme .Ce procédé peut donc convertir un composé inoffensif en composé toxique, changer une substance immédiatement métabolisable en substance difficile à détruire, ou altérer la toxicité du composé[17].

Cependant, lorsqu'on dit qu'un composé est biodégradable, cela signifie habituellement qu'il peut être minéralisé (conversion en dioxyde de carbone, eau et différentes formes inorganiques). La biodégradabilité est un paramètre qui caractérise l'impact d'un produit ou d'une substance sur l'environnement. Elle est directement liée à son aptitude et à sa vitesse de disparition en milieu biologique naturel. Plusieurs facteurs peuvent influencer la biodégradabilité, parmi lesquels : le temps, la température, le pH... [17,9]



### I-7-2 La biodégradation du phénol.

Plusieurs micro-organismes appartenant à diverses espèces ont montré leur capacité à utiliser le phénol comme source de carbone et d'énergie, par transformation en substances non toxiques suite à un ensemble de réactions catalysées par des enzymes de nature inductible. Il s'agit le plus souvent d'une mono-oxygénase fonctionnant comme hydroxylase. Cette enzyme fonctionne avec l'oxygène de l'air et une source d'électrons (ici NADH). L'un des atomes d'oxygène  $O_2$  est incorporé dans le substrat, l'autre se trouve dans une molécule d'eau pour donner le 1,2 dihydroxy-benzène ou le catéchol, celui-ci est éventuellement métabolisé en succinate plus l'acétate en (C4+C2) [18].

Le cycle du dérivé de catéchol est ouvert par une ortho ou une méta oxydation, *Pseudomonas aeruginosa* utilise le phénol par voie méta (comme illustré dans la figure I-2) et le produit qui suit le « catéchol » est le « 2-hydroxymuconic acide semialdéhyde (2-HMAS) ». [19].

Le processus aérobie peut se poursuivre jusqu'à minéralisation complète du substrat biodégradable et conduit alors à des métabolites constituants de la matière organique (C, H, N, P,S), dioxyde de carbone ( $CO_2$ ), eau ( $H_2O$ ), eau carbonatée ( $CO_3^{-2}$ ), bicarbonates ( $HCO^{-3}$ ), nitrates ( $NO_3^-$ ), phosphates ( $PO_4^{-3}$ ), sulfates[20].

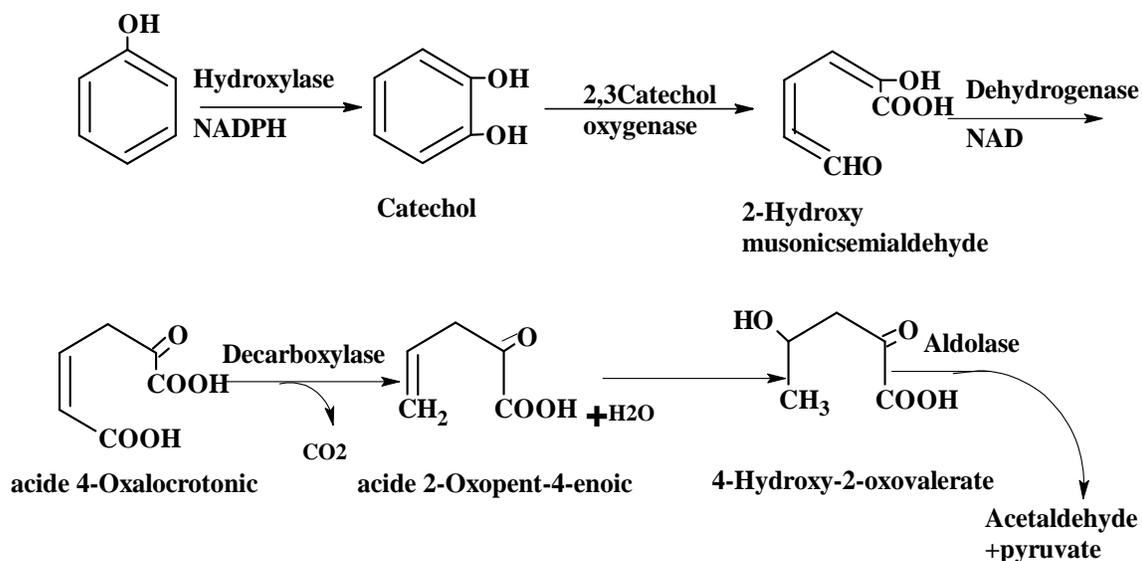
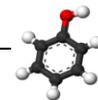


Figure I-2 : Mécanisme de la biodégradation aérobie des phénols par la voie méta.[21]



La biodégradation du phénol dans des conditions anaérobies a été étudiée par plusieurs auteurs. Cependant le procédé aérobie a été considéré le plus efficace avec sa facilité d'application. De plus, les méthodes de culture anaérobies nécessitent une longue phase d'adaptation contrairement aux conditions aérobies [21].

### ***I-7-3 Les principales bactéries pouvant dégrader le phénol:***

Un grand nombre de microorganismes, essentiellement les bactéries aérobies peuvent utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie, parmi les genres concernés on cite : les *Pseudomonas*, les *Vibrions*, *Achromobatareae* et *Mycobacterium*, les *Enterobacteries*, les *Alcaligenes*, les *Azotobacter*, les *Rhodococcus*, les *Phanerochaere* et les *Cryptococcus* [4].

Les *Pseudomonas* étant le groupe le plus important et plus précésemment l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* par sa capacité d'oxyder le catéchol issu de l'oxydation du phénol [22].

### **I-8 Toxicité du phénol**

Le phénol est corrosif et toxique. Pur, c'est un produit dangereux dont il faut se méfier. En solution à 3 %, les dangers sont plus réduits, mais il est cependant préférable d'éviter tout contact avec la peau (il l'attaque rapidement en formant des taches blanches) ou les yeux, et d'éviter de respirer les vapeurs.

Il convient donc de surveiller et de réglementer ces rejets de composés synthétiques, une réduction donc des émissions s'imposent [11].

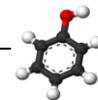
#### **➤ Chaîne alimentaire :**

L'accumulation dans les produits alimentaires est limitée. Les personnes à risques sont les fumeurs, car la fumée de cigarette contient des phénols. La présence de phénol dans la nappe phréatique a pour effet de polluer l'eau potable, et lui donner un goût qui la rend impropre à la consommation [9].

#### **➤ Devenir dans l'organisme :**

##### **1) études chez l'homme :**

Les vapeurs et solutions de phénol sont toxiques et pénètrent aisément dans l'organisme par voie cutanée. Le phénol est ensuite rapidement distribué dans tous les tissus. Les organes cibles sont le cerveau et les reins. L'inhalation des vapeurs a un effet caustique sur les voies respiratoires et les poumons. Le contact cutané et oculaire avec des solutions de phénol entraîne de sévères brûlures (poison puissant pour le protoplasme). L'exposition prolongée entraîne une paralysie du système



nerveux central ainsi que des atteintes rénales et pulmonaires. Cette paralysie peut finalement entraîner la mort. L'intoxication s'accompagne de symptômes tels que maux de tête, bourdonnements, vertiges, troubles gastriques et intestinaux, étourdissement, collapsus, empoisonnement, perte de conscience, respiration irrégulière, défaillance respiratoire, troubles cardiaques, et parfois convulsions [13,9].

## **2) Études chez l'animal**

Le phénol est toxique (réduit l'activité enzymatique) ou mortel pour les poissons, même à des concentrations très basses, par exemple, 5 à 25 mg/l.

Parmi les autres effets sensibles observés chez les animaux, il y a les transformations Histo-pathologiques du foie et du thymus, la réduction du nombre de certaines cellules du sang, la suppression de la réaction immunitaire et des effets sur le système nerveux [13,16].

## **3) Études chez les Végétaux:**

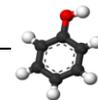
Perturbation de la perméabilité passive; inhibition de la croissance [17].

## **1-9 Production**

En 2005, le phénol a été produit à hauteur de 8 800 000 T dans le monde dont 26 % aux USA et 2 % en France. Le principal producteur est INEOS Phénol (Royaume Uni) avec une capacité de production de 1 600 000 T [23].

**Tableau I-2 : Principaux producteurs** : avec leurs Capacités de production de phénol, en  $10^3$  t/an, en 2005[20,12].

Pays	Production (en $10^3$ t/an)
INEOS Phénol (Royaume Uni)	1 600
Sunoco (Etats-Unis)	840
Mitsui (Japon)	750
Shell (Allemagne)	540
Novacap (France)	395
General Electric (Etats-Unis)	320
Dow Chemical (Etats-Unis)	250



### I-10 Normes de rejets de phénol

Le phénol est classé par l'Union Européenne comme mutagène catégorie 3 : substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets mutagènes [13].

#### a. Les normes de qualité de l'eau potable

\* **L'OMS** : la concentration limite du phénol dans l'eau potable est de 1 µg/l [24].

\* **Les normes européennes** : de qualité de l'eau potable fixées par le décret n° 89-3 du 3 janvier 1989: conformément à la demande de la commission européenne (directive 91.692), l'appréciation de la qualité de l'eau distribuée, par rapport à la concentration maximale admissible (CMA) du phénol est fixée à 0.5 µg/l C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH [25].

#### b. Les normes de rejet des eaux usées et d'effluents

\* **En France**, le ministère du travail a fixé à 5 ppm, soit 19 mg/m<sup>3</sup>, la valeur limite moyenne d'exposition (VME) [26].

Selon l'arrêté ministériel du 2 février 1998 (normes guides), les normes de rejet des eaux usées et d'effluents pour l'Indice Phénols sont fixées : 0.3 mg/l si le rejet dépasse 3 g/j [21].

\* **En Algérie**, Le décret publié au Journal officiel de la République à Alger, le 19 avril 2006 a fixé la valeur limite du phénol de rejets d'effluents liquides industriels égale à 0,3 mg/l, ce qui conforme à la norme française portée par l'arrêté du 2 février 1998 [27].

\* **L'OMS** : la concentration limite du phénol pour les eaux de rejets est de 1mg/l [24].

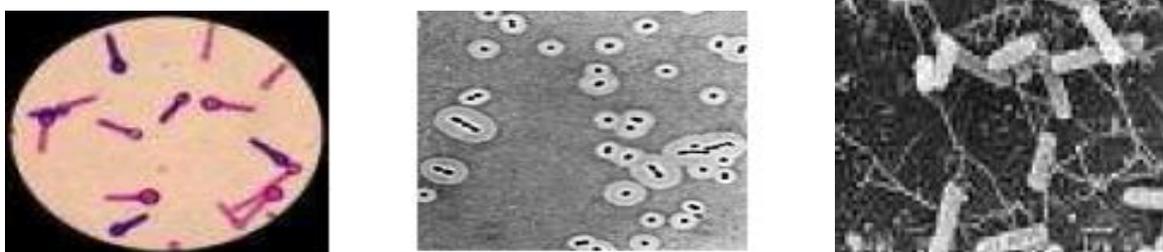
# Généralités sur les pseudomonas



## CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES PSEUDOMONAS

### II-1 Généralités sur les bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes, caractérisés par une absence de noyau et d'organites. Elles sont présentes dans le sol, dans l'eau, dans l'air et comme parasites des autres organismes vivants. Elles sont à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses. Une bactérie est un organisme extrêmement petit, constitué d'une seule cellule et nécessite un grossissement de mille fois pour être observé au microscope [28].



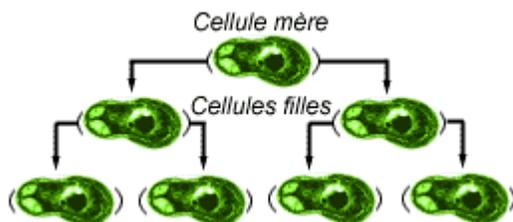
*Fig II-1 : cellules bactériennes*

#### ➤ **Reproduction bactérienne :**

Les bactéries sont des organismes asexués, la reproduction se fait par division cellulaire. La bactérie se multiplie par fission binaire : grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à la division cellulaire. Une cellule (appelée cellule mère) va donner naissance à deux cellules identiques appelées cellules filles, qui à leur tour deviennent mères, etc..., On appelle cela un mode de **reproduction binaire** ou **scissiparité** [29].

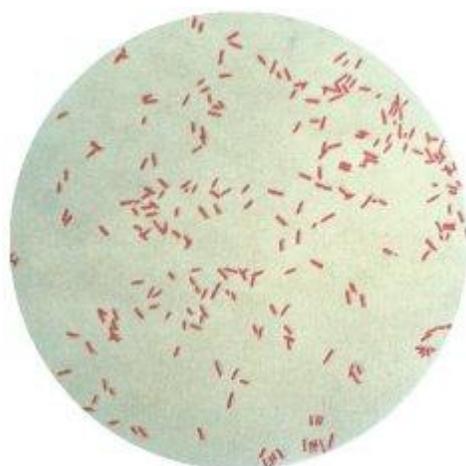


*Fig II-2.a : La duplication de l'ADN pendant la reproduction cellulaire*



**FigII-2.b : Bactérie en phase de croissance prête à se diviser**

**II-2 Généralité sur les Pseudomonas**



**Fig. II-3.a : Pseudomonas aeruginosa (Coloration de Gram).**



**Fig. II-3.b : Profil d'une bactérie du genre Pseudomonas**

En 1774, **Otto Frederik Müller** publie la première description d'une bactérie. Cet auteur désigne sous le nom de *Monas* des micro-organismes mobiles en forme de bâtonnet et sous le nom de *Vibrio* les micro-organismes mobiles de forme spiralée. Le genre *Monas* était en fait très hétérogène car il renfermait à la fois des organismes eucaryotes et des organismes procaryotes. En 1894, **Migula** proposa le genre *Pseudomonas* pour classer les bactéries initialement incluses dans le genre *Monas*. Primitivement, le genre *Pseudomonas* contenait une unique espèce « *Pseudomonas violaceae* » qui avait été décrite comme une espèce mobile grâce à un unique flagelle polaire. En fait, « *Pseudomonas violaceae* » est mobile grâce à un flagelle polaire et grâce à 1, 2, 3 ou 4 flagelles latéraux [30,31].



En 1895, Migula inclut dans le genre *Pseudomonas* des bactéries possédant une ciliature monotriche ou multitriche dont l'espèce « *Pseudomonas aeruginosa* ».

Par la suite, le genre *Pseudomonas* a accueilli un très grand nombre d'espèces (294 espèces) constituées de bacilles à Gram négatif, mobiles (ciliature polaire) ou immobiles et à métabolisme oxydatif. Au cours du temps, le genre *Pseudomonas* était devenu "une véritable poubelle taxonomique" [31,32].

### **II-3 Caractéristiques des PSEUDOMONAS :**

Le genre *Pseudomonas* est classé dans la famille des Pseudomonaceae comprend une soixantaine d'espèces pouvant répondre à la définition suivante [33] :

- Bacilles à Gram négatif.
- Aérobie stricts.
- Capables de se multiplier sur milieux usuels.
- Mobiles par ciliature polaire (sauf *Pseudomonas mallei*).
- Possédant une oxydase.
- Incapables de fermenter le glucose. espèce
- Pouvant produire des pigments

#### ➤ **Milieux de cultures utilisés [34].**

##### ○ **Milieux non sélectifs :**

Gélose ordinaire, Gélose BCP, Eau peptonée

##### ○ **Milieux sélectifs :**

Gélose cétrimide, Milieu de King A, Milieu de King B.



## II-4 PRINCIPALES ESPÈCES DES PSEUDOMONAS [31,32]:

- ✚ *Pseudomonas aeruginosa* (espèce type) ;  
l'espèce utilisée dans notre travail.
- ✚ *Pseudomonas putida*
- ✚ *Pseudomonas fluorescens*
- ✚ *Pseudomonas stutzeri*
- ✚ *Pseudomonas mendocina*
- ✚ *Pseudomonas pseudoalcaligenes*
- ✚ *Pseudomonas cepacia*
- ✚ *Pseudomonas pseudomallei*
- ✚ *Pseudomonas mallei*
- ✚ *Pseudomonas pickettii*
- ✚ *Pseudomonas solanacearum*
- ✚ *Comamonas acidovorans*

## II-5 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* (Ps.a) ou bacille pyocyanique est une bactérie gram-négatif du genre *Pseudomonas*, l'espèce la plus fréquemment isolée en bactériologie médicale découvert par **Gessard** en 1882 [35].



**Fig. II-4 : Bactérie *Pseudomonas aeruginosa***  
(Au microscope électronique à balayage)

### *II-5-1 Caractères bactériologiques :*

#### **a) Morphologie**

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, non sporulé. Les bacilles sont fins de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1,5 à 3,0  $\mu\text{m}$  de longueur, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes (ou en diplobacilles), droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules [29].



## b) Habitat

Les *Pseudomonas aeruginosa* sont des bactéries ubiquitaires, largement répandues dans l'environnement, vivent en saprophytes dans le sol et dans les eaux douces et marines. Elles se retrouvent sur les plantes, les denrées alimentaires, entraînant, parfois, leur altération.

De nombreuses souches pouvant se développer à basse température (souches psychrophiles) contaminent les produits pharmaceutiques conservés au réfrigérateur.

On peut occasionnellement les isoler de la flore intestinale de l'homme ou de l'animal au niveau des fosses nasales. Elles constituent, pour la plupart, une flore commensale. Mais leur capacité à résister à de nombreux antibiotiques et antiseptiques explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier. Ils se comportent comme des pathogènes opportunistes souvent à l'origine d'infections nosocomiales

Dans les habitations humaines, elles se retrouvent dans les siphons d'évier et les réservoirs d'eaux de pluie qui, lorsque qu'elles sont utilisées pour l'arrosage des plantes, peuvent provoquer des maladies sur les plantes en particulier les fleurs

Elle peut enfin contaminer le matériel hospitalier, hôtelier (robinetterie), médical (sondes, trocarts, cathéters) ou chirurgical (instruments, matériels de prothèse), les solutions antiseptiques, les solutés injectables, des produits médicamenteux ou cosmétiques [30,31].

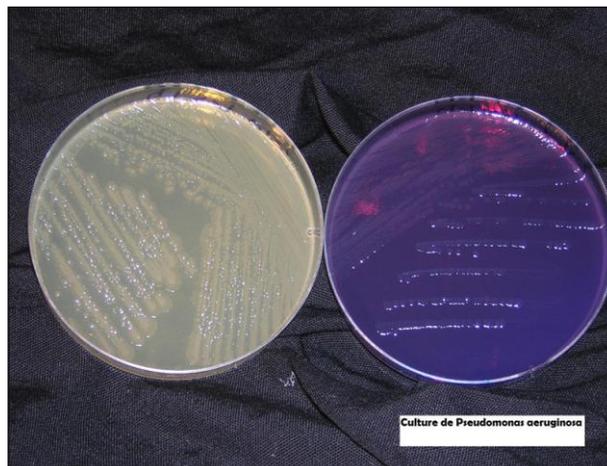
## c) Culture :

La culture est facile sur milieux ordinaires. Elle se fait strictement en aérobiose. La température optimale de croissance est 30°C mais les souches d'origine humaine, réputées pathogènes, supportent des températures plus élevées et se développent jusqu'à 41°C, contrairement aux souches de l'environnement. Une odeur caractéristique de fleur de seringa s'exhale des cultures.

Un milieu sélectif contenant un dérivé d'ammonium quaternaire : le cétrimide ou CétavlonR (bromure de N-cetyl-N-N-N triméthylammonium) et de l'acide nalidixique permet l'isolement de *Ps.a* de prélèvements plurimicrobiens [31].

## d) Pigments

*Pseudomonas aeruginosa* produit deux pigments qui diffusent dans le milieu de culture : la pyocyanine, bleu vert, soluble dans le chloroforme et la pyoverdine, jaune vert, fluorescent et soluble dans l'eau. La production de pigments est favorisée sur les milieux de King "A" pour la pyocyanine et "B" pour la pyoverdine [32].



**Fig.II-5** Caractères culturels des *Pseudomonas aeruginosa*

### **II-5-2 Pouvoir pathogène :**

*Pseudomonas aeruginosa* a toutes les caractéristiques d'un germe opportuniste : il est peu virulent pour les sujets en bonne santé mais très pathogène pour les sujets immuno-déprimés [31].

En pratique médicale, on l'isole de prélèvements variés : urines, selles, expectorations, suppurations diverses, lésions cutanées, sang ....

- Les *Pseudomonas aeruginosa* sont avec les staphylocoques et les entérobactéries, les bactéries les plus souvent responsables d'infections nosocomiales. Les marqueurs épidémiologiques (sérotypes, biotypes, antibiogrammes et autres) sont évidemment très utiles pour mener à bien les enquêtes à la recherche d'une source de contamination hospitalière [33].

### **II-5-3 Caractères biochimiques**

*Pseudomonas aeruginosa* est capable d'utiliser de nombreux substrats carbonés comme seule source de carbone et d'énergie : glucose, acide lactique, acide acétique, arginine, mannitol, citrate, malonate [36].

*Pseudomonas aeruginosa* n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu. Comme la plupart des *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* possède une oxydase [37].

### **II-5-4 Caractères Génétique**

*Pseudomonas aeruginosa* possède de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction et la plupart des souches sont multilysoogènes ; ceci explique les nombreuses variations



génétiques qu'on observe dans l'espèce avec pour conséquence, en particulier, la fréquence des souches polyrésistantes aux antibiotiques [37].

#### II-5-5 Sensibilité aux antibiotiques :

*Pseudomonas aeruginosa* est réputé pour sa résistance aux antibiotiques qui pose de sérieux problèmes thérapeutiques et favorise sa dissémination en milieu hospitalier. Elle présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et, au cours du temps, les souches ont développé une résistance acquise [31].

#### II-6 La croissance bactérienne

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné, en milieu liquide ou solide de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries.

Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme [30].

##### II-6-1 Courbe de croissance :

Dans un milieu liquide non renouvelé contenant les besoins nutritifs adéquats, la plupart des bactéries ont une croissance bactérienne homogène. On peut de façon simple suivre cette évolution en mesurant la concentration cellulaire générée par le milieu. Cette croissance peut être schématisée par 6 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance suivante [38] :

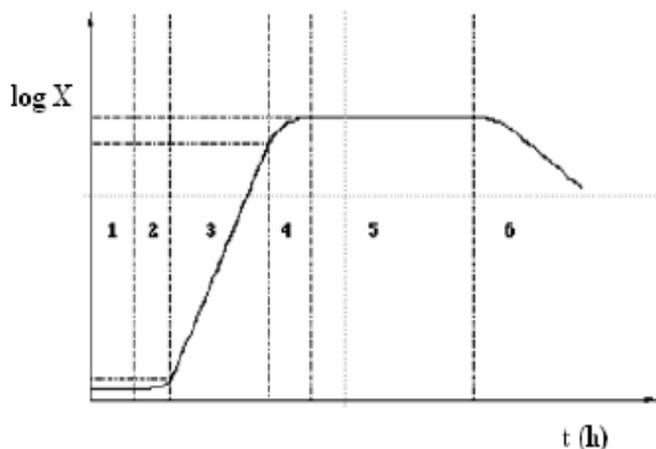


Fig.II-6 : Les phases de la croissance bactérienne en milieu liquide [39].

**1° Phase de latence :** peut être plus ou moins allongée selon les conditions préalables et la souche utilisée. Elle correspond à l'adaptation des bactéries aux conditions de culture, la température et le



temps de synthèse des enzymes indispensables. C'est la phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance, le taux de croissance est nul ( $\mu = 0$ ) [38].

**2° Phase d'accélération de la croissance :** caractérisé par une augmentation de la vitesse de croissance [40,41].

**3° Phase de croissance exponentielle :** le taux de croissance ( $\mu$ ) est le plus élevé et atteint sa valeur maximale ( $\mu = \mu_{max}$ ), le nombre de bactéries augmente en progression géométrique et cette phase est considérée en première approximation comme purement exponentielle. Elle dure tant que la vitesse de croissance est constante. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle) [40, 41,42].

**4° Phase de décélération ou phase de ralentissement :** cette phase intervient au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent, le taux de croissance va diminuer et retrouve son niveau de base. C'est la fin de la phase exponentielle [42].

**5° Phase stationnaire :** Arrêt de la reproduction, les bactéries vivent sur leurs réserves. Le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ ), les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent [40].

**6° Phase de déclin :** elle correspond au vieillissement du milieu de culture. Il peut être plus ou moins intense suivant les espèces bactériennes. Lorsque le milieu est épuisé on n'a plus de croissance active et le nombre de bactéries diminue, c'est la lyse des bactéries [30].

L'arrêt de la croissance est dû à un épuisement des substances nutritives, une modification des conditions métaboliques, une accumulation de produits toxiques.

**II-6-2 Les paramètres de la croissance bactérienne :**

La croissance d'une population bactérienne ne peut être observée que dans un environnement qui lui est favorable. Cette croissance peut être définie par deux paramètres :

**\*Le temps de génération :**

Il correspond à l'intervalle de temps qui sépare deux divisions successives, C'est le temps nécessaire au doublement de la population microbienne.

$$tg = t / n \dots\dots\dots (1)$$

Où t : temps ; n : nombre de divisions.

**\*Taux de croissance de cellules pendant la phase exponentielle :**

L'accroissement du nombre de cellules pendant la phase exponentielle suit une progression géométrique d'ordre 2.

$$X = 2^n X_0 \dots\dots\dots (2)$$

X : est la concentration cellulaire au temps (t) , ramenée en matière sèche (g/l).

X0 : est la concentration cellulaire initiale à t = 0



n : Nombre de générations.

La variation de la concentration cellulaire en fonction du temps est donnée par :

$$dX / dt = \mu X \quad \Rightarrow \quad \frac{dX}{dt} = \mu(t - t_0) \dots\dots\dots(3)$$

$\mu$  : Taux de croissance des cellules ( $h^{-1}$ ).

Comme : la relation (3)  $\Rightarrow X = 2^{nt} X_0$

D'où :  $n = \mu t$

$$\ln X = \mu t \ln 2 + \ln X_0 \dots\dots\dots(4)$$

Selon les courbes de croissance, on peut déduire le taux de croissance des cellules. Pendant la phase exponentielle, en traçant  $\ln X$  en fonction du temps selon l'équation (4), de laquelle on déduit la valeur de  $\mu$ . Soit  $\mu =$  la pente de la droite /  $\ln 2$  [43].

**II-6-3 Modélisation de la croissance bactérienne**

Le taux de croissance  $\mu$  dépend de la concentration des substrats utilisés pour la croissance. Si l'un des composés nécessaires à la nutrition des bactéries se trouve en apport limitant, sa concentration règle la vitesse des synthèses cellulaires et le rythme des divisions.

Soit S la concentration d'un tel substrat en ( $mg.l^{-1}$ )

La valeur de  $\mu$  est donnée en fonction de S, de sa valeur maximale  $\mu_{max}$ , et d'une constante Ks :

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{k_s + S} \longrightarrow (5)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{k_s + S} - k_2 \longrightarrow (6)$$

▪ La relation (5) est connue sous le nom de **loi de Monod**. Elle est basée sur la loi de **Michaelis** qui décrit la variation de la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration d'un substrat limitant. La constante Ks (constante de Monod) a la dimension d'une concentration : elle correspond à la valeur pour laquelle le taux de croissance  $\mu$  est égal à la moitié de  $\mu_{max}$ . C'est le modèle le plus simple, souvent valable en première approximation. Dans la formule (6) dite **loi de Herbert**, le terme  $K_2$  tient compte de la dégénérescence d'une partie des cellules [43,44].

▪ A forte concentration, certaines substances ou substrats deviennent des inhibiteurs de croissance. Plusieurs modèles mathématiques ont été proposés afin de quantifier l'effet inhibiteur



des substrats toxiques sur la croissance bactérienne. le modèle de **Haldane** est le plus utilisé et il est donné par la formule :

$$\mu = \frac{\mu \cdot s}{k + s + (s^2/k_i)} \longrightarrow (7)$$

#### II-6-4 Mesure de la biomasse bactérienne :

De très nombreuses techniques permettent de mesurer la biomasse : détermination du poids sec, mesure de la densité optique, mesure d'un ou de plusieurs constituants cellulaires, mesure de la consommation d'un substrat, mesure des produits d'excrétion, mesure des variations physico-chimiques induites par la croissance, etc.

La mesure du trouble est le procédé le plus simple, le plus rapide et actuellement le plus utilisé pour évaluer la masse microbienne. Il s'agit d'une méthode optique générale, appelée opacimétrie, fondée sur la propriété que présente toute solution d'absorber une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite. Elle mesure le pourcentage de lumière transmise par rapport à l'intensité du faisceau de lumière incidente  $I_0$ . Par définition  $\log(I_0/I)$  représente l'absorption (A). En négligeant l'intensité de lumière réfléchiée et diffusée, et en travaillant dans une cuve de 1 cm de trajet optique, on peut écrire :

$$A = DO = \log(I_0/I) = K.C$$

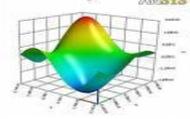
C : la concentration en cellules ;

K : le coefficient d'absorption.

L'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire. Les mesures sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600nm pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible [45].

# Chapitre III

## Le plan d'expérience



## CHAPITRE III : METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES

### III-1 Introduction

Méthode des plans d'expériences, Inventée vers 1920 à Rothamsted (en Angleterre) par le statisticien britannique Ronald Fisher pour les études agronomiques. De l'agronomie, la technique des plans d'expérience s'étendra à d'autres disciplines dont l'industrie, la physique, la chimie et dans le domaine biologique et médical.

L'utilisation de la méthode nécessitait des connaissances de Statistique, de mathématiques relativement peu étendues [46].

À partir de 1975, Génichi Taguchi vulgarisera la méthode, publiera des tables pratiquement utilisables, mettra au point de nouvelles procédures [47].

Au niveau industriel, la confection et l'utilisation d'un plan d'expérience conforme à un cahier des charges précis, à une modélisation donnée des phénomènes étudiés, requiert des outils mathématiques relativement sophistiqués : algèbre linéaire, algèbre finie, géométrie sur des corps finis, modèle linéaire généralisé de la statistique [46].



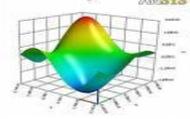
*Ronald Fisher*

### III-2 Définition des plans d'expérience

On nomme « **plan d'expérience** » l'organisation d'une expérience qui accompagne une recherche scientifique ou des études industrielles [1], dont le déroulement lui-même sera conditionné par les résultats obtenus en cours de route. 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 [48].

Un plan d'expérience permet d'obtenir le maximum de renseignement avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse [49]. Le plan d'expérience permet donc de réduire le nombre d'essais à ce qui est strictement nécessaire pour prendre une décision, ce qui permet un gain en temps et en coût financier.

Pour l'industrie: Un plan d'expérience est une suite d'essais rigoureusement organisés, afin de déterminer avec un minimum d'essais et un maximum de précision, l'influence respectives des différents paramètres de conception ou de fabrication d'un produit, afin d'en optimiser les performances [46].



La grande nouveauté de la méthode des plans d'expériences est qu'elle propose une **expérimentation factorielle**, c'est-à-dire que tous les facteurs varient simultanément, mais de manière programmée et raisonnée. Le traitement des résultats se fait à l'aide de la régression linéaire multiple et l'analyse de variance [50].

Les plans d'expériences permettent l'étude de nombreux facteurs tout en maintenant le nombre des essais à des hauteurs raisonnables, c'est pourquoi parmi leurs applications principales, la recherche des **facteurs influents et celle des facteurs optimums** [46].

### *III-2.1 L'intérêt des plans d'expériences*

Les plans d'expériences sont utilisés dans les études industrielles en recherche-développement dans de nombreux domaines industriels [48,49]. On peut notamment citer :

- Industrie chimique, pétrochimique et pharmaceutique
- Industrie mécanique et automobile
- Industries métallurgiques

L'utilisation des plans d'expériences vise aux buts suivants :

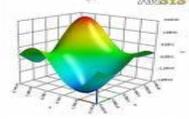
- Détermination des facteurs clés dans la conception d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé
- Diminution du nombre des essais
- Nombre de facteurs étudiés très grand
- Détection des interactions entre facteurs
- Détection des optimaux
- Meilleure précision sur les résultats
- Optimisation des résultats
- Modélisation des résultats ; Prédiction par modélisation du comportement d'un procédé
- Optimisation des réglages d'un procédé de fabrication ou d'un appareil de mesure
- Les plans d'expériences s'inscrivent dans une démarche générale d'amélioration de la qualité.

### *III-2.2 Les Stratégies des plans d'expériences*

L'objet des plans d'expériences est de quantifier l'influence des paramètres sur la réponse à partir de résultats d'expérimentations [46].

Pour cela, il existe plusieurs stratégies d'expérimentation :

**Plans factoriels ou plans complets** : cette stratégie consiste à tester toutes les combinaisons des paramètres sélectionnés

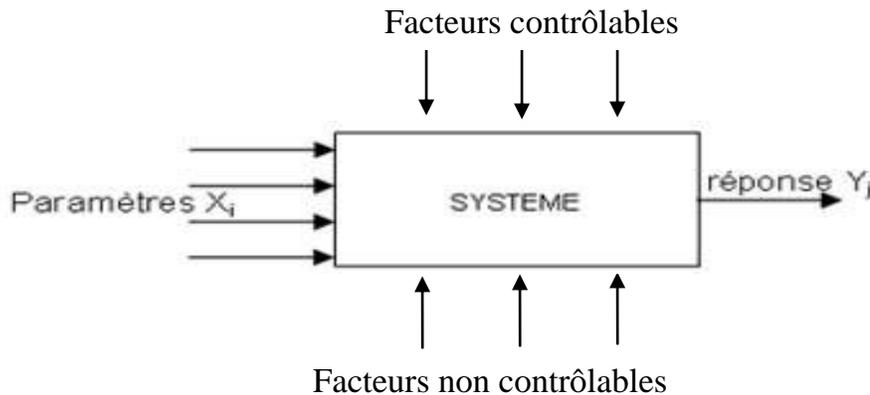


- **Plans réduits** : cette stratégie consiste à tester une partie de toutes les combinaisons des paramètres.
- **Plans Taguchi** : Génichi Taguchi a proposé une sélection de plans réduits.
- Les plans de Koshal, plans de Rechtschaffiner, plans de Plackett et Burman, les plans Supersaturés. Les plans composites, les plans de Doehlert , plans ybrides, plans de mélanges....etc[50].

### III-3 Notions de base

#### III-3-1 Expérience :

Une expérience est une Epreuve, essai effectué pour étudier un phénomène. Elle est définie par un ensemble de conditions opératoires. Une expérience est souvent caractérisée par des paramètres d'entrés et ceux de sortie [48].

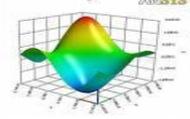


*Fig. III-1 : schéma représentant les facteurs et les réponses*

#### III-3-2 Facteur et réponse

Dans le plans d'expérience on emploi le mot **facteur** au lieu de variable, un facteur est la cause, supposé ou certaine, qui provoque le phénomène. Tous les facteurs susceptibles d'avoir de l'influence sur le phénomène doivent être pris en compte. Un facteur peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu, contrôlable ou non contrôlable est un paramètre supposé influencer la réponse. On peut citer les différents types de facteurs [46,48] :

- **Facteur contrôlé, facteur non contrôlé** : dans certaines situations, le facteur peut être Contrôlé c'est-à-dire qu'on peut imposer la modalité ou la valeur possible de ce facteur sur chaque unité expérimentale et donc ils dépendent directement du choix du manipulateur (pression, température...). Dans le cas contraire, le facteur est dit non contrôler (conditions climatiques, environnement d'utilisation....) [46,51].



▪ **Les facteurs d'entrée** : sont les facteurs dont on cherche à analyser une influence (matière première, vitesse d'agitation, température...) [48].

Les facteurs étudiés dans un plan d'expérience sont bien entendu les facteurs d'entrée.

La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau.

Il est important de pouvoir attribuer à chacun des facteurs deux **niveaux**, l'un sera qualifié de « niveau bas » l'autre de « niveau haut » .

Une **réponse** expérimentale est une manifestation mesurable à chaque essai, que l'on observe lorsque l'on fait varier les facteurs étudiés. La réponse dépend donc de un ou de plusieurs facteurs. Cette réponse s'appelle la grandeur d'intérêt, elle est le plus souvent mesurable mais elle peut également être qualitative [48].

### III-3-3 Variables codées ou variables centrées réduites d'un facteur :

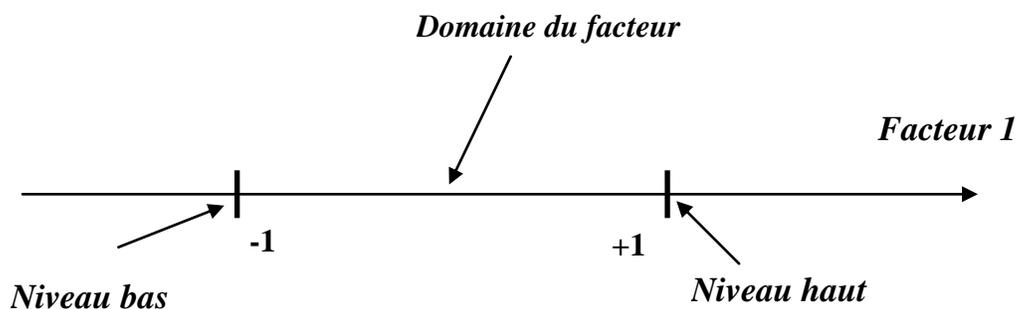
Le fait d'attribuer la valeur -1 au niveau bas du facteur et +1 au niveau haut revient à réaliser un changement d'unité de mesure et un changement d'origine qui permettent de traiter tous les facteurs de la même manière .les variables sont alors dis centrées réduites ou codées

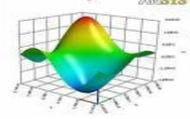
L'utilisation des variables centrées réduites présente l'intérêt : de pouvoir simplifier considérablement la présentation de la théorie des plans factoriels à deux niveaux, de pouvoir généraliser la théorie des plans d'expérience quels qu'en soient les facteurs ou les domaines d'études retenus. Remplacer les variables naturelles par les variables codées va permettre d'avoir pour chaque facteur le même domaine de variation (entre (-1)et (+1)) et de pouvoir ainsi comparer entre eux l'effet des facteurs [50].

### III-3-4 Domaine du facteur et Espace expérimental

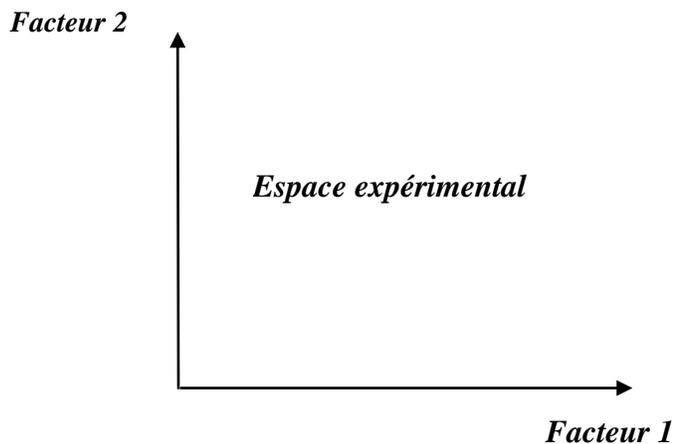
L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le « *domaine de variation du facteur* » ou le « *domaine du facteur* »

Un facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté





S'il ya un second facteur, il est aussi représenté, par un second axe gradué et disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace à deux dimensions. Cet espace est appelé **l'espace expérimental**



Les niveaux  $x_1$ ,  $x_2$  des deux facteurs respectivement sont les coordonnées d'un point de l'espace expérimental [51].

### **III-3 -5 Domaine d'étude :**

Il est défini par le regroupement des domaines des facteurs ce domaine d'étude est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais [48].

### **III-3 -6 Surface de réponse :**

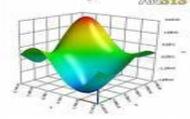
À chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. L'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse dont on peut tracer les courbes d'isoreponses en projection sur le domaine expérimental [48].

### **III-3 -7 Notion d'interaction :**

#### **▪ Définition de l'interaction dans le cas de deux facteurs**

On parle d'interaction entre deux facteurs A et B quand l'effet du facteur A sur la réponse va dépendre de la valeur du facteur B, soit l'un des facteurs renforce l'effet de l'autre. C'est le couplage entre les facteurs.

En outre, on dit qu'il ya interaction entre deux facteurs si l'effet moyen de l'un n'est pas le même suivant que l'on se place au niveau bas ou au niveau haut de l'autre.



L'interaction entre deux facteurs  $X_1$  et  $X_2$  sera considérée comme un nouveau facteur que l'on notera  $X_1X_2$  [50,52].

### ***III-3 -8 Effet global et effet moyen d'un facteur***

On appelle **effet global** d'un facteur (sous-entendu : sur la réponse) la variation de la réponse quand le facteur passe du niveau -1 au niveau +1. L'effet global donc est naturellement la moyenne de toutes les valeurs possibles :  $(e_{-1,-1} ; e_{1,1} ; e_{-1,+1} ; e_{+1,-1})$  [52].

Pour des raisons de généralisation ultérieure on préfère prendre la demi différence de l'effet globale qu'on appelle **effet moyen**, donc l'**effet moyen** d'un facteur (sous-entendu : sur la réponse) la demi variation de la réponse quand le facteur passe du niveau -1 au niveau +1 [49] .

### **III-4 Etapes d'une étude par plan d'expérience [46] :**

- Détermination de la réponse et des facteurs d'étude.
- Choix d'un modèle mathématique ou modélisation mathématique.
- Choix des expériences à réaliser.
- Réalisation des essais.
- Interprétation des résultats des essais.

#### ***III-4 -1 détermination de la réponse et des facteurs d'étude:***

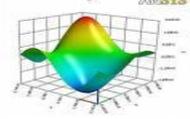
L'étude doit avant tout avoir un but précis, ainsi avoir les informations essentielles pour répondre aux questions suivantes :

- Choix de la réponse la plus judicieuse.
- Moyens de mesure adaptés.
- Facteurs potentiellement influents.
- Choix du domaine d'étude de ces facteurs.
- Eventuelles interactions à rechercher.
- Contrôle des facteurs non étudiés.

Une difficulté importante est la détermination du domaine d'étude, le domaine de variation des facteurs doit permettre de couvrir le domaine réel d'utilisation des facteurs .ce domaine d'étude ne doit pas être trop large, mais pas trop étroit [48].

#### ***III-4 -2 choix d'un modèle mathématique ou modélisation mathématique***

Chaque point expérimental permet d'obtenir une valeur de la réponse  $Y$  .cette réponse est modélisée par un polynôme : qui relie la réponse  $Y$  aux facteurs  $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n$ . On prend un



développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin. Et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z.$$

- y est la réponse ou la grandeur d'intérêt .elle est mesuré au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.
- x<sub>i</sub> représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue.
- a<sub>0</sub>, a<sub>i</sub>, a<sub>ii</sub>, a<sub>ij</sub> sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

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 théorique est appelé « **modèle postulé** » ou « **modèle a priori** » [49].

➤ **Le modèle mathématique pour un plan à deux facteurs avec interaction :**

Le domaine d'étude dans ce cas est un carré. Le modèle mathématique postulé est un modèle du premier degré par rapport à chaque facteur [46].

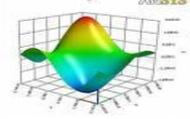
$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_{12} x_1 x_2 \dots \dots \dots (8)$$

- y : est la réponse
- x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub> : représentent le niveau attribué aux facteurs 1 et 2 respectivement.
- a<sub>0</sub> est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude.
- a<sub>1</sub> est l'effet du facteur 1.
- a<sub>2</sub> est l'effet du facteur 2.
- a<sub>12</sub> est l'interaction entre les facteurs 1 et 2.

\* **La signification de a<sub>0</sub>**

Si l'on donne à x<sub>1</sub> et à x<sub>2</sub> la valeur zéro, on définit le centre du domaine d'étude. La relation (I) devient alors : y = + a<sub>0</sub>

Le coefficient a<sub>0</sub> est la valeur calculée de la réponse au centre du domaine d'étude [50].



\* **La signification de  $a_1$**

Au niveau moyen du deuxième facteur, nous donnons la valeur zéro à  $x_2$ . La relation (8) devient donc :

$$y = a_0 + a_1 x_1$$

Cette relation permet de tracer l'évolution de la réponse prédite dans un plan de coupe  $x_2=0$ . L'effet du premier facteur apparaît comme la variation de la réponse entre le centre du domaine d'étude et le niveau haut de ce facteur [50].

\* **La signification de  $a_{12}$**

L'interaction apparaît comme la demi-différence entre l'effet du premier facteur au niveau haut du deuxième facteur (effet noté ( $ef^+$ )) et l'effet du premier facteur au niveau bas du deuxième (effet noté ( $ef^-$ )). Elle traduit une variation de l'effet d'un facteur en fonction du niveau d'un autre facteur [50].

L'interaction entre les deux facteurs est une interaction d'ordre 2.

**III-5 Les plans factoriels :**

***III-5 -1 Introduction***

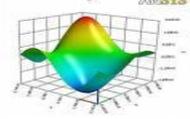
Parmi les différents plans expérimentaux, les *plans factoriels* sont courants car ils sont les plus simples à mettre en œuvre [46]

Une Expérimentation factorielle veut dire que tous les facteurs varient simultanément, Le traitement des résultats se fait à l'aide de la régression linéaire multiple et l'analyse de variance [52].

*Les plans factoriels* permettent de mettre en évidence très rapidement l'existence d'interactions entre les facteurs. Les plans factoriels à deux niveaux sont très utiles car ils ont de nombreuses applications, soit sous forme de plans complets, soit sous forme de plans fractionnaires.[50,52]

***III-5 -2 Les plans factoriels complets :***

Lors des essais, les facteurs peuvent prendre deux (ou trois) niveaux. L'objet du plan complet est de tester toutes les combinaisons possibles aux limites du domaine d'étude : c'est le nombre maximal d'essais pour un plan d'expérience factoriel. Ils permettent de quantifier l'influence de facteurs sur une caractéristique. Cependant le nombre d'essais N peut vite devenir trop important lorsque le nombre de facteurs augmente. Ce nombre d'essai N se calcule en prenant en compte le



nombre de facteurs et les niveaux associés à chacun d'eux. Prenons l'exemple de  $k$  facteur à deux niveaux le nombre d'essais  $N$  se calcule par la formule :  $N = 2^k$  [46].

### ***III-5 -3 Plans factoriels complets à deux niveaux et à $k$ facteurs : $2^k$***

L'hypothèse de base est d'assigner à chaque facteur (*normalisé*) sa valeur la plus basse ( $-1$ ) et sa valeur la plus haute ( $+1$ ), donc chaque facteur possède un nombre de niveaux limité à deux, Toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation. Ainsi, pour  $k$  facteurs, on se retrouve avec un ensemble de  $2^k$  d'expérimentations à faire .D'où la notation :  $2^k$  [50]

On peut augmenter le nombre de facteurs .l'espace expérimental possède autant de dimensions qu'il ya de facteurs [46,48].

Ces plans peuvent être utilisés indistinctement pour les variables continus et pour les variables discrètes [48].

### **III-6. Construction des plans factoriels complets à deux niveaux**

#### ***III-6-1 Matrice d'expériences.***

La matrice d'expériences est le tableau qui récapitule l'ensemble des essais et il indique le nombre d'expériences à réaliser avec la façon de faire varier les facteurs et l'ordre dans lequel il faut réaliser les expériences. Ce tableau est donc composé des nombres  $(+1)$  et  $(-1)$  [52].

Plus généralement la matrice d'expérience comporte  $k$  colonnes pour les facteurs principaux et  $2^k$  Lignes .Elle se construit suivant la règle suivante :

- Colonne du premier facteur : alternance  $-1$  et  $+1$
- Colonne du deuxième facteur : alternance  $-1$  et  $+1$  de 2 en 2
- Colonne du troisième facteur : alternance  $-1$  et  $+1$  de 4 en 4
- Colonne du quatrième facteur : alternance  $-1$  et  $+1$  de 8 en 8

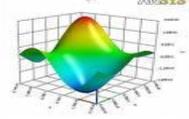
Et ainsi de suite pour un nombre plus élevé de facteurs [46].

Dans le cas où l'on ajoute à droite de la matrice d'expérience une colonne indiquant les réponses obtenues pour chaque essai, on obtient la « **matrice d'expériences et des réponses** » [46].

En adoptant ces règles empiriques, la matrice des effets obtenue est nommée : «**Matrice de Hadamard**» [52].

#### **a. Cas de Deux facteurs :**

Supposons que nous avons 2 facteurs notés :  $X_1$  et  $X_2$ , avec chacun deux niveaux (ce qui correspond au plan  $2^2$ ). On réalisera alors, dans la pratique 4 expériences, une matrice d'expérience et des réponses est donnée par :



N° d'essai	(X <sub>1</sub> )	(X <sub>2</sub> )	REPONSE
1	-1	-1	Y <sub>1</sub>
2	+1	-1	Y <sub>2</sub>
3	-1	+1	Y <sub>3</sub>
4	+1	+1	Y <sub>4</sub>

La colonne de gauche de la matrice d'expérience indique le numéro de l'expérience (ou de l'essai). La troisième ligne (par exemple) indique que lors de la réalisation du deuxième essai, le facteur X<sub>1</sub> sera au niveau haut alors que le facteur X<sub>2</sub> sera, lui, au niveau bas [46,51,52].

**III-6-2 Calcul des effets.**

L'effet moyen de X<sub>1</sub> est toujours la demi-variation de la réponse lorsque X<sub>1</sub> passe du niveau -1 au niveau +1. Or, pour chacun des niveaux de X<sub>1</sub>, il y a 2 expériences (une pour chacun des niveaux de X<sub>2</sub>). Nous devons alors envisager des réponses moyennes [52].

Quand X<sub>1</sub> est au niveau -1, nous avons la réponse moyenne :

$$\frac{y_1 + y_3}{2}$$

Et quand X<sub>1</sub> est au niveau +1, nous avons la réponse moyenne :

$$\frac{y_2 + y_4}{2}$$

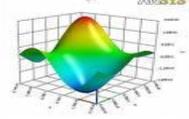
L'effet moyen a<sub>1</sub> de X<sub>1</sub> donne :

$$a_1 = \frac{\frac{y_2 + y_4}{2} - \frac{y_1 + y_3}{2}}{2}$$

$$a_1 = \frac{-y_1 + y_2 - y_3 + y_4}{4}$$

Les effets, moyen et globale de X<sub>2</sub> se calculent de la même manière. Et l'effet moyen a<sub>2</sub> soit :

$$a_2 = \frac{-y_1 - y_2 + y_3 + y_4}{4}$$



On calcule  $a_0$  ou « réponse théorique » pour  $X_1 = 0$  (au centre de son domaine de variation) comme la moyenne des réponses observées aux niveaux -1 et +1.

$$a_0 = \frac{\frac{y_2 + y_4}{2} + \frac{y_1 + y_3}{2}}{2}$$

$$a_0 = \frac{y_1 + y_2 + y_3 + y_4}{4}$$

### III-6-3 Calcul de l'interaction.

Puisque nous considérons l'interaction entre deux facteurs comme un nouveau facteur, l'effet moyen de l'interaction  $X_1X_2$  est la demi-variation de l'effet moyen de  $X_2$  lorsque  $X_1$  passe du niveau bas au niveau haut. Explicitons cela sur l'exemple de la matrice d'expériences et des réponses dans le cas de 2 facteurs  $X_1$  et  $X_2$ , avec chacun deux niveaux. **[46,50,52]**

Au niveau haut de  $X_1$ , l'effet moyen de  $X_2$  est :

$$\frac{y_4 - y_2}{2}$$

Au niveau bas de  $X_1$ , l'effet moyen de  $X_2$  est :

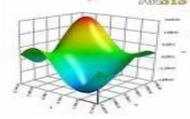
$$\frac{y_3 - y_1}{2}$$

L'effet moyen de l'interaction  $X_1X_2$  est :

$$a_{12} = \frac{\frac{y_4 - y_2}{2} - \frac{y_3 - y_1}{2}}{2}$$

$$a_{12} = \frac{y_1 - y_2 - y_3 + y_4}{4}$$

Bien entendu, on obtiendrait le même résultat en considérant au niveau haut de  $X_2$ , l'effet moyen de  $X_1$ , puis au niveau bas de  $X_2$ , l'effet moyen de  $X_1$ .



### III-6-4 Détermination des effets par une méthode matricielle

▪ **Définition**

Pour calculer les effets à partir des résultats d'expériences nous avons construit une matrice X qu'on appelle **matrice des effets**, la matrice X des effets servant au calcul des coefficients du modèle, elle s'obtient en ajoutant à gauche de la matrice d'expérience une colonne ne contenant que des 1 [46].

On s'intéresse toujours à un plan  $2^k$  et à un modèle polynomial du premier degré de la forme :

$$Y = a_0 + a_1 x_1 + \dots + a_k x_k \quad (\text{sans interaction}).$$

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z \quad (\text{avec interaction}).$$

**a). plan complet sans interaction**

▪ Exemple avec deux facteurs :

La matrice X des effets de l'exemple ci-contre montre qu'on peut retrouver les formules donnant les effets en prenant les signes dans la matrice des effets et en prenant  $2^k$  comme dénominateur.

On montre aussi que les effets sont les coefficients du modèle de régression linéaire (multiple) de Y sur les facteurs [48,50].

$$\begin{pmatrix} +1 & -1 & -1 \\ +1 & +1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & +1 \end{pmatrix}$$

**b). Plan complet avec interactions ; matrice des effets**

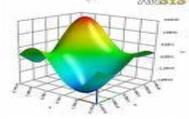
Si l'on désire étudier non seulement les effets des facteurs mais encore les interactions possibles entre les facteurs, la construction de la matrice d'expérience reste la même que celle donné au paragraphe V-1. C'est la matrice des effets qui doit être modifiée comme suit :

▪ Exemple avec deux facteurs :

La première colonne concerne l'effet moyen de X1, la deuxième celui de X2, la troisième est celui de l'interaction (c'est le produit des signes des deux premières colonnes), la quatrième concerne la moyenne ; et le dénominateur à utiliser est  $2^k$ .

$$\begin{pmatrix} +1 & -1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 \end{pmatrix}$$

On montre que ceci est toujours valable en augmentant le nombre de facteurs [48].



La matrice X des effets vérifie la relation :  $X^t X = n I_n$ , où  $I_n$  est la matrice identité d'ordre n. La matrice des effets vérifie donc le critère d'optimalité au sens d'Hadamard. Nous avons alors le résultat très simple suivant :

$$X^t Y = n E$$

$$E = 1/n \cdot X^t Y$$

- n : est le nombre d'expériences réalisées
- Y : vecteur réponse
- E : vecteur des effets
- $X^t$  : matrice transposée de la matrice X

Chaque estimation d'un coefficient du modèle est égal à la somme algébrique des réponses expérimentales  $y_i$  affectés des signes de la colonne de la matrice X correspondant au facteur  $X_i$  divisé par le nombre d'expériences [50].

**Tableau III-1 La matrice des expériences et des effets :**

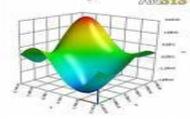
Exp	Moy	$X_1$	$X_2$	Y
1	+1	-1	-1	$y_1$
2	+1	+1	-1	$y_2$
3	+1	-1	+1	$y_3$
4	+1	+1	+1	$y_4$
coefficients	$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_{12}$
Diviseur	4	4	4	

En appliquant le résultat énoncé plus haut, on obtient :

$$a_0 = \frac{y_1 + y_2 + y_3 + y_4}{4}$$

$$a_1 = \frac{-y_1 + y_2 - y_3 + y_4}{4}$$

$$a_2 = \frac{-y_1 - y_2 + y_3 + y_4}{4}$$



On obtient ainsi les coefficients du modèle et l'on peut constater que  $a_1$  et  $a_2$  sont bien les effets moyens des facteurs  $X_1$  et  $X_2$  que nous avons précédemment calculés au paragraphe : III-6-2 , Le coefficient  $a_0$  est bien la réponse théorique au centre du domaine de variation des facteurs (ou tous les facteurs sont alors égaux à 0) [46,52].

### III-7 Tests de significativité des effets et validation du modèle :

#### a) La qualité d'ajustement des résultats

La qualité des résultats est évaluée à partir du coefficient de détermination et le coefficient de détermination ajustée.

#### Le coefficient de détermination $R^2$

Le coefficient de détermination ( $R^2$ ), est utilisé comme mesure de la qualité d'une droite de régression. Il mesure la proportion (le pourcentage) de la variation totale de Y expliquée par le modèle de régression.

Le coefficient de détermination est donné par [53] :

$$R^2 = \frac{SCEModèle}{SCETotale}$$

SCEL : « somme des carrés des écarts dues à la liaison linéaire ».

$$SCEL = \sum (Y_i^{est} - Y_{moy})^2$$

SCER : «somme des carrés des écarts des résidus".

$$SCER = \sum (Y_i - Y_i^{est})^2$$

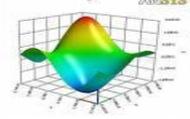
STCE: " somme totale des carrés des écarts".

$$SCET = SCEL + SCER$$

Nous pouvons donner deux propriétés de  $R^2$

- Ce n'est pas une quantité négative.
- Ses limites sont :  $0 \leq R^2 \leq 1$ .

$R^2=1$  indique un ajustement parfait, par contre  $R^2$  qui vaut 0 indique l'absence de relation entre la variable dépendante et la variable explicatives, dans ce cas la prédiction de toutes les Y n'est qu'une valeur moyenne. Dans cette confirmation, la droite de régression est une ligne horizontale parallèle à l'axe des abscisses.



### Le coefficient $R^2$ ajusté

Le  $R^2$  ajusté (utilisé en régression multiple) tient compte du nombre de paramètres du modèle.

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

$n$  : le nombre d'expériences réalisées.

$p$  : le nombre des coefficients du modèle.

Le reproche fait au coefficient de détermination est qu'il peut approcher la valeur 1, interprété comme un ajustement parfait, si on ajoute suffisamment de variables régresseurs.

Le  $R^2$  ajusté tient compte du rapport  $p/n$  entre le nombre de paramètres du modèle et le nombre d'observations.

### b) Réalisation du test de significativité des effets (Test de student).

L'outil fondamental de ces tests de significativité est l'estimation de la variance des résidus du modèle linéaire qui n'est utilisable que s'il y a moins de coefficients ( $p$ ) que d'expériences réalisées ( $n$ ).

L'analyse de la variance permet alors de tester l'influence des facteurs sur la réponse  $Y$ , qui est

donné par :

$$s^2 = \frac{1}{n-p} \cdot \sum e_i^2$$

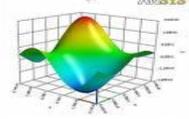
Où  $n$  est le nombre d'expériences réalisées et  $p$  le nombre de coefficients du modèle. Dans ces conditions, on peut montrer que tous les effets ont la même variance donnée par :

$$s_i^2 = \frac{S^2}{n}$$

$n$  : nombre des essais réalisés.

Dans le cas particulier où le nombre d'expériences réalisées ( $n$ ) égale au nombre de coefficients du modèle ( $p$ ), on détermine  $S^2$  par une méthode dite des << mesures au centre >> [50,47].

Dans la méthode des << mesures au centre >>, On effectue plusieurs mesures au centre du domaine (tous les facteurs sont réglés à 0) et on détermine  $s^2$  à partir des résultats sur ces << points au centre >>.



Si les mesures  $y_i$  au centre du domaine sont répétées  $n$  fois, on en déduit une estimation de la variance en ce point,  $\bar{y}$  est la moyenne de ces mesures [47].

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}$$

L'écart type  $S$  ainsi est calculé avec  $n - 1$  degré de liberté.

Le test utilisé est le test << t >> de Student. Un effet sera dit significatif (c'est-à-dire que la variable ou l'interaction qui lui est associée a une influence sur la réponse), s'il est, pour un risque donné, significativement différent de 0. On testera donc l'hypothèse notée par (H) :

$$H_0 = \langle\langle a_i = 0 \rangle\rangle$$

Contre l'hypothèse :

$$H_1 = \langle\langle a_i \neq 0 \rangle\rangle$$

Pour cela, on calcule :

$$t_i = \frac{|a_i|}{s_i}$$

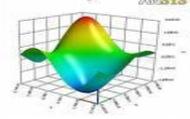
L'intervalle de confiance de tout coefficient est alors :

$$a_i \pm t_{crit} * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

On utilise alors une table de Student à  $(n - p)$  degrés de liberté ( $n$  est le nombre d'expériences réalisées et  $p$  le nombre d'effets  $y$  compris la constante), et à  $(n-1)$  degrés de liberté dans le cas des mesure au centre. On choisit un risque de première espèce (le plus souvent 5% ou 1%). à partir de la table de student on détermine la valeur de  $t_{crit}$  qu'on compare avec  $t_i$

La règle du test est alors la suivante :

- Si  $t_i > t_{crit}$ , on rejette  $H_0$  au risque accepté.



- Si  $t_i < t_{crit}$ , on accepte  $H_0$  au risque accepté.

Si l'hypothèse  $H_0$  est acceptée, cela veut dire que l'effet en question n'est pas, au risque significativement différent de 0 et donc que la variable qui lui est associée n'a pas d'influence sur la réponse.[48,52] .

On admettra qu'un coefficient est significatif si son intervalle de confiance n'englobe pas la valeur 0. Si la valeur 0 appartient à l'intervalle de confiance du coefficient, on en déduira que le coefficient n'est pas significativement différent de zéro pour le risque envisagé

### c) Analyse de la variance et validation du modèle linéaire (Test de Fisher)

L'analyse de la variance consiste à comparer à l'aide d'un test de Fisher (F), la somme des carrés des écarts due uniquement à la régression (donc au modèle), avec la somme des carrés des résidus [46,48].

On notera,  $Y_i$  les réponses observées lors de la réalisation des expériences et  $Y_i^{est}$  la réponse estimée à l'aide du modèle linéaire. On notera, de même,  $Y_{moy}$  la moyenne des réponses.

On définit alors trois types de "variations"

1- La variation due à la liaison linéaire :

$$SCEL = \sum ( Y_i^{est} - Y_{moy} )^2$$

2- La variation résiduelle :

$$SCER = \sum ( Y_i - Y_i^{est} )^2$$

3- La variation totale :

$$STCE = SCEL + SCER$$

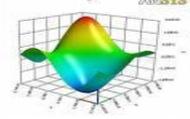
On définit de plus un "carré moyen" qui est le quotient d'une somme de carrés par son degré de liberté.

SCEL aura  $(p - 1)$  degrés de liberté ( $p$  est le nombre de coefficients estimé à partir du modèle).

SCER aura  $(n - p)$  degrés de libertés ( $n$  est le nombre d'expériences réalisées).

STCE aura  $(n - 1)$  degrés de liberté.

En outre, on note CML le carré moyen associé à SCEL, et CMR le carré moyen associé à SCER.



Le tableau de l'analyse de variance se présente alors de la façon suivante :

**Tableau III-2 Analyse de la variance**

Variation due à :	Somme des carrés	DDL	Carré moyen	F
Liaison	$SCEL$	$P - 1$	$\frac{SCEL}{p - 1} = CML$	$\frac{CML}{S^2}$
Résidus	$SCER$	$n - p$	$\frac{SCER}{n - p} = S^2$	
Total	$SCET$	$n - 1$		

*DDL : le degré de liberté*

Le test F permet alors de comparer pour un risque fixé à l'avance le  $F_{obs}$  que l'on a calculé dans le tableau précédent avec un F(critique) lu dans la table de Fisher-Snedecor avec (p-1) et (n - p) degrés de liberté.

Le test est le suivant :

Hypothèse  $H_0$  : « les deux carrés moyens sont de même grandeur » et donc la régression n'est pas significative

Hypothèse  $H_1$  : « le carré moyen dû à la régression est significativement plus grand que le carré moyen dû aux résidus » donc la régression est globalement significative

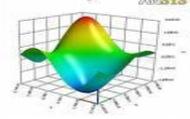
La règle du test est alors pour un risque choisi:

Si  $F_{obs}$  est inférieure au F(critique), on accepte l'hypothèse  $H_0$  .

Si  $F_{obs}$  est supérieur au F(critique), on accepte l'hypothèse  $H_1$  avec la confiance 1- a [52].

▪ **Optimisation**

Est un des principaux objectifs des plans d'expériences [46]. On appelle optimisation l'ensemble des techniques permettant de déterminer des paramètres afin qu'un système donné ait, autant que possible, de bonnes propriétés et/ou satisfasse certaines contraintes. Donc « optimiser » est de prévoir le niveau des paramètres qui permettent d'atteindre le niveau souhaité pour le critère analysé. La prévision passe par l'élaboration d'un modèle de comportement.[48]



### ▪ Propriété du plan factoriel : l'orthogonalité

La façon dont est construit le plan factoriel permet de vérifier la propriété suivante : Pour tout couple de facteurs, chaque niveau de l'un est associé à chaque niveau de l'autre un même nombre de fois indépendant du couple de facteur choisi. Un plan présentant cette propriété est dit orthogonal [46].

### III-8. Avantages d'un plan factoriel complet

Les plans factoriels complets sont des plans dits sans risque car ils permettent de déterminer tous les effets et toutes les interactions sans ambiguïté.

Le nombre d'essai nécessaire est au moins égale au nombre total de coefficients à déterminer [51].

Les essais sont réalisés de telle sorte que les coefficients sont estimés avec une variance minimale.

Leur simplicité d'exploitation assure un bon rendement par rapport aux résultats obtenus [51].

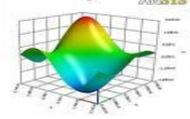
Dans le plan d'expérience les essais sont réalisés uniquement aux bornes du domaine d'étude et il ne demande pas des essais aux points du domaine.

### III-9. Les logiciels des plans d'expériences

Les logiciels des plans d'expérience possèdent des bibliothèques de plans classiques et ils permettent aussi de construire les plans sur mesure. On peut réaliser les calculs 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

Les logiciels des 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. On arrive ainsi à extraire, en peu de temps, toute l'information présente dans les résultats d'un plan d'expérience. Les logiciels de plan d'expérience sont devenus des outils absolument indispensables pour la construction de plans complexes et l'interprétation approfondie des résultats du plan.



Nous indiquons ci-dessous les principaux logiciels de plans d'expérience [46, 47,52].

- JMP
- Minitab
- Statistica
- Statgrafics
- Unscrambler
- Pirouette
- Modde

# Chapitre IV

## Matériel et Méthodes



## **CHAPITRE IV. MATERIELS ET METHODES**

### **IV -1 Matériels :**

#### ***IV -1-1 Matériel biologique :***

La souche bactérienne utilisée dans ce travail est *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 fournie par l'Institut PASTEUR d'Alger, elle est conservée au réfrigérateur à une température de 4°C sur milieu gélosé incliné de conservation.

#### ***IV -1-2 Milieu de culture:***

Le milieu de culture contient des nutriments nécessaires pour la croissance de la bactérie. Etant donné que les *Pseudomonas* sont des germes peu exigeants et sont capables d'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie un large spectre de substrats carbonés, nous avons utilisé un milieu ne contenant que le phénol comme seule source de carbone.

La composition du milieu utilisé est donnée en annexe N°1.

#### ***IV -1-3 Produits et matériels utilisés :***

##### ***a) Les Réactifs de dosage du phénol :***

- Les réactifs utilisés pour le dosage du phénol sont cités en annexe N°3.

##### ***b) Matériels et appareils utilisés :***

- Les différents matériels utilisés au cours de notre étude sont cités en annexe N°4.

### **IV-2 Méthodes d'analyse:**

#### ***IV-2-1. Dosage du phénol***

La détermination du phénol peut s'effectuer par application de nombreuses méthodes analytiques, la méthode la plus utilisée est le dosage *colorimétrique* [13].

##### **➤ Méthode à la 4-amino antipyrine [54]**

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

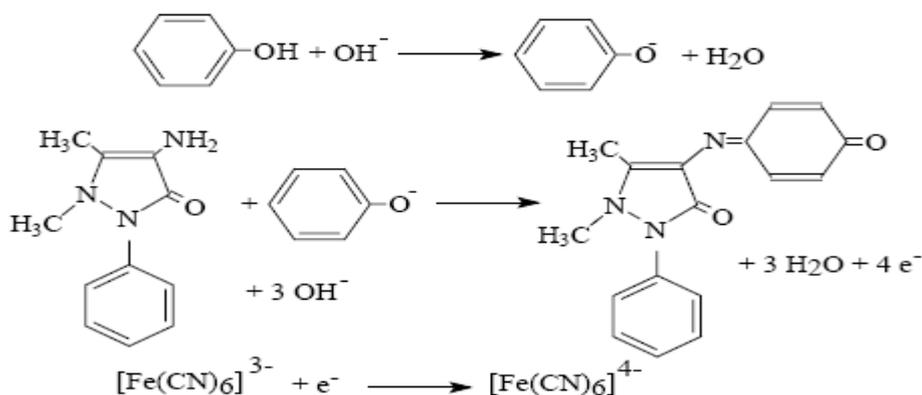


Fig. IV -1: Dosage du phénol par la 4-amino antipyrine. [Analyse des eaux].

➤ **Mode opératoire :**

Pour un volume de 100ml d'eau à analyser (faire une dilution en respectant la gamme de concentration appropriée à cette méthode d'analyse) :

- Ajouter 2ml de solution tampon ;
- Ajouter 2ml de 4-AAP, agiter immédiatement ;
- Ajouter 2ml de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , agiter ;
- Laisser la coloration se développer pendant 15mn ;
- Faire la lecture de la D.O. à 510nm au spectrophotomètre.

Cette méthode est valable pour des concentrations de 0.05 à 1mg/l .

La concentration inconnue en phénol peut donc être déterminée en mesurant la DO à 510 nm au spectrophotomètre UV/visible et en utilisant la courbe d'étalonnage présentée en annexe N°2.

La concentration se détermine à partir de l'équation de la droite (obtenue par la courbe d'étalonnage) suivante :

$$[\text{phénol}] \text{ (mg/l)} = 0.1416 \text{ DO (à 510 nm)}$$

**IV-2-2 Mesure de la croissance bactérienne**

Pour chaque prise de prélèvement, la concentration cellulaire est directement estimée par une lecture de la densité optique (DO) au spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 600 nm.

La valeur de la DO est ensuite convertie en poids cellulaire sec en utilisant la courbe d'étalonnage de la croissance bactérienne présentée en annexe N°5 dont l'allure est une droite d'équation [21] :

$$\text{DO} = 0.0023 \text{ X} \longrightarrow \text{X (mg/l)} = 434.8 \text{ DO (à 600 nm)}$$



### IV-3 Mise en marche du bioréacteur

#### ▪ **Préparation de l'inoculum (suspension bactérienne) :**

A partir d'un tube de conservation de *P. aeruginosa*, on a fait un ensemencement de quelques colonies à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans un tube de bouillon nutritif de 15ml (10 ml constitue l'inoculum de la culture et 5 ml restant sert à estimer le trouble de la préculture par lecture de la DO à 600 nm).

Après 48heures d'incubation à l'étuve à 37 °C, la présence du trouble dans le bouillon indique une croissance bactérienne.

#### ▪ **Mise en marche du bioréacteur :**

Pour assurer le bon fonctionnement du bioréacteur, nous avons procédé comme suit :

1. Stériliser le fermenteur de volume de 2 l, contenant 1 l de milieu de culture, à 120°C durant 20 mn à l'autoclave.

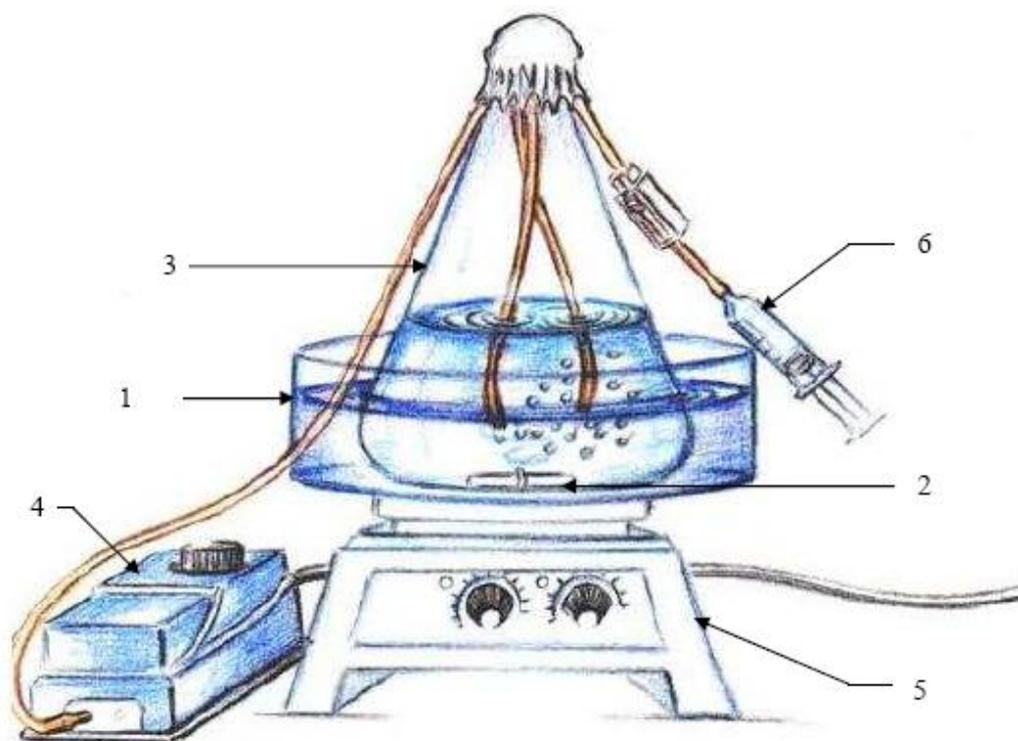
Dans la zone stérile :

- Ajouter au milieu, le phénol d'une concentration connue par filtration stérilisante;
- Ajouter le bouillon riche en bactéries (la Préculture) au milieu avec un pourcentage de 1%,
- Fixer les conditions opératoires : aération de 0.24 l/mn d'air, une agitation moyenne, et une Température optimale.

Des prélèvements sont effectués stérilement à des intervalles de temps réguliers.



IV-4 Dispositif experimental



- 1-bain marine
- 2-barreau magnétique
- 3-bioréacteur
- 4-diffuseur d'air
- 5-plaque chauffante et d'agitation
- 6-point de prélèvement

# Chapitre V

## Résultats et Discussion



## CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

### V -1 Influence de la nature du milieu sur la dégradation du phénol

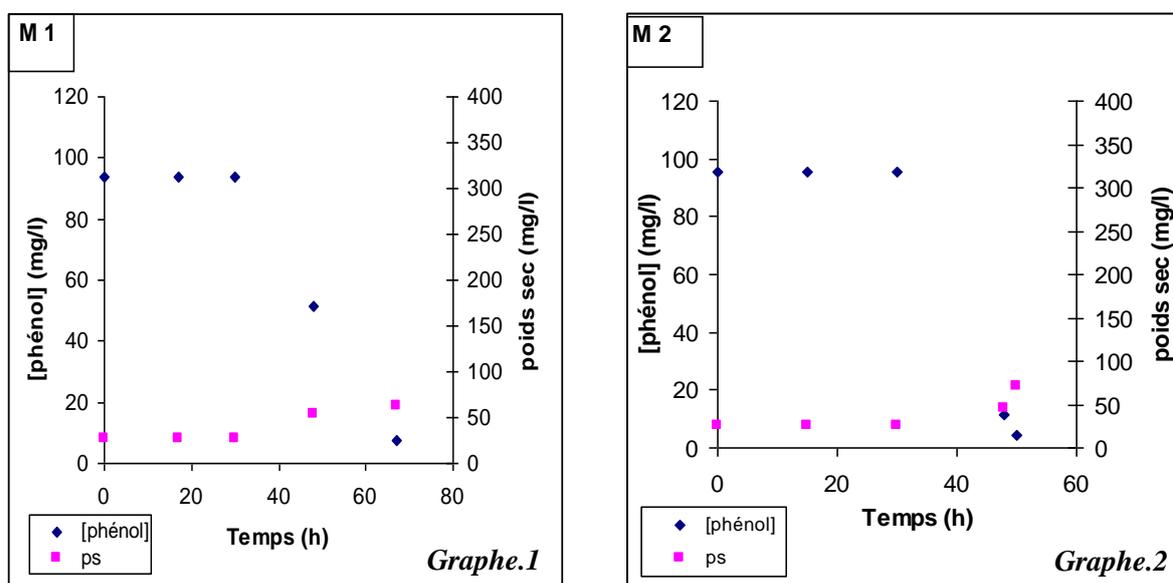
#### ➤ *Etude comparative de la dégradation du phénol dans deux milieux de cultures à des concentrations différentes en nutriments*

Nous avons utilisé deux milieux minéraux ( $M_1$  et  $M_2$ ) dont la composition est présentée en annexe N°2. Nous avons fixé les conditions opératoires optimales de dégradation en se référant à la thèse de Magister Ali [21] dont le thème porte sur « l'étude de l'influence des conditions opératoires sur la dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* », la température du système est portée à 37°C. Une agitation de 78 tours/mn et une aération de 0.24 l/mn

La seule différence entre les deux milieux est la concentration en éléments nutritifs.

#### La dégradation du phénol dans les deux milieux

L'analyse des échantillons prélevés au cours du temps pour les deux milieux nous a permis de tracer l'évolution de la croissance bactérienne ainsi que la dégradation du phénol, présentées sur la Fig V.1



*Fig. :V.1 comparaison de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol dans deux milieux minérales  $M_1$  et  $M_2$*

$T = 37^{\circ}\text{C}$ ,  $DO_{inoculum} = 1.4$ , agitation = 78 tours/mn, aération = 0.24 l/mn,  $[\text{phénol}]_0 = 100\text{mg/l}$ .

Le milieu de culture doit apporter à la bactérie un mélange équilibré de tous les nutriments nécessaires, permettant une croissance optimale, c'est à dire:

- Pas trop faible, sinon le milieu s'appauvrit plus rapidement donc la bactérie cultive mal;
- Pas trop forte, sinon le milieu devient toxique [55].

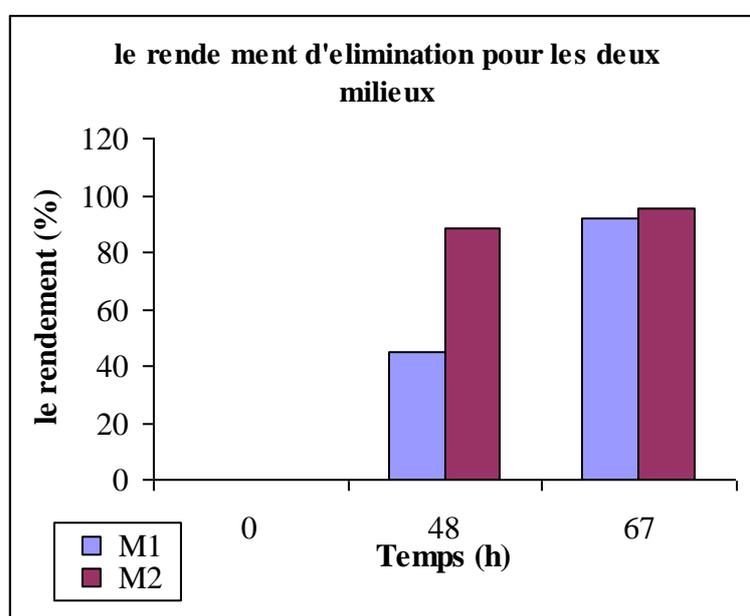


### Interprétation des résultats

D'après la figure V-1 nous remarquons une croissance bactérienne avec une bonne dégradation du phénol, cela est dû à la présence des bactéries dans un milieu favorable contenant les minéraux essentiels à la croissance bactérienne avec le phénol utilisé comme source de carbone et d'énergie.

La cinétique de croissance bactérienne suit la dégradation du phénol, ce qui peut être expliquée par la synthèse des enzymes nécessaires à ce métabolisme.

Nous pouvons bien remarquer sur les deux graphes que le milieu  $M_2$  favorise mieux la dégradation du phénol, le temps final de dégradation est de 50 heures en comparaison avec  $M_1$  qui atteint 72 heures. Les rendements d'éliminations instantanées du phénol étaient déterminés et présentés sur la figure : V-1-1



*Fig. V.1-1 : les rendements d'élimination du phénol dans les deux milieux de cultures ( $M_1, M_2$ ).*

En comparant les deux graphes de rendement de la figure, nous constatons que le taux de dégradation dans le milieu  $M_1$  était de 91% au bout de 67 heures, alors qu'avec le deuxième milieu minéral de concentration plus faible en nutriment on a obtenu une meilleure dégradation avec un taux de 95% en un temps plus réduit : 50heures.



#### ▪ Inhibition dû à $\text{FeSO}_4$ et $\text{CaCl}_2$

Les oligo-éléments tel que les métaux sont indispensables à la croissance des bactéries, soit pour la synthèse d'un métabolite ou bien pour la synthèse de pigment, mais à forte concentration ces métaux peuvent inhiber la croissance cellulaire et deviennent toxiques pour certaines cellules.

En général, les ions de fer et calcium présentent à forte concentration un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique des bactéries, car ces cations métalliques sont en mesure de se fixer sur les sites actifs de plusieurs enzymes. Donc ces ions métalliques peuvent rentrer en compétition avec un autre ion situé dans le site actif de l'enzyme et ainsi inhiber l'activité enzymatique bactérienne [56].

La teneur du milieu  $M_1$  en  $\text{FeSO}_4$  et  $\text{CaCl}_2$  est plus importante que celui du milieu  $M_2$ , ce qui implique une inhibition de l'activité des bactéries par l'excès des métaux.

#### ▪ Inhibition dû à $\text{NH}_4\text{NO}_3$

Plusieurs études ont démontré l'effet inhibiteur direct de nitrate sur la respiration cellulaire, et sur la croissance cellulaire.

C'est un inhibiteur de l'oxydase bactérienne et le mécanisme d'inhibition du nitrite sur la respiration bactérienne est dû à une inhibition directe au site terminal de réduction de l'oxygène.

Le nitrite réagit réciproquement directement avec l'oxydase terminale et inhibe la réaction de l'oxygène agglutination.

La forte concentration en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  dans le milieu  $M_1$  par rapport à celui du milieu  $M_2$ , peut nous expliquer la raison d'avoir une faible croissance bactérienne dans ce dernier ainsi qu'une faible dégradation du phénol [57,58].

#### ▪ L'effet de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Ce sel favorise à des concentrations optimales la croissance et l'activité bactérienne. Plusieurs auteurs ont montré que la production de la protéinase de l'extracellulaire était plus importante dans des milieux qui contiennent les sels d'ammonium. Dans notre cas, la plus haute activité spécifique était observée avec les Sulfates de l'ammonium, qui présentent aussi une source de soufre indispensable à la croissance bactérienne [59].



▪ **Solutions Tampons : ( $K_2HPO_4$  et  $KH_2PO_4$ )**

Ils sont inclus dans les milieux de culture bactériologiques afin d'éviter les brusques variations de pH dues aux modifications chimiques qui résultent de la dégradation du substrat. Les tampons phosphates ( $K_2HPO_4$  et  $KH_2PO_4$ ) sont les plus utilisés parce qu'ils permettent de garder le pH dans une large zone autour de 7, ils ne sont pas toxiques et représentent une source de phosphore [60].

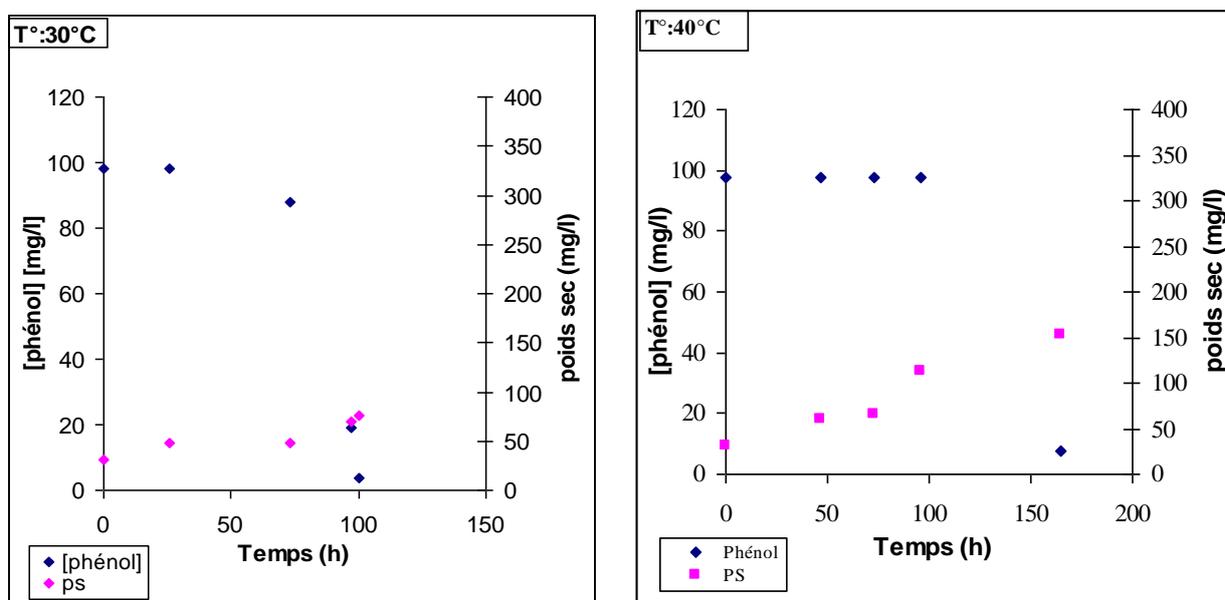
Les autres éléments composant les milieux de culture sont portés à la même concentration dans les deux milieux.

**V -2 Influence de la température du milieu sur la dégradation du phénol**

Dans la suite de notre travail nous avons utilisé le milieu  $M_2$  qui favorise mieux la dégradation du phénol.

Pour démontrer l'influence de la température sur le rendement de la biodégradation du phénol, nous avons utilisés deux milieux avec des températures différentes :

Le premier milieu est maintenu à une température de  $30^{\circ}C$  tandis que le deuxième était fixé à  $40^{\circ}C$ . En gardant les autres paramètres opératoires fixes sur les deux milieux : la D.O de l'inoculum à 600nm est de 0.953, une concentration initiale en phénol de 100 mg/l, une agitation moyenne et une aération de 0.24 l/mn d'O<sub>2</sub>. Les résultats obtenus pour les deux réacteurs sont représentés par la figure suivante :



**Figure V-2 :** Effet de la température sur la croissance bactérienne et la biodégradation du phénol  $[phénol]_0 = 100 mg/l$ , agitation = 78 tours/mn, aération = 0.24 l/mn d'O<sub>2</sub>, DO inoculum = 0.953



### Interprétation des résultats

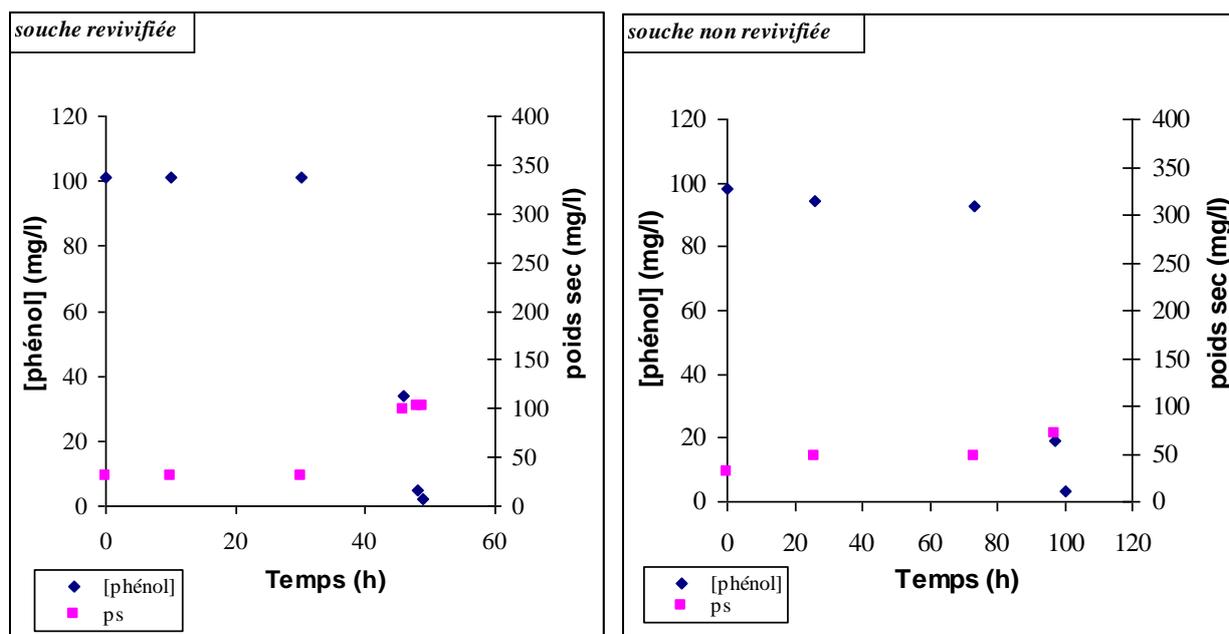
D’après les graphes obtenus, on constate une meilleure croissance bactérienne à la température 40°C estimé à 112 mg/l après 96 heures, alors qu’à la température 30°C la masse bactérienne était de 70 mg/l après 97heures. Ce résultat concorde avec les données théoriques concernant l’activité des *Pseudomonas* qui montrent une température optimale de croissance située entre 30 et 43°C [61].

Par contre, la meilleure dégradation du phénol était bien observée à 30°C avec une durée de dégradation totale du phénol de 100 heures. A 40°C la durée de dégradation était plus prolongée, elle atteignait 160 heures.

On peut conclure que la température 30°C favorise mieux la biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa*

### V -3 Influence de la nature des bactéries sur la dégradation du phénol :

Dans le but de visualiser l’influence de la nature de la souche (revivifiée et non revivifiée) sur la dégradation du phénol, nous avons réalisé deux expériences : la première avec des bactéries revivifiées (conserver pendant une semaine) et la deuxième avec des bactéries non revivifiées (conserver pendant 10 mois). Sous les mêmes conditions opératoires, les deux milieux minéraux ont la même composition et la préculture ajoutée a une densité de DO= 1.14. La croissance bactérienne et la dégradation du phénol pour les deux essais sont présentées sur la figure V-3



**Figure V-3** Influence de la nature des bactéries (revivifiées et non revivifiées) sur la croissance bactérienne et la dégradation du phénol



$T = 30^{\circ}\text{C}$ , agitation = 78 tours/mn, aération = 0.24 l/mn,  $[\text{phénol}]_0 = 100\text{mg/l}$ ,  $\text{DO inoculum} = 1.14$ .

### **Interprétation des résultats**

Le premier graphe de la figure montre une bonne croissance bactérienne (100mg/l après 48 heures) et une dégradation très rapide du phénol et sa dégradation totale a été observée au bout des 49 heures. Tandis que pour la souche non revivifiée, la croissance cellulaire était un peu faible (70mg/l après 100 heures), la dégradation du phénol n'est commencée qu'après une durée de 72 heures.

Le repiquage de la bactérie permet sa régénération, sa revivification et la reproduction de son activité enzymatique. Une adaptation transitoire aux conditions de culture présente de nouvelles propriétés par rapport à la souche originelle. Tous ces avantages de la souche bactérienne revivifiée ont favorisé leur croissance dans notre milieu de culture avec une très grande activité et une dégradation rapide du phénol [55,60].

Nous pouvons conclure que les bactéries revivifiées dégradent mieux le phénol et en un temps très réduit comparant à celles non revivifiées ou originelles.

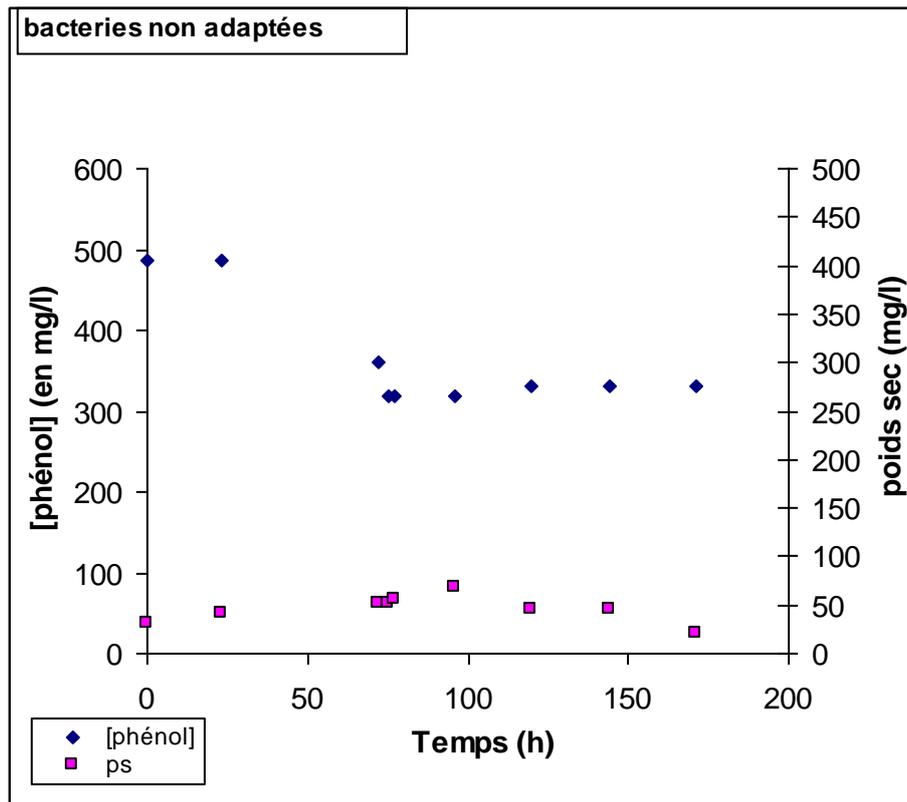
## **V -4 Influence de l'adaptation des bactéries sur la dégradation du phénol**

### **V 4- a étapes 1 :**

La concentration en phénol dans le milieu de culture influe sur la croissance bactérienne et sur sa biodégradation. Plus la concentration est élevée, moins la croissance bactérienne est importante.

Afin de démontrer l'effet de la concentration du phénol sur la cinétique bactérienne et la dégradation du phénol, nous avons réalisé l'expérience suivante :

Nous avons utilisé notre milieu de culture ( $M_2$ ), la concentration initiale en phénol est de 400mg/l et l'inoculum ajouté au milieu est de densité  $\text{DO} = 0.648$ , en gardant les mêmes conditions opératoires définies précédemment, les résultats obtenus pour la croissance bactérienne et pour la dégradation du phénol nous a permis de tracer le graphe présenté ci-dessous (fig. V-4) .



**Figure V-4-1.** Evolution de la croissance bactérienne et de la dégradation du phénol dans le cas de bactéries non adaptés au phénol,

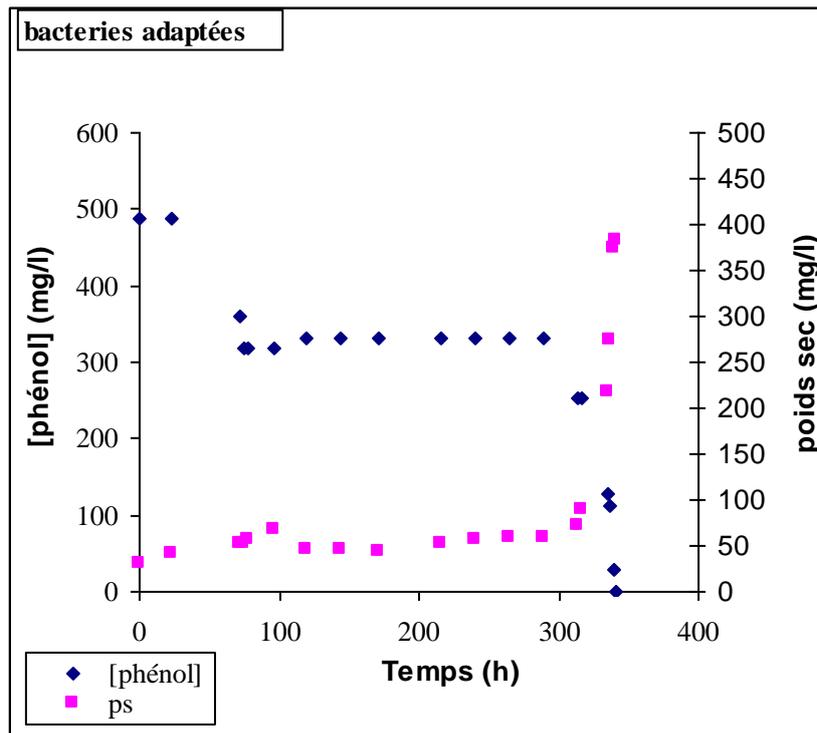
$[phénol]_0 = 100 \text{ mg/l}$ ,  $DO \text{ inoculum} = 0.648$ ,  $T = 30^\circ\text{C}$ ,  $agitation = 78 \text{ tours/mn}$ ,  $aération = 0.24 \text{ l/mnd'O}_2$

### Interprétation des résultats

D'après le graphe nous remarquons une très faible croissance bactérienne, cela est dû à l'effet inhibiteur du phénol à forte concentration. La présence d'un excès du phénol (le substrat) développe une saturation des sites enzymatiques chargée par ce dernier, ce qui implique une diminution de sa dégradation. Ce cas est observé lors de notre essai où nous avons obtenue une faible dégradation du phénol jusqu'à une concentration résiduelle limite de 300mg/l et au-delà de ce point on atteint un palier et une décroissance de la masse bactérienne qui correspond à la lyse cellulaire [62].

### V 4- b étapes 2 :

Dans cette deuxième étape nous avons ajouté au milieu précédent (après la dégradation partielle du phénol) un volume de 10ml d'un milieu riche en bactéries adaptées au phénol après la dégradation totale du phénol effectué dans un milieu de culture de concentration 100mg/l en phénol. Ensuite on a suivi l'évolution de la concentration du phénol et la croissance bactérienne dans le milieu, dont les résultats obtenus sont présentés sur la *Figure V-4-2*



**Figure V-4-2.** Evolution de la croissance bactérienne et de la dégradation du phénol dans le cas de bactéries adaptées au phénol,

$[phénol]_0=100mg/l$  , $DO$  inoculum =0.648),  $T = 30^{\circ}C$ , agitation=78 tours/mn, aération = 0.24 l/mnd'O2

### Interprétation des résultats

Les bactéries présentent généralement une exceptionnelle capacité d'adaptation à leur environnement.

Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* issues du milieu de concentration 100mg/l ont été alors adapté au phénol et cette adaptation est nécessaire pour la survie de la biodégradation du substrat dans d'autres milieux de concentration plus élevée en phénol. L'adaptation enzymatique est définie comme « la formation induite d'un enzyme sous l'influence de son substrat » [63].

*Pseudomonas aeruginosa* adaptée au phénol a continué à se développer et à dégrader le phénol, et sur la figure on observe bien une bonne croissance de la masse bactérienne qui atteint 380mg/l. D'autre part on observe une dégradation totale du phénol au bout de 170 heures.

La conclusion qu'on peut tirer c'est qu'aux fortes concentrations en phénol les bactéries doivent être adaptées au phénol préalablement pour qu'elles puissent le dégrader.



**V -5. PLAN D’EXPERIENCE ET MODELISATION**

La modélisation du phénomène de la biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en système batch nécessite l’établissement d’une relation entre les variables d’entrées qui sont dans notre cas :

1. La température (T) en °C.
2. La taille de l’inoculum ensemencé (par lecture de la densité optique à 600nm).

Et la variable de sortie (ou bien la réponse Y) qui est représentée dans notre étude par le temps totale de l’élimination du phénol dans le milieu.

Les limites de variation des facteurs d’entrée sont présentées sur le tableau suivant :

**Tableau V-5: les niveaux de variation des facteurs**

Les paramètres étudiés	Domaine d’étude (Niveaux de variation des facteurs)		
	UNITES	Niveau bas (-1)	Niveau haut (+1)
Température (X <sub>1</sub> )	(°C)	30	40
L’inoculum (DO à 600nm) (X <sub>2</sub> )		0.6	1.2

**V-5-1. Construction de la matrice d’expérience (La matrice d’Hadamard) :**

Pour un Plan factoriel complet du type 2<sup>2</sup> (k=2), le nombre des essais qu’il faut réaliser est égal à 4, ces expériences sont organisées en appliquant l’algorithme d’Hadamard définie dans le chapitre III.:

Le tableau V-5-1suivant nous résume les expériences réalisées et la façon de faire varier les facteurs:

**Tableau V-5-1: Les essais de plan d’expérience**

N° d’essai	(X <sub>1</sub> ) (en unité réel) (°C)	(X <sub>1</sub> ) (en VCR)	(X <sub>2</sub> ) (en unité réel)	(X <sub>2</sub> ) (en VCR)
1	30	-1	0.600	-1
2	40	+1	0.600	-1
3	30	-1	1.2	+1
4	40	+1	1.2	+1

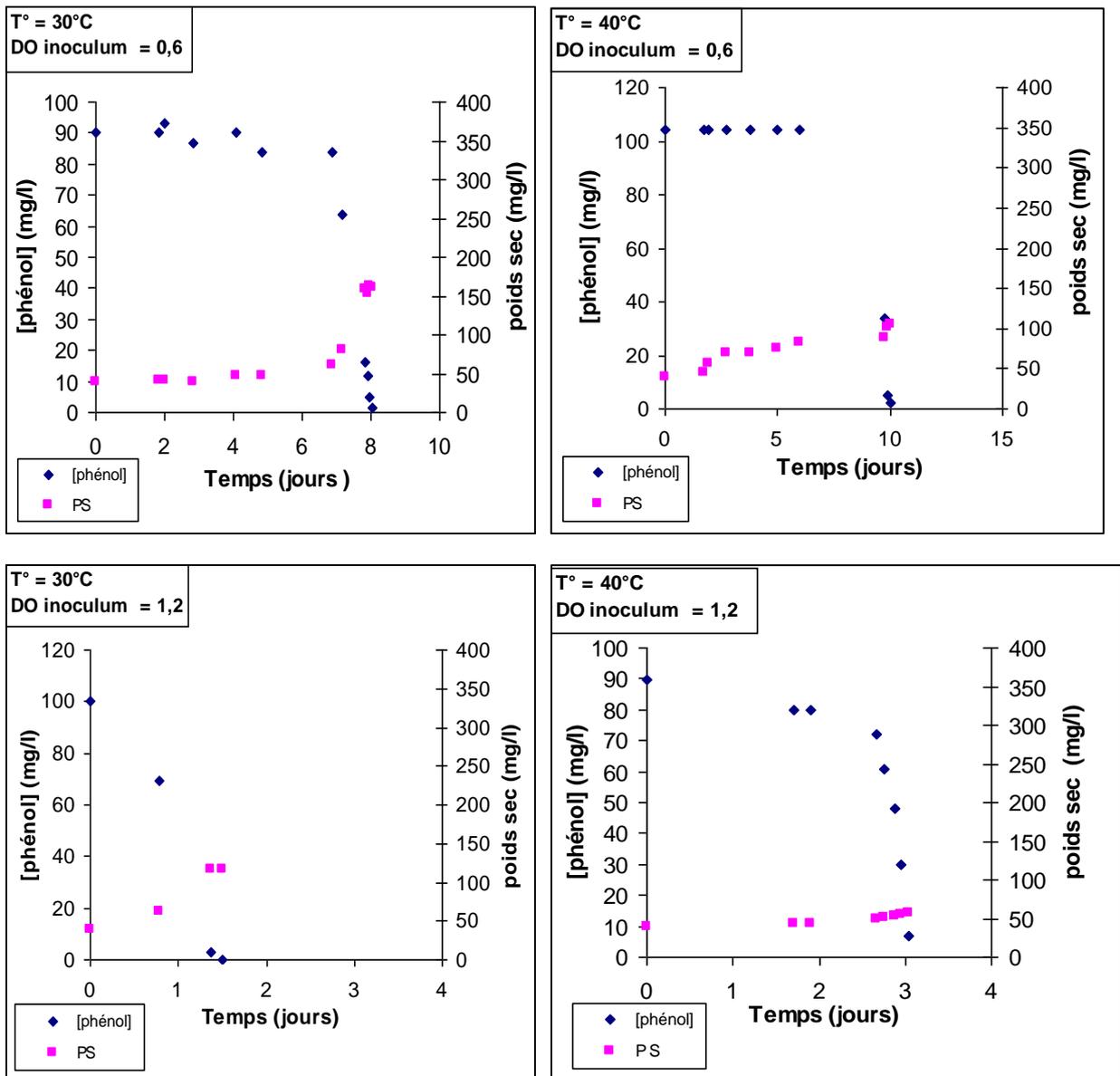
VCR : Variable Centrée réduite.



**V-5-2. Expression des résultats :**

Les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions opératoires précédentes, la concentration initiale du phénol est de 100mg/l, l'agitation est moyenne et l'aération est de 0.24l/mn.

En se basant sur le tableau des expériences ci-dessus, la représentation graphique des résultats est présentée sur la figure suivante :



*Fig. N°V-5-2. L'évolution de la dégradation du phénol et de la croissance bactérienne pour les quatre essais du plan d'expérience*



**V-5-3 Interprétation des résultats :**

A partir de ces résultats, nous pouvons déterminer les réponses ( $Y_i$ ) par la détermination du temps total de l'élimination du phénol pour chaque essai. Ces réponses sont récapitulées dans le tableau **VI-3** suivant :

**Tableau V-5-3 : Plan d'expérimentation utilisé dans notre étude**

N° d'essai	$X_1$	$X_2$	REPONSE ( $Y_i$ )	
1	-1	-1	$Y_1$	8
2	+1	-1	$Y_2$	10
3	-1	+1	$Y_3$	1.5
4	+1	+1	$Y_4$	3

**V-5-4.Application du modèle d'ordre 1 sans interaction :**

Le plan factoriel complet du type  $2^2$  utilisé dans notre étude, donne une réponse de la forme suivante :

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2$$

**Détermination des coefficients du modèle**

Les coefficients du modèle sont exprimés par la somme algébrique des réponses expérimentales  $y_i$  affectés des signes de la colonne de la matrice X correspondant au facteur  $X_i$  divisé par le nombre d'expériences (**chapitre III**).

L'ensemble des résultats sont rapportés dans les tableaux **V-5-4** suivant

**Tableau V-5-4 : Détermination des coefficients du modèle**

	Coefficients ( $a_i$ )	Valeurs des $a_i$
La constante	$a_0$	5.625
La température	$a_1$	0.875
L'inoculum	$a_2$	-3.375

Le modèle mathématique retenu finalement sera le suivant:

$$Y = 5.625 + 0.875X_1 - 3.375X_2.$$

Le domaine de validité du modèle est le suivant:

$30^{\circ}\text{C} < \text{Température} < 40^{\circ}\text{C}$ $0.6 < \text{taille de l'inoculum} < 1.2$
---



**V-6. Statistique de la régression du modèle**

La validité du modèle mathématique représentée par la régression linéaire a été estimée par l’approche des points suivants : l’analyse du coefficient de détermination ( $R^2$ ), l’analyse des résidus, l’intervalle de régression et de confiance et la significativité des coefficients (le test de student) et le test de Fisher pour la validation du modèle. [65]

**V-6-1 Coefficient de détermination :**

$R^2$  qui varie entre 0 et 1, mesure la proportion de variation totale de Y autour de la moyenne expliquée par la régression, c’est-à-dire prise en compte par le modèle. Plus  $R^2$  se rapproche de la valeur 1, meilleure est l’adéquation du modèle aux données.

Un  $R^2$  faible signifie que le modèle a un faible pouvoir explicatif[63].

$$R^2 = \frac{SCEModèle}{SCETotale} \quad [65]$$

Par application numérique, on trouve :

$$R^2 = 48.625/48,6875 = 0,998716303$$

$$R^2 \text{ ajusté} = 1 - \frac{((n - 1)(1 - R^2))}{(n - p)} \quad [65]$$

Par application numérique ,on trouve :

$$R^2 \text{ ajusté} = 1 - (4 - 1) * (1 - 0.997434253) / (1) = 0.996151379$$

**Tableau V-6-1 : Statistique de la régression du modèle**

<i>Statistiques de la régression</i>	
Coefficient de détermination multiple R	0,999357945
Coefficient de détermination $R^2$	0,998716303
Coefficient de détermination ajusté $R^2$	0.996148909

L’examen du coefficient de détermination  $R^2$  et le coefficient de détermination multiple R, ainsi que le coefficient de détermination ajusté nous indique la bonne qualité d’ajustement du modèle.



**V-6-2 Analyse de la régression :**

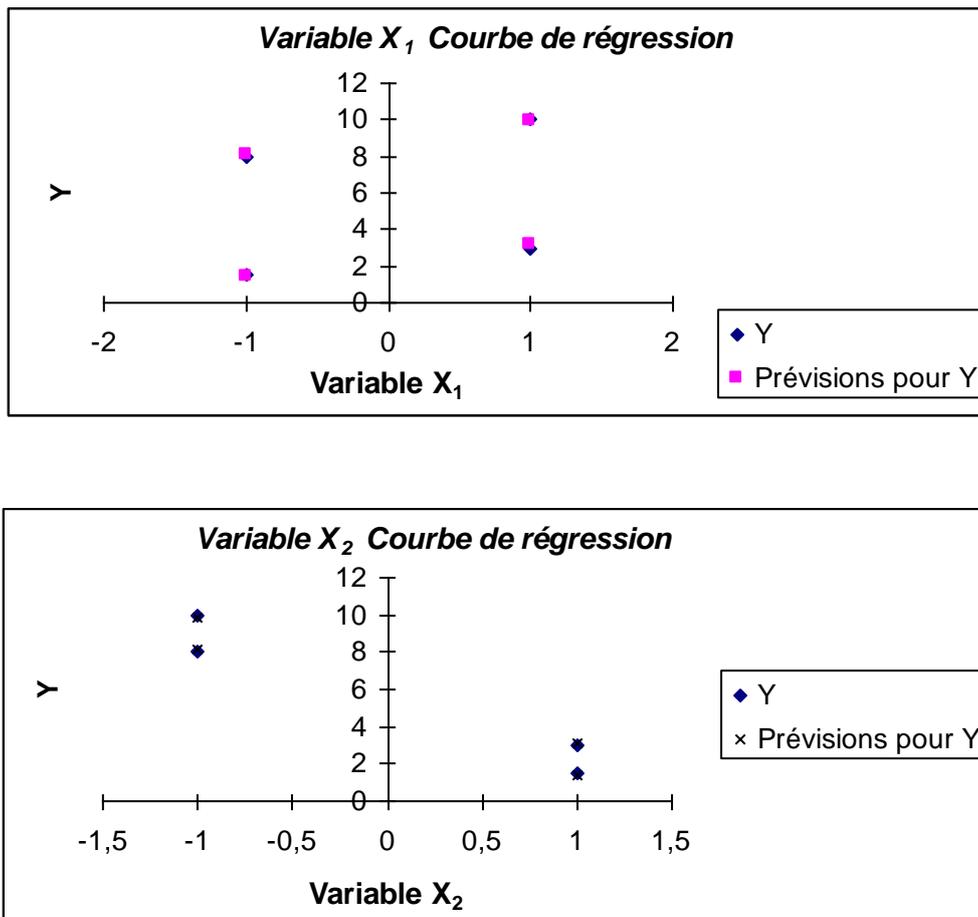
L'examen des graphes des régressions accompagnant le modèle permettra de voir plus clairement la localisation de chaque point expérimentale par apport à sa valeur estimée[65].

Nous avons déterminé à partir du modèle les réponses  $Y_i$  et on les a comparé avec celles obtenues en expérimentation, les résultats sont portés dans le tableau V-6-2 suivant :

**Tableau V-6-2 : comparaison des réponses expérimentales et estimées**

$Y_i$ (expérimentale)	$Y_{i\ est}$ (estimé par le modèle)
8	8.125
10	9.875
1.5	1.375
3	3.125

Les graphes de la figure V-6-2 montrent qu'effectivement le modèle proposé s'approche fortement du phénomène étudié.



**Figure V-6-2 : Courbes de régression**



**V-6-3 Analyse des résidus**

Les résidus sont les différences entre les valeurs Y réellement observées et celles qui sont fournies par l'équation de la régression [64].

Pour un point donné, le résidu ait une faible ou une forte valeur n'a absolument aucun rapport avec le fait que le modèle soit bon ou mauvais

Mais bien sûr, si tous les résidus d'une région sont faibles (resp. élevés), alors le modèle est bon (resp. mauvais)

D'après le tableau présenté ci-dessous, on remarque bien que les résidus ont des faibles valeurs ce qui nous confirme l'adéquation de notre modèle.

**Tableau V-6-3 : Analyse des résidus**

<i>Observation</i>	<i>Y (estimé)</i>	<i>Y (expérimentale)</i>	<i>Résidus</i>
1	8,125	8	-0,125
2	9,875	10	0,125
3	1,375	1.5	0,125
4	3,125	3	-0,125

**V-6-4. La significativité des coefficients du modèle postulé**

Pour effectuer l'évaluation statistique de la significativité des coefficients ai on utilise le t-test de Student:

Si  $t_i > t_c$ , alors le coefficient est significatif, sinon il est rejeté du modèle.

$$t_i = \frac{|a_i|}{s_i} \quad , i=1, 2, 3,4$$

$t_i$  : coefficient de Student calculée

$t_c$  : coefficient de Student critique ou tabulée

\* la valeur de  $t_{critique}$  est déterminé par une lecture sur la table de Student à  $(n - p)$  degrés de liberté et avec un *seuil de confiance* = 95%

\* L'intervalle de confiance de tout coefficient est donnée par :

$$a_i \pm t_{crit} * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

n : le nombre d'expériences réalisées, dans notre cas  $n = 4$

p : le nombre de coefficients du modèle, pour notre étude  $p = 3$  coefficients :  $(a_0, a_1, a_2)$

On dit qu'un coefficient est significatif, s'il appartient à cet intervalle.



▪ Calcul de la variance

$$s^2 = \frac{1}{n-p} \cdot \sum e_i^2$$

$e_i^2$  étant le résidu,  $\sum e_i^2 = 4 \cdot (0.125)^2 = 0.0625$

$$S^2 = 0.0625$$

$$s_i^2 = \frac{S^2}{n} \quad , \quad S_i^2 = \frac{0.0625}{4} = 0.0156 \quad , \quad S_i = 0.125$$

• Calcul des coefficients de Student :

Les valeurs calculées des coefficients de Student sont égales à :

$$t_{a0} = \frac{|a_0|}{s_i} = 5.625 / 0.125 = 45$$

$$t_{a1} = \frac{|a_1|}{s_i} = 0.875 / 0.125 = 7$$

$$t_{a2} = \frac{|a_2|}{s_i} = 3.375 / 0.125 = 27$$

La valeur tabulée du coefficient de Student retenue de la table de Student avec un degré de liberté : d.d.l. = (n - p) = 1 et avec un seuil de confiance de 95% est égale à  $t_{crit} = 6.314$ .

La condition  $t_i > t_c$  est vérifié, donc on peut dire que les facteurs du modèle sont considérés influents.

• Intervalle de confiance des coefficients :

En se basant sur la formule  $|a_i| \pm t_{crit} * \frac{S}{\sqrt{n}}$  , nous avons déterminé l'intervalle de confiance

des coefficients du modèle :

$$a_0 \pm 6.314 * \frac{0.25}{\sqrt{4}} = 5.625 \pm 0.78925 \quad , \quad a_0 \in [4.83575, 6.41425]$$

$$a_1 \pm 6.314 * \frac{0.25}{\sqrt{4}} = 0.875 \pm 0.78925 \quad , \quad a_1 \in [0.08575, 1.6425]$$

$$a_2 \pm 6.314 * \frac{0.25}{\sqrt{4}} = 3.375 \pm 0.78925 \quad , \quad a_2 \in [- 4.16425, - 2.58575]$$



Les résultats sont rapportés dans les tableaux VI-8 suivant :

**Tableau V-6-4 Intervalle de confiance des coefficients du modèle**

	Coefficients	Statistique t	Limite inférieure pour seuil de confiance = 95%	Limite supérieure pour seuil de confiance = 95%
Constante	5,625	45	4.83575	6.414225
Variable X <sub>1</sub>	0,875	7	0.08575	1.6425
Variable X <sub>2</sub>	-3,375	-27	- 4.16425	- 2.58575

Nous pouvons bien remarquer sur le tableau que les coefficients de notre modèle appartiennent à leurs intervalles de confiance, ce qui prouve la significativité des coefficients.

**V-6-5. Validation du modèle mathématique ( l'analyse de la variance)**

L'adéquation est le degré d'approximation des résultats expérimentaux et ceux des modèles. En mathématique statistique on utilise le critère de FISHER pour vérifier l'adéquation du modèle qui consiste principalement à comparer deux dispersions : dispersion d'adéquation résiduel, et dispersion expérimentale.

Si **F<sub>obs</sub> > au F(critique)** ; on accepte l'hypothèse H : « le carré moyen dû à la régression est significativement plus grand que le carré moyen dû aux résidus » avec la confiance 1- a (**voire chapitre III**). Dans ce cas la régression est globalement significative.

**Calcul de F observée**

d'essai	Y <sub>i</sub>	Y <sub>i</sub> <sup>est</sup>	Y <sub>moy</sub>	((Y <sub>i</sub> <sup>est</sup> - Y <sub>moy</sub> ) <sup>2</sup> )	((Y <sub>i</sub> - Y <sub>i</sub> <sup>est</sup> ) <sup>2</sup> )
1	3	3.125	5.625	6.25	0.015625
2	1.5	1.375	5.625	18.0625	0.015625
3	8	8.125	5.625	6.25	0.015625
4	10	9.875	5.625	18.0625	0.015625

$$SCEL = \sum ( Y_i^{est} - Y_{moy} )^2 = 48.625$$

$$SCER = \sum ( Y_i - Y_i^{est} )^2 = 0.0625$$



**Tableau V-6-5 Analyse de la variance**

Variation due à :	Somme des carrés	DDL	Carré moyen	F
Liaison	48.625	2	$\frac{48.625}{2} = 24.3125$	$\frac{24.3125}{0.0625} = 389$
Résidus	0.0625	1	$\frac{0.0625}{1} = 0.0625$	
Total	48,6875	3		

F(critique) lu sur la table de Fisher-Snedecor avec (p-1) et (n - p) degrés de liberté et un seuil de confiance =95%, est de 200.

D’après le tableau,  $F_{obs} = 389$  on remarque bien que  $F_{obs} >$  au F(critique) , l’hypothèse  $H_0$  est vérifiée et donc la régression est globalement significative.

**V-7. Essai confirmatif de la validité du modèle postulé**

La validation des résultats donnés par le modèle consiste à vérifier si les hypothèses retenues au départ du plan d’expérience sont bien vérifiées. La validation peut être réalisée en effectuant un essai complémentaire en dehors des essais du plan d’expérience.

Un essai au centre du domaine d’étude peut nous vérifier la linéarité de la réponse. Si la réponse de cet essai est égal à la moyenne des réponses du plan d’expérience, la linéarité des facteurs est vérifiée.

Dans notre cas d’étude, deux essais complémentaires ont été réalisés : le centre du domaine et un point du domaine d’étude

**V-7-1. la vérification au centre du domaine d’étude**

Le centre du domaine correspond à  $(X_1 = 0, X_2 = 0)$  exprimé en valeur réelle par  $(X_1 = 35^{\circ}C, X_2 = 0.9)$ .

Sous les mêmes conditions opératoires, la concentration initiale du phénol est de 100mg/l, l’agitation = 78 tours/ mn, l’aération = 0.24 l/mn et l’inoculum est de 1%. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure VI-4 :

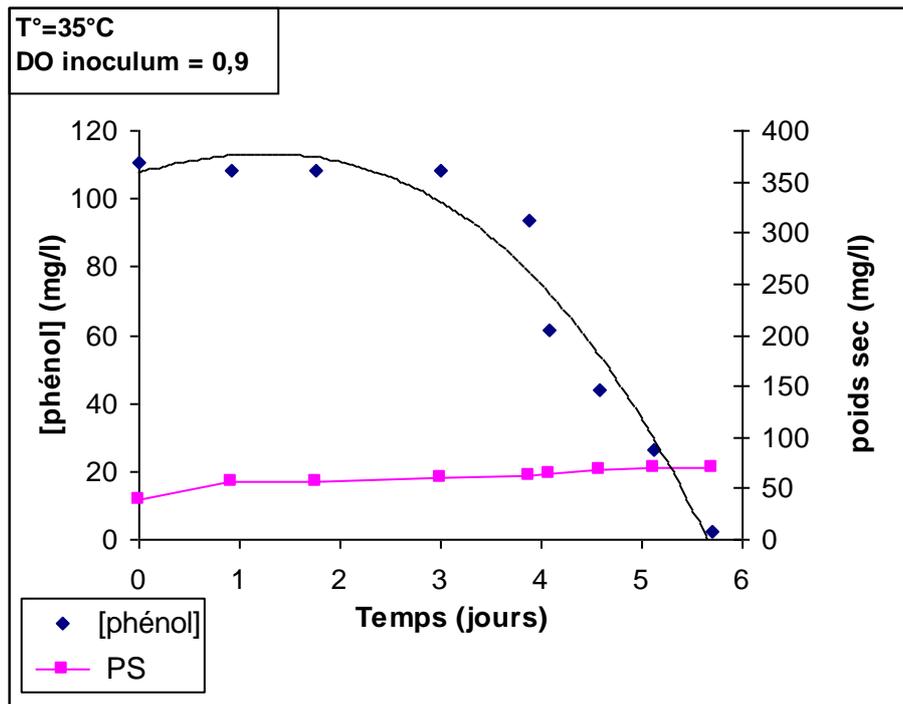


Figure V-7-1: Résultats de l'essai confirmatif au centre du domaine d'étude

$T=35^{\circ}\text{C}$ ,  $DO_{\text{inoculum}} = 0.940$ , agitation = 78 tours/ mn et aération = 0.24 l/mn,  $[\text{phénol}]_0 = 100\text{mg/l}$

D'après le graphe, on arrivera à la dégradation complète du phénol au bout de 137 heures.

On outre, Si on remplace les coordonnées de ce point dans notre modèle on aura:

$$Y = 5.625 + 0.875(0) - 3.375(0)$$

**Y = 5.625 jours**

On remarque bien que la réponse déterminée expérimentalement est très proche au résultat théorique, ce qui confirme la validité de notre modèle.

### V-7. 2 Application du modèle en un point à l'intérieur de l'intervalle d'étude

Dans cette partie on a vérifié le modèle pour un essai déjà réalisé à l'intérieur du domaine d'étude.

Dans l'étude de l'effet de la souche jeune (Chapitre V), sous les conditions opératoires :  $T = 30^{\circ}\text{C}$ ,  $DO = 1.14$ , agitation = 78 tours/mn, aération = 0.24 l/mn, et  $[\text{phénol}]_0 = 100\text{mg/l}$ , on est arrivé à une dégradation complète du phénol au bout de deux jours

Pour appliquer le modèle mathématique pour cet essai, il faut convertir les valeurs des deux paramètres en variables centrées réduites par le biais de la relation donnée en annexe N° 7:

La conversion en variable centrée réduite nous donne :

Variable	Variable réelle	Variable réduite
X1	30°C	-1
X2	1,14	0,8



Remplaçons donc les coordonnées de ce point dans notre modèle on aura:

$$Y=5.625+0.875X_1-3.375X_2$$

$$Y=5.625+0.875(-1)-3.375(0.8) = \mathbf{2.05 \text{ jours}}$$

Nous remarquons bien que la réponse obtenue par l'expérience se rapproche à celle calculée par le modèle.

# Conclusion Générale

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif de notre travail est la modélisation de la biodégradation du phénol par *pseudomonas aeruginosa* en système batch par le biais de plan d'expérience.

La première étape de notre travail, a porté sur l'étude de l'influence de quelques paramètres opératoires intervenant dans la biodégradation du phénol. Les résultats obtenus nous ont mené à déduire que :

- L'évolution de la dégradation du phénol à 30 °C et à 40 °C , indique que le rendement d'élimination du phénol est meilleur à une température de 30 °C
- La souche repiquée dégrade mieux le phénol en un temps réduit par rapport à une souche vieille .
- Les bactéries adaptées au phénol peuvent le dégrader à des concentrations élevées.

Dans la deuxième étape , l'utilisation d'un plan factoriel à deux niveaux nous a permis d'obtenir un modèle linéaire sous la forme :

$$Y=5.625+0.875X_1-3.375X_2$$

Nous avons par la suite:

- \* Étudier la validité du modèle obtenu par l'utilisation d'outils statistiques appropriés, comme le test de Student et l'analyse de la variance (test de Fisher)
- \* Vérifier l'exactitude de la méthode par la réalisation des essais supplémentaires appartenant au domaine d'étude.

En conclusion, on peut dire que l'élimination du phénol par *pseudomonas aeruginosa* en batch, est un moyen efficace pour pallier à la pollution des eaux par ce composé toxique .

La technique de plan d'expérience constitue un outil d'organisation et de gestion d'une campagne expérimentale destiné à apporter des éléments d'information, facilement interprétables sur le système étudié. La définition des expériences à réaliser permet de construire un modèle d'exploration du domaine expérimentale.

Deux principales perspectives sont envisageables :

- Etude de plusieurs paramètres, qui semblent être des facteurs influents sur le système comme (PH, la concentration, ... etc)
- Application et comparaison des autres plans d'expériences.

# Références bibliographiques

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :**

- [1] phénols monohydriques et dihydriques, dans les *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, 1999, Winnipeg, le Conseil.
- [2] Journal of Hazardous materials ,N° 140, (2007), pages 346-352
- [3] Journal of biotechnologie, N° 87, (2001) , pages 211-223
- [4] **R. Brückner** , Mécanismes réactionnels en chimie organique, De Boeck Université 1999.
- [5] **G. Dupuis** , Cours de chimie générale et organique ,Lycée Faidherbe de LILLE.
- [6] **Hermann , J. C. Chottard, J. C. Depezay, J. P Leroux** . Chimie fondamentale, 1982.
- [7] **J.BORMANS**, Analyse des eaux résiduaires industrielles, Edition CEBEDOC 1974.
- [8] **N. T. Ahn** , Introduction à la chimie moléculaire, Ellipses 1994.
- [9] **A. Pichard.**, Phénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS. N°2, 2005.
- [10] **INRS, phénol**, fiche toxicologique N°15, Paris (1997).
- [11] <http://www.pdfactory.com>
- [12] <http://www.sfc.fr/donnees/orga/cumene/textcum.htm>
- [13] **INERIS** (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques), Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, Juin 2003, <http://www.ineris.fr>.
- [14] [http://fr.wikipedia.org/wiki/Phénol\\_\(molécule\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Phénol_(molécule)).
- [15] [http://www.lenntech.com/français/feedback\\_fr.htm](http://www.lenntech.com/français/feedback_fr.htm)
- [16] Rapport d'évaluation pour le phénol, Loi canadienne sur la protection de l'environnement, page5 (1999).
- [17] **Grady** , Biodégradation des hydrocarbures aromatiques . 1985

- [18] **Álvaro A.M.G. Monteiro<sup>1</sup>, Rui A.R. Boaventura, Al'irio E. Rodrigues,** Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. Biochemical, Engineering Journal 6 (2000), pp. 45–49.
- [19] **W. Si-jing, L. Kai-chee** , « Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation », Enz. Micr. Tech., V. 25, 1999, pp. 177-184.
- [20] **K.Arinjay, K.Shashi and K.Surendra.**, Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. Biochemical engineering journal, Vol.22, N°2, pp.151-159, 2005.
- [21] **Ali.O (2005)**, Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du Phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en fermenteur. Magister, ENP.
- [22] **K. Weissermel, H-J. Arpe**, "Chimie organique industrielle", Masson, 1981.
- [23] Informations Chimie n°337, avril 1992, n°341, septembre 1992
- [24] **Brisou J (1971)**. Métabolisme des produits cycliques et aromatiques. Techniques d'enzymologie bactérienne. Ed : MASSON et CIE Paris.
- [25] **Barker E.L, Peter E.B, Petrecia F, Grant S.K (1978)**. Phenol poisoning due to contaminated drinking water. Arch. Env. Health.Vol 33. 89-94.
- [26] le Journal Officiel de la République Française, publié le 3 mars 1998.
- [27] Journal officiel de la république algérienne. N° 26, Le 23 avril 2006.
- [28] **Hermann**, 1985; élément de Microbiologie.75015 Paris.
- [29] **Philippe CAILLOUX**, Les bactéries : Réunion des représentants des usagers et des Associations, 25 janvier 2008.
- [30] **J. Euzéby** : Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale, à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- [31] <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cvfrançais.html>.
- [32] <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/index.html>.
- [33] [www.encyclopediefrancaise.com](http://www.encyclopediefrancaise.com).
- [34] **J.Guiraud, P.Galzy**, L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires, L'usine, pp 69-72, (1982).
- [35] *Pseudomonas aeruginosa*, Un article de Wikipédia, l'encyclopédie libre.

- [36] **J-C Boeglin**, Traitements biologiques des eaux résiduaires, Techniques de l'Ingénieur, J 3 942 (1999).
- [37] **J.Brisou**, **Techniques d'enzymologie bactérienne**, MASSON et C<sup>ie</sup>, Paris (1971).
- [38] <http://www.imedecin.com/Category1-All.htm>
- [39] [www.med.univmontp1.fr/.../modbase/MB7\\_Bio\\_Med/Ressources\\_locales/BACTERIO/B2-Physiologie\\_bacterienne.pdf](http://www.med.univmontp1.fr/.../modbase/MB7_Bio_Med/Ressources_locales/BACTERIO/B2-Physiologie_bacterienne.pdf)
- [40] **J. Freney, F.Renaud, W. Hansen, C. Bollet**, .Précis de bactériologie clinique. Coordinateurs: Editions ESKA, 2000.
- [41] **C. Bosgiaud**, Microbiologie générale et Santé , Coordinateur , Editions ESKA, 2003
- [42] <http://www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.html>
- [43] **H. Roques**, Fondements théoriques du traitement biologique des eaux, Ed. Technique et Documentation, T1 Lavoisier 1980, pages : 170-263.
- [44] **J. Monod**, La technique de cultures, théorie et application. Annales Institut Pasteur (1950), Paris.
- [45] **A. Meyer, J.Deiana, H.Leclerc** : Cours de microbiologie générale ; 1984 Doin Editeurs.
- [46] **GOUPY**, Introduction aux plans d'expériences, seconde édition, Dunod, 2001
- [47] Plans d'expériences. Application à l'entreprise. **Jean Jacques DROESBEKE, Jeanne Fine, Gibert Saporta**. Edition TECHNIP 1997
- [48] **M.PILLET**, Les plans d'expériences par la méthode de Taguchi, Les éditions d'organisation,2001
- [49] **G. & M.C SADO**, Les plans d'expériences, AFNOR, 2000 .
- [50] **Jacques Goupy et Lee Creighton, Dunod** Introduction aux plans d'expérience, / L'usine nouvelle, 2006,
- [51] Jacques .Goupy, **Techniques de l'ingénieur, P230, 1997**
- [52] Plan d'expérience, Un article de Wikipédia, l'encyclopédie libre.

- [53] Revue MODULAD, 2006 , Numéro 35, <sup>2</sup> <http://www-rocq.inria.fr/axis/modulad/archives/numero-33/tutorial-confais-33/confais-33-tutorial.pdf>
- [54] Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20<sup>th</sup> edition, 1988, Method 5530, pp.40-44.
- [55] [http://www . agri techno.ch](http://www.agri techno.ch)
- [56] **J Infect Chemother** , Effect of Metal Ions on Phospholipase C (Heat-Labile Hemolysin) from *Pseudomonas aeruginosa*, **1997**
- [57] MICROBIOLOGIE COURANTE Vol. 12 (1985).
- [58] Springer 2005, Biodegradation , pages : 319 - 327
- [59] Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Neutral Proteinase Production by *Pseudomonas aeruginosa*, **Folia Microbiol. 26, 358--363** (1981), **J.N. NIGA~, K.R. PILLAI and J. N. BA~UAH**
- [60] Microbiologie pratique, **JEAN-PAUL LARPENT ,MONIQUE LARPENT-GOURGAUD** , HERMANN,PARIS 1970
- [61] **Luis H. Guerra-Santos, Othmar Kiippeli, and Armin Fiechter**, Applied Microbiology Biotechnology (1986)
- [62] [http://biochonline.neuf.fr/cours\\_fichiers/effecchimiquesenz.htm](http://biochonline.neuf.fr/cours_fichiers/effecchimiquesenz.htm)
- [63] **JACQUES MONOD**, Inducteur et inhibiteur spécifique dans la biosynthèse d'un enzyme, Paris 1952.
- [64] **J. D. Lagrade** « Initiation à l'analyse des données » Edition Dunod, Paris, 1983
- [65] **DAMODAR, N.GUJARATI** : Econométrie (2004) ; Traduction de la 4<sup>émé</sup> édition Américaine par Bernard Bernier

# Annexes

**Annexe N°1 Composition des milieux de culture :**

**a) La composition du premier milieu (M<sub>1</sub>) dans un litre :**

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1.5 g.
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0.5 g.
- NaCl : 0.5 g.
- MgSO<sub>4</sub> : 0.5 g.
- NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 3 g.
- FeSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O : 0.02g .
- CaCl<sub>2</sub>,2H<sub>2</sub>O : 0.02g.

**b) La composition du deuxième milieu (M<sub>2</sub>) dans un litre :**

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.5 g.
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1.5 g.
- NaCl : 0.5 g.
- Mg SO<sub>4</sub> : 0.5 g.
- NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 1 g.
- FeSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O : 0.01g .
- CaCl<sub>2</sub>,2H<sub>2</sub>O : 0.01g.
- NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> : 0.5g.

Puis on ajoute par filtration stérilisante 100mg de phénol dans chacun des deux milieux. Les solutions obtenues sont ajustée à pH = 7 .

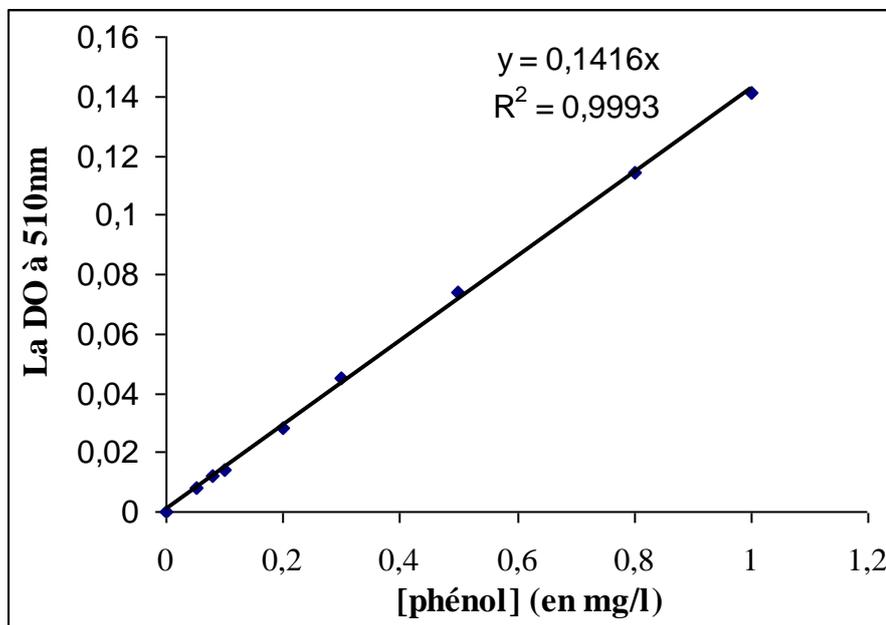
### Annexe N°2 Courbe d'étalonnage du phénol

On analyse des solutions préalablement préparées, à différentes concentrations connues en phénol.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Dilutions	Le blanc	1	2	3	4	5	6	7	8
DO	0.037	0.08	0.05	0.1	0.028	0.045	0.074	0.114	0.141
[phénol] (en mg/l)	0	0.012	$8.10^{-3}$	0.014	0.2	0.3	0.5	0.8	1

A partir de ces résultats, en traçant la variation de la densité optique en fonction de la concentration du phénol dans la solution. On obtient la courbe d'étalonnage suivante :



### Annexe N°3 Réactifs de dosage du phénol :

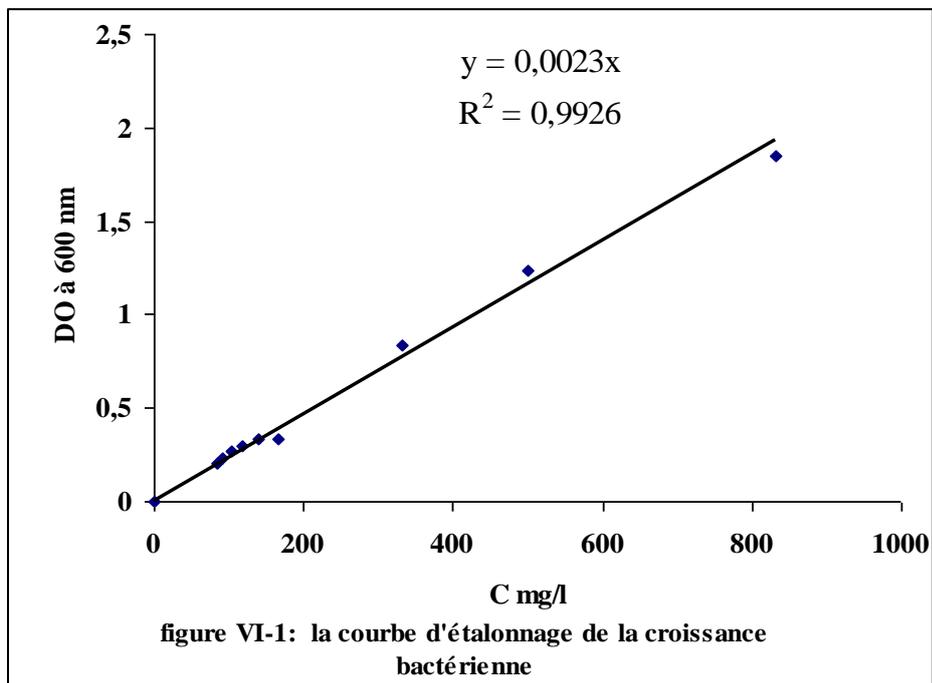
- 1- Solution d' amino-4-antipyrine à 2%
- 2- Solution de ferricyanure de potassium à 8%
- 3- Solution tampon à pH = 10

(Dissoudre 6.76g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dans 57.2ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , et compléter à 100ml avec de l'eau distillée)

#### Annexe N°4 Matériels utilisés

- Autoclave de marque CERTOCLAV
- Etuve de marque MEMMERT
- Spectrophotomètre UV/visible de marque SHIMADZU
- Erlenmeyer de 2 litre
- pH-mètre de marque HANNA
- Agitateur vortex de marque FISHER bioblock scientific
- Epprouvettes 16 x 125 mm en verre
- Plaque chauffante munie d'un agitateur de marque STUART
- Bec bunsen
- Micro filtres 0.45 µm
- Verrerie courante de laboratoire

#### Annexe N°5 La courbe d'étalonnage de la croissance bactérienne



### Annexe N°6 Détermination du rendement de dégradation du phénol

Le rendement de dégradation du phénol est calculé comme suit :

$$\text{Rendement de dégradation \%} = 100 \cdot (C_0 - C) / C_0$$

$C_0$  : concentration initiale en phénol ;

$C$  : concentration résiduelle en phénol dans le milieu.

### Annexe N°7 [47] : conversion des variables réelles en variables centrées réduites et inversement

Lorsqu'on attribue la valeur -1 au niveau bas d'un facteur et la valeur +1 au niveau haut, on effectue deux modifications importantes :

- 1) On change l'unité de mesure et la nouvelle unité est le pas est mesurée en unité d'origine.
- 2) On déplace l'origine des mesures et la nouvelle origine, noté 0, diffère donc de l'origine exprimée en unité courante.

Ces deux modifications entraînent l'introduction de nouvelles variables que l'on appelle variables centrées réduites (v.c.r) . Centrées pour indiquer le changement d'origine et réduite pour signaler la nouvelle unité.

Le passage des variables d'origine,  $A$ , aux variables centrées réduites,  $X$ , et inversement, est donné par la formule suivante :

$$X = \frac{A - A_0}{Pas}$$

-  $A_0$  : est la valeur centrale en unités courantes.

*Annexe N° 8 : Valeurs tabulées du critère de STUDENT tT [ P , v ]*

$\alpha=1-P$	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.025	0.010	0.005	0.001
P	0.5	0.60	0.70	0.80	0.90	0.95	0.975	0.990	0.995	0.999
v										
1	0.000	0.325	0.727	1.376	3.078	6.314	12.706	31.82	63.657	318.3
2	0.000	0.289	0.617	1.061	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.33
3	0.000	0.277	0.584	0.978	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.22
4	0.000	0.271	0.560	0.941	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173
5	0.000	0.267	0.559	0.920	1.476	2.015	2.571	3.305	4.032	5.893
6	0.000	0.265	0.553	0.900	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208
7	0.000	0.263	0.549	0.896	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785
8	0.000	0.262	0.546	0.889	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501
9	0.000	0.261	0.543	0.883	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297
10	0.000	0.260	0.542	0.879	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144
11	0.000	0.260	0.540	0.876	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025
12	0.000	0.259	0.539	0.873	1.365	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930
13	0.000	0.259	0.538	0.870	1.350	1.771	2.160	2.650	3.013	3.852
14	0.000	0.258	0.537	0.868	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787
15	0.000	0.258	0.536	0.866	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733
16	0.000	0.258	0.535	0.865	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686
17	0.000	0.257	0.534	0.863	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646
18	0.000	0.257	0.534	0.862	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.611
19	0.000	0.257	0.533	0.861	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579
20	0.000	0.257	0.533	0.860	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552
21	0.000	0.257	0.532	0.859	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527
22	0.000	0.256	0.532	0.858	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505
23	0.000	0.256	0.532	0.858	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485
24	0.000	0.256	0.531	0.857	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467
25	0.000	0.256	0.531	0.856	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450
26	0.000	0.256	0.531	0.856	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435
27	0.000	0.256	0.531	0.855	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421
28	0.000	0.256	0.530	0.855	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408
29	0.000	0.256	0.530	0.854	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396
30	0.000	0.256	0.530	0.854	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385
40	0.000	0.255	0.529	0.851	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307
60	0.000	0.254	0.527	0.848	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.232
80	0.000	0.254	0.527	0.846	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195
100	0.000	0.254	0.526	0.845	1.290	1.660	1.984	2.365	2.626	3.174
200	0.000	0.254	0.525	0.843	1.286	1.653	1.972	2.345	2.601	3.131
$\infty$	0.000	0.253	0.524	0.842	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090

Annexe N° 9 : Valeurs tabulées du critère de Fisher  $F[n-P, P-1]$

<i>(n - p)</i> degrés de liberté	<i>(p-1) degrés de liberté</i>												
	Pr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.25	5.83	7.50	8.20	8.58	8.82	8.98	9.10	9.19	9.26	9.32	9.36	9.41
	0.10	39.9	49.5	53.6	55.8	57.2	58.2	58.9	59.4	59.9	60.2	60.5	60.7
	0.05	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244
2	0.25	2.57	3.00	3.15	3.23	3.28	3.31	3.34	3.35	3.37	3.38	3.39	3.39
	0.10	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38	9.39	9.40	9.41
	0.05	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4
	0.01	98.5	99.0	99.2	99.2	99.3	99.3	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4
3	0.25	2.02	2.28	2.36	2.39	2.41	2.42	2.43	2.44	2.44	2.44	2.45	2.45
	0.10	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24	5.23	5.22	5.22
	0.05	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74
	0.01	34.1	30.8	29.5	28.7	28.2	27.9	27.7	27.5	27.3	27.2	27.1	27.1
4	0.25	1.81	2.00	2.05	2.06	2.07	2.08	2.08	2.08	2.08	2.08	2.08	2.08
	0.10	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94	3.92	3.91	3.90
	0.05	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91
	0.01	21.2	18.0	16.7	16.0	15.5	15.2	15.0	14.8	14.7	14.5	14.4	14.4
5	0.25	1.69	1.85	1.88	1.89	1.89	1.89	1.89	1.89	1.89	1.89	1.89	1.89
	0.10	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32	3.30	3.28	3.27
	0.05	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.71	4.68
	0.01	16.3	13.3	12.1	11.4	11.0	10.7	10.5	10.3	10.2	10.1	9.96	9.89
6	0.25	1.62	1.76	1.78	1.79	1.79	1.78	1.78	1.78	1.77	1.77	1.77	1.77
	0.10	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.96	2.94	2.92	2.90
	0.05	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00
	0.01	13.7	10.9	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.79	7.72
7	0.25	1.57	1.70	1.72	1.72	1.71	1.71	1.70	1.70	1.69	1.69	1.69	1.68
	0.10	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.72	2.70	2.68	2.67
	0.05	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57
	0.01	12.2	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.54	6.47
8	0.25	1.54	1.66	1.67	1.66	1.66	1.65	1.64	1.64	1.63	1.63	1.63	1.62
	0.10	3.46	3.11	2.92	2.81	2.73	2.67	2.62	2.59	2.56	2.54	2.52	2.50
	0.05	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28
	0.01	11.3	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.73	5.67
9	0.25	1.51	1.62	1.63	1.63	1.62	1.61	1.60	1.60	1.59	1.59	1.58	1.58
	0.10	3.36	3.01	2.81	2.69	2.61	2.55	2.51	2.47	2.44	2.42	2.40	2.38
	0.05	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07
	0.01	10.6	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.18	5.11

## ملخص:

يتمثل محتوى هذا البحث في استعمال المخطط التجريبي لانجاز الدالة التي تمثل ظاهرة التحلل البيولوجي للفينول في الماء من طرف بكتيريا بسودوموناس اريجينوزا.

لقد أثبتنا في هذه الدراسة تأثير درجة الحرارة نوع البكتيريا تأقلم البكتيريا قبل التثبيت على الفينول وتركيز الوسط التجريبي بالعناصر المعدنية على مرد وديق التحلل البيولوجي للفينول .

لقد قمنا بدراسة لإثبات صحة الدالة المفترضة من خلال إجراء فحصى ستودان و فيشر و تأكدنا من خلال إجراء بعض التجارب الإضافية.

كلمات مفاتيح : بسودوموناس اريجينوزا , الفينول , المخطط التجريبي

## Résumé :

Le present travail consist en l'utilisation du plan d'expérience pour modéliser la biodégradation du phénol dans l'eau par *Pseudomonas aeruginosa* en système batch.

Nous avons démontré l'influence de ,la température ,la nature de la souche bactérienne, la concentration du milieu de culture en minéraux, et l'adaptation des bactéries au phénol sur le rendement de la biodégradation.

Une étude de la validation du modèle postulé a été effectuée en appliquant les tests de Fisher et Student et une vérification du modèle par la réalisation des essais supplémentaires.

**Mots clés :** phénol, biodegradation, *Pseudomonas aeruginosa* , plan d'expérience,

## Abstract :

The present work consists in the use of the design of experiments to modelise the biodegradation of the phenol in water by *Pseudomonas aeruginosa* in batch system.

We have demonstrate the influence of, the temperature, the nature of the bacterial stump, the concentration of the culture middle in minerals, and the adaptation of the bacteria to the phenol on the output of the biodegradation.

A survey of the validation of the model applied for has been done while applying the tests of Fisher and Student and a verification of the model by the realization of the tests supplémentaires.

**Key words:** phenol, biodegradation, *Pseudomonas aeruginosa*, design of experiments,