

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



Ecole Doctorale Science de l'Eau et Développement Durable  
Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement  
Mémoire

présenté pour l'obtention du diplôme de **Magister** en  
*Science de l'eau et développement durable*  
*Option : Traitement des effluents industriels*

***Etude et modélisation de la cinétique de  
biodégradation du phénol par deux  
champignons filamenteux***

par

**TEBBOUCHE Latifa**

Soutenu devant le jury composé de :

<i>Président</i>	<i>Mr R. KERBACHI</i>	<i>Professeur</i>	<i>ENP</i>
<i>Rapporteur</i>	<i>M<sup>me</sup> A. HELLAL</i>	<i>Professeur</i>	<i>ENP</i>
<i>Examineurs :</i>	<i>Mr K. BENRACHADI</i>	<i>Professeur</i>	<i>UMBB</i>
	<i>M<sup>me</sup> S. ZEBODJ</i>	<i>Maitre de Conférences A</i>	<i>ENP</i>
	<i>M<sup>me</sup> N.YEDDOU</i>	<i>Maitre de Conférences A</i>	<i>USTHB</i>

Année universitaire 2010-2011  
ENP, Avenue Hassan Badi, El-Harrach, Alger

## **DEDICACES**

***A mes très chers parents***

*Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance*

***A mes sœurs et mes frères***

***A mes belles sœurs***

***A toute ma famille et mes amis***

***A tous ceux qui me sont chers***

## REMERCIEMENTS

*Le présent travail a été réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de L'Environnement (L S T E) au département du Génie de l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger.*

*J'adresse ma profonde reconnaissance à Madame Amina HELLAL Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude et mes sincères remerciements pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de m'encadrer, pour sa disponibilité ainsi que pour les compétences qu'elle m'a permis d'acquérir en réalisant ce travail.*

*Je tiens à remercier également Monsieur R.KERBACHI, Professeur à l'ENP pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*A Monsieur K.BENRACHEDI, Professeur à UMBB, qu'il trouve ici le témoignage de mes remerciements pour avoir accepté d'apporter son jugement à ce travail.*

*A Madame S.ZEBOUDJ Maitre de conférences à l'ENP et Madame N.YEDDOU Maitre de conférences à USTHB, tous mes remerciements pour avoir accepté d'examiner le présent mémoire.*

*Mes remerciements les plus distingués à Mr. A. KETTAB, Professeur, Responsable de l'Ecole Doctorale Sciences de l'Eau et développement durable.*

*Un remerciement spécial et sincère à M<sup>lle</sup> Dalila HANK et M<sup>lle</sup> Oumsaad ALI , pour leurs précieuse aide.*

*Mes remerciements les plus sincères pour tout les post-graduants du laboratoire de département de génie de l'environnement ainsi qu'à tous les étudiants de ma promotion.*

*Enfin je suis très reconnaissante à toute ma famille dont le soutien m'a permis de mener ce travail à son terme.*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Sommaire

<i>Résumé</i>	<i>i</i>
<i>Liste des tableaux et des figures</i>	<i>i</i>
<i>Abréviation</i>	<i>iii</i>

## INTRODUCTION

### Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I.1</b> le phénol , un polluant majeur des eaux	3
I.1.1 Identification et propriétés physiques et chimique du phénol	3
I.1.2 <i>Comportement du phénol dans l'environnement</i>	3
<b>I.1.3</b> <i>Toxicité et nuisance du phénol</i>	4
<b>I.1.4</b> Fabrication et utilisation	4
I.1.5 Les Sources d'émission	5
I.1.6 Réglementations	6
I.1.7 l'élimination du phénol	7
<b>I.2</b> L'état de connaissance sur la biodégradation du phénol	9
I.2.1 La biodégradation du phénol	9
I.2.3 Le mécanisme de la biodégradation aérobie	19
I.2.2 La dégradation fongique des composés aromatiques	12
<b>I.3</b> Généralités sur les moisissures	14
I.3.1 Les caractères généraux des champignons microscopiques	14
I.3.2 Conditions physico-chimiques de croissance	16
I.3.3 l'utilisation des champignons filamenteux	17
I.3.4 Présentation des espèces utilisées	17
<b>I.4</b> La méthodologie des plans d'expériences	19
I.4.1 Terminologie	19
I.4.2 Plans factoriels complets 2 <sup>k</sup>	22
I.4.3 La modélisation et l'objectif des plans d'expériences	22
I.4.4 Analyse de la variance et validation du modèle	23
I.4.5 Les tests statistiques	24
I.4.3. Optimisation et fonction désirabilité	26
I.4.5. Les logiciels de plan d'expérience	26

## **Chapitre II : MATERIEL ET METHODES**

II.1 Matériel biologique	27
II.2 Produits et matériels utilisés	27
II.3 Méthodes d'analyse	28
II.4 Dispositif expérimental	30
II.5 Méthode de plan d'expériences	31

## **Chapitre III : ETUDE DE LA DEGRADATION FONGIQUE DU PHENOL**

III.1 Etude de la dégradation fongique du phénol par respirométrie manométrique	33
III.2 Etude de l'influence de certains paramètres sur la biodégradation du phénol	35
III.2.1 Effet de l'adaptation du mycélium sur la biodégradation du phénol	35
III.2.2 Effet de la température sur la dégradation fongique du phénol	37
III.2.3 Effet du pH sur la dégradation fongique du phénol	39
III.2.4 Effet de la concentration initiale sur la biodégradation du phénol et la croissance fongique	41

## **Chapitre IV : LA MODELISATION PAR LE PLAN FACTORIEL**

IV.1. Définition des niveaux des facteurs	45
IV.2 Choix du plan d'expériences	46
IV.3 Expérimentation	47
IV.3.1 Analyse Classique	49
IV.4 Interprétation des résultats des calculs	54
IV.4.1 calculs des coefficients	54
IV.4.2 Analyse statistique	55
IV.5 la validation du modèle	57
IV.6 Représentation graphique des effets	60
IV.7 Optimisation et fonction désirabilité	63

*Références bibliographiques*

*Annexes*

## المُلخَص :

استُخدمت نوعين من الفطريات الخيطية ، *Aspergillus niger* و *Rhizopus stolonifer* لإختبار قدرتهم على تحليل الفينول في ظروف تجريبية مختلفة. حيث تمت دراسة تأثير تكييف سلالات ، التركيز الأولي للفينول ، درجة الحموضة ودرجة الحرارة. أظهرت النتائج أن كلا من الفطريات لها قدرة عالية على تحليل الفينول فالوقت اللازم لتحليل التام ل1 جرام/ لتر من الفينول هو 140 ساعة لـ *A. niger* و 210 ساعة بالنسبة لـ *R. stolonifer*. كان للتكييف تأثير ملحوظ على حركية تحليل الفينول من طرف *R. stolonifer* الا ان *Aspergillus niger* تمكن من تحليل الفينول بدون تكييف مسبق. سمح لنا تصميم التحليل الفطري من خلال التصميم التجريبي  $2^3$  بتحديد تأثير تركيز الفينول الأولي ، ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة كذا تأثير التفاعلات فيما بينها وذلك بواسطة متعدد الحدود من الدرجة الأولى حيث أن تركيز الفينول يؤثر سلبا على تحليل الفينول ، في حين أن pH و درجة الحرارة لهما تأثير إيجابي.

الكلمات المفاتيح : الفينول- الفطريات- التحلل -التصميم التجريبي

## Résumé

Deux champignons filamenteux, *Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer* ont été utilisés afin d'étudier leurs capacités de dégrader le phénol dans différentes conditions opératoires, à savoir : l'adaptation des souches, la concentration initiale du phénol, le pH et la température du milieu. Les cinétiques de biodégradation ont montré que *A. niger* possède un potentiel de dégradation plus élevé par rapport à *R. stolonifer* ; le temps nécessaire pour éliminer 1g du phénol par les deux champignons filamenteux était respectivement de 140 et 210 heures. Contrairement à *R.stolonifer*, *A.niger* a montré une tolérance plus élevée envers le milieu acide. La modélisation par un plan factoriel complet  $2^3$  de la biodégradation du phénol par *R.stolonifer* et *A.niger*, exprimée par un polynôme de premier degré, nous a permis de constater que la concentration influe négativement sur la réponse, tandis que le pH, et dans une moindre mesure la température, ont une action positive.

**Les mots clés :** phénol , biodégradation, champignons filamenteux, plan d'expérience.

## Abstract :

Two filamentous fungi, *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer* were used to test their ability in phenol degradation under different operating conditions such as: adaptation of strains, the initial concentration of phenol, pH and temperature. The results showed that both fungi have a high degradation potential towards phenol. Indeed, the time required for total elimination of 1g / L of phenol is 140 hours for *A. niger* and 210 hours for the *R.stolonifer*. Adaptation of *R.stolonifer* has a remarkable effect on the kinetics of degradation of phenol. However, *Aspergillus niger* does not require prior exposure to phenol. The performance modeling of fungal degradation by the factorial design ( $2^3$ ) allowed us to determine the effects of initial phenol concentration, pH and temperature and the effect of interactions between them. The factorial design expressed by a polynomial of first degree, we found that the concentration negatively affects the response, while the pH and to a lesser extent the temperature have a positive action.

**key words :** phenol , filamentous fungi ,fungal degradation, factorial design.

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I.1</b> : Caractérisation physique et chimique du phénol	3
<b>Tableau I.2</b> : Les principales utilisations du phénol	5
<b>Tableau I.3:</b> Les concentrations du phénol dans différentes eaux résiduaires	6
<b>Tableau I.4</b> : les valeurs limite algérienne des rejets d'effluents liquides industriels	7
<b>Tableau I.5</b> : les modes d'élimination du phénol dans l'eau	7
<b>Tableau I. 6</b> : présentation et description des espèces fongiques	18
<b>Tableau I.7</b> : formules générales donnant les effets et les interactions	23
<b>Tableau I.8</b> : Analyse de la variance	25
<b>Tableau II. 1:</b> Facteurs et domaine d'étude	32
<b>Tableau II. 2:</b> Matrice d'expériences du plan factoriel complet	32
<b>Tableau IV.1</b> : Facteurs et domaine d'étude	46
<b>Tableau IV.2</b> : Matrice d'expérience	49
<b>Tableau IV.3</b> : Effets et interactions des facteurs	54
<b>Tableau IV.4</b> : Estimations des coefficients (A.niger)	55
<b>Tableau IV.5</b> : Estimations des coefficients du modèle simplifié	56
<b>Tableau IV.6</b> : Estimations des coefficients (R.stolonifer)	56
<b>Tableau IV.7</b> : Résumé de l'ajustement	57
<b>Tableau IV.8</b> : Analyse de la variance (A.niger)	58
<b>Tableau IV.9</b> : analyse de la variance (R.Stolonnifer)	59

## Liste des figures

<b>Figure I.1</b> : Deux voies de métabolisme du phénol par <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
<b>Figure I.2</b> : ortho clivage du catechol	11
<b>Figure I.3</b> : meta clivage du catechol	11
<b>Figure I.4</b> : Région apical d'un hyphes	14
<b>Figure I.5</b> : Schéma simplifié de l'environnement d'un système donné	19
<b>Figure I.6</b> : l'effet d'un facteur	20
<b>Figure I.7</b> : domaine d'étude de plan factoriel $2^3$	20
<b>Figure II.1</b> : schéma du dispositif expérimental	29
<b>Figure II.2</b> : photo du dispositif expérimental	30
<b>Figure II.3</b> : respiromètre Oxitop.	30
<b>Figure III.1</b> : cinétiques de dégradation du phénol par <i>A.niger</i> (a) <i>R.stolonifer</i> (b) par respirométrie.	34
<b>Figure III.2</b> : Effet de l'adaptation sur la biodégradation du phénol	36
<b>Figure III.3</b> : Effet de la température sur la biodégradation du phénol	38
<b>Figure III.4</b> : Effet du pH sur la biodégradation du phénol	40
<b>Figure III.5</b> : Effet de la concentration initiale du phénol sur la biodégradation et la croissance (b) du <i>A. niger</i> .	42
<b>Figure III.6</b> : Effet de la concentration initiale du phénol sur la biodégradation et la croissance du <i>R.stolonifer</i>	43
<b>Figure IV.1</b> : les huit essais du plan factoriel complet $2^3$ ( <i>A. niger</i> )	47
<b>Figure IV.2</b> : les huit essais du plan factoriel complet $2^3$ ( <i>R.stolonifer</i> )	48
<b>Figure IV.3</b> : Essai du centre (600mg/l du phénol pH=5.5 et température=30°C)	48
<b>Figure IV.4</b> : les variations de la réponse ( <i>A.niger</i> ) en fonction des facteurs	51
<b>Figure IV.5</b> : les variations de la réponse ( <i>R.stolonifer</i> ) en fonction des facteurs	53
<b>Figure IV.6</b> : Illustration du tableau IV.3	54
<b>Figure IV.7</b> : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues	58
<b>Figure IV.8</b> : Diagramme des effets et de La désirabilité ( <i>A.niger</i> )	60
<b>Figure IV.9</b> : Diagramme des interactions	60
<b>Figure IV.10</b> : Diagramme des effets et de La désirabilité	61
<b>Figure IV.11</b> : Diagramme des interactions	62



## *Abréviation*

$a_0$ : Moyenne des réponses au centre,

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

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

DBO : Demande biologique en oxygène

F : Test de Fisher

Log  $P_{ow}$  : Coefficient de partage

n : Nombre d'expériences

pH : Potentiel d'hydrogène

PDAI: Modèle de premier degré avec interaction

p : Nombre de coefficients,

$R^2$  : coefficient de corrélation

S : Solubilité dans l'eau

T : température

t : Test de Student

$x_i$  : valeur centrée réduite du paramètre étudié,

$y_i$ : Réponse mesurée,

$\hat{y}_i$ : Réponse calculée,

$\bar{y}$ : Réponse moyenne

$\alpha$  : Seuil de confiance

$\mu$  : taux spécifique de croissance

## ***INTRODUCTION***

Le cheminement de l'humanité et l'accélération continue qui le caractérise aboutissent aujourd'hui à une situation environnementale déséquilibrée et inquiétante.

En effet, l'expansion extraordinaire qu'a connue l'industrie au cours des dernières décennies se traduit par la mise en circulation dans la biosphère d'innombrables composés organiques de toxicité souvent élevée.

L'intensification de ces divers polluants dans les cours d'eaux et les multiples usages domestiques, agricoles et industriels, qui font appel à l'eau, fragilisent cette ressource naturelle irremplaçable et indispensable pour toute forme de vie.

Devant cette situation, on aperçoit l'émergence de la notion de développement durable qui consiste en l'assurance des besoins de l'homme en ressources naturelles en préservant la terre à la future génération à travers une gestion plus rationnelle des ressources naturelles, et la recherche de méthodes de dépollution de plus en plus perfectionnées.

Actuellement la dépollution des eaux usées contenant des composés phénoliques est réalisée par les méthodes chimiques ou physiques, y compris l'extraction de solvant, la séparation par membrane, adsorption sur charbon actif, l'oxydation électrochimique et l'ozonisation. Malgré le fait que certaines de ces techniques se sont révélées efficaces dans la détoxification des phénols, la plupart d'entre elles sont non seulement coûteuses, mais aussi peuvent conduire à la formation de produits secondaires toxiques. Par ailleurs le traitement biologique, basé principalement sur la capacité des micro-organismes, est utilisé comme une alternative car il a un faible coût et peut conduire à une minéralisation complète.

Les micro-organismes capables de dégrader ces polluants dans les conditions naturelles sont d'un intérêt particulier à cet égard. Ces dernières années, une attention particulière s'est portée sur le rôle des champignons filamenteux dans le recyclage des substances naturelles complexes (la lignine, la cellulose et la chitine) grâce à leur riche arsenal enzymatique. En effet cette richesse enzymatique permet à ces champignons d'assurer un grand nombre de réactions biochimiques (oxydation, réduction, hydrolyse et synthèse) sur des polluants de structures chimiques différentes.

Dans cette étude le phénol a été choisi pour représenter les composés aromatiques toxiques des eaux industrielles. Les objectifs de ce travail est :

- i) d'étudier les effets de la concentration initiale du phénol, la température et le pH sur la cinétique de biodégradation du phénol par deux champignons filamenteux (*Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer*).
- ii) de proposer un modèle par un plan factoriel complet pour interpréter les résultats obtenus et optimiser les conditions opératoires.

Ce document comporte quatre chapitres. Le premier chapitre présente un rappel des principales données bibliographiques concernant :

- le phénol,
- la biodégradation,
- les champignons filamenteux,
- les plans d'expériences,

L'ensemble du matériel et des méthodes utilisés pour la culture et l'étude de la biodégradation est décrit dans le deuxième chapitre. Le troisième et le quatrième chapitre sont consacrés à l'étude et la modélisation de dégradation du phénol par les deux espèces fongiques.

Enfin, une conclusion générale et une bibliographie complètent cette rédaction.

*Chapitre I :*

***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE***

### I.1 le phénol , un polluant majeur des eaux :

La civilisation technologique rejette dans les eaux de façon directe ou accidentelle, d'innombrables substances organiques de synthèse. Les phénols figurent parmi les redoutables polluants des eaux. Leur toxicité est des plus élevées pour la plupart des organismes [1].

#### I.1.1 Identification et propriétés physiques et chimiques du phénol:

Le phénol ou l'hydroxybenzène est un hydrocarbure monoaromatique oxygéné de formule  $C_6H_5OH$  [2]. Il se présente dans les conditions normales de température et de pression sous forme d'une masse cristalline ou d'aiguilles incolores et d'odeur caractéristique à la fois âcre et douceâtre, au contact de l'air, il a tendance à s'oxyder légèrement pour donner des traces de quinones qui le colorent en rose [3].

**Tableau I.1 :** Caractérisation physique et chimique du phénol [3-5] :

Masse moléculaire (M) :	<b>94,11g/mol</b>
Température d'ébullition :	<b>181,7 °C.</b>
Masse volumique à 20 °C :	<b>1,072 g/cm<sup>3</sup>.</b>
Coefficient de partage <b>Log P<sub>ow</sub></b> :	<b>1.47</b>
Potentiel <b>pKa</b> à 20 °C :	<b>10</b>
Solubilité dans l'eau <b>S</b> :	<b>82.8 10<sup>3</sup> mg/l</b>
Température auto-inflammation :	<b>715 °C</b>

#### I.1.2 Comportement du phénol dans l'environnement :

Les propriétés physico-chimiques du phénol qui sont regroupées dans le tableau I.1 permettent de prévoir leur comportement lors de leur entrée dans l'environnement.

A 25°C, le phénol est modérément soluble dans l'eau (83 g/l) ; il l'est en toute proportion à partir de 65°C. Il est également très soluble dans nombreux solvants organiques usuels (l'acétone, l'éthanol) [3].

Dans le sol le phénol est mobile à moyennement mobile [4] sa dégradation est généralement rapide (2-5 jours), alors qu'il peut persister dans l'eau pour une période de 9 jours. Sa demi-durée de vie dans l'atmosphère est estimée de 16 heures [6].

### ***1.1.3 Toxicité et nuisance du phénol :***

La toxicité des hydrocarbures est liée à leur hydrophobicité exprimée par le coefficient de partage octanol/eau ( $\log P_{ow}$ ) qui reflète aussi la capacité des polluants à déstructurer les membranes biologiques [7, 8] .

Les composés aromatiques possédant un  $\log P_{ow}$  entre 1 et 3,5 sont très toxiques pour les organismes vivants.

- la solubilité modérée du phénol et sa valeur de  $\log P_{ow} = 1,47$  (tableau I.1) lui confèrent une toxicité élevée vis à vis les micro-organismes [2].
- Le phénol est toxique par voies orale et cutanée, irritant pour le tractus respiratoire et corrosif pour la peau. L'ingestion par l'homme de 4,8 g de phénol entraîne le décès en 10 minutes [3].
- Une exposition prolongée au phénol induit des effets d'intensité variable selon l'espèce, en particulier sur le système nerveux central, le cœur, le foie et reins [9].
- Absorbé facilement par ingestion, par inhalation ou à travers la peau, le phénol est éliminé rapidement, essentiellement dans l'urine sous forme de dérivé sulfo-conjugué ou glucurono-conjugué [3].
- Le phénol est classé mutagène catégorie 3 (substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets mutagènes) par l'Union Européenne [4], et l'agence de protection de l'environnement EPA le classe parmi les polluants les plus importants [10,11].
- Le phénol est un polluant toxique à faible taux pour les êtres vivants. En effet il est toxique pour les poissons à faible concentration (5-25mg/l) [12-14] ; il devient dangereux dans l'eau de rivières dès que sa teneur atteint 1mg/l [15].
- La réaction entre le phénol et de nombreuses substances (formaldéhyde, chlorure d'aluminium, nitrobenzène) peut être violente.
- A chaud, le phénol liquide attaque certains métaux (plomb, zinc, aluminium...) ainsi que certains plastiques notamment le polyéthylène [3].

### ***1.1.4 Fabrication et utilisation du phénol :***

Le phénol ordinaire est un produit majeur de la grande industrie en servant de précurseur pour la fabrication de nombreux ingrédients de la vie moderne [15].

Il existe pour sa synthèse plusieurs procédés industriels, mais seules deux d'entre elles sont mises en œuvre industriellement :

- **Peroxydation du cumène** : le principe de cette fabrication est fondé sur l'oxydation du cumène en hydroperoxyde de cumène, suivie de sa scission en milieu acide pour donner le phénol et l'acétone [16]. Sa synthèse est réalisée à plus de 95% par cette méthode [6].

- **Oxydation de toluène (méthode "Dow")** consiste à une décarboxylation oxydante de l'oxyde benzoïque former par l'oxydation de toluène [4].

A côté de sa synthèse, d'autres sources concernent des goudrons, lignite et de liqueur de lavage des essences de craquage [16].

Actuellement environ **6 millions de tonnes par an** du phénol sont produits dans le monde avec une tendance à l'augmentation [6].

**Tableau I.2** : Les principales utilisations du phénol [6]:

produit	pourcentage
Bisphénol A	28%.
Résines phénoliques	35%
Nylon6	16%

Le phénol peut être converti en xylénols, alkylphénols, chlorophénols, aniline et d'autres intermédiaires secondaires. Il entre également dans la production de tensio-actifs, les engrais, les explosifs, les peintures et décapants pour peinture, des textiles, du caoutchouc et en plastique plastifiants et des antioxydants [6]. Il est utilisé dans une moindre mesure en tant que composant dans des cosmétiques et des médicaments.

Depuis 2006, le phénol ne peut être utilisé comme substance active biocide (désinfectant) [3].

#### ***1.1.5 Les Sources d'émission :***

Les phénols peuvent exister à l'état naturel dans les milieux aquatiques, étant produits par la décomposition de la végétation aquatique [20]. Le métabolisme humain et animal et la décomposition de déchets organiques divers sont également responsables de la présence de phénol dans l'environnement [4].

La présence de phénol xénobiotique [17] dans l'environnement provient des eaux résiduaires de diverses industries [4,17] telles que les raffineries, les opérations de cokéfaction et de transformation du charbon, et la fabrication des produits pétrochimiques. De plus les rejets des industries des produits pharmaceutiques [18, 19], des plastiques, les produits du bois, la peinture et des pâtes et papiers contiennent des quantités non négligeables de phénol [6].

**Tableau I.3:** Les concentrations du phénol dans différentes eaux résiduaires industrielles [6]

Source	concentration de phénol (mg/l)
les raffineries	6- 500 mg/l
les opérations de cokéfaction	28- 3900mg/l
la transformation du charbon	9- 6800 mg/l
la fabrication des produits pétrochimiques	2.8-1220 mg / l
production des résines phénoliques	15000 mg/l [8]
rejet d'huile d'olive	1000 - 1500mg/l [8]
Autres sources	0.1-1600 mg / l

### *1.1.6 Réglementations:*

Du fait du caractère toxique des phénols, il est important de légiférer sur les teneurs maximales admissibles pour éviter tout risque environnemental ou humain, en effet l'agence de protection de l'environnement (EPA) a établi une norme de purification de l'eau de moins de **1µg/l** de phénol dans les eaux de surface [21], alors que les limites indiquées par l'Union Européenne pour les émissions des eaux usées sont de **0,5 mg/l** pour les eaux de surface et de **1mg/l** pour le système d'égouts.

En ce qui concerne les eaux destinées à la consommation humaine (les eaux potables et minérales) les concentrations ne doit pas excéder **0,5 µg/l** [6].

- **Norme Algérienne :**

Le Décret exécutif **06-141** (définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels) fixe, pour différentes industries, les teneurs maximales admissibles dans les effluents aqueux, un distinguo est fait entre les installations neuves et anciennes (tableau I.4).



**Tableau I.4** : valeurs limites algériennes des rejets d'effluents liquides industriels [22] :

Type d'industrie	Valeurs limites	tolérance aux valeurs limites anciennes installations
Raffinage de pétrole	0,25g/t	0,5g/t
Industrie cokéfaction	0,3mg/l	0,5mg/l
Industrie mécanique	0,5mg/l	1mg/l

***1.1.7 L'élimination du phénol :***

Le potentiel danger du phénol vis-à-vis de l'homme et de son environnement est clairement mis en évidence. Leur élimination des eaux résiduaires a été souvent envisagée. Les techniques employées vont des procédés physicochimiques aux traitements biologiques.

Ces procédés peuvent être classés selon deux modes, le premier a pour but la récupération des composés phénols, en revanche le deuxième est basé sur la destruction biotique et abiotique de ces derniers.

**Tableau I.5** : modes d'élimination du phénol dans l'eau [6, 26] :

• Méthodes de séparation	• Méthodes de destruction
Distillation	Ozonation
Extraction liquide-liquide avec différents solvants	Oxydation enzymatique par voie humide
Adsorption sur charbons actifs	Electrochimique
Extraction sur membrane par solvant	Oxydation photocatalytique
	Traitements biochimiques
	Biodégradation

Bien que ces méthodes de traitement semblent efficaces pour le traitement des rejets phénoliques, certaines d'entre elles, telles que l'adsorption sur charbon actifs et l'incinération, présentent l'inconvénient d'être chers avec la possibilité de générer des sous-produits polluants [23]. Ainsi l'élimination du phénol par les voies biologiques s'est avérée

être une méthode efficace et économique [24] en raison des coûts inférieurs et la possibilité de la minéralisation complète. D'un point de vue environnemental cette minéralisation totale est souhaitable, car elle représente une désintoxication complète [25].

## **I.2 L'état de connaissance sur la biodégradation du phénol :**

Le but de biodégradation est au moins de réduire les niveaux de polluants à un niveau indétectable, non toxique ou des niveaux acceptables, c'est à dire dans les limites fixées par les organismes de réglementation ou, idéalement, minéraliser complètement les organo-polluants en dioxyde de carbone. En outre la biodégradabilité est une propriété intrinsèque d'une substance mais elle dépend aussi de la présence des microorganismes de biodégradation compétents dans le milieu considéré.

### ***I.2.1 La biodégradation du phénol :***

La biodégradation du phénol par les bactéries a été examinée depuis le début de vingtième siècle [27]. En effet la dégradation bactérienne des composés aromatiques, et en particulier le phénol et ses dérivés, a été largement étudiée notamment par l'espèce bactérienne du genre *Pseudomonas* [28].

Cependant la capacité de dégrader des phénols ne se limite pas uniquement aux bactéries. Dans ce contexte plusieurs auteurs ont identifié de nombreux microorganismes pouvant utiliser le phénol comme source unique de carbone et d'énergie comme les champignons [18,19,29], les levures [21,12] et les algues [30].

Les traitements biologiques des effluents phénoliques peuvent être effectués en aérobiose [45] comme en anaérobiose [8] par des cultures mixtes ou pures[49] ; ainsi l'utilisation des cellules vivantes peut s'effectuer en cultures libres ou immobilisées, en réacteur fermé ou bien en continu [50-52].

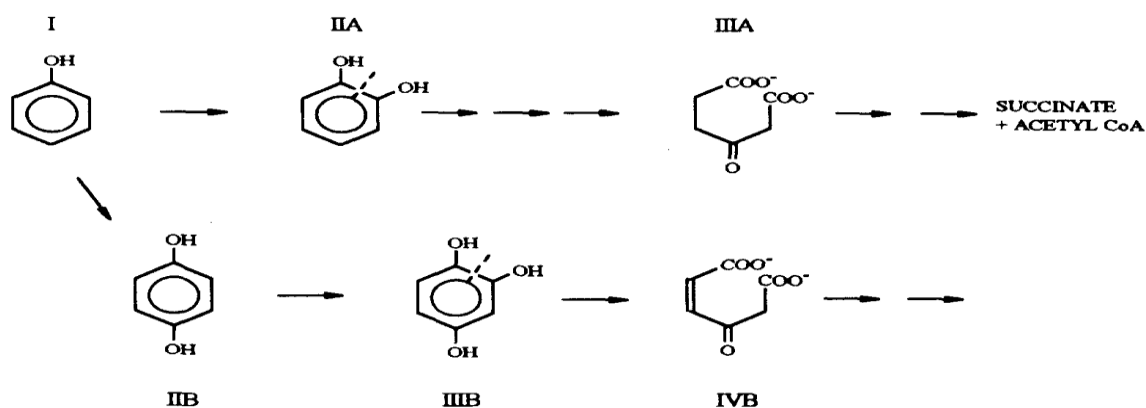
### ***I.2.3 Le mécanisme de la biodégradation aérobie :***

La dégradation aérobie d'un composé aromatique s'effectue typiquement en deux temps, la première phase fragilise le cycle par oxygénation et la seconde consacre l'ouverture du cycle et les transformations successives qui conduisent au métabolisme cellulaire central (cycle de Krebs) [15].

Deux voies différentes sont proposées pour le métabolisme du phénol :

Dans la première voie, le phénol subit une ortho-hydroxylation pour donner du catéchol, Dans l'autre voie, le phénol est hydroxylé en para position pour produire l'hydroquinone, qui

est ensuite converti en 1,2,4-trihydroxybenzène pour la fission cycle par ortho-clivage pour donner maléylacetate [41].



**Figure I.1** : Deux voies de métabolisme du phénol par *Aspergillus fumigatus* (ATCC28282)[41]

**I** phénol, **IIA** catéchol,, **IIIA** 3-oxoadipate,

**IIB** hydroquinone, **IIIB** 1,2,4trihydroxybenze, **IVB** maléylacetate

*Le catéchol* est l'intermédiaire le plus important qui résulte du métabolisme de biodégradation du phénol par différents microorganismes. En effet une seule hydroxylation transforme le phénol ordinaire en catéchol [15, 43,52].

Généralement, deux modes d'attaque pour le clivage du catéchol sont possibles selon les micro-organismes concernés : [31]

- L'ouverture intra-diol du catéchol dite voie ortho (figure I.2) implique le clivage du catéchol par la 1,2 catéchol-dioxygénase qui catalyse le clivage ortho de catéchol en cis- acide muconique. Après l'ortho clivage les produits sont métabolisés par la voie 3-oxodipate (ou  $\beta$ -cétoadipate) conduisant à la formation du succinate et de l'acétyl-CoA [43].

- L'ouverture extra-diol du catéchol ou la voie de clivage méta (figure I.3) a comme produits finaux le pyruvate et l'acétaldéhyde [36].

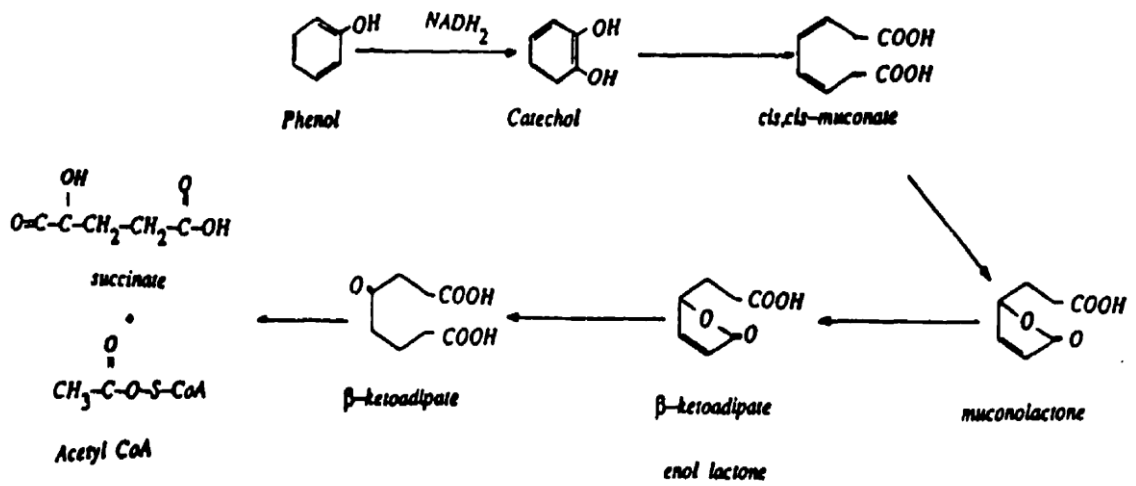


Figure I.2 : ortho clivage du catéchol

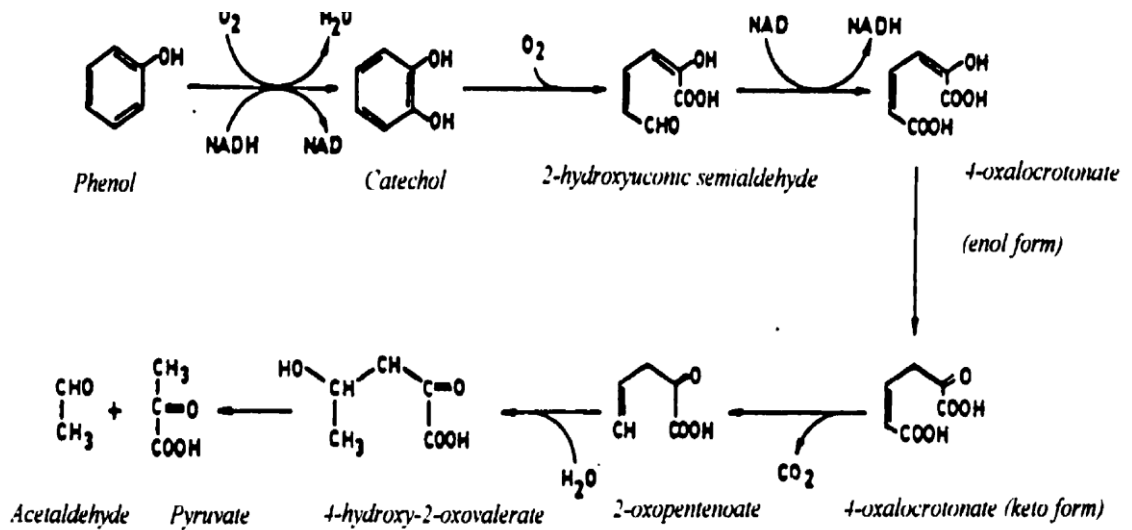


Figure I.3: méta clivage du catéchol [31]

La voie du 3-oxoadipate (*ortho clivage du catéchol*) est utilisée par nombreuses espèces bactériennes et par des Eucaryotes notamment des levures et des champignons filamenteux [7, 15, 18, 19, 42,43].

Les composés résultant du clivage des différents composés aromatiques sont ensuite complètement oxydés en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O lors de leur utilisation dans le cycle de Krebs.

Durant le catabolisme aérobie des composés phénoliques, l'oxygène joue un double rôle, d'activateur au moment des hydroxylations et du clivage, et d'accepteur final des électrons issus du cycle de Krebs [65].

### ***1.2.2 La dégradation fongique des composés aromatiques:***

Malgré la mise en évidence de la dégradation fongique en 1960 [27], l'utilisation des champignons a attiré peu d'attention puisque la plupart des recherches de biodégradation ont porté principalement sur l'utilisation de bactéries. Néanmoins, récemment, les champignons ont reçu une attention considérable pour leur rôle important dans le recyclage de complexes substances naturelles (la lignine, la cellulose et la chitine) grâce à leur riche arsenal enzymatique [18, 15, 32, 44].

D'ailleurs les enzymes qui sont impliquées dans la fragmentation de la lignine, dégradent une large gamme de polluants persistants [33].

Il convient de noter que les champignons filamenteux sont capables de se développer dans des conditions extrêmes et de survivre dans la présence de divers xénobiotiques toxiques pour d'autres souches [34]. En outre, les champignons ont l'avantage de pénétrer dans le sol contaminé pour atteindre les polluants [29, 33].

Les recherches sur la dégradation fongique des polluants ont abouti à l'isolement de nombreux genres de champignons qui peuvent métaboliser des hydrocarbures aromatiques [33] y compris le phénol et ses dérivés [18, 19, 36], des hydrocarbures aliphatiques [37], le pyrène [48], les pesticides [25,39,46] et les herbicides [47]. Ces recherches ont également démontré la capacité fongique à éliminer les métaux lourds [40].

La synthèse de quelques travaux disponibles dans la littérature concernant la dégradation fongique du phénol laisse envisager un potentiel intéressant de certains champignons filamenteux tels que *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* qui sont connus pour leurs capacités de dégrader des composés aromatiques [29, 36, 41].

Santos et Linardi [18] ont isolé et étudié 30 souches de champignons différents, tolérants au phénol. La présence de l'activité d'hydroxylase-phénol et le catéchol 1,2-dioxygénase a été prouvée dans les cellules de 15 souches de l'espèce *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Graphium*, cultivées dans un milieu contenant du phénol [18].

### I.3. Généralités sur les moisissures :

Responsables de la destruction d'une grande partie de la matière organique terrestre, les moisissures contribuent largement à l'accomplissement des grands cycles biologiques naturels. En effet le terme « moisissure » n'est pas réellement de signification systématique, il est utilisé de façon empirique pour désigner tous *champignons microscopiques* qui intéressent l'économie et l'environnement humains, de façon bénéfique ou néfaste. Les moisissures sont des champignons et ils ont donc tous les caractères fondamentaux [53].

#### I.3.1 Les caractères généraux des champignons microscopiques :

Les champignons filamenteux (moisissures) sont des organismes *Eucaryotes hétérotrophes*, ils se différencient des Procaryotes par le fait que leurs cellules sont généralement de taille supérieure, contenant un noyau, des vacuoles et des mitochondries. Les champignons sont incapables d'effectuer la photosynthèse et tirent leur énergie de l'oxydation des composés chimiques organiques. Ils sont immobiles à cause de la rigidité de leur paroi et ont une structure mycélienne constituée de filaments ramifiés, *les hyphes*, qui constituent le *mycélium* (thalle) [54].

##### A. Classification :

On distingue quatre divisions selon les modalités de la reproduction sexuée : les Zygomycotina, les Mastigohmycotina (appelés mycètes inférieurs), les Ascomycotina et les Basidiomycotina. En outre, lorsque la reproduction n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina [55].

##### B. Croissance et reproduction :

La croissance d'une extrémité d'un hyphe permet au mycélium de s'étendre dans de nouvelles régions à partir de l'inoculum [54].

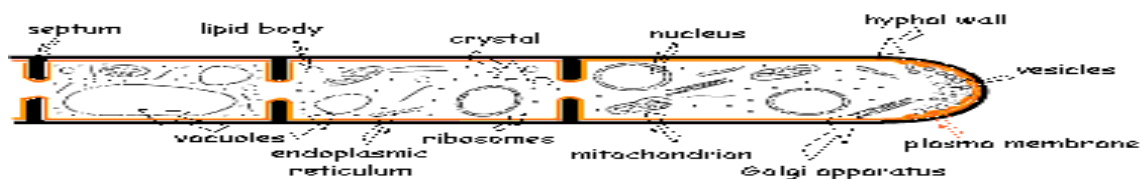


Figure I.4 : Région apical d'un hyphe [54]



Lorsque les moisissures sont filamenteuses, leur taux de croissance est déterminé en mesurant les modifications de la masse (M) en fonction du temps dans des conditions d'excès de nutriments. Le taux spécifique de croissance ( $\mu$ ) pour la culture peut être calculé en utilisant la formule:

$$\frac{dM}{dt} = \mu M$$

La croissance des moisissures dans un milieu donné suit différentes phases successives: phases de latence, d'accélération, de croissance exponentielle, de décélération stationnaire et de mortalité.

La croissance exponentielle ne survient que pendant une période brève dans laquelle les branches des hyphes sont activées et les nouvelles hyphes s'étendent ensuite à taux linéaire vers les régions non colonisées du milieu de culture [54].

La reproduction chez les moisissures passe par la formation des spores issues de processus asexués ou sexués [56]. Le développement de l'hyphes se fait à partir d'une spore (sexuée ou asexuée) par émission d'un ou plusieurs tubes germinatifs et par croissance de la seule cellule terminale. La formation d'une colonie se fait de façon radiale à partir du point d'inoculation.

#### ***A. Nutrition et métabolisme du carbone :***

Concernant les besoins nutritionnels : Les moisissures sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone. Elles utilisent des matériels organiques comme sources de carbone et d'énergie.

Les hydrates de carbone doivent être sous forme soluble pour entrer dans les hyphes, seules les petites molécules du substrat peuvent traverser la paroi, les grosses doivent être préalablement dégradées (les grosses molécules sont captées physiquement par absorption sur la biomasse). Fixés de façon extracellulaire, leurs produits d'hydrolyse générés sous l'action d'exo-enzymes peuvent ensuite pénétrer dans les cellules mêmes.

Les oligoéléments tels que K, Fe, Cu, Mn, Mg, Zn, Mo et Ca sont essentiels pour la croissance.

Au sein des hyphes, la glycolyse et le cycle de l'acide carboxylique constituent les voies du métabolisme du carbone et de l'énergie. Les moisissures sont habituellement aérobies, mais certaines espèces sont capables de vivre dans des milieux à faible teneur en oxygène [57].

Une carence en nutriments, une compétition et d'autres types de stress métabolique limitent la prolifération et favorisent la sécrétion de métabolites secondaires. Ces composés peuvent être

produits par diverses voies métaboliques, certains sont des antibiotiques, des hormones végétales, arômes et des alcaloïdes.

Diverses classes d'enzymes peuvent être produites en fonction des substrats métabolisés par ces microorganismes, comme des cellulases; des chitinases, des protéases. L'activité de ces enzymes est régulée par la concentration du substrat et par rétro-inhibition [54].

### ***1.3.2 Conditions physico-chimiques de croissance :***

Outre les exigences nutritives, le développement microbien est sous la dépendance de conditions physico-chimiques dont la nature varie selon l'espèce.

A la différence des substances nutritives qui ne sont pas limitantes dans la majeure partie des cas, les facteurs de l'environnement peuvent constituer un élément déterminant pour l'initiation et la poursuite du développement des champignons.

❖ *La température*: l'action de la température intervient à plusieurs niveaux : activation du métabolisme selon la loi d'Arrhenius, stress thermique et dénaturation des constituants cellulaires. La température intervient aussi sur les transferts physiques.

La plupart des champignons sont *mésophiles* avec des optima de croissance de 25-35°C. Quelques espèces sont *thermotolérantes* (20-50°C) ; la température limite de développement est de 60-62°C. Certains sont *psychrophiles* et se développent à des températures inférieures à 20°C [57].

❖ *Le pH* a une grande incidence sur l'équilibre ionique du milieu, donc sur la perméabilité cellulaire et la disponibilité des substrats, sur les activités enzymatiques extracellulaires et à un bien moindre degré les activités intracellulaires.

L'action de certains composés toxiques dépend aussi du pH qui peut modifier leur structure et leur accessibilité cellulaire [61].

Les moisissures sont peu sensibles au pH du milieu, la grande majorité peut se développer à des pH de 4,5-8,0. Les optima se situent entre 5,5 et 7,5. Cependant quelques espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* peuvent se développer à pH=2,0. Toutefois, ils ne sont pas considérés comme acidophiles car ce n'est pas dans les sols acides que l'on dénombre le plus de champignons. Ils semblent pouvoir se développer sur une gamme de pH assez large.

❖ *L'Oxygène* : d'une façon générale, les moisissures sont des organismes aérobies, cependant certains sont peu exigeants tel que *Penicillium* [53,57].

❖ *Induction et répression* : Parmi les nombreuses enzymes qu'une cellule peut produire, certaines sont dites consécutives car elles sont toujours présentes en quantité notable, en revanche la concentration d'enzymes inductibles impliquées dans les voies de dégradation des composés sont contrôlées par un certain nombre de réactions d'inductions et de répressions.

### ***1.3.3 l'utilisation des champignons filamenteux***

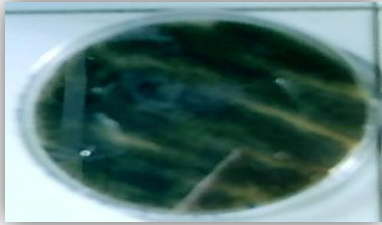



L'utilisation des moisissures fait l'objet de plusieurs recherches dans un certain nombre de domaines parmi lesquels on relèvera le domaine de la santé l'industrie alimentaire, la biolixiviation.

Elles synthétisent un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes: enzymes, acides organiques, antibiotiques, alcaloïdes, De plus les propriétés nuisibles de certains microorganismes peuvent être mises à profit dans l'environnement et contrôlées par l'homme pour convertir les déchets agricoles et industriels ou éliminer des molécules polluantes (phénols, pesticides) [56,57].

### ***1.3.4 Présentation des champignons filamenteux utilisés :***

Le tableau I.7 présente les souches fongiques : *A.niger* et *R.stolonifer* utilisés dans notre étude

Tableau I.6 : présentation et description des espèces fongiques : *A.niger* et *R.stolonifer*

<i>Souches fongiques</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<b>classification</b>	Division : Ascomycèta Classe : Ascomycète Famille : Trichocomaceae Genre : Aspergillus Espèce : <i>Aspergillus niger</i> [53]	Division : Zygomycota Classe : Zygomycètes Ordre : Mucorals Genre : Rhizopus Espèce : <i>Rhizopus stolonifer</i> [57]
<b>Morphologie macroscopique :</b>	Recto : colonies d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires. Verso : blanc à jaune pale  	Thalle à croissance rapide (près de 55mm par jour). les colonies de couleur blanchâtre à brun grisâtre  
<b>Morphologie microscopique</b>	Thalle mycélien cloisonné Têtes conidiennes bisériées, radiées, se scindant généralement en plusieurs colonies, noir brunâtres foncées ou noires [57]  	Sporocystes globuleux, avec des spores irrégulières. Stolons, rhizoïdes et sporocystophes sont bien différenciés [55].  
<b>Habitat</b>	Ils sont omniprésents dans l'environnement, fréquemment rencontrés dans les céréales, les fruits et légumes moisissés, le fourrage, les produits laitiers.	Ils sont très largement répandus. Isolés d'un très grand nombre de substrats moisissés.

#### I.4. La méthodologie des plans d'expériences :

Un plan d'expériences consiste à mettre en œuvre une stratégie de travail dans le but de réduire le nombre des essais tout en atteignant rapidement les meilleures estimations possibles des effets de facteurs sur une ou plusieurs réponses.

L'un des objectifs que l'on s'impose lors de la construction d'un plan d'expériences est de faciliter l'interprétation des résultats.

La démarche méthodologie d'un plan expérimental peut être décomposée en différentes étapes :

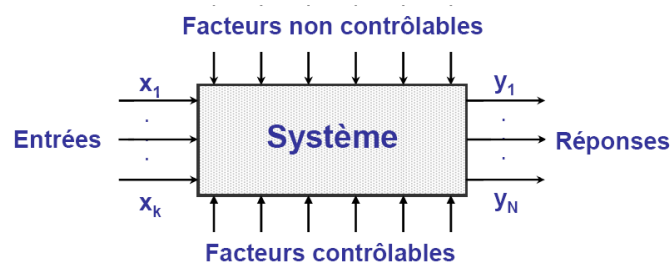
- Etape A : définition des objectifs et des réponses
- Etape B: choix des facteurs et du domaine expérimental
- Etape C : Proposition d'un modèle
- Etape D : Estimation des coefficients du modèle
- Etape E: Validation du modèle
- Etape F : mise en œuvre et suivi

##### I.4.1 Terminologie :

###### a) *Facteur* :

Les variables que l'on désire étudier sont appelées *facteurs*. En générale le facteur varie entre deux bornes : la borne inférieure est *le niveau bas* (-1) et la borne supérieure est *le niveau haut* (+1). 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.

Les facteurs étudiés peuvent êtres des variables continues, des variables discontinues, variables ordonnables et variables booléens [62].



**Figure I. 5 :** Schéma simplifié de l'environnement d'un système donné

### b) L'effet d'un facteur

On appelle *effet global* d'un facteur la variation de la réponse quand le facteur passe du niveau -1 au niveau +1 et l'effet moyen est défini comme étant la moitié de l'effet global.

On dit qu'il y a *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.

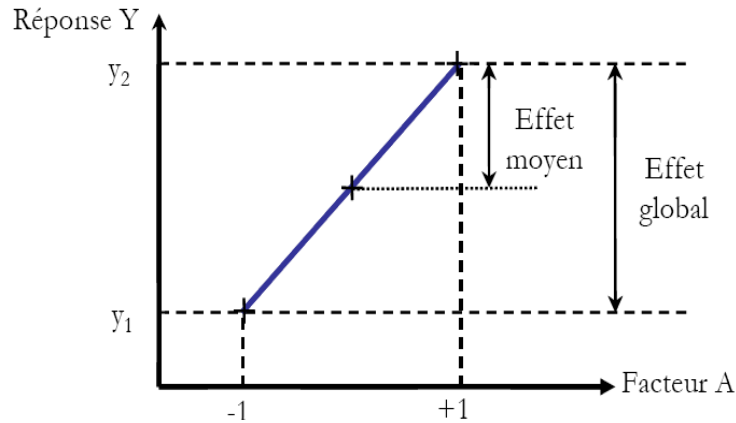


Figure I.6 : l'effet d'un facteur

### c) L'espace expérimental et domaine d'étude

Pour présenter l'espace expérimental nous utiliserons un espace à deux dimensions, les deux facteurs continus peuvent être représentés par deux axes gradués et orientés, le second axe est disposé orthogonalement sur le premier.

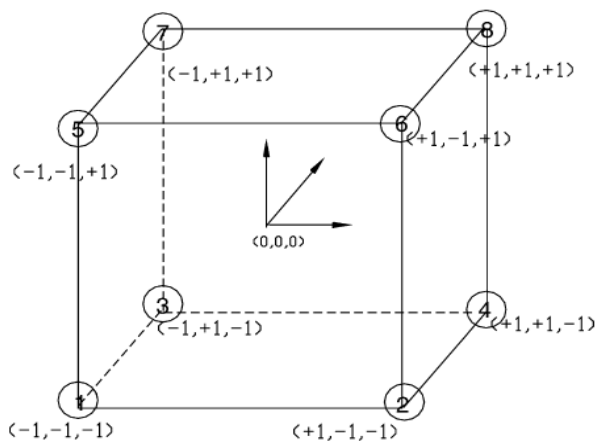


Figure I.7 : domaine d'étude de plan factoriel  $2^3$

*d) Variables codées ou variables centrées réduites (vcr):*

On utilise des variables codées qui proviennent de la transformation des variables d'origine en attribuant la valeur « - 1 » au niveau bas d'un facteur et la valeur « + 1 » au niveau haut. L'utilisation des variables codées a pour conséquences de permettre la standardisation des effets des facteurs facilitant ainsi leur comparaison.

Le passage des variables d'origine A aux variables codées x, et inversement, est donné par la formule suivante [63]:

$$x = \frac{A-A_0}{Pas} \quad \text{I.1}$$

$$Pas = \frac{A_{+1}-A_{-1}}{2} \quad \text{I.2}$$

$$A_0 = \frac{A_{+1}+A_{-1}}{2} \quad \text{I.3}$$

$A_0$  est la valeur centrale en unités courantes

*e) Réponse :*

Les grandeurs qui intéressent l'expérimentateur et qui sont mesurées à chaque expérience sont appelées *réponse* notée y. En effet ce n'est qu'après une analyse minutieuse des phénomènes, des objectifs et des contraintes de l'étude que l'on peut définir la ou les bonnes réponses.

*f) Surface de réponse*

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine expérimental correspond un ensemble de réponses qui définit une surface appelée « surface de réponse » qui représente donc le comportement de la réponse lorsque les niveaux des facteurs varient [62].

*g) les plans d'expériences*

Plusieurs types de plans sont définis pour réaliser les expériences et sont décrits dans la littérature [62]. Retenons que les plans d'expériences sont généralement répartis en plans factoriels complets et fractionnaires. Cependant, pour le choix d'un plan adéquat, il y a un certain nombre de pré-requis tels que l'objectif poursuivi par l'analyste, le type et le nombre de facteurs à étudier, les informations à recueillir, et même les exigences de l'expérimentateur.

### ***1.4.2 Plans factoriels complets $2^k$ :***

La dénomination  $2^k$  a la signification suivante : le chiffre 2 représente les deux niveaux haut et bas des facteurs, et k indique le nombre de facteurs.

Ces plans sont les plus simples à réaliser. Ils consistent à prendre pour chaque facteur deux valeurs significatives (ou niveaux) qui correspondent aux limites du domaine de variations de celui-ci [63].

Dans le cas des plans factoriels, le modèle mathématique utilisé est du premier degré par rapport à chaque facteur, ils conduisent à une modélisation simple mais suffisante.

La matrice d'expériences est le tableau qui 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.

### ***1.4.3. La modélisation et l'objectif des plans d'expériences :***

L'objectif final des plans d'expériences est de permettre l'élaboration d'un modèle mathématique. La modélisation permet d'exprimer la relation entre, d'une part, la réponse ( $Y$ ) qui le plus souvent, est un paramètre de performance de la méthode analytique, et, d'autre part, les facteurs à étudier ( $x_1, x_2, x_3 \dots x_p$ ). Le choix du modèle (premier ou second degré) dépendra des objectifs poursuivis, du nombre de facteurs considérés ainsi que du nombre de niveaux à tester par facteurs. L'équation I.4 représente un modèle appliqué sur la base d'une régression linéaire multiple pour  $p$  facteurs :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ijk} x_i x_j x_k \quad \text{I.4}$$

$$a_0 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i \quad a_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i y_i \quad \text{I.5}$$

$$a_{ij} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_i x_j y_i \quad , \quad a_1 = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^n x_{1i} y_i \quad , \quad a_2 = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^n x_{2i} y_i \quad , \quad a_3 = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^n x_{3i} y_i \quad \text{I.6}$$

$$a_{12} = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^n x_{1i} x_{2i} y_i \quad , \quad a_{13} = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^n x_{1i} x_{3i} y_i \quad , \quad a_{23} = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^n x_{2i} x_{3i} y_i \quad , \quad a_{123} = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^n x_{1i} x_{2i} x_{3i} y_i \quad \text{I.7}$$



**Tableau I.7** : formules générales donnant les effets et les interactions d'un plan factoriel  $2^3$ 

$a_0$	$1/8(y_1+y_2+y_3+y_4+y_5+y_6+y_7+y_8)$
$a_1$	$1/8(-y_1+y_2-y_3+y_4-y_5+y_6-y_7+y_8)$
$a_2$	$1/8(-y_1-y_2+y_3+y_4-y_5-y_6+y_7+y_8)$
$a_3$	$1/8(-y_1-y_2-y_3-y_4+y_5+y_6+y_7+y_8)$
$a_{12}$	$1/8(y_1-y_2-y_3+y_4+y_5-y_6-y_7+y_8)$
$a_{13}$	$1/8(y_1-y_2+y_3-y_4-y_5+y_6-y_7+y_8)$
$a_{23}$	$1/8(y_1+y_2-y_3-y_4-y_5-y_6+y_7+y_8)$
$a_{123}$	$1/8(-y_1+y_2+y_3-y_4+y_5-y_6-y_7+y_8)$

***I.4.4. Analyse de la variance et validation du modèle linéaire :***

Il s'agit de vérifier si le modèle estimé explique correctement les variations de la réponse observée. Le modèle sera considéré comme adéquat (approprié) si pour une combinaison donnée, l'écart entre la réponse moyenne observée et la réponse moyenne prédite par le modèle est acceptable [64].

***A. Analyse de la corrélation :***

Le coefficient de corrélation  $R^2$ , nous renseignera sur la validité du modèle. Plus ce coefficient est loin de l'unité plus il sera considéré médiocre, et donc le modèle qui le fournit est moins représentatif. [63]

$$R^2 = \frac{\text{somme des carrés des réponses calculés corrigées de la moyenne}}{\text{somme des carrés des réponses mesurées corrigées de la moyenne}} \quad \text{I.8}$$

$$0 < R^2 < 1$$

Le coefficient  $R^2$  ajusté :

$$R^2_{\text{ajusté}} = 1 - \frac{(n-1)(1-R^2)}{(n-p)} \quad \text{I.9}$$

n : le nombre d'expérience réalisées.

P : le nombre de coefficients du modèle.

**B. Seuil de confiance :**

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

**C. Les tests statistiques :**

- **Le t de student :**

Pour évaluer l'importance d'un coefficient, la théorie des statistiques compare ce coefficient à son écart-type en faisant le rapport  $\frac{a_1}{\sigma_{a_1}}$ , ce rapport est appelé *le t de student*. A partir de *t student*, on peut évaluer la probabilité que le coefficient soit sans importance ou peu significatif. Si cette probabilité (*la p-value*) est proche de 0 le coefficient est influent, si la probabilité est proche de 1 le coefficient est négligeable. Si *la p-value* possède une valeur intermédiaire, le coefficient est peut être légèrement significatif. La fonction *LOI STUDENT* du logiciel EXCEL fournit la p-value). Cette dernière peut être calculée à partir de la fonction d'Excel LOI.F.

- **Test de Fisher :**

Le test de Fisher est le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus. Ce rapport permet de calculer la probabilité que ces deux carrés ne soient pas égaux. En d'autres termes, si le F de Fisher est élevé, les variations des réponses mesurés sont bien dues aux variations des facteurs. Si le F de Fisher proche de 1, les variations des réponses mesurés sont comparables à celles des résidus [63].

Tableau I.8 : Analyse de la variance

Source	Degré(s)de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	P-1	$\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$\sum_{i=1}^n \frac{(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p-1}$	$\frac{\sum_{i=1}^n \frac{(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{p-1}}{\sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}}$
Résidus	n-P	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}$	
Total	n-1			

n : est le nombre d'expériences

p : est le nombre de coefficients, il est égale à 8,

$y_i$ : Réponse mesuré,

$\hat{y}_i$ : Réponse calculé,

$\bar{y}$ : réponse moyen

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

$$CM_R : \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p}$$

Le test consiste à comparer le rapport entre  $CM_a$  et  $CM_r$ , noté  $F_{obs}$  avec la valeur  $F_{théorique}$  que nous trouverons dans le tableau de lié à la loi de Fisher-Snedecor, en fonction de :

- degrés de liberté du facteur étudié et de la résiduelle.
- du risque que l'on choisit.

La probabilité ou « valeur p » peut seulement prendre des valeurs comprises entre 0 et 1 ; si elle est inférieure à 0.05, on conclut que l'effet est significatif et si elle est inférieure à 0.01, il est possible de conclure que le facteur est hautement significatif.

- **L'erreur expérimentale : [64]**

On appelle « erreur expérimentale » la variabilité observée sur les essais répétés.

Les causes d'erreur sont multiples. On distingue les erreurs :

Accidentelles, Systématiques, Aléatoires.

Les deux premiers conduisent à des résultats faux et doivent être évitées autant que faire se peut. Les dernières augmentent l'incertitude d'un plan d'expérience.

Parmi les solutions suggérées, le jalonnement de l'expérimentation par des points au centre, on appelle « *point au centre* » un essai réalisé au centre du domaine d'étude. Au centre, tous les facteurs sont réglés au niveau 0.

#### ***1.4.5 Optimisation et fonction désirabilité :***

La fonction désirabilité (D) permet d'optimiser la réponse. Les valeurs de cette fonction sont comprises entre 0 et 1. La valeur de 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse inacceptable et celle de 1 lorsque la réponse représente la performance maximale désirée pour les facteurs considérés [63,64].

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

#### ***1.4.7. Les logiciels de plan d'expérience :***

Le logiciel JMP est un logiciel statistique élaboré par la société SAS qui est particulièrement bien adapté pour construction et l'analyse des plans d'expérience. Il effectue non seulement le calcul des coefficients mais aussi tous les calculs statistiques permettant d'évaluer la qualité du modèle mathématique, il est aussi programmé pour calculer des réponses dans tout le domaine d'étude, pour effectuer les analyses de variance, le tracer des graphes et des diagrammes. 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'expériences. Les logiciels de plans d'expériences sont devenus des outils absolument indispensables pour la construction de plans complexes et l'interprétation approfondie des résultats du plan [64].

*Chapitre II :*  
***MATERIEL ET METHODES***

## II MATERIEL ET METHODES :

Ce chapitre regroupe les informations sur les matériels et les méthodes employés au cours de l'étude. Il s'attachera tout d'abord à donner les caractéristiques des matériels biologiques avant d'indiquer les produits chimiques utilisés ainsi que les méthodes analytiques et le dispositif expérimental employé.

La méthodologie de plans d'expériences est présentée dans la seconde partie de ce chapitre.

### II.1 Matériel biologique :

#### II.1.1 Souches fongiques :

Nous avons utilisé dans notre étude deux souches fongiques *Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer* provenant de la collection du laboratoire Sciences et Techniques de l'Environnement de l'ENP.

#### II.1.2 Milieux et conditions de culture :

Il existe une grande variété de milieux de culture, synthétiques ou complexes, liquides ou solides. Dans notre étude nous avons utilisé trois milieux (*compositions en annexe 2*), qui sont :

- **Milieu de culture YMA solide :**

Après stérilisation le milieu est réparti dans des boîtes de Pétri qui sont ensuiteensemencées avec les deux espèces et incubées pendant 72h à 30°C puis conservées à 4°C pour utilisations ultérieures.

- **Milieu de propagation YM liquide :**

Les milieux de propagation permettent une croissance intense des hyphes et l'obtention de biomasse (mycélium), pour cela il suffit de prélever avec une anse stérile quelques spores ou un fragment mycélien à la marge du thalle à partir des boîtes de Pétri et de transférer l'inoculum dans les flacons du milieu de propagation YM liquide [19]. Après incubation à 30°C pendant 72 h, le mycélium se forme.

- **Milieu minéral (milieu de czapekdox):**

Pour l'étude de la biodégradation du phénol nous avons utilisé un milieu minéral liquide [19] auquel était ajouté le phénol comme source unique de carbone.

### II.2 Produits et matériels utilisés :

- les appareils utilisés sont résumés dans un tableau. Annexe 3
- les réactifs du dosage du phénol. Annexe 1

### **II.3 Méthodes d'analyse :**

#### ***II.3.1 Mesure de la croissance fongique :***

La croissance fongique a été déterminée en mesurant les modifications de la masse humide (M) du mycélium avant et après l'expérience par simple pesée de la biomasse.

#### ***II.3.2 Détermination de la concentration en phénol :***

La méthode de 4 amino-antipyrine a été employée pour déterminer les concentrations résiduelles du phénol dans les solutions. Il s'agit de la condensation en milieu basique de l'ion phénate sur le 4-amino antipyrine en présence d'un oxydant, ferricyanure de potassium. Le complexe obtenu de couleur rouge est analysé à la longueur d'onde de  $\lambda = 510$  nm par la méthode analytique spectrophotométrique UV-Visible [36].

Une courbe d'étalonnage a été réalisée afin de convertir les absorbances en concentrations de phénol. Annexe 1

##### ***II.3.2.1. Mode Opérateur :***

La biomasse de préculture de 72 heures a été récupérée stérilement par filtration sur du papier Whatman N°6 et lavée avec de l'eau distillée stérile. Ensuite,  $2 \pm 0.2$  grammes (en poids humide) de la biomasse mycélienne sert à inoculer le milieu minéral qui contient 100 mg/l de phénol comme seule source de carbone. Le pH de la solution est initialement ajusté à 5,5 et la température d'incubation est maintenue à 30°C.

Afin de suivre les taux de biodégradation du phénol des prélèvements réguliers sont effectués et analysés. Chaque expérience a été effectuée jusqu'à ce que la concentration résiduelle de phénol dans les réacteurs devienne non détectable par l'analyse.

##### ***II.3.2.2 Dispositif expérimental :***

Toutes les expériences sur la biodégradation en utilisant les deux souches ont été réalisées dans des Erlen-meyers de 250 ml contenant 150 ml de milieu réactionnel inoculé par 2g du mycélium (en poids humide), les Erlen-meyers sont placés dans un incubateur de température réglable muni d'une agitation orbitale 120 trs/min.

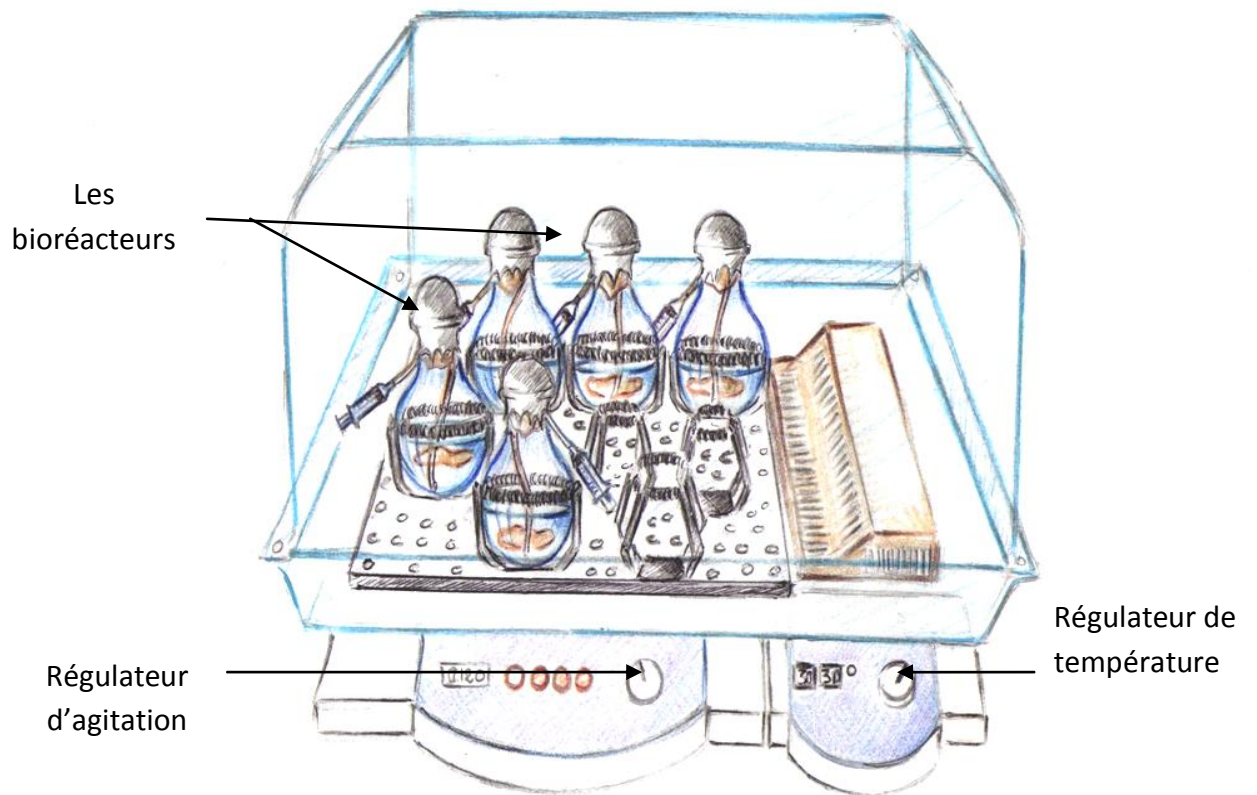


Figure II.1 : Schéma du dispositif expérimental





Figure II .2: Dispositif expérimental

### II.3.3 Mesure de la $DBO_5$ :

La méthode adoptée est une méthode manométrique utilisant un respiromètre Oxitop.

Pour décomposer les substances organiques après la fermeture du système, les micro-organismes consomment l'oxygène de la réserve d'air confinée. Le gaz carbonique qui se forme ainsi est absorbé par NaOH. Suite à la diminution de la quantité d'oxygène dans le flacon, la pression diminue, et cette diminution est détectée dans les têtes de mesure et enregistrée.



Figure II.3: respiromètre Oxitop

### II.3.3.1. Mode Opérateur :

Pour le test de respirométrie, les biomasses fongiques (*A. niger* et *R.stolonifer*) ont été récupérées après une préculture de 72 h (phase exponentielle de croissance) par filtration sur du papier Whatman et lavées à l'eau distillée stérile ; 2g en masse humide des biomasses obtenues de chaque champignon ont été suspendues dans deux flacons :

- Le premier sert de référence, contient 164 ml du milieu minéral sans phénol, afin de mesurer la consommation en oxygène due à la respiration endogène des champignons.

- Le deuxième contient un volume de 164 ml du milieu minéral contenant 200 mg/l de phénol. Les flacons contenant les échantillons sont remplis selon les données à l'affichage (quantité d'eau correspondant à la plage de mesure DBO).

Après 5 jours, la quantité d'oxygène consommée par les champignons pour dégrader le phénol, ainsi que celle consommée pour la respiration endogène exprimée en mg d'O<sub>2</sub>/l est directement lue.

### II.4. Méthode de plan d'expériences:

Afin de déterminer les conditions opératoires permettant la biodégradation du phénol, la méthodologie des plans d'expériences a été retenue en utilisant *un plan factoriel complet* à trois facteurs chacun à deux niveaux 2<sup>3</sup> avec 3 répétitions du point au centre du domaine.

Même dispositif expérimental est utilisé pour effectuer les essais de plan d'expérience.

Le modèle mathématique utilisé est un modèle de premier degré avec interaction (PDAI).

Ainsi, si on considère que la réponse  $y$  mesurée est le *rendement d'élimination* calculé à  $t/2$  et  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  sont les trois facteurs continus et contrôlés tel que :

$x_1$  : la concentration initiale du phénol (mg/l).

$x_2$  : le pH du milieu.

$x_3$  : la température d'incubation (°C).

On peut écrire l'équation suivante :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{123}x_1x_2x_3$$

Avec :

$y$  : la réponse

$x_i$  : valeur centrée réduite du paramètre étudié  $x_i$ ,

$a_0$ : moyenne des réponses au centre,

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

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

Tableau II.1 : facteurs et domaine d'étude

Les facteurs étudiés	Niveaux de variation des facteurs		
	Niveau bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
$C_0$ du phénol (mg/l) $x_1$	200	600	1000
pH $x_2$	2.5	5.5	8.5
Température (°C) $x_3$	25	30	35

Tableau II.2 matrice d'expériences:

Essai n°	$X_1$ (vrc)	$X_2$ (vrc)	$X_3$ (vrc)	concentration initiale en phénol $x_1$	pH $x_2$	Température $x_3$	rendement d'élimination à $t^{1/2}$ Y%
1	-1	-1	-1	200	2.5	25	
2	1	-1	-1	1000	2.5	25	
3	-1	1	-1	200	8.5	25	
4	1	1	-1	1000	8.5	25	
5	-1	-1	1	200	2.5	35	
6	1	-1	1	1000	2.5	35	
7	-1	1	1	200	8.5	35	
8	1	1	1	1000	8.5	35	
9	0	0	0	600	5.5	30	
10	0	0	0	600	5.5	30	
11	0	0	0	600	5.5	30	

Ce tableau comprend *une matrice d'expériences* qui emploie les unités codées et une *matrice d'expérimentation* construite avec les unités physiques habituelles.

## *Chapitre III :*

# *Etude de la biodégradation fongique du phénol*

### III ETUDE DE LA DEGRADATION FONGIQUE DU PHENOL :

L'objectif de ce travail est l'étude de la dégradation dans un milieu minéral synthétique, du phénol par *Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer*.

Dans un premier temps nous testerons le pouvoir de dégradation du phénol chez ces deux champignons. Pour ce faire, un test de respirométrie sera mené en utilisant le respiromètre OxiTop®

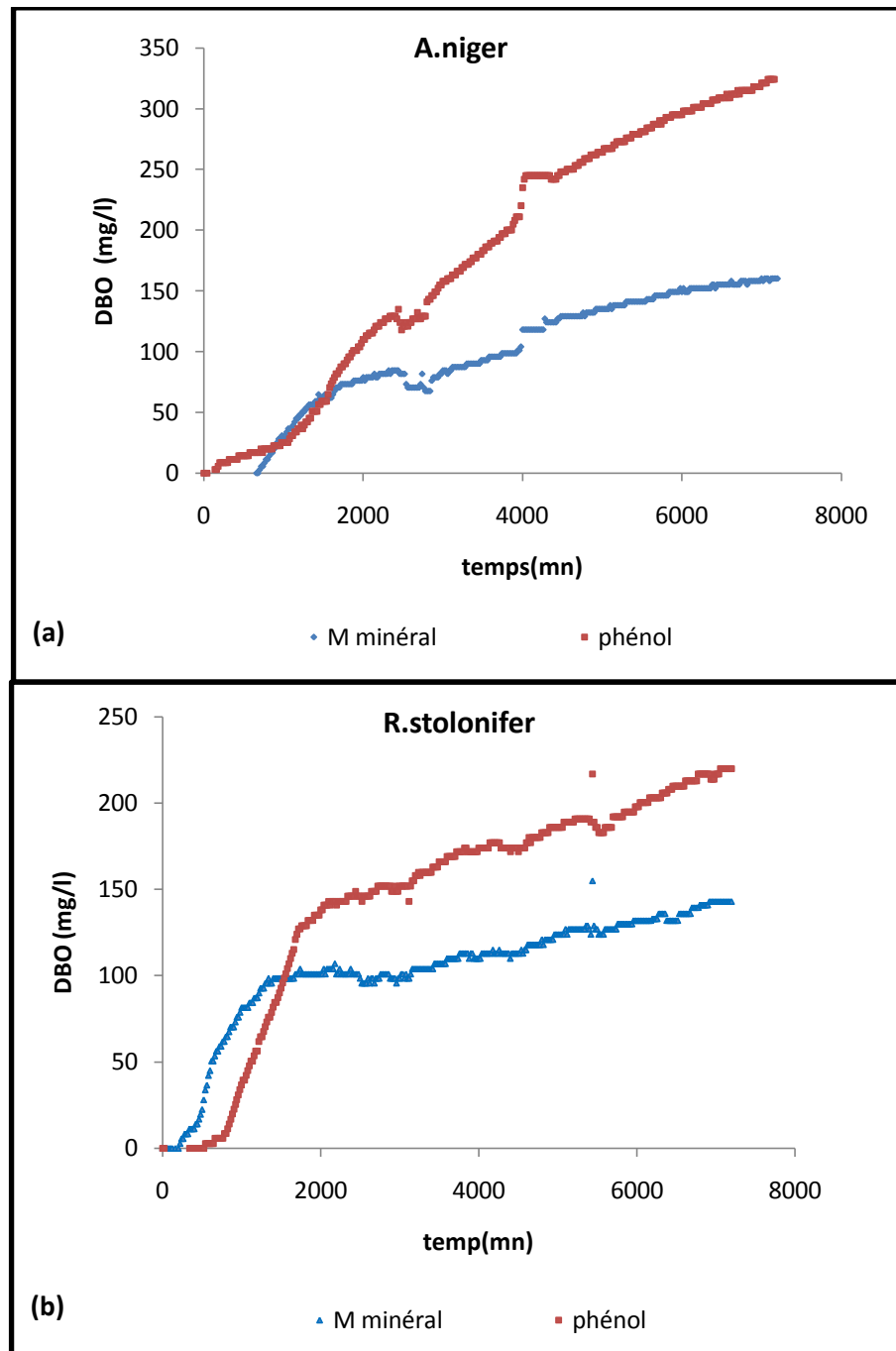
Nous étudierons l'effet de l'adaptation du mycélium, la concentration initiale en phénol ainsi que l'effet du pH et la température.

Afin d'optimiser les conditions opératoires influant sur la biodégradation du phénol, un plan d'expérience sera établi.

#### III.1 Etude de la dégradation fongique du phénol par respirométrie manométrique :

Les profils de consommation d'oxygène d'*A.niger* et *R.stolonifer* dans les flacons sont illustrés respectivement sur les figures III.1.

Les deux courbes sur les graphes (a) et (b) de la figure III.1 représentent respectivement, la respiration endogène et exogène de la biomasse. La respiration endogène indique la respiration de la biomasse en absence du phénol, alors que sa respiration exogène concerne sa respiration en présence de ce substrat.



**Figure III.1** : cinétiques de dégradation du phénol par *A.niger* (a) , *R.stolonifer*(b) par respirométrie

On constate que la consommation de l'oxygène par *A.niger* en présence du phénol au début de l'expérience (1560 mn) est proche de la demande en oxygène enregistrée par le mycélium en absence de ce substrat (milieu minéral), cela pourrait correspondre à la phase de latence où le mycélium est en respiration endogène.

Cependant la respiration du *R.stolonifer* en présence du phénol est inférieure à sa respiration endogène durant le premier jour de l'expérience, cela est dû à une phase d'inhibition par défaut d'adaptation au phénol.

Au-delà de 1560mn , la DBO des deux mycéliums devient supérieure à celle du témoin, cette augmentation traduit une activité fongique qui est la métabolisation du phénol.

On remarque que la valeur de la DBO<sub>5</sub> de *A. niger* (324 mg d'O<sub>2</sub>/l) est supérieure à celle de *R. stolonifer* (220 mg d'O<sub>2</sub>/l) avec une élévation visible dans la masse du mycélium du *A. niger* par rapport à celle du *R. stolonifer*.

En effet les deux champignons (*A. niger* et *R. stolonifer*) ont dégradé respectivement 88% et 60% de la charge totale en 5 jours. Cela indique que *A. niger* a un potentiel de dégradation meilleur que celui de *R. stolonifer*.

### **III .2 Etude de l'influence de certains paramètres sur la dégradation fongique du phénol :**

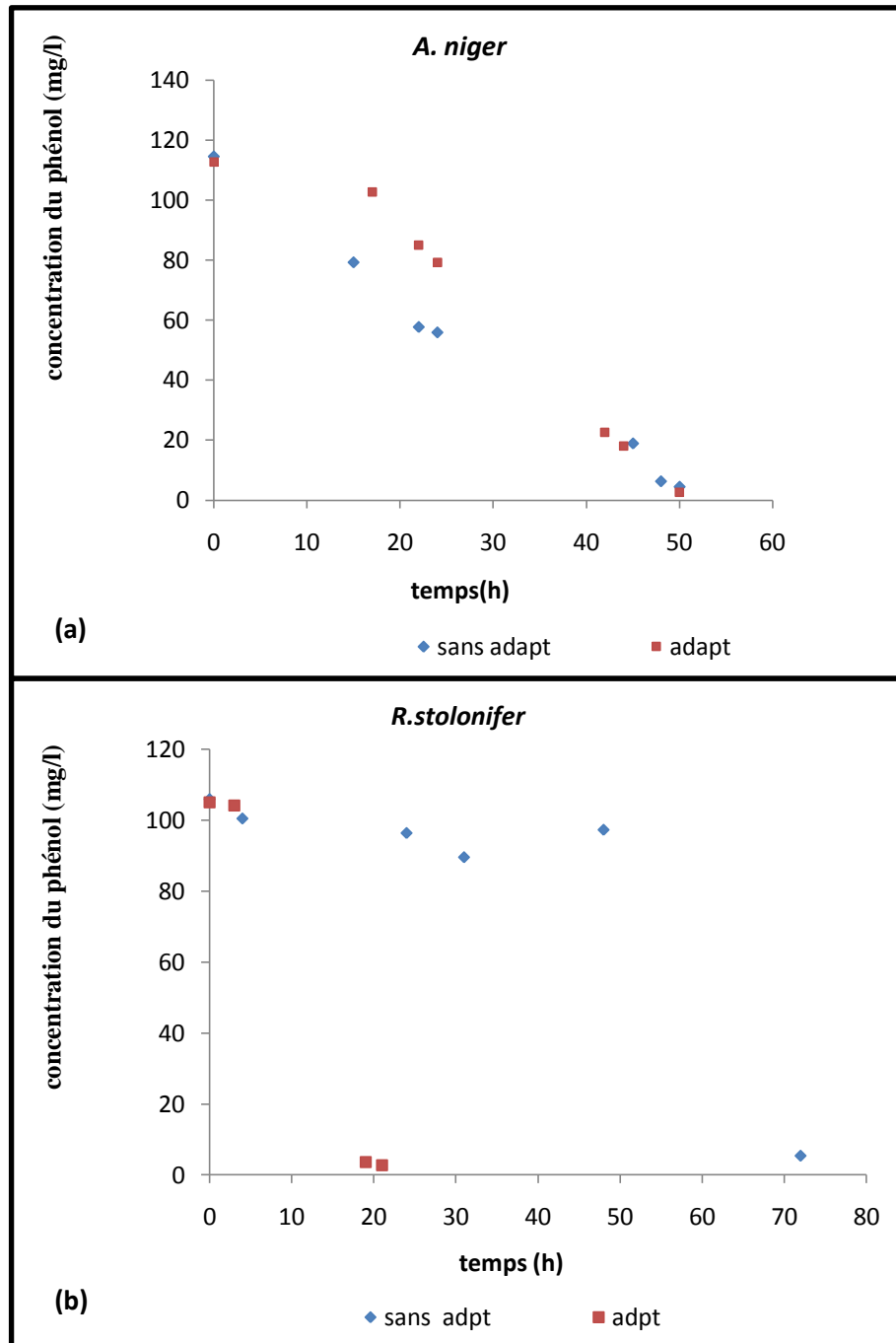
*L'adaptation du mycélium, la concentration initiale en phénol, le pH et la température* ont été les paramètres étudiés.

#### ***III.2.1 Effet de l'adaptation du mycélium sur la biodégradation du phénol :***

Afin d'étudier l'effet de l'adaptation des souches sur la dégradation du phénol, la biomasse mycélienne a subi un test d'adaptation.

La biomasse a été utilisée pour deux cycles de dégradation, après la dégradation complète de 100 mg/l de phénol dans les conditions opératoires prédéfinies, la biomasse est récupérée, rincée à l'eau distillée stérile ensuite réutilisée pour une deuxième expérience dans les mêmes conditions opératoires.

Les concentrations résiduelles du phénol en fonction du temps pour les deux souches sont illustrées sur la figure III.2.



**Figures III 2:** Effet de l'adaptation sur la biodégradation du phénol par *A.niger* (a) *R.stolonifer*(b), [phénol]=100mg/l ,T=30°C , pH=5.5, agitation =120 tpm, inoculum=2g

Les résultats montrent que l'adaptation du *R. stolonifer* a un effet remarquable sur la cinétique de dégradation du phénol, en effet nous constatons une diminution de la phase de latence après l'adaptation. De plus le temps de dégradation décroît de 73 heures pour la souche avant adaptation jusqu'à 18 heures après adaptation ; cette diminution pourrait être expliquée par



l'induction enzymatique de la phénol-hydroxylase, qui est à la base de l'hydroxylation du cycle benzénique du phénol [51].

Cependant les deux cinétiques avant et après adaptation de *A. niger* sont très voisines, avec une légère différence au début de la dégradation qui est due peut être à l'inhibition de la phénol-hydroxylase par les métabolites secondaires du premier cycle.

Ce résultat suggère que *A. niger* dispose des enzymes susceptibles de dégrader ce composé au bout de 50 heures et qu'elle peut utiliser le phénol comme source du carbone sans adaptation préalable.

Les tests de respiration réalisés par Coulibaly et al [51] en présence de phénol et de catéchol ont montré qu'il n'est pas nécessaire d'adapter *A. niger* au phénol et au catéchol pour qu'il dégrade ces substrats car les enzymes responsables ne sont pas induites par le substrat mais plutôt constitutives.

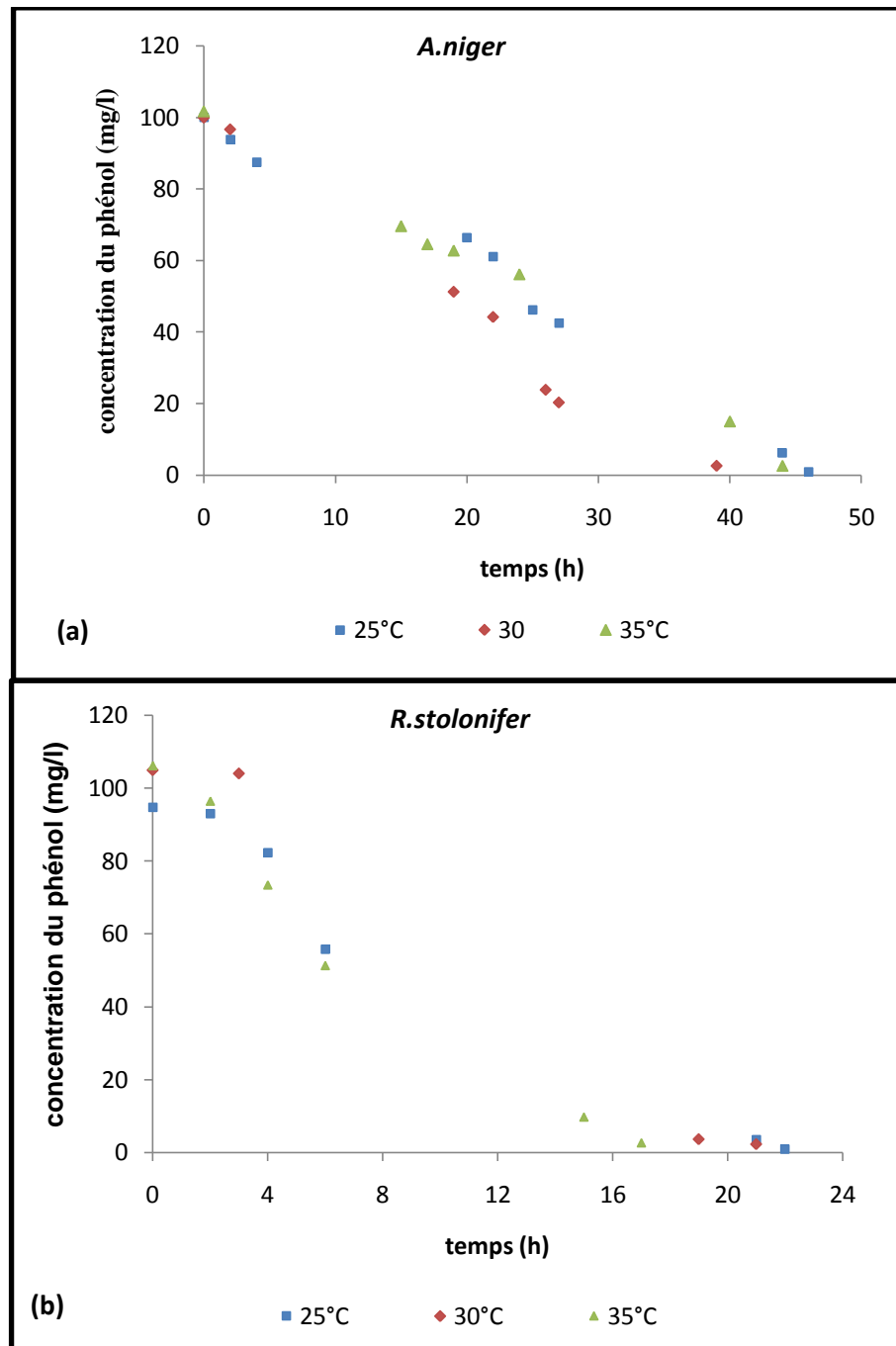
En outre *A. niger* est connu pour sa capacité à dégrader des composés aromatiques [29, 36, 41] notamment les phénols qui appartiennent à la chimie de lignine [15] qui représente une source du carbone abondante dans la nature.

En comparant les profils (figure III.2) de dégradation du phénol par les biomasses de *R. stolonifer* et d'*A. niger* adaptées à ce composé et ceux non adaptées, il ressort qu'il faut procéder à une exposition de *R. stolonifer* au phénol avant les expériences de l'étude. Par ailleurs, comme *A. niger* dégrade le phénol facilement sans une adaptation préalable, elle ne nécessite pas une exposition préalable au phénol.

Les enzymes de dégradation du phénol seraient donc constitutives chez *A. niger* et inductibles chez *R. stolonifer*. En outre le caractère constitutif de l'enzyme phénol-hydroxylase chez *Aspergillus awamori* a été démontré par Stoilova et al [65] dans leur étude sur la biodégradation des composés phénoliques par ce champignon.

### ***III.2.2. Effet de la température sur la dégradation fongique du phénol :***

Pour évaluer l'effet de la température sur la biodégradation du phénol. Nous avons varié la température entre 25 et 35°C, tous les autres paramètres sont maintenus constants.



**Figures III.3:** Effet de la température sur la biodégradation du phénol par *A.niger* (a) *R.stolonifer* (b) [phénol]=100mg/l, pH=5,5, agitation =120 tpm, inoculum=2g

Les résultats de la dégradation du phénol par *A.niger* à différentes températures en milieu minérale sont présentés sur la figure III.3(a). Une dégradation du phénol légèrement plus rapide à 30°C par rapport à 25 et 35°C est enregistrée. En effet, le phénol est totalement dégradé à 30°C après 39h d'incubation. Cependant, à 25 et 35°C sa dégradation complète ne survient qu'après 46 et 42 heures respectivement.

Les températures élevées peuvent avoir un effet préjudiciable sur les enzymes responsables de l'ouverture du cycle aromatique qui est la principale étape dans le processus de dégradation. L'exposition à des températures plus basses peut ralentir l'activité fongique.

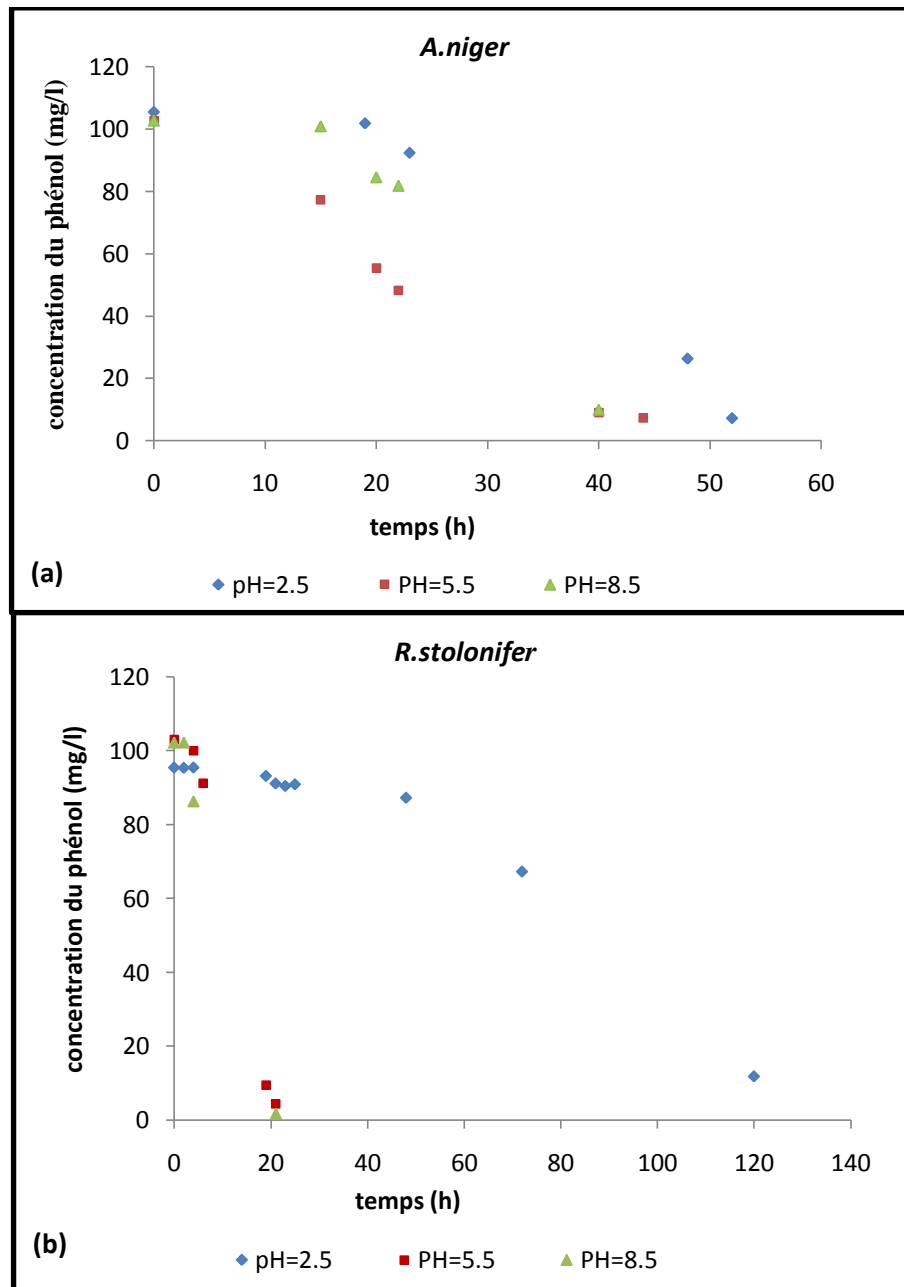
Cai et al [36] ont montré que la biodégradation du phénol par *Fusarium sp* est optimale à 30°C.

Quant à la dégradation du phénol par *R. stolonifer*, nous remarquons que 21 heures étaient suffisantes pour que cette dernière dégrade 100 mg/l du phénol à 30°C. La température de 35°C favorise mieux la dégradation du phénol par *R.stolonifer* en comparaison avec la température du 25°C, par conséquent le temps final de dégradation est de 17 heures à 35°C alors qu'à 25°C il atteint 22 heures. Ce résultat concorde avec les données bibliographiques concernant l'exigence thermique de *Rhizopus* [32]. L'étude menée par Babich et Stotzky [58] cité auparavant confirme l'effet favorable de la température sur la dégradation du phénol par *R.stolonifer*, qui s'est mieux développé à température 32°C qu'à 22°C. Cependant *A.niger* été moins sensible à cette variation de température.

### ***III.2.3 Effet du pH sur la dégradation fongique du phénol :***

La biodégradation de certains composés toxiques dépend aussi du pH et pour démontrer l'influence du pH sur la cinétique de biodégradation du phénol nous avons effectué trois essais à différentes valeurs du pH du milieu réactionnel à savoir (2,5- 5,5- 8,5), toute en conservant les autres conditions opératoires prédéfinies.

Les résultats exprimant l'effet du pH sur les cinétiques de dégradation sont représentés sur la figure III.4.



**Figures III.4 :** Effet du pH sur la biodégradation du phénol par *A.niger*(a)

*R.stolonifer*(b). [phénol]=100mg/l, T=30°C , agitation =120 tpm, inoculum=2g

Ces résultats révèlent que lorsque *R. stolonifer* a été exposé à 100mg/l de phénol à des pH = 5,5 et 8,5, aucune différence n'a été observée sur la cinétique de dégradation du phénol en fonction du temps ; en effet une dégradation rapide et complète est observée au bout de 18 heures. Par contre, sur milieu fortement acide (pH=2,5), le temps de dégradation est prolongé jusqu'à 120 heures avec une phase de latence de 50 heures (Figure III.4(b)). Ceci peut s'expliquer par une inhibition des enzymes fongiques par les pH acides.

Les résultats de la dégradation du phénol par *A.niger* à différents pH du milieu sont présentés dans la figure III.4(a). Une dégradation relativement rapide du phénol aux pH=5,5 et 8,5 par rapport au pH= 2,5 est enregistrée. Après 39 heures d'incubation, le phénol est totalement dégradé aux pH 5,5 et 8,5 alors que dans le milieu de pH=2,5 sa dégradation complète n'aboutit qu'après 53 heures.

L'absence d'un effet du pH sur la dégradation du phénol entre pH 5,5 et 8,5 par les deux souches est comparable aux résultats rapportés par Babich et Stotzky [58], qui ont montré, en étudiant l'influence des facteurs physicochimiques sur la toxicité de phénol envers des microorganismes, qu'aucune différence n'a été observée sur la croissance de *A. niger* et *R.stolonifer* lorsque elles été exposés à 500mg/l du phénol au pH varie entre 5,5 et 8,5.

De plus, ces mêmes auteurs ont rapporté que Herbert (1962) a enregistré le même comportement chez *les truites arc -en-ciel* exposées au mélange phénoliques à une plage du pH varie entre 5,8 et 8,1.

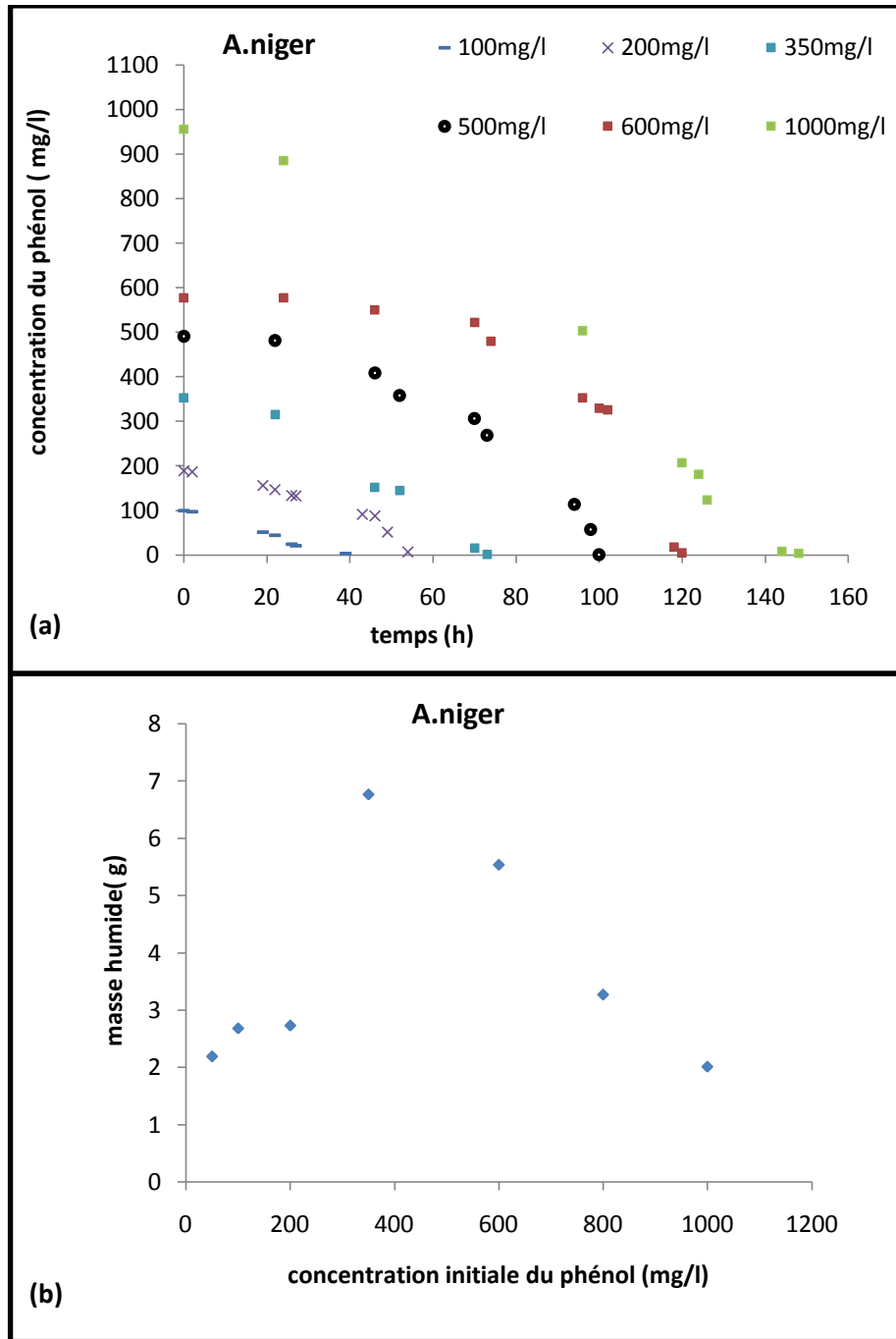
Contrairement à *R.stolonifer*, *A.niger* a montré une tolérance plus élevée envers le milieu acide pH =2,5. Ce comportement confirme le caractère acidophile du champignon *Aspergillus* [57].

#### ***III.2.4 Effet de la concentration initiale sur la biodégradation du phénol et la croissance fongique :***

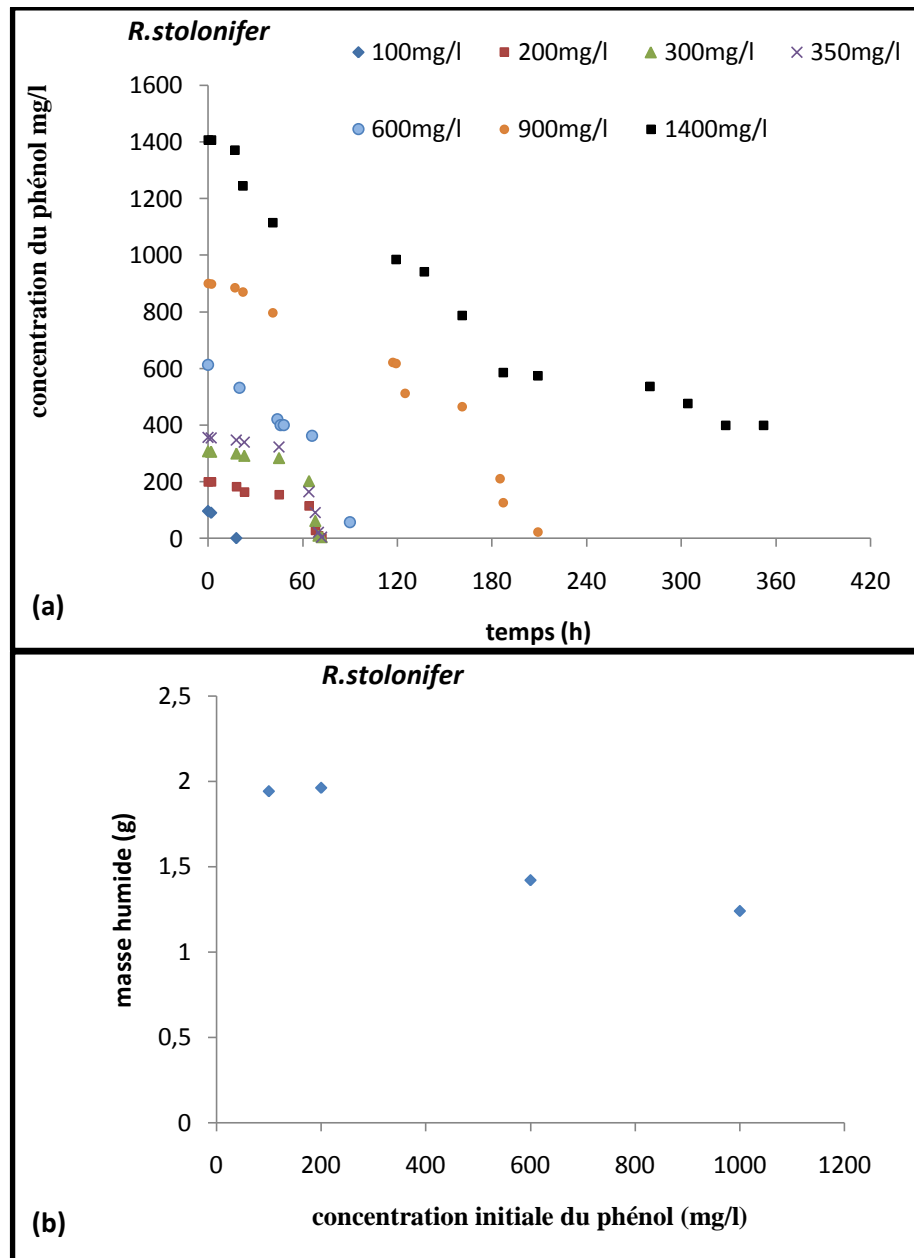
Etant donné que les phénols sont connus pour avoir un effet inhibiteur sur l'activité des microorganismes, leur concentration initiale joue un rôle important dans le processus de biodégradation.

Les solutions du phénol utilisées avaient des concentrations comprises entre 100mg/l et 1400mg/l, plage exigée d'une part par les fortes teneurs en phénol des rejets d'effluents liquides industriels qui varient entre 6-500mg/l dans les rejets des raffineries et atteignent les 15g/l dans ceux de la production des résines phénoliques, d'autre part cette plage est limitée par le caractère toxique du phénol vis-à-vis les microorganismes.

Le suivi de l'évolution de la masse mycélienne finale en fonction de la concentration initiale, nous a permis de tracer les deux graphes représentés sur les figures III.5 et III.6.



**Figures III. 5 :** Effet de la concentration initiale du phénol sur la biodégradation (a) et la croissance(b) de *A. niger*, T=30°C , pH=5,5 ,agitation =120 tpm, inoculum=2g



**Figure III. 6 :** Effet de la concentration initiale du phénol sur la biodégradation (a) et la croissance (b) du *R.stolonifer*, T=30°C , pH=5,5 , agitation =120 tpm, inoculum=2g

L'examen des courbes de la dégradation de différentes concentrations du phénol permet de noter que le temps nécessaire pour une élimination totale du phénol varie entre 40 et 140 heures pour *A. niger* et de 20 à 210 heures pour *R.stolonifer*.

Les courbes illustrées sur la figure III.5(a) montrent l'effet de l'augmentation des concentrations du phénol sur le temps nécessaire à la dégradation du phénol par *A.niger*. Le temps nécessaire pour l'élimination du phénol croît avec l'augmentation de la concentration initiale qui varie de 100 mg/l jusqu'à 1g/l, cette diminution augmentation indique que les

fortes concentrations influent sur la cinétique de dégradation fongique traduisant une inhibition.

*A.niger* arrive à dégrader 350mg/l du phénol en 70h, 600 mg/l en 118h et moins de 6jours pour une minéralisation complète de 1g/l du phénol. Ces résultats se rapprochent de ceux de Stoilova et al [19] qui ont étudié la biodégradation des phénols par *Aspergillus awamori*. Ce dernier a pu dégrader 300mg/L du phénol en 60 h ,600mg/l au bout de72 h et 1g/l entre 7et 8 jours.

D'après la figure III.5(b) on note que la croissance mycélienne du *A.niger* en fonction de concentration initiale évolue en cloche, la valeur maximale  $m= 6.7g$  en masse humide est obtenue pour une concentration initiale=350mg/l en phénol. Pour les concentrations variant entre 100 et 350 mg/l la croissance de la biomasse observée est due à l'anabolisme cellulaire du champignon *A.niger*. Au-dessus de 350 mg /l, la croissance cellulaire est inhibée par le substrat. En outre l'augmentation de la concentration initiale du phénol accrue son effet inhibiteur [59].

La figure III.6(a) montre que le temps de dégradation du phénol par *R.stolonifer* pour des concentrations inférieures à 350mg/l ne dépasse pas 75 heures. Au-delà de cette concentration, le temps de dégradation du phénol croit avec l'augmentation de la concentration initiale. D'autre part la dégradation du phénol par *R.stolonifer* n'a pas engendré de croissance mesurable de la biomasse mycélienne (figure III.6(b)), cette capacité de dégradation qui dépasse 1400mg/l du phénol ne correspond pas à une croissance mycélienne visible.

En effet, la croissance fongique n'a pas été proportionnelle à la dégradation du phénol à des fortes concentrations en phénol, bien que les deux champignons consomment ce substrat principalement pour la production de la biomasse et la maintenance énergétique cellulaire.

En outre, la production et l'accumulation des divers intermédiaires peuvent également être responsables de la baisse de la production mycélienne [12].

L'absence de production de biomasse observée chez *A.niger* et *R.stolonifer* à des concentrations élevées pourrait s'expliquer par le fait que les champignons utilisent la reproduction sexuée dans des conditions défavorables [19,60] impliquant ainsi des spores qui aident à la survie.



## *Chapitre IV :*

# *Modélisation de la dégradation fongique du phénol par le plan d'expérience*

## IV LA MODELISATION DE LA DEGRADATION FONGIQUE DU PHENOL PAR LE PLAN FACTORIEL :

L'étude de La biodégradation du phénol a révélé que les deux souches fongique peuvent assimiler le phénol dans les conditions opératoires étudiées.

Dans ce contexte nous désirons savoir, à l'aide de la modélisation par le plan factoriel complet, quels sont les facteurs influents sur ce phénomène et leurs sens du de variation ainsi que les interactions.

Pour mener cette étude nous avons sélectionné les facteurs qui peuvent être influent sur la dégradation fongique du phénol, et on les a divisés en deux catégories, les facteurs qui seront étudiés grâce au plan d'expérience et les facteurs qui ne seront pas étudiés au cours de l'expérimentation mais dont les niveaux seront fixés toujours à la même valeur. En effet trois facteurs ont été retenus pour construire le plan d'expérience :

La concentration initiale du phénol.

Le pH du milieu.

La température d'incubation.

Les autres facteurs sélectionnés qui peuvent modifier les réponses seront fixés à un niveau constant pour tous les essais :

La taille d'inoculum

La vitesse d'agitation

Volume et composition du milieu réactionnel

### IV.1.Définition des niveaux des facteurs :

Il s'agit de choisir, en fonction de résultats de l'étude préliminaire et de la littérature, les niveaux hauts et bas des trois facteurs retenus et d'attribuer à chaque facteur sa valeur basse (-1) et sa valeur la plus haute (+1) :

- La concentration initiale du phénol (mg/l).
- Le pH du milieu.
- La température d'incubation (°C).

**Tableau IV.1** : facteurs et domaine d'étude

Les facteurs étudiés	Niveaux de variation des facteurs		
	Niveau bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
C <sub>0</sub> du phénol (mg/l)    x <sub>1</sub>	200	600	1000
pH                                    x <sub>2</sub>	2.5	5.5	8.5
Température (°C)            x <sub>3</sub>	25	30	35

**IV.2 Choix du plan d'expériences :**

Il y a trois facteurs à étudier. Les niveaux bas et hauts de chaque facteur ont été définis, et comme on suppose que le modèle du premier degré avec interactions (PDAI) est suffisant pour modéliser le phénomène, il convient de choisir *un plan factoriel complet 2<sup>3</sup>*. Ainsi, si on considère que la réponse y mesurée est le *rendement d'élimination* calculé à t<sub>1/2</sub> et x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub> et x<sub>3</sub> sont les trois facteurs continus et contrôlés tel que :

x<sub>1</sub> : la concentration initiale du phénol (mg/l).

x<sub>2</sub> : le pH du milieu.

x<sub>3</sub> : la température d'incubation (°C).

On peut écrire l'équation suivante :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{123}x_1x_2x_3 \quad \text{IV.1}$$

y : la réponse

x<sub>i</sub> : valeur centrée réduite du paramètre étudié,

a<sub>0</sub>: moyenne des réponses au centre,

a<sub>i</sub> : coefficient donnant l'effet du facteur x<sub>i</sub> sur la réponse

a<sub>ij</sub> : coefficient donnant l'effet de l'interaction entre les paramètres x<sub>i</sub> et x<sub>j</sub> sur la réponse,

a<sub>123</sub> : coefficient donnant l'effet de l'interaction entre les trois paramètres.

Le modèle du premier degré avec interactions (PDAI) associé aux plans factoriels complets 2<sup>3</sup>, sera utilisé pour les deux réponses des deux champignons *R. stolonifère* et *A. niger*. On note y<sub>1</sub> la réponse du biodégradation par *A.niger* et y<sub>2</sub> celle de *R.stolonifer*.

IV.3 Expérimentation :

Les essais (figure IV.1, figure IV.2) sont menés conformément au plan d'expérience et les résultats sont consignés dans la matrice d'expériences (tableau IV.2), et pour valider le modèle nous ajoutons 3 essais (figure IV.3) au centre du domaine d'étude.

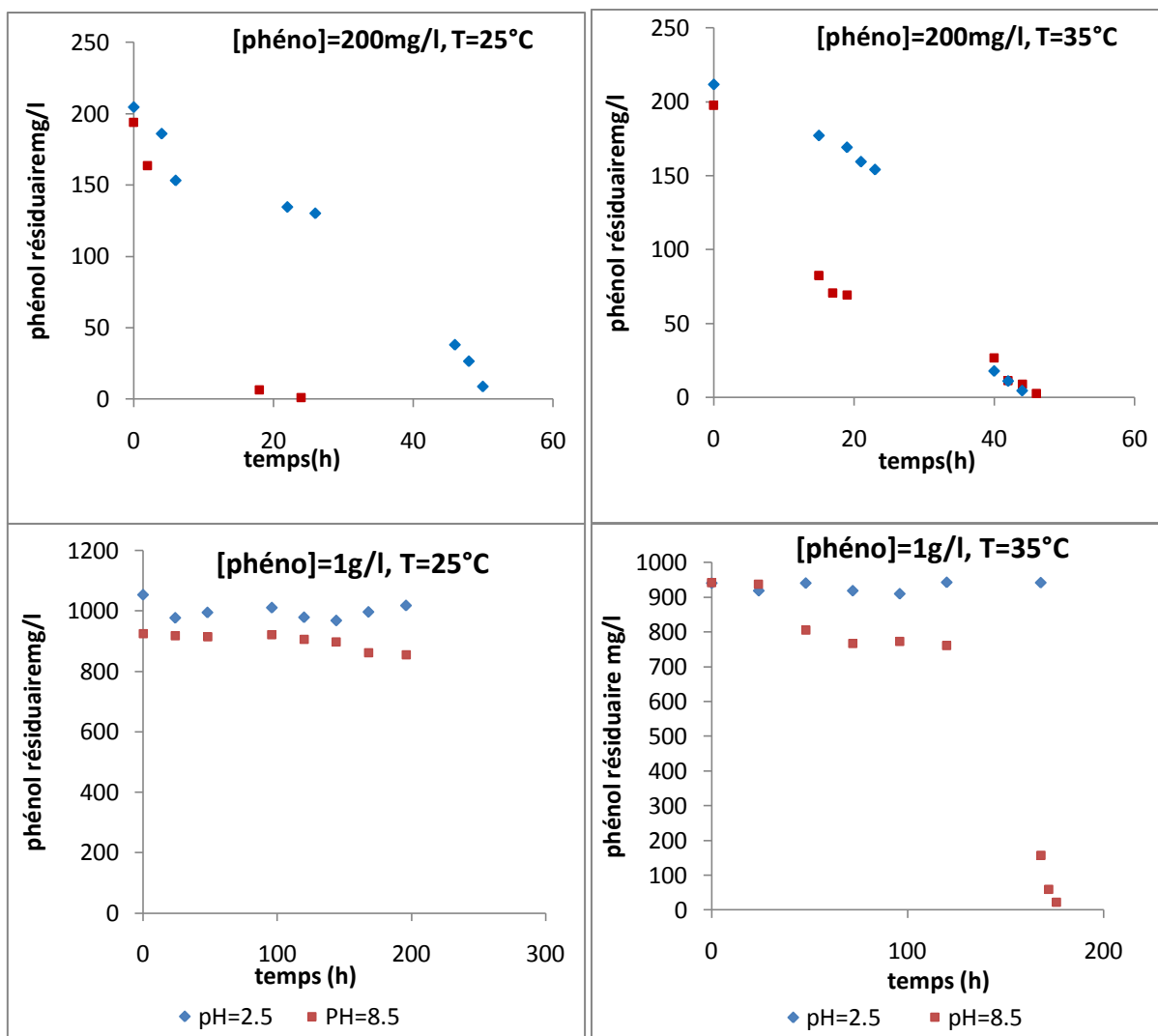


Figure IV.1: les huit essais du plan factoriel complet(*A.niger*)

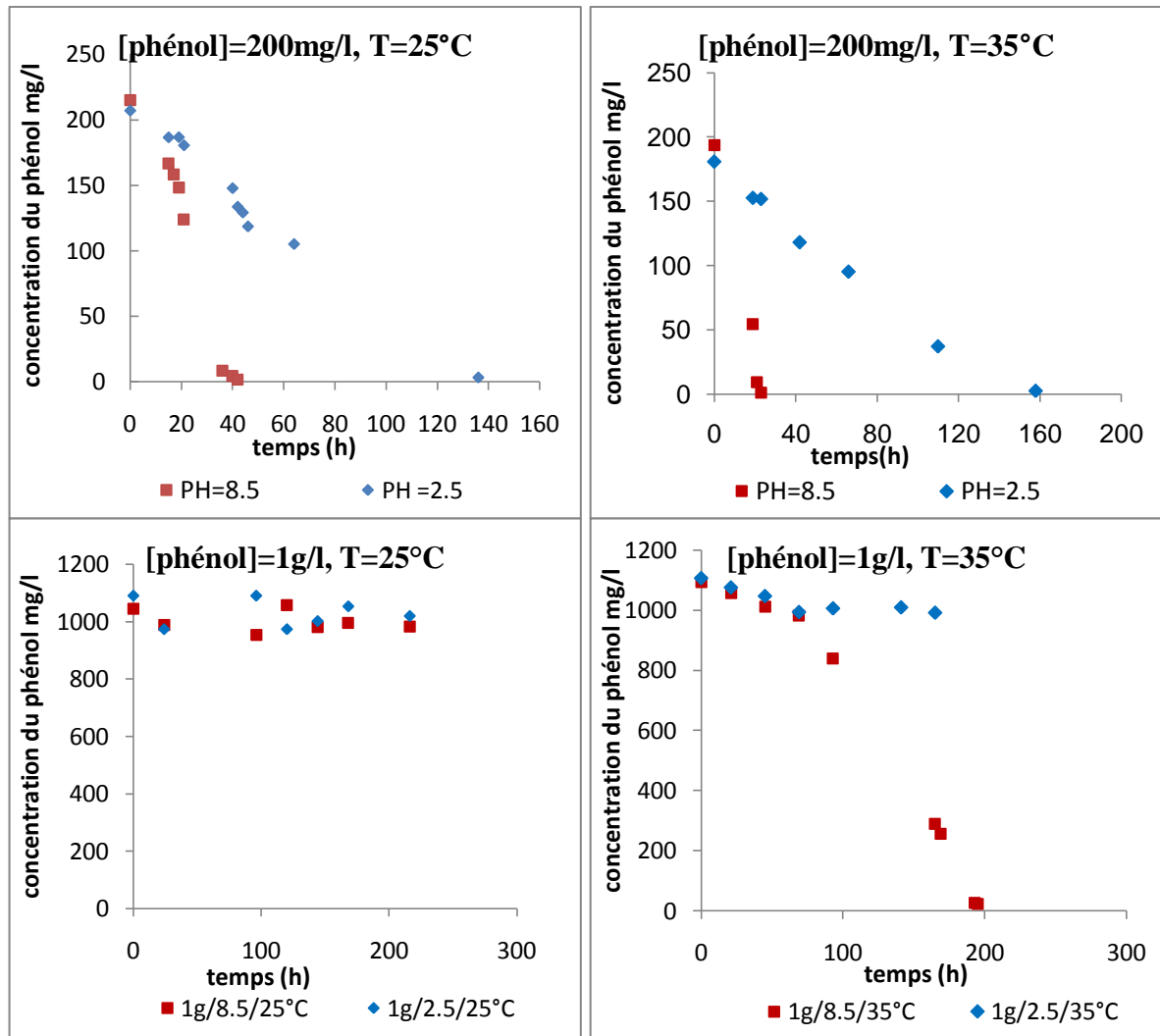


Figure IV.2: les huit essais du plan factoriel complet  $2^3$  (*R. stolonifer*)

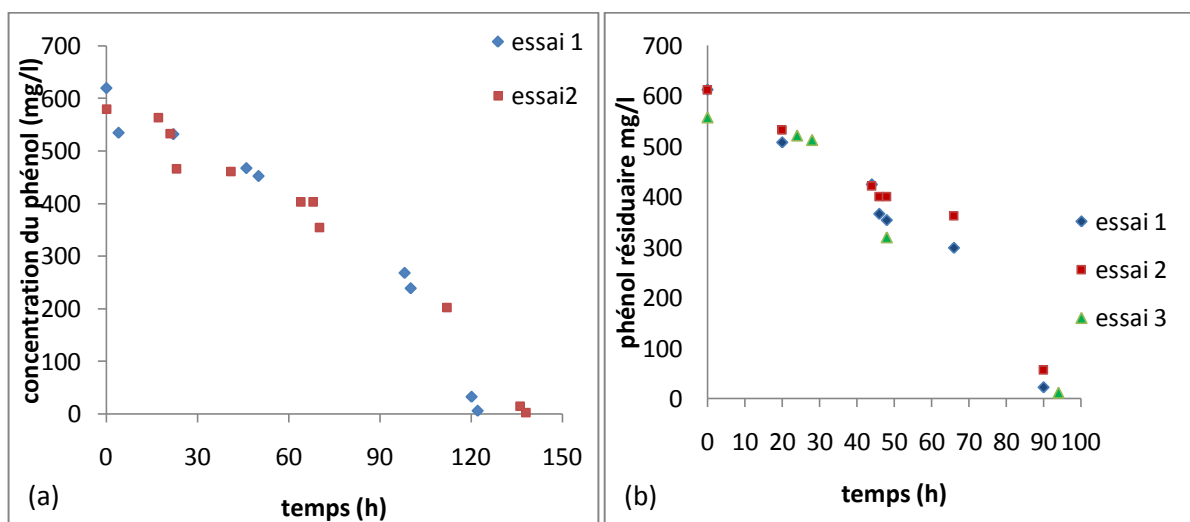


Figure IV.3 : Essais du centre, *A. niger* (a), *R. stolonifer* (b) (600mg/l du phénol pH=5.5 et température=30°C)

**Tableau IV.2** : matrice d'expérience

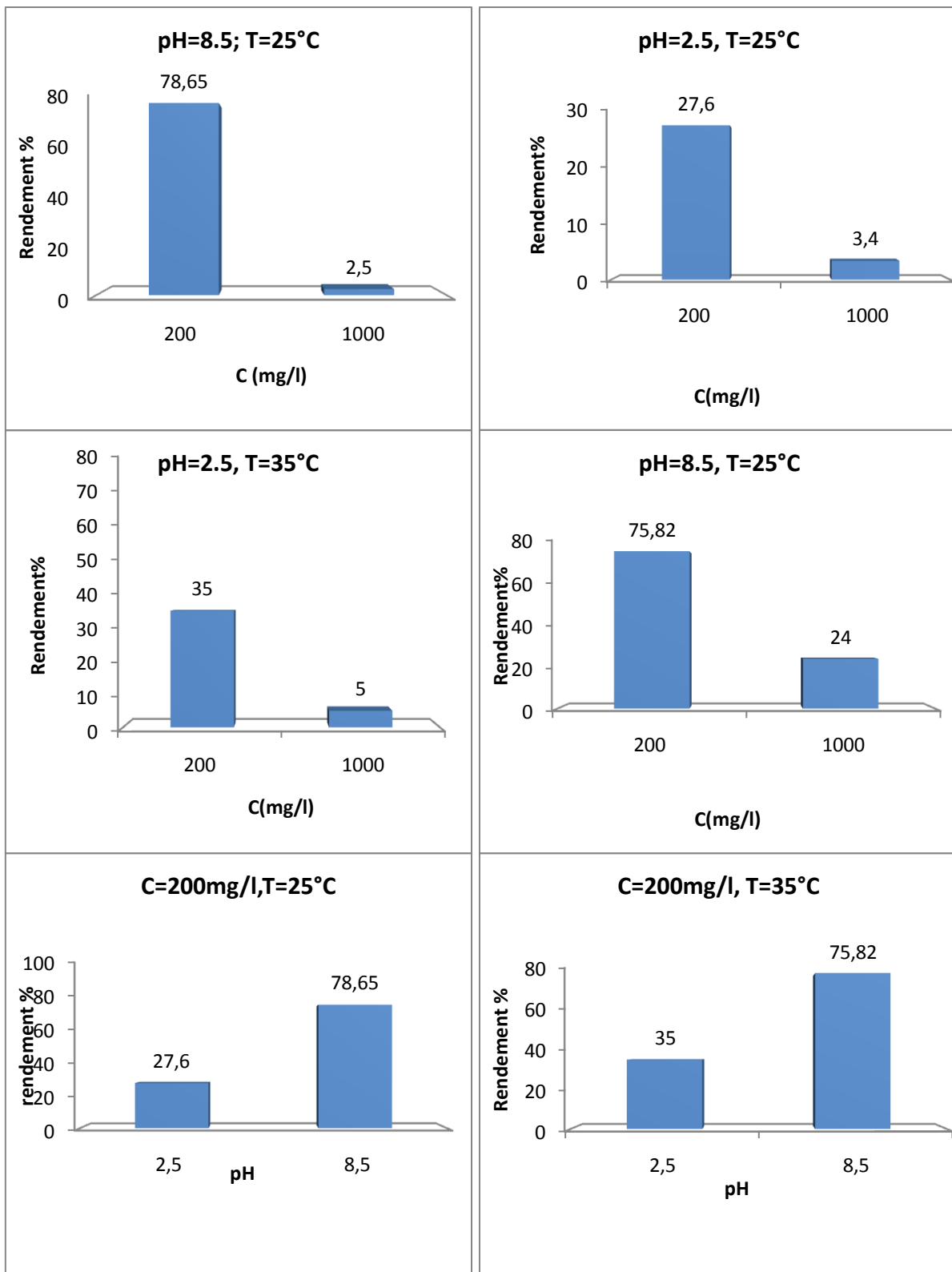
Essai n°	concentration initiale en phénol mg/l x1	pH x2	Température °C x3	rendement d'élimination à t <sub>1/2</sub> y <sub>1</sub> ( <i>A. niger</i> )	rendement d'élimination à t <sub>1/2</sub> y <sub>2</sub> ( <i>R. Stolonifer</i> )
1	200	2.5	25	<b>27.6</b>	<b>10</b>
2	1000	2.5	25	<b>3.4</b>	<b>1.13</b>
3	200	8.5	25	<b>78.65</b>	<b>30</b>
4	1000	8.5	25	<b>2.5</b>	<b>3.4</b>
5	200	2.5	35	<b>35</b>	<b>15</b>
6	1000	2.5	35	<b>5</b>	<b>2.5</b>
7	200	8.5	35	<b>75.82</b>	<b>71.82</b>
8	1000	8.5	35	<b>24</b>	<b>4.5</b>
9	600	5.5	30	<b>35</b>	<b>14.86</b>
10	600	5.5	30	<b>32</b>	<b>16.15</b>
11	600	5.5	30		<b>15.4</b>

#### IV.3.1 Analyse classique :

Les courbes sur la figure IV.1, indiquent La nature inhibitrice du phénol à des fortes concentrations (1g/l) à l'exception du cas où pH=8.5 et T= 35°C.

A partir des histogrammes (figures IV.4et IV.5) représentant la variation du rendement de biodégradation du phénol en fonction des paramètres étudiés, nous pouvons constater que le rendement de dégradation du phénol prend sa valeur la plus faible lorsque la concentration initiale du phénol est à son niveau haut 1000mg/l .De même on constate que les faibles valeurs du pH diminuent les rendements de dégradation.

Le tableau IV.2 montre que deux facteurs sont nettement influents : la concentration (facteur1) et le pH (facteur2).



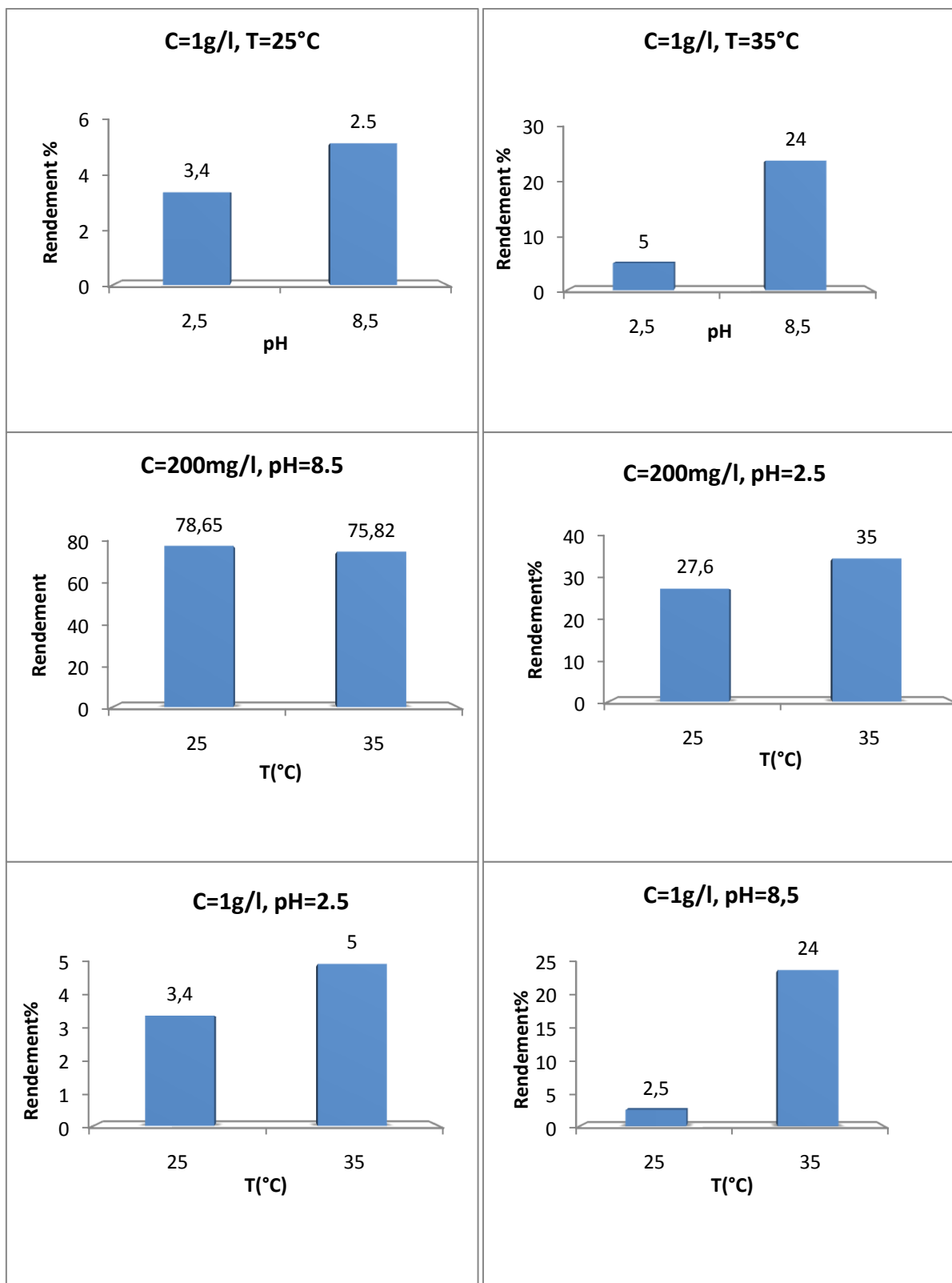
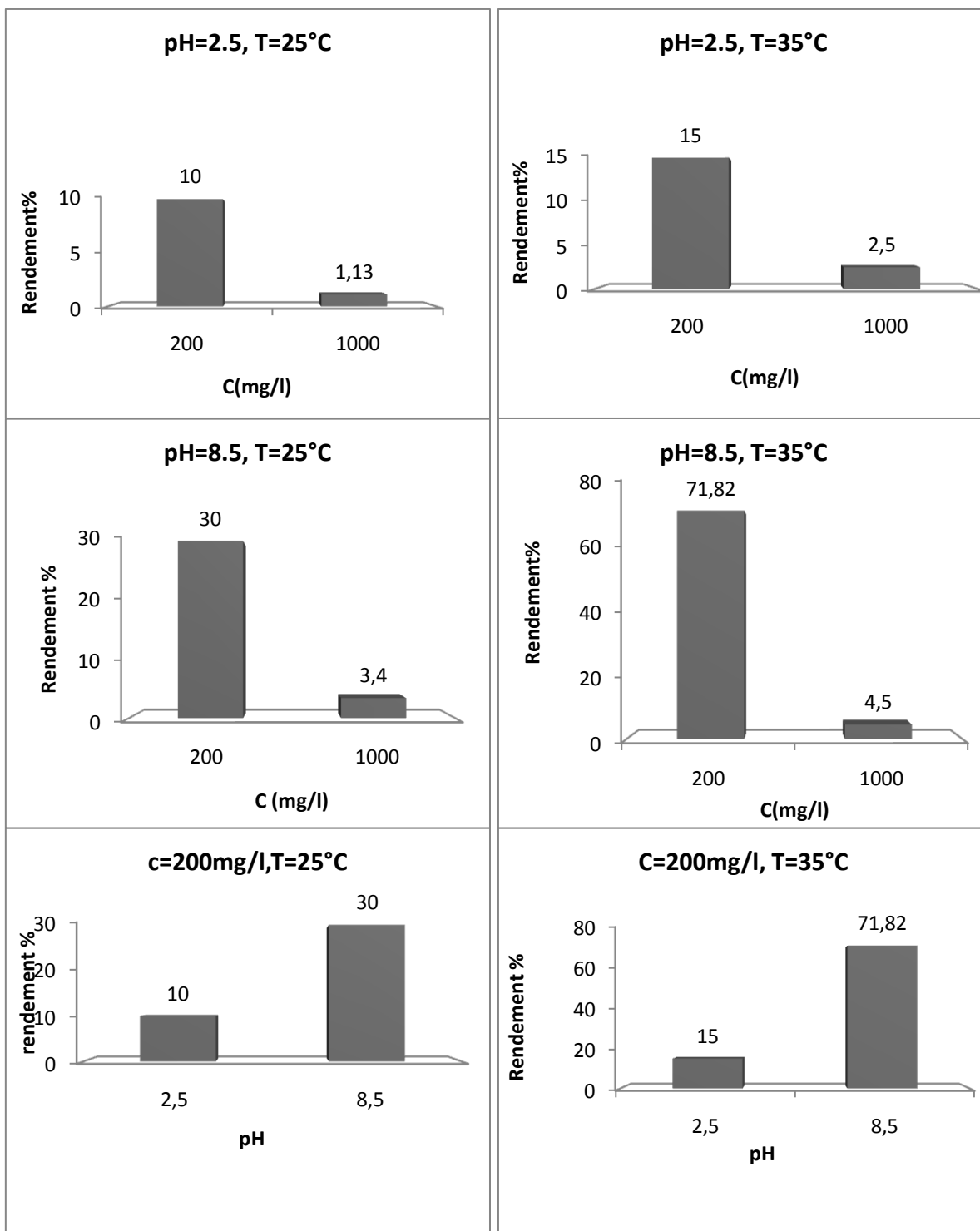


Figure IV.4 : les variations de la réponse  $y_1$  (*A. niger*) en fonction des facteurs.





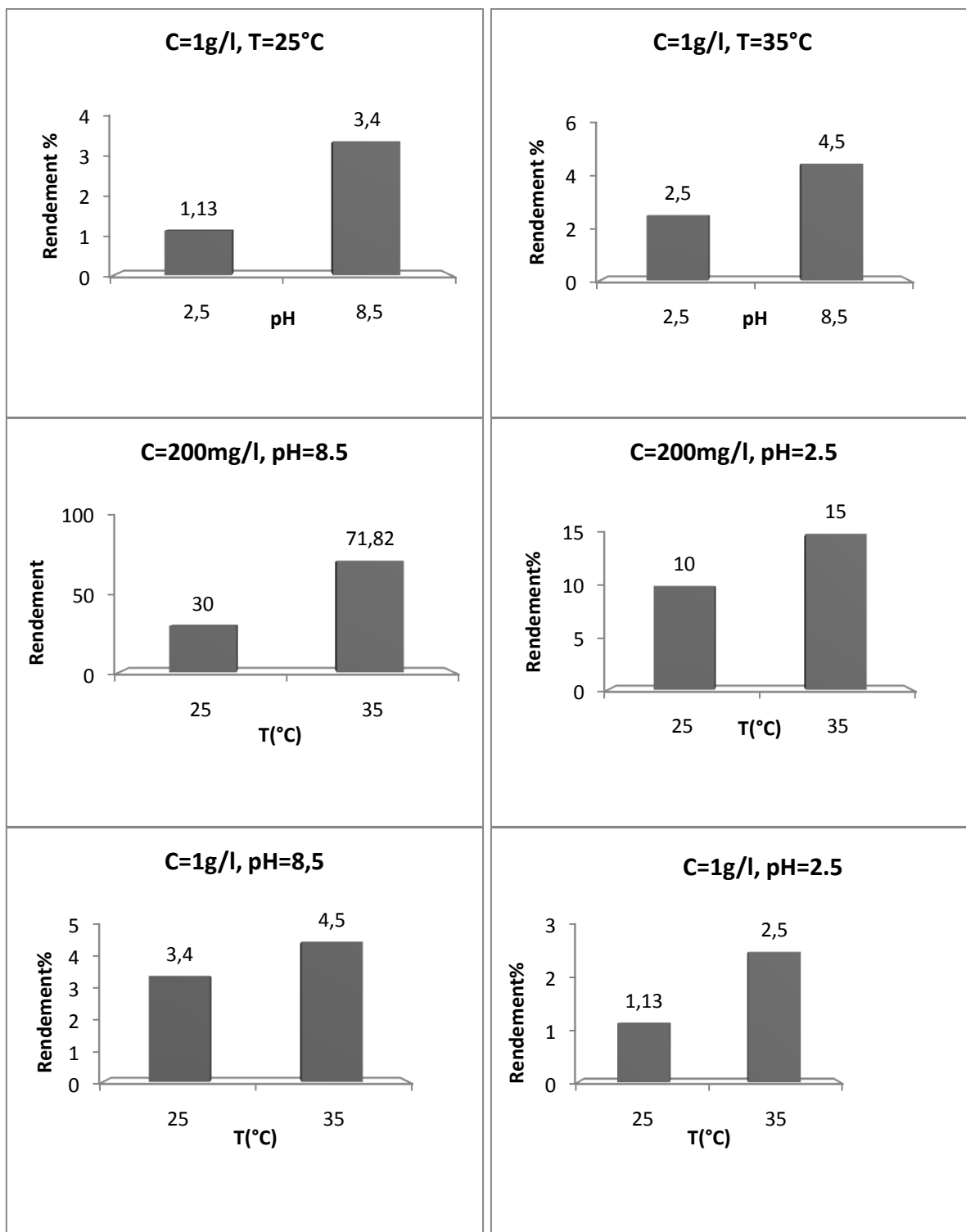


Figure IV.5 : les variations de la réponse  $y_2$  (*R.stolonifer*) en fonction des facteurs

IV.4 Interprétation des résultats des calculs:

IV.4.1 Calcul des coefficients

A partir des résultats expérimentaux obtenus (tableau IV.2), nous calculons la valeur des coefficients de chaque facteurs en utilisant le modèle mathématique (Eq IV.1) ces valeurs figurent sur le tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Effets et interactions des facteurs

coefficients	Valeur ( <i>A. niger</i> )	Valeur ( <i>R.stolonifer</i> )
(a <sub>0</sub> )	32,09	17
(a <sub>1</sub> )	-22,77	-14.37
(a <sub>2</sub> )	13,74	10.1
(a <sub>3</sub> )	3,45	6.19
(a <sub>12</sub> )	-9,22	-9.10
(a <sub>13</sub> )	2,31	-5.5
(a <sub>23</sub> )	1,20	4.53
(a <sub>123</sub> )	3,76	-4.67

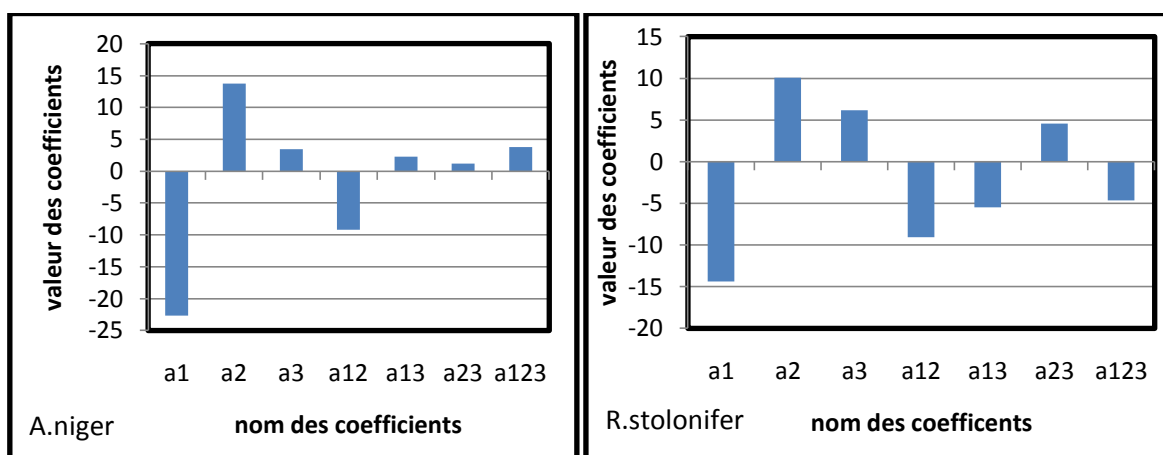


Figure IV.6 : Illustration du tableau IV.3.

\*

**IV.4.2 Analyse statistique :**

Le logiciel *jmp 8.0* (version d'évaluation) utilise la probabilité (*p-value*) ( $P < 0,05$ ) pour évaluer l'analyse de la variance) pour déterminer l'importance de chaque terme dans les équations du modèle et d'estimer la qualité de l'ajustement dans chaque cas.

La signification de chaque coefficient dans l'équation a été déterminée par *le test de Student* et *P-valeurs* :

- **Test du Student :**

Pour évaluer l'importance de ces coefficients, on compare ce coefficient à son écart-type en faisant le rapport  $\frac{a_1}{\sigma_{a1}}$ , ce rapport est appelé *le t de student*. En comparant  $|t_i|$  de chaque terme avec la valeur  $t_{crit}$  déterminé à partir de la table du *student* (annexe 4) en fonction du degré du liberté ddl ( $n-p$ ) et  $\alpha=0.05$ .

A partir de *t student*, on peut évaluer la probabilité (*p-value*) que le coefficient soit sans importance ou peu significatif et pour prendre une décision d'acceptation ou de rejet du coefficient, il suffit de comparer cette valeur au seuil  $\alpha$  tel que  $\alpha=0.05$ .

Pour chacune des réponses étudiées les coefficients de modèle calculés sont affichés dans le tableau IV.4 et IV.5. la valeur de chaque coefficient est accompagné par l'ecart- type et le rapport t et P-valeurs.

**Tableau IV.4 :** Estimations des coefficients (*A.niger*)

Terme	Estimation	Écart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	32,097	0,864177	37,14	0,0007*
X1(200,1000)	-22,77125	0,966179	-23,57	0,0018*
X2(2,5,8,5)	13,74625	0,966179	14,23	0,0049*
X3(25,35)	3,45875	0,966179	3,58	0,0699
X1*X2	-9,22125	0,966179	-9,54	0,0108*
X1*X3	2,31625	0,966179	2,40	0,1387
X2*X3	1,20875	0,966179	1,25	0,3374
X1*X2*X3	3,76625	0,966179	3,90	0,0600

*Un astérisque est placé à côté des valeurs qui répondent à des testes significatifs*

En examinant les résultats (tableau IV.4), on s'aperçoit que les facteurs les plus influents sont la concentration initiale du substrat et le pH. En effet la probabilité *P-value* est très faible pour les deux coefficients ( $a_1, a_2$ ) ainsi que leur interaction ( $a_{12}$ ), elle égale à 0.0018, 0.0049

et 0.0108 respectivement. Tandis que la probabilité *P-value* pour les autres coefficients est supérieur à 0.05 ce qui nous permet de retenir que les trois coefficients  $a_1, a_2, a_{12}$ .

L'effet de la température semble négligeable

- **Simplification du modèle :**

Les interactions ( $a_{13}, a_{23}, a_{123}$ ) sont négligeables. On refait les calculs avec un modèle simplifié, ce modèle ne faisant intervenir que les coefficients significatifs. Pour ce faire, on élimine les coefficients les plus faibles.

Le modèle simplifié : 
$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_{12} x_1 x_2$$
 Eq IV.2

**Tableau IV.5:** Estimations des coefficients du modèle simplifié (*A.niger*)

Terme	Estimation	Écart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	32,097	2,155325	14,89	<,0001*
X1(200,1000)	-22,77125	2,409726	-9,45	<,0001*
X2(2,5, 8,5)	13,74625	2,409726	5,70	0,0013*
X1*X2	-9,22125	2,409726	-3,83	0,0087*

Ces résultats permettent d'écrire le modèle donnant la réponse  $y_1$  :

$$y_1 = 32.09 - 22.77x_1 + 13.74x_2 - 9.22x_1x_2$$

**Tableau IV.6 :** Estimations des coefficients (*R.stolonifer*)

Terme	Estimation	Écart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	16,991818	0,522717	32,51	<,0001*
X1(200,1000)	-14,37375	0,61294	-23,45	0,0002*
X2(2.5, 8.5)	10,09875	0,61294	16,48	0,0005*
X3(25,35)	6,19875	0,61294	10,11	0,0021*
X1*X2	-9,10625	0,61294	-14,86	0,0007*
X1*X3	-5,50625	0,61294	-8,98	0,0029*
X2*X3	4,53125	0,61294	7,39	0,0051*
X1*X2*X3	-4,67375	0,61294	-7,63	0,0047*

Un astérisque est placé à côté des valeurs qui répondent à des testes significatifs

Le tableau IV.6 qui représente les estimations des coefficients du modèle  $y_2$  (*R.stolonifer*), montre que la probabilité *P-value* pour qu'un coefficient soit négligeable est très faible, elle

est inférieur à 0.05 pour tout les coefficients, ceci nous permet donc de les retenir sans exception.

En comparant  $|t_i|$  de chaque terme avec la valeur  $t_{crit}= 2.353$  déterminé à partir du table de *student* en fonction du ddl ( n-p)= 3 et  $\alpha=0.05$ , nous constatons que les  $t_i$  sont supérieur à  $t_{crit}$

Le modèle donnant la réponse  $y_2$  en fonction des trois facteurs est le suivant :

$$y_2 = 17 - 14.37x_1 + 10.1x_2 + 6.19x_3 - 9.1x_1x_2 - 5.5x_1x_3 + 4.53x_2x_3 - 4.67x_1x_2x_3$$

Cette relation est utilisée par le logiciel *jmp* pour faire tous les calculs et tracer tous les graphiques.

#### IV.5. validation du modèle :

Le modèle jugé doit franchir les tests de validations suivantes :

- *Les points au centre*

Le centre du domaine correspond à ( $x_1=0$ ,  $x_2=0$ ,  $x_3=0$ ) exprimé en valeur réelle par ( $x_1=600\text{mg/l}$ ,  $x_2=5.5$ ,  $x_3=30^\circ\text{C}$ )

Les réponses mesurée au centre du domaine (tableau IV.2) sont statistiquement égales à la réponse calculé (la constante  $a_0$ ) par ce modèle au même point du domaine, les modèles PDAI sont donc valides.

- *Le coefficient de détermination  $R^2$  :*

L'analyse des variances permet de calculer une statistique très utile : le ( $R^2$ ) et ( $R^2$  ajusté). Les résultats obtenus à l'aide du logiciel *jmp* sont présentés sur le tableau IV.7.

**Tableau IV.7:** résumé de l'ajustement

	( <i>A.niger</i> )	( <i>R.stolonifer</i> )
R carré	<b>0,957889</b>	<b>0,997763</b>
R carré ajusté	<b>0,936834</b>	<b>0,992542</b>
Écart-type résiduel	6,815735	1,733655
Moyenne de la réponse	32,097	16,99182
Observations (ou sommes pondérées)	10	11

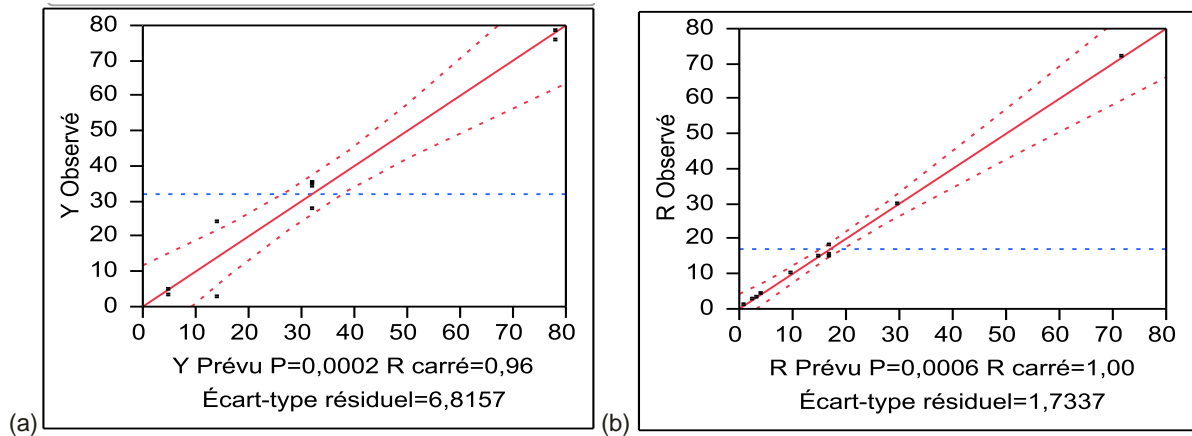


Figure IV.7 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues

Les valeurs du coefficient de détermination ( $R^2 = 0,957889$ ) et du coefficient de détermination ajusté ( $R^2_{aj} = 0,936834$ ) du modèle  $y_1$  sont proches de 1. En outre  $R^2 = 0,957889$  a montré que seulement 4,22% de la variation totale ne peut pas être expliquée par le modèle.

Le coefficient de détermination ( $R^2 = 0,9977$ ) a indiqué que 99,77% de la variable totale été exprimée par le modèle  $y_2$ . La valeur de coefficient de détermination  $R^2$  ajusté ( $R^2$  ajusté = 0,9925) est également élevé. Généralement, un modèle de régression qui possède une valeur de  $R^2$  supérieure à 0,9 est considéré comme ayant une très forte corrélation. Ces deux paramètres indiquent la bonne qualité d'ajustement du modèle.

- **Le test de Fisher :**

Le tableau IV.8 résume l'analyse de la variance (test Fisher) pour la réponse  $y_1$ . Le test de Fisher est le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus, il permet de calculer la probabilité que ces deux carrés ne soient pas égaux.

Tableau IV.8 : analyse de la variance (*A.niger*)

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	3	6340,1653	2113,39	45,4940
Résidus	6	278,7255	46,45	Prob. > F
Total	9	6618,8908		0,0002*

Le test-F a indiqué que toutes les facteurs et les interactions pris en compte dans la conception expérimentale sont statistiquement significatives ( $P < 0,05$ ) et que les variations

des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs, en effet, la valeur faible de probabilité (<0,0002) indique que le modèle est significatif.

**Tableau IV.9:** analyse de la variance (*R.stolonifer*)

Source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	(p-1)=7	4021,0615	574,437	191,1250
Résidus	(n-p)=3	9,0167	3,006	Prob. > F
Total	10	4030,0782		0,0006*

A la lumière des valeurs F 191.125 et Prob> F (<0,0006) du modèle, rapportées sur le tableau IV.9, il apparaît bien que les termes du modèle  $y_2$  sont significative, par conséquent, le modèle est validé.

Pour chacune des réponses ( $y_1$  et  $y_2$ ), la valeur de  $F_{calc}$  est inférieure à celle de  $F_{crit}$ , ce qui s'est traduit par des probabilités *p-value* très satisfaisantes.

En effet, les tests de validation témoignent amplement de la bonne qualité des modèles proposés et qui sont valident dans le domaine suivant :

A.niger  $y_1 = 32.09 - 22.77x_1 + 13.74x_2 - 9.22x_1x_2$

R.stolonifer  $y_2 = 17 - 14.37x_1 + 10.1x_2 + 6.19x_3 - 9.1x_1x_2 - 5.5x_1x_3 + 4.53x_2x_3 - 4.67x_1x_2x_3$

200 < C (mg/l) < 1000

2.5 < pH < 8.5

25 < T°C < 35



IV.6 Représentation graphique des effets

a. la réponse  $y_1$ :

Le diagramme des effets (figure IV.8) indique les effets principaux des facteurs. L'importance et le sens de la pente de chaque paramètre donne une information sur l'influence de ce paramètre.

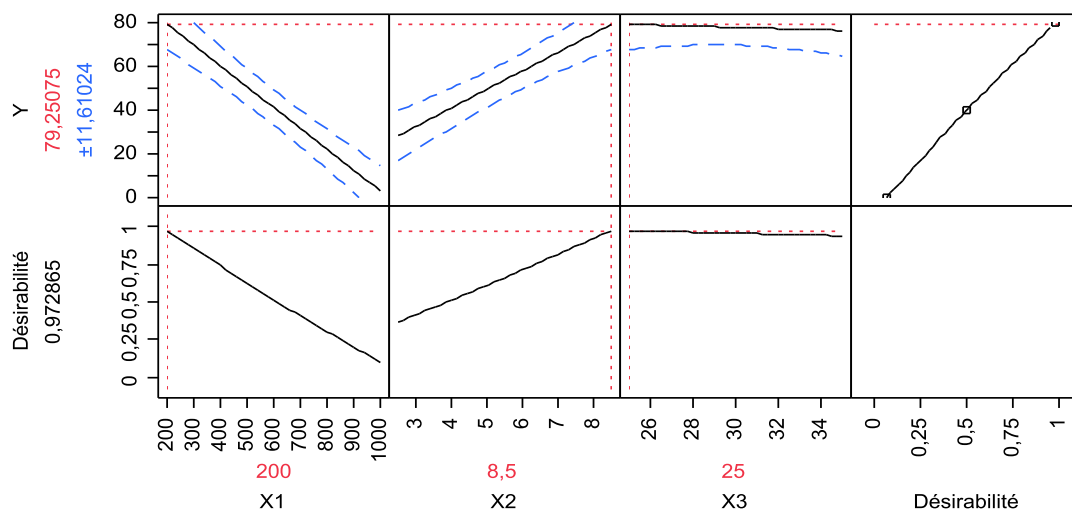


Figure IV.8: Diagramme des effets et de La désirabilité

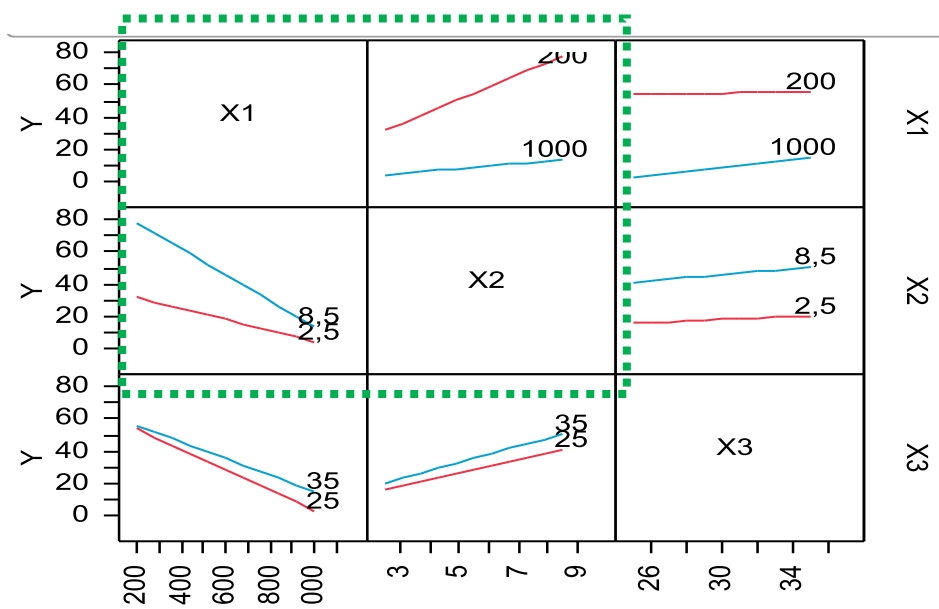


Figure IV.9 : Diagramme des interactions

Le diagramme des effets (figure IV.8) permet de constater que le facteur le plus influent est la concentration initiale du substrat avec un effet négatif (-22.77), le deuxième dans l'ordre, est

le pH avec un effet positif (+13.74), le troisième facteur, la température d'incubation, a un effet négligeable sur la réponse (3,45).

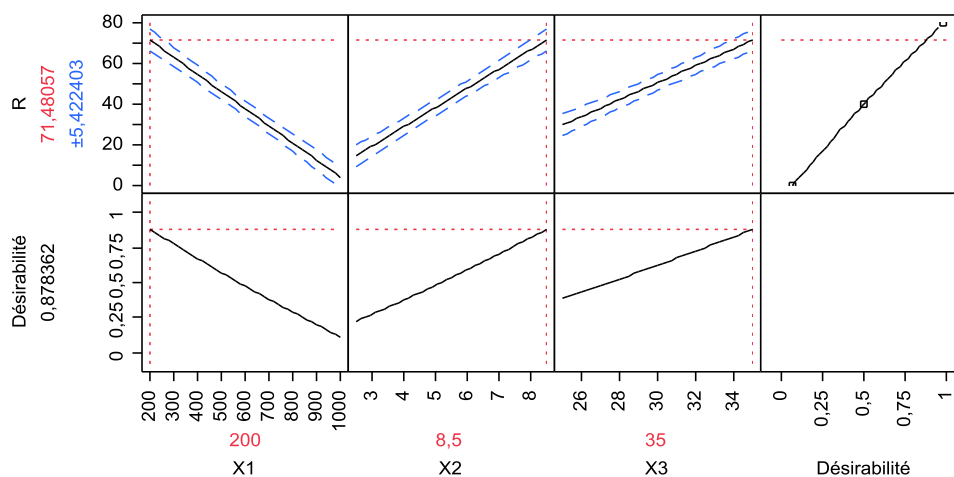
Le diagramme des interactions indique l'effet d'un facteur au niveau bas et haut d'un autre facteur. L'étude de leur interaction (figure IV.9) permet de préciser que :

Les interactions  $a_{13}$ ,  $a_{23}$ ,  $a_{123}$  sont négligeables, les droites représentant les effets sont parallèles dans la plupart des carrés du diagramme des interactions.

Nous savons si les droites des effets ne sont pas parallèles, il y a une interaction significative c'est le cas des deux facteurs 1 et 2, dont les pentes des effets sont différentes dans les deux perspectives (figure IV.9), dans le carré supérieur droite, qui indique l'effet de pH pour le niveau bas (200) et haut (1000) de la concentration, et le carré inférieur gauche présentant l'effet de la concentration pour le niveau bas (2.5) et haut (8.5) de pH.

Il ressort que le pH acide accentue la toxicité du phénol par conséquent l'inhibition de sa dégradation

**b. la réponse  $y_2$ :**



**Figure IV.10:** Diagramme des effets et de La désirabilité

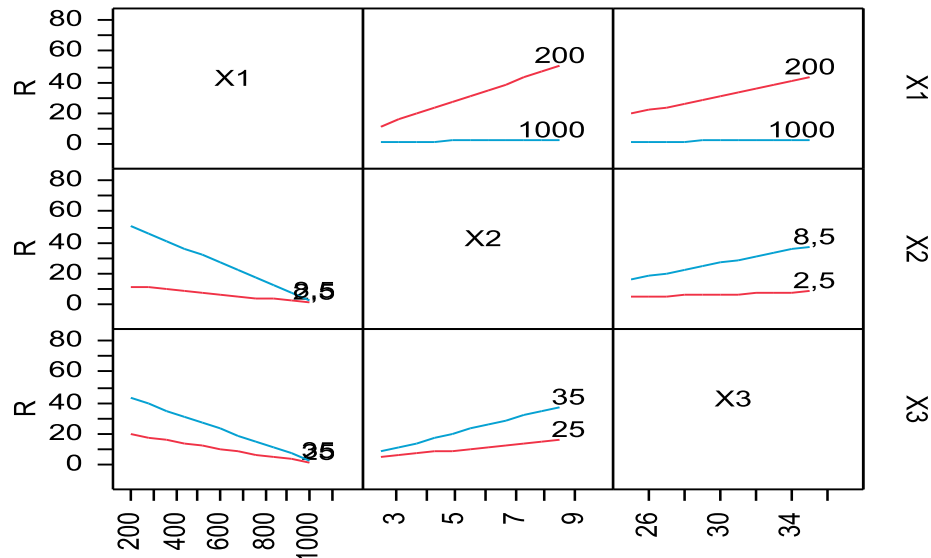


Figure IV.11: Diagramme des interactions

D'après les diagrammes des effets (figures IV.10) la concentration a un effet négatif, en effet la valeur  $a_1 = -14.37$  signifie qu'en moyenne, le rendement diminue de  $2 \times 14.37 = 28.74\%$ , quand on passe d'une concentration initiale de 200 mg/l (niveau bas) à une concentration initiale de 1000mg/l du phénol (niveau haut).

On constate également que le pH, et dans une moindre mesure la température, ont une action positive sur le rendement de dégradation tel que  $a_2 = 10.1$  et  $a_3 = 6.19$  qui signifie que lorsque le pH et la température passe du niveau bas vers le niveau haut, le rendement augmente de 20.2% et 12.38% respectivement.

L'effet de l'interaction entre ces facteurs est mis en évidence sur les figures (figure IV.11).

Le non- parallélisme des courbes entre les trois facteurs permet de rendre compte de l'effet des interactions sur l'évolution de la réponse.

L'interaction  $a_{12}$  entre la concentration du phénol et le pH est de -9.10. Cela signifie que l'effet de la concentration est plus faible quand le pH est élevé.

L'interaction  $a_{13}$  entre la concentration en phénol et la température est de -5.5. Cela signifie que l'effet de la concentration est plus faible quand la température est élevée.

L'interaction  $a_{23}$  entre le pH et la température est de 4.53, et donc l'effet de pH est plus élevé quand la température est élevée.

L'interaction  $a_{123}$  entre les trois facteurs est de -4.67, Elle intervient car l'interaction du premier ordre entre les deux facteurs dépend du troisième facteur.

#### IV.7 Optimisation et fonction désirabilité :

La fonction désirabilité (D) permet d'optimiser les réponses  $y_1$  et  $y_2$ .

Le rendement maximal d'élimination à  $t_{1/2}$  ( $y_1$ ) correspondant à une désirabilité maximale qui vaut 0,97 (figure IV.8) est obtenu avec les conditions opératoires suivantes :

- Concentration initiale en phénol 200mg/l
- Le pH du milieu égale à 8.5
- La température d'incubation égale à 25 °C

Le rendement maximal d'élimination à  $t_{1/2}$  ( $y_2$ ) correspondant à une désirabilité maximale qui vaut 0,87 (figure IV.10) est obtenu avec les conditions opératoires suivantes :

- Concentration initiale en phénol 200mg/l
- Le pH du milieu égale à 8.5
- La température d'incubation égale à 35 °C

En appliquant les équations (I.1), (I.2) et (I.3) on peut exprimer les modèles en unités réelles :

$$y_1 = 32.09 - 22.77 \frac{(X_1-600)}{400} + 13.74 \frac{(X_2-5.5)}{3} + -9.22 \frac{(X_1-600)}{400} \frac{(X_2-5.5)}{3}$$

$$y_2 = 17 - 14.37 \frac{(X_1-600)}{400} + 10.1 \frac{(X_2-5.5)}{3} + 6.19 \frac{(X_3-30)}{5} - 9.1 \frac{(X_1-600)}{400} \frac{(X_2-5.5)}{3} - 5.5 \frac{(X_1-600)}{400} \frac{(X_3-30)}{5} + 4.53 \frac{(X_2-5.5)}{3} \frac{(X_3-30)}{5} - 4.67 \frac{(X_1-600)}{400} \frac{(X_2-5.5)}{3} \frac{(X_3-30)}{5}$$

En conclusion, les tests statistiques et les diagrammes permettent de considérer le modèle du premier degré comme un bon modèle pour représenter les résultats du plan d'expériences.

## CONCLUSION

L'étude de la dégradation du phénol a été effectuée sur deux champignons filamenteux à savoir *Aspergillus niger* et *Rhizopus stolonifer*.

L'influence des paramètres tels que l'adaptation des souches, la concentration initiale, le pH et la température ont été examinées.

Les résultats obtenus permettent d'énoncer les conclusions suivantes :

Les deux champignons sont capables de métaboliser le phénol à de fortes concentrations dans les conditions opératoires étudiées, en effet le temps nécessaire pour une élimination totale de 1g/l phénol est de 140 heures pour *A. niger* et 210 heures pour *R.stolonifer*. L'augmentation de la concentration initiale du phénol accrue son effet inhibiteur, de plus la croissance fongique n'a pas été proportionnelle à la dégradation du phénol à des fortes concentrations.

L'adaptation du *R.stolonifer* a un effet remarquable sur la cinétique de dégradation du phénol. Cependant, *Aspergillus niger* ne nécessite pas une exposition préalable au phénol.

Une absence d'un effet du pH sur dégradation du phénol entre pH 5,5 et 8,5 par les deux souches a caractérisé les cinétiques de dégradation.

Contrairement au *R.stolonifer*, *A.niger* a montré une tolérance plus élevée envers le milieu acide pH =2,5. *A.niger* est moins sensible aux variations du pH et du température..

La biodégradation du phénol par *R.stolonifer* et *A.niger* a été modélisée selon un plan factoriel complet  $2^3$ .

Le modèle donnant le rendement d'élimination par *R.stolonifer* en fonction des niveaux des trois facteurs (unités codées) est un polynôme de 1 degré :

$$y = 17 - 14.37x_1 + 10.1x_2 + 6.19x_3 - 9.1x_1x_2 - 5.5x_1x_3 + 4.53x_2x_3 - 4.67x_1x_2x_3$$

On constate que la concentration a un effet négatif sur la réponse, Cependant le pH, et dans une moindre mesure la température, ont une action positive.

Concernant la souche *A.niger*, nous concluons que le modèle adéquat est du premier degré et que les facteurs les plus influents sont la concentration initiale du substrat et le pH.

$$y = 32.09 - 22.77x_1 + 13.74x_2 - 9.22x_1x_2$$

La modélisation du rendement de dégradation fongique par le plan factoriel ( $2^3$ ) a permis de déterminer le rendement maximal d'élimination à  $t_{1/2}$  correspondant à une désirabilité maximale qui vaut 0,87 pour *R.stolonifer* est obtenu avec les conditions opératoires suivantes : Concentration initiale en phénol 200mg/l, le pH égale à 8,5, la température d'incubation égale à 35 °C. Tandis pour *A.niger* nous avons enregistré une désirabilité maximale dans les conditions opératoires suivantes : concentration initiale en phénol 200mg/l, le pH égale à 8,5, la température d'incubation égale à 25 °C.

Il faut souligner donc l'apport de l'application de la méthodologie de plan d'expérience qui a permis d'affiner l'approche expérimentale et optimiser les conditions favorables.

Les données révélées montrent la perspective de l'application des champignons filamenteux pour la réduction des rejets industriels phénoliques.

Dotés d'un arsenal enzymatique très varié, les champignons filamenteux sont capables d'assimiler et de biodégrader une grande partie des différents éléments organiques constitutifs des effluents industriels.

L'utilisation de ces champignons filamenteux ayant un aspect floculant permet la récupération et la valorisation de la biomasse.

Les possibilités d'utilisation de ces deux souches dans le traitement biologique des eaux usées contenant du phénol, sont d'approche intéressante qui pourrait être appliquée dans les effluents industriels, donc il sera important de tester cette possibilité à l'échelle pilote, en comparant ses performances économique et technique aux traitements biologiques et physico-chimiques.

## Références bibliographiques

- [1] Ramade. F. Dictionnaire Encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'Environnement, 2<sup>ème</sup> édition, Dunod, 2002.
- [2] Soltani. M, Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes, Variation en fonction de la source de carbone, Thèse de doctorat, université Paris 6, France, 2004.
- [3]INRS, Fiche toxicologique, phénol, 2008.
- [4] I N E R I S - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques phénol, N°2-mai 2005.
- [5] Atteia, O, Chimie et pollution des eaux souterraines, Tec & Doc/Lavoisier, 2005.
- [6] Busca, G., Berardinelli, S., Resini,C., Arrighi, L. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments, Journal of Hazardous Materials 160 : 265–288, 2008.
- [7]Vandecasteele, J.P Microbiologie pétrolière : Concepts. Implications environnementales. Applications industrielles, IFP, édition Technip, paris, 2005.
- [8]Bajaj, M. Treatment of phenol wastewater in suspended and fixed bed bioreactors university Karlsruhe, 2008.
- [9] <http://toxnet.gov>: Environmental Health Criteria Vol:16 ,1994.
- [10] ATSDR., Toxicological profile of phenol, Agency for Toxic Substances and Disease, 2006.
- [11] Michałowicz. J., Duda. J. Phenols – Sources and Toxicity, Polish Journal of Environmental Studies Vol. 16, No. 3, 2007.
- [12] Jiang, Y., Wen, J., Hongmei, L., Suliang, Y., Zongding, H. The biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*, Journal of Hazardous Materials, 147, 672–676, 2007.
- [13] Jiang,Y., Wen ,J., Lan, L., Hu, Z. Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by the yeast *Candida tropicalis*, Biodegradation 18, 719–729, 2007.
- [14] Wang, G., Wen , J., Li, H ., Qiu, C. Biodegradation of phenol and m-cresol by *Candida albicans* PDY-07 under anaerobic condition, Journal of Industrial and Biotechnology 36, 809–814, 2009.
- [15] Pelmont, J. Biodégradation et métabolisme, Grenoble Sciences, édition EDP, 2005.

- [16] Weissermelk. K., Arpl. H, Chimie organique industriels, 3<sup>e</sup> édition, De Boek university, 2000.
- [17] Kumaran. P., Paruchuri.Y.L, Kinetics of phenol biotransformation, Water Resources, 1, 11-22, 1997.
- [18] Santos, V.L., Linardi, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents—identification and degradation potential, Process Biochemistry 39, 1001–1006, 2004.
- [19] Stoilova, I., Krastanov, A., Stanchev,V., Daniel, D., Gerginova, M., Alexieva Z.  
Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells, Enzyme and Microbial Technology 39, 1036-1041, 2006.
- [20] Conseil canadien des ministres de l'environnement. Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux : protection de la vie aquatique : phénols — phénols monohydriques et dihydriques, dans Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, Winnipeg, le Conseil, 1999.
- [21] Yang, R. D., Humphrey. A. E. Dynamic and steady state of phenol biodegradation in pure and mixed cultures, John Wiley and Sons.inc, 1975.
- [22] Journal Official N° 26, 23 avril 2006.
- [23] Chin Wang, C., Mei Lee. C., Jen Lu, C., Shang Chuang, C., Zong Huang, M. Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in the presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria, Chemosphere 41, 1873-1879, 2000.
- [24] Varma, R.J., Gaikwad, B.G, Biodegradation and phenol tolerance by recycled cells of *Candida tropicalis* NCIM 3556, International Biodeterioration & Biodegradation 63, 539–542,2009.
- [25] Fragoeiro,S. Use of fungi in Bioremediation of pesticides, Grandfield university, 2005.
- [26] Gogate, R., Pandit, A.B, A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions, Advances in Environmental Research 8 : 501–551, 2004.
- [27] Harbhajan, S. Mycoremédiation fungal bioremediation Wiley, 2000.
- [28] Hinteregger,C., Leitner,R. Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida*, Applied Microbiology Biotechnology 37, 252-259, 1992.
- [29] Leitão, A.L. Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field, International Journal of Environmental Research and Public Health 6,1393-1417, 2009.



- [30] Pinto, G., Pollio, A., Previtera, A., Temussi, F. Biodegradation of phenols by microalgae, *Biotechnology Letters* 24, 2047–2051, 2002.
- [31] Onysko, L.K. Unsteady-state behavior of an immobilized-cell fluidized-bed bioreactor for phenol biodegradation, university of Waterloo, Canada, 1999.
- [32] Bugnicourt, M. *Dictionnaire De Microbiologie Générale*, Ellipses, 15<sup>e</sup> édition, Paris, 1995.
- [33] Juhasz, A.L., Naidu, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *International Biodeterioration & Biodegradation* 45, 57-88, 2002.
- [34] Stanchevun, V., Stoilova, I. La dynamique de la biodégradation de fortes concentrations en catéchol par *Aspergillus awamori*, *Journal of Hazardous Materials* 154, 396–402, 2008.
- [35] Santos, V.L., Monteiro, A. S., Braga, D.T. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents, *Journal of Hazardous Materials* 161, 1413–1420, 2009.
- [36] Cai, W., Li, J., Zhang, Z. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp, *Journal of Hazardous Materials* 148: 38–42, 2007.
- [37] Husaini, A., Roslan, H. A., Hii, K. S. Y., Ang, C. H. Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites, *World Journal Microbiology and Biotechnol*, 24:2789–2797, 2008.
- [38] DaSilva, M., Esposito, E., Moody, J. D. Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium* sp, *Chemosphere* 57: 943–952, 2004.
- [39] Yugui, T., Yaoming, W., Shilei, Y., Lianbin, Y. Optimization of omethoate degradation conditions and kinetics model, *International Biodeterioration & Biodegradation* 62: 239–243, 2008.
- [40] Wang, J.L., Chen, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future, *Biotechnology advances* 27, 195-226, 2009.
- [41] Jones, K.H., Trudgill, P.W., Hopper, D.J. Evidence of two pathways for the metabolism of phenol by *Aspergillus fumigates*, *Archives Microbiology* 163, 176–81, 1995.
- [42] Scriban, R. *Biotechnologie*, TECH et DOC, Paris, 1999.
- [43] Boschloo, J. G., A. Iiaffen, T. Koot, W. J. J. van den Tweel, R. F. M. van Gorcom, J. H. G. Cordewener, C. J. Bos. Genetic analysis of benzoate metabolism in *Aspergillus niger*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 225-228, 1990.

- [44] Sánchez, C., Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi, *Biotechnology Advances*, 2008.
- [45] Acuña-Argüelles. M.E., Olguin-Lora. P., E. Razo-Flores. Toxicity and kinetic parameters of the aerobic biodegradation of the phenol and alkylphenols by a mixed culture, *Biotechnology Letters*, 25, 559–564, 2008.
- [46] Chun, M., Chngchun, S., Yanghao.G., Xian'ai, S. Study on characteristics of biocometabolic removal of omethoate by *aspergillus spp*, *water research* 38:1139-1146, 2004.
- [47] Torra-Renentos, M., Yajima, M. Degradation of the herbicides thiobencarb, butachlor and molinate by newly isolated *asperillus niger*, *journal of pesticide science* 29(3), 214-216, 2004.
- [48] Ravelet, C., Krivobok, S., Sage. L., Steiman. R. Biodegradation of pyrene by sediment fungi, *Chemosphere* 40, 557-563, 2000.
- [49] Reardon, K. F., Mosteller, DC., Rogers, J .B., DuTeau, N. M., Kim, K.H. Biodegradation Kinetics of Aromatic Hydrocarbon Mixtures by Pure and Mixed Bacterial Cultures, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 110, Supplement 6: 1005-1011, 2002.
- [50] Jiang, Y., Wen, J., Bai, J., Jia, X., Hu, Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*, *Journal of Hazardous Materials* 14: 672–676, 2007.
- [51] Coulibaly, L., Gourène, G., Agathos, S. N. Sélection d'un champignon filamenteux pour l'épuration des eaux usées: Le phénol comme inhibiteur modèle de discrimination entre *A.niger* et *A. oryza*, *Sciences & Nature* Vol. 5 N°2 : 111 – 119, 2008.
- [52] Varga, J. M ., Neujahr. H. Y, Isolation from soil of phenol-utilizing organisms and metabolic studies on the pathways of phenol degradation, *Plant and Soil* 33, 565-571, 1970.
- [53] Lemaitre, C., Pébère. N. Biodégradation des matériaux, *EPD sciences*, paris, 1998.
- [54] Niklin, J., Grame-Cook, K., Paget.T., Killington, R. *L'Essentiel en Microbiologie*, BERTI éditions, Paris, 1999.
- [55] Cahier de formation biologie médicale : les moisissures d'intérêt médical, *bioforma* N°2 mars 2002.
- [56] Florent. J. *Microbiologie industrielle*, 112-161, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 1993.
- [57] Botton, B, Bretton, A., Fevre, M., Guy, Ph., Larpent, J.P., Veau, P. *Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle*, 2<sup>e</sup> édition, Masson, Paris, 1990.

- [58] Babich, H., Stotzky, G.A. Microbial assay for determining the influence of physicochemical environmental factors on the toxicity of organics: Phenol, *Archives of Environment, Contamination Toxicology* 14, 409-415, 1985.
- [59] Jiang, Y., Wen, J., Bai, J., Jia, X., Hua, Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Candida tropicalis*, *Biochemical Engineering Journal*, 24, 243-247, 2005.
- [60] Prescott, M., Harley, J., Klein, T. *Microbiologie*, 2<sup>ème</sup> édition, de Boeck, Bruxelles
- [61] Guiraud, J.P., *Microbiologie alimentaire*, 1998, Dunod, Paris, 2003
- [62] Goupy, J. *Plans d'expériences pour surfaces de réponse*, Dunod, Paris, 1999.
- [63] Goupy, J., Creighton, I. *Introduction aux plans d'expériences*, 3<sup>e</sup> édition, Dunod, Paris, 2006.
- [64] Sado, G. *Les plans d'expériences : De l'expérimentation à l'assurance qualité*, AFNOR, 2000.
- [65] Stoilova, I., Krastanov, A., Yanakiev, I. Biodegradation of mixed phenolic compounds by *Aspergillus awamori* NRRL 3112, *International Biodeterioration & Biodegradation* 60, 342-346, 2007.

# Annexe 1

## 1. les réactifs du dosage du phénol :

### Solution tampon pour 1L :

34 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$

200 g tartre double

Bien mélanger dans un peu d'eau distillée jusqu'à ce que les sels fondent puis ajouter 15 ml de  $\text{NH}_3$  pour avoir un  $\text{pH} = 9.5$  et ajuster au trait de jauge

### solution de 4-amino-antipyrine

20 g / l 4-amino-antipyrine (ALDRICH)

la solution de 4-amino-antipyrine est mise dans un flacon teinté.

### solution de Ferricyanure de potassium

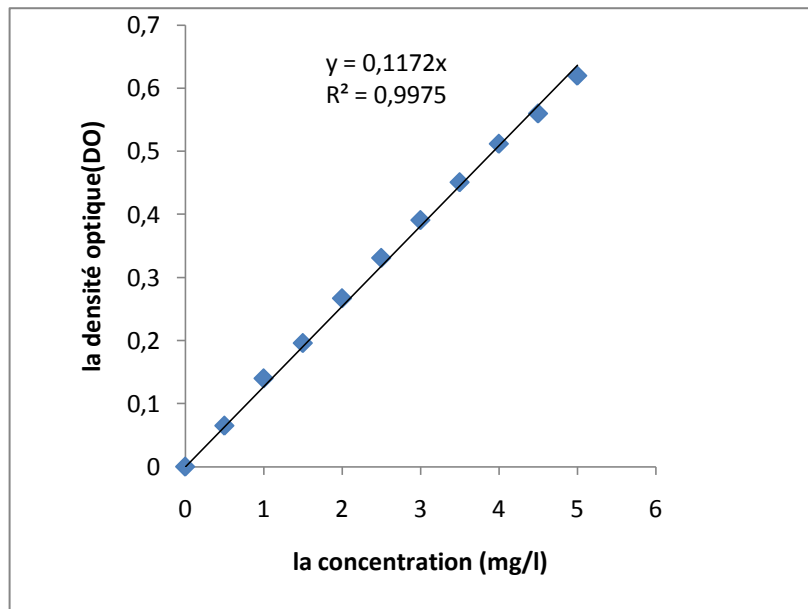
20 g/l Ferricyanure de potassium (PROLABO)

### La Courbe d'étalonnage du phénol

On dispose d'une solution étalon de phénol à 1 g.L<sup>-1</sup>. Diluer 200 fois cette solution , soit 5 mL

dans une fiole jaugée de 1000 mL.

- diluer 100 fois cette solution, soit 1.0 mL en fiole jaugée de 100 mL;
- compléter à 100 mL avec de l'eau distillée;
- placer en bécher et ajouter 5 mL de tampon  $\text{pH} = 9.5$ ;
- ajouter 1.0 mL de la solution de 4-amino antipyrine, agiter immédiatement;
- ajouter 2.0 mL de solution de ferricyanure de potassium, agiter ;
- laisser la coloration se développer à température ambiante pendant 5 min, lire la densité optique à 510 nm.



**Figure 1 :** Droite d'étalonnage : Absorbance = f (concentrations du phénol)

$$C = DO \cdot 100 / \text{Pente de la courbe d'étalonnage}$$

## Annexe 2

### La composition de milieu de culture YMA :

Tableau .1 : La composition de milieu de culture YMA [19]

composé	Quantité (g/l)
Extrait de levure	3
Extrait de malt	3
Peptone de viande	5
Glucose	10
Agar-agar	20

### La composition du *Milieu minéral Czapek Dox*

Le pH initial de milieu est ajusté à 5,5 avec NaOH et/ou HCL. La solution est autoclavée et après stérilisation on ajoute 5 mL des solutions stériles\* suivantes :

*FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O* : 0.01g

*Phénol* : 100 mg/l

\*stérilisé par filtration à l'aide d'un filtre stérile 0,2µm

Tableau .2 : La composition du *Milieu minéral Czapek Dox*

composé	Quantité (g/l)
<i>NaNO<sub>3</sub></i>	2
<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	1
<i>MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</i>	0.5
<i>KCl</i>	0.5

## **Annexe3**

**Tableau .3 : matériels utilisés**

<b>Matériel</b>	<b>Marque</b>
<b>Etuve</b>	MEMMERT UE -400
<b>Autoclave</b>	WEBECO-GMPH BAD SCHWARTAU
<b>Spectromètre UV/Visible</b>	SHIMADZU UV MINI-1240
<b>pH mètre</b>	HANNE INSTRUMENTS 211
<b>Plaque chauffante muni d'un système d'agitation</b>	
<b>Balance de précision</b>	KERN ALS 120-4N
<b>Incubateur menu d'agitation orbitale</b>	Heidolph uimax1010
<b>respiromètre OxiTop® Control</b>	WTW

## Annexe4

Table de student

$\alpha=1-P$	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



