

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Ecole Nationale Polytechnique

**Département de Génie De l'Environnement
Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement**

MÉMOIRE DE MAGISTER

Présenté par :

ALI OUMESSAAD

**Ingénieur d'Etat en Technologie de Transformation
des Céréales de l'université de BOUMERDES**

**Pour l'obtention du titre
de Magister en Génie de l'Environnement**

Option : Génie de l'Environnement



Soutenu le 13/ 09/ 2005 devant le jury suivant :

Présidente :	M ^{me} N. BELHANECHÉ	Professeur	ENP
Codirectrice :	M ^{me} A. HELLAL	Professeur	ENP
Directeur :	Mr A. NAMANE	Chargé de cours	ENP
Examinatrices :	M ^{me} F. BENTAHAR	Professeur	USTHB
	M ^{elle} J. ARRAR	Chargée de cours	ENP
	M ^{me} F. ZERROUK	Chargée de cours	INA

ENP, Avenue Hassan Badi, El-Harrach, Alger

Dédicaces

A mes parents qui n'ont épargné aucun effort pour m'instruire.

A la mémoire de ma chère sœur Nassima.

A mes frères.

A mon adorable sœur Malek.

A tous mes ami(e) s, spécialement ceux du laboratoire.

A ma famille.

A tous ceux qui me sont chers.

Qumessaad

Remerciements

Louanges à Allah tout puissant pour m'avoir accordé le courage, la force et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Le présent travail a été réalisé au laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique sous la direction de madame A. HELLAL et monsieur A. NAMANE.

Mes vifs remerciements leur sont adressés pour la bienveillance et la patience avec lesquelles ils m'ont suivie et pour les conseils si précieux et si constructifs qui m'ont orientée dans mon travail.

J'adresse également tous mes remerciements à madame le professeur N. BELHANECHÉ de l'Ecole Nationale Polytechnique pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance. Je présente l'expression de ma reconnaissance et mes remerciements à :

Madame F. BENTAHAR, professeur à l'université des sciences et de la Technologie Houari Boumediene, mademoiselle J. ARRAR chargée de cours à l'ENP, ainsi que madame F. ZERROUK chargée de cours à l'Institut National d'Agronomie, pour avoir eu l'aimable gentillesse de juger mon travail.

Je tiens à remercier infiniment mon frère ABDELGHANI pour tous ce qu'il a fait pour la réalisation de ce mémoire ainsi que A. TASSISTE, L. HADERBECHE.

Ma gratitude s'adresse à monsieur T. BENCHAMA, chargé de cours à l'université de Boumerdes, pour l'aide inestimable qu'il m'a apportée au cours de la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement tous les enseignants du département, le technicien monsieur MAHFOUD et la secrétaire HAMIDA, sans oublier le personnel de la bibliothèque, ainsi que les techniciens des laboratoires de l'université de Boumerdes. Je remercie mes chères amies et collègues du laboratoire pour leur soutien moral et leur aide.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire

Merci

Liste des Abréviations et des sigles

- α : Coefficient de proportionnalité.
- μ : taux de croissance (h^{-1}).
- μ_{max} : Taux maximal de croissance de la biomasse (h^{-1}).
- A** : Facteur préexponentiel (facteur de d' Arrhenius) « Stossfaktor » (h^{-1}).
- B ou X**: Quantité de biomasse (mg/l).
- BTEX**: benzene, toluene, ethylbenzene, et xylene.
- CAS** : chemical abstracts service.
- d** : longueur du trajet optique (cm).
- D** : République fédérale d'Allemagne
- DBO₅** : Demande biologique en oxygène (mg/l).
- E_a** : Energie d'activation ($Kj.mol^{-1}$).
- EINECS** : Européen Inventory of existing commercial chemical substances.
- I₀** : intensité lumineuse du rayon incident (A).
- I₁** : intensité du rayon transmis en l'absence de biomasse (A).
- I₂** : intensité du rayon transmis en présence de biomasse (A).
- K** : Constante de dégradation (h^{-1}).
- K_i** : Constante d'inhibition (mg/l).
- K_m** : Constante de saturation ou Michaelis (mg/l).
- K_S** : Constante de saturation (mg/l).
- lpm** : litre par minute
- ms** : matière sèche
- ppt** : parties par trillion (volume).
- ps** : pré culture de *Pseudomonas aeruginosa*
- R** : Constante des gaz parfaits ($8,314 J.K^{-1}.mol^{-1}$).
- S** : Concentration en substrat (mg/l).
- t** : durée de dégradation (h).
- T** : Température absolue (k).
- TCDD** : 2, 3, 7,8 tetrachlorodibenzodioxine.
- tg** : temps de génération(h).
- V_{max}**: Vitesse maximale de la réaction ($mg.l^{-1}.h^{-1}$).
- WGK** : Catégorie de risque de pollution de l'eau.
- Y_{X/S} ou q** : Coefficient de conversion du substrat (mg/mg) ou (g/g)

Liste des tableaux

Tableaux	Page
Tableau I- 1 : Les caractéristiques du phénol	6
Tableau I-2 : Classification WGK des substances toxiques dans l'eau	7
Tableau I-3 : Paramètres Physico-Chimiques du phénol comme polluant	8
Tableau I-4 : Valeurs comparatives de référence	10
Tableau I-5 : Classement de toxicité	11
Tableau I- 6 : Toxicité du phénol	13
Tableau III-1 : Classification des microorganismes en fonction de leur température de développement	31
Tableau III-2 : Les valeurs de taux de croissance (μ) pendant les différentes phases de la croissance bactérienne	35
Tableau III-3 : les constantes bio cinétique de la biodégradation du phénol (comparaison entre le modèle de Monod et le modèle de Haldane)	38
Tableau III-4 : Valeurs de paramètre de modèle de biodégradation aérobie de phénol par les cultures pures	38
Tableau III-5 : Récapitulatif des différents modèles de cinétique de biodégradation en fonction de concentration en substrat S et de la densité de la population microbienne	44

Liste des figures

Figures	Page
Figure I-1: Les différentes techniques de traitement des eaux résiduaires phénoliques	15
Figure II-1: Mécanismes réactionnels de la métabolisation aérobie de la pollution carbonée	19
Figure II-2: Les voies du catabolisme du phénol, toluène et benzène par <i>Pseudomonas putida F1</i>	20
Figure II-3 : Les voies aérobie de la biodégradation du toluène	21
Figure II-4 : Hydroxylation du monoaromatique	21
Figure II-5 : Schéma général de la dégradation du noyau mono-aromatique	22
Figure II- 6 : Les voies métaboliques du phénol	24-25
Figure : III-1: profil d'une <i>Pseudomonas</i> Bacille, Gram ⁻ , mobiles par flagelles polaires	27
Figure III-2 : Coloration de gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> observée sous microscope photonique « GX100 »	29
Figure III-3 : Colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur agar	29
Figure III-4 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> observée sous microscope électronique CDC. GX15000	29
Figure III- 5 : Croissance typique d'une bactérie en milieu liquide Les six phases de la cinétique de croissance d'une population bactérienne	32
Figure III-6 : La représentation de Monod qui permet la détermination du μ_{max} , K_S	39
Figure III-7 : la représentation de Haldane qui permet la détermination du K_i	40

Sommaire

Dédicaces.....	i
Remerciements.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Liste des figures.....	iv
Liste des tableaux.....	v

Introduction Générale.....	Erreur ! Signet non défini.
----------------------------	-----------------------------

Chapitre I : Revue bibliographique sur le phénol

I-1 Historique et Définition.....	Erreur ! Signet non défini.
I-2 Utilisations et production.....	Erreur ! Signet non défini.
I-3 Principales sources de pollution	Erreur ! Signet non défini.
I-4 Identification et Caractérisation du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
I-5 Paramètres d'évaluation de la pollution par phénol	Erreur ! Signet non défini.
I-5-1 Paramètres physico-chimiques	Erreur ! Signet non défini.
I-5-2 Comportement du phénol dans l'environnement	Erreur ! Signet non défini.
I-5-2-1 Milieu aquatiques et solides.....	Erreur ! Signet non défini.
I-5-2-2 Sols.....	Erreur ! Signet non défini.
I-5-2-3 Atmosphère	Erreur ! Signet non défini.
I-5-2-4 Biodégradation du phénol	Erreur ! Signet non défini.
I-5-3 Valeurs limites de la pollution par phénol	Erreur ! Signet non défini.
I-6 Pathologie et toxicologie	Erreur ! Signet non défini.
I-6-1 Devenir dans l'organisme humain.....	Erreur ! Signet non défini.
I-6-2 Intoxication Aigue	Erreur ! Signet non défini.
I-6-2-1 Action sur la peau et les muqueuses	Erreur ! Signet non défini.
I-6-2 -2 Action par ingestion.....	Erreur ! Signet non défini.
I-6-2 -3 Action Par Inhalation	Erreur ! Signet non défini.
I-6-3 Intoxications chroniques	Erreur ! Signet non défini.
I-7 Les procédés de traitement des rejets phénoliques	Erreur ! Signet non défini.

Chapitre II : Biodégradation du phénol

II-1- Définitions.....	Erreur ! Signet non défini.
II-2 Le principe de biodégradation.....	Erreur ! Signet non défini.
II-3 Biodégradation des hydrocarbures mono aromatique	Erreur ! Signet non défini.
II-3-1 En aérobiose	Erreur ! Signet non défini.
II-3-2 En anaérobiose	Erreur ! Signet non défini.
II-4 La biodégradation du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
II-4-1 En aérobiose	Erreur ! Signet non défini.
II-4-2 En anaérobiose	Erreur ! Signet non défini.

Chapitre III : Cinétique bactérienne

III-1 Généralités sur le genre <i>Pseudomonas</i>	Erreur ! Signet non défini.
III-2 Métabolisme des <i>Pseudomonas</i>	Erreur ! Signet non défini.
III-3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Erreur ! Signet non défini.
III-3-1 Nom scientifique.....	Erreur ! Signet non défini.
III-3-2 Nom commun	Erreur ! Signet non défini.
III-3-3 Caractéristiques	Erreur ! Signet non défini.
III-3-3-1 Morphologie	Erreur ! Signet non défini.
III-3-3-2 Culture	Erreur ! Signet non défini.
III-3-3-3 Température de croissance	Erreur ! Signet non défini.
III-3-3-4 Autres Caractéristiques	Erreur ! Signet non défini.
III-3-3-5 Habitat	Erreur ! Signet non défini.
III-4 La nutrition bactérienne	Erreur ! Signet non défini.
III-5 Conditions physico-chimiques de croissance	Erreur ! Signet non défini.
III-5-1 Température	Erreur ! Signet non défini.
III-5-2 pH	Erreur ! Signet non défini.
III-5-3 Pression osmotique	Erreur ! Signet non défini.
III-5-4 Aération et agitation	Erreur ! Signet non défini.
III-5-4-1 Aération.....	Erreur ! Signet non défini.
III-5-4-2 agitation.....	Erreur ! Signet non défini.
III-5-5 concentration des composés nécessaires à la croissance	Erreur ! Signet non défini.

III-5-6 Substances antibactériennes contenues dans le milieu....	Erreur ! Signet non défini.
III-6 Croissance des bactéries	Erreur ! Signet non défini.
III-6-1 Phase de latence	Erreur ! Signet non défini.
III-6-2 Phase d'accélération.....	Erreur ! Signet non défini.
III-6-3 La phase exponentielle ou logarithmique	Erreur ! Signet non défini.
III-6-4 Phase de ralentissement.....	Erreur ! Signet non défini.
III-6-5 Phase stationnaire	Erreur ! Signet non défini.
III-6-6 Phase de décroissance exponentielle ou déclin	Erreur ! Signet non défini.
III-7 Les paramètres de croissances	Erreur ! Signet non défini.
III-7-1 Le taux de croissance pendant la phase exponentielle ...	Erreur ! Signet non défini.
III-7-2 Temps de génération.....	Erreur ! Signet non défini.
III-7-3 Coefficient de conversion du substrat	Erreur ! Signet non défini.
III-8 Modélisation de la courbe de croissance	Erreur ! Signet non défini.
III-8 -1 Modèle de Monod.....	Erreur ! Signet non défini.
III-8-2 Modèle de Haldane	Erreur ! Signet non défini.
III-8-3 Détermination les constantes biocinétiques.....	Erreur ! Signet non défini.
III-8-3-1 Détermination de K_s et μ_{max}	Erreur ! Signet non défini.
III-8-3-2 Détermination de K_i	Erreur ! Signet non défini.
III-8-3-3 Le taux de biodégradation.....	Erreur ! Signet non défini.
a) Cinétique d'ordre 1	Erreur ! Signet non défini.
b) Cinétique de Michaelis & Menten	Erreur ! Signet non défini.
c) Modèle de Monod	Erreur ! Signet non défini.
d) Choix du modèle pertinent.....	Erreur ! Signet non défini.

Chapitre IV : Matériels & Méthodes

IV -1 Matériels	Erreur ! Signet non défini.
IV -1-1 Matériel biologique	Erreur ! Signet non défini.
IV-1-2 Milieu de culture	Erreur ! Signet non défini.
IV-1-3 Produits.....	Erreur ! Signet non défini.
a) Les Réactifs de dosage du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
b) Appareils utilisés.....	Erreur ! Signet non défini.

IV-2 Méthodes.....	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-1 Protocole expérimental.....	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-2 Conservation de la souche	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-3 Coloration de Gram.....	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-4 Mesure de la biomasse microbienne	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-4-1 Etalonnage.....	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-4-2 La technique	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-5 Dosage du Phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-5-1 Principe	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-5-2 Etalonnage.....	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-5-3 Dosage du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-6 Filtre stérilisant	Erreur ! Signet non défini.
IV-2-7 Dispositif expérimental	Erreur ! Signet non défini.

Chapitre V : Résultats et discussions

V-1 Observation de la souche	Erreur ! Signet non défini.
V-2 Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en fermenteur	Erreur ! Signet non défini.
V -2-1 Influence du milieu sur la dégradation du phénol	Erreur ! Signet non défini.
V-2-1-1 Milieu M ₁	Erreur ! Signet non défini.
V-2-1-2 Milieu M ₂	Erreur ! Signet non défini.
V -2-1-3 Milieu M ₃	Erreur ! Signet non défini.
V -2-1-4 Milieu M ₄	Erreur ! Signet non défini.
V -2-1-5 Milieu M ₅	Erreur ! Signet non défini.
V -2-1-6 Les Paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
V-2-2 Effet de l'agitation	Erreur ! Signet non défini.
V -2-3 Influence de l'aération sur la dégradation du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
V -2-3-1 Les Paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
V -2-4 Influence de la température sur la dégradation du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.

V -2-4-1	Température 30 °C	Erreur ! Signet non défini.
V -2-4-2	Température 37 °C	Erreur ! Signet non défini.
V -2-4-3	Température 40 °C	Erreur ! Signet non défini.
V -2-4-4	Température 45 °C	Erreur ! Signet non défini.
V -2-4-5	Température 50 °C	Erreur ! Signet non défini.
V -2-4-6	Les paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
V -2-4-7	Détermination de l'énergie d'activation.....	Erreur ! Signet non défini.
V -2-5	l'influence de la concentration initiale du phénol sur la dégradation du phénol	Erreur ! Signet non défini.
V -2-5-1	Concentration de phénol 0 mg/l	Erreur ! Signet non défini.
V -2-5-2	Concentration de phénol 100 mg/l	Erreur ! Signet non défini.
V -2-5-3	Concentration de phénol 200 mg/l	Erreur ! Signet non défini.
V -2-5-4	Concentration de phénol 300mg/l	Erreur ! Signet non défini.
V -2-5-5	Concentration de phénol 400mg/l	Erreur ! Signet non défini.
V -2-5-6	Concentration de phénol 500mg/l	Erreur ! Signet non défini.
V -2-5-7	Concentration de phénol 600mg/l	Erreur ! Signet non défini.
V -2-5-8	Concentration de phénol 800mg/l	Erreur ! Signet non défini.
V-2-5-9	Les Paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol.....	Erreur ! Signet non défini.
V -2-6	Calcul de constantes cinétiques	Erreur ! Signet non défini.
V -2-6-1	K_S et μ_{max}	Erreur ! Signet non défini.
V -2-6-2	Le taux de dégradation du phénol K	Erreur ! Signet non défini.
V -2-6-3	μ_{max} et K_i	Erreur ! Signet non défini.
Conclusion.....		Erreur ! Signet non défini.

Références bibliographiques

Annexe

Introduction Générale

Introduction Générale

Les interactions entre l'Homme et son environnement sont nombreuses et variées. Les facteurs présents dans l'environnement sont physiques, chimiques et biologiques et leurs effets peuvent être amplifiés ou réduits par l'intervention humaine.

L'usage irrationnel et abusif des ressources en eau et la production croissante de déchets exercent sur l'environnement une pression insoutenable. De plus, la croissance démographique, le développement industriel, l'élévation du niveau de vie font que les besoins en eaux s'accroissent de même que les volumes d'eaux usées, les réserves n'étant pas éternelles. La demande de plus en plus importante, est incapable d'être satisfaite d'où le recours à des traitements pour palier aux déficits.

Le premier principe de la déclaration de Rio est « les êtres humains au centre des préoccupations relatives au développement durable. Ils ont droit à une vie saine et productive en harmonie avec la nature » [1].

Notre responsabilité commune est de préserver la santé et de léguer à nos enfants un monde dont les ressources et les écosystèmes soient intacts. C'est dans cet ordre d'idées que notre travail est orienté vers la problématique du traitement des eaux contaminées par les hydrocarbures, spécialement le phénol.

Pour cela et pour éviter les effets toxiques des substances phénoliques rejetées dans l'eau sur l'environnement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) donne comme concentration maximale souhaitable des composées phénoliques dans les eaux de boissons $1\mu\text{g/l}$ [2] ainsi qu'il convient de procéder à un traitement approprié de ces substances avant leur rejet dans le milieu naturel.

La pollution des eaux par les composés phénoliques, qu'elle soit chronique ou accidentelle, pose un grand problème de point de vue dégradation. Alors l'élimination du phénol, cette substance toxique, fait appel à différents traitements chimiques et physiques qui

sont limités par leur coût ou leurs impacts secondaires sur l'environnement, et souvent ces voies de dégradation ne font que transférer la pollution d'un milieu à un autre en la concentrant, ce qui nous incite à utiliser les traitements biologiques qui prennent de plus en plus de place surtout qu'ils ne sont pas coûteux, et ils permettent une minéralisation totale des composés phénoliques [3,4].

La dégradation du phénol par les cultures pures et mixtes a été un sujet de beaucoup d'études [5-17].

Un certain nombre de micro-organismes, notamment les *Pseudomonas* (*P.aeruginosa*, *P.putida*) sont capables de croître en utilisant le phénol comme source de carbone et d'énergie [18-22].

Le présent travail porte sur la détermination de l'aptitude d'un micro-organisme appartenant à la famille des pseudomonocae (*Pseudomonas aeruginosa*) à dégrader le phénol en optimisant les conditions opératoires de dégradation en batch.

Différents milieux de cultures seront testés, le milieu adéquat sera déterminé, en variant les paramètres physiques de fonctionnement (température, aération, concentration du substrat). Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire des Sciences Techniques de l'environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique (ENP).

Ce mémoire comporte cinq chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une revue bibliographique sur le phénol.
- Le deuxième chapitre traite des mécanismes de la biodégradation du phénol.
- Le troisième chapitre quant à lui traite de la cinétique bactérienne.
- La méthodologie expérimentale, les résultats expérimentaux, les différents calculs, les discussions et interprétations sont traités dans les chapitres IV et V.

Chapitre I
Revue Bibliographique
Sur le Phénol

I

Généralités

I-1 Historique et Définition :

Dès le début du XIX^e siècle, les chimistes avaient réussi à isoler des huiles moyennes du goudron de houille, d'où un composé bouillant à 175°C et cristallisant par refroidissement pour fondre de nouveau aux environs de 40° C. En raison de la nature du procédé d'extraction, on considérait ce composé comme un acide carboxylique, puis un acide phénique.

Lorsqu'il fut établi qu'il ne se comportait pas comme la plupart des acides organiques connus alors et n'ayant pas un groupe acide carboxylique dans sa structure, Gerhardt proposa de l'appeler « **phénol** », nom qui a peu à peu détrôné celui d'acide phénique encore partiellement en usage en 1930[23-26].

Le phénol est le plus simple des dérivés hydroxylés d'un noyau benzénoïde. D'autres phénols sont présents dans les huiles essentielles, par exemple, le thymol de l'essence de thym, la vanilline des gousses de vanille, l'eugénol des clous de girofle, et l'acide gallique de la noix de galle [23, 24].

I-2 Utilisations et production :

Environ deux millions de tonnes de phénol sont utilisées dans la Communauté européenne annuellement. Le phénol est principalement utilisé en synthèse organique [27-31].

Il constitue la matière première pour la production de bisphénol A (2,2-bis-1 hydroxyphénylpropane) utilisé dans la fabrication des résines phénoliques, de caprolactame utilisé dans la fabrication du nylon, d'alkylphénols, d'acide salicylique, de diphenyl-ether, de chlorophénols et d'autres substances chimiques telles que l'acide adipique, la phénolphtaléine et l'acide picrique. Il est également utilisé pour la désinfection, dans la fabrication de dissolvants pour peintures et vernis, dans la fabrication de laques, de peintures, de caoutchoucs, d'adhésifs, de durcisseurs, de matériaux isolants et dans l'industrie pharmaceutique [27-31].

La capacité mondiale de production était voisine de 8 000 Kt/an en 2000, dont environ 3 500 Kt/an en Europe, 3 000 Kt/an en Amérique du Nord et 1 500 Kt/an en Asie. Durant la période 1995-2000, les prix du phénol ont fluctué entre 380 et 990 Euros la tonne [32].

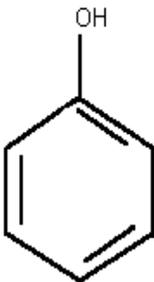
I-3 Principales sources de pollution :

La présence de phénol dans l'environnement provient des eaux résiduares et des flux d'air rejetés lors de la production, de la transformation ou de l'utilisation du phénol. Les échappements des moteurs thermiques, la dégradation photochimique du benzène, la décomposition de déchets organiques divers, le métabolisme humain et animal sont également responsables de la présence de phénol dans l'environnement. Il en est de même des usines de Torréfaction et de carbonisation à basse température, de la combustion du bois et du tabac [29].

I-4 Identification et Caractérisation du phénol :

Le tableau I-1 regroupe quelques caractéristiques du phénol ainsi que la structure chimique de la molécule.

Tableau I- 1 : Les caractéristiques du phénol [26, 29, 30]

Structure chimique	Caractéristiques	
	Numéro EINECS* :	203-632-7
	Numéro du CAS** :	108-95-2
	Nom dans le registre :	Phénol
	Nom de la substance :	Phénol
	Formule chimique	C ₆ H ₆ O
	Synonymes, noms commerciaux :	Acide carbolique, benzophénol, acide phénique, benzéno, phénol ordinaire
	Description générale:	Substance incolore/rosée ou fusion incolore; odeur particulière à la fois âcre et douceâtre, caustique au toucher.

* EINECS : Européen Inventory of existing commercial chemical substances.

** CAS : chemical abstracts service.

I-5 Paramètres d'évaluation de la pollution par le phénol :

I-5-1 Paramètres physico-chimiques :

La pollution engendrée par le phénol est évaluée par les paramètres de pollution régis par des normes de rejets définis par les législations de différents pays concernant la pollution de l'eau de l'air et du sol.

Les différentes propriétés physico-chimiques sont résumées dans le tableau I-3.

I-5-2 Comportement du phénol dans l'environnement :

I-5-2-1 Milieux aquatiques et solides :

Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer. Il se dissout lentement et, même dilué, continue de former des solutions toxiques. En raison de sa forte toxicité dans l'eau, le phénol figure dans la catégorie 2 de risque WGK (Catégorie de risque de pollution de l'eau) en Allemagne comme le montre le tableau I-2 [30].

Tableau I-2 : Classification WGK des substances toxiques dans l'eau [33].

Classe	Potentiel De Risque
0	Non polluant
1	Légèrement polluant pour l'eau
2	polluant pour l'eau
3	Extrêmement polluant pour l'eau

Signalons aussi qu'au dessus de 68,4°C, le phénol est complètement miscible à l'eau [29].

Tableau I-3 : Paramètres Physico-chimiques du phénol comme polluant

Paramètres	Valeur	Etendue	Référence
Facteur de conversion (dans l'air à 20 °C)	1 ppm = 3,91 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0,26 ppm		[29,30]
Seuil olfactif (ppm) dans l'air	(1)	0,006-7,9	[29,30]
Masse molaire (g/mol)	94,11 ⁽²⁾	94,11-94,144	[28-31]
Masse volumique à 20°C (g/cm ³)	1,072		[30,31]
Point d'ébullition (°C) (à pression normale)	181,8 ⁽²⁾	181,75-182	[28-31]
Point de fusion (°C)	40,8		[30, 31, 28]
Indice de réfraction (à 45 °C)	1,540.	1,540-2.	[31]
Pression de vapeur (Pa) (à 20°C)	28,7 ⁽³⁾	20-47,6	[29]
Solubilité dans l'eau (mg/l)	83500 à 20°C ⁽⁴⁾ 85700 à 25°C ⁽⁴⁾	82000-84000 70000-93000	[29,30]
Constante de Henry (Pa.m ³ /mol)	4,56.10 ⁻² à 20 °C 4,02.10 ⁻² à 25 °C		[29]
Coefficient de diffusion Dans l'air (cm ² /s)	8,2.10 ⁻²		[29]
Coefficient de diffusion dans l'eau (cm ² /s)	8,8.10 ⁻⁶ ⁽⁵⁾	8,5.10 ⁻⁶ -9,1.10 ⁻⁶	[29]
Coefficient de diffusion à travers le PEHD (m/j)	8,5.10 ⁻¹⁰		[29]
Perméabilité cutanée depuis l'eau (cm/h)	8,2.10 ⁻³ ⁽⁶⁾		[29]

(1) La dispersion des données ne permet pas une évaluation convenable du seuil olfactif.

(2) Valeur la plus fréquemment citée.

(3) Moyenne arithmétique de plusieurs valeurs.

(4) Les données disponibles n'établissent pas de nette discrimination entre les valeurs des densités à 20°C et à 25 °C.

(5) Moyenne arithmétique des deux seules valeurs disponibles.

(6) Déterminé expérimentalement in vitro sur peau humaine.

I-5-2-2 Sols :

Dans le sol, le phénol subit une dégradation microbienne aérobie ou anaérobie, de sorte que l'effet d'accumulation reste limité. L'accumulation est fonction de la présence de minéraux argileux (forte affinité avec l'oxyde d'aluminium) [30,34].

I-5-2-3 Atmosphère :

Dans l'atmosphère, le phénol réagit avec les radicaux hydroxyles formés photo - chimiquement. Un temps de demi-vie de 14 heures pour la dégradation photochimique dans l'atmosphère est mentionné sur la base d'une concentration atmosphérique en radicaux OH égale à 5×10^5 molécules/cm³ [29,30].

La dégradation par les radicaux NO₃ peut aussi jouer un rôle important dans l'atmosphère. Un temps de demi-vie approximativement égal à 44 minutes peut être calculé pour le phénol [29,30].

I-5-2-4 Biodégradation du phénol

La biodégradation des phénols naturels est en général très bonne, de sorte qu'une accumulation dans la flore ou la faune est peu probable. La dégradation par des bactéries est intégrale jusqu'à formation de dioxyde de carbone (gaz carbonique). Dans le sol, une condensation avec formation d'acide humique peut se produire. En revanche, la dégradabilité des phénols synthétiques est plus faible, car nombre d'entre eux ont une action bactéricide. Plus les phénols contiennent d'atomes de chlore ou d'azote, plus leur toxicité est forte, Ainsi, le « pentachlorophénol » est le plus toxique des chlorophénols, et le trinitrophénol (acide picrique) le plus toxique des nitrophénols [30].

La biodégradabilité du phénol en eaux souterraines et de surface a été examinée par Vaishnav et Babeu en 1987. Les concentrations en phénol étaient de 0,8, 1,6 et 3,2 mg/l. La biodégradation était de 60% (eaux de rivière), 45%(eaux souterraines) après 20 jours et 88% (eaux portuaires) après 15 jours [29].

Les métabolites des phénols peuvent également être très toxiques ; la combustion incomplète de 2,4,5-trichlorophénol peut donner naissance à la dioxine TCDD (2,3,7,8 tetrachlorodibenzodioxine). En règle générale, la dégradation biologique entraîne d'abord la formation de pyrocatechine, de o-quinone et d'acide dicarboxylique, puis d'acide acétique et de CO₂.

Dans l'organisme humain, le phénol est éliminé par voie urinaire après oxydation ou liaison conjuguée avec l'acide urique ou l'acide gluconique [30].

I-5-3 Valeurs limites de la pollution par le phénol :

Le tableau ci-dessous donne les valeurs limites de pollution au phénol dans différents pays, ainsi que dans divers milieux.

Tableau I-4 : Valeurs comparatives de référence

Milieu/origine	Pays	Valeur	Source
Eau:			
Station épuration (amenée/déchargée)	D*, USA	2-20 ppb	(2)
Eau de rivière	USA	10-100 ppb	(2)
Eaux superficielles (1977)	Japon	< 10 ppb	(2)
Danube (1972)	D*	0,01-1 ppb	(2)
Eaux souterraines et eaux de surface (rivières, mers) (2000)	régions européennes	<1 µg/l	(3)
Eaux de pluie (2001)	France, Allemagne	<5 µg/l	(4)
Eau potable	D*	6-20 ppt**	(2)
Sols/sédiments :			
Sédiments (1977)	Japon	30-40 ppb	(2)
Atmosphère :			
Concentration à l'air libre	D*	12 µg/m ³	(1)
Milieu urbain (1979)	Japon	0,5-1,0 ppb	(2)
Milieu urbain (1973)	USA	15-91 ppt	(2)
Paris (1977)	France	0,17-2,1 ppb (2h)	(2)
Gaz d'échappement		1,3-1,5 ppm	(2)
Fumée de tabac		300-500 ppm	(2)
Homme :			
Excrétions, urine		0,02-6,6 mg/kg/j	(2)

(1) : HORN, K. et al. (1989) : Grundlagen der Lufthygiene. Berlin.

(2) : RIPPEN, G. (1989) : Handbuch der Umwelt-Chemikalien. 4^e fascicule supplémentaire, 11/89. Landsberg/Lech.

(3) : *Evaluation basée sur des données fournies* par ATSDR (1989), Commission Européenne (2000) et IUCLID (2000).

(4) : *Evaluation basée sur des données HSDB (2001) concernant des régions européennes (France, Allemagne).*

D* : République fédérale d'Allemagne, ppt** : parties par trillion (volume).

I-6 Pathologie et toxicologie :

Le phénol est un produit caustique dangereux, il peut pénétrer dans l'organisme par voie cutanée, par inhalation ou accidentellement par ingestion, il exerce à la fois une action locale sur la peau et les muqueuses et une action générale sur l'organisme [28].

I-6-1 Devenir dans l'organisme humain

Le phénol est rapidement absorbé par toutes les voies d'exposition. L'absorption est estimée de 70 à 80 % en 6 heures, pour une exposition à des vapeurs de phénol à des concentrations comprises entre 6 et 20 mg/m³, pratiquée uniquement par voie cutanée chez des volontaires sains. Le phénol est ensuite rapidement distribué dans tous les tissus, Les organes cibles sont le cerveau et les reins. Le foie, les poumons et les muqueuses gastro-intestinales sont les principaux sites de métabolisation du phénol. Ceux-ci dépendent de la voie d'exposition. Le phénol est essentiellement conjugué avec l'acide glucuronique et l'acide sulfurique. Seule une petite fraction est transformée en catéchol ou en hydroquinone. Le phénol est essentiellement éliminé par voie urinaire [28,29].

I-6-2 Intoxication Aigue :

La toxicité aiguë est expérimentée sur des animaux (en général les rats) et se mesure par la DL (dose létale) ; elle s'exprime en mg ingéré par kg de poids de l'animal. La DL est la quantité ingérée qui provoque la mort [35].

Le tableau suivant nous donne le classement de toxicité d'une façon générale, selon la valeur de la DL.

Tableau I-5 : Classement de toxicité [35]

DL (mg/kg)	Classement
< 25	très toxique
25 à 200	Toxique
200 à 2 000	substances dangereuses
> 2 000	non toxique

I-6-2-1 Action sur la peau et les muqueuses :

Le phénol provoque des lésions locales dont la gravité est fonction, soit du temps de contact, soit s'il s'agit de solutions des concentrations utilisées. Elles peuvent aller du simple érythème à la gangrène phéniquée ; on observe parfois de la mélanodermie (ochronox).

I-6-2 -2 Action par ingestion :

Cas peu fréquent et surtout accidentels. Ils sont caractérisés par une sensation immédiate de brûlures digestives suivie de vomissements ; les signes nerveux apparaissent ensuite. La mort peut survenir dans un laps de temps généralement assez court, par syncope respiratoire, Par exemple :

L'ingestion de 4,8 g de phénol entraîne le décès en 10 minutes [28,29].

I-6-2 -3 Action Par Inhalation :

L'atteinte respiratoire se traduit par des signes d'irritation avec toux et dyspnée (insuffisance respiratoire). Au cours des ces intoxications aiguës, une atteinte rénale transitoire est possible [28, 29].

I-6-3 Intoxications chroniques :

L'absorption de phénol par petites doses de façon répétée est susceptible de provoquer des troubles digestifs, de l'irritation des voies respiratoires et des troubles nerveux (vertiges). Ces symptômes sont connus sous le nom de marasme phénique. Ils peuvent s'accompagner de troubles cutanés (érythèmes, eczémas) [28, 30].

Une étude de mortalité par *pathologie cardio-vasculaire* a été menée sur une population de 1282 salariés dans l'industrie du caoutchouc et du pneu. Les salariés sont exposés à 25 solvants différents. Le suivi a été réalisé sur une période de 15 ans. Un lien entre la mortalité par maladie cardio-vasculaire et l'exposition au phénol a pu être établi. Cependant cette étude n'a pas pris en compte les habitudes tabagiques, les cas d'hypertension artérielle et d'hypercholestérolémie [28, 29].

Chez la souris l'exposition par inhalation à des vapeurs de phénol à la concentration de 5 ppm (19 mg/m³) 8 heures par jour, 5 jours par semaine, pendant 90 jours induit une augmentation du stress mais pas d'altération des autres paramètres examinés (hématologiques, analyse urinaire, chimie du sang, fonction rénale, poids corporel et examen pathologique) [29].

Le tableau ci-dessous donne quelques indications concernant d'autres animaux.

Tableau I- 6 : Toxicité du phénol [8]

Homme :	1 g peut être mortel
Mammifères :	
Rat	DL ₅₀ 414-530 mg/kg, voie. Orale
	DL ₅₀ 670 mg/kg, voie dermale
Lapin	DL ₅₀ 400-600 mg/kg, voie. Orale
	DL ₅₀ 850 mg/kg, voie. Dermale
Chat	DL ₅₀ 100 mg/kg, voie. Orale
Chien	DL ₅₀ 500 mg/kg, voie. Orale
Organismes aquatiques :	
Pimephales promelas	CL ₅₀ 24-68 mg/l
Leuciscus idus melanotus	CL ₅₀ 25 mg/l (48h)
Lepomis macrochirus	CL ₅₀ 24 mg/l (96h)
Daphnie	CL ₅₀ 12 mg/l (48h)

Des données de toxicité pour divers dérivés du phénol sont fournies par DFG (Fonds allemand scientifique), 1982, vol. II: Phénols

DL₅₀ : permet d'évaluer la toxicité chronique ; c'est la dose qui dans un essai de toxicité est responsable de la mortalité de 50 % des organismes testés pendant une durée déterminée [35].

CL₅₀ : Concentration létale entraînant 50 % de mortalité parmi la population animale étudiée [30].

I-7 Les procédés de traitement des rejets phénoliques

Pour éviter les effets toxiques des substances phénoliques rejetées dans l'eau, il convient de procéder à un traitement approprié de ces substances avant leur rejet dans le milieu naturel.

On distingue deux grandes catégories de méthodes d'épuration :

La première comprend les procédés ayant pour but la récupération des phénols, Alors que la seconde catégorie s'intéresse à leur destruction [36].

Le choix de la méthode est essentiellement pratique et économique (moyens disponibles et volume des eaux phénoliques rejetées journallement). Pour les petites exploitations où le volume des eaux phénoliques n'atteint que quelques m³ par jour, la récupération n'est ni rentable ni même recommandable pour des raisons techniques, car les installations nécessaires à cette fin sont coûteuses et exigent une surveillance spéciale [36].

Pour les exploitations importantes la récupération des phénols ne produit qu'une épuration partielle des eaux résiduaires, alors ces dernières ne sont pas totalement exemptes de phénol mais renferment encore de petites quantités et sont encore les plus souvent fortement polluées par des substances d'accompagnement, pour cette raison on combine très souvent dans les installations de traitement des eaux résiduaires de ces usines les opérations de récupération et les méthodes de destruction des phénols [36].

Les procédés de traitement des rejets phénoliques sont présentés dans la figure I-1, où nous remarquons l'existence de deux branches :

- La récupération : extraction, évaporation et adsorption,
- Epuration : physico-chimique et biologique.

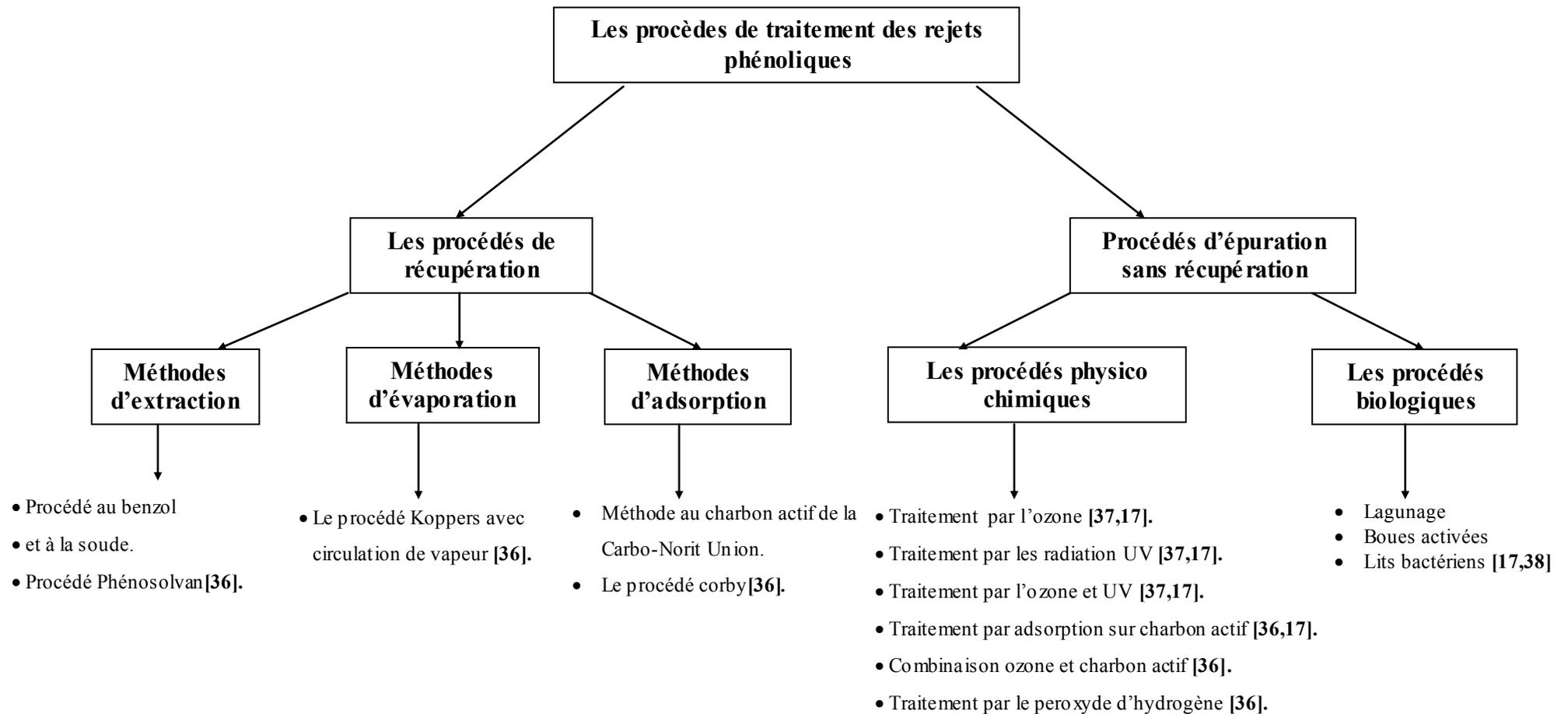


Figure I-1: Les différentes techniques de traitement des eaux résiduaires phénoliques

Chapitre III

Biodégradation du Phénol

II La Biodégradation

II-1- Définitions

Le terme **biodégradation** généralement retenu dans la littérature scientifique correspond à une action de dégradation d'un composé organique par des agents biologiques (généralement microbiens) avec comme seuls rejets des produits simples tels que H_2O , CO_2 , CH_4 , H_2 , Cl^- ..., mais encore des produits organiques simples (métabolites) tels que des acides organiques. Si la biodégradation du substrat organique est totale, c'est-à-dire formation uniquement de produits inorganiques tels H_2O , CO_2 , CH_4 , H_2 , on parle de **minéralisation** [39,40].

Le terme **biotransformation** implique la notion de transformation incomplète d'un substrat organique métabolisé qui n'aboutit pas forcément à une assimilation totale. Il peut s'agir par exemple d'une oxydation partielle du substrat qui se traduit par un rejet de produits intermédiaires (**métabolites**) dans le milieu [39].

La pollution importante des eaux exige de nos jours une épuration de préférence biologique pour éviter que les effluents pollués ne provoquent une destruction totale des **écosystèmes** aquatiques [41].

II-2 Le principe de biodégradation :

Le moteur de toute dégradation de substances organiques est, en fait, les enzymes secrétées par les bactéries et qui sont des catalyseurs organiques se transformant et se régénérant au cours des processus mis en œuvre.

On distingue les **enzymes extracellulaires** qui provoquent la destruction des structures moléculaires trop complexes pour pénétrer au sein des capsules bactériennes, et les **enzymes intracellulaires**, qui assurent l'assimilation et, par conséquent sont à l'origine des phénomènes vitaux pour la prolifération des cellules [41].

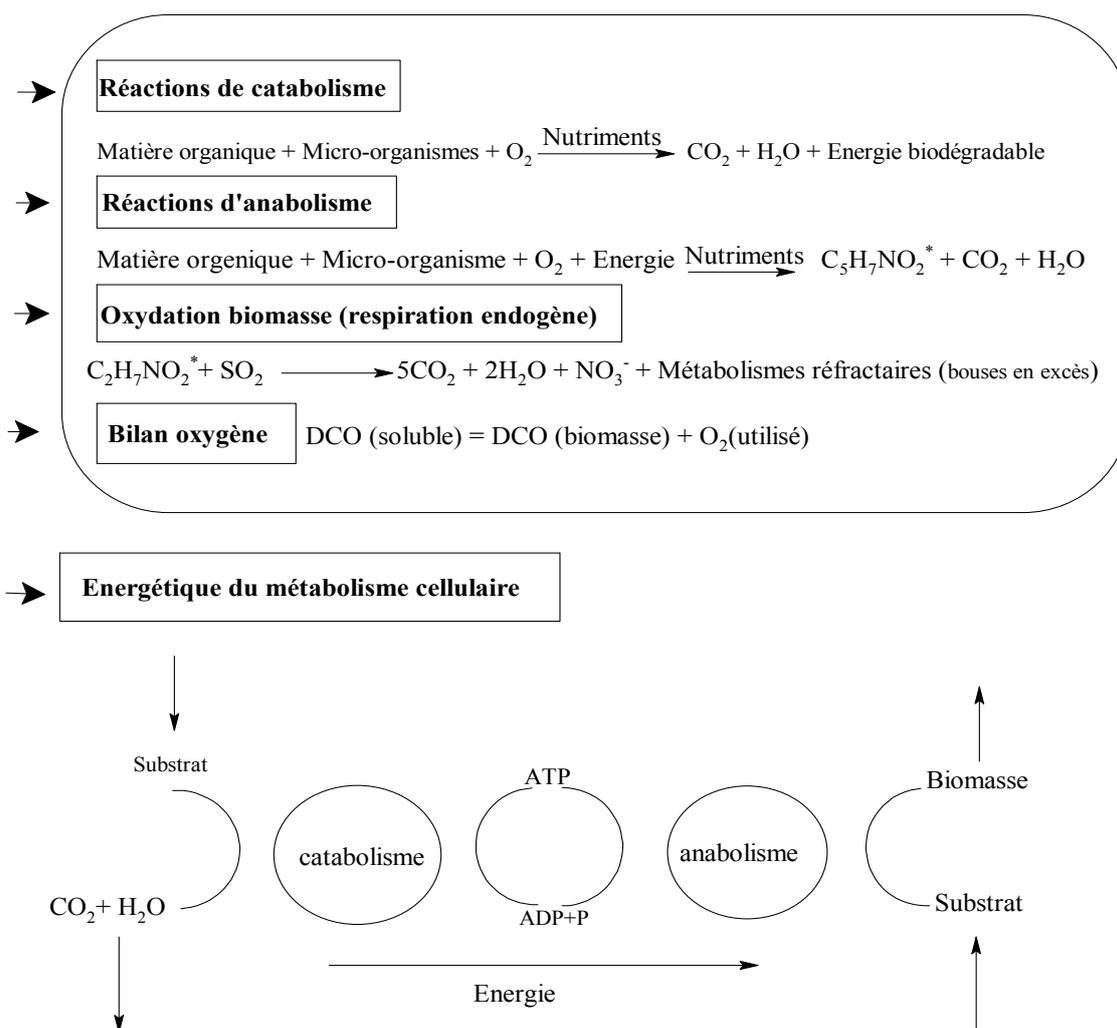
Selon que la combustion intracellulaire, ou oxydation, se produit aux dépens de l'oxygène dissous dans l'eau (**processus aérobie**) ou que, au contraire, il y a transfert de l'hydrogène du combustible brûlé, à un accepteur d'hydrogène autre que l'oxygène moléculaire (**processus anaérobie**), la nature des produits de dégradation élémentaires

ou déchets sera différente : CO_2 , H_2O , NH_3 ou NO_3 en aérobiose ; CO_2 , CH_4 et acides gras en anaérobiose.

Il faut considérer que, quoique théoriquement, l'épuration biologique des eaux usées peut s'effectuer par voie aérobie ou anaérobie, c'est la première de ces techniques qui est universellement utilisée à cause de sa supériorité évidente, tout au moins pour de faibles concentrations polluantes des effluents à traiter.

En effet, du fait du caractère beaucoup plus exothermique du métabolisme aérobie, le processus est plus rapide et plus complet, avec comme contrepartie, la production d'une masse cellulaire beaucoup plus importante [41].

Le schéma représenté sur la figure II-1 nous montre clairement les réactions de catabolisme et d'anabolisme qui donnent les différents métabolites que nous retrouverons dans le milieu, ainsi qu'un accroissement de la biomasse.



(*)C₅H₇NO₂ formule qui décrit la composition élémentaire de la matière vivante des bactéries

Figure II-1 : Mécanismes réactionnels de la métabolisation aérobie de la pollution carbonée [41]

II-3 Biodégradation des hydrocarbures mono aromatiques :

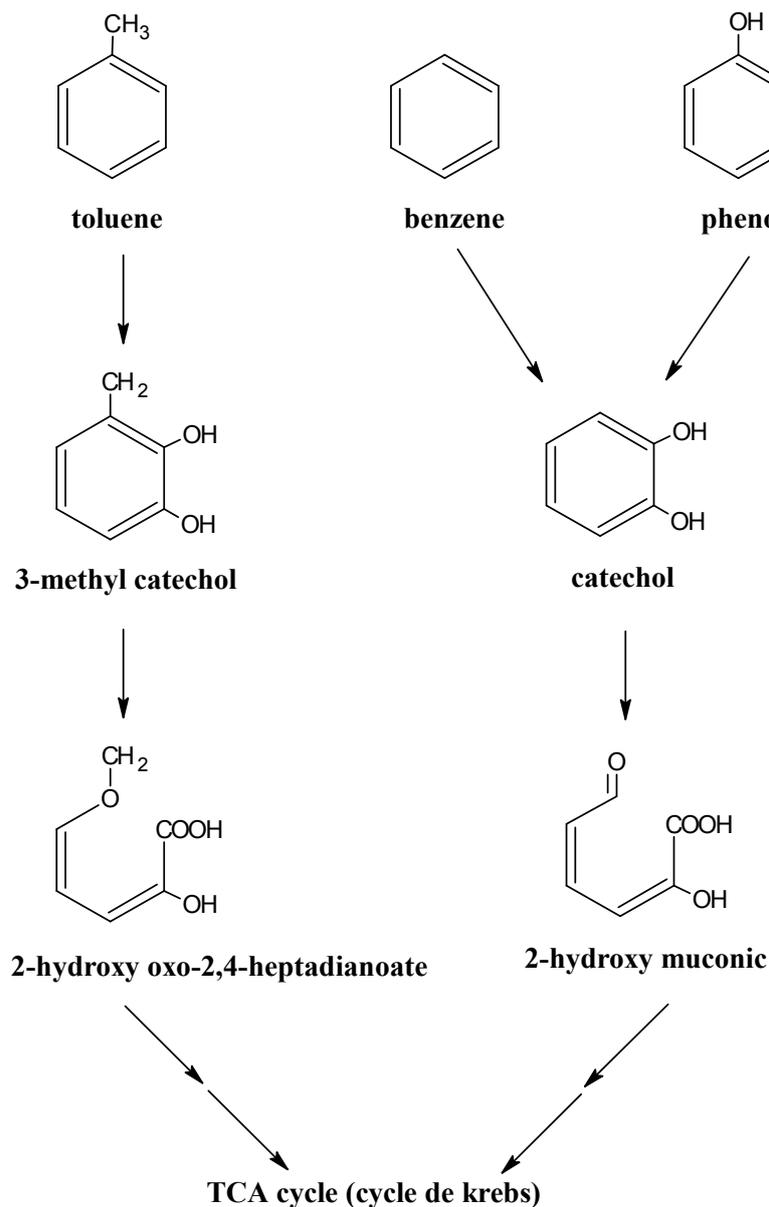
II-3-1 En aérobiose :

Les hydrocarbures mono aromatiques ainsi que les composés cycliques sont, d'une façon générale, accessible aux attaques bactériennes. Les *Pseudomonas*, *Vibrions*, *Achromobactereae*, et *Mycobacterium*... constituent des artisans fréquents de cette dégradation. De nombreux travaux leur ont été consacrés [42, 43].

La dégradation est initiée soit par des mono-oxygénases (hydroxylases) agissant sur les substituants alkylés du cycle aromatique ou sur le cycle lui-même, soit par des dioxygénases agissant directement sur le cycle aromatique. Le mode d'attaque dépend des groupements alkyles substituant (figure II-2) [43,14].

Pour un même composé, ce mode dépend, également, de la souche bactérienne (Cinq ont été répertoriées dans le cas du toluène étudié de façon quasi exhaustive, figure II-3) [43, 44].

Un mode d'attaque très utilisé, par une dioxygénase sur le noyau aromatique est illustré dans la figure (II-4) où le *Cis*-dihydrodiol produit est déshydrogéné en catéchol ou en un de ses dérivés [43].



FigureII-2 : les voies du catabolisme du phénol, toluène et benzène par *Pseudomonas putida F1* [14]

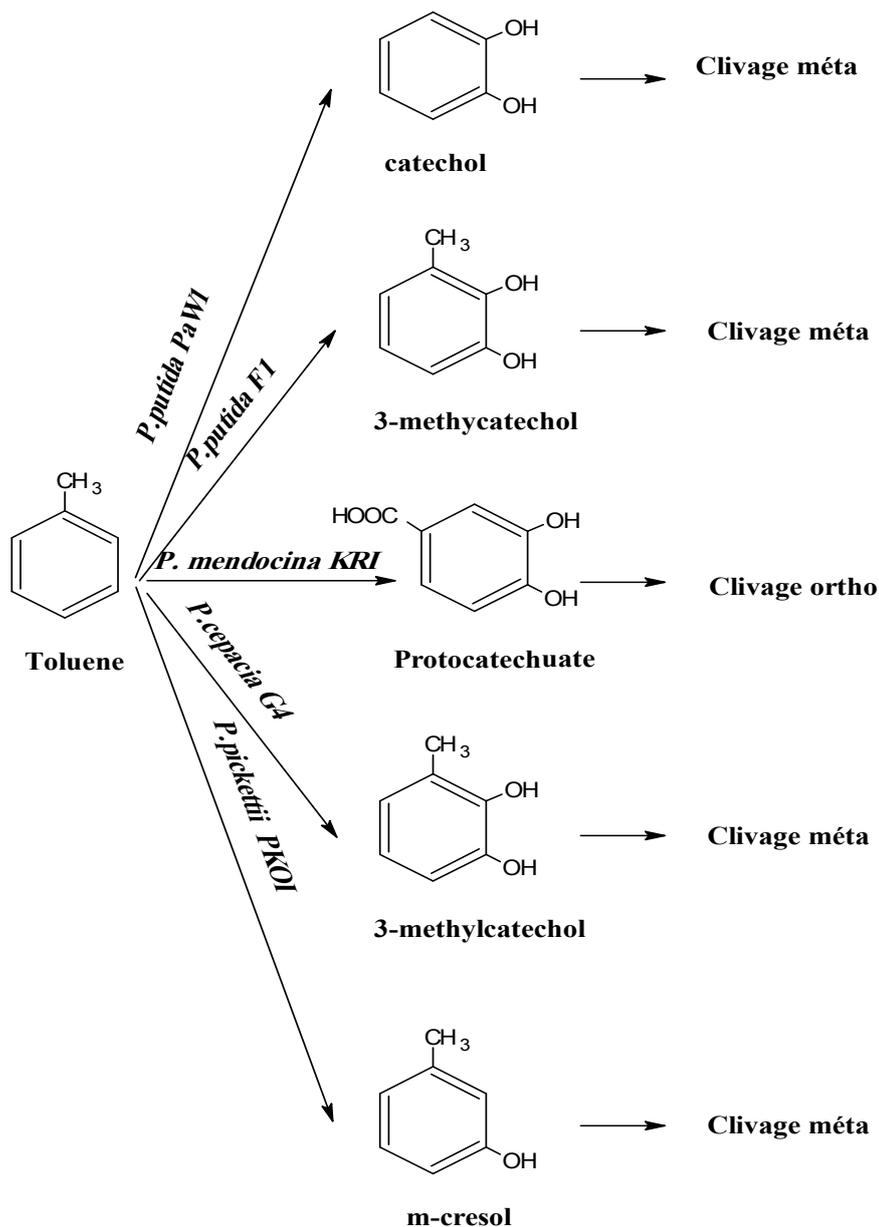


Figure II-3 : Les voies aérobies de la biodégradation du toluène [44]

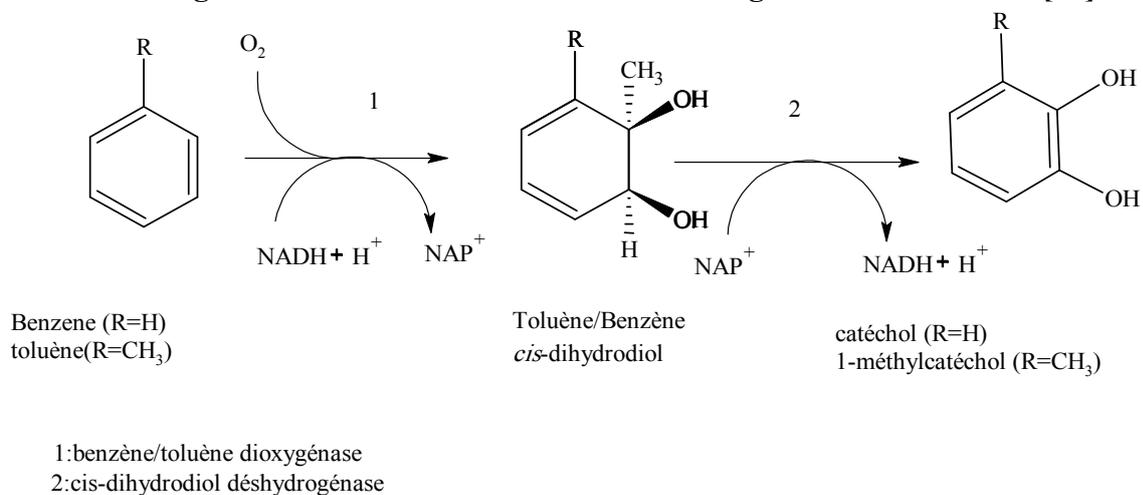


Figure II-4 : Hydroxylation du monoaromatique [43]

Les systèmes enzymatiques impliqués ont été étudiés, ils présentent des analogies avec les systèmes bactériens d'hydroxylation des alcanes, c'est au niveau du catéchol ou de ses dérivés que s'effectue l'ouverture du cycle aromatique par des dioxygénases.

Deux modes d'attaque sont possibles, selon les composés et les bactéries concernés, ils sont dits clivage ortho et clivage méta (Voir figure II-5).

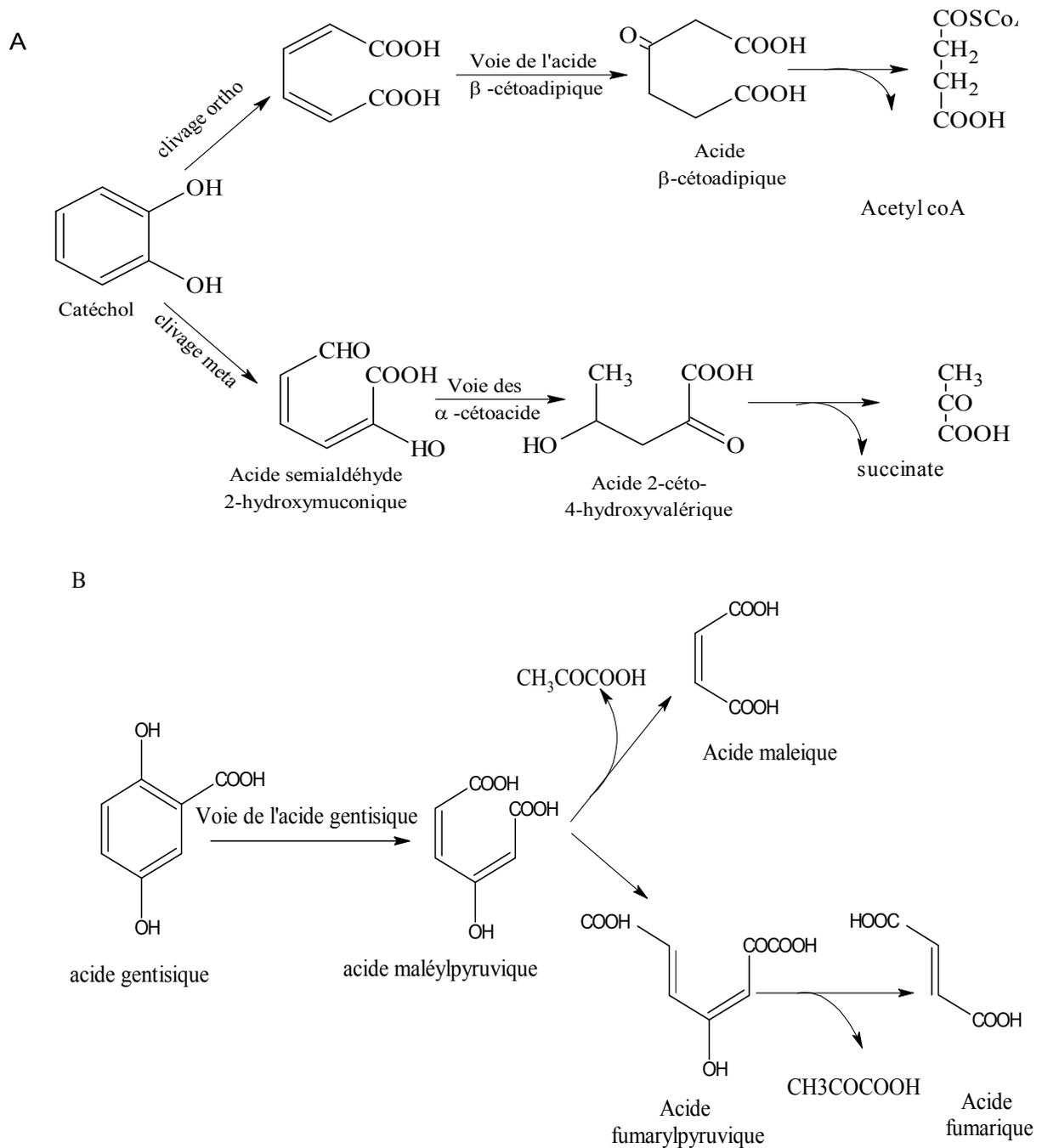


Figure II-5 : Schéma général de la dégradation du noyau mono-aromatique [43]

A : voies de l'acide β -cétoadipique et des α -cétoacides.

B : voie de l'acide gentisique.

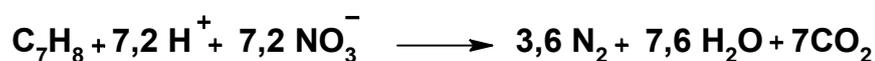
Les voies suivies aboutissent à la formation des composés du cycle citrique, en règle générale la présence de deux groupements hydroxyles sur le cycle aromatique est nécessaire pour l'ouverture du cycle, leur disposition doit être en ortho (cas du catéchol) ou en para. On suit dans ce dernier cas la voie dite de l'acide gentisique (figure II-3). La dégradation des BTEX (benzène, toluène, éthylène, xylène) chez les *P.putida* a fait l'objet d'études très détaillées [43].

II-3-2 En anaérobiose :

La dégradation anaérobie de composés aromatiques issus de l'attaque de la lignine (acides vanillique, syringique, benzoïque) est connue depuis un certain temps mais celle des hydrocarbures aromatiques a été plus récemment mise en évidence par Holiger, Zehnder et Lovley. En sachant que la lignine représente ce que le règne végétal possède de plus résistant à la biodégradation.

Dans les conditions dénitrifiantes, la dégradation des BTEX a été observée dans l'ordre suivant : toluène, *p*- et *m*-xylènes, éthylbenzène et xylène.

Le bilan correspond à une minéralisation de l'hydrocarbure telle que nous le montre l'équation chimique :



La dénitrification apparaît comme le système le plus efficace thermodynamiquement, mais d'autres accepteurs d'électrons fonctionnant à des potentiels plus bas peuvent également dégrader certains hydrocarbures mono aromatiques. C'est le cas pour les bactéries sulfato-réductrices (réduction de SO_4^{2-} en H_2S) qui peuvent minéraliser le toluène puis le *p*-xylènes, et enfin le *o*-xylène.

D'autres bactéries utilisent le Fe^{3+} comme accepteur d'électrons et le réduisent en Fe^{2+} avec minéralisation du toluène. Enfin, des groupes de bactéries dans des conditions de méthanogenèse peuvent également minéraliser le toluène en produisant du CO_2 et du CH_4 . Les voies métaboliques de dégradation anaérobie sont encore mal connues mais elles sont supposées analogues à celles étudiées pour des composés comme le benzoate [43, 45].

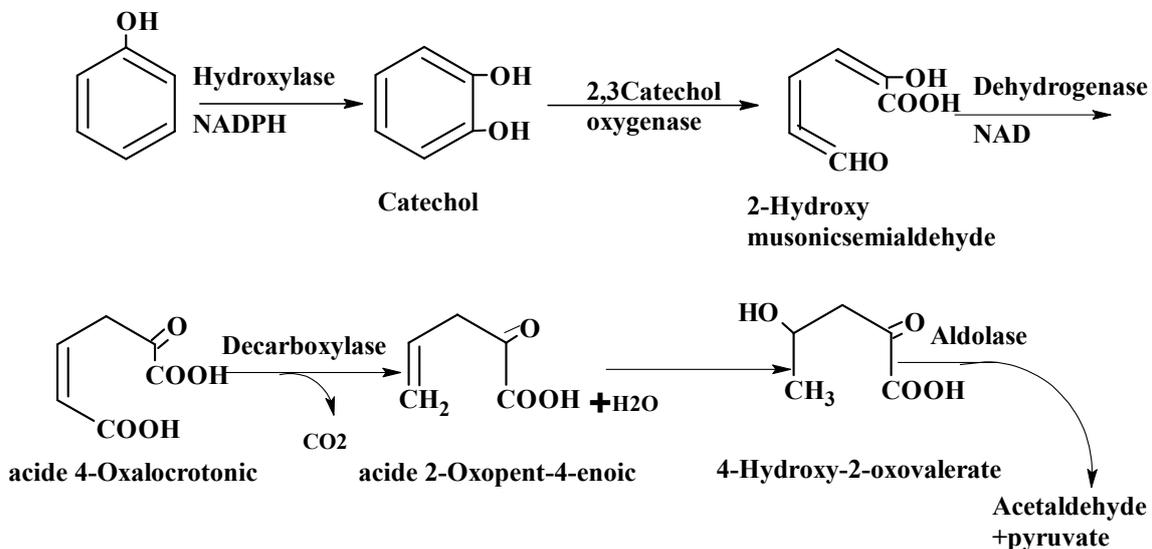
II-4-La biodégradation du phénol

II-4-1 En aérobiose

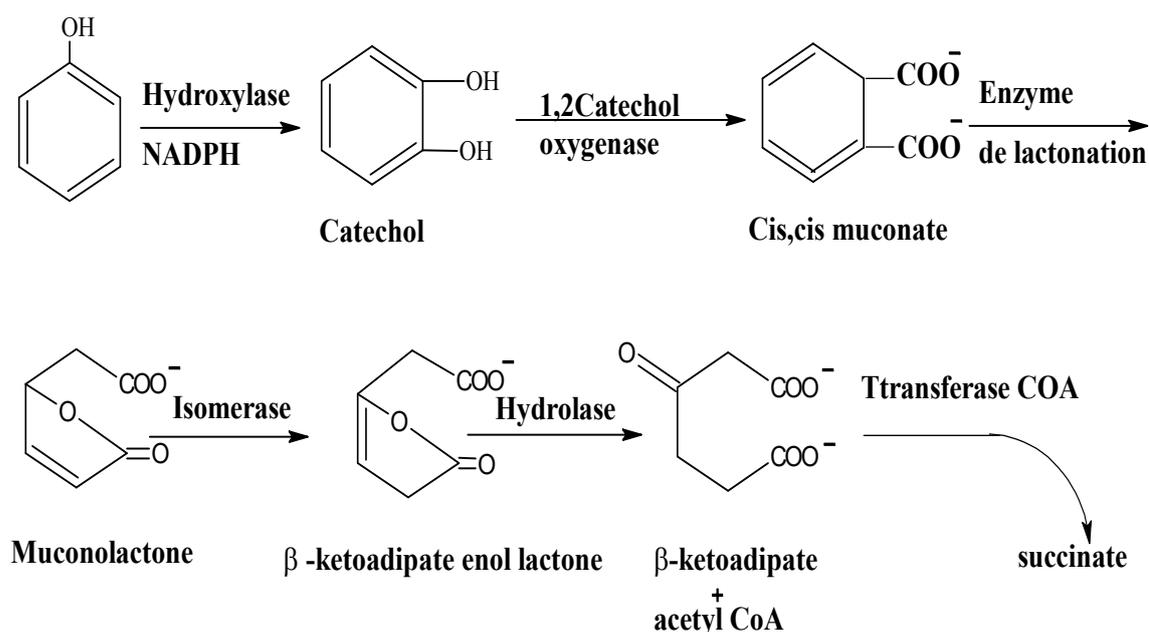
Plusieurs bactéries et champignons aérobies [5] peuvent utiliser le phénol comme source unique de carbone et d'énergie (les *Pseudomonas*, *Vibrions*, *Enterobacteries*) [3, 6, 7, 18, 20, 46-48] ; une collection de 700 bactéries obtenue par une installation de remédiation de traitement industrielle des composées phénoliques a été faite pour choisir des contraintes potentielles en tant que biodétecteurs microbiens. Les *pseudomonas* étaient le groupe le plus abondant, dont 48 souches sélectionnées de liquide ou de suspension solides pour leur réponse physiologique à l'identification du polluant phénolique [3, 29].

Une voie métabolique typique de la dégradation du phénol est celle de l'hydroxylation du cycle aromatique pour obtenir un dérivé du catéchol, puis le cycle est ouvert par une ortho ou une meta oxydation, comme illustré dans la figure II-6.

Pseudomonas putida utilise le phénol par la voie meta. Dans la voie méta, le 2,3 oxygénase est un système d'induction où le phénol peut jouer le rôle d'inducteur [18, 6, 47].



La voie meta(*pseudomonas putida*)



La voie ortho(*Trichosporon cutaneum*)

Figure II- 6 : les voies métaboliques du phénol [6]

Le phénol, l'acide benzoïque, l'acide anthranilique oxydés conduisent au catéchol, ce produit est lui même repris et transformé en acide muconique, betha-cétoadipique par des *Pseudomonas* (*P.aeruginosa* est capable d'oxyder rapidement le catéchol et bien d'autres composés de ce groupe) et des vibrions [42, 43].

II-4-2 En anaérobiose :

On a observé la croissance anaérobie sur le phénol pour diverses bactéries ; Dans tous les cas étudiés, le phénol a semblé être carboxylé en 4-hydroxybenzoate et la croissance sur celui-ci dépendait de la présence de CO₂.

Les groupes de bactéries de fermentation convertissent le phénol en benzoate et décarboxyle le 4-hydroxybenzoate en phénol [9, 49].

Chapitre III

Cinétique Bactérienne

III

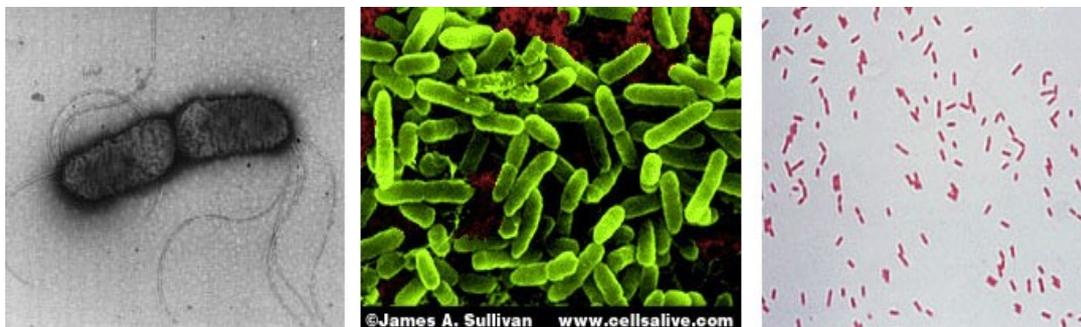
Cinétique bactérienne

III-1 Généralités sur le genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* (figure III-1) de la famille des *Pseudomonaceae* comprend une soixantaine d'espèces pouvant répondre aux critères suivants [51,52] :

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

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires que l'on rencontre dans les sols, sur les végétaux et surtout dans les eaux douces et marines. De nombreuses souches pouvant se développer à basse température (souches psychrophiles) contaminent les denrées alimentaires ou les produits pharmaceutiques conservés au réfrigérateur [53].



**Figure III-1: profil d'une *Pseudomonas*
Bacille, Gram⁻, mobiles par flagelles polaires [50]**

On peut occasionnellement les isoler de la flore intestinale de l'homme ou de l'animal mais leur capacité à résister à de nombreux antibiotiques et antiseptiques explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier. Ils se comportent comme des pathogènes opportunistes souvent à l'origine d'infections nosocomiales [54].

Les *Pseudomonas* ont peu d'exigences nutritionnelles et sont capables de croître dans des environnements très différents [55, 56]. Les espèces sont reconnues selon différents critères à savoir [51, 56]:

- les caractères biochimiques.
- les possibilités d'assimilation des substrats carbonés (auxanogramme)
- les besoins en facteurs de croissance.
- L'analyse des profils de restriction des gènes ARNr (ARN ribosomal) permettant un classement en 5 groupes (I à IV) et en non groupables.

Groupe I : *P. aeruginosa* (espèce type), *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes*.

Groupe II : *P. cepacia*, *P. pseudomallei*, *P. mallei*, *P. pickettii*, *P. solanacearum*

Groupe III : *P. acidovorans*, *P. testosteroni*

Groupe IV : *P. diminuta*, *P. vesicularis*

Groupe V : *P. maltoph*

III-2 Métabolisme des *Pseudomonas* :

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont capables d'utiliser des substrats variés. Elles utilisent pour cela plusieurs voies cataboliques :

- La voie d'Entner Doudouroff [42, 43, 50].
- La voie du β -cetoacide (voir chapitre II).

Certaines bactéries suivant cette dernière voie sont utilisées dans le nettoyage de sites pollués du fait que leur métabolisme les autorise à dégrader chimiquement des composés aromatiques complexes (comme le toluène et les hydrocarbures aromatiques polycycliques AHP) [57].

Toutes ces voies convergent vers le cycle de Krebs et permettent de fournir l'énergie nécessaire au développement des bactéries du genre *Pseudomonas*.

III-3 *Pseudomonas aeruginosa*

Sur le plan écologique et épidémiologique, *Pseudomonas aeruginosa*, espèce type du genre *Pseudomonas* encore appelé bacille pyocyanique est présent dans de nombreuses niches.

III-3-1 Caractéristiques :

III-3-1-1 Morphologie :

- Bacille à Gram négatif d'environ $2 \times 0.5 \mu\text{m}$ [58].
- Bacille d'aspect très fin, non sporulé, mobile grâce à un cil polaire monotriche.
- Souvent est entouré d'une pseudocapsule "slime".

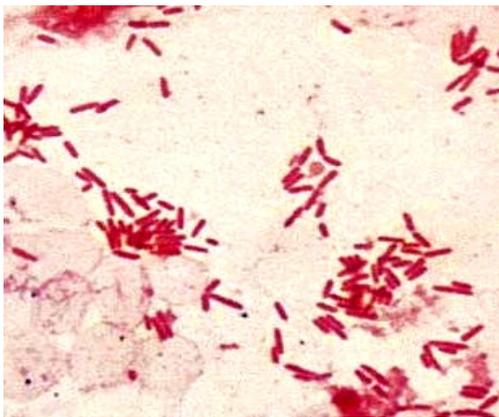


Figure III-2 Coloration de gram de *Pseudomonas aeruginosa* observée sous microscope photonique « GX100 » [59]



Figure III-3 Colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur agar [53]

Figure III-4 *Pseudomonas aeruginosa* observée sous microscope électronique CDC. GX15000 [53]



III-3-1-2 Culture :

La culture des *Pseudomonas* (*P.aeruginosa*) est facile sur milieux ordinaires [51, 60] et sur des milieux spéciaux comme les milieux de King (milieu King A) [61]. *P.aeruginosa* se caractérise par la production d'un pigment pyocyanine (Bleu vert), celle-ci est favorisée par la présence d'ions inorganiques dans le milieu King A [60, 61].

III-3-1-3 Température de croissance :

La température optimale de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* est 30°C, mais c'est la seule bactérie capable de se développer à +43°C [56].

III-3-1-4 Autres Caractéristiques :

Pseudomonas aeruginosa a comme particularités biochimiques d'être Catalase+, et Oxydase+ [56]. Elle est capable de se multiplier dans un milieu minimum (eau 80%, glucose 5 g/l, (NH₄)₂ SO₄ 10g/l et oligoéléments) et malgré qu'elle soit aérobie stricte, elle est capable de respirer en anaérobiose les nitrates (NO₃⁻ accepteur final d'électrons) [56], mais est incapable de fermenter le glucose.

III-3-1-5 Habitat :

Comme la majorité des espèces du genre, *P. Aeruginosa* est un germe répandu dans la nature, il vit dans l'eau et sur le sol. On dit qu'il est saprophyte [62].

III-4 La nutrition bactérienne :

Lorsqu'un micro-organisme est introduit dans un milieu de culture lui convenant, il développe une activité en relation avec ses potentialités et les conditions environnantes, cette activité se traduit par une augmentation de la concentration en biomasse microbienne [43].

Comme tous les êtres vivants, les bactéries s'alimentent à partir du milieu extérieur, certains aliments lui servent de matériaux de construction, d'autres de source d'énergie nécessaire aux synthèses et à la vie de la bactérie. Les besoins nutritifs des bactéries comprennent les besoins élémentaires tels le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, et l'azote, ensuite les besoins énergétiques apportés pour la plupart des cas par des sucres comme le glucose, et enfin des besoins spécifiques (cas des bactéries Auxotrophes) en facteur de croissance tels que les vitamines [43, 63].

Il est courant d'employer le terme « fermentation » pour définir la plupart des cultures et réactions microbiennes, bien qu'il ne s'agisse pas dans certains cas d'une fermentation au sens biochimique [43].

III-5 Conditions physico-chimiques de croissance :

III-5-1 Température : La température exerce une influence déterminante sur l'ensemble de l'activité cellulaire microbienne, cette dernière peut être totalement inhibée aux basses températures. Dans l'intervalle des températures physiologiques, la croissance microbienne est accélérée par une augmentation de la température et suit la loi d'Arrhenius. Le taux de croissance atteint sa valeur maximale dans la zone relativement étroite des

températures optimales [43,64]. On distingue classiquement en fonction des limites de température entre lesquelles prolifèrent les microorganismes trois groupes (tableau III-1).

Tableau III-1 : Classification des microorganismes en fonction de leur température de développement [65, 39]

Microorganismes	Température de développement en °C		
	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophiles	- 5	+ 5 à + 10	+ 20
Mésophiles	+ 10	+ 30 à + 40	+ 45
Thermophiles	+ 40	+ 50 à + 60	+ 75

Ces valeurs n'ont qu'un caractère général ; les températures indiquées peuvent, selon les espèces et les souches, subir des décalages. Dans chaque groupe il existe des espèces ou des souches pour lesquelles le caractère psychrophile, mésophile ou thermophile est strict alors qu'il est facultatif pour d'autres. La raison pour laquelle les bactéries ont des températures de culture différentes paraît être due, au moins en partie, à la stabilité thermique spécifique de leurs enzymes. Les bactéries pathogènes de l'homme sont mésophiles, avec un optimum aux environs de 37°C [39, 64].

III-5-2 pH :

La plupart des bactéries demandent un milieu neutre ou légèrement alcalin (pH 7,5), certaines espèces pathogènes dont *Vibrien*, se cultivent bien en milieu très alcalin, les lactobacilles (flores du vagin par exemple) se développent à pH légèrement acide 6,3 à 6,5 [39, 63, 64].

III-5-3 Pression osmotique :

Les bactéries tolèrent de fortes variations de concentrations ioniques. Certaines sont très tolérantes ou même exigeantes en force ionique élevée, on les dénomme halophiles et certaines halophiles sont pathogènes (*Vibrien haemolyticus*). Les germes halophiles et même les germes hyperhalophiles entraînent les dégradations des aliments (salaison) [39, 63].

III-5-4 Aération et agitation :

III-5-4-1 Aération :

A cause de la très faible solubilité de l'oxygène, il constitue souvent un obstacle au développement des microorganismes aérobies. La maîtrise de ce paramètre est très importante pour l'augmentation du rendement en biomasse. Pour y pallier, divers dispositifs d'aération (injection d'air, pales...) ont été mis au point dans les montages de croissance [43, 64].

III-5-4-2 Agitation :

L'agitation est un facteur complémentaire pour le transfert d'oxygène mais également pour les autres éléments du milieu. Elle peut cependant être à l'origine d'inconvénients tels que les phénomènes de cisaillement quand il s'agit de cultures mycéliennes et de formation des mousses à l'origine des contaminations [43,64].

III-5-5 concentration des composés nécessaires à la croissance :

Au cours de la phase exponentielle, le taux de croissance est indépendant de la concentration des divers composés du milieu de culture lorsqu'ils sont en excès. Quand ceux-ci se trouvent en faibles quantités, le taux de croissance demeure inférieur au taux de croissance maximal, et augmente avec elle. Ce phénomène a été étudié par Monod en 1949 qui a proposé d'exprimer le taux de croissance μ en fonction de la concentration du substrat S [43,64].

III-5-6 Substances antibactériennes contenues dans le milieu :

Certains produits chimiques modifient la croissance des bactéries en la ralentissant, ce sont des inhibiteurs sélectifs on les rajoute dans des milieux pour favoriser la multiplication des bactéries insensibles ; c'est le principe des milieux sélectifs ou d'enrichissement [63].

III-6 Croissance des bactéries :

En milieu liquide, la plupart des bactéries ont une croissance homogène dans le bouillon de culture. On peut de façon simple mesurer le nombre des cellules vivantes ou la concentration cellulaire totale. Ceci permet de décrire la courbe de croissance de la bactérie qui comporte 6 phases successives (figure III-5).

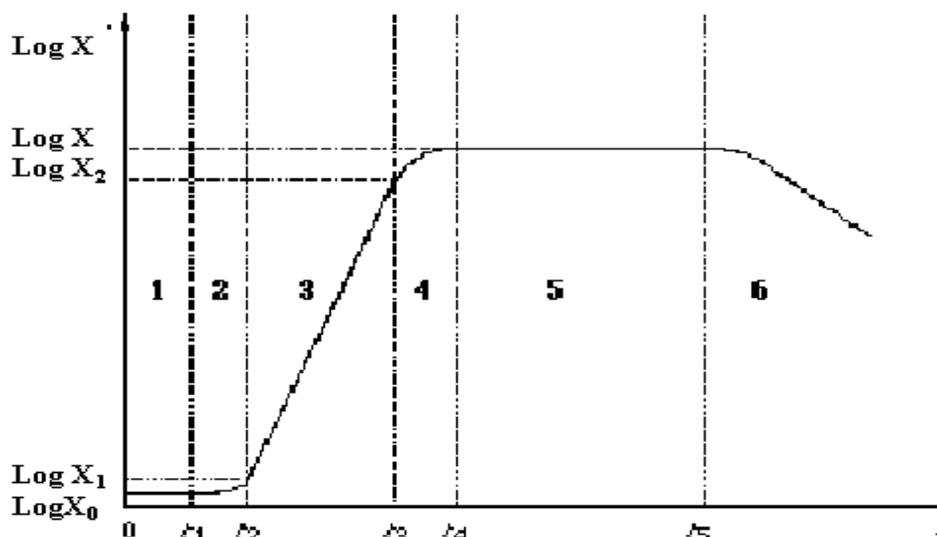


Figure III- 5 Croissance typique d'une bactérie en milieu liquide Les six phases de la cinétique de croissance d'une population bactérienne. D'après Buchanan (1919) [39,66]

X est le nombre de bactéries;

X_0 est l'inoculum;

X_1 le nombre de bactéries en fin de phase d'accélération;

X_2 le nombre de bactéries en fin de phase exponentielle;

X_f le nombre de bactéries finales.

1 : Phase de latence ; 2 : phase d'accélération ; 3 : phase quasi-exponentielle ; 4 : phase de ralentissement ; 5 : phase stationnaire ; 6 : phase éventuelle de mortalité.

III-6-1 Phase de latence :

C'est la période comprise entre l'ensemencement et le début du développement bactérien, dans laquelle on remarque une augmentation de la taille des bactéries. Elle ne dépasse pas deux à trois heures (courte) dans des conditions optimales [43, 64-67].

III-6-2 Phase d'accélération :

C'est pendant cette phase qu'on remarque un phénomène d'accélération de la croissance de la population. La multiplication s'effectue à taux constant ; On mesure la rapidité de croissance par le temps mis par une bactérie pour se diviser (temps de génération), qui est aussi le temps que met une population bactérienne pour doubler (temps de doublement). Le taux de croissance correspond à l'inverse d'un temps de génération [43, 64-67].

III-6-3 La phase exponentielle ou logarithmique :

Elle correspond au moment où la vitesse de reproduction cellulaire atteint son maximum, Pendant cette phase les bactéries se reproduisent, le taux de croissance est constant et maximal.

Cette phase est relativement courte. Cela est dû à l'accumulation de déchets métaboliques dans le milieu de culture et à la disparition des éléments nutritifs disponibles, les microorganismes sont très sensibles à des conditions défavorables pendant cette phase. [43, 64- 67].

III-6-4 Phase de ralentissement :

Il arrive un moment où la courbe présente un point d'inflexion qui correspond du point de vue biochimique à l'épuisement du milieu de culture suite à la disparition d'un ou de plusieurs composés nécessaires à la croissance bactérienne (C, N, P,etc.). Le taux de croissance va diminuer progressivement pour s'annuler à la fin [43,64-67].

III-6-5 Phase stationnaire :

Au cours de laquelle la croissance est maximale et stationnaire, cette phase est brève pour les bactéries fragiles, pour les autres peut durer plusieurs heures et même plusieurs jours.

- Déséquilibre du milieu de culture marqué par l'apparition de changements morphologiques chez les bactéries (gonflement ou allongement).
- La pollution du milieu et l'épuisement des éléments nutritifs conduisent à la phase de décroissance.
- Arrêt de la reproduction, les bactéries vivent sur leurs réserves [43, 64-67].

III-6-6 Phase de décroissance exponentielle ou déclin :

- Nombre de bactéries qui meurent dépassent le nombre de nouvelles bactéries.
- Bactéries survivantes diminuent selon une progression géométrique en fonction du temps.
- Libération des endotoxines par les bactéries Gram (-)
- Il arrive durant cette phase qu'un petit nombre de bactéries particulièrement résistantes continuent à se développer en puisant leurs éléments nutritifs libérés par les bactéries mortes et lysées (cannibalisme).
- La décroissance perd alors son allure exponentielle [43, 64-67].

III-7 Les paramètres de croissances :

III-7-1 Le taux de croissance pendant la phase exponentielle :

Chaque cellule microbienne donne après multiplication deux cellules identiques. Après **n** générations, le nombre initial de cellules **X₀** pour **t = 0**, devient au temps **t**, **X** tel que :

1- $X = X_0 2^n$

2- $X = X_0 2^{\mu t}$ Qui s'intègre

3- $\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \cdot \ln 2$

4- $\ln X - \ln X_0 = \mu \cdot t \cdot \ln 2$

5-
$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t \cdot \ln 2} \quad \text{(III-1)}$$
}

 X₀: Nombres de cellules à t₀
 X: Nombres de cellules à t
 μ: Taux de croissance (1/h)

Ceci vérifie que pendant la phase de croissance logarithmique, la croissance cellulaire est indépendante de la concentration du substrat, Si celui-ci est largement en excès .Dans le cas contraire le taux de croissance dépendrait de la concentration en substrat (S) qui joue le rôle de facteur limitant [43, 64, 68, 69].

En traçant $\ln X$ en fonction du temps d'après équation 3 .La pente de la droite obtenue donne le taux de croissance :

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \ln 2$$

$$\ln X = \mu \ln 2 t + \ln X_0$$

μ_{\max} varie en fonction de la nature du milieu nutritif, la concentration d'un facteur limitant et les facteurs physico-chimiques (température) [70].

Tableau III-2: Valeurs de taux de croissance (μ) pendant les différents phases de la croissance bactérienne [43, 67,70] :

Les différentes phases de croissance	valeurs de μ
Phase de latence	$\mu = 0$
Phase d'accélération	μ augmente
Phase exponentielle	$\mu = \mu_{\max} = \text{cste}$
Phase de ralentissement	μ diminue
Phase stationnaire	$\mu = 0$
Phase de déclin	mortalité

III-7-2 Temps de génération

Temps que met une cellule à se diviser et la population dont elle provient à doubler.

- Varie considérablement d'une bactérie à l'autre.
- Pour la majorité des bactéries, le temps de génération est de 1 à 3 heures
- (20 minutes dans des conditions idéales).
- Plus de 24 heures pour certaines espèces [67].

$$tg = \frac{0,69}{\mu}$$

(III-2)

$\left\{ \begin{array}{l} tg : \text{temps de génération} \\ \mu : \text{taux de croissance} \end{array} \right.$

III-7-3 Coefficient de conversion du substrat :

C'est le coefficient qui correspond à l'augmentation de la biomasse par rapport à la consommation du substrat [43, 70].

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

$Y_{X/S}$: s'exprime en gramme de matière sèche cellulaire par gramme (rendement pondéral) ou par mole du substrat métabolisé (rendement molaire).

X_f : Concentration cellulaire finale (g.l^{-1}) ;

X_0 : Concentration cellulaire initiale (g.l^{-1});

S_f : Concentration du substrat finale (g.l^{-1}) ou (mol.l^{-1});

S_0 : Concentration du substrat initiale (g.l^{-1}) ou (mol.l^{-1}).

III-8 Modélisation de la courbe de croissance :

La croissance microbienne est un phénomène globalement très complexe. Par le nombre et le type des réactions mises en jeu au cours de son déroulement et par leur dépendance vis-à-vis des facteurs extérieurs pouvant d'ailleurs exercer des influences susceptibles d'interactions. L'application des méthodes mathématiques à l'étude, rendue possible grâce à l'apparition des calculateurs, a permis de faire progresser considérablement la connaissance de ces phénomènes et de ce fait de mieux les maîtriser et les exploiter [43].

Il existe de nombreux modèles empiriques :

III-8 -1 Modèle de Monod :

Le modèle de Monod est couramment utilisé dans tous les secteurs de la microbiologie. Plus précisément, 1800 publications scientifiques font explicitement référence aujourd'hui aux travaux de Monod.

Ce modèle de croissance donne une relation entre le taux de croissance μ d'une population de micro-organismes et la concentration S en substrat limitant,

$$\mu = \frac{1}{B} \cdot \frac{dB}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot [S]}{K_S + [S]} \quad (\text{III-4})$$

Où B : quantité de biomasse [mg.l^{-1}].

μ_{\max} représente le taux de croissance maximum.

K_S c'est concentration en substrat qui correspond à un taux de croissance demi-maximal et elle a la une signification physique d'une concentration seuil au –dessous de laquelle le taux de croissance devient très dépendant de la concentration en substrat principal.

Cette relation est parfois justifiée en disant que la croissance cellulaire repose sur un grand nombre de réactions enzymatiques et qu'il est donc logique que la forme de la relation de Monod soit identique à celle de Michaelis et Menten [66, 70- 72].

Note : Les valeurs K_S et μ_{\max} sont extrêmement variables, même pour une seule espèce et un seul substrat limitant [66, 70, 71].

III-8-2 Modèle de Haldane :

L'évaluation de l'inhibition de substrat devient une importante considération dans le traitement des composés toxiques (phénol).

Plusieurs modèles mathématiques ont été développés à mesurer l'effet inhibiteur des substrats toxiques sur la cinétique de croissance microbienne.

Le modèle de Haldane est un des modèles le plus généralement utilisé pour décrire la cinétique d'inhibition de croissance des micro-organismes [11].

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S + (S^2/K_i)} \quad (\text{III-5})$$

D'où K_i représente la constante d'inhibition.

L'équation de Haldane a été appliquée largement pour décrire la cinétique de croissance de cellules sur phénol et elle est également souvent employée pour la prévision du taux de dégradation de phénol en assurant un rendement constant de la masse de cellules [13].

Les différentes constantes biocinétiques de la biodégradation du phénol des deux modèles(Monod et Haldane) pour les souches, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas fluorescense* 2218 et la culture mixte avec les composés phénoliques synthétiques sont représentés dans le Tableau III-3 alors que le tableau III-4 montre l'influence des conditions opératoires (température ,concentration maximale...etc) sur les constantes de la biodégradation du phénol pour différents souches pures .

Tableau III-3 : Constantes biocinétiques de la biodégradation du phénol (comparaison entre le modèle de Monod et le modèle de Haldane) [70] :

Microorganismes (type de culture)	Les valeurs de modèle de Monod		Les valeurs de modèle de Haldane	
	μ_{\max} (h ⁻¹)	K _s (mg/l)	μ_{\max} (h ⁻¹)	K _i (mg/l)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (monoculture)	0.465	30.96	0.588	460
<i>Pseudomonas fluorescense</i> 2218 (monoculture)	0.624	18.66	0.823	475
Culture mixte avec les composés phénolique synthétiques	0.463	11.079	0.746	410

Tableau III-4 : Valeurs de paramètre de modèle de biodégradation aérobie de phénol par les cultures pures [14] :

Microorganismes (type de culture)	T (°C)	Concentration Maximal de phénol (mg/l)	μ_{\max} (h ⁻¹)	K _s (mg/l)	K _i (mg/l)	YX/S (g/g)
<i>P. putida</i> F1 (batch)	30	54	0,11 ± 0,01	32,0 ± 2,4	—	0.80 ± 0.07
<i>P. putida</i> NRRL b-14875 (continu)	25	400	0,569	18,54	99.37	0.52
<i>P. putida</i> ATCC 17484 (batch)	30	700	0,534	<1,0	470	0,52 ± 0,08
<i>P. putida</i> Q5 (batch)	10	200	0,119	5,27	377	0,55
<i>Burkholderia cepacia</i> G4 (batch)	23-26	50	0,441	1,22	36.8	0,74
		175	0,441	1,22	138	0,74
<i>P. putida</i> ATCC 17514 (continu)	30	500	0,567	2,38	106	—
<i>P. putida</i> ATCC 17514 (batch)	28,5	150	0,897	12,2	203.7	0,77
<i>P. resinovorans</i> ATCC 14235 (batch)	28,5	150	1,007	13,0	117.7	0,68
<i>Trichosporon cutaneum</i> (continu)	30	900	0,464	1,66	380	0,851
<i>Candida tropicalis</i> No. 708 (batch)	30-35	2000	0,22	110	1200	0,5
<i>Nocardia</i> sp. CF222 (continu)	30	2100	0,29	<1	730	0.88

III-8-3 Détermination des constantes biocinétiques :

Pour la détermination des constantes cinétiques (K_s , μ_{max} et K_i) nous avons eu recours à la forme linéarisée de l'équation de Monod et celle de Haldane :

III-8-3-1 Détermination de K_s et μ_{max} :

- **Forme linéarisée de L'équation de Monod :**

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (III-6)$$

La représentation de l'inverse de la vitesse d'élimination du substrat $1/\mu$ en fonction de l'inverse de la concentration $1/S$ permet la détermination du μ_{max} , K_s à partir de la pente et de l'ordonnée a l'origine de la droite (Monod) comme le montre la figure III-6 [71].

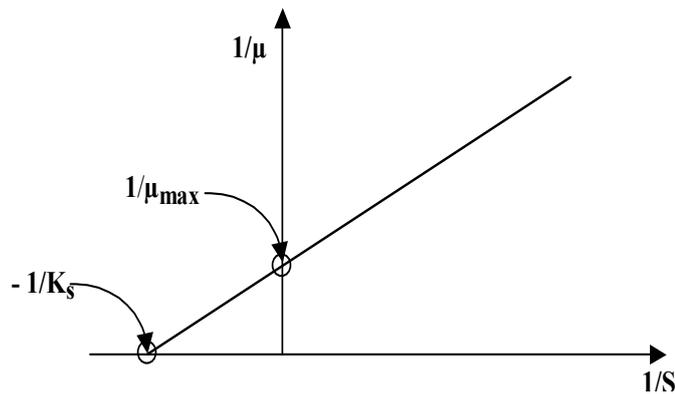


Figure III-6 : la représentation de Monod qui permet la détermination du μ_{max} , K_s

III-8-3-2 Détermination de K_i :

- **Forme linéarisée de L'équation de Haldane :**

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max} \cdot S} + \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{S}{K_i \cdot \mu_{max}} \quad (III-7)$$

$\frac{K_s}{\mu_{max} \cdot S}$ Cette fraction tend vers zéro quand $S \gg K_s$

La représentation de $1/\mu$ en fonction de S pour le cas du modèle de Haldane, permet la détermination de la constante d'inhibition K_i comme le montre la figure III-7 [71].

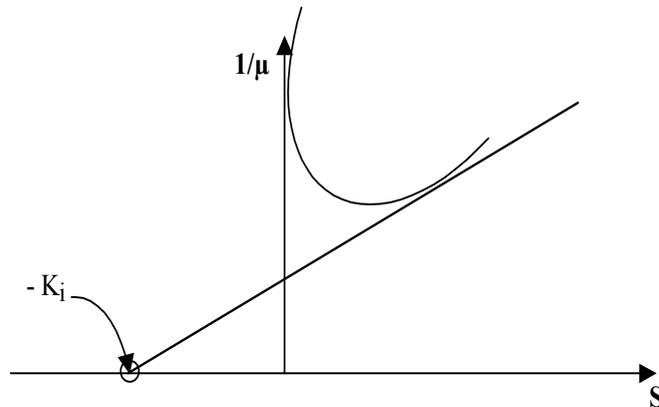


Figure III-7 : la représentation de Haldane qui permet la détermination du K_i

III-8-3-3 Le taux de biodégradation :

Les cinétiques de dégradation sont décrites par une variété d'expressions mathématiques de complexité croissante au fur et à mesure des tentatives d'intégration des nombreuses variables affectant la disparition de la matière organique. Nous ne donnerons qu'un résumé des différentes expressions les plus communément utilisées pour décrire les réactions de dégradation [73].

a) Cinétique d'ordre 1 :

Le modèle le plus fréquemment utilisé est une cinétique d'ordre 1. La vitesse de dégradation est proportionnelle à la concentration d'un seul réactant : la matière organique. Ce modèle considère la matière organique comme une substance homogène, c'est-à-dire monomoléculaire, de vitesse de dégradation constante égale à K [73] :

$$\frac{d[S]}{dt} = -K[S] \quad \text{III-8}$$

Qui s'intègre en :

$$e^{-kt} = \frac{[S]}{[S_0]} \text{ ou } [S] = [S_0]e^{-kt} \quad \text{III-9}$$

Avec K : constante de dégradation [h^{-1}]

t : durée de dégradation [h]

$[S]$: concentration de substrat initiale [$mg.l^{-1}$]

$[S_0]$: concentration de substrat initiale [$mg.l^{-1}$]

Cette cinétique de décomposition du premier ordre, en fait une courbe de dilution, est connue en géochimie sous le nom de *one-G model*. De l'équation III-9, nous tirons la valeur de la constante K :

$$\ln\left(\frac{[S]}{[S_0]}\right) = -Kt \quad \text{III-10}$$

b) Cinétique de Michaelis & Menten :

Malgré l'hétérogénéité des populations microbiennes aquatiques, il semble que la vitesse d'utilisation d'un substrat par la biomasse microbienne obéisse à une cinétique Michaelienne (Williams, 1973).

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{III-11}$$

Avec

V_{\max} : Vitesse maximale de la réaction [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$].

$[S]$: Quantité de substrat [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$].

K_m : Constante de saturation ou Michaelis ($K_m = [S]$ pour $v = V_{\max}/2$) [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$].

La signification de la constante K_m est modifiée, elle ne mesure plus l'affinité d'une enzyme pour son substrat mais prend en compte également les barrières de diffusion créées par la morphologie de la biomasse et la structure de la matière organique. En fait, l'équation de Michaelis & Menten ne s'applique en toute rigueur qu'à une enzyme pure.

c) Modèle de Monod :

Les réactions enzymatiques peuvent être utilisées pour décrire non plus une réaction isolée mais un ensemble de réactions (croissance de populations microbiennes). Les vitesses v et V_{\max} sont remplacées par μ et μ_{\max} , (taux de croissance) et l'équation de Michaelis & Menten devient l'équation de Monod (déjà décrite en page 36) :

$$\mu = \frac{1}{B} \cdot \frac{dB}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad \text{III-12}$$

Nous ne mesurons plus la disparition d'espèces chimiques mais l'accroissement de biomasse B résultant de l'assimilation de la matière organique. Cette équation décrivant l'accroissement de biomasse en fonction du substrat peut être vue comme une mesure indirecte de son utilisation par les micro-organismes [73].

d) Choix du modèle pertinent

La biodégradation peut donc se modéliser selon plusieurs cinétiques. Simkins & Alexander (1984) proposent de voir dans la grande variété d'expressions mathématiques et de formes des courbes de biodégradation, le résultat d'interactions entre la concentration en substrat $[S]$ et la densité de biomasse B . En supposant que l'équation de Monod décrive fidèlement la relation entre croissance microbienne μ et concentration en substrat $[S]$, la relation entre le changement de taille des populations et la modification concomitante de la concentration $[S]$ est décrite par le bilan massique [73] :

$$[So] + qB_0 = [S] + qB \quad \text{III-13}$$

Où q est un facteur de conversion de la biomasse en matière organique. Si nous considérons q comme constant, l'expression qB peut être remplacée par X , quantité de substrat nécessaire pour produire une densité de population égale à B . L'équation de Monod peut s'écrire ainsi :

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad \text{III-14}$$

Si nous posons $X_0 = qB_0$ alors l'équation III-13 s'écrit :

$$[So] + X_0 = [S] + X \quad \text{III-15}$$

Et la disparition du substrat en fonction de la biomasse devient :

$$\frac{-d[S]}{dt} = \frac{\mu_{\max} [S] ([S_0] + X_0 - [S])}{K_s + [S]} \quad \text{III-16}$$

Cette équation différentielle est l'expression générale de la disparition du substrat dans un système où seule la densité de population et la concentration en substrat déterminent la

cinétique de dégradation. Elle traduit à la fois l'effet linéaire du changement de densité de population et l'effet non linéaire du changement de concentration en substrat.

Pour des rapports extrêmes entre densité de biomasse X_0 et concentration en substrat $[S]$ ou entre $[S]$ et K_s , l'équation III- 16 se simplifie de la façon suivante[73] :

1. $X_0 \gg [S_0]$ & $[S_0] \ll K_s$. A biomasse constante et concentration en substrat sévèrement limitante, la vitesse de dégradation est proportionnelle à $[S_0]$, c'est l'exemple type des **cinétiques d'ordre 1**. Pas d'accroissement de biomasse dû soit à une concentration limite $[S_0] \ll K_s$, soit un nombre initial de micro-organismes trop important pour la quantité de substrat ;
2. $X_0 \gg [S_0]$ L'équation de **Michaelis & Menten** (équation de Monod sans croissance microbienne) peut être utilisée quand les sites d'adsorption des micro-organismes ne sont pas saturés au départ de l'incubation. Toutefois, la concentration initiale en substrat est insuffisante pour supporter une croissance significative de la biomasse. Nous nous retrouvons dans une cinétique analogue à celle d'une réaction enzymatique ;
3. $X_0 \gg [S_0]$ & $[S_0] \gg K_s$. Saturation des sites enzymatiques et pas d'accroissement de la biomasse. Si la densité microbienne est si grande que la quantité de substrat est insuffisante pour supporter une augmentation de la biomasse, la cinétique de disparition de la matière organique est **d'ordre 0** (linéaire en fonction de temps) ;
4. $[S_0] \ll K_s$. Faible biomasse de départ augmentant sur une concentration en substrat faible. Dans ces conditions, l'accroissement de biomasse a lieu à vitesse décroissante au fur et à mesure que $[S_0]$ diminue. Cette croissance sur ressource limitante donne la courbe sigmoïde ou **logistique**, en forme de S, symétrique par rapport au point d'inflexion ;
5. Une faible densité de micro-organismes dans un milieu où $[S_0]$ est supérieur à K_s . Il y a croissance microbienne avec disparition du substrat, la dégradation est décrite par **l'équation de Monod** ;
6. $[S_0] \gg K_s$ quand $[S_0]$ est très supérieur à K_s (en pratique $[S_0] > 32K_s$) la majeure partie du substrat disparaît alors que le système de la cellule est saturé. Dans ces conditions ($K_s + [S_0] \approx [S_0]$) la cinétique de dégradation suit un **modèle logarithmique**. C'est la situation la plus communément étudiée par les bactériologistes.

Tableau III-5: Récapitulatif des différents modèles de cinétique de biodégradation en fonction de la concentration en substrat S et de la densité de la population microbienne [73].

Modèles	$-d[S]/dt =$	Constantes de vitesses
1. Ordre 1	$K[S]$	$K = \mu_{\max} \frac{X_0}{K_S} (h^{-1})$
2. Michaelis et Menten	$K \frac{[S]}{K_S + [S]}$	$K = \mu_{\max} X_0 (mg.l^{-1}.h^{-1})$
3. Ordre 0	K	$K = \mu_{\max} X_0 (mg.l^{-1}.h^{-1})$
4. Logistique	$K[S]([S_0] + X_0 - [S])$	$K = \frac{\mu_{\max}}{K_S} (l.mg^{-1}.h^{-1})$
5. Monod	$\frac{K[S]([S_0] + X_0 - [S])}{K_S + [S]}$	$K = \mu_{\max} (h^{-1})$
6. Logarithmique	$K([S_0] + X_0 - [S])$	$K = \mu_{\max} (h^{-1})$

(D'après Battersby, 1990)

Chapitre : III

Matériels et méthodes

IV Matériels et méthodes

Introduction :

Le présent travail a pour but d'étudier l'influence des conditions de dégradation du phénol en fermenteur en utilisant une souche bactérienne dite *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour ce faire, nous avons procédé comme suit :

- En premier lieu, à la description du matériel et des méthodes utilisés tout au long de nos manipulations et le plan expérimental suivi.
- En second lieu nous étudions l'influence des conditions opératoires sur de dégradation du phénol.

IV -1 Matériels :

IV -1-1 matériel biologique :

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

IV-1-2 Milieu de culture :

Le milieu de culture contient les substances nutritives indispensables à la croissance des microorganismes, *Pseudomonas aeruginosa* est cultivée dans un milieu de culture dont la composition est détaillée dans l'annexe [74].

IV-1-3 produits :

a) Les Réactifs de dosage du phénol : les produits utilisés pour le dosage du phénol sont cités en annexe.

b) Appareils utilisés :

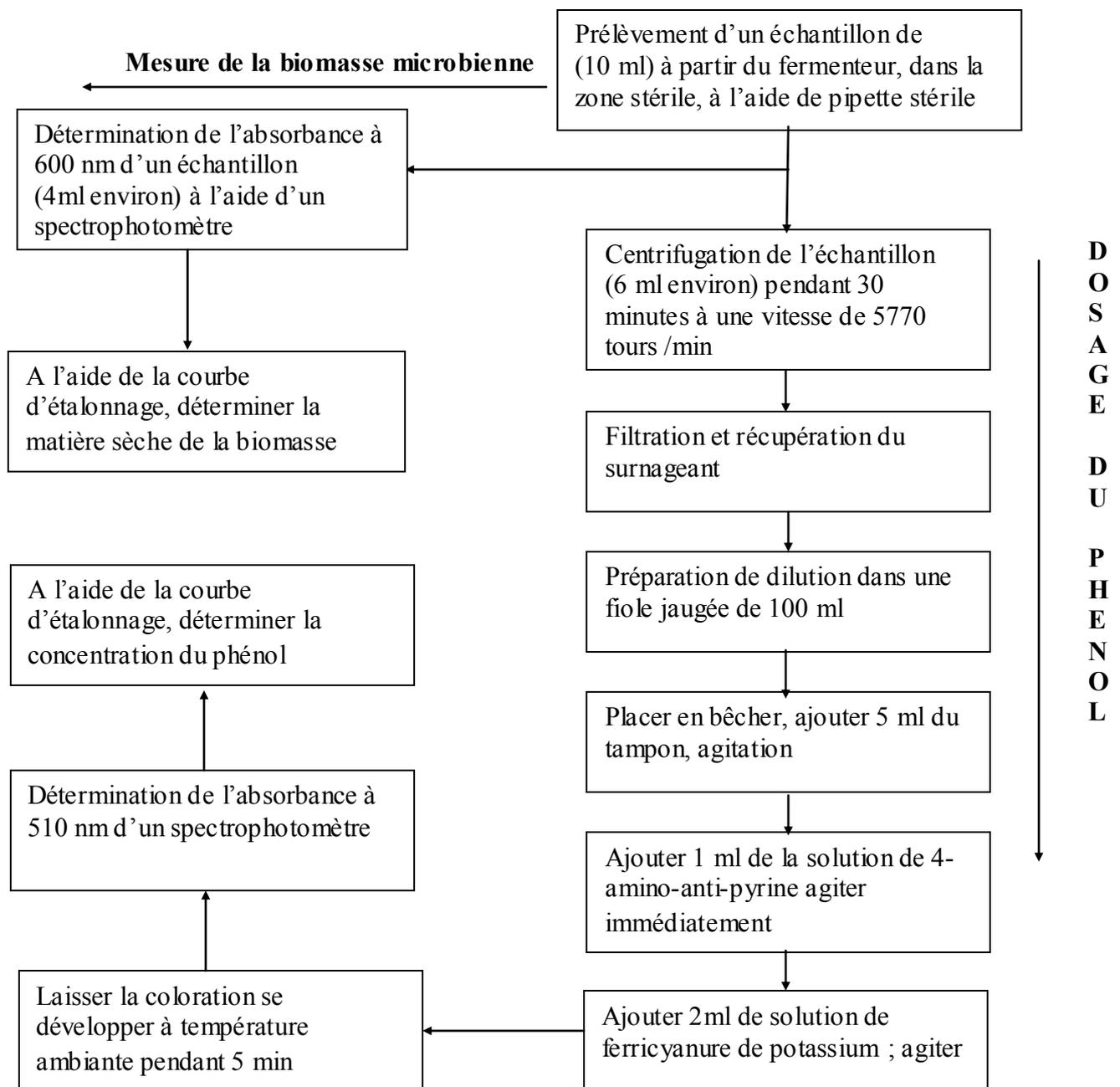
Le tableau IV-1 qui résume les différents matériels utilisés pour l'élaboration de cette étude se trouve en annexe.

IV-2 Méthodes :

IV-2-1 Protocole expérimental :

Pour que la biodégradation puisse se faire dans des conditions optimales d'asepsie, le protocole suivant est suivi :

- Stériliser le fermenteur contenant le milieu de culture à l'autoclave à 120°C pendant 20 min ;
- La préculture préparée 24 h ou 48 h avant l'expérience ;
 Dans la zone stérile :
 - Ajouter respectivement CaCl_2 et FeSO_4 et la solution du phénol d'une concentration connue par filtration stérilisante au fermenteur ;
 - Ajouter la préculture d'un inoculum de 1% au fermenteur.
 - Fixer les conditions opératoires sur le fermenteur (aération, agitation (70 tours /min) et T°C).



IV-2-2 Conservation de la souche :

La souche est conservée pendant tout la période de l'étude, sur des milieux inclinés (King A, gélose nutritive) qui permettront sa conservation pendant une période qui peut aller jusqu'à 6 mois.

IV-2-3 Coloration de Gram :

Cette méthode est basée sur la différence de structure de la paroi chez les deux groupes, forte proportion de lipides (20%) chez les gram négatif, faibles traces chez les gram positif [56, 75,76] voir annexe.

IV-2-4 Mesure de la biomasse microbienne :

La mesure de l'opacification du milieu de culture est une technique très prisée pour mesurer la biomasse, c'est la masse bactérienne sèche présente par unité de volume .Il est en effet possible d'utiliser une loi, analogue à celle de Beer-Lambert. Le détail de cette technique est présenté en annexe [13,70].

IV-2-4-1 Etalonnage :

La détermination de la matière sèche cellulaire est la méthode la plus rigoureuse. La biomasse microbienne est récupérée généralement par centrifugation, lavée afin d'éliminer le milieu de culture retenu entre les cellules et séchée à 105°C jusqu' à poids constant.

Cette technique s'applique aux suspensions assez denses et dans lesquelles les micro-organismes sont les seules particules en suspension [43, 77].

IV-2-4-2 La technique :

- 200 ml de culture bactérienne sont centrifugés puis lavés avec de l'eau distillée 3 fois.
- Le culot est remis en suspension dans 60 ml d'eau distillée.
- La DO est lue à 600 nm d'un spectrophotomètre.
- 50ml de cette suspension est séchée à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant ($m - m_0$).

$$C_0 = \frac{(m - m_0)}{50ml} \quad \text{IV-3}$$

- Le reste (10ml) est utilisé pour la préparation des dilutions. Pour chaque dilution, la prise de DO est effectuée à 600nm.
- La courbe des DO en fonction des concentrations est établie.

L'allure de la courbe obtenue est une droite représentée en annexe. Par le biais de cette courbe d'étalonnage, nous arrivons à déterminer les concentrations inconnues (matière sèche); c'est-à-dire qu'elles sont calculées à partir de l'équation de suivante :

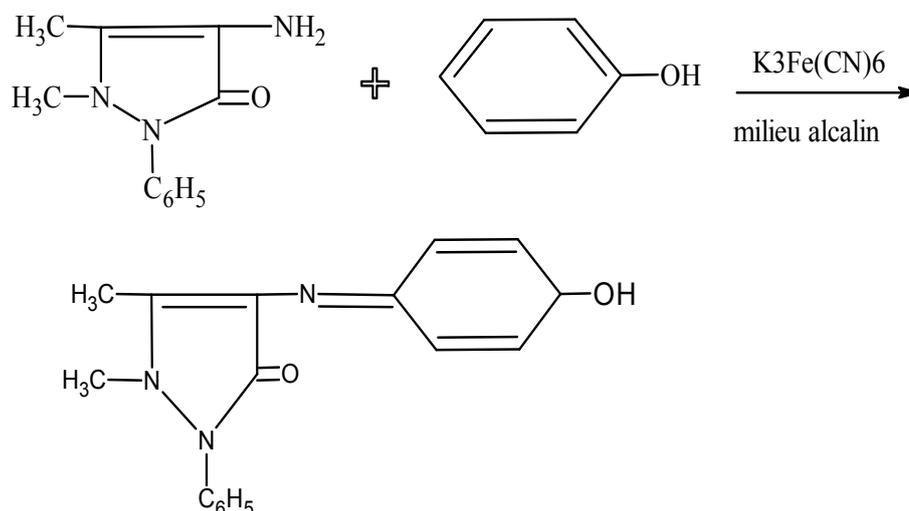
$$X \text{ (mg/l)} = 434,78 \text{ DO (à 600 nm)} \quad \text{IV-4}$$

IV-2-5 Dosage du Phénol :

IV-2-5-1 Principe :

Le phénol a été quantifié par méthode colorimétrique basée sur la condensation du 4-amino-antipyrène avec le phénol en présence d'un agent oxydant ferricyanure de potassium dans un milieu alcalin pour donner un complexe de couleur rouge, intensité de cette dernière dépend de la concentration du phénol NF (T 90-204).

La réaction est la suivante [78, 79, 80] :



Cette méthode à une limite de détection du phénol de 5 mg/l.

IV-2-5-2 Etalonnage :

- A partir de la solution mère de phénol à 1 g/l préparer par dilutions, de manière à obtenir des solutions étalons contenant respectivement 0 - 0,5 - 1 - 1,5 -5mg/l.
- Prélever 100 ml de chacune de ces solutions, ajuster le pH à 9,5 à l'aide de la solution tampon (5ml).
- Introduire 1 ml de la solution de 4-amino-antipyrine; mélanger le tout immédiatement.
- Ajouter 2ml de solution de ferricyanure de potassium ; mélanger de nouveau.
- Laisser reposer pendant 5 min pour permettre le développement de la coloration (à température ambiante). Celle-ci reste stable pendant 2 à 3h.

La courbe exprimant la relation entre la DO à 510 nm et la concentration en phénols (mg/l) est représentée en annexe.

IV-2-5-3 Dosage du phénol :

- Prélever un échantillon (10 ml) du fermenteur à l'aide d'une pipette stérile de 10ml, dans la zone stérile.
- Centrifuger l'échantillon (vitesse de 5770 tours/ min, durée de 30minutes) [81].
- Filtrer l'échantillon centrifugé et récupérer le surnageant.
- Préparer la dilution à partir du surnageant, en utilisant une fiole jaugée de 100 ml tout en tenant compte de la limite de détection du phénol de la méthode (5 mg/l).
- Dans un bêcher de 125ml contenant 100 ml de la solution à doser ajouter 5 ml de tampon afin d'ajuster le pH de la solution à 9,5 ;
- Ajouter 1 ml de la solution de 4-amino-antipyrine agiter immédiatement ;
- Ajouter 2ml de solution de ferricyanure de potassium ; agiter ;
- Nous laissons la coloration se développer à température ambiante pendant 5 min.
- Enfin nous déterminons l'absorbance de la solution à 510 nm au spectrophotomètre et par le biais de cette courbe d'étalonnage, nous arrivons à déterminer la concentration inconnue du phénol; c'est-à-dire qu'elle est calculée à partir de l'équation suivante :

$$[\text{Phénol}] \text{ (mg/l)} = 10,214 \text{ DO (à 510 nm)}$$

IV-5

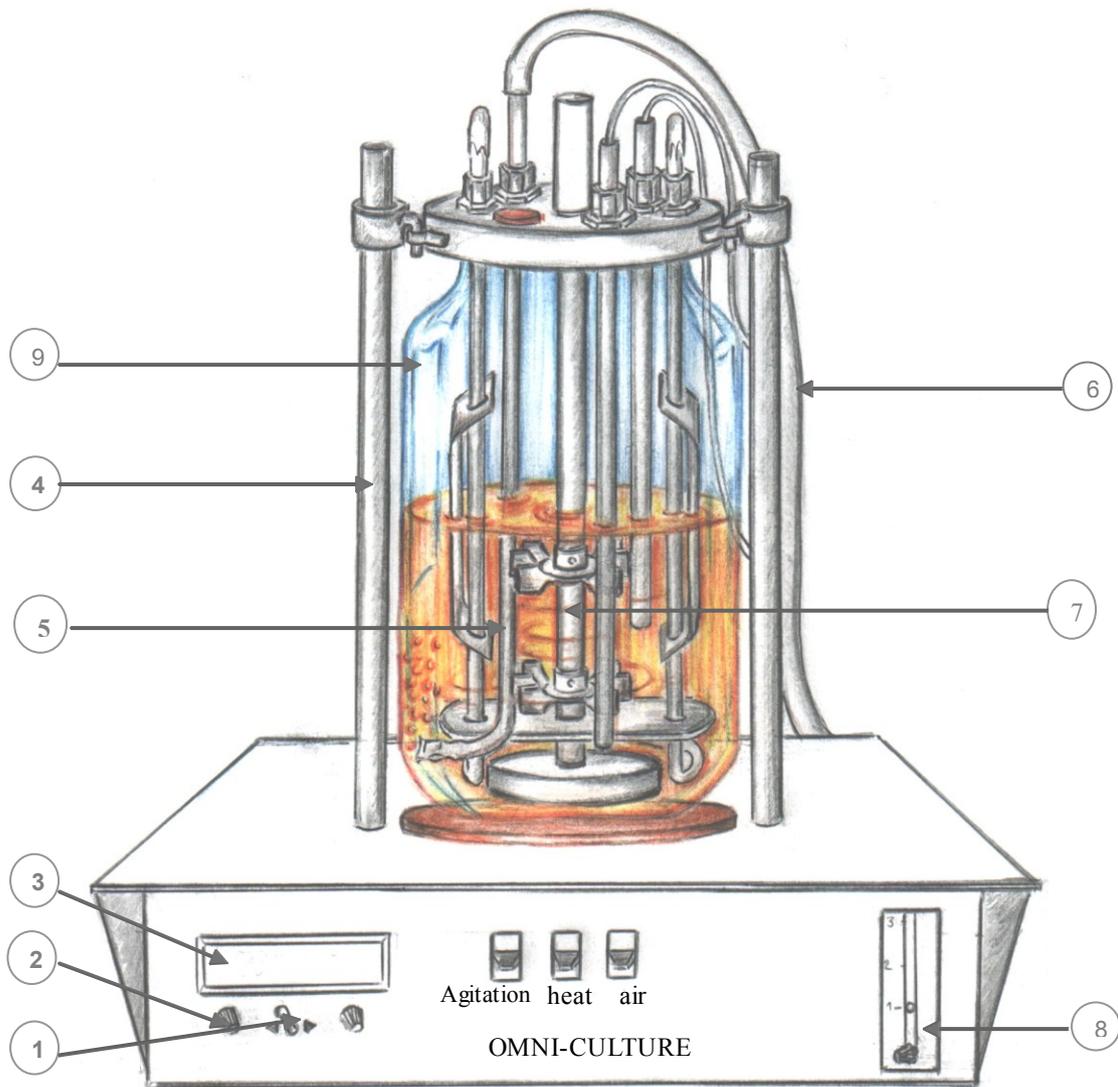
IV-2-6 Filtre stérilisant :

Nous ajoutons le phénol au fermenteur à travers un filtre stérilisant montré ci-dessous pour éviter toute contamination du milieu.



Figure IV- 1 : Filtre stérilisant (ou filtre à seringue) (0,45 µ m)

IV-2-7 Dis positif expé rimental :



- (1) : bouton de sélection (vitesse /température) (9) : jarre en verre (2 litres)
(2) : bouton de fixation (vitesse /température) (6) : tuyau d'aération
(3) : indicateur numérique (7) : mobile d'agitation
(4) : support (8) : débitmètre à flotteur
(5) : conduite transmettant l'air dans le fermenteur

Figure IV-2: Fermenteur biologique

Chapitre V

Résultats et discussions

V Résultats et discussions

V-1 Observation de la souche :

Le test de coloration de Gram a montré que la souche « *Pseudomonas aeruginosa* » se présente comme un bacille Gram⁻, comme le montre la photo ci dessous :

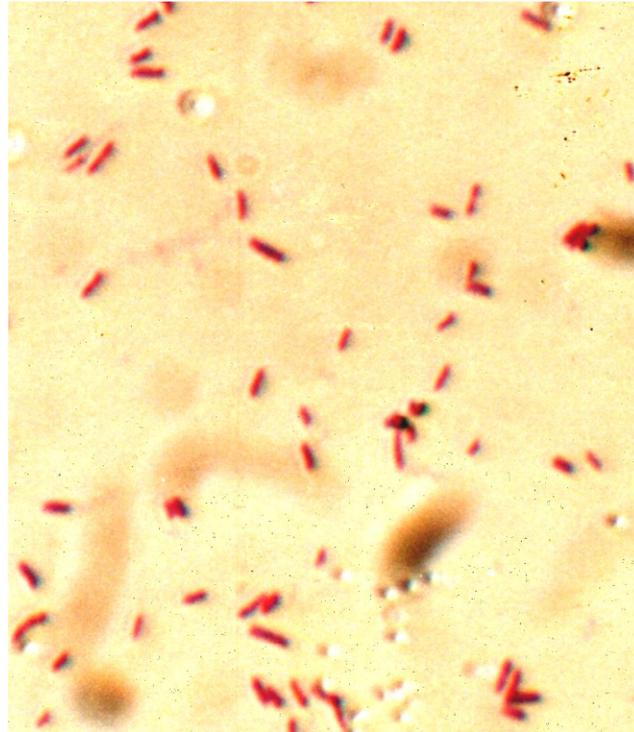


Figure V-1 : Observation de la souche au microscope photonique Gx133 après coloration de gram

V-2 Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en fermenteur

Les micro-organismes sont capables d'effectuer une grande diversité de réactions biochimiques qui se traduisent par une production de biomasse, c'est-à-dire de corps cellulaire, et par la dégradation, la transformation ou la production de substances organiques ou minérales [43].

V -2-1 Influence du milieu sur la dégradation du phénol :

Nous avons essayé de voir l'effet de chaque constituant du milieu d'abord seul sur la biodégradation du phénol et la croissance bactérienne et ensuite nous avons finalisé cette étape par l'utilisation du milieu complet .Les résultats obtenus nous ont permis de tracer l'évolution de la cinétique bactérienne et la biodégradation du phénol pour chaque milieu, les courbes sont représentées sur les figure V-2.

Les différents milieux sont composés, en maintenant les autres conditions opératoires pour chaque cas : comme le montre le tableau V-1 :

Tableau V-1 : Composition des milieux de culture :

Milieux	Concentration initiale du Phénol	Composition du milieu	Conditions opératoires
M ₁	+100 mg/l	Eau distillée	+1% de pré culture (Ps) à T (°C)=30 « pas agitation et pas d'aération »
M ₂		Eau distillée +0.5mg/l glucose	
M ₃		Eau distillée +extrait de levure	
M ₄		Eau distillée+minéraux	
M ₅		Milieu complet « Eau distillée +glucose +minéraux +extrait de levure »	

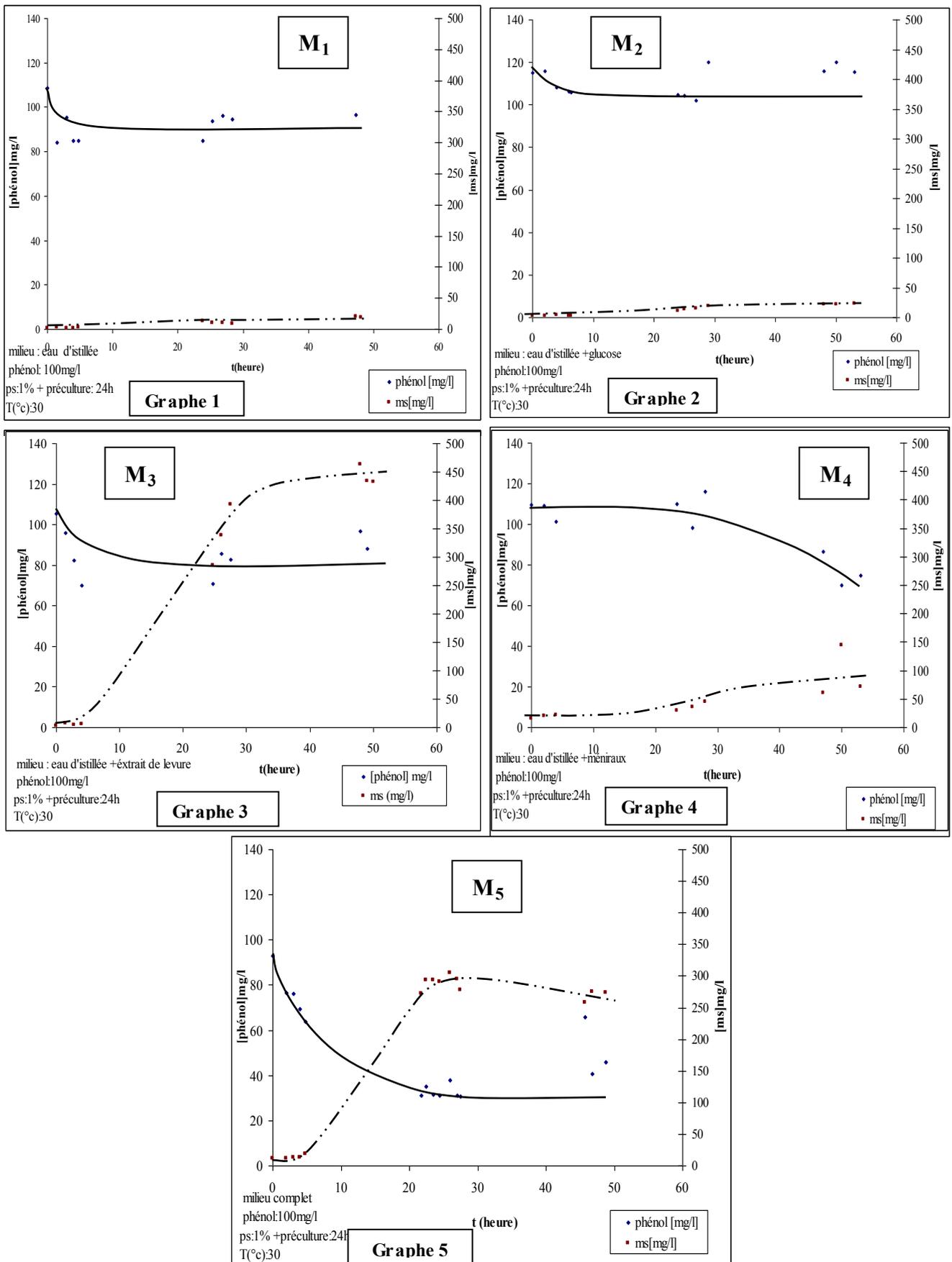


Figure V-2 : Cinétique bactérienne et biodégradation du phénol pour les milieux M₁, M₂, M₃, M₄ et M₅

Dans le métabolisme pour la croissance, on remarque que la cinétique de croissance suit la cinétique de dégradation du phénol, ce qui laisse supposer que la bactérie possède les enzymes nécessaires à ce métabolisme. L'induction de ces enzymes aurait été stimulée par l'adaptation de la bactérie au phénol lors de la préculture, puisque on constate que la biodégradation démarre juste au début de la culture (figure V-2).

V-2-1-1 Milieu M1 :

En analysant graphe 1 de la figure V-2, on trouve qu'en présence de phénol dans l'eau distillée (M1), la cinétique de croissance et de biodégradation du phénol est pratiquement nulle. Cela est dû au fait que le milieu est dépourvu d'éléments nutritifs indispensables pour l'activité de la bactérie.

V-2-1-2 Milieu M2 :

En présence du glucose (cas de M₂) figure V-2, graphe 2, nous remarquons une légère amélioration de croissance bactérienne, mais la cinétique de dégradation du phénol reste semblable à celle du M₁. D'après l'étude de Wang et Baltzis, quand le glucose et le phénol sont présents dans le milieu, la bactérie les utilise simultanément [82]. Chaque diminution de 400mg /l de glucose correspond à une diminution 20mg /l de phénol [21].

En prolongeant la durée de culture bactérienne (10 jours) et en gardant la même composition du milieu nous avons pu avoir une biodégradation totale du phénol comme le démontre la figure V-3, au cours des 50 premières heures (cas de M₂), il y a eu consommation du glucose comme source majeure d'énergie. Après son épuisement la bactérie a eu recours au phénol comme source secondaire d'énergie.

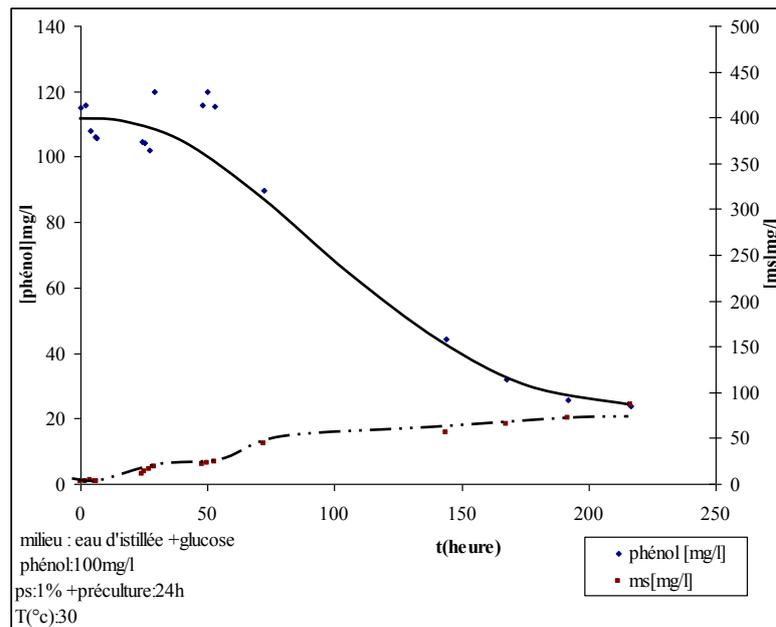


Figure V-3 : cinétique bactérienne et biodégradation du phénol pour le milieu M₂ au cours de 216 heures

V -2-1-3 Milieu M₃ :

Présence de l'extrait de levure, les facteurs de croissance sont disponibles, la croissance est meilleure. la dégradation du phénol est toujours faible, cependant elle est meilleure que celle enregistrée avec l'eau distillée M₁ et M₂, la dégradation se fait en phase exponentielle entre (5 et 28 h) (figure V-2 , graphe3).

L'extrait de levure apporte les cofacteurs nécessaires aux enzymes de dégradation du phénol. Cependant, il apporte aussi d'autres sources facilement assimilables (les acides aminés) qui peuvent retarder sa dégradation effective.

La légère amélioration n'est donc due qu'à la disponibilité d'une plus grande population bactérienne à faible potentiel de dégradation du phénol.

V -2-1-4 Milieu M₄ :

En présence d'oligo-éléments; les cofacteurs nécessaires à la dégradation du phénol sont disponibles (cas de M₄) (figure V-2, graphe 4). L'absence d'une autre source facilement assimilable oblige la biomasse à utiliser le phénol ce qui donne une meilleure cinétique de dégradation du phénol.

La croissance enregistrée est plus faible que celle obtenue en présence d'extrait de levure, ceci est dû à l'absence des facteurs de croissance (acides aminés, vitamines).

V -2-1-5 Milieu M₅ :

Nous remarquons d'après la figure V-2 (graphe 5) que la dégradation du phénol en milieu complet (eau distillée+ minéraux+glucose+extrait de levure+100 mg/l du phénol) M₅ se fait en phase exponentielle entre (4 et 22 h), on assiste à une dégradation de près de 70% au bout de 30 heures, nous pouvons dire que le phénol serait utilisé en même temps que le glucose « source d'énergie ».

V -2-1-6 Les Paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol :

Pour mieux exploiter et maîtriser les courbes de croissance et les courbes de biodégradation du phénol nous avons calculé les paramètres de croissance et le rendement d'élimination du phénol comme le montre le tableau V-2.

Tableau V- 2 : Paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol

Milieux de culture	Equation de la phase exponentielle de la courbe de croissance	μ_{max} (1/h)	Rendement d'élimination du phénol R (%)
M ₁	$Y = 0,081X + 0,4223$	0,117	12
M ₂	$Y = 0,095X + 0,1881$	0,138	11
M ₃	$Y = 0,180X + 1,1164$	0,261	24
M ₄	$Y = 0,026X + 2,9247$	0,038	36
M ₅	$Y = 0,1647X + 2,0306$	0,239	70

D'après les résultats du tableau on peut déduire :

⇒ Que le taux de croissance de milieu M3 (eau distillée + extrait de levure + 100 mg phénol) est le meilleur (graphe 3 dans la figure V-2,) ; par contre le rendement d'élimination est faible ce qui explique que la bactérie a utilisé l'extrait de levure comme source d'énergie et non pas le phénol c'est-à-dire qu'elle a commencé par consommer le phénol après avoir épuisé l'extrait de levure. Le taux de croissance élevé est dû au fait que l'extrait de levure est un mélange riche d'acides aminés qui apporte de l'énergie ainsi que des éléments de base nécessaires pour la multiplication bactérienne.

⇒ Concernant le milieu M2 (eau distillée+glucose+100 mg/l phénol), le taux de croissance est faible (graphe 2 dans la figure V-2,) par rapport au M3 et M5, ainsi que le rendement d'élimination du phénol par la bactérie ; la bactérie a utilisé en priorité la forme la plus simple (glucose) comme seule source de carbone et d'énergie [42], cette source est assimilée plus rapidement que l'extrait de levure qui est un mélange plus complexe mais plus énergétique.

⇒ En prolongeant la durée de la fermentation jusqu'à 216 h nous avons remarqué que le rendement d'élimination du phénol par les bactéries devient 80% (cas d'épuisement de glucose).Le phénol est donc dégradé à des niveaux satisfaisants mais tardivement (figureV-3).

⇒ La plupart des espèces de *Pseudomonas* sont prototrophes « c'est à dire capables de croître en milieu minéral défini contenant une source unique de carbone et d'énergie [56] ce qui explique le rendement d'élimination du phénol (36%) de M4 (graphe 4 dans la figure V-2,) (eau distillée + les minéraux +100 mg phénol). Le taux de croissance enregistré dans ce cas est le plus faible. Ce ci peut être expliqué par le fait que le phénol est une source de carbone difficilement assimilable ; son apport en énergie nécessaire pour la multiplication bactérienne est tardif et même faible par rapport au glucose (cas M₂) et à l'extrait de levure M₃.

⇒ En utilisant un milieu très pauvre en oligoéléments et en source de carbone facilement assimilable (cas M1), le taux de croissance est faible en comparant avec celui de M2 [82], M3 et M5, le rendement d'élimination du phénol est le plus bas (environ de 12 %) (graphe 1 dans la figure V-2,) ainsi que ce même taux de dégradation est atteint en cas de M₂ (figure V-2 et graphe 2). Ceci explique le rôle important des oligoéléments (nécessairement Mg²⁺) dans l'activité bactérienne (Coenzymes nécessaires pour l'activité catalytique des enzymes qui dégradent le phénol) [21]. Ce rôle apparaît nettement lorsqu'on utilise un milieu à base de minéraux (cas M4) où le rendement de dégradation de phénol est moyen (36 %). En prolongeant la durée de la fermentation jusqu'à 72 h nous avons remarqué que le rendement d'élimination du phénol par la bactérie augmente jusqu'à 96%, ceci a été confirmé par l'étude de Ojumu et Bello [84], qui fixe la dégradation totale du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* à 60 h et la dégradation total du phénol par *Pseudomonas fluorescense* à 84 h.

⇒ En combinant les différents constituants étudiés (cas M5), nous avons remarqué que le taux de croissance est comparable à celui obtenu avec le milieu à base d'extrait de levure et le rendement d'élimination du phénol est maximal (70%) (, graphe 5 dans la figure V-2).

L'évolution du rendement de biodégradation du phénol, les taux de croissance bactérienne et les constantes de cinétique de dégradation du phénol enregistrées dans différents milieux sont illustrés dans la figure V-4.

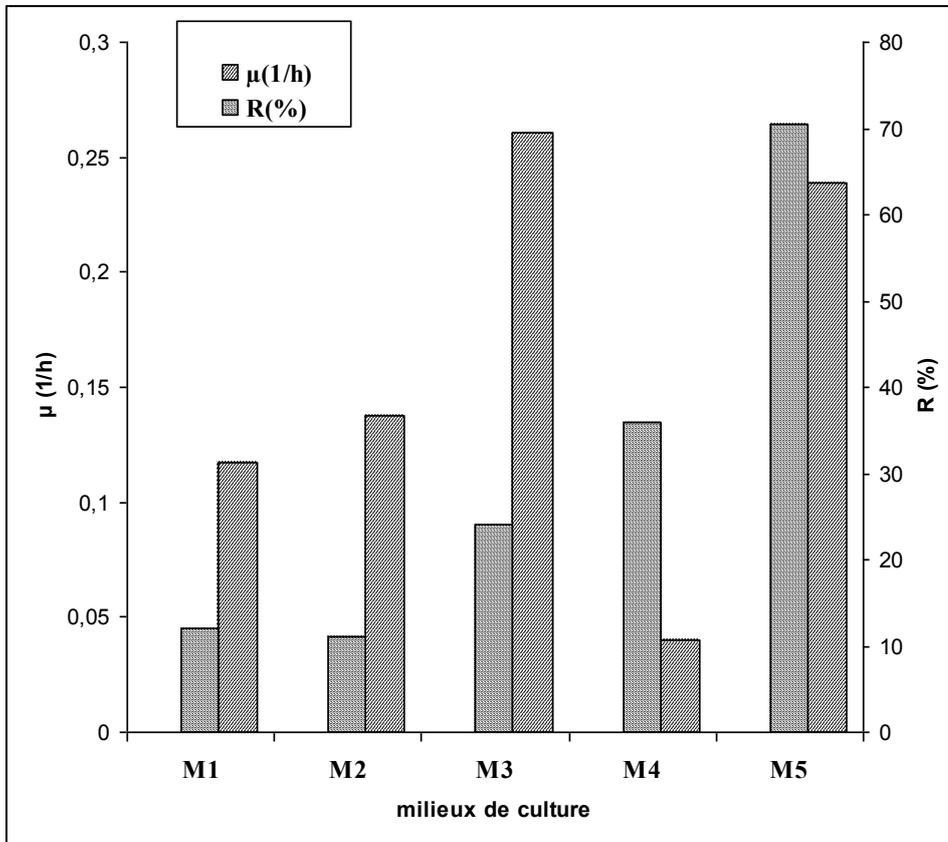


Figure V -4 : l'influence de la variation du milieu sur le taux de croissance (μ) et le rendement d'élimination du phénol (R)

V -2-3 Influence de l'aération sur la dégradation du phénol :

Les traitements aérobie requièrent le transfert d'oxygène dans l'eau car seul l'oxygène dissout est utilisable par les cellules. La faible dissolution de l'oxygène dans l'eau (maximum de 10 mg/l à la température ambiante) exige que ce dernier soit fourni constamment dans le milieu de culture. L'oxygène intervient dans certains mécanismes de régulation du métabolisme de façon directe comme inducteur ou répresseur de la synthèse d'enzymes respiratoires, mais aussi de façon indirecte du fait de son rôle dans le métabolisme énergétique [43].

L'aération sert non seulement à combler les besoins en oxygène des bactéries entre autre pour oxyder le polluant mais aussi à agiter le milieu, à éloigner les produits de la fermentation du voisinage immédiat des cellules et à apporter de nouvelles substances nutritives. L'aération influence ainsi positivement la croissance des bactéries [64, 85].

Pour mieux voir l'effet de l'aération sur la biodégradation du phénol nous avons choisi les conditions regroupées dans le tableau V-3.

Tableau V-3 : Les conditions opératoires dans cas de l'introduction de l'aération

Composition du milieu	Concentration initiale du Phénol	Débit d'oxygène	Les conditions opératoires
Milieu complet « M ₅ »	+100 mg/l du	0 l/min d'O ₂	+1% de pré culture (Ps) Température (°C)=30 Agitation =70 tour/min
		0,21 l/min d'O ₂	
		0,42 /min d'O ₂	
		0,63 l/min d'O ₂	

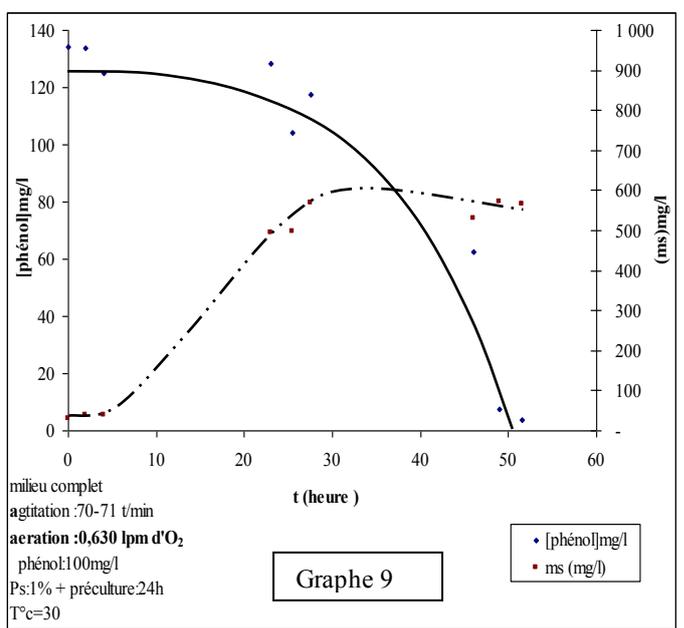
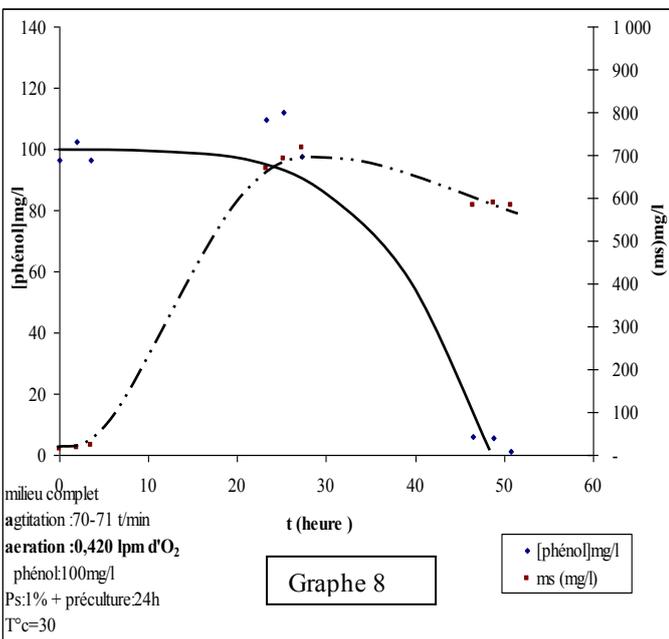
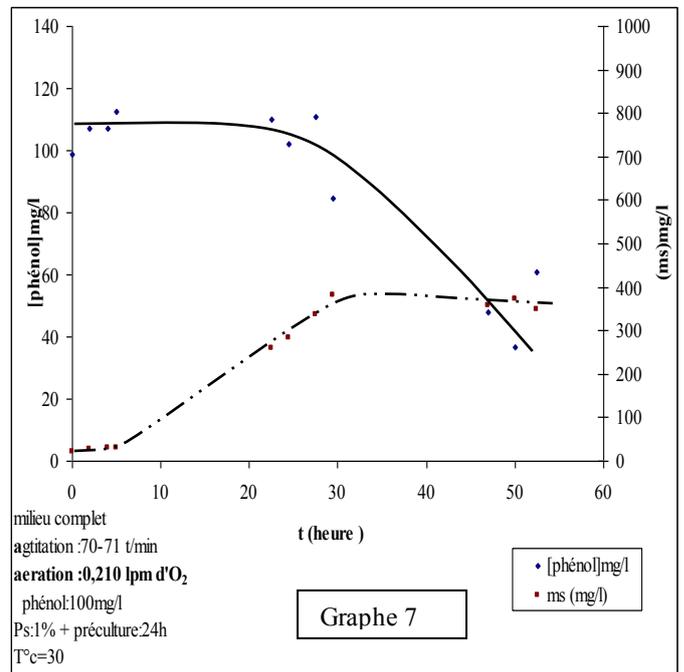
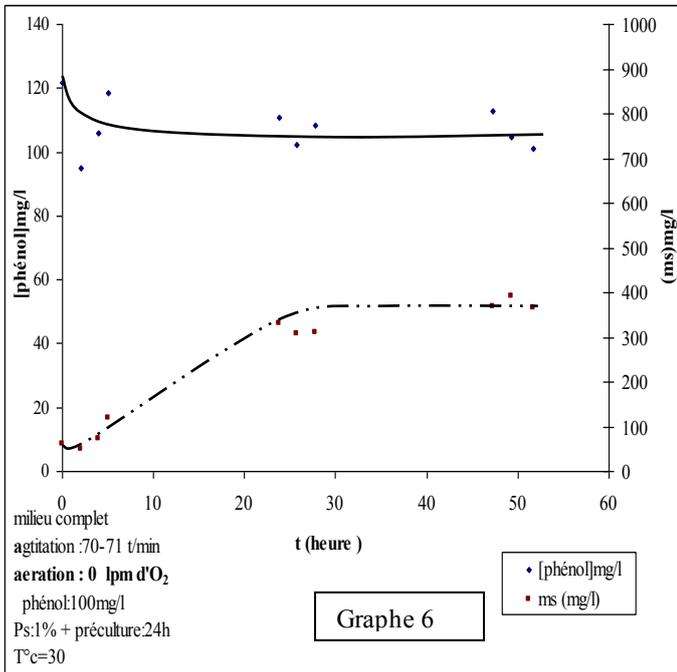


Figure V-5 : L'influence de la variation de l'aération « 0, 0,210, 0,420 et 0,630 l/min d'O₂ » sur la cinétique bactérienne et biodégradation du phéno

Pour les trois graphes 7, 8 et 9 nous remarquons quand nous avons introduit l'aération, la dégradation du phénol se fait en phase stationnaire c'est-à-dire après l'épuisement des nutriments du milieu de culture.

La dégradation du phénol est très voisine pour les deux taux d'aération (0,42 l/min d'O₂, 0,630 l/min d'O₂) donnant des concentrations de phénol presque nulles au bout de 50 heures. Le taux d'élimination du phénol enregistré pour l'aération 0,210 l/min d'O₂ pour le même temps est nettement inférieur donnant une concentration résiduelle voisine de 40mg/l, l'aération apparaît donc importante (en comparant le graphe 6 avec les graphes 7, 8 et 9 de la figure V-5) avec un optimum de 0,420 l/min d'O₂, l'augmentation de l'aération au delà de ce taux n'améliore pas significativement le rendement d'élimination du phénol figure V-7.

Le processus de dégradation du phénol apparaît nettement lié à l'oxygénation, il est donc aérobie.

V -2-3-1 Les Paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol :

Pour mieux exploiter et maîtriser les courbes de croissances et les courbes de biodégradation du phénol nous avons calculé les paramètres de croissances et le rendement d'élimination du phénol, comme le montre le tableau V-4.

Tableau : V-4 les paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol, cas d'introduction de l'aération

Débit d'air (l/min)	Débit d'O ₂ (l/min)	Equation de la phase exponentielle de la courbe de croissance	μ_{\max} (1/h)	Rendement d'élimination du phénol R (%)
0	0	$Y = 0,0668X + 4,224$	0,097	16
1	0,210	$Y = 0,1064X + 2,954$	0,154	63
2	0,420	$Y = 0,1706X + 2,5402$	0,247	99
3	0,630	$Y = 0,1328X + 3,1469$	0,192	97

La figure V-6 Montre que :

A des taux d'aération faibles (0 et 0,210 l d'O₂ /min), le taux d'O₂ est insuffisant pour la respiration aérobie (O₂ accepteur final d'électrons) [4], la respiration anaérobie pourrait être la voie de secours (NO₃⁻ accepteur final d'électrons). L'énergie nécessaire pour la multiplication bactérienne est dans ce cas insuffisante, ce qui implique que le taux de croissance μ est faible.

Lorsque l'aération est suffisante (0,420 l d'O₂ /min), la respiration aérobie de la bactérie génère l'énergie nécessaire pour la croissance maximale. Cependant, lorsque le débit d'O₂ dépasse les limites de 0,420 l/min (0.630 l/min), nous remarquons une diminution du taux de croissance, ceci est du à un effet d'inhibition causé par l'oxygène.

Le débit de 0,420 l d'O₂ /min est compatible aussi bien pour la croissance que pour l'élimination du phénol, comme le montre la figure V-6

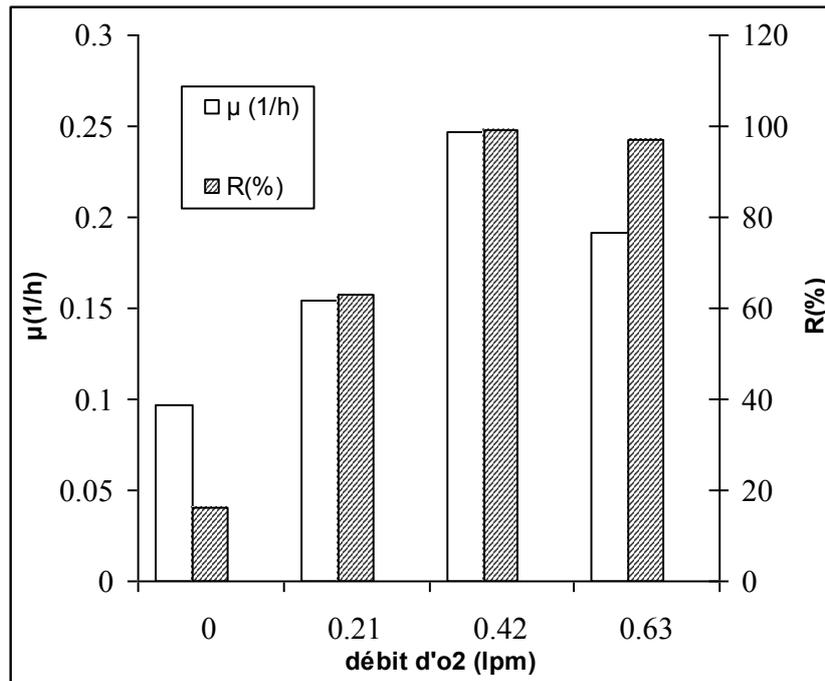


Figure V-6 : la variation de taux de croissance (μ) et le rendement d'élimination du phénol (R) en fonction du débit d'O₂

V-2-4 Influence de la température sur la dégradation du phénol :

Dans ce cas on a varié la température (30, 37, 40, 45 et 50°C) en gardant les autres paramètres fixes comme le montre le tableau ci dessous :

Tableau V-5 : Conditions opératoires en cas de variation de température

Composition du milieu	Concentration initiale du Phénol	Température (C°)	Les conditions opératoires
Milieu complet « M₅ »	+100 mg/l	30	+1% de pré culture (Ps) Agitation=70 tour/min Aération =0,210 l/min d'O ₂
		37	
		40	
		45	
		50	

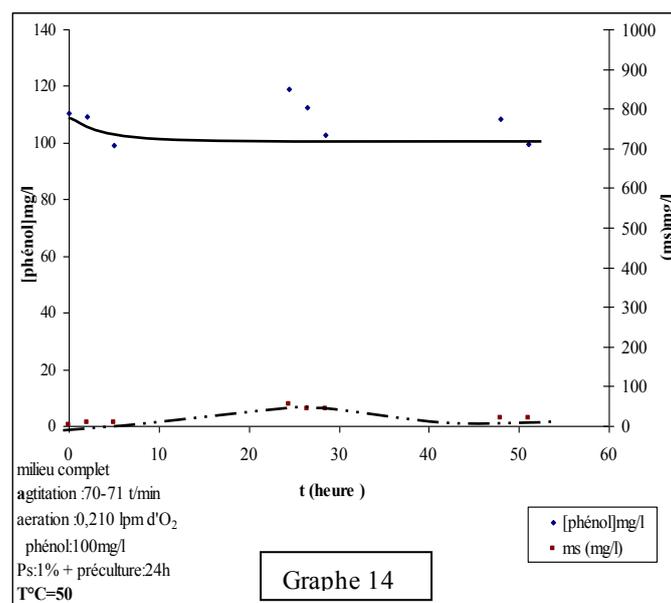
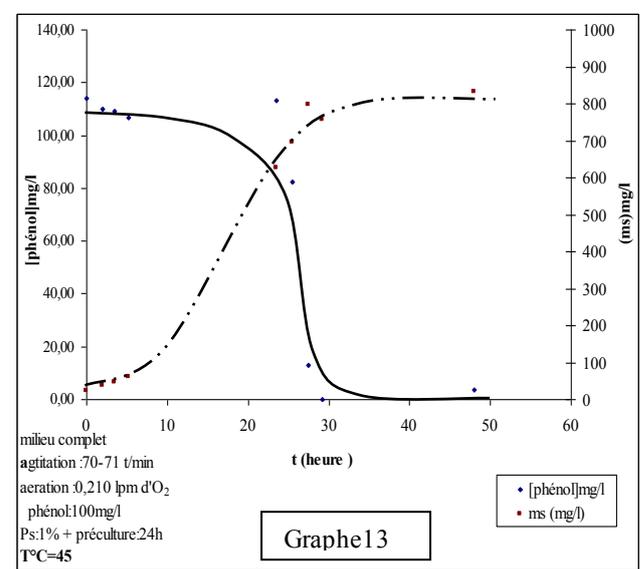
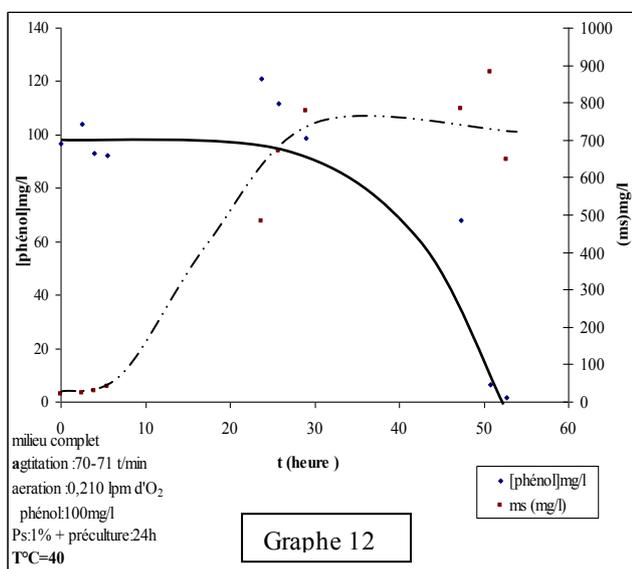
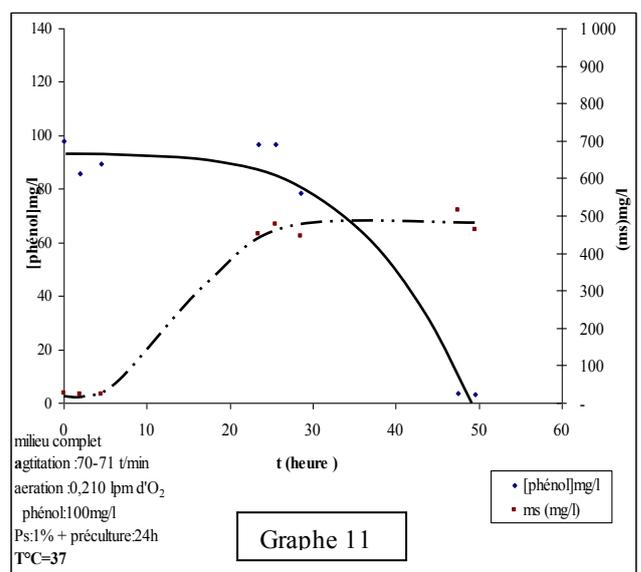
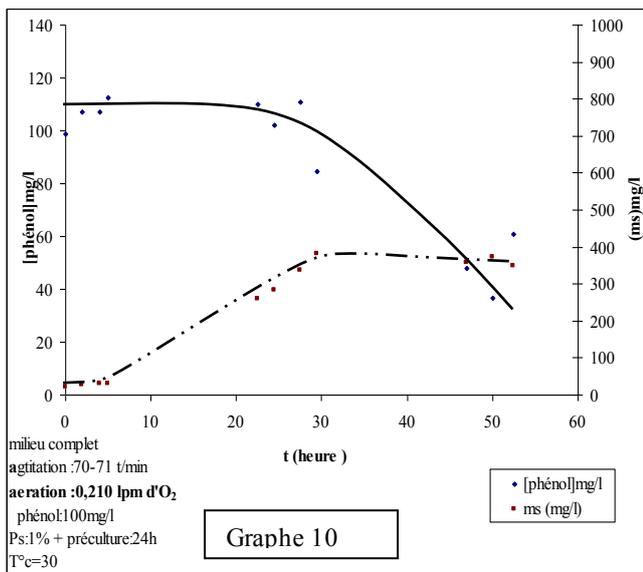


Figure V-7 : L'influence de la variation de la température (30, 37, 40, 45 et 50°C) sur la cinétique bactérienne et biodégradation du phénol

V -2-4-1 Température 30 °C :

La phase stationnaire de la croissance est atteinte à partir de 30 heures .A u cour de cette phase commence la dégradation du phénol jusqu'à la concentration résiduelle = 37 mg/l à 50 heures (Graphe 10).

V -2-4-2 Température 37 °C :

Dans ce cas, la phase stationnaire est peu précoce (à partir de 22 heures), la dégradation du phénol se fait toujours en phase stationnaire jusqu'à la concentration résiduelle dégradation presque nulle à 50 heure (Graphe 11).

V -2-4-3 Température 40 °C :

La population bactérienne atteinte est plus importante, la dégradation du phénol aboutit à un taux relativement faible au cours de 50 à 52 heures (Graphe 12).

V -2-4-4 Température 45 °C :

0La teneur en biomasse est la plus importante aboutissant à une dégradation rapide du phénol au cours de la phase de ralentissement jusqu'à un taux = 0 mg/l du phénol à 30 heures (Graphe 13).

V -2-4-5 Température 50 °C :

La croissance cellulaire est défavorisée car, la phase stationnaire est très courte (25 et30h) aboutissant à un déclin précoce (de 30 à 50 h) en parallèle la dégradation du phénol est très faible (9,78 %), s'expliquant par une diminution de l'activité des différentes enzymes de dégradation (Graphe 14).

V -2-4-6 Les paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol : Pour mieux exploiter et maîtriser les courbes de croissance et celles de biodégradation du phénol nous avons calculé les paramètres de croissance et le rendement d'élimination du phénol comme le montre le tableau V-6

Tableau V-6 : Influence de la température sur la cinétique bactérienne et le rendement d'élimination du phénol

T (°C)	L'équation de la phase exponentielle de la courbe de croissance	$\mu_{\max}(1/h)$	Rendement d'élimination du phénol R (%)
30	$Y=0,1064x + 4,635$	0,154	63,00
37	$Y = 0,1597X + 2,360$	0.231	96.60
40	$Y = 0,1411X + 2,854$	0,204	98.21
45	$Y = 0,1295X + 3,402$	0.187	99.95
50	$Y = 0,0923X + 1,750$	0,134	09.78

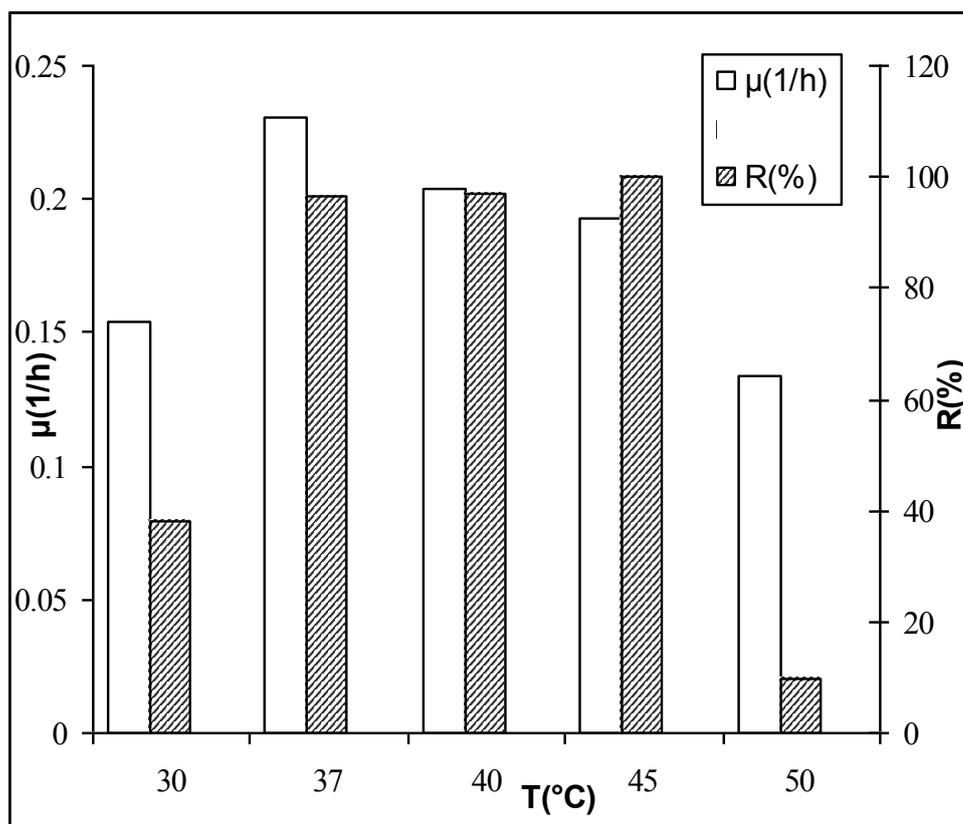


Figure V-8 : Influence de la température (T) sur le taux de croissance (μ) de bactérie et le rendement d'élimination du phénol(R)

Nous pouvons déduire de la figure V-8 ci dessus que la température optimale pour la croissance des bactéries est de 37°C. Ce résultat concorde avec les données théoriques concernant l'activité des pseudomonas qui montrent que la température optimale est située entre 30 et 45°C pour des PH compris entre 6,5 et 8 [56, 86] Cependant, le rendement d'élimination du phénol est maximal à la température 45°C (T° optimale de dégradation).

L'augmentation de la température entre 37°C et 45°C n'a pas un effet significatif sur le rendement d'élimination du phénol lui-même mais a un effet sur la diminution de la durée de la dégradation totale du phénol.

Au delà de 45°C, nous remarquons qu'il y a une chute du rendement d'élimination du phénol et une diminution de la vitesse de croissance des bactéries (0,1341/h), ceci est du à l'inhibition des enzymes de dégradation du phénol et une destruction bactérienne par l'effet de la température élevée.

V-2-4-7 Détermination de l'énergie d'activation :

La vitesse de la réaction de dégradation du phénol augmente avec la température, (loi d'Arrhenius)[69], dans notre cas, plus la température augmente plus la vitesse de la dégradation du phénol augmente, mais à partir d'une température de 37°C cette vitesse devient inversement proportionnelle à la température.

L'influence de la température s'exerce par l'intermédiaire de la constante de vitesse dégradation k ; où cette constante est égale à μ_{\max} (car la dégradation du phénol est décrite par le modèle Monod).

On constate expérimentalement que $\ln k$ est proportionnel à $1/T$ et il a ainsi été établi que la relation reliant k et T est de la forme [69] :

$$\boxed{k = A e^{-\frac{E_a}{RT}}} \quad \text{V-1}$$

$$\text{Où } \ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A$$

A et E_a , différents pour chaque réaction, sont des termes constants, ayant une signification physique, pour une réaction donnée.

E_a : Energie d'activation, c'est-à-dire l'énergie cinétique minimale qui doit être présente au moment du choc pour que celui-ci soit efficace ($\text{Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$).

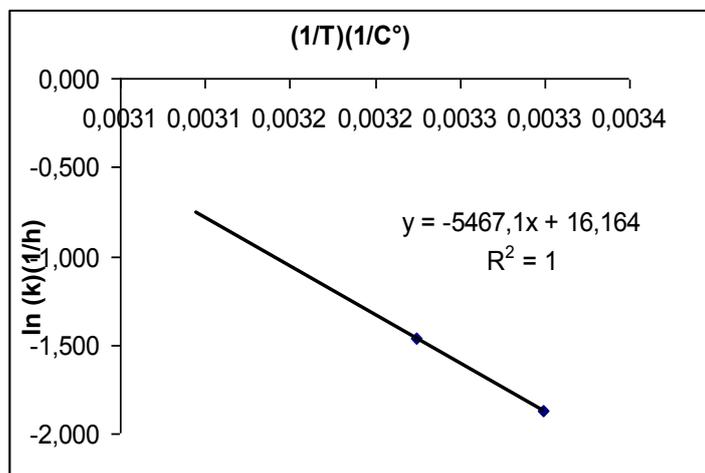
A : Facteur préexponentiel (facteur d'Arrhenius) « Stossfaktor » qui rend compte de la fréquence des collisions et des exigences géométriques de la réaction (h^{-1}).

R : Constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$).

T : Température absolue (k).

Calcul de l'énergie d'activation :

La représentation $\ln k$ en fonction de l'inverse de la température ($1/T$) permet la détermination de E_a .



D'après le graphe nous avons :

$$\ln k = -5467,1 \frac{1}{T} + 16,164 \quad \text{en comparant avec} \quad \ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A$$

La pente de la droite $(-5467,1) = -\frac{E_a}{R}$ et $\ln A = 16,164$ alors

$$E_a = 45,45 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$A = 10,47 \cdot 10^6 \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

Et l'équation d'Arrhenius devient :

$$K = 10,47 \cdot 10^6 e^{-\frac{45,45}{RT}}$$

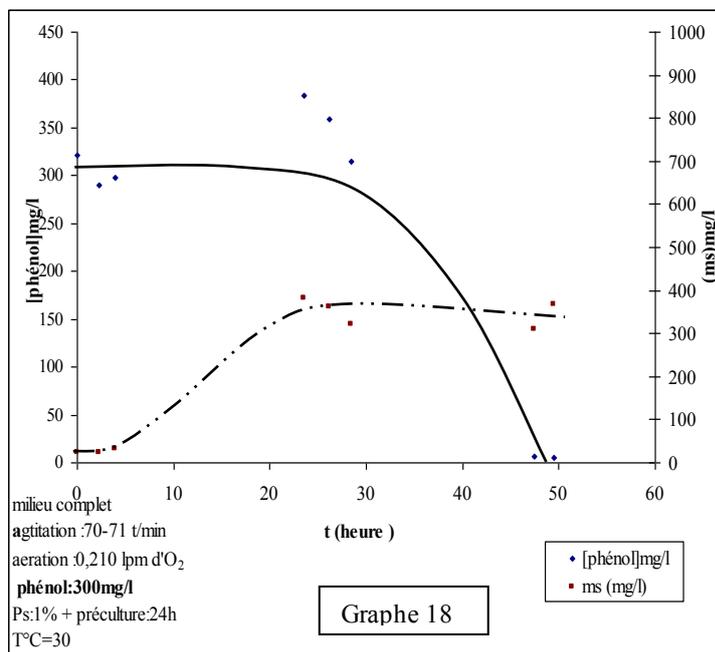
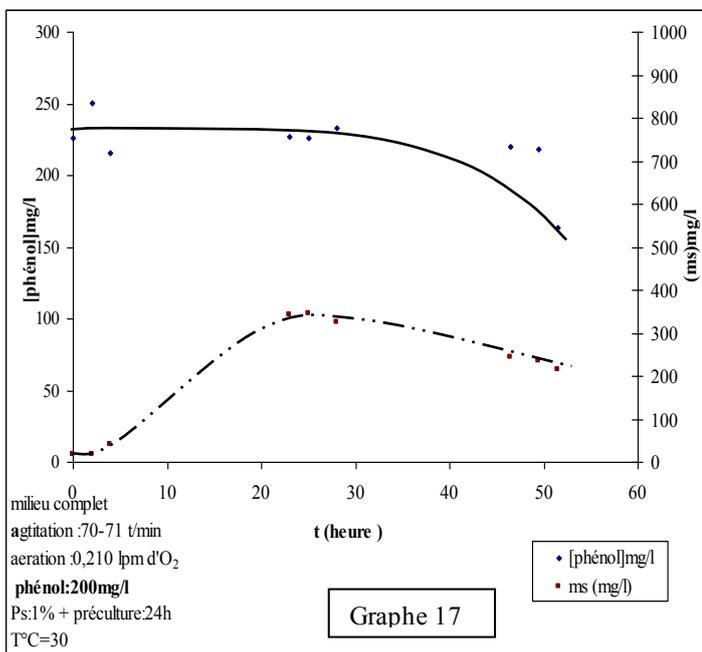
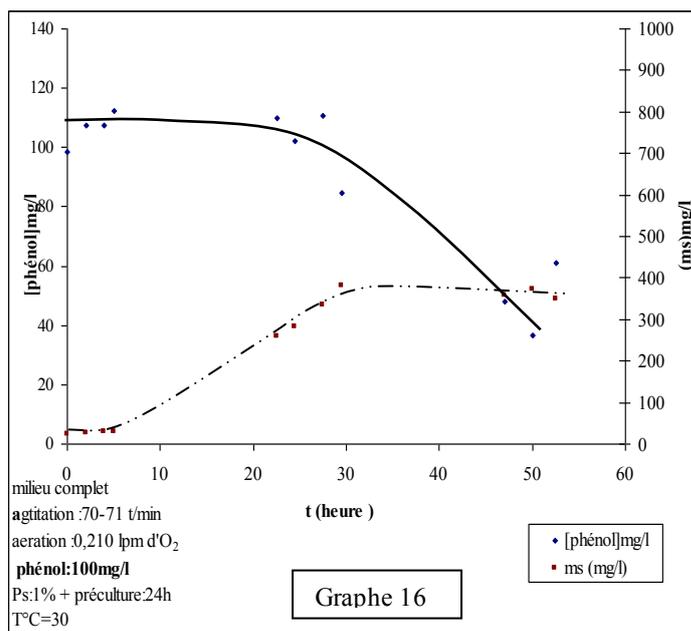
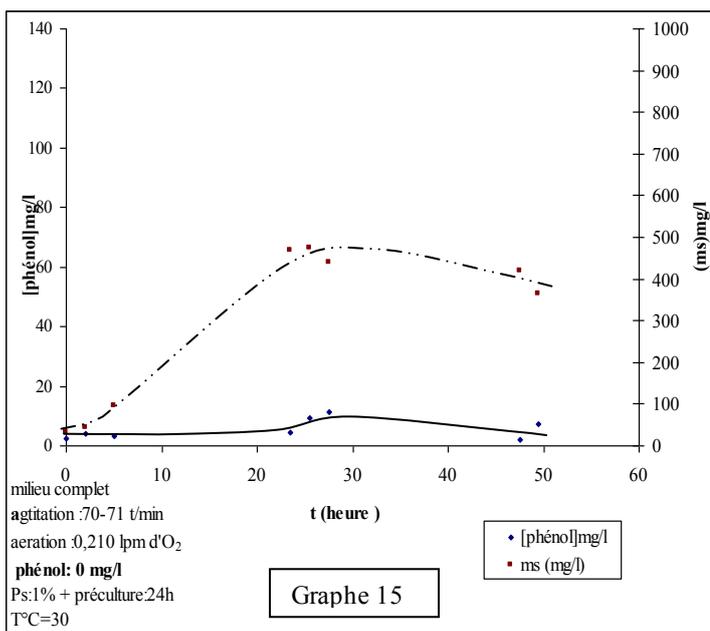
L'énergie d'activation nécessaire pour transformer le complexe enzyme-phénol en produits de réaction est de $45,45 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. A titre comparatif, on peut noter qu'elle est inférieure à l'énergie nécessaire à l'oxydation catalytique du phénol ($93 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) [87] et aussi à celle nécessaire pour l'oxydation catalytique par l'air humide du phénol ($85 - 105 \text{ kJ/mol}$) [88].

V -2-5 l'influence de la concentration initiale du phénol sur sa dégradation :

Dans ce cas nous varions la concentration de (100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 mg/l) en gardant les autres paramètres fixes comme le montre le tableau ci dessous :

Tableau V-7 : Les conditions opératoires cas de variation de concentrations

Composition du milieu	Concentrations (mg/l)	Les conditions opératoires
Milieu complet « M ₅ »	0	+1% de préculture (Ps) Agitation=70 tour/min Aération =0,210 l d'O ₂ /min Température (°C) : 30
	100	
	200	
	300	
	400	
	500	
	600	
	800	



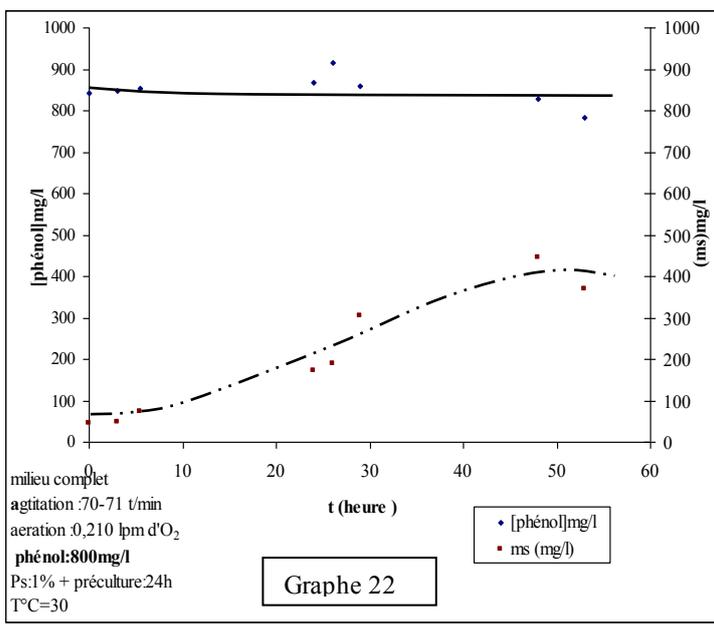
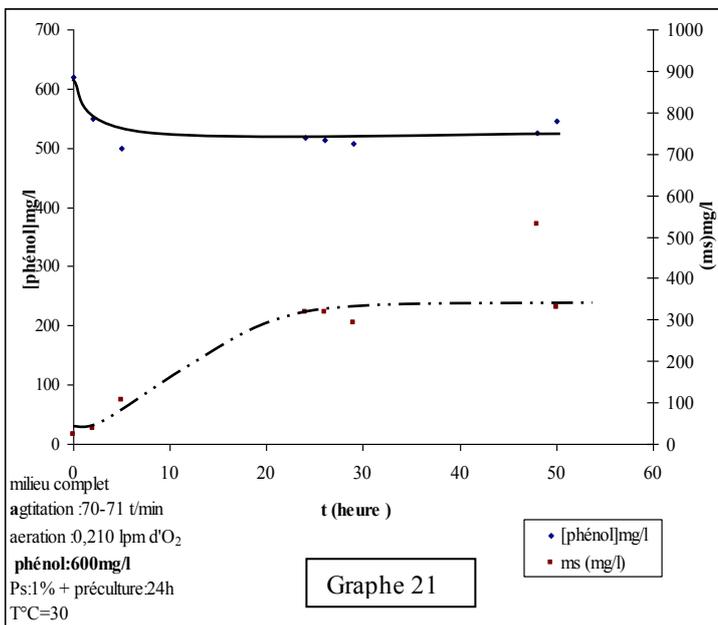
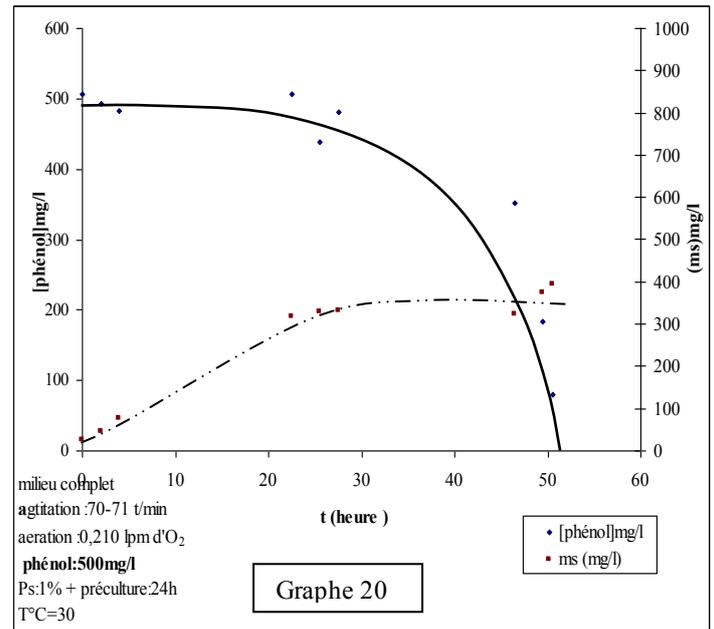
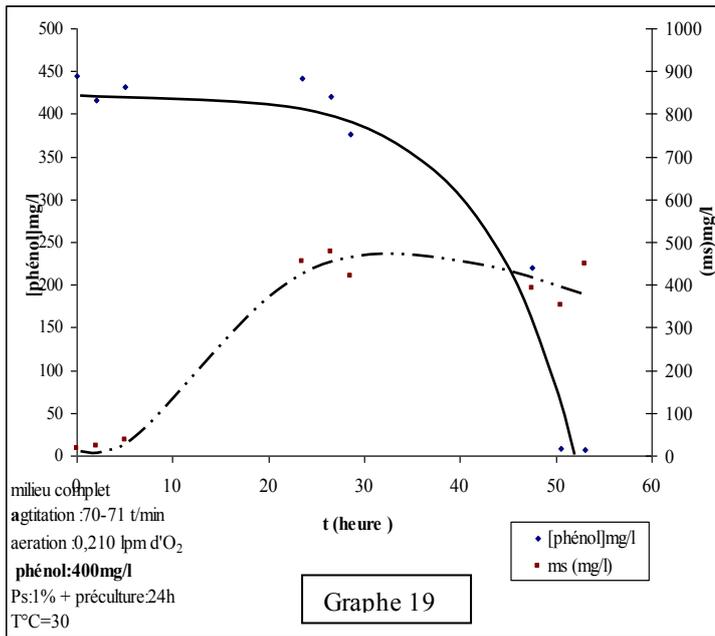


Figure V-9 :L'influence de la variation de la concentration (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 et 800mg/l) sur la cinétique bactérienne et biodégradation du phénol

V -2-5-1 Concentration de phénol 0 mg/l :

Concernant le graphe 15 nous remarquons qu'il y a une croissance malgré qu'il n'y a pas le substrat (phénol), ceci s'explique par le fait que les bactéries utilisent le milieu de culture (glucose, extrait de levure « riche en acides aminées et vitamines », minéraux) comme source de carbone et d'énergie.

V -2-5-2 Concentration de phénol 100 mg/l :

Dégradation légère du phénol au cours de la phase exponentielle de la croissance mais assez rapide au cours de la phase stationnaire à partir de 30 h (Graphe 16).

V -2-5-3 Concentration de phénol 200 mg/l :

La dégradation ne se fait pas convenablement et la phase de déclin est rapide (Graphe 17).

V -2-5-4 Concentration de phénol 300 mg/l :

Dégradation légère du phénol au cours de la croissance mais assez rapide au cours de la phase stationnaire mais cette fois ci à partir de 25 h (Graphe 18).

V -2-5-5 Concentration de phénol 400 mg/l :

La dégradation commence à partir de 25 heures et elle est totale au bout de 50 h (Graphe 19).

V -2-5-6 Concentration de phénol 500 mg/l :

La dégradation commence à partir de 25 heures et elle est totale au bout de 50 h. D'après le (graphe 20) on remarque l'absence de la phase de latence (Graphe 20).

V -2-5-7 Concentration de phénol 600 mg/l :

Une très faible dégradation du phénol est enregistrée, et la population bactérienne atteinte est de l'ordre de 350 mg/l (Graphe 21).

V -2-5-8 Concentration de phénol 800 mg/l :

Une très faible dégradation du phénol est enregistrée mais cette fois ci la population bactérienne atteinte est de l'ordre de 400 mg /l avec une phase de latence étendue qui a duré 10 heures tout en comparant cette dernière avec les essais précédentes qui ont une phase de latence comprise entre (0 (graphe 20) et 3 heures (graphes 16, 17, 18, 19,21) (Graphe 22).

V -2-5-9 Les Paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la dégradation du phénol :

Pour mieux exploiter et maîtriser les courbes de croissance et celles de biodégradation du phénol nous avons calculé les paramètres de croissance et le rendement d'élimination du phénol comme le montre le tableau V-8.

Tableau V-8 : Influence de la concentration sur la cinétique bactérienne et le rendement d'élimination du phénol

[phénol] (mg/l)	L'équation de la phase exponentielle de la courbe de croissance	μ_{\max} (1/h)	Rendement d'élimination du phénol R (%)	Y _{x/s} (mg/mg)
100	Y=0,1063 X + 4,635	0,154	63,00	1,05
200	Y=0,1308 X + 4,535	0,189	28,00 (98,64*)	0,15
300	Y=0,1284 X + 4,603	0,186	98,25	0,23
400	Y=0,1371 X + 4,585	0,198	98,16	0,37
500	Y = 0,077 X + 3,842	0,111	84,13	0,81
600	Y = 0,084 X + 3,809	0,121	18,15	0,15
800	Y = 0,061 X + 3,782	0,088	01,82	0,29

* le rendement 98,64% est obtenu après 71 heures de fermentation

Nous constatons d'après le tableau V-8 que le taux de conversion (biomasse /phénol) (Y_{x/s}) varie entre 0,15 et 1,05 mg de biomasse / mg phénol.

Ce taux a été déjà trouvé compris entre 0,5 et 1,24 mg de biomasse /mg phénol pour des souches pures [11], entre 0,8 et 1 de g biomasse / g phénol pour des souches thermophile (*Bacillus thermolevorans sp A2*) et entre (0,40-0,52 g biomasse / g phénol) pour les souches mésophiles (*Pseudomonas putida*) [89]. Cependant la valeur théorique d'après Monod et Andrew de (Y_{x/s}) pour la croissance sur phénol est de 0,94 g/g [14].

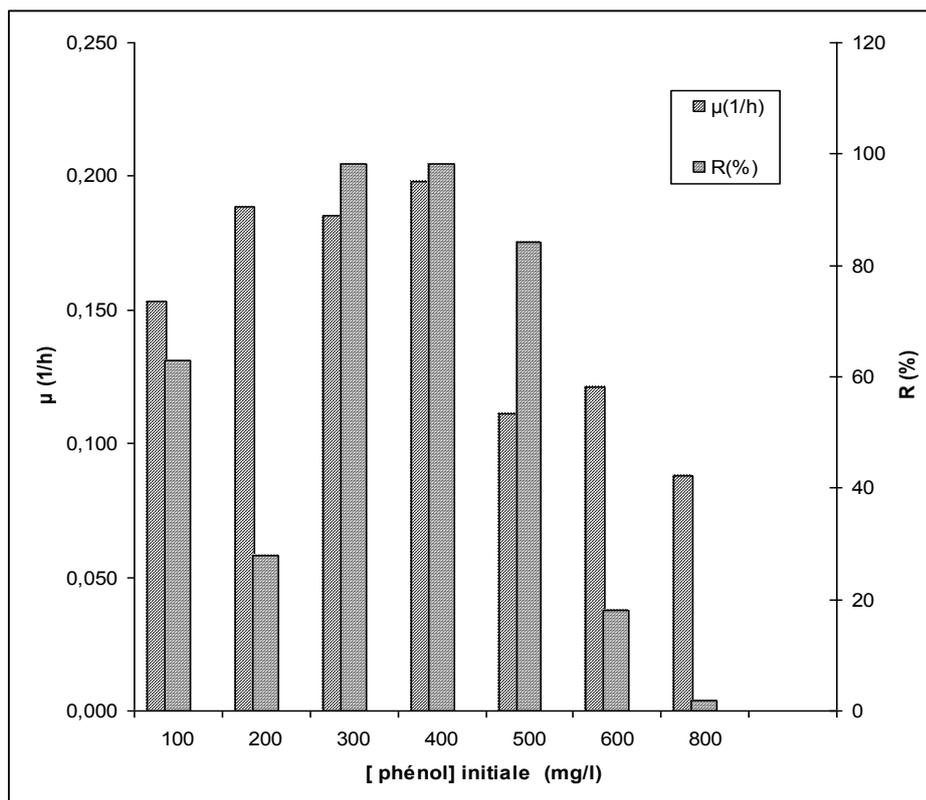


Figure V-10 : Influence de la concentration initiale du substrat (phénol) sur le taux de croissance (μ) de bactérie, et le rendement d'élimination du phénol (R)

D'après la figure V-11 nous remarquons que le rendement d'élimination du phénol par la bactérie est maximal pour les concentrations initiales du phénol de 300, 400 et 500 mg/l et elle est faible pour 100, 600 et 800. Ceci est dû au fait que la toxicité du polluant peut interdire tout développement bactérien et donc sa biodégradation concernant les concentrations 600 et 800, ce qui n'est pas le cas pour la concentration initiale 100 mg/l dont le polluant est difficilement disponible [90, 91].

Nous remarquons que le rendement d'élimination du phénol diminue au fur et à mesure que la concentration initiale du phénol augmente pour le domaine de concentration en phénol, considérés $\geq 400\text{mg/l}$ [92].

En dépassant une concentration de 400mg/l du phénol (figure V-10), le taux de croissance μ diminue alors nous pouvons constater que la concentration inhibitrice est de 500 mg/l.

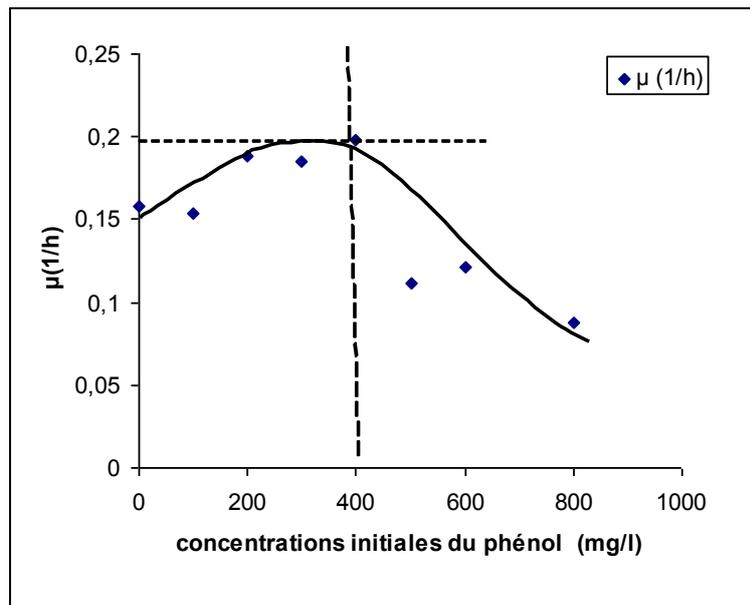


Figure V-11 : Influence de la concentration initiale du substrat (phénol) sur le taux de croissance (μ) de bactérie

Nous remarquons aussi que le taux de croissance (μ) augmente au fur et à mesure que la concentration augmente jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur de 0,198 (1/h), à partir de cette valeur le taux de croissance devient inversement proportionnel à la concentration initiale du phénol.

Nous pouvons expliquer ce phénomène comme suit :

Les enzymes responsables de la dégradation du phénol chez *Pseudomonas aeruginosa*, ont des sites actifs sur leur membrane quand le substrat (phénol) est présent dans le milieu de la bactérie à grande concentration. Ces sites ne seront plus suffisants pour la réception (fixation) de toutes les molécules du phénol ; c'est-à-dire qu'à partir d'un certain excès de substrat, il y a trop de molécules au niveau des sites de fixation et le substrat gêne sa propre fixation ou le substrat n'est pas disposé correctement dans le site actif (inhibition par excès de substrat) figure V-12 [43, 93, 94].

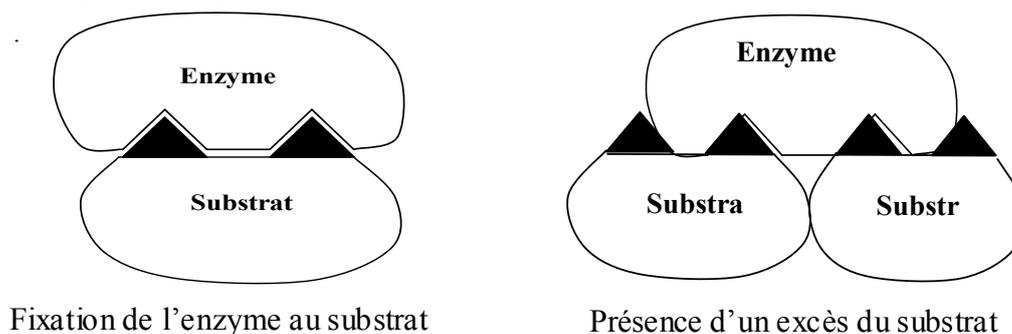


Figure V-12 : Illustration de l'inhibition par excès du substrat

et l'équation de Monod devient :

$$\mu = 0.217 \frac{S}{40.59 + S}$$

Nous savons que K_S est la concentration pour laquelle le taux de croissance prend la moitié de sa valeur maximale.

V -2-6-2 Le taux de dégradation du phénol K :

Une faible densité des micro-organismes dans le milieu où la concentration initiale du phénol (100-600 et 800 mg/l) est supérieure à K_S (40,59mg/l), permet d'évaluer la dégradation du phénol par **l'équation de Monod**, et ceux pour le domaine de concentration en phénol, considérés $\leq 500\text{mg/l}$, dans ce cas la constante de dégradation (K) est égale au taux de croissance maximale μ_{\max} [12, 73, 90, 95].

Nous remarquons que la constante de dégradation augmente en fonction de la concentration initiale en phénol si celle-ci varie de 100 à 400 mg/l. Mais à partir d'une concentration initiale en phénol de 500 mg/l, on observe une diminution de cette vitesse. Ceci peut être dû à un effet d'inhibition causé par le phénol, lorsque celui-ci est présent en grande quantité.

V -2-6-3 μ_{\max} et K_i :

La représentation de l'inverse du taux de croissance ($1/\mu$) en fonction de la concentration S permet la détermination de μ_{\max} et K_i (cas d'inhibition) Figure V-14 :

$\mu_{\max} = 0,254/\text{h}$ $K_i = 491,56 \text{ mg/l}$
--

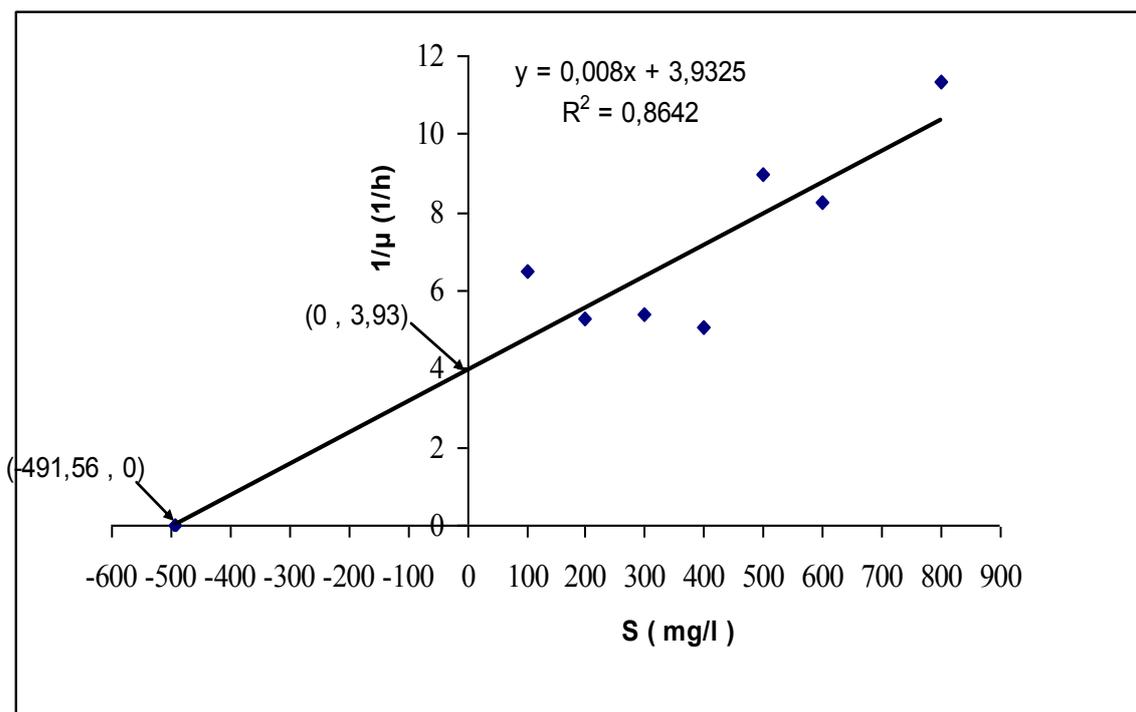


Figure V-14 : Les constantes cinétiques déterminées par l'application du model Haldane

Et l'équation de Haldane devient :

$$\mu = \frac{0,254 S}{40,59 + S + (S^2 / 491,56)}$$

Selon nos résultats, lorsque le phénol joue un rôle d'un substrat, son affinité ($1/K_s$) vis-à-vis des enzymes de *Pseudomonas* est de 0,025 l/mg. Cependant lorsqu'il joue le rôle d'inhibiteur, son affinité ($1/K_i$) est faible (0,0020 l/mg). L'effet inhibiteur du phénol vis-à-vis une culture pure de *Pseudomonas aeruginosa* n'apparaîtra qu'à des fortes concentrations. Selon Hao et al [11], les valeurs de k_s –trouvées pour toutes les cultures pures- comprises entre 1 et 2,4 mg/l expriment immédiatement un taux de croissance maximum si l'effet du substrat -inhibiteur n'existe pas. La constante d'inhibition K_i obtenue pour les cultures pures est située entre 36 et 470 mg/l excepté pour le genre *Pseudomonas* où cette constante, obtenue à des fortes concentrations initiales en phénol est nettement plus importante.

L'utilisation du Modèle de Monod a pour but de déterminer les paramètres cinétiques (K_s , μ_{max}) (figure V-13) de notre bactérie. Nous avons constaté d'après l'allure de la courbe qu'il existe une inhibition par substrat (phénol) ce qui nous a poussé à utiliser le modèle de Haldane (figure V-14) pour déterminer les paramètres cinétiques d'inhibition (K_i et μ_{max}).

la valeur trouvée de K_i (491,56 mg/l) comparée à celle retenue du graphe V-13 (le taux de la croissance (μ) en fonction de la concentration initiale du phénol), 500 mg/l est assez proche voire identique dans la limite de l'erreur de l'expérimentation.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les méthodes biologiques de biodégradation ont donné leurs preuves pour pallier à la pollution des milieux naturels et spécifiquement les eaux résiduaires issues des industries. Le challenge actuel étant de sélectionner des espèces efficaces et de trouver les conditions optimales pour cette fonction.

Dans notre étude nous avons pu travailler avec une souche bactérienne de la famille des pseudomonaceae (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) pour la dégradation d'un polluant toxique, le phénol. Nous avons optimisé les conditions de cette biodégradation, jugeant que les paramètres ajustés sont primordiaux au bon déroulement de notre expérience.

Nous sommes arrivés aux conditions optimales suivantes :

Concernant le milieu, le choix s'est porté sur le milieu complet car il offrait une dégradation de 70 % de phénol au bout de 25 heures. Cependant, le milieu minéral a donné un rendement de dégradation de 96% de phénol au bout de 72 heures.

La température optimale pour la croissance de la bactérie est de 37°C avec un rendement d'élimination du phénol de 96,60 % au bout de 48 heures cependant le rendement d'élimination du phénol est maximal (99,95%) à la température de 45°C (T° optimum de dégradation) au bout de 30 heures.

L'augmentation de la température entre 37°C et 45°C n'a pas un effet significatif sur le rendement d'élimination du phénol lui-même mais a un effet sur la diminution de la durée de la dégradation totale du phénol.

L'aération optimale est de 0,42 l d'O₂ /min avec un rendement d'élimination du phénol de 99% au bout de 48 heures, et l'augmentation de l'aération au delà de ce taux n'améliore pas significativement le rendement d'élimination du phénol.

Pour ce qui est des concentrations initiales en phénol nous avons pu constater une inhibition par excès de substrat et celle ci est de (500 mg/l) dans nos conditions opératoires.

La dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en fermenteur est décrite par l'équation de Monod.

En appliquant les modèles de cinétique bactérienne de Monod et Haldane (l'inhibition) nous avons obtenu les constantes cinétiques de notre souche et qui sont les suivantes :

- Le taux de croissance $\mu_{\max} = 0,217$ 1/h trouvé par le modèle de Monod, confirmé par le modèle de Haldane $\mu_{\max} = 0,2541$ /h.
- La concentration pour laquelle le taux de croissance prend la moitié de sa valeur maximale K_s de 40,59mg/l
- La constante d'inhibition $K_i = 491,56$ mg/l.

Cette étude nous a ouvert des perspectives de transfert des résultats à grande échelle à travers un modèle mathématique qui devrait prendre en considération l'évolution de la concentration en oxygène dissous car il constitue un paramètre limitant dans la cinétique de biodégradation du phénol.

Annexes

I Milieu de culture :KH₂PO₄ (PANREAC) :1,5gK₂HPO₄ (PROLAB) :0,5g

NaCl :0.5g

MgSO₄ .7H₂O (MERCK):0.5gNH₄NO₃ (MERCK):3gFeSO₄.7H₂O (MERCK):0.02gCaCl₂.2H₂O (MERCK):0.02g

Glucose : 0.5g

Extrait de levure : 2g

Eau distillée : 1 litre

} Ajouter séparément par
un filtre stérilisant

On ajuste le pH du milieu à 7, le milieu est stérilisé par autoclavage à 120° pendant 20 min.

Tableau I-1 : Matériels utilisés

Matériels	Type
Agitateur	FISHERBRAND 10511
PH mètre	HANNE INSTRUMENTS 211
Fermenteur (V =2 l)	OMNI-CULTURE (Virtis) 914
Spectrophotomètre Uv-Visible	SHIMADZU UV MINI-1240
Autoclave	WEBECO-GMPH BAD SCHWARTAU
Filtre stérilisant (0,45µm)	MILLEX-HA
Etuve	MEMMERT UE-400
Centrifugeuse	MIKRO 22R HETTICH
Microscope	ZEISS 100-800

II Les Réactifs du dosage phénol:

- Solution 4-amino-antipyrène (ALDRICH) à 20g/l (flacon en verre teinté, bouchon, Rôdé) doit être conservé à l'abri de l'air et de l'humidité. La solution à 20g/l peut être conservée pendant plusieurs mois.
- Solution ferricyanure de potassium (MERCK) à 20g/l
- Pour 1 l de solution tampon :
 - Dissoudre dans 700 ml d'eau :
 - 34 g de NH_4Cl (MERCK);
 - 200 g tartrate double de Na et K (ANALAR TRADE MARK) ;
 - 15ml d'ammoniac concentré ;
 - Compléter à 1 l et ajuster le PH à 9,5 au PH- mètre avec NH_3 concentré (MERCK).
- Solution du phénol (MERCK) à 1g/l « solution mère»
- Cette méthode a une limite de détection du phénol de 5 mg/l.

Cette coloration permet de séparer la plupart des bactéries en deux groupes distincts :

- les gram positif : celles qui retiennent le violet de gentiane après lavage à l'alcool.
- les gram négatif : celles qui sont décolorées et prennent ensuite la couleur d'un second colorant.

III Technique de coloration de Gram :

III -1 Préparation du frottis :

Le frottis : consiste en l'étalement de la substance à étudier suivi d'un séchage, d'une fixation et éventuellement d'une coloration. Les frottis sont réalisés fréquemment pour les bactéries ou les produits contenant des bactéries. Les étapes de préparation du frottis (Etalement, Séchage et fixation).

III -1-1 Etalement:

Une goutte de suspension microbienne est disposée au centre de la lame.

Cette goutte doit être de petite taille pour éviter les débordements.

La manipulation est effectuée de manière aseptique la lame étant placée près du bec bunsen.

III-1-2 Séchage :

Il est réalisé en portant la lame au-dessus de la flamme du bec bunsen (20 à 30cm)en la tenant entre le pouce et l'index ; ceci évite un chauffage trop violent. L'étalement peut être effectué conjointement .Il faut travailler dans les conditions d'aseptie les meilleures.

III-1-3 Fixation :

Elle est réalisée soit en chauffant fortement 2 à 3 fois une demi- seconde la préparation tenue à la pince ou en versant sur la préparation quelque gouttes d'alcool éthylique absolu que l'on laisse refroidir .La fixation s'opère par dessiccation .Après la fixation on peut considérer que la lame ne présente qu'un danger de contamination limité.

III-2 Coloration :

Le frottis doit être parfaitement refroidi après la fixation .la coloration se fait de la façon suivante :

- Recouvrir totalement la lame de violet de gentiane soigneusement filtré.
- Laisser le violet environ 20 secondes.
- Rejeter le violet en l'entraînant avec la solution de lugol (solution d'iode dans l'iodure de potassium).
- décolorer à l'alcool. Ce temps de décoloration, le plus délicat.
- Recolorer à la fuchsine (colorant rose fuchsia), laisser la fuchsine 10 à 20 secondes.
- Rincer à l'eau, nous séchons en éponge délicatement entre deux feuilles de papier filtre.
- Mettre une goutte d'huile à immersion (huile de cèdre) sur le frottis coloré parfaitement sec.
- Enfin observer à l'objectif X 100 à immersion.

Selon les cultures examinées nous pouvons mettre en évidence [75]

La forme des bactéries (Cocci ou bacilles) ;

La couleur des bactéries :

Violet : bactéries gram positif.

Rose : bactéries gram négatif.

III-3 Mesure de la biomasse microbienne :

La mesure de l'opacification du milieu de culture est une technique très prisée pour mesurer la biomasse, c'est à la masse bactérienne sèche présente par unité de volume. Il est en effet possible d'utiliser une loi, analogue à celle de Beer-Lambert, exprimant la proportionnalité entre la contribution bactérienne à l'absorbance du milieu A et la biomasse B présente en solution,

$$A = \text{Log} \frac{I_0}{I_2} - \text{Log} \frac{I_0}{I_1} = \text{Log} \frac{I_1}{I_2} = \alpha dB$$

Où :

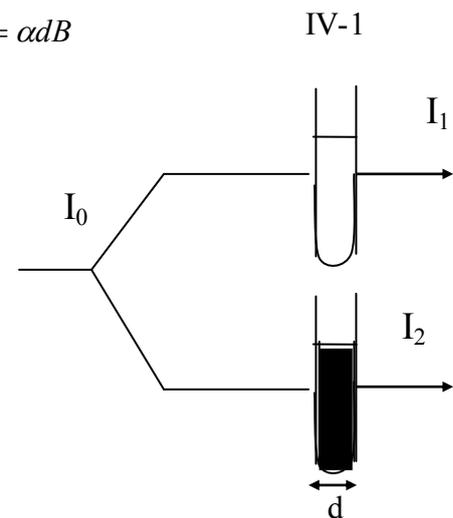
I_0 : intensité lumineuse du rayon incident ;

I_1 : intensité du rayon transmis en l'absence de biomasse ;

I_2 : intensité du rayon transmis en présence de biomasse ;

d : longueur du trajet optique ;

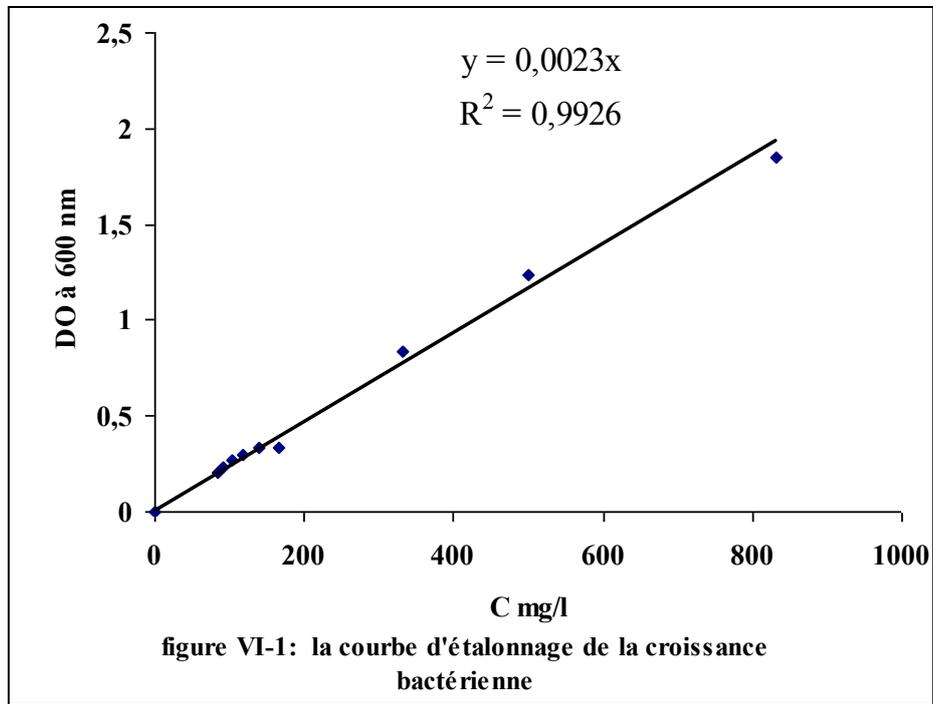
α : Coefficient de proportionnalité.



L'absorbance est rapportée conventionnellement à un trajet optique de 1 cm pour définir la densité optique (DO) du milieu :

$$DO = \frac{1}{d} \text{Log} \frac{I_1}{I_2} = \alpha B \quad \text{IV-2}$$

Cette relation empirique a été vérifiée expérimentalement par de nombreux auteurs (MONOD, TOENNIES et GALLANT, SCHAECHTER, LUEDEKING et PIRET, SPAUN, DEAN et ROGERS, KOCH, GRIFFITH et MELVILLE) [70, 13].

IV Les courbes d'étalonnages :**IV-1 La courbe d'étalonnage de la croissance bactérienne :****IV-2 La courbe d'étalonnage du phénol :**