

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

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

En Génie de l'Environnement

THEME

**Elimination des polluants organiques par
couplage de la photocatalyse et la
biodégradation bactérienne**

HAMIDA HAMDI

Sous la direction de **Mme A. HELLAL** Professeur ENP

Soutenue le 06/11/2019

Devant le jury composé :

Président :	Mr Rabah KERBACHI	Professeur	ENP d'Alger
Directrice de thèse :	Mme Amina HELLAL	Professeur	ENP d'Alger
Examinatrices :	Mme Jazia ARRAR	Professeur	ENP d'Alger
	Mme Nassira YEDDOU	Professeur	USTHB
	Mme Hassiba ZEMMOURI	MCA	USTHB
	Mme Fatima BOUMECHHOUR	MCA	Univ. de Boumerdès

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

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES
En Génie de l'Environnement

THEME

**Elimination des polluants organiques par
couplage de la photocatalyse et la
biodégradation bactérienne**

HAMIDA HAMDI

Sous la direction de **Mme A. HELLAL** Professeur ENP

Soutenue le 06/11/2019

Devant le jury composé :

Président :	Mr Rabah KERBACHI	Professeur	ENP d'Alger
Directrice de thèse :	Mme Amina HELLAL	Professeur	ENP d'Alger
Examinatrices :	Mme Jazia ARRAR	Professeur	ENP d'Alger
	Mme Nassira YEDDOU	Professeur	USTHB
	Mme Hassiba ZEMMOURI	MCA	USTHB
	Mme Fatima BOUMECHHOUR	MCA	Univ. de Boumerdès

REMERCIEMENTS

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

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

Un grand merci à madame Jazia ARRAR Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, pour toute l'aide qu'elle ma fournie.

J'exprime mes profonds remerciements aux membres du jury, Madame Jazia ARRAR Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, Madame Nassira YEDDOU Professeur à l'USTHB, Madame Hassiba ZEMMOURI Maitre de conférences à l'USTHB, Madame Fatima BOUMECHHOUR Maitre de conférences à l'Université de Boumerdès.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Madame Rym SALAH Maitre de conférence à l'UMMTO pour son soutien, ses encouragements constants et sa disponibilité.

Je désire également exprimer toute ma gratitude à Melle Farida ALANE pour toute l'aide qu'elle ma fournie.

Je tiens à remercier Madame Yasmine ZEGHIOUD, Monsieur Hichem ZEGHIOUD pour leurs soutiens.

Je tiens à remercier aussi Madame Ibtissem BELGACEM et Madame Nadjia BENSOUILAH pour leurs aides.

Je tiens également à remercier Melle Soumeya BOUCHAREB, Melle Hassiba IRINI SLIMANE, Melle leila BENSADELLAH, Madame Amina TCHOULAK, Melle Oumsaad ALI pour leurs aides.

Je souhaite remercier l'ensemble des enseignants, doctorants, ingénieurs et personnel administratif que j'ai eu le privilège de côtoyer depuis 2007 et qui ont permis, par leurs encouragements et leurs assistance aussi bien morale que matérielle, de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

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

Je remercie également Madame Hamida BOUAAM, notre secrétaire de département de génie de l'environnement.

Enfin, je ne saurais terminer cette liste sans adresser un remerciement particulier à ceux qui m'ont soutenu dans l'ombre, mes frères et sœurs, mes belles sœurs et beaux-frères, mes neveux et mes nièces et à toute ma famille.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو اقتران تقنية التحفيز الضوئي الغير المتجانس مع تقنية العلاج البيولوجي لهدف تنقية المياه الملوثة بالمواد العضوية. أول شيء قمنا به هو تصميم المفاعل الضوئي على مستوى المخبر. القيام بتحسين شروط تشغيل المفاعل الضوئي و هذا عن طريق تطبيق الطريقة التي تعتمد على المخطط التجريبي. الشروط التي تحصلنا عليها بأعلى نسبة لتحليل الفينول هي: تركيز الفينول 20مغ/ل، تركيز الحفاز 2000 مغ/ل و درجة الحموضة 9. قمنا بتشخيص البكتريا المعزولة من المياه الملوثة على انها بسيلبوس سيبتيليوس و ايجاد الشروط التي تؤثر على هذه البكتيريا في التحليل البيولوجي للفينول. فوق تركيز 500مغ/ل تكون البكتريا غير متحفزة. عند درجة حرارة بين 30 و 37م و بين و درجة الحموضة 7 و 9 البكتيريا تكون فعالة جدا. استعمال البكتيريا المثبة في حبيبات الالجينات أدت إلى تحسين التحليل البيولوجي للفينول و تم إيجاد الشروط التي أدت إلى إعطاء أعلى نسبة لتحليل البيولوجي للفينول في اسرع مدة و هذا بتطبيق المخطط التجريبي. اقتران تقنية التحفيز الضوئي الغير متجانس مع تقنية العلاج البيولوجي أدت إلى نقصان المدة الكلية لتحليل الفينول 8 ساعات من التحفيز الضوئي أدت إلى مدة قدرها 15سا لتخلص من الفينول كليا باستعمال بسودوموناس ايغوجنوزا عوضا 47 سا و 11 سا بواسطة بسيلبوس سيبتيليوس عوضا 20سا.

كلمات مفاتيح: تقنية التحفيز الضوئي، العلاج البيولوجي، اقتران تقنية التحفيز الضوئي مع تقنية العلاج البيولوجي.

Abstract

The objective of this work is the coupling of photocatalytic and biological treatment in order to remove the organic pollutants. In the first time the photoreactor was designed.

A full factorial experimental design methodology was used to optimize the operating conditions. The optimal conditions values obtained by the factorial experimental design methodology are phenol concentration 20 mg.L⁻¹, TiO₂ concentration 2 g.L⁻¹ and pH 9.

A bacteria isolated from polluted water is identified as *Bacillus subtilis*. The optimization of the parameters that influence the biodegradation of phenol in free bacterium is studied. Concentrations greater than 500 mg.L⁻¹ caused inhibition. A better degradation time and a better bacterial activity are obtained at pH between 7 and 9 and between 30 and 37°C of temperature.

The biodegradation of phenol by immobilized bacterium is studied, applying a second full factorial experimental design methodology. The maximum desirability is obtained at the low level of the parameters

The combined photocatalytic-biological treatment significantly reduced the degradation time of phenol. For 8h of photocatalysis, a complete phenol biodegradation occurs in 11h hours when using *Bacillus subtilis* and 15h when using *Pseudomonas aeruginosa*

Keywords : photocatalysis, biodegradation, coupling of photocatalysis and biodegradation

Résumé :

L'objectif de cette étude était le couplage du procédé photocatalytique et le procédé biologique pour l'élimination d'un polluant organique des eaux. Dans un premier temps, un photoréacteur à l'échelle du laboratoire a été conçu.

Les conditions opératoires du photo réacteur ont été optimisées en utilisant un plan d'expériences. Le pourcentage de dégradation maximale du phénol Y correspond à une désirabilité maximale qui vaut 0,91 obtenu dans les conditions opératoires suivantes : Concentration en phénol 20 mg.L⁻¹, Concentration en TiO₂ 2000 mg.L⁻¹ et un pH de 9.

Nous avons identifié une souche bactérienne comme étant *Bacillus subtilis*, remarquablement active par rapport à l'ensemble des souches isolées des eaux polluées et optimisé Les paramètres qui influent sur la biodégradation du phénol par cette souche en cellules libre. Les concentrations initiales de phénol supérieures à 500 mg L⁻¹ provoquent des inhibitions de la bactérie. Une meilleure durée de dégradation et une meilleure activité bactérienne sont obtenues à un pH 7 et 9 et une température de 30 et 37°C.

La biodégradation du phénol par les bactéries immobilisées a été étudiée on appliquant un deuxième plan factoriel complet. La désirabilité maximale qui correspond à l'optimum de 0,912569 était obtenue au niveau bas des facteurs.

Le couplage de la photocatalyse au procédé biologique a permis une diminution de la durée de dégradation du phénol. Ainsi, pour 8h de photocatalyse la durée de dégradation diminue de 20h à 11h pour *Bacillus subtilis* et de 47h à 15h pour *Pseudomonas aeruginosa* et (traitement biologique par des cellules libres).

Mots clés : La photocatalyse, la biodégradation, couplage photocatalyse /traitement biologique

TABLE DE MATIERE

LISTE DES TABLEAU
LISTE DES FIGURES
LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION 12

PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Volet 1

LE PHENOL

1.1.1.	Le phénol	15
1.1.2.	Propriétés oxydantes du phénol.....	16
1.1.3.	Toxicité et écotoxicité du phénol.....	16

Volet 2

LA PHOTOCATALYSE HETEROGENE

1.2.1.	Principe de la photocatalyse hétérogène.....	17
1.2.2.	L'oxyde de titane.....	19
1.2.3.	Paramètres affectant le procédé photocatalytique.....	20
1.2.3.1.	L'effet de la quantité du catalyseur mise en œuvre.....	21
1.2.3.2.	L'effet de la concentration en polluant.....	21
1.2.3.3.	L'effet du pH	22
1.2.3.4.	L'effet de la température.....	22
1.2.3.5.	L'effet des accepteurs d'électrons.....	22
1.2.3.6.	L'effet des ions métalliques.....	23
1.2.3.7.	L'effet de l'intensité lumineuse.....	23
1.2.3.8.	L'effet du type et la composition du catalyseur	23
1.2.4.	Avantages et inconvénient des procédés photocatalytiques	24

Volet 3

LA BIODEGRADATION

1.3.1.	Définition de la biodégradation.....	25
1.3.2.	Facteurs influençant la biodégradation du polluant et la croissance bactérienne	25
1.3.3.	La biodégradation du phénol.....	26

Volet 4

IMMOBILISATION

1.4.1.	Définition	29
--------	------------------	----

1.4.2.	Les techniques d'immobilisation cellulaire.....	29
1.4.3.	Inclusion dans des matrices poreuses.....	30
1.4.3.1.	Inclusion des cellules dans un gel	30
1.4.3.2.	Inclusion des cellules dans un support préformé.....	31
1.4.4.	Avantages et inconvénients de la technique des cellules immobilisées.....	31
1.4.5.	L'alginate de sodium	32
1.4.5.1.	Nature chimique des alginates.....	32
1.4.5.2.	Propriétés physico-chimiques.....	33

Volet 5

LE COUPLAGE PROCÉDES PHOTOCATALYTIQUE /TRAITEMENT BIOLOGIQUE

1.5.1.	La stratégie générale pour le couplage de la photocatalyse avec le traitement biologique	35
1.5.1.1.	Confirmation de la non- biodégradabilité des composés.....	35
1.5.1.2.	La biodégradabilité des composés intermédiaires	36
1.5.1.3.	La durée de prétraitement	36
1.5.2.	Résumé des travaux réalisés sur le traitement par couplage photo catalyse/bidegradation	36
1.5.3.	Les avantages du couplage	38

Volet 6

LA METHODOLOGIE DES PLANS D'EXPERIENCES

1.6.1.	Définition des méthodes des plans d'expériences.....	39
1.6.2.	Les principaux avantages des plans d'expériences.....	40
1.6.3.	Notion de modélisation mathématique.....	40
1.6.4.	L'Analyse statistique des résultats.....	41
1.6.5.	Le plan d'expérience appliqué	43
1.6.6.	Les logiciels de plans d'expériences	44

PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES

2.1.	Le polluant	46
2.2.	Le catalyseur	46
2.3.	Matériel biologique.....	47
2.4.	L'alginate de sodium	47
2.5.	Composition du milieu de culture.....	48
2.6.	Dosage de phénol	48
2.7.	Mesure de la biomasse microbienne	48
2.8.	La photodégradation.....	48

2.9.	La biodégradation du phénol.....	50
2.10.	Technique d'immobilisation dans l'alginat de calcium	50
2.10.	La photobiodégradation.....	51

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

La photodégradation

3.1.1.	L'influence de la longueur d'onde.....	53
3.1.2.	La photolyse (sans catalyseur) et l'adsorption du phénol sur le TiO ₂ (sans la présence des UV).....	54
3.1.3.	Plans d'expérience et modélisation de la photodégradation du phénol	54

La biodégradation

3.2.1.	Isolement des souches bactériennes autochtones et étude de leurs activités....	63
3.2.2.	Identification de la souche Sb5	66
3.2.3.	La biodégradation du phénol par des cellules libres	69
3.2.3.1.	L'effet de la concentration initiale du phénol sur la biodégradation.....	69
3.2.3.2.	Effet du pH sur la biodégradation du phénol.....	75
3.2.3.3.	Effet de la température sur la biodégradation du phénol.....	76
3.2.4.	La biodégradation du phénol par des cellules immobilisées	77
3.2.4.1.	L'Essai d'adsorption du phénol sur les billes d'alginat.....	77
3.2.4.2.	Plans d'expérience et modélisation de la biodégradation du phénol par des cellules immobilisées.....	78

Le couplage photocatalyse / traitement biologique

3.3.1.	Temps de pré-traitement photocatalytique.....	85
3.3.2.	Le couplage photocatalyse / traitement biologique.....	87
3.3.2.1	Couplage photocatalyse-biodégradation par cellules libres.....	87
3.3.2.2.	Couplage photocatalyse-biodégradation par cellules immobilisées.....	89

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	91
--	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	93
---	-----------

ANNEXE.....	101
--------------------	------------

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Classification des procédés d'oxydation avancés.....	17
Tableau 1.2	Travaux réalisés sur le traitement par couplage photocatalyse /biodégradation	37
Tableau 1.3	Analyse de la variance (ANOVA).....	41
Tableau 1.4	Plan factoriel à 3 facteurs.....	43
Tableau 3.1	limites de variation des facteurs.....	55
Tableau 3.2	Les essais du plan d'expérience.....	55
Tableau 3.3	Plan factoriel complet 2 ³	55
Tableau 3.4	Estimation des coefficients	57
Tableau 3.5	Analyse de la variance.....	59
Tableau 3.6	Résultats obtenus après coloration de Gram, tests oxydase / tests catalase et aspect microscopique des souches.....	64
Tableau 3.7	Résultats de la coloration de Gram et des tests d'orientation de la souche Sb5.....	66
Tableau 3.8	Identification de la souche Sb5 par galerie API 50 CH.....	68
Tableau 3.9	Influence de la concentration sur la cinétique bactérienne et la durée de dégradation totale du phénol.....	74
Tableau 3.10	Influence de la température sur la croissance bactérienne et la durée de dégradation totale du phénol	77
Tableau 3.11	Limites de variation des facteurs.....	78
Tableau 3.12	Les essais du plan d'expérience	79
Tableau 3.13	Plan factoriel complet 2 ³	79
Tableau 3.14	Estimation des coefficients.....	81
Tableau 3.15	Analyse de la variance.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure de la molécule de phénol.....	16
Figure 1.2	Schéma du principe de la photocatalyse hétérogène.....	19
Figure 1.3	Structure cristalline des trois formes allotropiques les plus courantes de TiO ₂ :anatase (a), rutile (b) et brookite (c).....	20
Figure 1.4	Voies métaboliques ortho et méta de la dégradation du phénol.....	27
Figure 1.5	Classification des systèmes d'immobilisation selon quatre classes.....	30
Figure 1.6	Structure chimique de la chaîne d'alginate de sodium.....	32
Figure 1.7	Les unités de base de la molécule d'acide alginique (l'acide mannuronique (M) et l'acide α -L-gulonique (G)).....	32
Figure 1.8	Gélification de l'alginate par des ions calcium.....	34
Figure 2.1	Spectre IR du catalyseur TiO ₂	46
Figure 2.2	Le diffractogramme du catalyseur TiO ₂	47
Figure 2.3	Le dispositif de la photodégradation.....	49
Figure 2.4	Vue de l'intérieur du photoreacteur.....	49
Figure 2.5	Bioréacteur.....	50
Figure 3.1	La photodégradation du phénol à deux différentes longueurs d'ondes (365nm et 254nm).....	53
Figure 3.2	La photolyse (sans catalyseur) et l'adsorption du phénol sur le TiO ₂ (sans la présence des UV).....	54
Figure 3.3	Représentation graphique des valeurs estimées en fonction des valeurs mesurées.....	56
Figure 3.4	Diagramme de Pareto.....	58
Figure 3.5	Les profils des interactions pour tous les facteurs.....	59
Figure 3.6	La fonction désirabilité pour l'optimisation de la réponse.....	60
Figure 3.7	Représentation des variations de la réponse Y en fonction de la concentration en phénol et le pH.....	60
Figure 3.8	Evolution du pourcentage du phénol restant et de la croissance bactérienne des sept souches sélectionnées en fonction du temps.....	65
Figure 3.9	Effet de la concentration en phénol sur sa biodégradation et sur la croissance bactérienne.....	70
Figure 3.10	L'effet de la concentration initiale du phénol sur le temps de la dégradation du phénol par la souche SB5.....	71
Figure 3.11	Cinétique de la croissance bactérienne à différentes concentrations en phénol.....	72
Figure 3.12	Biodégradation du phénol par Sb5 (<i>Bacillus subtilis</i>) et par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
Figure 3.13	Influence de la concentration initiale du substrat (phénol) sur le taux de croissance (μ).....	74
Figure 3.14	Effet du pH sur la dégradation du phénol et la croissance bactérienne de la souche Sb5.....	75
Figure 3.15	Effet de la température sur la dégradation du phénol et sur la croissance bactérienne de la souche Sb5.....	76
Figure 3.16	Cinétique d'adsorption du phénol sur des billes d'alginate vierges à différents diamètres.....	78
Figure 3.17	Graphique des valeurs mesurées en fonction des valeurs estimées.....	80
Figure 3.18	Diagramme de Pareto du modèle proposé.....	81

Figure 3.19	Diagramme des interactions.....	82
Figure 3.20	La fonction désirabilité pour l'optimisation de la réponse.....	83
Figure 3.21	Pourcentage de dégradation du phénol en fonction de la durée de photocatalyse	85
Figure 3.22	Résultats du couplage de photocatalyse avec biodégradation par <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87
Figure 3.23	Comparaison entre le couplage photocatalyse /biodégradation et la biodégradation seule pour les deux souches.....	88
Figure 3.24	Couplage photocatalyse / traitement biologique par <i>Bacillus subtilis</i> (cellules immobilisées).....	89

LISTE DES ABREVIATIONS

POA : Procédés d'Oxydation Avancées

INRS : Institut National de la recherche et de sécurité

DCO : Demande chimique en oxygène

F : Le critère de Fisher

BC : Bande de conduction

BV : Bande de valence sq

λ : Longueur d'onde

G : Acide α -L- guluronique

M : Acide mannuronique

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

DRX : Diffraction des rayons X

INTRODUCTION

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

Certains de ces polluants sont très stables et par conséquent difficiles à se dégrader. D'autres parviennent à se dégrader partiellement mais en produisant des composés intermédiaires très stables pouvant avoir un effet plus toxique que le polluant de départ. L'effet de ces polluants sur la santé et de leurs risques écologiques nécessitent le développement de procédés efficaces capables de les dégrader.

Les procédés d'oxydation avancée (POA) sont adaptés pour traiter des effluents toxiques et récalcitrants qui ne sont pas facilement éliminés par les procédés biologiques conventionnels. Ils sont basés sur la formation de radical hydroxyle, non sélectif et très réactif. La réactivité des radicaux hydroxyles est exploitée afin d'oxyder les composés organiques permettant ainsi leur minéralisation en CO_2 , hétéroatomes et ions inorganiques. Parmi les POA, la photocatalyse par irradiation UV sur dioxyde de titane (TiO_2) semble être une technique adaptée pour dégrader et minéraliser ces composés organiques biorécalcitrants. Cependant, les temps d'irradiation nécessaires pour une minéralisation quasi complète sont longs et impliquent des consommations énergétiques importantes pour générer les UV.

Dans un objectif de limitation des coûts de traitement et de conception d'un procédé propre, sobre et sûr, le procédé photocatalytique peut être couplé avec un traitement biologique. Le POA permettrait la diminution de la toxicité de l'effluent en augmentant sa biodégradabilité et la minéralisation serait assurée à moindre coût par un traitement biologique. L'ordre des opérations peut être inversé si l'effluent est majoritairement biodégradable et contient une faible proportion de composés récalcitrants.

Un des verrous du couplage oxydation chimique/traitement biologique est la conception du système et l'optimisation du fonctionnement.

C'est dans cette optique que nous nous sommes fixés comme méthodologie :

- La conception d'un photo-réacteur de laboratoire ;
- La détermination de l'efficacité d'un catalyseur commercial (TiO_2) ;
- La détermination et l'optimisation des paramètres affectant la photocatalyse ;
- La détermination de l'efficacité d'une souche pure autochtone isolée et purifiée dans la biodégradation du polluant choisi ;
- La détermination des paramètres affectant la croissance bactérienne ainsi que la biodégradation du polluant ;

- L'optimisation de la biodégradation par immobilisation des bactéries ;
- La comparaison entre le procédé photocatalytique et le procédé biodégradation ainsi que le couplage des deux procédés photocatalyse / biodégradation (en utilisant un polluant modèle qui est le phénol).

Pour cela, cette thèse sera structurée en trois chapitres :

Le premier chapitre est une revue bibliographique, il est subdivisé en six volets.

Le premier volet sera consacré au phénol (le polluant organique). La photocatalyse hétérogène fera l'objet du deuxième volet. Le troisième volet présentera des notions relatives à la biodégradation, les facteurs influençant la biodégradation des polluants et la croissance bactérienne en mettant l'accent sur les voies de biodégradation du phénol. Le quatrième volet, sera consacré à l'immobilisation ainsi que les avantages et les inconvénients de cette technique. Le couplage du procédé photocatalytique/traitement biologique fera l'objet du cinquième volet. Des rappels sur les plans d'expériences seront évoqués, dans le dernier volet.

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

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

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

PARTIE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Volet 1

LE PHENOL

Les polluants organiques sont des composés définis par les propriétés suivantes :

- *Toxicité* : ils présentent un ou plusieurs impacts nuisibles prouvés sur la santé humaine et sur l'environnement.
- *Persistance dans l'environnement* : ce sont des molécules qui résistent aux dégradations biologiques naturelles.
- *Bioaccumulation* : les molécules s'accablent dans les tissus vivants et leurs concentrations augmentent le long de la chaîne alimentaire.

En plus de leurs propriétés de persistance et de bioaccumulation, ces molécules ont tendance à se déplacer le long de très grandes distances et se déposer loin des lieux d'émission. C'est le cas par exemple des pesticides, des hydrocarbures, des colorants, des médicaments, de la pyridine, du phénol et leurs dérivés.

1.1.1 Le phénol

Le phénol est un polluant très répandu dans de nombreux effluents industriels ; on le trouve dans les eaux usées des usines de transformation du charbon, des raffineries du pétrole, des industries papetières, des usines de fabrication de résines, de peintures, de textiles, de pesticides, des industries pharmaceutiques et des tanneries (Ehtash, 2011).

Le phénol de formule chimique C_6H_5OH (figure 1.1) est un alcool aromatique, il est connu sous le nom de : hydroxybenzène, acide carbolique, acide phénique, hydroxyde de phényle, benzénole, alcool de phényle, acide phénylique et hydrate de phényle. Le phénol, pur est un solide incolore cristallisé à la température ambiante. Il est hygroscopique et a une odeur âcre et douceâtre. Sa limite olfactive est égale à $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ (INRS, 2011). Au contact de l'air ou sous l'influence de l'humidité le phénol s'oxyde légèrement pour donner des traces de quinone. Il prend alors une couleur rose, puis rouge. Sa solubilité dans l'eau est limitée : 80 g.L^{-1} à 25°C . Il a un faible point de fusion mais un point d'ébullition élevé (INERIS, 2005). Le phénol est soluble dans l'eau et dans de nombreux solvants organiques comme l'acétone, l'éthanol, l'oxyde de diéthyle, l'éther et le benzène (INRS, 2011).

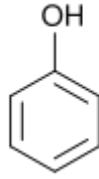


Figure 1.1 : Structure de la molécule de phénol.

1.1.2 Propriétés oxydantes du phénol

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

1.1.3 Toxicité et écotoxicité du phénol

Le phénol est classé par l'Union Européenne mutagène comme catégorie III.

Le phénol est une substance irritante et fortement corrosive. Il a une forte capacité à pénétrer dans l'organisme en traversant la peau et les muqueuses, les systèmes cardiovasculaire et nerveux sont également des cibles. A cet effet, les personnes manipulant du phénol doivent éviter le contact cutané et l'inhalation de ce produit.

Le phénol présent dans l'environnement conduit à de nombreux effets indésirables. Les études sur le phénol et de ses dérivés révèlent qu'ils sont toxiques et très dangereux pour la vie aquatique. Il peut notamment modifier les écosystèmes aquatiques et causer des dommages aux ressources précieuses (Ehtash, 2011).

Dans l'atmosphère, en raison de sa volatilité, le phénol existe principalement en phase gazeuse. Sa durée de vie est généralement courte, elle dépend des conditions atmosphériques. La photo-oxydation, la photolyse et le dépôt sec et humide sont les principales voies de son élimination de l'atmosphère.

Dans les sols, les propriétés physico-chimiques qui influent sur le devenir et le comportement du phénol sont le pH, la capacité d'échange, la teneur en matière organique et la teneur en argile. Le phénol présente une forte affinité avec l'oxyde d'aluminium, par conséquent, son accumulation est fonction de la présence de minéraux argileux.

Volet 2

LA PHOTOCATALYSE HÉTÉROGÈNE

Bien que les technologies d'épuration des eaux aient fortement progressé, elles se heurtent toujours à certains polluants qui sont très stables et par conséquent difficiles à se dégrader ou d'autres parviennent à se dégrader partiellement mais en produisant des composés intermédiaires très stables pouvant avoir un effet plus toxique que le polluant de départ.

L'effet de ces polluants sur la santé et de leurs risques écologiques nécessite le développement de procédés plus efficaces capables de dégrader des polluants récalcitrants aux méthodes conventionnelles.

La recherche s'est intéressée à de nouveaux procédés. Ainsi, de nombreux articles scientifiques traitent actuellement des POAs (Procédés d'Oxydation Avancées) qui constituent un développement récent pour l'élimination des polluants Bio-résistants par rapport à d'autres méthodes de traitement plus classiques.

Les Procédés d'Oxydation Avancées sont définis comme des alternatives très intéressantes pour la dégradation des polluants organiques non biodégradables par les procédés biologiques de traitements. Ces POAs sont basés sur la génération et l'utilisation des puissants oxydants, tel que le radical hydroxyl (OH^\bullet). Ce radical peut être produit par des procédés photochimiques et non photochimiques (tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Classification des procédés d'oxydation avancés.

Procédés non-photochimiques	Procédés photochimiques
Oxidation électrochimique Electro-Fenton Peroxonation ($\text{O}_3 / \text{H}_2\text{O}_2$) Procédé de Fenton ($\text{Fe}^{2+} / \text{H}_2\text{O}_2$)	Photolyse de l'eau ($\text{UV} / \text{H}_2\text{O}$) Photolyse du peroxyde d'hydrogène ($\text{UV} / \text{H}_2\text{O}_2$) Photolyse de l'ozone (UV / O_3) $\text{UV} / \text{H}_2\text{O}_2 / \text{O}_3$ Photocatalyse hétérogène Photo-Fenton ($\text{Fe}^{2+} / \text{H}_2\text{O}_2 / \text{UV}$)

Parmi les procédés photochimiques, la photocatalyse hétérogène a suscité un grand intérêt.

1.2.1. Principe de la photocatalyse hétérogène

Le processus photocatalytique repose sur l'excitation d'un semi-conducteur tel que le TiO_2 par un rayonnement lumineux de longueur d'onde inférieure à 385 nm (dans le cas du

TiO₂), correspondant à une énergie supérieure ou égale à la largeur de la bande interdite de 3,2 eV (Figure 1.2)(Chiang et al., 2002).

Sous excitation lumineuse, les électrons (e^-) de la bande de valence (BV) du TiO₂ passent vers la bande de conduction (BC), laissant une charge positive ou trou (noté h^+) dans la BV (Ahmed et al., 2010; Baraka et al., 2008 ; Karunakaran et al., 2010; Sarantopoulos, 2007).

Ces paires électron/trou peuvent se recombiner en libérant de la chaleur, ou réagir séparément avec d'autres molécules présentes dans le milieu. En présence d'eau, les trous peuvent réagir avec des donneurs d'électrons (H₂O, OH⁻) pour produire des espèces oxydantes comme le radical hydroxyle OH[•] qui est un élément très oxydant (potentiel d'oxydation 2,8V) (Alahiane et al., 2013 ; Ballesteros et al., 2009 ; Baraka et al., 2008 ; Kachif et al., 2009 ; Qamar et al., 2006). L'électron peut réagir avec l'oxygène adsorbé à la surface de TiO₂ pour former l'ion radicalaire superoxyde O₂^{-•} (Karunakaran et al., 2010). En présence d'un polluant en solution aqueuse, ce dernier peut céder un électron à un trou h^+ et s'oxyder sous la forme primaire d'un radical cation. L'oxydation de cette dernière espèce se poursuivra jusqu'à minéralisation complète grâce notamment aux espèces actives de l'oxygène (HO[•], HO₂[•], H₂O₂) générées (Hadj Salah, 2012 ; Malato et al., 2009).

La recombinaison des paires (e^-/h^+) peut défavoriser le processus photocatalytique, la présence de l'oxygène peut diminuer ce phénomène par le piégeage des charges par cette dernière (Kachif et al., 2009 ; Maroga Mboula, 2012).

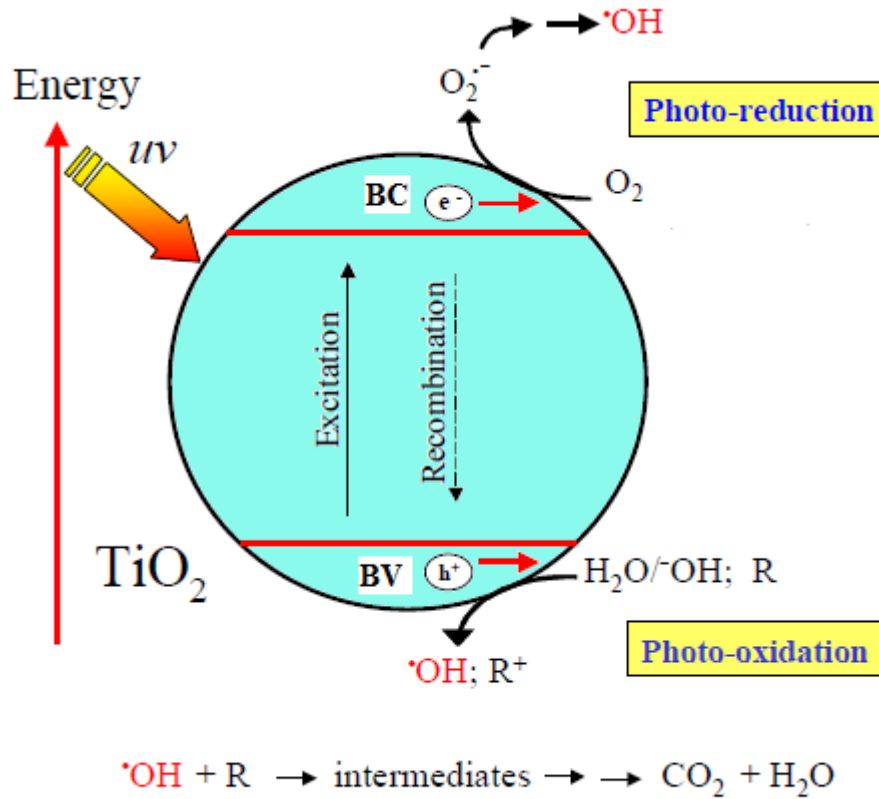


Figure 1.2 : Schéma du principe de la photocatalyse hétérogène (Parra cardona, 2001; Alahiane, 2013).

1.2.2 L'oxyde de titane

L'entité qui absorberait la lumière est un semi-conducteur caractérisé par une Bande interdite relativement faible (Baraka, 2008). Plusieurs photocatalyseurs ont été testés : TiO_2 , ZnO , ZnS , WO_3 , GaP , Fe_2O_3 et CdS etc (Helali, 2012).

Le composé photocatalytique le plus utilisé et le plus intéressant du point de vue industriel est actuellement le dioxyde de titane grâce aux avantages qu'il présente (Ahmed et al., 2010; Lin et al., 2009 ; Rodriguez,2003 ; Sarantopoulos, 2007 ; Chuan-yi et al., 2006 ; Wang et al., 2014) :

- Il est stable, non toxique ;
- Il peut être utilisé soit sous forme de poudre dans l'eau (destruction de polluants, pesticides, colorants) avec séparation et recyclage en fin de traitement, soit sous forme déposée sur support (fibres de verre, tissus, plaques) ;
- Il présente un faible coût de production ;
- Il est le composé le plus photoactif sous UV et le plus stable. De plus, la position de ses bandes d'énergie lui donne un fort pouvoir oxydant lorsqu'il est excité sous rayonnement

ultraviolet (Ahmed et al., 2010 ; Bernardini et al., 2010 ; Gohin, 2009 ; Parra cardona, 2001).

Le TiO_2 existe sous plusieurs formes allotropiques selon la température de prétraitement et dont les principales sont l'anatase, brookite et rutile (figure 1.3). L'anatase (structure tétragonale) est prédominant lorsque la température est inférieure à 600°C . A mesure que la température augmente, la forme brookite instable (structure orthorhombique) se forme. La forme rutile (structure tétragonale) devient prédominante autour de 900°C . De point de vue activité photocatalytique, l'anatase est celui qui donne les meilleurs résultats (Baraka, 2008).

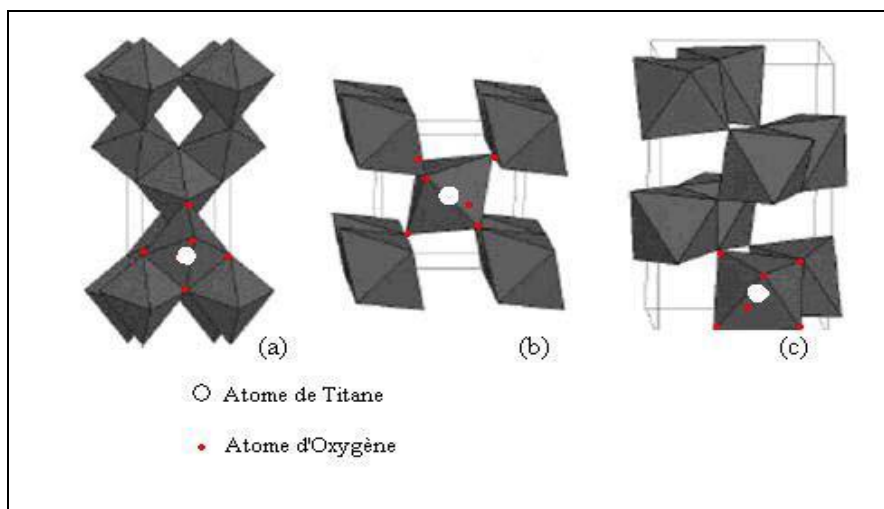


Figure 1.3 : Structure cristalline des trois formes allotropiques les plus courantes de TiO_2 : anatase (a), rutile (b) et brookite (c).

1.2.3 Paramètres affectant le procédé photocatalytique

Beaucoup de facteurs affectent le taux de réaction photocatalytique ; une distinction peut être faite entre les paramètres opératoires et ceux en rapport avec les caractéristiques du photocatalyseur.

Les paramètres opératoires ou extrinsèques sont des facteurs externes tels que les conditions de fonctionnement qui incluent le pH de la solution, la concentration initiale du composé organique, l'intensité de la lumière, la quantité du catalyseur, la température, le débit de circulation, le débit de l'oxygène, la présence des ions en solution, les dimensions et la configuration du photoréacteur (Lin et al., 2009 ; Malato et al., 2009).

Les paramètres en rapport avec les propriétés du photocatalyseur ou intrinsèques sont ceux liés aux propriétés du photocatalyseur lui-même (surface spécifique, bande interdite, taille des cristallites) (Ahmed et al., 2010 ; Chuan-yi, 2006).

1.2.3.1 L'effet de quantité du catalyseur mise en œuvre

La quantité de catalyseur mise en œuvre affecte le rendement de dégradation des polluants lors des procédés de traitement photocatalytique. Faisal et al. (2007) ; Kashif et al. (2009) ; Saratale et al. (2014) ont montré que le taux de dégradation d'un composé augmente avec l'augmentation de la quantité du catalyseur jusqu'à une certaine valeur limite où il est observé une diminution de ce taux (Kachif et al., 2009 ; Saratale et al., 2014).

Ce résultat est dû au fait qu'une augmentation suffisante de la concentration du catalyseur augmente la formation des paires électrons /trous par conséquent il y a la génération des radicaux OH[•] qui vont oxyder une gamme très large des polluants. Par contre à une grande concentration du catalyseur il y a d'une part difficulté de pénétration du rayonnement (solution opaque) et d'autre part une possible diminution des sites d'adsorption disponibles à la surface des catalyseurs. En effet, lorsque la quantité en catalyseur est élevée, les particules de catalyseur auraient tendance à s'agglomérer donc la surface interfaciale entre le milieu réactionnel et le catalyseur diminue (Faisal et al., 2007) et ainsi moins de sites d'adsorption seraient disponibles (Faisal et al., 2007 ; Kachif et al., 2009 ; Maroga Mboula, 2012 ; Saratale et al., 2014).

1.2.3.2 L'effet de la concentration en polluant

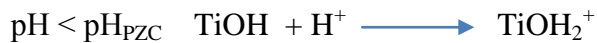
Le pourcentage de dégradation photocatalytique augmente avec l'augmentation de la concentration en polluant jusqu'à une valeur limite où le pourcentage commence à diminuer (Ahmed et al., 2010 ; Kachif et al., 2009).

La diminution du pourcentage de dégradation photocatalytique à une grande concentration en polluant est due à l'augmentation du nombre de molécules du polluant adsorbé sur la surface catalytique. Ces molécules adsorbées rentrent en compétition avec les ions OH⁻ et l'oxygène moléculaire (O₂) ; par conséquent la diminution de la formation des ions radicalaires OH[•] et O₂^{-•} qui sont les espèces les plus réactifs dans les réactions photocatalytiques (Ahmed et al., 2010 ; Kachif et al., 2009). De plus, une augmentation de la concentration en polluant peut générer des espèces intermédiaires qui vont être adsorbées à la surface catalytique (Ahmed et al., 2010).

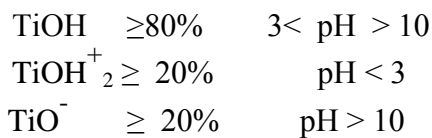
1.2.3.3 L'effet du pH

Le pH du milieu réactionnel est un élément clé pour les réactions photocatalytiques, il affecte énormément la charge de surface du TiO₂ (Faisal et al., 2007 ; Kachif et al., 2009 ; Simon et al., 2008).

Le pH pour lequel la charge de la surface du catalyseur est nulle s'appelle le point de Zéro charge (pH_{PZC}). Pour le TiO₂ ce dernière est entre 6,0 et 6,8. Pour des valeurs différentes de ce pH, la surface du catalyseur est chargée. En effet, si le pH est supérieur au pH_{PZC} du TiO₂, la surface du photocatalyseur est chargée négativement et l'inverse pour une valeur de pH inférieure à pH_{PZC} (Ahmed et al., 2010 ; Kachif et al., 2009 ; Simon et al., 2008). Comme le montrent les équilibres suivants (Ahmed et al., 2010 ; Malato et al., 2009) :



La distribution des espèces chimiques en fonction du pH est la suivante :



Saratale et al. (2014) ont montré l'influence du pH sur la dégradation photocatalytique du phénol. Ils ont trouvé que le pourcentage de dégradation du phénol est de : 68,21%, 78,14%, 98,00% et 80,42% pour des pH de 3, 7, 9 et 11 respectivement. Ils ont déduit que à une faible valeur du pH, il y a un faible pourcentage de dégradation qui est due à la diminution des ions hydroxyles qui sont nécessaires pour la formation des radicaux hydroxyles. Par contre la dégradation est améliorée dans des solutions alcalines.

1.2.3.4 L'effet de la température

Généralement la réaction photocatalytique est indépendante de la température (Baraka et al., 2010). Cependant, une augmentation de la température peut affecter le phénomène d'adsorption à la surface du catalyseur et ainsi aide la réaction photocatalytique dans le sens de défavoriser la réaction de recombinaison des paires électrons/trous (Baraka et al., 2008 ; Baraka et al., 2010).

1.2.3.5 L'effet des accepteurs d'électrons

L'un des grands problèmes dans l'utilisation du TiO₂ comme catalyseur est la recombinaison des paires électrons/trous. Pour éviter ce problème l'ajout des accepteurs d'électrons est nécessaire. La présence de l'oxygène moléculaire dans la solution est un

facteur favorable où il limite les risques de recombinaison trou/électron. D'autres accepteurs sont utilisés comme H_2O_2 , $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ et le BrO_3^- .

En plus de la prévention contre la recombinaison des paires électron/trou, les accepteurs d'électron augmentent la formation des radicaux hydroxyles et le % d'oxydation de certains composés intermédiaires (Ahmed et al., 2010 ; Kachif et al., 2009).

1.2.3.6 L'effet des ions métalliques

L'ion métallique dissous dans les eaux polluées peut avoir un effet significatif sur les réactions photocatalytiques (Kachif et al., 2009).

Les travaux de Kashif et al. (2009) ont montré que l'addition des ions métalliques comme Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+} ont un effet positif sur la photocatalyse.

L'amélioration de la dégradation photocatalytique par l'addition des ions métalliques (Fe^{3+}) est due aux réactions qui ont lieu entre l'ion métallique et l'électron de la bande de conduction, ces réactions évitent les réactions de recombinaison électron/trou.

1.2.3.7 L'effet de l'intensité lumineuse

La vitesse de formation des paires électron-trou sous l'impact des photons dépend principalement de l'intensité de la lumière d'incidence. Si l'intensité lumineuse est trop importante, il a été montré qu'un phénomène de recombinaison électron-trou se produisait, inhibant le phénomène photocatalytique, l'optimum apparaît pour un flux de 250W/m^2 (Hadj Salah, 2012 ; Ahmad et al., 2016).

1.2.3.8 L'effet du type et la composition du catalyseur

Le rendement photocatalytique du TiO_2 varie considérablement en fonction de sa structure cristalline. L'anatase est considéré comme la forme la plus photoactive, tandis que le rutile est considéré comme ayant une faible activité photocatalytique. La plus grande activité de l'anatase par rapport à celle du rutile pourrait s'expliquer par l'aptitude la plus élevée de l'anatase à photoadsorber l'oxygène sous forme O_2^- et O^- de la photodésorption de l'oxygène et d'avoir une faible vitesse de recombinaison des paires (e^-/h^+).

Toutefois, La combinaison entre ces deux formes cristallines est suggérée diminuer la recombinaison des paires électrons trous (e^-/h^+) photogénérées et permettre ainsi une meilleure activité que l'anatase utilisé seul. Le TiO_2 -P25 Degussa est le plus utilisé internationalement dans la plupart des applications environnementales. La proportion

observée entre les deux phases, 75 % anatase et 25% rutile, est la meilleure d'après la littérature (Ahmed et al., 2010 ; Malato et al., 2009).

1.2.4 Avantages et inconvénient des procédés photocatalytiques

La photocatalyse présente plusieurs avantages parmi lesquelles on peut citer :

- Minimise les rejets secondaires car c'est un procédé d'oxydation qui permet d'obtenir une excellente minéralisation des polluants (Baraka et al., 2010 ; Simon et al., 2008 ; Tarek et al., 2008) ;
- Dégradation de plusieurs produits organiques non biodégradables (Ahmed et al., 2010 ; Zhang et al., 2010 ; Lee et al., 2003) ;
- Production des sous-produits biodégradables et moins toxiques que le produits mère (Ahmed et al., 2010 ; Zhang et al., 2010).

Cependant, ce procédé présente encore certaines limites :

- Lorsqu'il s'agit d'appliquer la photocatalyse au niveau industriel, l'utilisation du TiO₂ en poudre nécessite une étape de filtration ou de décantation à la fin du procédé. Cela augmente les coûts du processus, ce qui peut contrebalancer les avantages économiques provenant de l'emploi de l'irradiation solaire (Danion, 2002) ;
- Son application reste limitée à des débits et des concentrations en polluants plutôt faibles (Simon et al., 2008) ;
- La recombinaison des paires e^-/h^+ qui limite l'efficacité du procédé photocatalytique (Maroga Mboula, 2012) ;
- Les UV qui ne représentent que 3 à 5 % des irradiations solaires (Maroga Mboula, 2012) ;
- La formation d'intermédiaires réactionnels qui peuvent être plus néfastes que les composés de départ (Maroga Mboula, 2012 ; *Ballesteros et al., 2008*).

Volet 3

LA BIODEGRADATION

En comparaison aux méthodes physico-chimiques, les méthodes biologiques sont généralement préférables pour l'élimination de plusieurs polluants. La demande de l'utilisation de ces méthodes est due essentiellement à leurs faibles coûts, leurs facilités de mise en œuvre et leurs applicabilités à presque tous les types de polluants.

Ces méthodes permettent de dégrader les polluants par l'action de microorganismes (bactéries, champignons), elles peuvent être utilisées seules ou en complément d'une autre technique.

1.3.1 Définition de la biodégradation

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement (Lecomte, 1998 ; Soltani, 2004). Elle est définie par l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant en différents sous-produits par l'action des microorganismes. La croissance s'effectue par l'oxydation du carbone qui est utilisé comme source d'énergie. Cette réaction met en jeu deux autres éléments, l'azote et le phosphore qui participent à la synthèse protéique (Lecomte, 1998). Ce phénomène peut s'effectuer dans le sol, l'eau et l'air.

1.3.2 Facteurs influençant la biodégradation du polluant et la croissance bactérienne

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

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

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

1.3.3 La biodégradation du phénol

✓ Voie aérobie

Plusieurs espèces de bactéries sont connues pour dégrader le phénol, ce sont *Alcaligenes* sp et *Achromobacter* sp, *Rhodococcus* sp, *Erythropolis*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*sp, *Candida tropicalis* et *Candida maltosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* , *Bacillus*, et des champignons tels que *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp et *Graphium* sp 1 (Ehtash, 2011 ; Sridevi, 2012, Ali et al., 2013).

La dégradation aérobie du phénol par des micro-organismes est principalement basée sur l'*ortho*- et la *méta*-oxydation (figure 1.4). Au cours de la première étape de la dégradation du phénol, l'oxygène moléculaire est utilisé par l'enzyme hydroxylase du phénol pour ajouter un deuxième groupe hydroxyle dans la position *ortho*- à celle déjà présente pour produire du catéchol qui peut ensuite être dégradé soit par l'*ortho*- ou la *méta*-oxydation.

L'*ortho* oxydation ou le clivage *ortho* est catalysé par le catéchol 1,2-dioxygénase. Le produit de cette réaction serait l'acide *cis,cis*muconique ou l'un de ses dérivés.

Le *méta* oxydation ou le clivage *méta* est assuré par la catéchol 2,3-dioxygénase où le métabolite serait le 2-hydroxy muconique semi-aldéhyde (Mohd. Tuah et al., 2009 ; Sridevi et al., 2012).

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

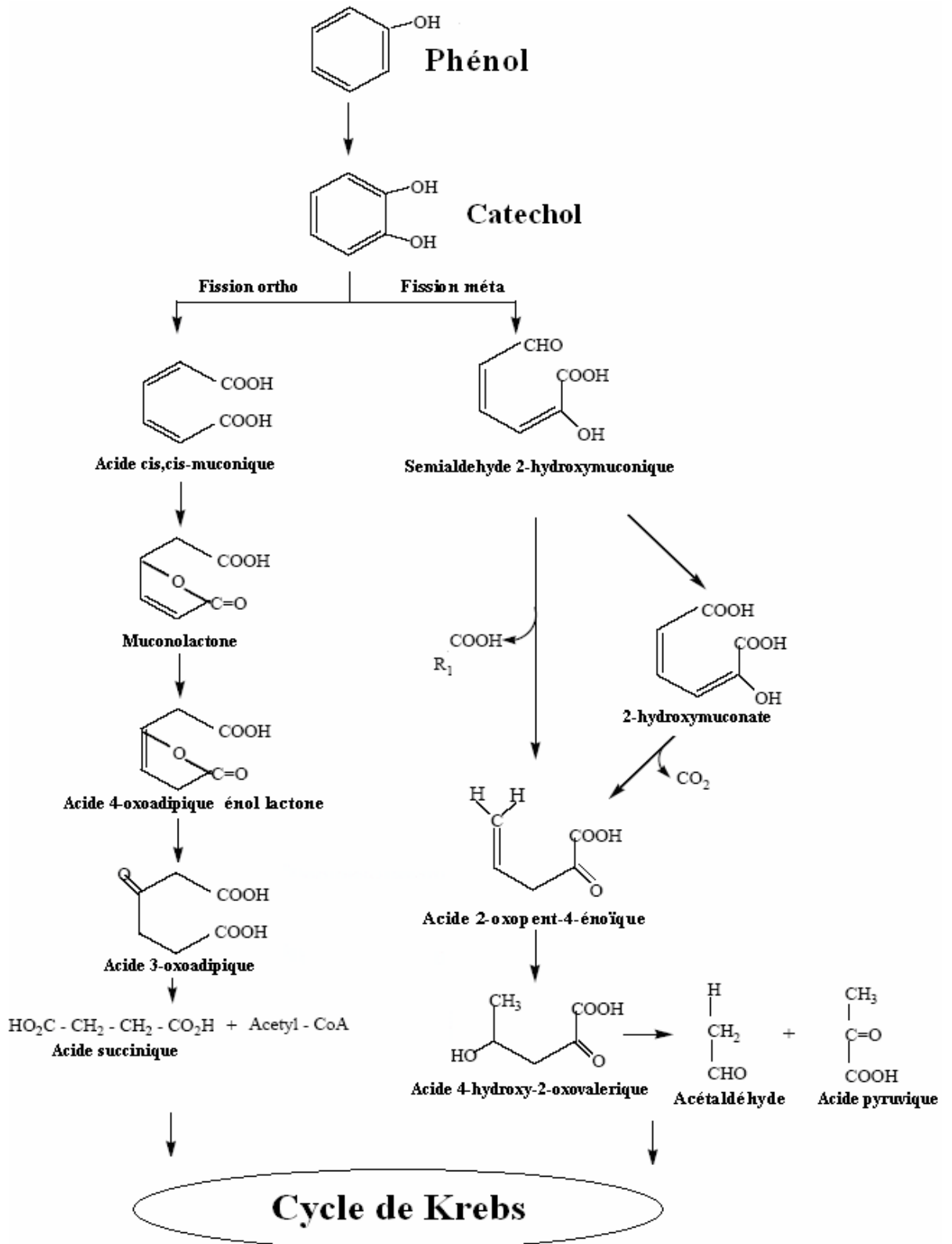


Figure 1.4 : Voies métaboliques ortho et méta de la dégradation du phénol (Sridevi et al., 2012).

✓ **Voie anaérobie**

Dans le milieu anaérobie, le phénol est dégradé par des organismes méthanogènes, par des bactéries du fer et des bactéries sulfato-réductrices. La voie anaérobie la plus étudiée est une dégradation du phénol par le biais du benzoyl-CoA. L'efficacité des biodégradations anaérobies n'est pas élevée, c'est pourquoi la biodégradation du phénol en milieu aérobie est préférée.

Volet 4

IMMOBILISATION

Les procédés d'immobilisation des microorganismes sont des techniques biotechnologiques de plus en plus développées notamment en vue d'améliorer la performance et la stabilité des systèmes de traitement biologiques, conçus pour la biorestauration des eaux contaminées par des hydrocarbures, des nitrates, des solvants chlorés et d'autres composés biologiquement dégradables. Elles sont utilisées car ces techniques permettaient d'obtenir une haute densité cellulaire et de séparer facilement les cellules en fin de procédé afin de pouvoir les réutiliser pour la biosynthèse subséquente (Bergmaier, 2002).

Ces techniques d'immobilisation copient la nature où les bactéries sont rarement en suspension et forment au contraire des agrégats, des floccs, des biofilms qui sont des structures qui les protègent.

1.4.1 Définition

L'immobilisation cellulaire est une méthode qui vise à retenir physiquement ou chimiquement une population microbienne dans un système de fermentation sans perte d'activité biologique désirée.

Elle est principalement utilisée pour obtenir des cultures avec une haute densité cellulaire ainsi qu'une stabilité renforcée même dans des conditions environnementales extrêmes.

1.4.2 Les techniques d'immobilisation cellulaire

Les méthodes existantes pour immobiliser les microorganismes sont nombreuses ; on cite : l'attachement à des surfaces, l'inclusion dans des matières poreuses, la rétention derrière des barrières (membranes), la floculation, l'encapsulation, l'inclusion dans une matrice de polymère et l'utilisation de membranes (figure 1.5). Le choix de la méthode est largement gouverné par les caractéristiques et la nature du microorganisme et l'application au quel il est destiné.

Nous avons concentré notre travail sur les systèmes dans lesquels les cellules sont immobilisées par inclusion.

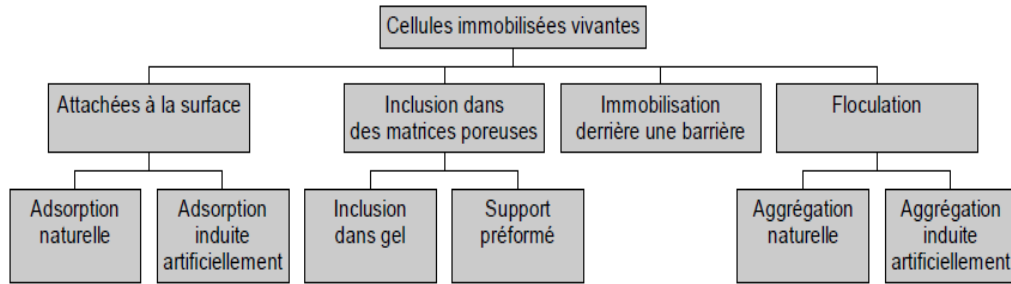


Figure 1.5 : Classification des systèmes d'immobilisation selon quatre classes (Bergmaier, 2002).

1.4.3 Inclusion dans des matrices poreuses

Le procédé d'inclusion dans une matrice poreuse est le procédé le plus utilisé. Il consiste à inclure les cellules dans une matrice d'un polymère plus ou moins rigide et qui peut être soit un gel, soit un support préformé. Ces polymères sont soit synthétique (polyacrylamide) ou naturel (protéine comme la gélatine ou polysaccharide comme la cellulose, l'agar-agar, les alginates ou encore le κ -carraghénane) (Housseny, 2012).

1.4.3.1 Inclusion des cellules dans un gel

Pour sa simplicité et son excellent confinement cellulaire, la plupart des recherches utilise cette méthode. Ce procédé consiste à inclure les cellules dans un polymère, où l'ensemble forme le biocatalyseur. Les cellules sont alors piégées par gélification d'une matrice polymère poreuse permettant le transport des substrats et des produits.

Le choix du type de polymère va être dépendant de propriétés mécaniques (cisaillement), chimiques (toxicité, stabilité) et physiques (perméabilité) du gel.

La forme et la taille de ces billes, influencent l'activité de la biomasse immobilisée.

Deux méthodes peuvent être utilisées pour produire les billes de gel :

L'extrusion : un mélange liquide, contenant les polymères et les microorganismes, est extrudé par une seringue dans une solution de durcissement pour former des billes.

Emulsion : cette méthode fait intervenir la dispersion de la phase aqueuse de cellules/ polymère dans une phase organique, donnant une émulsion eau dans huile. Les gouttes aqueuses dispersées sont par la suite durcies par abaissement de température ou par l'ajout d'un agent gélifiant (Bergmaier, 2002).

1.4. 3.2 Inclusion des cellules dans un support préformé

Dans le cas d'un support préformé, la matrice d'immobilisation est ajoutée au début d'une fermentation. Les cellules se diffusent dans les espaces libres du support où elles commencent à proliférer.

1.4.4 Avantages et inconvénients de la technique des cellules immobilisées

Au plan de la théorie, on attend de l'immobilisation des cellules microbiennes les avantages suivants :

- Les billes peuvent garder leur activité pendant une longue durée et pendant plusieurs utilisations (Liffourrena et al., 2014 ; Ha et al., 2009) ;
- Les billes évitent la perte du microorganisme en fin de réaction et donc avoir la possibilité de le réutiliser ;
- Améliorent la stabilité biologique et physique à long terme des microorganismes en raison de la protection par le support. Ce dernier pourrait agir comme un agent protecteur face aux effets du pH, de la température, des solvants voire même des métaux lourds (Dong-Zhi et al., 2013 ; Ruey-Shin et al., 2006 ; Dong-Zhi et al., 2013) ;
- Facilitent la séparation cellules/liquide, ce qui permet soit de mettre fin à la réaction au temps voulu, soit de faciliter les opérations de clarification en fin de réaction et donc avoir la possibilité de les réutiliser (Ha et al., 2009) ;
- Les billes Augmentent le pourcentage de dégradation (Andres et al., 2014) ;
- Les billes permettent une haute densité cellulaire (Andres et al., 2014 ; Dong-Zhi et al., 2013 ; Namane et al., 2012 ; Patil et al., 2006).

Cependant, cette technique comporte des inconvénients, comparés à des procédés utilisant des cellules libres qui sont :

- Possibilité de détachement des cellules du support entraînant une contamination du milieu ;
- Stabilité mécanique et chimique de certains supports parfois insuffisante (décomposition par les produits, dissolution) ;
- Possibilité de destruction du support par les cellules qui prolifèrent induisant la libération de ces dernières ;
- Une difficulté à obtenir des billes de petites tailles.

1.4.5 L'alginate de sodium

L'alginate de sodium (figure 1.6) est un polysaccharide de structure linéaire, biopolymère anionique, extrait des algues brunes, c'est les genres *Laminaria*, *Macrocystis*, *Fucus*, *Phaeophyceae*, *Ascophyllum*, *Ecklonie*, *Nereocystis*, *Durvillia*, *Chnoospora*, *Cystoseira* et *Turbinaria* (Belattmania et al., 2015 ; Bouderga, 2015 ; Chetouani, 2015). Cependant, certaines bactéries telles que *Azotobacter vinelandii* et plusieurs espèces de *Pseudomonas* sont susceptibles de produire l'alginate par des processus de fermentation microbienne suivis d'une polymérisation (Bouderga, 2015).

L'alginate peut constituer entre 10% et 40% du poids sec des algues. Son abondance va dépendre de la profondeur à laquelle les algues se sont développées, mais varie également en fonction de la saison (Ely, 2010).

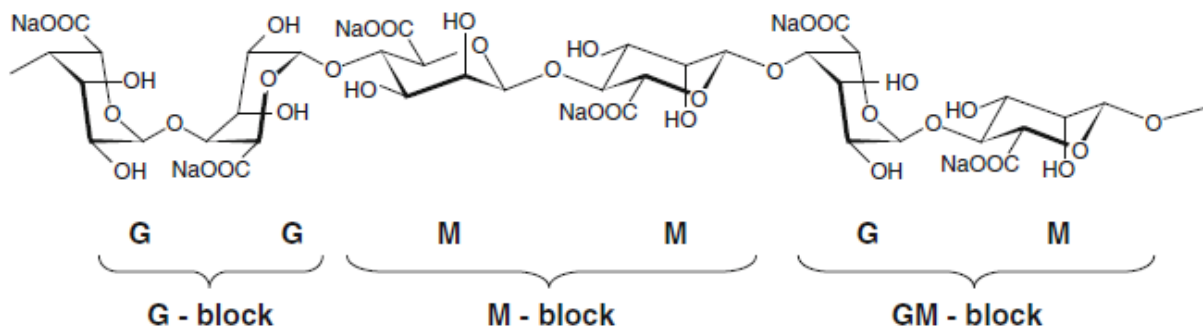


Figure 1.6: Structure chimique de la chaîne d'alginate de sodium.

1.4.5.1 Nature chimique des alginates

Les alginates sont des composés naturellement présents dans la paroi cellulaire des algues brunes sous forme de sels de magnésium, de calcium et de sodium. Ils donnent à l'hydrolyse deux acides uroniques, l'acide mannuronique (M) et l'acide α -L-gulonique (G). Ces deux acides uroniques constituent les unités de base de la molécule d'acide alginique, qui se compose de différents types de blocs : M-M G-G M-G (figure 1.7)



Figure 1.7 : Les unités de base de la molécule d'acide alginique (l'acide mannuronique (M) et l'acide α -L-gulonique (G)).

La séquence des différents blocs (M) et (G) dépend du type d'algue, de son âge ainsi que de la partie dont est isolé l'alginate. La saison de récolte affecte de même la composition en blocs et les séquences (Belattmania, 2015).

1.4. 5.2 Propriétés physico-chimiques

a. Solubilité

Les constantes de dissociation des acides carboxyliques présents dans les monomères M et G ont été déterminées : 3,38 et 3,65 respectivement. Les mêmes valeurs de pKa ont été déterminées pour les polymères. Pour des valeurs de pH inférieures au pKa, les fonctions carboxyliques seront protonées, et dissociées dans le cas contraire. L'acide alginique moléculaire n'est pas soluble dans l'eau mais par contre sa solubilité dépendra du type de sel formé (sodium, ammonium, potassium ou d'autres métaux alcalins). Les formes dissociées se dissolvent parfaitement en solution aqueuse en donnant des solutions à haute viscosité. Le paramètre essentiel qui détermine et limite la solubilité des alginates dans l'eau est le pH du solvant, avec la présence de charges électrostatiques dans les résidus d'acide uronique. Les solutions d'alginates précipitent au contact des solvants organiques polaires comme les alcools et les cétones. Par contre, l'alginate glycol est soluble dans l'alcool (Ely, 2010).

b. Gélification

Les propriétés physiques de l'alginate sont décrites pour la première fois dans les années 1970. La principale caractéristique de l'alginate est sa capacité à se gélifier en présence de cations multivalents.

Les sels d'alginates sont solubles dans l'eau et sont capables de gélifier en présence de cations multivalents tels que les ions Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} ou encore Al^{3+} grâce à la formation d'une jonction impliquant plusieurs chaînes polysaccharidiques. Cette interaction est décrite par le modèle « boîte d'œufs » dans lequel chaque ion divalent peut interagir avec deux résidus G adjacents ou appartenant à deux chaînes opposées (Figure 1.8).

Deux blocs G de deux chaînes de polymères adjacentes peuvent être réticulés par un cation bivalent (par exemple Ca^{2+} ou Ba^{2+}), par une interaction électrostatique entre les deux groupes carboxyliques COO^- du polysaccharide. Cette complexation non covalente donne lieu à la formation d'un réseau à trois dimensions, et donc d'un hydrogel physique. Lorsque deux brins de polymère sont face à face, la conformation des blocs G forment des cavités dans lesquelles viennent se loger les ions Ca^{2+} . Cette dimérisation des blocs G est communément appelée structure type "boîte d'œufs". Un schéma représentatif de la gélification des chaînes d'alginate est représenté dans la figure 1.8. La rigidité du gel obtenu dépend du ratio entre les

blocs G et les blocs M contenus dans le polymère (ration G/M). De façon générale, les alginates composés d'un faible ratio G/M forment des gels plus mous et élastiques, alors que les alginates avec ratio G/M élevé donnent plutôt des gels durs et cassants (Rolland, 2013).

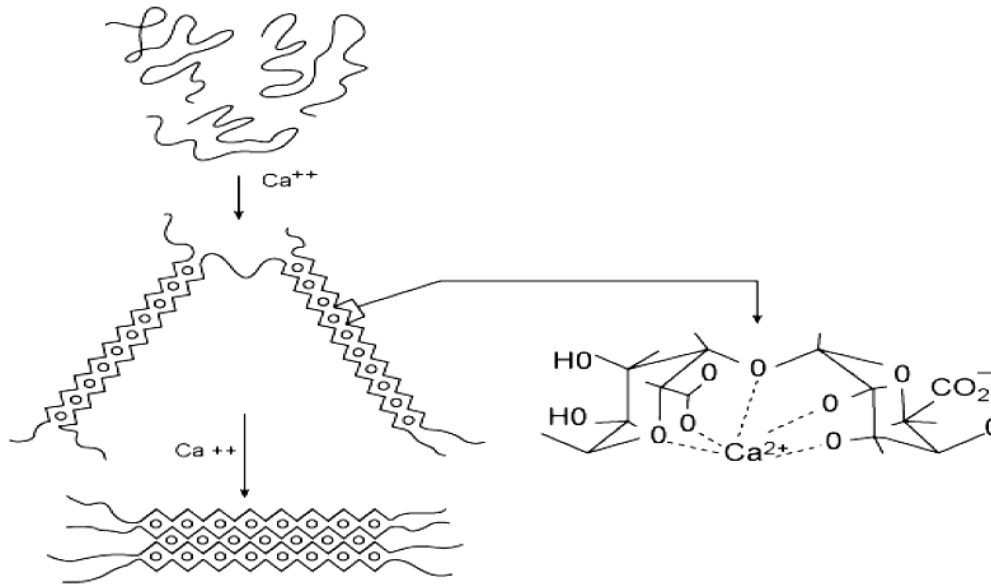


Figure 1.8: Gélification de l'alginate par des ions calcium.

Le sel de cation divalent généralement utilisé pour la gélification de l'alginate est le chlorure de calcium en raison de sa bonne solubilité en milieu aqueux et de la forte disponibilité en ions calcium qu'il apporte. Il a été montré que 90% des ions sodium contenus dans une solution d'alginate de sodium peuvent être facilement déplacés par les ions calciques.

Les ions calcium s'associent préférentiellement aux fragments poly-guluronate plutôt qu'aux fragments poly-mannuronate. En effet, les blocs poly-guluronate, en raison de leur conformation spatiale, permettent une chélation plus énergétique des ions. Ces derniers sont retenus dans une « cage » et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles. Les ions calcium sont beaucoup mieux retenus que par de simples liaisons ioniques.

Volet 5

LE COUPLAGE PROCÉDES PHOTOCATALYTIQUE /TRAITEMENT BIOLOGIQUE

L'efficacité des procédés biologiques est souvent limitée par la présence des composés récalcitrants (non biodégradables) (Augugliaro et al., 2006), même si ceux –là sont les procédés les plus conventionnellement utilisés et les plus économiques.

D'autre part, la photocatalyse hétérogène permet la dégradation de la majorité des contaminants mais leur utilisation est entravée par la formation des sous-produits (Brosillon et al., 2008), le coût élevé du procédé (Ballesteros et al., 2009; Yahiat et al., 2011) et par le manque de connaissances requises pour les différentes étapes dans la minéralisation totale des composés . Par ailleurs, l'utilisation seule comme procédure de traitement ne semble pas lucrative.

Ainsi, pour réduire la toxicité du composé et ou diminuer le coût du procédé photocatalytique, plusieurs auteurs recommandent l'utilisation des procédés couplés en citant le procédé photocatalytique comme un pre-traitement pour réduire la toxicité du composé jusqu'à un niveau désiré suivi par le traitement biologique. Ce couplage peut être une bonne alternative (Ballesteros et al., 2009 ; Brosillon et al., 2008 ; Loveira et al., 2012 ; Suryaman et al., 2010 ; Yahiat et al., 2011 ; Zapata et al., 2010).

1.5.1. La stratégie générale pour le couplage de la photocatalyse avec le traitement biologique

Le couplage de la photocatalyse avec le traitement biologique est une bonne alternative. Plusieurs auteurs ont mis au point une stratégie générale applicable au traitement des eaux usées contenant des composés bio-récalcitrants :

1.5.1.1 Confirmation de la non- biodégradabilité des composés

Il est recommandé de confirmer la non-biodegradabilité du composé présent dans la solution à traiter car les composés biodégradables sont dirigés vers les traitements classiques biologiques qui sont à l'heure actuelle les moins chère (Parra cardona, 2001 ; Tamer et al., 2006).

1.5.1.2 La biodégradabilité des composés intermédiaires

Après le traitement photocatalytique, la solution résultante est considérée être biodégradable après l'élimination des Produits récalcitrants et les Produits inhibiteurs et /ou non biodégradables (Parra cardona, 2001 ; Tamer et al., 2006).

1.5.1.3 La durée de prétraitement

Le temps de prétraitement photocatalytique doit être optimisé. Ce temps est un paramètre qui représente le meilleur compromis entre l'efficacité du traitement initial et son coût actif. Il dépend de l'évolution de la toxicité et de la biodégradabilité de la solution à traité (Augugliaro et al., 2006 ; Parra cardona, 2001 ; Ballesteros et al., 2008) .

Un temps faible de prétraitement est désiré pour éviter une longue durée d'irradiation par conséquence une grande consommation électrique. Le coût électrique atteint 60% du coût opérationnel total d'un procédé phototraitement en utilisant une source électrique (Augugliaro et al., 2006). Cependant, un temps de phototraitement trop court générerait une structure des composés intermédiaires formés similaires à celles des composés bio-récalcitrantes de départ qui sont, de fait non biodégradable (Suryaman et al., 2010 ; Parra cardona, 2001).

Suryaman et al. (2010) ont montré qu'une faible durée de phototraitement d'une solution de chlorophénol a besoin d'une longue durée de traitement biologique à cause de l'effet inhibiteur des composés intermédiaires générés par le phototraitement.

Toute difficulté du couplage réside donc dans la nécessité de trouver un temps de prétraitement suffisant pour réduire la toxicité de la solution initiale et la rendre plus biodégradable mais sans trop minéraliser la solution, afin qu'une quantité suffisante de substrat organique s'y maintienne pour satisfaire le traitement biologique.

1.5.2. Résumé des travaux réalisés sur le traitement par couplage photocatalyse / biodégradation

Plusieurs études ont été publiées mettant en évidence un effet positif du couplage des procédés catalytiques aux traitements biologiques. Le tableau 1.2 montre quelques travaux de certains auteurs.

Tableau 1.2 : travaux réalisés sur le traitement par couplage photocatalyse /biodégradation.

Le résumé des travaux	Les références
Une diminution dans le coût de traitement est prouvée par l'application d'un couplage photocatalytique /traitement biologique pour la dégradation d'un bactéricide	Loveira et al.(2012)
Une minéralisation totale de 400mg.L ⁻¹ du composé 4-chlorophénol pour une durée de 96h lors de l'utilisation d'un couplage photocatalyse avec un traitement biologique.	Goel et al. (2010)
Le couplage photocatalytique et biologique a amélioré La dégradation de la Tétracycline(TC) et la Tylozine (TYL).	Yahiat et al. (2011)
Le couplage du procédé photocatalytique avec le traitement biologique a permis une diminution significative dans le pourcentage de dégradation des composés suivants : 2-chlorophénol, 2-4 dichlorophénol, 2-4-5 trichlorophénol et le pentachlorophénol.	Suryaman et al. (2010)
Amélioration de la dégradation de rouge de méthyle (composé modèle) par le couplage photocatalytique / traitement biologique. Le rouge de méthyle a eu une dégradation partielle par photocatalyse.	Tatoba et al.(2019)
L'utilisation du couplage photocatalyse/traitement biologique pour la dégradation d'un pesticide commercial (AR183) faiblement biodégradé.	Chebli et al.(2011)
La minéralisation totale du composé α -methylphenylglycine a été obtenue après un couplage de photocatalyse avec un traitement biologique. Le composé est faiblement biodégradable.	Oller et al.(2007)

1.5.3. Les avantages du couplage

Il a été démontré que le couplage du procédé photocatalytique avec le traitement biologique a beaucoup d'avantage en citant :

- Les microorganismes utilisés dans les traitements biologiques ne sont pas exposés aux produits toxiques car la toxicité est diminuée et ou éliminée par photocatalyse ;
- Diminution du coût total de traitement ;
- La minéralisation totale des produits organiques ;
- La diminution du coût des produits chimiques utilisés dans le traitement ;
- En cas de l'immobilisation du catalyseur, le traitement ne nécessite pas une filtration après le procédé photocatalytique (Yahiat et al., 2011).

Volet 6

LA METHODOLOGIE DES PLANS D'EXPERIENCES

De manière générale, la méthode des plans d'expériences cherchera à déterminer et à établir les liens existants entre deux types de variable :

La réponse : grandeur physique étudiée ;

Les facteurs : grandeur physique modifiable par l'expérimentateur, sensées influencer sur la variation de la réponse.

Plus précisément, elle vise aussi bien à comprendre les relations liant la réponse avec facteurs, que les facteurs entre eux. Pour cela la solution proposée consiste dans tous les cas à établir un modèle, exprimant la réponse en fonction des facteurs.

Pour bâtir ce modèle, il faut appréhender ces variations. Celle-ci sont déduite des résultats de séries d'expériences, c'est-à-dire plusieurs configurations pour lesquelles les valeurs des facteurs sont différentes.

La notion de plan d'expériences, correspondant donc à la réalisation d'une série de N expériences, qui sont toutes :

- Déterminer à priori ;
- Obligatoirement réalisables ;
- Indépendantes entre elles.

La réalisation d'un plan revient à déterminer la valeur de la fonction réponse pour ces N configurations. Une relation de modalisation en est alors déduite.

1.6.1 Définition des méthodes des plans d'expériences

La méthode des plans d'expériences est un ensemble de techniques complémentaires aidant son utilisateur dans la détermination des expériences à réaliser ainsi que dans la compréhension et l'exploitation des résultats obtenus.

Ces outils s'appuient essentiellement sur des bases statistiques et algébriques. Cette particularité induit la possibilité quasi-permanente de connaître les erreurs concédées sur les données expérimentales et sur celle qu'en déduites (Vivier, 2002).

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur (Goupy, 2013):

- Plans factoriels complet.
- Plans factoriels fractionnaires.

- Plans pour surface de réponse (plans de box-behnken, plans composites.....).
- Plans booléens.
- Plans pour simulation numériques.

1.6.2. Les principaux avantages des plans d'expériences

Les principaux avantages de cette méthode (Goupy, 2006) :

- Une diminution considérable du nombre d'essai ;
- Une interprétation rapide et sans équivoque en fournissant un modèle expérimental précis du système étudié ;
- Fournissent des résultats faciles à présenter ;
- Possibilité d'étudier un très grand nombre de facteurs ;
- Détection des interactions éventuelles ;
- Modélisation aisée des résultats ;
- Découvrir la solution optimale
- Détermination des résultats avec une bonne précision.

1.6.3. Notion de modélisation mathématique

En l'absence de toute information sur la fonction qui lie la réponse aux facteurs, on se donne, a priori, une loi d'évolution dont la formulation la plus générale est la suivante :

$$y = f(x_1, x_2, x_3 \dots, x_n) \dots \dots \dots \text{Eq 1}$$

Cette fonction est trop générale et il est d'usage d'en prendre un développement limité de Taylor. Si les dérivées du développement de Taylor peuvent être considérées comme des constantes le développement précédent prend la forme d'un **polynôme** de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_{ii}^2 + \sum a_{ijk} x_i x_j x_k \dots \dots \dots \text{Eq 2}$$

- y : La grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur. C'est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.
- x_i : Représente le niveau attribué au facteur i . C'est la valeur de la coordonnée du facteur i retenue par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue. On supposera même, par la suite, que ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).

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

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences.

Ce modèle est appelé "*modèle postulé*" ou "*modèle a priori*" (Goupy, 2006 ; Goupy, 1997).

1.6.4. L'Analyse statistique des résultats

- **Test de Fischer**

L'objectif de l'analyse globale des résultats est de définir la qualité descriptive du modèle au moyen d'un tableau d'analyse de la variance (Tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Analyse de la variance (ANOVA)

	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	F_{obs}
Model	$SCM = \sum_{i=1}^N \left(\hat{y}_i - \bar{y} \right)^2$	$p - 1$	$SCM / (p - 1)$	F_{obs}
Résidus	$SCE = \sum_{i=1}^N \left(y_i - \hat{y}_i \right)^2$	$N - P$	$SCE / (N - P)$	
Total	$SCT = \sum_{i=1}^N \left(y_i - \bar{y} \right)^2$	$N - 1$		

- N : Le nombre d'expériences
- P : Le nombre de coefficients
- y_i : Réponse mesurée
- \hat{y}_i : Réponse calculée
- \bar{y} : Réponse moyenne
- SCT : La somme des carrés total, cette somme peut être décomposé en deux sommes
 - ✓ SCM : La somme des carrés des erreurs entre les réponses estimées et la moyenne des réponses mesurées
 - ✓ SCE : La somme des carrés des écarts entre les réponses mesurées et estimées

L'analyse statistique du modèle dans sa globalité se poursuit par la construction d'un test statistique, visant à affecter une probabilité à l'hypothèse nulle (H_0) qui dit que le modèle ne permet pas de décrire la variation des résultats d'essai.

Il s'agit du test de comparaison du rapport de deux variances à une valeur donnée. On définit pour cela la statistique, notée F_{obs} à partir de la relation :

$$F_{obs} = \frac{SCM/P-1}{SCE/N-P} \dots\dots\dots \text{Eq 3}$$

Les quantités (P-1) et (N-P) correspondent respectivement au nombre de degrés de liberté affectés à la somme des carrés associée au modèle (SCM) et à la somme des carrés associés aux résidus (SCE).

Donc l'hypothèse H_0 est rejeté, avec une probabilité α si :

$$F_{obs} > F_{(\alpha, P-1, N-P)} \dots\dots\dots \text{Eq 4}$$

- **L'analyse statistique des coefficients (test de Student)**

Une autre étape de l'analyse statistique du modèle concerne l'analyse statistique des coefficients basée sur l'hypothèse nulle (H_0) qui affirme que les coefficients a_i associé à l'élément X_i du modèle est nul. La probabilité associée à cette hypothèse est obtenue à partir du test statistique de comparaison à la valeur 0.

Pour cela on établit pour chaque coefficient la statistique, noté t_{obs} , à partir de la relation :

$$t_{obs} = \frac{|a_i|}{\sigma(a_i)} \dots\dots\dots \text{Eq 5}$$

Tel que $\sigma(a_i)$ est l'estimation de l'écart-type du coefficient a_i

Pour réaliser ce test au seuil α , il faut comparer la valeur de t de student avec la valeur critique d'un student à (N-P) degré de liberté.

On utilise une table de student à N-P degré de liberté, α étant choisi, on lit dans cette table de student la valeur $t_{critique}(\alpha/2, N-P)$. On rejette H_0 lorsque $t_{obs} > t_{critique}$

- **Coefficient de détermination (R^2 et R^2 ajusté)**

Le Coefficient de détermination R^2 , est à la fois la fraction des variations de la réponse expliquée par le modèle est un indice de la qualité de la régression

$$R^2 = \frac{SCM}{SCT} \dots\dots\dots \text{Eq 6}$$

Le coefficient de **R² ajusté**

$$R^2 \text{ ajusté} = \frac{SCE/N-P}{SCT/N-1} \dots\dots\dots \text{Eq 7}$$

Plus la valeur du coefficient de régression est proche de 1 et plus la qualité descriptive du modèle est satisfaisante (Rabier, 2007).

1.6.5. Le plan d'expérience appliqué

Pour notre étude nous nous somme intéressé au *plan factoriel complet*

Plans factoriels complets 2^k :

Les plans factoriels à deux niveaux sont les plus simples, ils permettent de bien comprendre le principe de la méthode, et ont de nombreuses application.

La dénomination 2^k a la signification suivante : le chiffre 2 représente les deux niveaux haut et bas des facteurs, et k indique le nombre de facteurs. Le nombre d'expériences à réaliser se calcule par : 2^k

En présence de 3 facteurs, le nombre des essais est égale à 2³. L'application du modèle avec interaction donne 8 paramètres à déterminer. Donc nous sommes en présence d'un plan saturé ce qui nécessité la réalisation des essais supplémentaires au centre du domaine qui permettra de faire les analyses statistiques.

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

$Y=a_0+a_1X_1 +a_2 X_2 +a_3 X_3 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3+a_{123}X_1X_2X_3 \dots\dots$ Equation 8

Il est facile d'estimer les paramètres à partir de la matrice d'expérience, il suffit de construire le tableau 1.4 suivant :

Tableau 1.4 : Plan factoriel à 3 facteurs.

N° des essais	X ₁	X ₂	X ₃	RESPONSE (Y)
1	-1	-1	-1	Y1
2	+1	-1	-1	Y2
3	-1	+1	-1	Y3
4	+1	+1	-1	Y4
5	-1	-1	+1	Y5
6	+1	-1	+1	Y6
7	-1	+1	+1	Y7
8	+1	+1	+1	Y8

9	0	0	0	Y9
10	0	0	0	Y10

1.6.6. Les logiciels de plans d'expériences

Les logiciels de plans d'expériences sont devenus des outils absolument indispensables pour la construction de plans complexes et l'interprétation approfondie des résultats du plan.

A l'aide de ces logiciels on peut effectuer non seulement le calcul des coefficients mais aussi les calculs statistiques permettant d'évaluer la qualité du modèle mathématique. Les logiciels de plans d'expériences sont aussi programmés pour calculer des réponses dans tous les domaines d'étude, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer des courbes d'isoreponses, pour construire les surfaces de réponse et pour déterminer les zones d'intérêt. Cet ensemble de possibilités permet d'effectuer de multiples analyses et de regarder ces données sous tous les angles. On arrive ainsi à extraire, en peu de temps, toute l'information présente dans les résultats d'un plan d'expériences (Goupy, 1997).

Parmi ces logiciels on cite JMP, Statistica, Minitab, XLstat.....

PARTIE 2
MATERIELS ET METHODES

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Le polluant

Les études de photodégradation, de biodégradation et de couplage photocatalyse-biodégradation ont porté sur le phénol (BICHEM Chemopharma) comme polluant organique modèle.

2.2. Le catalyseur

Le catalyseur utilisé est le dioxyde de titane TiO_2 commercial (BICHEM Chemopharma).

Le TiO_2 commercial a été caractérisé par :

1- Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

À l'aide d'un spectromètre FTIR-4100 avec un domaine de fréquence de 400-4000 cm^{-1} . L'échantillon est ajouté au KBr à raison de 0,5g/300g de KBr.

Le spectre infrarouge représenté sur la figure 2.1 montre qu'il y a une bande d'absorption entre 1850 et 1500 cm^{-1} qui représente une bande de vibration de O-H due à la réabsorption de l'eau à partir de l'atmosphère.

Et une autre aux environs des faibles fréquences dans la région entre 400-800 cm^{-1} associée au Ti-O-Ti.

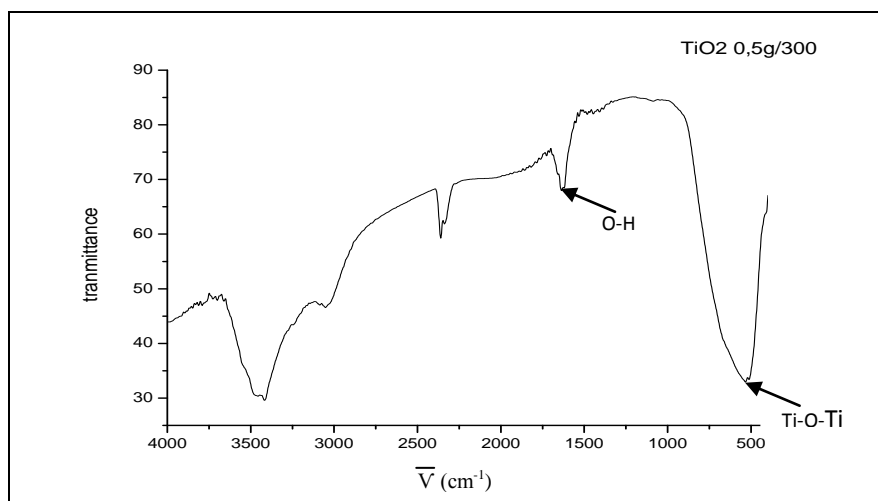


Figure 2.1 : Spectre IR du catalyseur TiO_2 .

2- Diffraction des rayons X (DRX)

Cette analyse a été effectuée sur un diffractomètre PANalytical, avec une irradiation $CuK\alpha$ ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$). L'intensité de diffraction est mesurée entre 2 et 70°, avec un pas 2θ de 0,017° et un pas de temps de 87,2256s.

Les positions et les intensités des pics observés sont comparés au fichier de référence

PDF-ICDD (Powder Diffraction File-International Center for Diffraction Data) pour l'identification des phases minéralogiques présentes.

La figure 2.2 montre que le catalyseur est composé de deux phases minéralogiques.

1-L'anatase

2-Le rutile

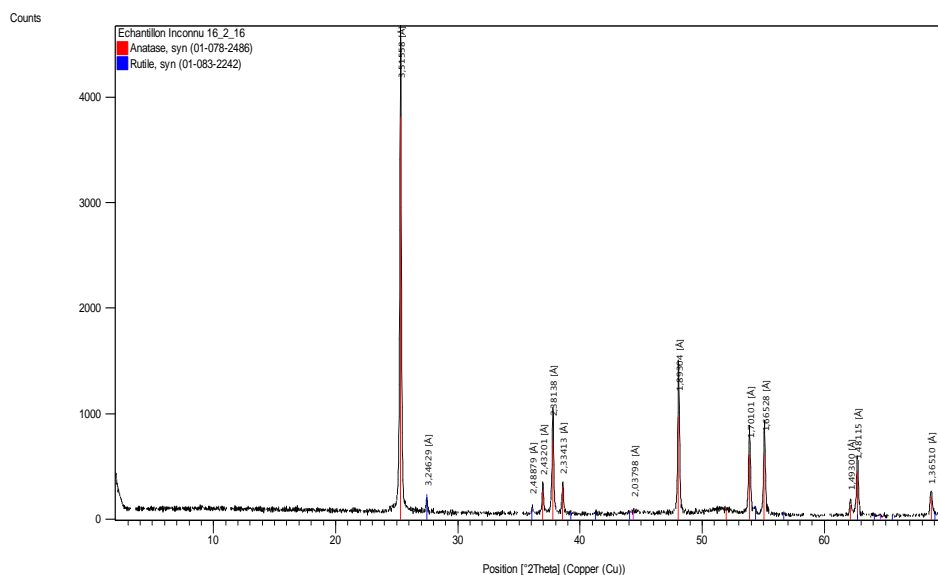


Figure 2.2: Le diffractogramme du catalyseur TiO₂.

3- La Mesure de la surface spécifique par la méthode B.E.T

La surface spécifique du catalyseur a été déterminée à partir de la mesure d'isotherme d'absorption(BET) sur un appareillage Quantachrome. La surface a été trouvée de l'ordre de 3,761m²/g.

2.3. Matériel biologique

Deux souches ont été utilisées dans ce travail :

- 1- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, est fournie par l'institut pasteur d'Alger (IPA)
- 2- Une souche bactérienne (bactérie autochtone), a été isolée à partir des eaux résiduaires d'Oued El Harrach dans des travaux antérieurs (Hamdi, 2007) et qui est capable de dégrader le phénol.

2.4. L'alginate de sodium

L'alginate de sodium utilisé dans l'immobilisation des cellules est de formule (C₆ H₇ Na_{1/2} O₆)_n (Fluka).

2.5. Composition du milieu de culture

Le milieu minimum de culture contient des substances nutritives indispensables à la croissance des microorganismes. La composition est présentée en annexe 1 (Sheeja et al, 2002).

2.6. Dosage de phénol

Le phénol a été analysé par une méthode colorimétrique selon la norme NF(T90-204), par condensation du 4-amino antipyrine avec le phénol en présence d'un agent oxydant ferricyanure de potassium dans un milieu alcalin pour donner un complexe rouge, l'intensité de cette dernière dépend de la concentration du phénol. La courbe d'étalonnage ainsi que la méthode de dosage sont présentées en annexe 2.

2.7. Mesure de la biomasse microbienne

La matière sèche cellulaire est déterminée par le biais d'une courbe d'étalonnage (Chung et al. 2003 ; Li et al., 2010) (voir annexe 2).

2.8. La photodégradation

Les expériences de la photodégradation du phénol ont été réalisées dans un photo réacteur, dispositif conçu par notre équipe (Figure 2.3).

Le photoreacteur est divisé en deux compartiments :

- Le premier assure l'agitation et l'aération de la solution à traiter, il est composé d'un réacteur en verre de 3L couvert avec du papier aluminium afin d'éviter l'infiltration des rayonnements.
- Le deuxième où la réaction photocatalytique se déroule, est composé d'une chambre en inox munie d'un système en escaliers (Figure 2.4) permettant d'augmenter la surface de contact.

Les rayonnements UV proviennent d'une lampe (VILBER LOURMAT, FRANCE). Cette dernière placée au milieu du couvercle de la chambre en inox. Deux longueurs d'ondes sont émises par cette lampe 254nm et 365nm.

La solution est agitée à l'obscurité durant 30min (Helali, 2012 ;) cela permet d'une part d'atteindre l'équilibre d'adsorption à la surface du catalyseur et d'autre part une répartition homogène du catalyseur ainsi qu'une bonne dissolution d'oxygène nécessaire à l'oxydation (Helali, 2012 ; Seok et al., 2008).

Après 30min et avant d'allumer la lampe, un prélèvement correspond à $t=0$ min est effectué. La solution continuellement maintenue sous agitation est ensuite irradiée et des prélèvements sont effectués pour l'analyse du phénol. Les échantillons à analyser sont filtrés en utilisant des filtres millipores de $0,45\mu\text{m}$ (Goutaille et al., 2001. Helali,2012).

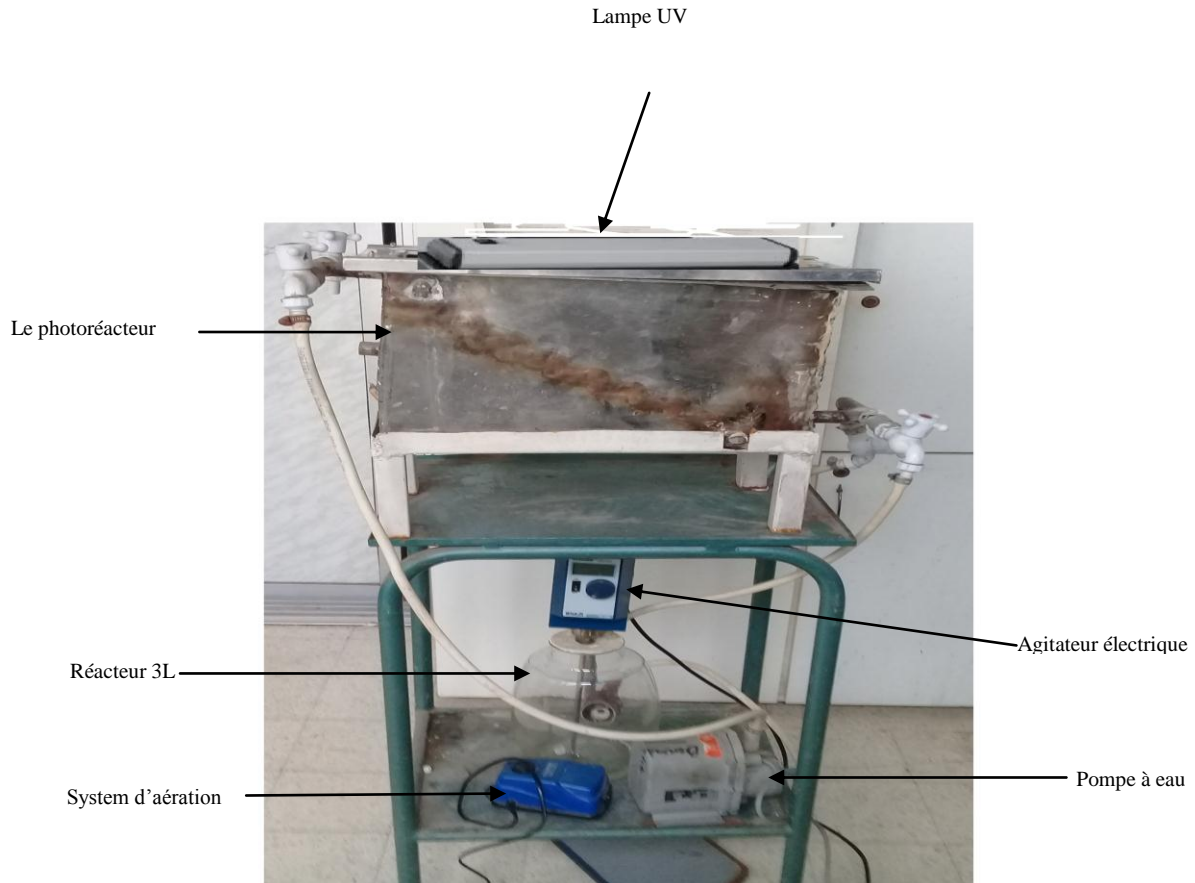


Figure 2.3 : le dispositif de la photodégradation.



Figure 2.4 : Vue de l'intérieur du photoreacteur.

2.9. La biodégradation du phénol

La figure 2.5 présente le schéma du réacteur biologique utilisé. Il est composé d'une cuve en verre contenant 1 litre de solution, moyennement agitée, et dont la température est réglée. Des prélèvements sont effectués pour l'analyse du phénol résiduel.

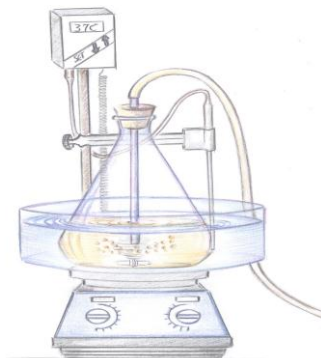


Figure 2.5 : Bioréacteur.

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 20min ;
- La préculture préparée 24h avant l'expérience ;
- Dans la zone stérile :
 - Ajouter respectivement CaCl_2 et FeSO_4 à la solution du phénol ;
 - Ajouter la préculture d'un inoculum de 1% au bioréacteur ;
 - Fixer les conditions opératoires sur le bioréacteur (aération, agitation et température).

2.10. Technique d'immobilisation dans l'alginate de calcium

L'inoculum bactérien utilisé dans l'immobilisation provient d'une expérience de biodégradation de $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ du phénol. Les bactéries sont récupérées par centrifugation (15mn à 4000 tr/mn). Le culot obtenu est lavé 2 fois par une solution tampon (voir annexe 1).

Après récupération du culot, ce dernier est remis en suspension dans une solution d'alginate de sodium (3% poids/volume) préalablement stérilisée pendant 15min à 121°C (Adinarayana et al., 2005).

Des billes sphériques d'alginate de calcium sont préparées par extrusion à partir d'une solution d'alginate de sodium contenant l'inoculum bactérien et une solution de chlorure de calcium.

Deux solutions de CaCl_2 sont préparées, 0,1M pour la formation des billes et 0,2M pour le durcissement des billes formées. Les deux solutions sont autoclavées à 120°C pendant 15mn, puis conservées au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation (Ali, 2016).

2.11. La photobiodégradation

La solution du phénol prétraité par photocatalyse est envoyée vers le bioréacteur afin de compléter la dégradation du phénol.

Le TiO_2 est séparé de la solution du phénol par une décantation de 4h de temps (Suryaman et al., 2010).

Avant le commencement de la biodégradation un échantillon est prélevé de la solution photo catalysée afin de s'assurer que la concentration finale après photocatalyse n'est pas changée. L'ajout des nutriments est nécessaire.

PARTIE 3

RESULTATS ET DISSCUSSIONS

3.1. La photodégradation

Dans cette première partie nous avons cherché à mettre en évidence l'influence de quelques paramètres sur la photodégradation catalytique du phénol dans une suspension aqueuse de TiO_2 . Les paramètres testés sont la longueur d'onde d'irradiation, la concentration en phénol, la concentration en dioxyde de titane et le pH de la solution.

3.1.1. L'influence de la longueur d'onde

Les expériences de dégradation du phénol ont été réalisées en présence de deux solutions contenant 100 mg.L^{-1} du phénol, 2 g.L^{-1} de TiO_2 et un pH de 3. L'une a subi une irradiation UV à 254 nm et l'autre à 365 nm. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3.1.

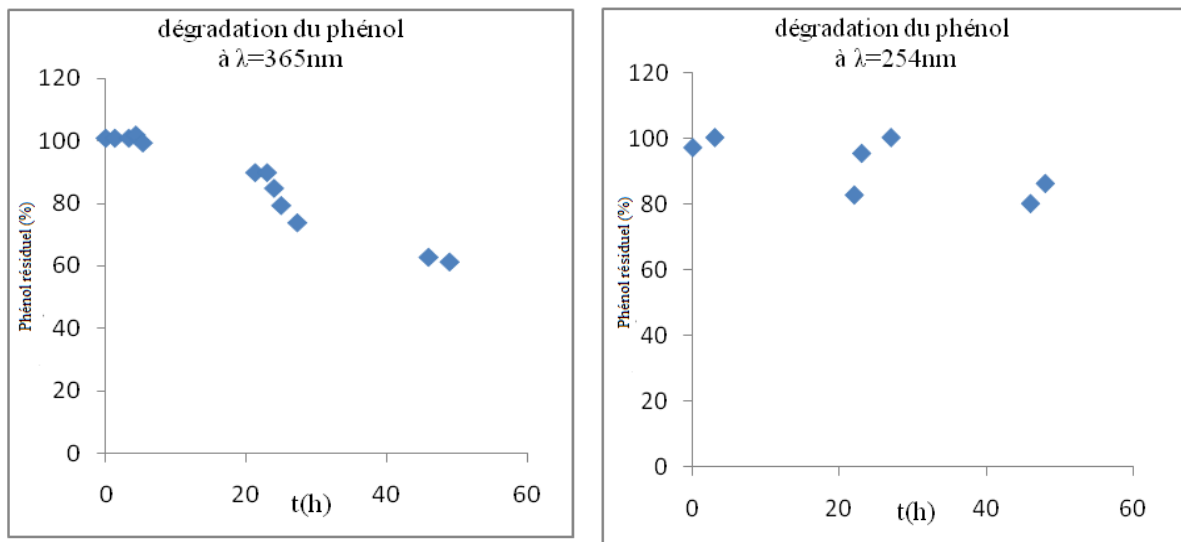


Figure 3.1 : La photodégradation du phénol à deux différentes longueurs d'ondes (365nm et 254nm).

Après 48h d'irradiation le taux d'élimination du phénol est de 40 % à 365 nm et presque de 20% à 254 nm.

Faisant référence à la page 46, le dioxyde de titane TiO_2 utilisé dans notre étude est composé de deux formes cristallines : anatase et rutile ce qui est confirmé par l'analyse du RX, et selon Helali (2012) l'anatase a été montré comme étant la forme de TiO_2 la plus active.

L'anatase présente une énergie de bande interdite E_g de 3,2 eV correspondant à une activation par des photons de longueur d'onde $\lambda < 388 \text{ nm}$ (Helali, 2012; Sarantopoulos, 2007). D'après la figure 3.1 la longueur d'onde 365nm montre le meilleur pourcentage de dégradation du phénol.

Dans le reste de notre travail, on se limite à l'étude de la dégradation sous irradiation UV à 365 nm ; en raison du faible taux d'élimination à 254 nm.

3.1.2 La photolyse (sans catalyseur) et l'adsorption du phénol sur le TiO₂ (sans la présence des UV)

Pour montrer l'efficacité du procédé photocatalytique afin de faire une dégradation photocatalytique du phénol, une expérience sous irradiation UV (absence de TiO₂) et une expérience en présence de TiO₂ (sans UV) ont été faites.

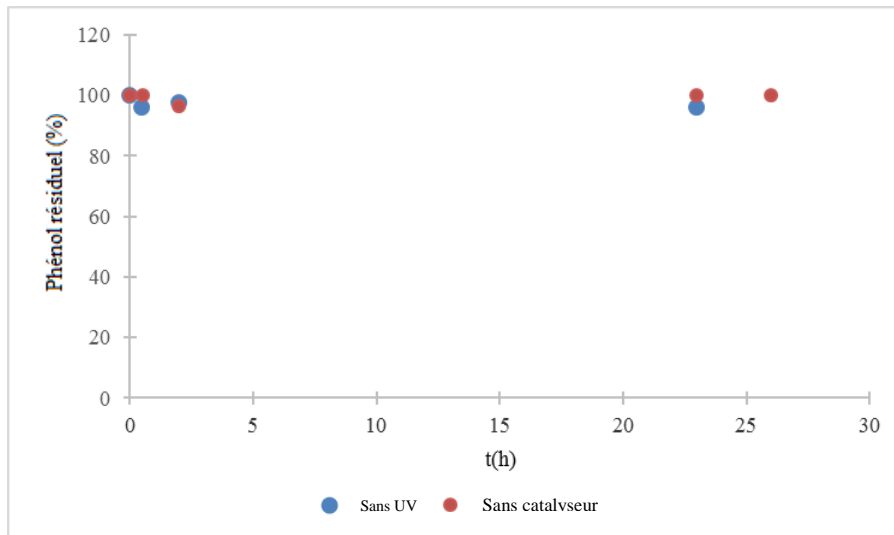


Figure 3.2 : La photolyse (sans catalyseur) et l'adsorption du phénol sur le TiO₂ (sans la présence des UV) ([phénol]=100mg.L⁻¹, [TiO₂]= 2000mg.L⁻¹, pH=4)

La figure 3.2 montre que sous irradiation UV et en l'absence de TiO₂ la quantité éliminée du phénol est faible. La même remarque est observée pour l'expérience avec TiO₂ (absence des UV). Le même résultat est observé par Kartal et al. (2001).

3.1.3 Plans d'expérience et modélisation de la photodégradation du phénol

La modélisation de la photodégradation du phénol est l'établissement d'une relation entre les variables d'entrée qui sont les paramètres opératoires et les variables de sortie qui représentent dans notre cas le pourcentage de dégradation du phénol.

Les variables d'entrée sont :

- La concentration du phénol (mg.L⁻¹) ;
- La concentration du TiO₂ (mg.L⁻¹) ;
- Le pH de la solution.

Le temps de la réaction photocatalytique est fixé à 24h.

Les limites de variations de chaque facteur sont présentées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Limites de variation des facteurs.

<i>Les paramètres étudiés</i>	<i>Niveau de variation des facteurs</i>		
	Niveau bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
X₁ : Concentration du phénol (mg.L⁻¹)	20	60	100
X₂ : Concentration du TiO₂ (mg.L⁻¹)	400	1200	2000
X₃ : pH de la solution	2,6	5,8	9

✓ **Construction de la matrice d'expérience**

Pour un plan factoriel complet à deux niveaux, le nombre d'expérience à réaliser = 2^k dans notre cas, $k=3$ on a 8 essais à réaliser. Le tableau 3.2 résume ces essais et donne la façon de faire varier les facteurs.

Tableau 3.2 : Les essais du plan d'expérience.

<i>N° d'essai</i>	X₁	X₂	X₃
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
C	0	0	0
C	0	0	0

C : essai au centre

Les résultats obtenus pour chaque essai sont présentés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Plan factoriel complet 2^3 .

<i>N° d'essai</i>	X₁	X₂	X₃	REPONSE (Y)
1	-1	-1	-1	Y1=30.61
2	+1	-1	-1	Y2=14.1
3	-1	+1	-1	Y3=0
4	+1	+1	-1	Y4=17.56
5	-1	-1	+1	Y5=55
6	+1	-1	+1	Y6=1.78
7	-1	+1	+1	Y7=64.56
8	+1	+1	+1	Y8=32.95
C	0	0	0	Y9=24.72
C	0	0	0	Y10=24.72

Pour un modèle d'ordre 1 avec interaction, la forme générale du polynôme est la suivante :

$$Y=a_0+a_1X_1 +a_2 X_2 +a_3 X_3 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3+a_{123}X_1X_2X_3 \dots\dots\dots(1)$$

✓ **Détermination des coefficients du modèle**

Les coefficients du modèle sont obtenus à l'aide d'un logiciel d'analyse JMP8 et le modèle s'écrit sous la forme suivante :

$$Y=26.6-10.4725 X_1 + 1.6975 X_2+11.5025 X_3 + 6.96 X_1 X_2 -10.735 X_1 X_3 + 8.485 X_2X_3 - 1.5575 X_1X_2 X_3 \dots\dots\dots (2)$$

A partir des coefficients obtenus, l'estimation de chaque point expérimental est donnée par le logiciel JMP8.

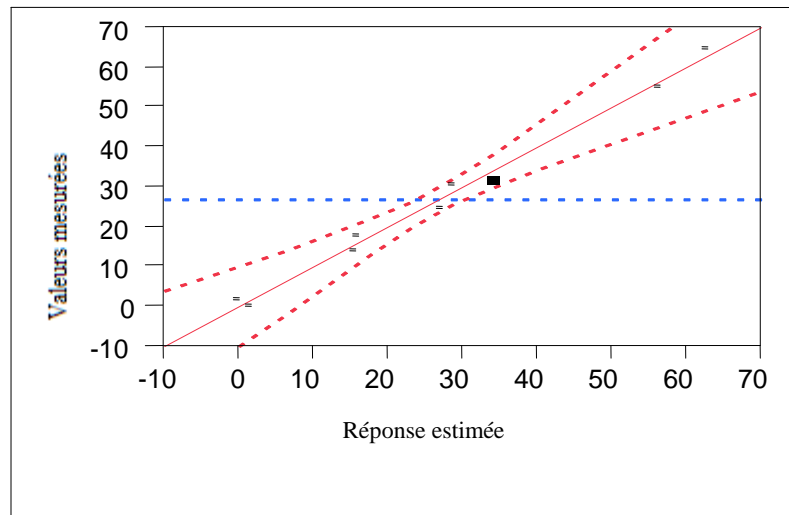


Figure 3.3 : Représentation graphique des valeurs estimées en fonction des valeurs mesurées.

✓ **Statistique de la régression du modèle**

La validité du modèle de la régression linéaire a été estimée par l'approche des points suivants :

- Analyse du coefficient de détermination.
- Test de student pour la significativité des coefficients du modèle.
- Test de Fisher.

Analyse du coefficient de détermination

Le coefficient de détermination R^2 ainsi que R^2 ajusté étant égale à 99,77% et 98,97%, respectivement, nous pouvons déduire que le modèle mathématique est donc satisfaisant et peut être accepté (figure 3.3).

Test de student

Le test de student est utilisé pour déterminer la significativité des coefficients du modèle. Rappelons qu'un facteur est significatif à 5% lorsque la valeur de student observée expérimentalement (t_{obs}) est supérieure ou égale à la valeur de student critique (t_c) à un niveau de confiance égale à 95%.

Pour 95% de confiance et 4 degrés de liberté, t critique égale à 2,132. Si la valeur de t est supérieure à 2,132 cela signifie que les coefficients de la régression sont significatifs.

Pour la réponse étudiée les coefficients de modèle calculés sont affichés dans le tableau 3.4. La valeur de chaque coefficient est accompagnée par l'écart- type, le rapport t et les valeurs de probabilité p .

Tableau 3.4: Estimation des coefficients.

<i>Parameters</i>	<i>Estimation</i>	<i>Erreur type</i>	<i>Rapport t</i>	<i>(p-valeur)</i>
Constant	26,6	0,970265	27,42	0,0001*
X1	-10,4725	1,08479	-9,65	0,0024*
X2	1,6975	1,08479	1,56	0,2156
X3	11,5025	1,08479	10,6	0,0018*
X1*X2	6,96	1,08479	6,42	0,0077*
X1*X3	-10,735	1,08479	-9,9	0,0022*
X2*X3	8,485	1,08479	7,82	0,0044*
X1*X2*X3	-1,5575	0,743135	-2,10	0,1711

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

En examinant les résultats (tableau 3.4), on s'aperçoit que les facteurs les plus influents sont la concentration du phénol et le pH. En effet la probabilité (p -valeur) est très faible pour les deux coefficients (a_1 , a_3) ainsi que les interactions (a_{12} , a_{13} , a_{23}), elles sont égale à 0,0024, 0,0018 et 0,0077, 0,0022, 0,0044 respectivement. Tandis que la probabilité (p -valeur) pour les coefficients de concentration du TiO_2 et l'interaction (a_{123}) sont supérieures à 0,05.

On refait les calculs avec un modèle simplifié, ce modèle ne faisant intervenir que les coefficients significatifs. Pour ce faire, on élimine les coefficients les plus faibles.

Le modèle simplifié :

$$Y=26.6-10.4725 X_1 +11.5025 X_3 + 6.96 X_1 X_2 -10.735 X_1 X_3 + 8.485 X_2X_3..... (3)$$

Les valeurs positives des coefficients indiquent que l'augmentation dans le pourcentage de dégradation (réponse) suit le passage du niveau bas vers le niveau haut des facteurs.

D'après le model on remarque que le phénol a un effet négatif par contre le pH a un effet positif, cela veut dire que la réaction photocatalytique est favorisée à une faible concentration du phénol et un pH élevé.

Les résultats obtenus dans le tableau 3.4 sont présentés graphiquement par le diagramme de Pareto (figure 3.4), indiquant que la concentration du phénol et le pH sont significatif. Cela signifie que la concentration du phénol et le pH influent sur le pourcentage da la dégradation du phénol (Y).

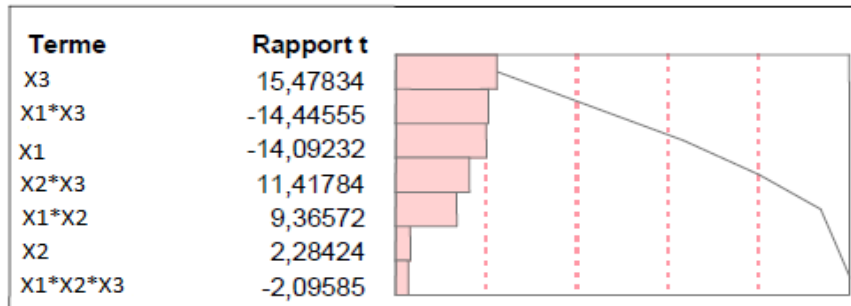


Figure 3.4: Diagramme de Pareto.

Le diagramme des interactions (figure 3.5) indique les effets d'un facteur au niveau bas et au niveau haut d'un autre facteur.

Nous savons que si les droites des effets ne sont pas parallèles, il y a une interaction significative. C'est le cas des trois facteurs dont les pentes des effets sont différentes dans une perspective et se croisent dans l'autre.

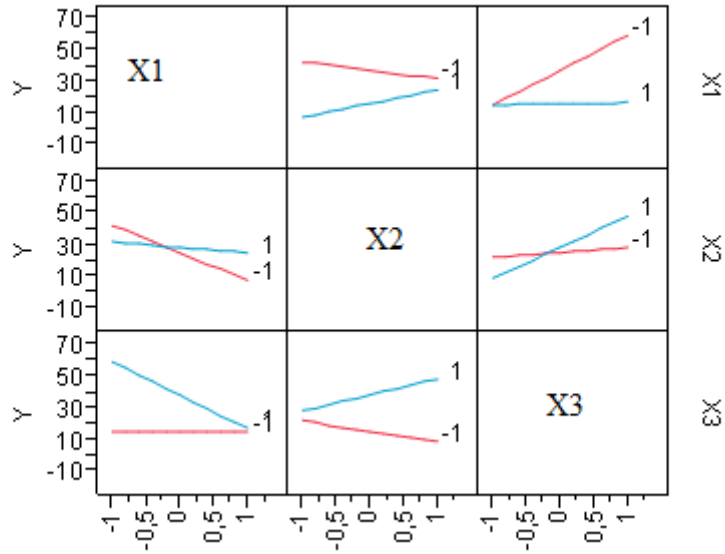


Figure 3.5 : Les profils des interactions pour tous les facteurs.

Le diagramme des profils d'interaction montre clairement que les interactions ne sont pas négligeables.

Test de Fisher

L'adéquation est le degré d'approximation des résultats expérimentaux et ceux des modèles. En mathématique statistique on utilise le critère de Fisher pour vérifier l'adéquation du modèle.

L'analyse de la Variance est indiquée dans le tableau 3.5, la valeur statistique F_{obs} est supérieur à $F_{critique}$ donc ANOVA montre que le modèle de la régression est très adéquat.

Tableau 3.5: Analyse de la variance.

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>Rapport F</i>	<i>F_{critique}</i>
Modèle	3821.2625	5	764.253	59.5972	6,26
Résidue	51.2945	4	12.824		
Total	3872.5570	9			

$F_{critique}=F(0,05 ;5 ;4)$.

Optimisation et fonction désirabilité

La fonction désirabilité (D) permet d'optimiser la réponse Y.

Le pourcentage de dégradation du phénol maximal Y correspond à une désirabilité maximale qui vaut 0,91 (figure 3.6) est obtenu avec les conditions opératoires suivants :

- Concentration en phénol 20 mg.L⁻¹ ,
- Concentration en TiO₂ 2000 mg.L⁻¹ ,
- pH de la solution 9.

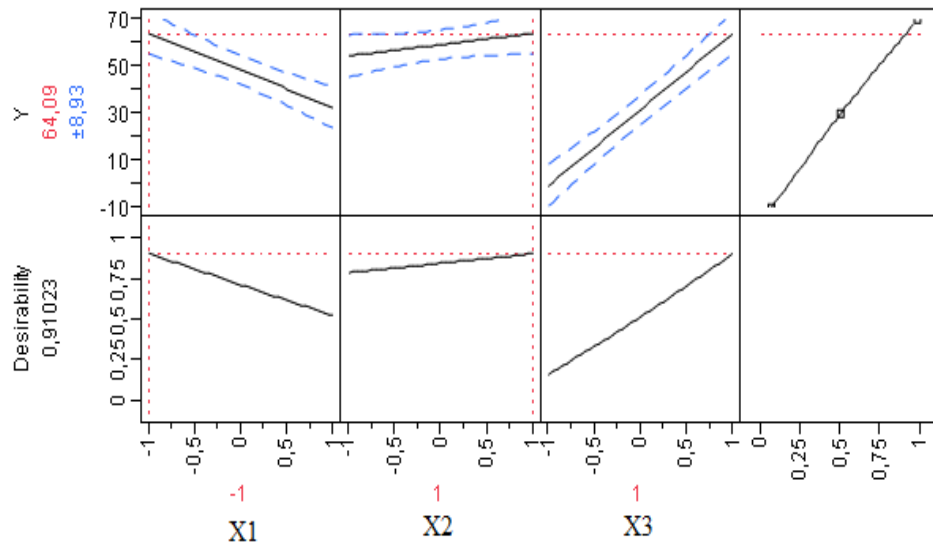


Figure 3.6 : La fonction désirabilité pour l'optimisation de la réponse.

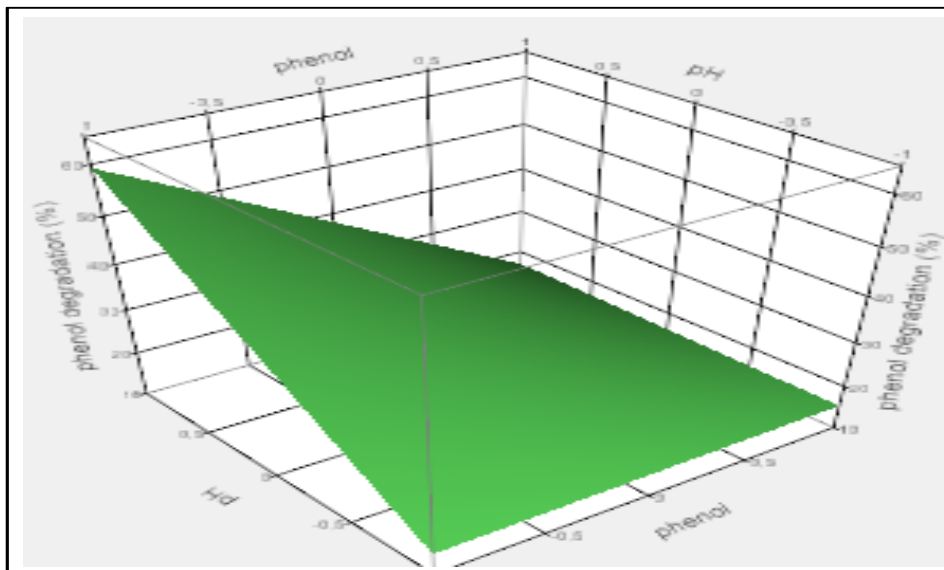


Figure 3.7: Représentation des variations de la réponse Y en fonction de la concentration en phénol et le pH.

D'après les résultats on remarque que l'optimum est obtenu à une faible concentration en phénol et un pH élevé (pH =9) et une concentration en TiO_2 de 2 g.L^{-1} .

Baraka (2008) a montré que Le temps nécessaire pour l'élimination totale est fonction de la concentration initiale. En outre, plus la concentration initiale du polluant est importante, plus le temps nécessaire à sa disparition est long. Il a conclu que la photocatalyse avec TiO_2 est donc une méthode adaptée à la dégradation des polluants en faible concentration en solution aqueuse.

Saratale et al. (2014) ont montré l'influence du pH sur la dégradation photocatalytique du phénol. Ils ont trouvé que pour des pH de 3, 7, 9 et 11, le pourcentage de dégradation du phénol obtenu est de : 68,21%, 78,14%, 98,00% et 80,42% respectivement. Ils ont déduit que la dégradation est améliorée dans des solutions alcalines. Cette amélioration est due aux ions hydroxydes qui sont nécessaires pour la formation des radicaux hydroxy.

Selon les travaux de Abo Tariq et al. (2008) ; Al-Shamali (2013) ; Faisal et al. (2007) ; Kartal et al. (2001) ; Kashif et al. (2009) ; Saratale et al. (2014) le pourcentage de dégradation du phénol et d'autres polluants organiques en présence du TiO_2 augmente avec l'augmentation de la concentration du catalyseur jusqu'à une valeur limite. Une quantité plus grande que cette valeur provoque la diminution de pourcentage de dégradation.

Al-Shamali (2013) ; Kartal et al. (2001) ; Saratale et al. (2014) ont montré que la valeur limite est de 2 g.L^{-1} Ce qui concorde avec nos résultats.

Selon ces mêmes auteurs ce résultat est dû au fait qu'une augmentation suffisante de la concentration du catalyseur augmente la formation des paires d'électrons /trous par conséquent il y a génération des radicaux OH^\cdot qui vont oxyder une gamme très large des polluants. Par contre à une grande concentration du catalyseur il y a une difficulté de pénétration du rayonnement (solution opaque). En effet, lorsque la quantité en catalyseur est élevée, les particules de catalyseur auraient tendance à s'agglomérer donc la surface interfaciales entre le milieu réactionnel et le catalyseur diminue.

Le résultat de photocatalyse du phénol obtenu avec les conditions optimales montre un rendement d'élimination moyen durant un temps de 24h. Ce résultat est peut-être aussi en rapport avec les propriétés du photocatalyseur lui-même : qui sont la surface spécifique et la taille des cristallites (Zeghioud et al., 2016).

Selon Zeghioud et al. (2016), la surface spécifique a une grande importance sur le taux de dégradation ; une augmentation dans la surface spécifique provoque une augmentation dans les sites actifs sur la surface du catalyseur.

Beaucoup de recherches mentionnent aussi l'existence d'une taille des cristallites optimales pour atteindre un taux d'élimination optimale. Une taille très petite permet la recombinaison rapide des paires électrons trous (e^-/h^+). (Zighioud et al., 2016)

Conclusion

- ✓ Les tests statistiques permettent de considérer le modèle d'ordre 1 avec interaction comme un bon modèle pour optimiser le processus de photocatalyse,
- ✓ Les conditions opératoires optimales du photoréacteur ont été déterminées : -
 - Une concentration en phénol de 20 mg.L^{-1} ,
 - Une concentration de TiO_2 de 2000 mg.L^{-1} ,
 - Un pH de la solution de 9.
- ✓ La concentration en phénol et le pH sont les paramètres les plus influents sur la photocatalyse,
- ✓ Le pourcentage de dégradation photocatalytique du phénol en 24h sous les conditions opératoires optimales est de 64% .

3.2 La biodégradation

3.2.1. Isolement des souches bactériennes autochtones et étude de leurs activités biologiques

Certains microorganismes peuvent vivre dans des eaux ou des sols pollués et peuvent, de ce fait, contribuer à la diminution de la charge polluante par la biodégradation ; leur présence et leur capacité à dégrader les polluants sont dues à leurs adaptations aux conditions du milieu et à leur métabolisme. C'est la raison pour laquelle beaucoup d'auteurs dans le monde s'intéressent à l'isolement des souches à partir des eaux ou des sols pollués par les hydrocarbures. Une purification de ces souches est faite afin de tester leurs activités dans la dégradation des polluants organiques dans le but de les utiliser dans les traitements des sols ou des eaux polluées.

Nous avons commencé notre travail par l'isolement et la purification des souches bactériennes à partir des eaux polluées par les hydrocarbures. Pour cela deux eaux ont été choisies : une eau de borbier de Hassi Messaoud et une eau prélevée de l'Oued El Harrach.

L'activité de dégradation de ces souches a été testée sur une eau synthétique de phénol.

Les résultats obtenus après dénombrement et isolement des souches nous ont permis de constater que :

- Les eaux trop chargées en hydrocarbures ne sont pas favorables au développement des bactéries, à cause de la toxicité des polluants vis-à-vis des microorganismes (eau de borbier).
- Une centaine de souches ont été isolées, purifiées et conservées ; 85 souches proviennent de l'eau de l'Oued El Harrach et 5 souches de l'eau de borbier.

La sélection des souches les plus actives a montré que parmi les 90 souches, 44 souches seulement sont capables de dégrader le phénol. Une sélection d'après le temps de développement sur boîte pétri a permis de récupérer seulement 7 souches.

Les 7 souches ont été identifiées, en utilisant la coloration de Gram, le test oxydase /catalase et les galeries d'identification biochimiques API20E et API20NE.

La recherche de l'oxydase (pour les Gram⁻) et de la catalase (pour les Gram⁺) permettent l'orientation vers les genres bactériens possibles (Hamdi, 2007)..

Le tableau 3.6 présente Les résultats obtenus pour la coloration de Gram et le test oxydase/catalase ainsi que la forme des souches :

Tableau 3.6 : Résultats obtenus après coloration de Gram, tests oxydase / tests catalase et aspect microscopique des souches.

Souches	Test oxydase (Gram-)	Test catalase (Gram +)	Forme des souches
SB5		+	bacille
SB6		+	bacille
SC7		+	bacille
SD7		+	coque
SE6	-		bacille en chaînette
SE7*	-		bacille
SE8	-		bacille

* : souche isolée de l'eau de bourbier de Hassi Messaoud.

Des essais de biodégradation du phénol par les sept souches sélectionnées (les souches les plus actives) en culture pure ont été réalisés pour déterminer la souche qui donne la meilleure durée d'élimination du phénol.

L'efficacité de ces souches dans la dégradation du phénol dépend très fortement de l'espèce bactérienne. Les meilleures activités étaient obtenues avec les souches SB6 et SB5 parmi les Gram⁺ et la souche SE8 parmi les Gram⁻ (figure 3.7) avec prédominance des Gram⁺ (Hamdi, 2007).

PARTIE 3 : RESULTATS ET DESCUSSIONS

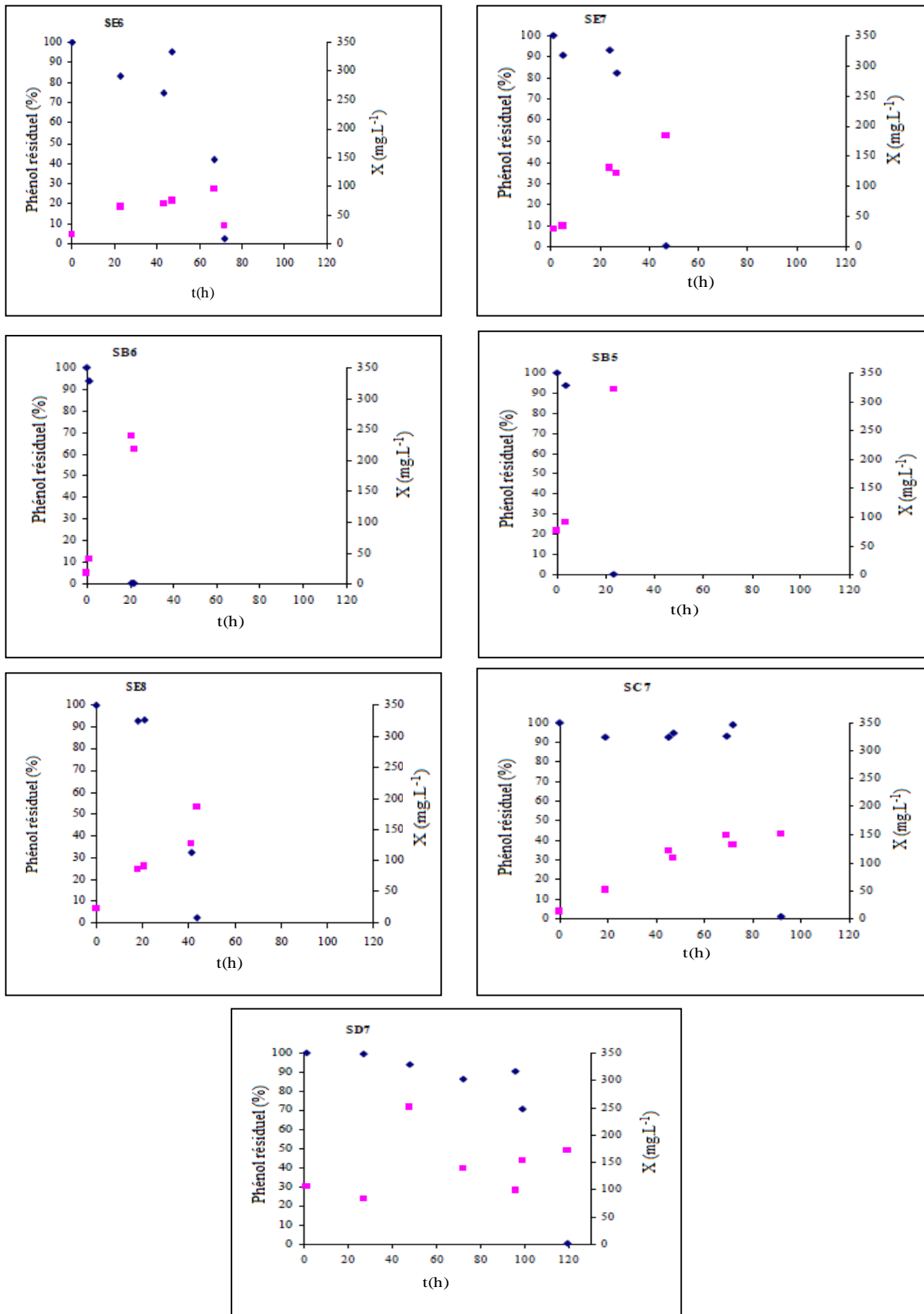


Figure 3.8 : Evolution du pourcentage du phénol résiduel et de la croissance bactérienne des sept souches sélectionnées en fonction du temps ([phénol]=100mg.L⁻¹, pH=7, T=37°C) (Hamdi, 2007).

Dans le reste de notre travail, le choix s'est porté sur la souche SB5 qui présente presque la même activité que la souche SB6. Nous avons alors procédé à son identification.

3.2.2. Identification de la souche Sb5

La classification des bactéries est basée sur des caractères morphologiques, culturels et biochimiques.

En plus de la galerie biochimique API 50CH, des tests ont été réalisés pour permettre l'identification de la souche Sb5. Il s'agit de :

- Coloration de Gram ;
- Test catalase ;
- Test oxydase.

Sur milieu gélosé (gélose nutritive ordinaire), la souche isolée apparaît sous forme de colonies rondes de couleur crème.

Après coloration de Gram, l'observation microscopique montre des microorganismes en bâtonnets. Ils se présentent sous forme isolée ou regroupée par paires ou chaînettes. Ils sont de Gram positif.

L'étude biochimique des bactéries montre qu'elles sont aérobies et catalase positive (Tableau 3.7).

Tableau 3.7: Résultats de la coloration de Gram et des tests d'orientation de la souche Sb5.

Coloration de Gram	Tests d'orientations	
	Catalase	Oxydase
Bacille à Gram positif	Positive	Positive

Identification par la galerie API 50 CH

La galerie API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude de la fermentation des substrats, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif. L'identification de la souche est basée sur l'utilisation des logiciels qui réalise un calcul de probabilité pour les caractères obtenus avec la mini-galerie.

Remarque : la galerie API 50 CH peut être utilisée pour étudier deux autres voies :

- L'oxydation se traduisant par un changement de couleur dans la cupule, dû à une production d'acide en aérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.

PARTIE 3 : RESULTATS ET DESCUSSIONS

- L'assimilation se traduisant par une croissance de microorganismes dans la cupule quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.

La composition de la galerie API 50 CH ainsi que les résultats trouvés sont reportés dans la liste des tests ci-dessous (tableau 3.8).

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 3.8 : Identification de la souche Sb5 par galerie API 50 CH.

Cupule	Composition du test	Résultat
0	TEMOIN	-
1	Glycérol	+
2	Erythritol	-
3	D-Arabinose	-
4	L-Arabinose	+
5	D-Ribose	+
6	D-Xylose	+
7	L-Xylose	-
8	D-Adonitol	-
9	Méthyl-βD-Xylopyranoside	+
10	Galactose	-
11	Glucose	+
12	Fructose	+
13	Mannose	+
14	Sorbose	/
15	L-Rhamnose	/
16	Dulcitol	/
17	Inositol	/
18	Mannitol	+
19	Sorbitol	+
20	Méthyl-αD-Mannopyranoside	-
21	Méthyl-αD-Glucopyranoside	+
22	N-Acétyleglucosamine	-
23	Amygdaline	-
24	Arbutine	+
25	Esculine citrate de fer	+
26	Salicine	+
27	Cellobiose	+
28	D-Maltose	+
29	D-Lactose (origine bovine)	-
30	D-Melibiose	-
31	D-Saccharose	+
32	D-Trehalose	+
33	Inuline	+
34	D-Mélézitose	-
35	D-Raffinose	-
36	Amidon	+
37	Glycogène	+
38	Xylitol	-
39	Gentiobiose	+
40	D-Turanose	+
41	D-Lyxose	-
42	D-Tagatose	-
43	D-Fucose	-
44	L-Fucose	-
45	D-Arabitol	-
46	L-Arabitol	-
47	potassium Gluconate	-
48	potassium 2-Cétogluconate	-
49	potassium 5-Cétogluconate	-

L'identification par galerie Api 20E a confirmé que les caractères suivants sont positifs :

- **ONPG** (Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside) : Ce test est pratiqué pour toute bactérie lactose - en 24 h ;
- **Gélatinase** ;
- **VP** (Voges Proskauer).

D'après les tests préliminaires et les tests biochimiques on a confirmé que la bactérie est *Bacillus subtilis*.

3.2.3. La biodégradation du phénol par des cellules libres

Dans cette partie nous avons essayé d'optimiser les paramètres qui influent sur la biodégradation du phénol en utilisant la souche *Bacillus subtilis* (SB5). Les résultats sont comparés par rapport à une souche de référence qui est *Pseudomonas aeruginosa*.

Les paramètres choisis sont la concentration en phénol, la température et le pH.

3.2.3.1 L'effet de la concentration initiale du phénol sur la biodégradation

Afin d'évaluer l'influence de la concentration du phénol sur la biodégradation et sur la croissance bactérienne, une série d'expériences a été réalisée en variant la concentration. Les expériences ont été faites dans un réacteur en mode batch pour dégrader le phénol (100, 500, 700, 900 mg. L⁻¹) sous une température de 37°C et un pH qui avoisine la neutralité.

La figure 3.9 montre l'effet de la concentration sur la biodégradation du phénol ainsi que sur la croissance bactérienne.

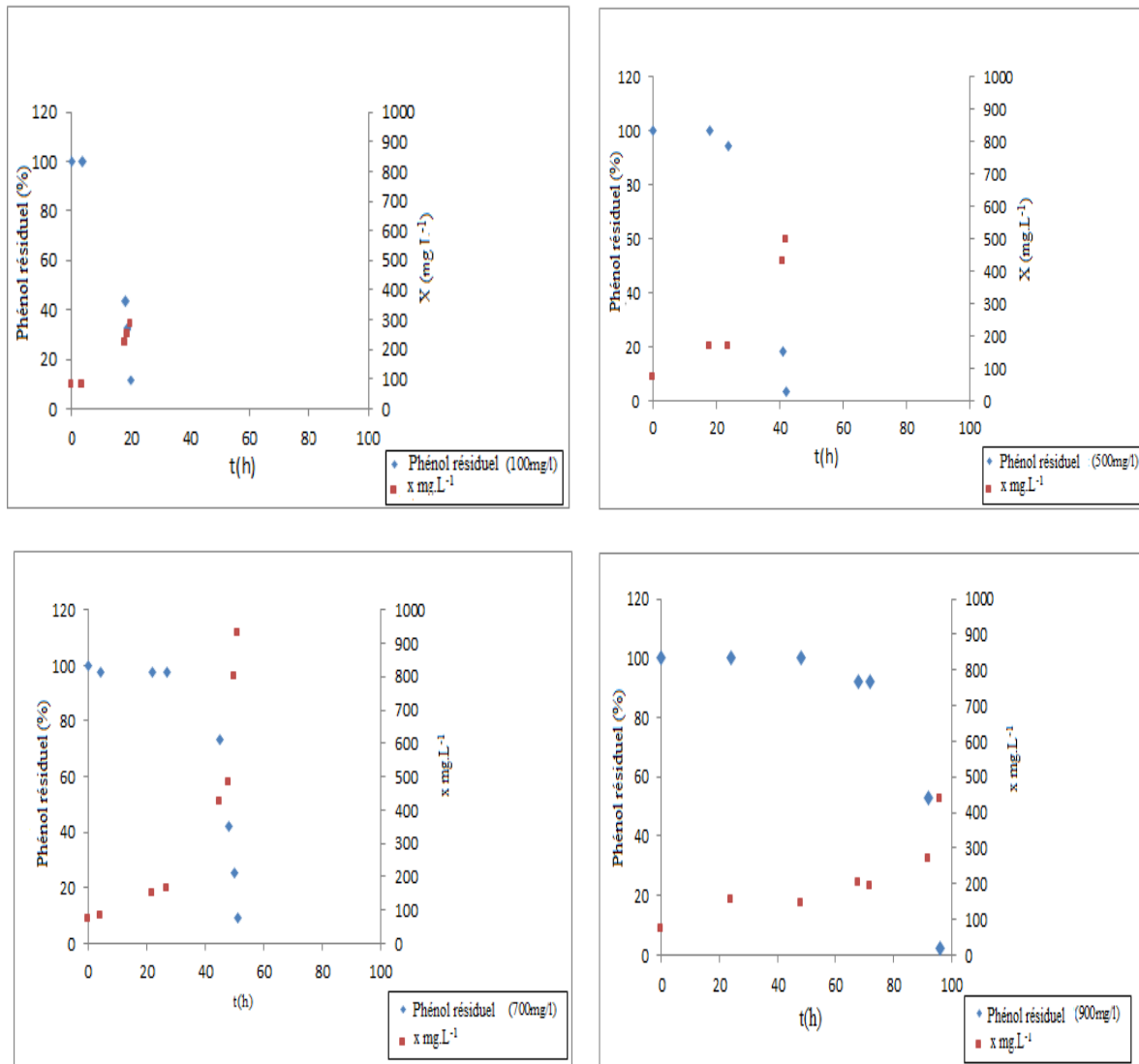


Figure 3.9 : Effet de la concentration en phénol sur sa biodégradation et sur la croissance bactérienne.

Une dégradation totale est remarquée pour toutes les concentrations de 100 à 900 mg L^{-1} mais à différentes durées de dégradation.

La figure 3.9 montre que le phénol résiduel diminue en fonction de l'augmentation du temps contrairement à la concentration en biomasse qui augmente en parallèle. Cela est dû à la consommation du phénol par la bactérie confirmant son utilisation comme seule source de carbone.

La figure 3.9 montre aussi la continuité de l'augmentation de la biomasse bactérienne après la consommation totale du phénol qui est une indication de la formation d'un ou de plusieurs composés intermédiaires qui pourrait avoir contribué à la croissance observée. Ce même résultat est confirmé par Reardon et al. (2000).

D'après l'allure des courbes qui sont représentées sur la figure 3.10, nous constatons que la concentration de 100 mg. L⁻¹ correspond à la plus courte durée de dégradation (20h).

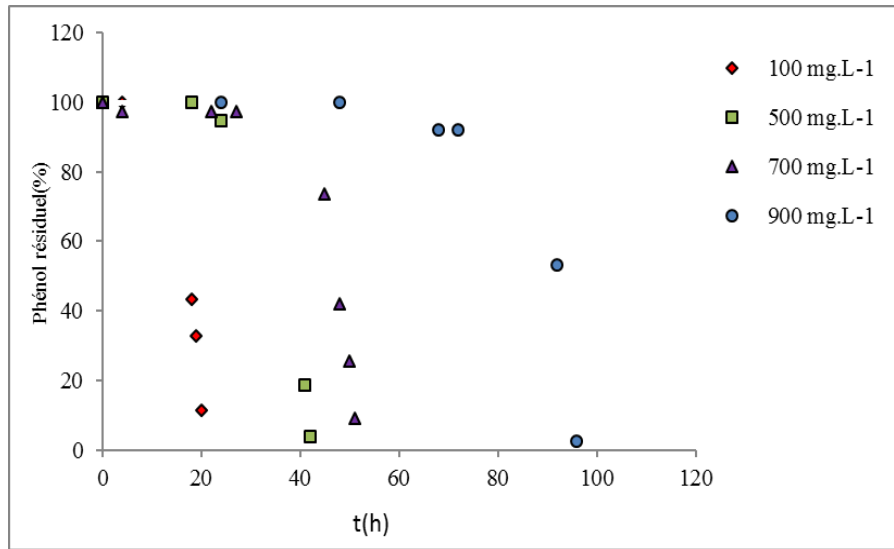


Figure 3.10 : L'effet de la concentration initiale du phénol sur le temps de la dégradation du phénol par la souche SB5.

L'augmentation de la concentration initiale en phénol provoque aussi une augmentation de la durée de la phase de latence (la phase qui correspond à l'adaptation de la bactérie à son milieu de culture) ce qui implique une prolongation dans la durée de dégradation totale du phénol (figure 3.11). Il a été remarqué que pour la concentration de 100 mg.L⁻¹, la croissance est très rapide avec une phase de latence très courte contrairement aux concentrations supérieures à cette valeur. Ce même résultat est trouvé par Nweke et Okpokwasili (2014).

L'élévation de la concentration du substrat, oblige les cellules à s'adapter à des concentrations élevées, ce qui provoque l'allongement du temps de la phase de latence.

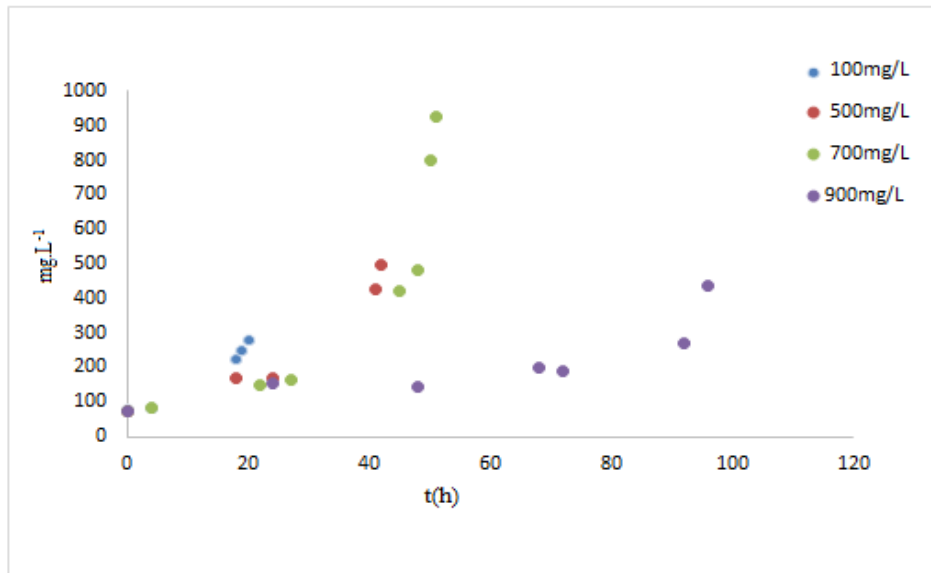


Figure 3.11: Cinétique de la croissance bactérienne à différentes concentrations en phénol.

La souche isolée Sb5 a été comparée à une souche de référence *Pseudomonas aeruginosa*. Le résultat de la biodégradation du phénol est montré dans la figure 3.12.

Dans les mêmes conditions, *Pseudomonas aeruginosa* présente une durée de biodégradation, de 100 mg.L⁻¹ de phénol, de 48h ce résultat est aussi confirmé par les travaux de Ali et al. (2013) par contre la durée est de 20h pour la souche Sb5 ce qui confirme la meilleure activité biodégradante du phénol par cette souche.

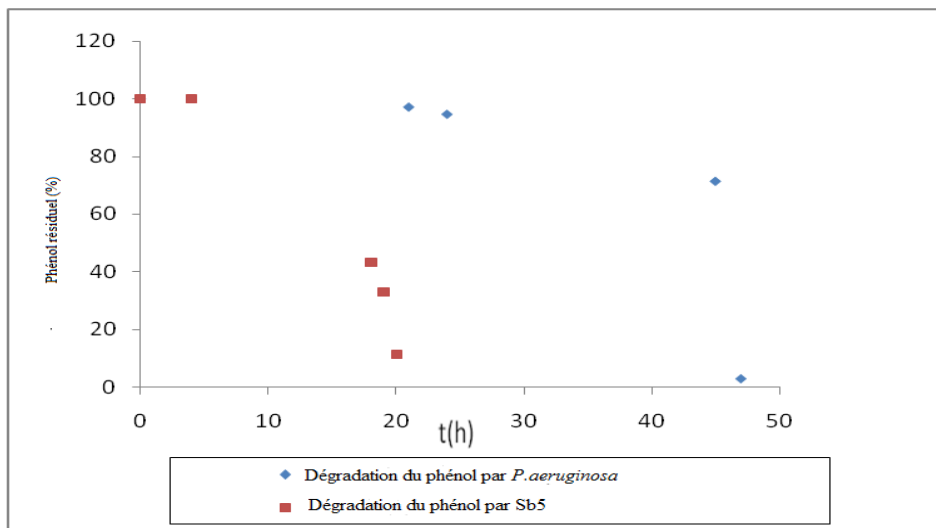


Figure 3.12: Biodégradation du phénol par Sb5 (*Bacillus subtilis*) et par *Pseudomonas aeruginosa*.

Les paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et de 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 bactérienne.

Le taux de croissance pendant la phase exponentielle

Le taux de croissance maximale (μ_{max}) a été déterminé au niveau de la phase exponentielle lorsque les bactéries sont en division maximale. Ce facteur est caractéristique d'une souche, d'un milieu nutritif et des conditions générales de croissance (température, agitation, volume de culture, etc.).

Le μ_{max} correspond à la pente de la tangente de la courbe $\ln(X) = f(t)$ (Eq1) au niveau de la phase exponentielle.

$$\ln X = \mu \ln t + \ln X_0 \dots \dots \dots \text{Eq (1)}$$

tel que X_0 : Concentration cellulaire à t_0

X : Concentration cellulaire à t

μ : le taux de croissance

En traçant $\ln X$ en fonction du temps d'après l'équation (1), la pente de la droite obtenue donne le taux de croissance maximale.

Coefficient de conversion du substrat

C'est le coefficient qui correspond à l'augmentation de la biomasse par rapport à la consommation en substrat (Eq(2)) :

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{C_0 - C_f} \dots \dots \dots \text{Eq(2)}$$

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

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

C_0 : Concentration du substrat initiale ($g.l^{-1}$).

C_f : Concentration du substrat finale ($g.l^{-1}$).

Le calcul du taux de croissance, le coefficient de conversion ainsi que la durée totale de dégradation sont donnés dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9: Influence de la concentration sur la cinétique bactérienne et la durée de dégradation totale du phénol.

[phénol] (mg.L ⁻¹)	μ_{\max} (h ⁻¹)	La durée de dégradation totale du phénol (h)	$Y_{X/S}$
100	0,172	20	1,8
500	0,215	42	0,6
700	0,196	51	1,05
900	0,033	96	0,33

L'étude de l'effet inhibiteur du phénol sur la croissance bactérienne de SB5 a été déterminé (figure 3.13) en considérant le taux de croissance maximale (μ_{\max}) estimé à partir des courbes de croissance précédentes.

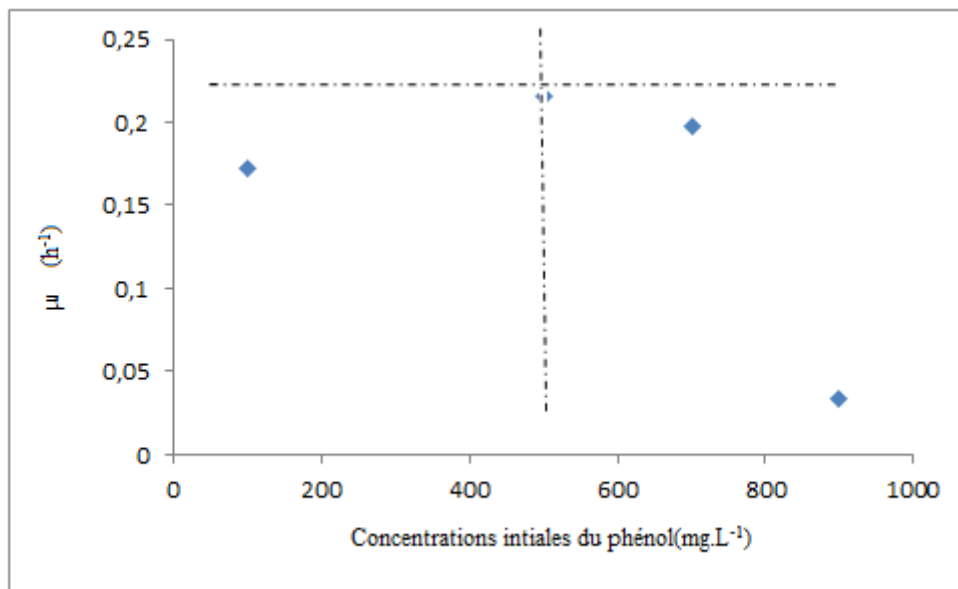


Figure 3.13: Influence de la concentration initiale du substrat (phénol) sur le taux de croissance (μ).

Les résultats montrent (tableau 3.9) qu'à des concentrations allant de 100 à 500 mg.L⁻¹ le taux de croissance augmente jusqu'à atteindre une valeur de 0,21 h⁻¹ puis diminue, ce qui indique une inhibition de la croissance à partir de 500 mg.L⁻¹ due à la sensibilité de la bactérie à des concentrations relativement élevées en phénol.

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

Par contre, chez *Bacillus* sp. DISKI et *Pseudomonas aeruginosa* sp.DAFI, une augmentation du temps d'exposition a entraîné une stimulation de l'activité de la déshydrogénase à une

concentration faible en phénol. Le seuil de toxicité varie donc en fonction des espèces bactériennes et du temps d'exposition (Nweke et al., 2010).

Nous constatons d'après le tableau 3.9 que le taux de conversion $Y_{X/S}$ varie entre 1,8 et 0,33.

3.2.3.2. Effet du pH sur la biodégradation du phénol

Le pH affecte de manière significative les réactions biochimiques nécessaires à la biodégradation du phénol.

Pour cette raison, une série d'expériences a été effectuée dans un intervalle de pH allant de 2,6 à 9 pour étudier l'influence de ce paramètre sur l'élimination de 100 mg.L^{-1} de phénol par *Bacillus subtilis*. La température du milieu réactionnel a été maintenue à 37°C . Les résultats sont représentés dans la figure 3.14 :

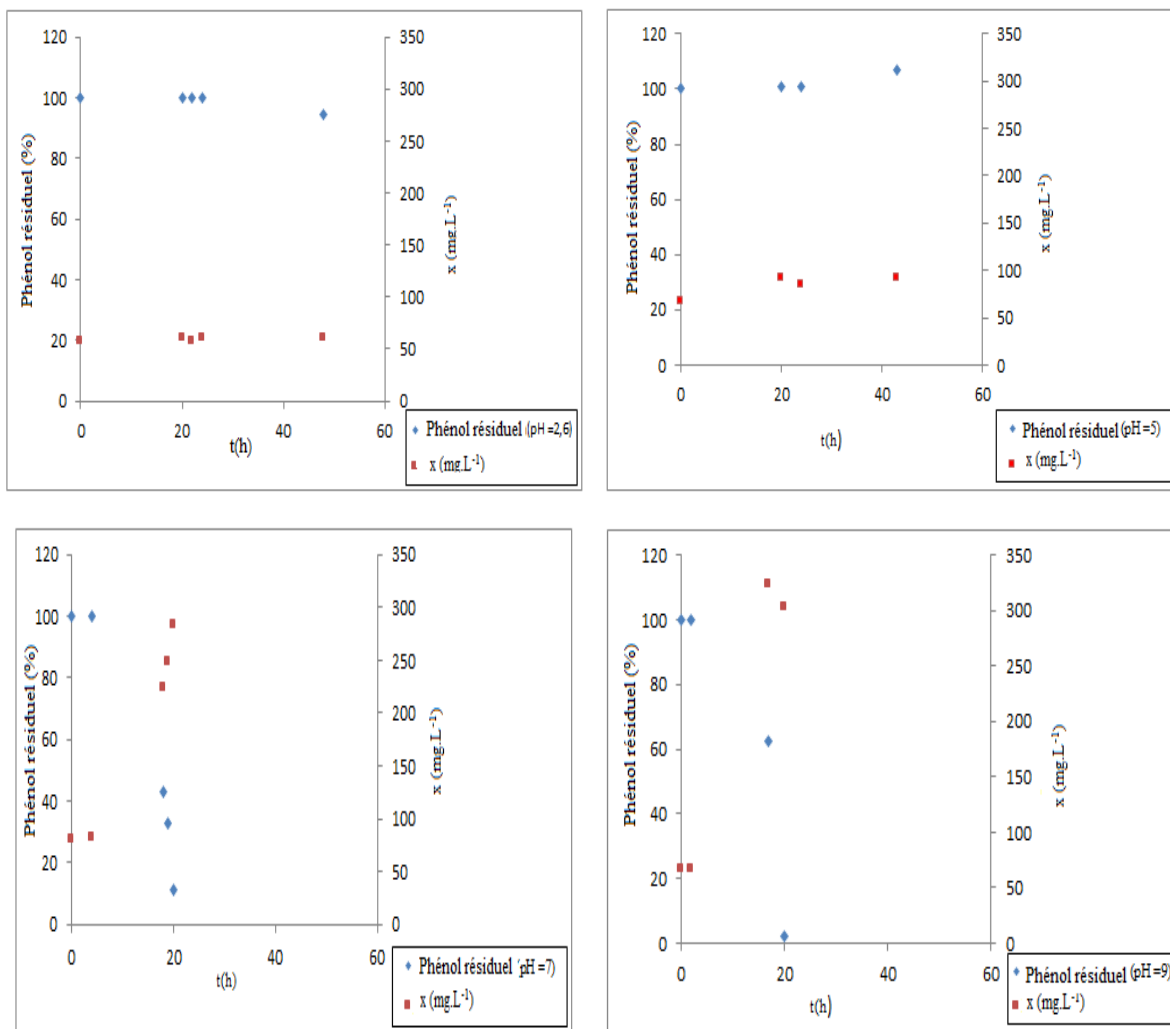


Figure 3.14: Effet du pH sur la dégradation du phénol et la croissance bactérienne de la souche Sb5.

Nos résultats montrent que pour des valeurs de pH allant de 7 à 9, une biodégradation totale du phénol est observée. Le temps mis pour dégrader la totalité du polluant est presque le même (20h). Cependant pour des pH acides, l'activité de *Bacillus subtilis* est inhibée. Ce qui est confirmé par les travaux d'Amutha et al., (2011) qui ont montré que *Bacillus subtilis* ne tolère pas des pH acides ou très basiques.

3.2.3.3. Effet de la température sur la biodégradation du phénol

La température est un paramètre important pouvant influencer la biodégradation du phénol et l'activité physiologique des micro-organismes.

L'influence de la température a été étudiée pour la dégradation de 100 mg.L⁻¹ de phénol par la souche Sb5. Quatre valeurs de température ont été choisies à savoir : 30, 37,40, 45°C. La variation de la concentration du phénol ainsi que la biomasse microbienne en fonction du temps sont représentée sur la figure 3.15.

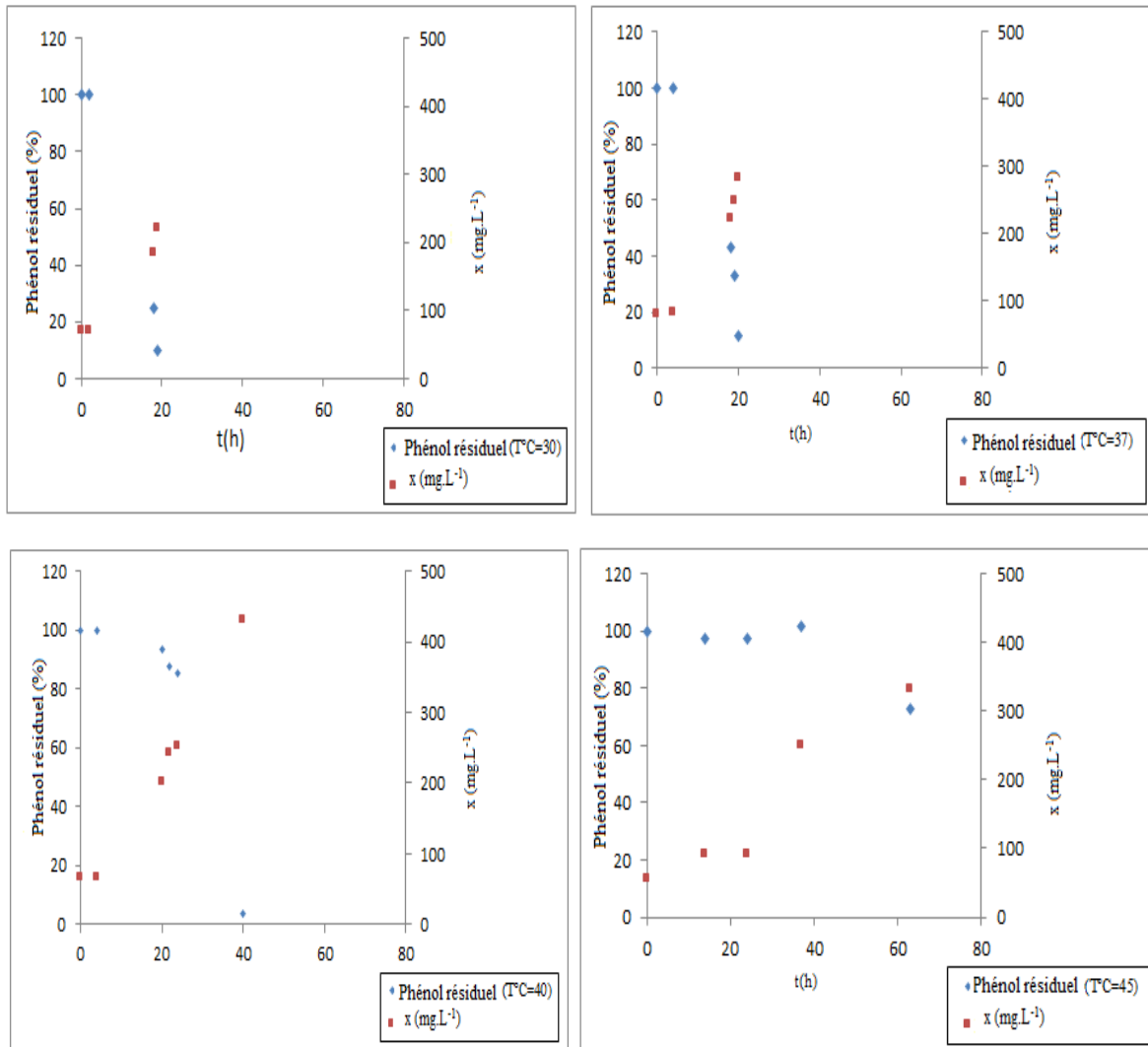


Figure 3.15 : Effet de la température sur la dégradation du phénol et sur la croissance bactérienne de la souche Sb5.

La figure 3.15 montre que la biodégradation du phénol semble meilleure à la température de 30 et 37°C puisque le substrat est totalement dégradé en 20h de culture.

Aux températures de 40 et 45°C, il a fallu 40h et plus que 63h respectivement pour obtenir une dégradation totale du phénol.

D'après le tableau 3.10 qui représente les paramètres d'évaluation de la croissance bactérienne et la durée de dégradation du phénol, on peut déduire que le taux de croissance est meilleur à une température de 37°C.

Tableau 3.10: Influence de la température sur la croissance bactérienne et la durée de dégradation totale du phénol

Température (°C)	μ_{\max} (1/h)	La durée totale d'élimination du phénol (h)
30	0,0492	20
37	0,172	20
40	0,0985	40
45	0,065	Pas d'élimination totale (25% du phénol a été éliminé en 63h)

La température est importante pour la croissance bactérienne car les bactéries sont thermosensibles. Cette thermosensibilité va influencer de façon importante le métabolisme des bactéries car la température intervient dans la catalyse de nombreuses enzymes. Les travaux d'Amutha et al. (2011) montrent qu'une meilleure activité de *Bacillus subtilis* est obtenue à une température de 37°C.

3.2.4. La biodégradation du phénol par des cellules immobilisées

L'objectif de cette partie d'étude est d'améliorer le procédé de biodégradation du phénol par *Bacillus subtilis*, en introduisant la technique d'immobilisation des bactéries sur des billes d'alginate. L'avantage principal que présente cette nouvelle technique est la protection des cellules contre l'effet toxique du polluant.

3.2.4.1 L'Essai d'adsorption du phénol sur les billes d'alginate vierges

Deux cinétiques d'adsorption de 100 mg. L⁻¹ de phénol sur des billes d'alginate vierges (sans cellules bactériennes) à des diamètres de 3 et 5mm ont été effectués. Les résultats sont représentés dans la figure 3.16.

Les résultats indiquent qu'il y a un changement négligeable dans la concentration du phénol durant une période de 24h. Ce qui implique qu'il n'y a eu ni évaporation ni adsorption du phénol sur les billes d'alginate.

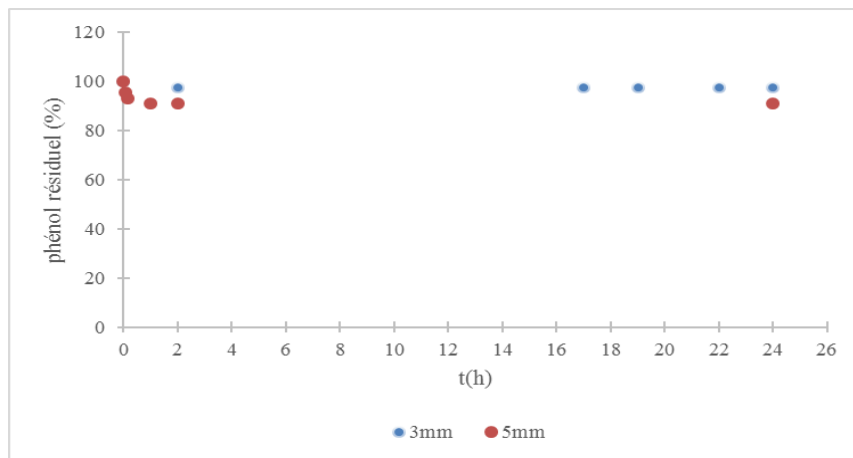


Figure 3.16: Cinétique d'adsorption du phénol sur des billes d'alginate vierges à différents diamètres.

3.2.4.2 Plans d'expérience et modélisation de la biodégradation du phénol par des cellules immobilisées

L'étude de l'influence des paramètres opératoires sur la biodégradation du phénol par les bactéries immobilisées et leurs interactions sur la réponse a été menée par un plan factoriel complet exploitant une matrice factorielle à 2^3 expériences.

Nous avons considéré que la réponse Y de mesure est le temps d'élimination totale du phénol et X_1 , X_2 , X_3 , sont les trois facteurs continus :

- X_1 : La concentration initiale du phénol (mg.L^{-1}).
- X_2 : Le diamètre des billes (mm).
- X_3 : La taille de l'inoculum exprimé en Concentration en matière sèche (mg.L^{-1}).

Les limites de variations de chaque facteur sont présentées dans le tableau 3.11 suivant :

Tableau 3.11 : Limites de variation des facteurs

Les paramètres étudiés	Niveau de variation des facteurs		
	Niveau bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
X_1 : C_0 du phénol (mg.L^{-1})	100	500	900
X_2 : Diamètre des billes (mm)	3	4	5
X_3 : Concentration en matière sèche (mg.L^{-1})	244.5	317.7	390.9

✓ **Construction de la matrice d'expérience**

Pour un plan factoriel complet à deux niveaux, le nombre d'expériences à réaliser = 2^k dans notre cas, $k = 3$ on a 8 essais à réaliser. Le tableau 3.12 suivant résume ces essais et donne la façon de faire varier les facteurs.

Tableau 3.12 : Les essais du plan d'expérience

<i>N° d'essai</i>	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
C	0	0	0
C	0	0	0

En se basant sur le tableau 3.12 ci-dessus, les résultats obtenus pour chaque essai sont représentés dans le tableau suivant (tableau 3.13).

Tableau 3.13: Plan factoriel complet 2^3 .

<i>N° d'essai</i>	X_1	X_2	X_3	<i>REPONSE(Y)(h)</i>
1	-1	-1	-1	Y1=08
2	+1	-1	-1	Y2=78
3	-1	+1	-1	Y3=09
4	+1	+1	-1	Y4=75
5	-1	-1	+1	Y5=10,5
6	+1	-1	+1	Y6=77
7	-1	+1	+1	Y7=13
8	+1	+1	+1	Y8=103
C	0	0	0	Y9=46
C	0	0	0	Y10=46

Pour un modèle d'ordre 1 avec interaction, la forme générale du polynôme est la suivante :

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13} X_1 X_3 + a_{23} X_2 X_3 + a_{123} X_1 X_2 X_3 \dots \dots \dots (1)$$

✓ **Détermination des coefficients du modèle**

Les coefficients du modèle sont obtenus à l'aide d'un logiciel d'analyse JMP8 permettant l'obtention de l'équation suivante :

$$Y = 46,55 + 36,5625 X_1 + 3,3125 X_2 + 4,1875 X_3 + 2,4375 X_1 X_2 + 2,5625 X_1 X_3 + 3,8125 X_2 X_3 + 3,4375 X_1 X_2 X_3 \dots \dots \dots (2)$$

A partir des coefficients obtenus, l'estimation de chaque point expérimental est donnée par le logiciel JMP.8 (figure 3.17).

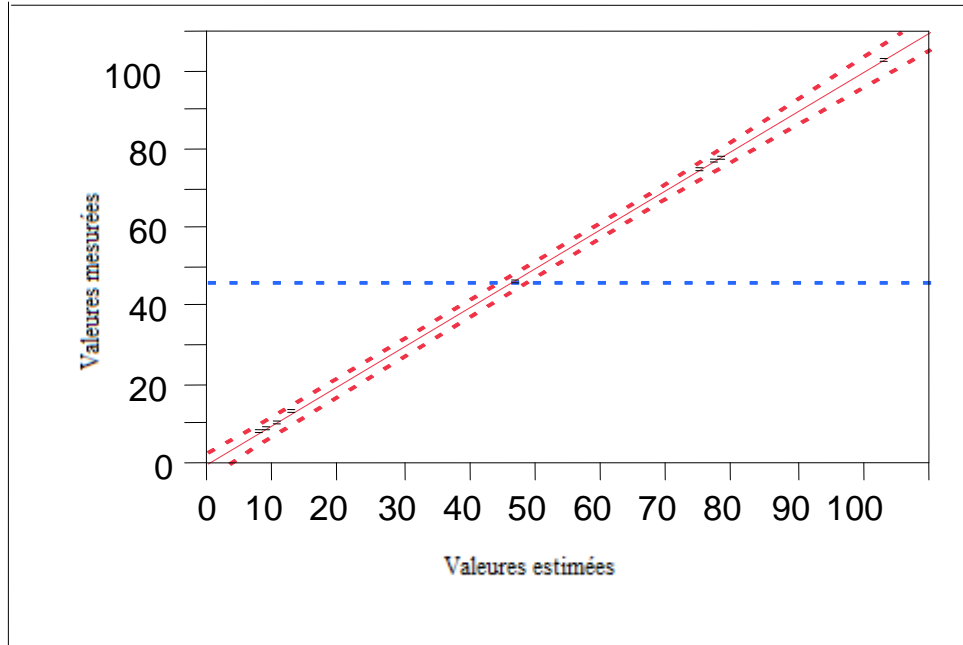


Figure 3.17 : Graphique des valeurs mesurées en fonction des valeurs estimées.

D'après le modèle, on remarque que les coefficients sont positifs, par conséquent un temps d'élimination plus faible est obtenu au niveau bas des facteurs.

✓ **Statistique de la régression du modèle**

Le coefficient de détermination R^2

Le coefficient de détermination ($R^2 = 0,999933$) a indiqué que 99,993 % de la variable totale a été exprimé par le modèle. De plus le modèle présente un coefficient de détermination ajusté ($R^2_{aj} = 0,999697$) proche de 1. Ces deux paramètres indiquent que le modèle mathématique est satisfaisant et peut être accepté.

Test de student

Rappelons qu'un facteur est significatif à 5% lorsque sa valeur de student observée expérimentalement (t_{obs}) est supérieure ou égale à la valeur de student critique (t_c) à un niveau de confiance égale à 95% .

Pour un niveau de signification α égale à 5%, $t_{critique}$ est égale à :

$$t_{critique} = t(\alpha/2, N-P) = 2,920$$

N : le nombre d'expériences réalisées.

P : le nombre des coefficients du modèle.

Les résultats de l'analyse des coefficients sont regroupés dans le tableau 3.14 suivant :

Tableau 3.14 : Estimation des coefficients.

<i>Terme</i>	<i>Estimation</i>	<i>Ecart-type</i>	<i>Rapport t</i>	<i>(p-valeur)</i>
constante	46,55	0,194454	239,39	<,0001*
X ₁	36,5625	0,217407	168,18	<,0001*
X ₂	3,3125	0,217407	15,24	0,0043*
X ₃	4,1875	0,217407	19,26	0,0027*
X ₁ * X ₂	2,4375	0,217407	11,21	0,0079*
X ₁ * X ₃	2,5625	0,217407	11,79	0,0071*
X ₂ * X ₃	3,8125	0,217407	17,54	0,0032*
X ₁ * X ₂ * X ₃	3,4375	0,217407	15,81	0,0040*

(* : Valeur répondant à des tests significatifs).

En comparant le t.student avec le t-critique, on remarque que tous les coefficients sont significatifs.

Les résultats indiquent aussi que la probabilité (p-valeur) de tous les coefficients est inférieure au seuil α (0,05) ce qui permet de dire que tous les coefficients sont significatifs.

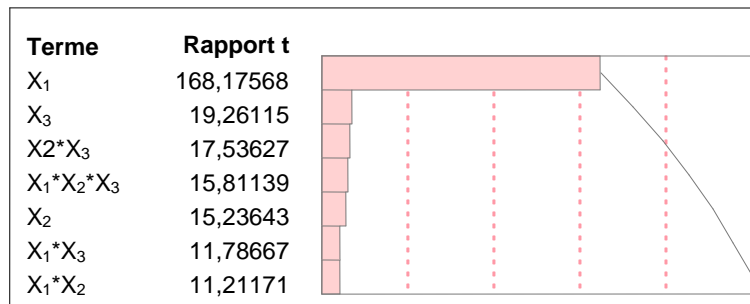


Figure 3.18 : Diagramme de Pareto du modèle proposé.

Les résultats du tableau 3.15 sont présentés par le diagramme du pareto (figure 3.18) qui montre l'influence des trois facteurs analysés. Le plus influant est le facteur X₁ qui est la concentration du phénol.

Analyse de la variance

Le tableau 3.15 résume l'analyse de la variance (test de Fischer) pour la réponse Y. On remarque que F_{obs} est supérieure à $F_{critique}$, indiquant que le modèle est valide.

PARTIE 3 : RESULTATS ET DESCUSSIONS

Tableau 3.15 : Analyse de la variance.

<i>Source</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degrés de liberté</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>Rapport F</i>	<i>F critique</i>
<i>Modèle</i>	11233,469	7	1604,78	4244,5	19,4
<i>Résidus</i>	0,756	2	0,38	prob>F	
<i>Total</i>	11234,225	9		0,0002	

$F_{critique} = F(0,05,7,2) = 19,4.$

Les effets des interactions sont présentés dans la figure 3.19, le diagramme confirme l'analyse statistique qui montre que les interactions ($X_1 * X_2$, $X_1 * X_3$, $X_2 * X_3$, $X_1 * X_2 * X_3$) ne sont pas négligeables, car les droites des interactions ne sont pas parallèles.

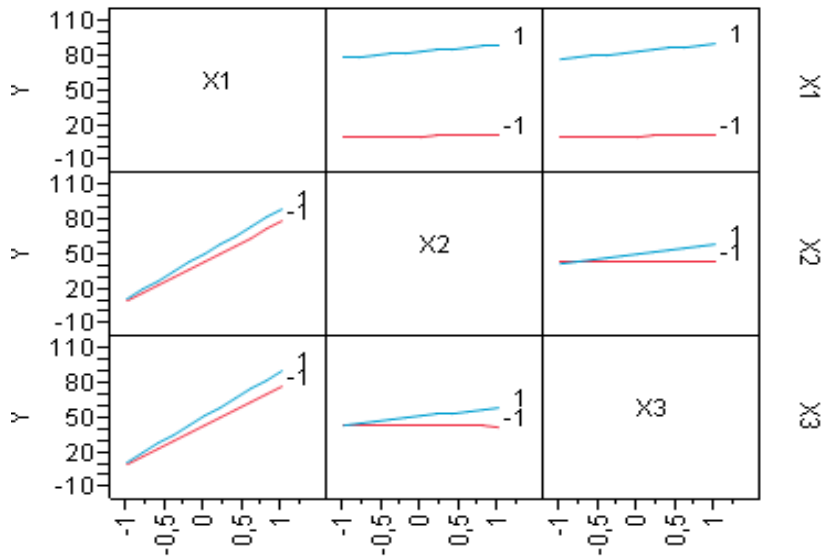


Figure 3.19 : Diagramme des interactions.

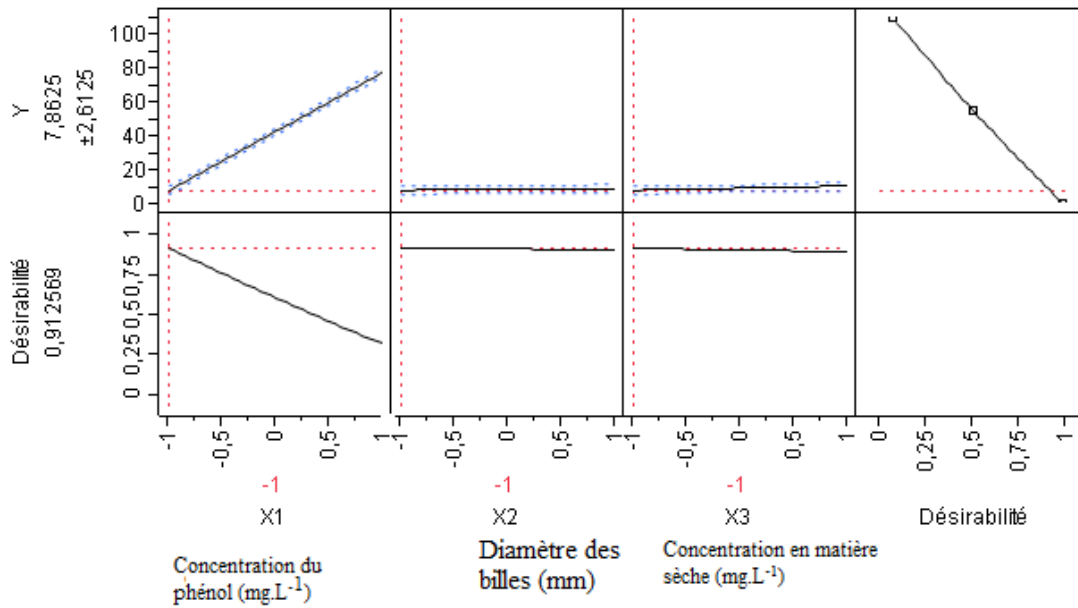


Figure 3.20 : La fonction desirabilité pour l'optimisation de la réponse.

Comme le montre la figure 3.20, la desirabilité maximale qui correspond à l'optimum de 0,912569 était obtenue au niveau bas des facteurs, la concentration initiale de phénol (100 mg.L^{-1}), le diamètre des billes est de 3mm et le niveau bas de la taille de l'inoculum ($244,5 \text{ mg.L}^{-1}$).

Une durée d'élimination de 8h pour une concentration de 100 mg.L^{-1} à confirmer que l'immobilisation de la bactérie dans les billes d'alginate a amélioré le procédé de biodégradation. Des résultats similaires ont été obtenus par Ali et al. (2013) par leurs travaux sur l'effet de l'immobilisation sur la diminution de la durée d'élimination du phénol. Ils ont montré que les cellules immobilisées ont pu dégrader totalement 100 mg.L^{-1} du phénol au bout de 8h, alors que les cellules libres n'ont pu dégrader la même concentration qu'après 48h de culture.

Namane et al. (2012), ont comparé entre trois méthodes de traitement biologiques ; dégradation par des bactéries libres, dégradation par des bactéries fixées sur charbon actif et dégradation par immobilisation dans des billes d'alginate de sodium. Ils ont trouvé que la meilleure méthode vis-à-vis de la durée d'élimination et la quantité éliminée est celle qui utilise l'immobilisation sur des billes d'alginate.

Selon Ali (2016), la performance de la biomasse immobilisée dans une matrice de gel dépend des cinétiques de réaction cellulaires, des transferts de masse interne et externe des substrats et des produits, ainsi que le relargage cellulaire de la surface des billes dans le milieu externe.

Selon les paramètres qui ont été optimisés pour le procédé immobilisé, le diamètre des

billes. L'optimum était obtenu au faible diamètre des billes (3mm) ce qui est en accord avec Beaucoup de recherche.

Basak et al. (2014) ont montré que le meilleur rendement d'élimination du phénol par *Candida tropicalis* sur des billes d'alginate de diamètre allant de 2 à 6mm a été obtenu pour les billes à 3mm de diamètre.

L'étude faite par Chung et al. (2003) sur l'effet de la taille des billes de diamètre 3 et 4mm sur la biodégradation du phénol par *Pseudomonas putida* a montré que des billes de 3mm ont donné les meilleurs résultats de dégradation. Selon ce même auteur, la biodégradation du phénol était lente pour les billes de plus grand diamètre. Ces résultats peuvent s'expliquer par les phénomènes de diffusion qui lorsque les microorganismes sont immobilisés par inclusion dans une matrice microporeuse tels que les gels alginate, le substrat diffuse dans les micropores des billes d'alginate et subit une biodégradation par les cellules immobilisées.

Dursun and Tepe (2005) ont constaté selon leur étude qu'une augmentation de la taille des billes entraîne une augmentation de limitation de diffusion de phénol dans les billes et les faibles taux d'élimination du substrat ont été trouvés pour des billes de plus grand diamètres.

En ce qui concerne la taille de l'inoculum, l'optimum a été trouvé au bas niveau qui offre une concentration en matière sèche de 244, 5 mg.L⁻¹. Selon Ali (2016), au-delà d'une certaine valeur il n'y pratiquement pas de différence dans le temps de biodégradation. Ceci peut être due qu'un nombre plus important de bactéries ainsi que les métabolites de dégradation présents dans la bille, causent un encombrement et par conséquence une limitation de diffusion.

Conclusion

- ✓ D'après les tests préliminaires et les tests biochimiques nous avons confirmé que la bactérie est *Bacillus subtilis*.
- ✓ L'utilisation de la souche *Bacillus subtilis* SB5 en culture libre a permis la dégradation de la totalité du phénol en 20 heures. L'immobilisation de la même bactérie dans les billes d'alginate a amélioré le procédé en réduisant le temps de la dégradation à 8 heures seulement.
- ✓ La désirabilité maximale qui correspond à l'optimum de 0,912569 était obtenue au niveau le plus bas des facteurs, la concentration initiale de phénol (100 mg.L⁻¹), le diamètre des billes et de 3mm et le niveau bas de la taille de l'inoculum (244,5 mg.L⁻¹).

3.3. Le couplage photocatalyse / traitement biologique

L'optimisation des conditions opératoires du procédé photocatalytique et du procédé biologique par des cellules libres et immobilisées dans les résultats précédents a révélé les résultats suivants :

- ✓ Les conditions optimales pour la dégradation du phénol en photoréacteur sont une concentration en phénol de 20mg.L^{-1} , un pH de 9 et une concentration en TiO_2 de 2g.L^{-1} .
- ✓ La dégradation complète de 100mg.L^{-1} de phénol par la souche bactérienne *Bacillus subtilis* SB5 en culture libre a duré 20h.
- ✓ La dégradation complète de 100mg.L^{-1} de phénol par un inoculum de $244,5\text{mg.L}^{-1}$ de la souche bactérienne *Bacillus subtilis* SB5 immobilisée dans des billes d'alginate de 3mm de diamètre a duré 8h.

Suite à ces résultats nous nous sommes intéressés à l'étude de l'efficacité du couplage des procédés photocatalytique et biologique qui a été réalisé en deux étapes. La première étape a consisté à minimiser la durée du pré-traitement par photocatalyse. La seconde étape a consisté en l'étude du couplage des deux procédés en utilisant des cellules libres et des cellules immobilisées.

3.3.1. Temps de pré-traitement photocatalytique

Les résultats des pourcentages de dégradation de 100mg.L^{-1} de phénol à différents temps (4, 6, 8, 16 et 24h) de pré-traitement par photocatalyse sont représentés sur la figure 3.21.

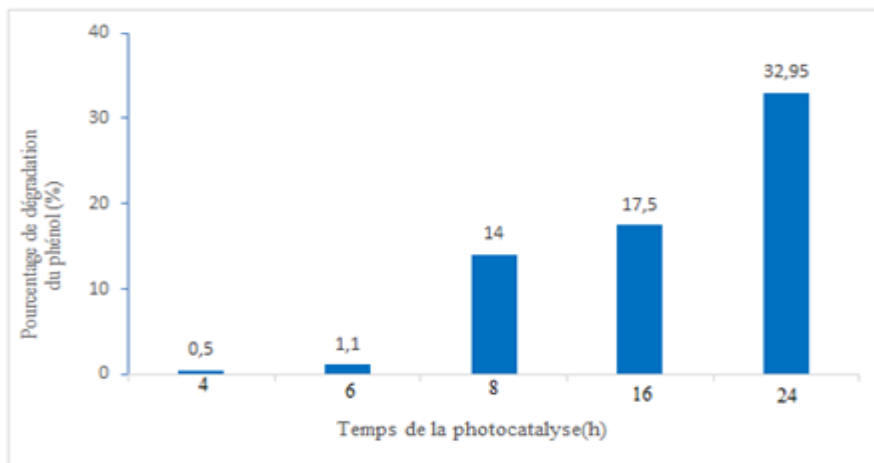


Figure 3.21 : Pourcentage de dégradation du phénol en fonction de la durée de photocatalyse ($[\text{TiO}_2]= 2\text{g.L}^{-1}$, $\text{pH}=9$).

D'après la figure 3.21, on remarque que le pourcentage de dégradation augmente avec l'augmentation du temps d'irradiation. Ce même résultat a été constaté par Ola et al. (2016) et Mohanty et al. (2005).

Le choix de la durée de prétraitement dépend très fortement du pourcentage de dégradation du polluant, du coût de traitement ou de la nature des intermédiaires et des produits issus de ce traitement (toxicités et résistances).

Ola et al. (2016) ont suivi la dégradation photocatalytique de 125 mg. L⁻¹ du phénol sur ZnO supporté comme catalyseur, à différents temps d'irradiation : 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 6 et 24h. Ils ont montré que pour une durée de 6h, 50% du phénol ont été éliminés. Au-delà de 6h le pourcentage de dégradation varie lentement. A cet effet ils ont opté pour un temps de prétraitement de 6h pour réaliser le couplage.

Par ailleurs Loveira et al (2012) ont constaté que malgré la dégradation photocatalytique rapide et complète d'un bactéricide (chlorure de benzalkonium (BKC)) utilisé dans le domaine pharmaceutique, les produits intermédiaires issus du prétraitement sont plus toxiques et plus résistants que le polluant de départ. Ce qui a amené ces chercheurs à opter pour un temps permettant d'éviter ce problème. Ils ont remarqué aussi que le couplage avec le procédé biologique à ce temps a conféré une très grande efficacité.

García-Ripoll et al. (2007) ont testé la dégradation de l'ultracide (un pesticide commercial) par photocatalyse sous irradiation solaire. Le pesticide est complètement dégradé au bout de 2h d'irradiation, mais pour une minéralisation totale ils ont atteint 7 à 8h de temps. García-Ripoll et al. (2007) ont proposé un couplage par le procédé biologique en utilisant des boues activées capables de minéraliser totalement la solution photocatalysée.

Yahiat et al. (2011) ont étudié la dégradation d'une solution de deux antibiotiques (composés toxiques pour les microorganismes et non biodégradables), la tétracycline (TC) et la tylozine (TYL). Ils ont choisi le couplage photocatalyse / traitement biologique pour éliminer ou diminuer la concentration de ces antibiotiques. Ils ont trouvé qu'après 2h d'irradiation, une diminution dans la concentration de ces deux antibiotiques est enregistrée. Cependant, ils ont constaté que les sous-produits issus de la photocatalyse du TC ne sont pas biodégradables. Par contre ceux issus de la tylozine ont montré une biodégradabilité significative (diminution de 56% de DCO) ce qui prouve qu'il y a une diminution de la toxicité de tylozine.

Comme nous ne disposons pas des méthodes d'analyses qui nous permettent de suivre les différents produits issus de la photocatalyse et voir leurs toxicités vis-à-vis de la bactérie, les critères de sélection de l'optimum sont l'efficacité du traitement (pourcentage de dégradation) et le coût du procédé (consommation d'énergie moindre).

3.3.2. Le couplage photocatalyse / traitement biologique

3.3.2. 1. Couplage photocatalyse-biodégradation par cellules libres

Le couplage de la photocatalyse comme prétraitement avec la biodégradation par des cellules libres a été effectué. Deux souches ont été utilisées *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa* à titre comparatif.

Les essais du couplage ont été effectués pour dégrader 100mg.L^{-1} du phénol. Pour la photocatalyse la concentration en TiO_2 est de 2g.L^{-1} , le pH est de 9. Concernant la biodégradation, les essais ont été effectués sous une température de 37°C et un pH de 7.

La durée de la photocatalyse a été fixé à 8h (correspondant à un pourcentage de dégradation du phénol de 14%(figure3.21))

La figure 3.22 représente les résultats du couplage photocatalytique avec le traitement biologique par les deux souches *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*.

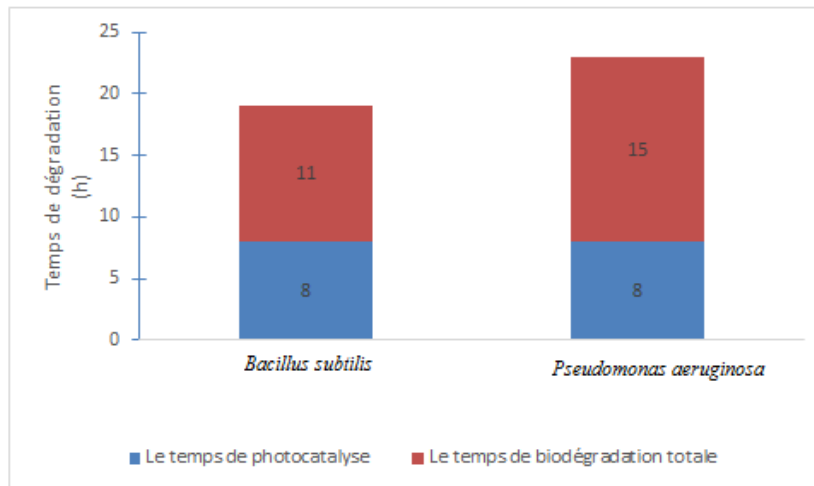


Figure 3.22 : Résultats du couplage de photocatalyse avec biodégradation par *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*.

La figure 3.22 montre que le couplage avec un prétraitement de 8h (14% d'élimination) a permis une biodégradation totale du phénol par *Bacillus subtilis* au bout de 11h, et par *Pseudomonas aeruginosa* au bout de 15h.

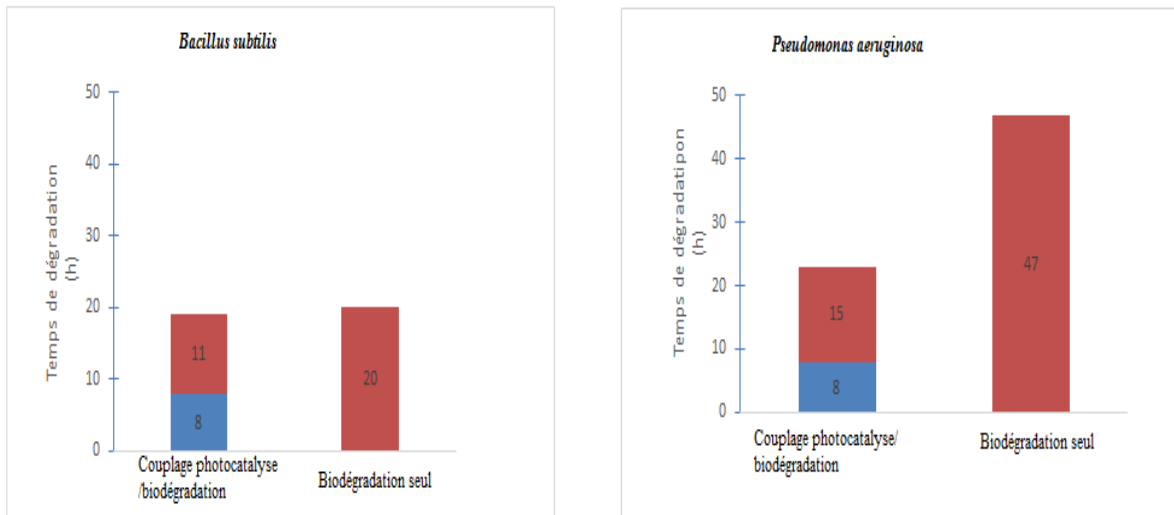


Figure 3.23 : Comparaison entre le couplage photocatalyse /biodégradation et la biodégradation seule pour les deux souches.

On remarque d’après la figure 3.23 que le couplage des deux procédés à une durée de 8h de photocatalyse est très efficace.

Les résultats obtenus indiquent, qu’en présence seulement de la souche *Bacillus subtilis* la durée de biodégradation totale du phénol est de 20h alors que celle-ci est diminué pratiquement de moitié lorsqu’on couple la biodégradation à la photocatalyse. Le même résultat est observé avec *Pseudomonas aeruginosa*, une durée de biodégradation de 15h est obtenue à partir du couplage alors qu’elle était de 47h en biodégradation seule.

L’avantage du couplage a été démontré par plusieurs chercheurs. Goel et al. (2010) ont montré qu’un prétraitement de 4h par le procédé photocatalytique pour la dégradation du 4-chlorophénol, suivi d’un traitement biologique, a permis une minéralisation totale de 400mg.L⁻¹ de ce produit en 96h au lieu de 264h pour une biodégradation seule.

Suryaman et al. (2010) ont trouvé une diminution significative dans le pourcentage de dégradation des composés suivants : 2-chlorophénol, 2-4 dichlorophénol, 2-4-5 trichlorophénol et le pentachlorophénol par couplage de procédés photocatalytique et biologique. Des pourcentages de dégradations de 54% du 2-chlorophénol, 67% du 2-4- dichlorophénol, 86% du 2-4-5-trichlorophénol et 99% du pentachlorophéol ont été obtenus après un traitement photocatalytique de 6h. Le reste de la quantité a été éliminée par traitement biologique.

Ola et al. (2016) ont étudié la dégradation de 125mg.L⁻¹ de phénol par couplage de la photocatalyse et de la biodégradation par *Penicillium chrysogenum*. Après 6h d’irradiation, 90% de la quantité totale de phénol restante après la photocatalyse a pu être dégradée au bout de 18h. Alors que sans prétraitement, 77,3% du phénol ont pu être dégradés au bout de 168h

3.3.2.2. Couplage photocatalyse-biodégradation par cellules immobilisées

Le couplage de la photocatalyse avec le traitement biologique pour la dégradation de 100 mg.L⁻¹ du phénol a été réalisé en utilisant la souche SB5 (*Bacillus subtilis*) immobilisée dans des billes d'alginate de sodium sous les conditions de diamètre et de taille d'inoculum de 3mm et 244,5mg.L⁻¹ respectivement.

La biodégradation totale du phénol en cellules immobilisées (sous les conditions optimales) a donné presque 8h de temps. En vue d'améliorer cette durée nous avons opté pour 4h (0,5% d'élimination) de photocatalyse. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.24.

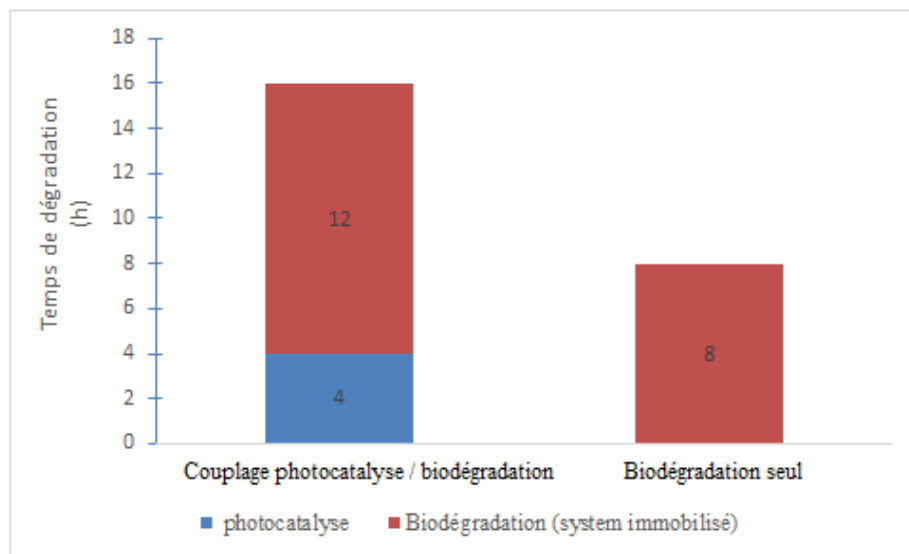


Figure 3.24 : Couplage photocatalyse / traitement biologique par *Bacillus subtilis* (cellules immobilisées).

D'après les résultats (Figure 3.24), nous constatons une augmentation de la durée de biodégradation lors du couplage avec la photocatalyse (4h). En effet, celle-ci est passée de 8h (sans pré-traitement) à 12h avec prétraitement. L'augmentation de la durée de biodégradation peut être due aux phénomènes d'inhibitions par certains produits de dégradation obtenus par la photocatalyse qui gênerait l'activité des cellules immobilisées (Ballestros et al., 2008), probablement par adsorption sur la surface des billes. Ce qui serait à l'origine du ralentissement de l'activité de dégradation. A ce propos, Yahiat et al. (2011) ont signalé qu'on peut avoir des sous-produits issus de la photocatalyse plus toxiques que le produit de départ comme c'est le cas de la tétracycline, et d'autres sont moins toxiques comme la tylozine.

Conclusion

D'après les résultats obtenus dans cette partie, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Le couplage photocatalytique /traitement biologique (cellules libres) a amélioré la durée de biodégradation de 100mg.L^{-1} du phénol par rapport à la biodégradation par les cellules libres seules.
- Le couplage photocatalytique /traitement biologique (cellules immobilisées) a donné en revanche un temps peu élevé comparé à celui du système cellules immobilisé.
- L'efficacité du couplage dépend des sous-produits issus de chaque traitement.
- Le temps choisi pour le prétraitement que ce soit la photocatalyse ou le traitement biologique a une grande importance.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La pollution de l'environnement est l'un des grands enjeux de notre temps par conséquent son élimination est devenue une préoccupation mondiale. A cet effet, beaucoup de méthodes physico-chimiques et biologiques ont été utilisées pour la dégradation de différents polluants. Cependant, les procédés physico-chimiques sont limités par leurs coûts ou leur impact secondaire sur l'environnement. Alors que la dégradation par voie biologique, malgré les avantages de minéralisation totale et de coût, elle reste limitée par la nature du polluant à cause de la toxicité vis-à-vis de la bactérie. D'où l'intérêt de l'utilisation d'un couplage entre deux méthodes (une méthode physico-chimique avec la méthode biologique) dans l'objectif de diminuer la toxicité et limiter le coût de traitement.

L'objectif de cette étude était le couplage du procédé photocatalytique et le procédé biologique pour l'élimination d'un polluant organique des eaux. Les résultats obtenus à l'issue de cette étude nous ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

Dans un premier temps, un photoréacteur à l'échelle du laboratoire a été conçu.

La partie expérimentale est scindée en trois étapes :

Au cours de la première partie, on a pu optimiser les conditions opératoires du photoréacteur en utilisant un plan d'expériences. Ce dernier s'est révélé une méthode aussi rapide qu'efficace pour déterminer les conditions optimales du photoreacteur. L'application d'un plan factoriel complet à deux niveaux nous a permis d'obtenir un modèle linéaire avec interaction. La validité statistique du modèle fut évaluée par le test de Fischer, qui révèle que cette régression est statistiquement significative.

Le pourcentage de dégradation maximale du phénol correspond à une désirabilité maximale qui vaut 0,91 est obtenu dans les conditions opératoires suivantes :

- Concentration en phénol 20 mg/l ,
- Concentration en TiO₂ 2000 mg/l,
- pH de la solution 9.

Dans la seconde partie, nous avons identifié une souche bactérienne comme étant *Bacillus subtilis*, remarquablement active par rapport à l'ensemble des souches isolées des eaux polluées.

Les paramètres qui influent sur la biodégradation du phénol ont été optimisés en utilisant la souche *Bacillus subtilis*. Les résultats sont comparés par rapport à une souche de référence qui est *Pseudomonas aeruginosa*. Les paramètres choisis sont la concentration en phénol, la température et le pH.

La biodégradation du phénol par les cellules libres de *Bacillus subtilis* a montré que les concentrations initiales de phénol supérieures à 500 mg L^{-1} provoquent des inhibitions de la bactérie.

Une meilleure durée de dégradation et une meilleure activité bactérienne sont obtenues à un pH 7 et 9 et une température de 30 et 37°C respectivement.

Afin d'améliorer l'activité des cellules, la technique d'immobilisation des bactéries sur des billes d'alginate a été introduite. L'avantage principal que présente cette nouvelle technique est la protection des cellules contre l'effet toxique du polluant.

L'étude de l'influence des paramètres opératoires sur la biodégradation du phénol par les bactéries immobilisées et leurs interactions sur la réponse (le pourcentage de dégradation du phénol) a été menée par un deuxième plan factoriel complet. Les paramètres choisis sont la concentration du phénol, le diamètre des billes et la taille de l'inoculum.

La désirabilité maximale qui correspond à l'optimum de 0,912569 était obtenue au niveau bas des facteurs, la concentration initiale de phénol (100mg.L^{-1}), le diamètre des billes et de 3mm et le niveau bas de la taille de l'inoculum.

La troisième partie concernant le couplage de la photocatalyse au procédé biologique (cellules libres) a amélioré la durée de biodégradation de 100mg.L^{-1} du phénol par rapport à la biodégradation par les cellules libres seules.

Les résultats obtenus indiquent, qu'en présence seulement de la souche *Bacillus subtilis* la durée de biodégradation totale du phénol est de 20h alors que celle-ci est diminuée en 11h de temps lorsqu'on couple la biodégradation avec 8h de photocatalyse. Le même résultat est observé avec *Pseudomonas aeruginosa*, une durée de biodégradation de 15h est obtenue à partir du couplage alors qu'elle était de 47h en biodégradation seule.

Le temps choisi pour le prétraitement que ce soit la photocatalyse ou le traitement biologique a une grande importance.

Dans la perspective de compléter et d'enrichir cette étude, il serait intéressant :

- ✓ D'utiliser des catalyseurs immobilisés sur des supports solides ou lit fixes pour éviter l'étape de filtration qui est très pénalisante dans le procédé photocatalytique ;
- ✓ D'utiliser un radiomètre qui permet une mesure rapide de flux lumineux ;
- ✓ D'utiliser d'autres méthodes d'analyse qui permettent de suivre l'évolution de la pollution le long du traitement.

Références bibliographiques

- **AbuTariq M., Faisal M., Saquib M., MuneerM.,** 2008. Heterogeneous photocatalytic degradation of an anthraquinone and a triphenylmethane dye derivative in aqueous suspensions of semiconductor. *Dyes and Pigments*, 76:358-365.
- **Adinarayana K., Jyothi B., Ellaiah P.,** 2005. Production of Alkaline Protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various Matrices by Entrapment Technique. *AAPS PharmSciTech*, 48:391-397
- **Ahmad R., Ahmad Z., Khan A.U., Mastoi N. R.,** 2016. Photocatalytic systems as an advanced environmental remediation: Recent developments, limitations and new avenues for applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4: 4143-4164.
- **Ahmed S., Rasul M.G., Brown R., Hashib M.A.,** 2010. Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater A: short review. *Journal of Environmental Management*, 1-20.
- **Alahiane S., Qourzal S., El Ouardi M., Belmouden M., Assabbane A., Ait-Ichou Y.,** 2013. Adsorption et photodégradation du colorant indigo carmine en milieu aqueux en présence de TiO₂/UV/O₂ (Adsorption and photocatalytic degradation of indigo carmine dye in aqueous solutions using TiO₂/UV/O₂). *Journal of Materials and Environmental Science*, 4(2): 239-250.
- **Ali O., Namane A., Hellal A.,** 2013. Use of recycling of Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol from wastewater. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19 : 1384-1390.
- **Ali O.,** 2016. Biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans des billes d'alginate en modes batch et continu. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Polytechnique, Alger.
- **Al-Shamali,** 2013. Photocatalytic degradation of methylene bleu in the presence of TiO₂ catalyst assisted solar radiation. *Australian Journal of Basic and Applied Science*, 7: 172-176.
- **Amutha K. JayaPriya K.,** 2011. Effect of pH, temperature and metal ions on amylase activity from *Bacillus Subtilis* KCX006. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2: 407- 413.
- **Augugliaro V., Litter M., Palmisano L., Soria J.,** 2006. The combination of heterogeneous photocatalysis with chemical and physical operations: A tool for improving the photoprocess performance. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 7: 127–144.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Ballesteros Martin M.M., Sanchez Pérez J.A., Ación Fernandez F.G., Casas Lopez J.L., Gaeafa A.M., Arques A., Oller I., Malato Rodriguez S.,** 2008. Combined photo-Fenton and biological oxidation for pesticide degradation : effect of photo-treated intermediates on biodegradation kinetics. *Chemosphere* 70 ; 1476-1483.
- **Ballesteros Martin M.M., Sanchez Pérez J.A., Casas Lopez J.L., Oller I., Malato Rodriguez S.,** 2009. Degradation of four - pesticide mixture by combined photo-Fenton and biological oxidation. *Water Research* 43 : 653-660.
- **Baraka N., Qourzal S., Assabbane A., Nounah A., Ait-Ichou Y.,** 2008. Factors influencing the photocatalytic degradation of Rhodamine B by TiO₂-coated non-woven paper. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 195: 346–351.
- **Basak B., Bhunia B., Dey A.,** 2014. Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for phenol biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 93: 107-117.
- **Belattmania Z., Zrid R., Reani A., Elatouani S., Sabbar E.M., Mourtadi A., El Moznine R., Cherkaoui O., Bentiss F., Sabour B.,** 2015. Spectroscopic and rheological characterization of sodium alginate extracted from three Phaeophyceae seaweeds (*Dictyopteris polypodioides*, *Dilophus ligulatus* and *Halopteris scoparia*) from El Jadida shoreline – Morocco (Caractérisation spectroscopique et rhéologique des alginates de sodium extraits de trois algues marines Phaeophyceae (*Dictyopteris polypodioides*, *Dilophus ligulatus* et *Halopteris scoparia*) de la côte d'El Jadida – Maroc). *Journal of Material and Environmental Science*, 6: 1654-1662.
- **Bergmaier D.,** 2002. Production d'oxopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de LB. RHANOSUS RW- 9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum, thèse de doctorat.
- **Bernardini C., Cappelletti G., Dozzi M.V., Selli E.,** 2010. photocatalytic degradation of organic molecules in water: photoactivity and reaction paths in relation to TiO₂ particles features. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry*, 211:185-192.
- **Brosillon S., Djelal H., Merienne N., Amrane A.,** 2008. Innovative integrated process for the treatment of azo dyes: coupling of photocatalysis and biological treatment. *Desalination*, 222 : 331–339.
- **Chebli D., Fourcade F., Brosillon S., Nacef S. and Amrane A.,** 2011. Integration of photocatalysis and biological treatment for azo dye removal – application to AR183. *Environmental Technology*, 32 : 507–514.
- **Chiang K., Amal R., Tran T.,** 2002. Photocatalytic degradation of cyanide using titanium dioxide modified with copper oxide. *Advanced in Environmental Research* 6 : 471-485.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Chuan-yi W., Pagel R., Dohrmann J.K., Bahnemann D.W.,** 2006. Antenna mechanism and disaggregation concept novel mechanistic principles for photocatalysis. *C.R. Chimie*, 9: 761-773.
- **Chung T.P., Tseng H.Y., Juang R.S.,** 2003. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process biochemistry*, 38 : 1497-1507.
- **Danion A.,** 2002. Développement d'un réacteur à base de fibre optiques photocatalytiquement actives pour la dépollution de l'eau. Thèse de doctorat, Ecole Centrale, Lyon.
- **Dong-Zhi C., Jun-Yi F., Qian S., Jie-Xu Y., Du-Juan O., Jian-Meng C.,** 2013. Biodegradation of tetrahydrofuran by *Pseudomonas oleovorans* DT4 immobilized in calcium alginate beads impregnated with activated carbon fiber: Mass transfer effect and continuous treatment. *Bioresource Technology*, 139: 87–93.
- **Dursan A.Y., Tepe O.,** 2005. International mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*. *Journal of Hazardous Material*, 126 : 105-111.
- **Ehtash M.,** 2011. Purification des eaux polluées par du phénol dans un pertracteur à disques tournants. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Rouen.
- **Ely A.,** 2010. Synthèse et propriétés de biosorbants à base d'argiles encapsulées dans des alginates : application au traitement des eaux. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, France.
- **Faisal M., Abu Tariq M., Muneer M.,** 2007. Photocatalysed degradation of two selected dyes in UV-irradiated aqueous suspensions of titania. *Dyes and Pigments*, 72: 233-239.
- **Garcia-Ripol A., Amat A.M., Arques A., Vicente R., Lopez M.F., Oller I., Maladonado M.I., Gernjak W.,** 2007. Increased biodegradability of Ultracid in aqueous solutions with solar TiO₂ photocatalysis. *Chemosphere*, 68 :293-300.
- **Ghoïn M.,** 2009. Films photocatalytiques par voie sol-gel pour applications vitrages en intérieur, Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique, Palaiseau.
- **Goel M., Chovelon J. M., Ferronato C., Bayard R., T.R. Sreerkrishnan,** 2010. The remediation of wastewater containing 4-chlorophenol using integrate photocatalytic and biological treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 98: 1–6.
- **Goupy J.,** 1997. Modélisation par les plans d'expériences. *Techniques de l'Ingénieur, Traité Mesures et contrôle*, R 275 : 1-23.
- **Goupy J.,** 2006. Les plans d'expériences, *Revue MODULAD* N°34.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Goupy J.**, 2013. Introduction aux plans d'expériences avec application. 5^{ème} édition, DUNOD.
- **Goutailler G., Valette J.C., Guillard C., Païssé O., Faure R.**, 2001. Photocatalysed degradation of cyromazine in aqueous titanium dioxide suspensions: comparison with photolysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 141: 79–84.
- **Ha J., Cady R. E., James R. W.**, 2009. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca alginate gel beads. *Bioresource Technology*, 100: 1138–1142.
- **Hadj Salah N.**, 2012. Etude de la dégradation photocatalytique de polluants organiques en présence d'oxyde de titane, en suspension aqueuse et en lit fixe. Thèse de Doctorat, Université Mentouri, Constantine.
- **Hamdi H.**, 2007. La biodégradation des hydrocarbures activité de la microflore des eaux polluées. Thèse de Magistère, Ecole Nationale Polytechnique, Alger.
- **Helali S.**, 2012. Application de la photocatalyse pour la dégradation des polluants chimique et bactériologiques dans l'eau en utilisant des catalyseurs irradiés par photons de lumière naturelle ou artificielle (UV-A/UV-B). Thèse de doctorat, Université de Claude Bernard, Lyon I.
- **Housseny C. K.**, 2012. Vinification continue avec levure immobilisées analyse du système et conception du réacteur industriel. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique, Toulouse.
- **INERIS**, 2005. Phénol, Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimique, 2-1 :47.
- **INRS**, 2011. Phénol, Fiche toxicologique, FT 15 : 8.
- **Kartal O.E., Erol M., Oguz H.**, 2001. Photocatalytic destruction Of Phenol by TiO₂ powders. *Chemical Engineering Technology*, 24(6) :645-649.
- **Karunakaran C., Dhanalakshmi R., Gomathisankar P., Manikandan G.**, 2010. Enhanced phenol-photodegradation by particulate semiconductor mixtures Interparticle electron-jump. *Journal of Hazardous Materials*, 176: 799–806.
- **Kashif N., Ouyang F.**, 2009. Parameters effect on heterogeneous photocatalysed degradation of phenol in aqueous dispersion of TiO₂. *Journal of Environmental Sciences*, 21: 527–533.
- **Lecomte P.**, 1998. Les sites pollués : traitement des sols et des eaux souterraines. Tec et Dc, 2^{ème} édition.
- **Lee J., Kim M., Hwang B., Bae W., Kim B.**, 2003. Photodegradation of acid red 114 dissolved using a photo-fenton process with TiO₂. *Dyes and Pigments* 56 : 59-67.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Li Y., Li J., Wang C., Wang P.,** 2010. Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas Putida* LY1, *Bioresource Technology* 101 :6740-6744.
- **Liffourrena A.S., Lucchesi G.I.,** 2014. Degradation of trimethylamine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* A (ATCC 12633). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90: 88-92.
- **Lin Y., Ferronato C., Deng Fengwu N., Chovelon J. M.,** 2009. Photocatalytic degradation of methyl para ben by TiO_2 ; multivariable experimental design and mechanism. *Applied Catalysis, B: Environmental*, 88: 32-41.
- **Loveira E.L., Fiol P. S., Senn A., Curutchet G., Candal R., Litter M.I.,** 2012. TiO_2 -photocatalytic treatment coupled with biological system for the elimination of benzalkonium chloride in water. *Separation and Purification Technology*, 91: 108–116.
- **Malato S., Fernandez-Ibanez P., Maladonado M.I., Blanco J., Gernjak W.,** 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis : recent overview and trends. *Catalysis to day* 147 : 1-59.
- **Maroga Mboula V.,** 2012. Devenir des polluants émergents lors d'un traitement photochimique ou photocatalytique sous irradiation solaire. Thèse de Doctorat, Ecole des Mines de Nantes, France.
- **Mohanty S., Neti Rao N., Khare P., Kaul S. N.,** 2005. A coupled photocatalytic-biological process for degradation of 1- amino-8-naphtol-3 ,6-disulfonic acid (H-acide). *Water Research*, 39 : 5064-5070.
- **Mohd. Tuah P., Noor Aini Abdul R., Md. Salleh M.,** 2009. Degradation pathway of phenol through ortho- cleavage by *Candida tropicalis* RETL-Cr1. *Borneo science*, 24.
- **Namane A., Ali O., Hellal A.,** 2012. Evaluation of biological treatment for the adsorption of phenol from polluted waters. *Adsorption Science and Technology*, 30(6) : 521-532.
- **NF(T90-204),** 1986. Essai des eaux effluents aqueux des raffineries de petrole Paris, 464-467.
- **Nweke C. O., Okpokwasili G. C.,** 2010. Influence of exposure time on phenol toxicity to refinery wastewater bacteria. *Journal of Environmental chemistry and Ecotoxicology*, 2: 20-27.
- **Nweke C. O., Okpokwasili G. C.,** 2014. Kinetics of growth and phenol degradation by pseudomonas species isolated from petroleum refinery wastewater. *International Journal of Biosciences*, 4(7): 28-37.
- **Ola M. G., Amr El-Hag A.,** 2016. Enhanced dephenolization using sequential biologicaland photocatalytic treatment. *Polymer Bulletin*, 73: 3271–3286.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Oller P. I., Malato S., Sánchez-Pérez J-A., Gernjak W., Maldonado M. I., Pérez-Estrada L.A., Pulgarín C.,** 2007. A combined solar photocatalytic-biological field system for the mineralization of an industrial pollutant at pilot scale. *Catalysis today*, 122: 150-195.
- **Parra cardona S. P.,** 2001. Coupling of photocatalytic and biological process as a contribution to the detoxification of water: catalytic and technological aspects. Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale, Lausanne.
- **Patil N. K., Veeranagouda Y., Vijaykumar M.H., Anand Nayak S., Karegoudar T.B.,** 2006. Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus* sp. immobilized cells in alginate and polyurethane. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57: 82–87.
- **Qamar M., Muneer M., Bahnemann D.,** 2006. Heterogeneous photocatalysed degradation of two selected pesticide derivatives, triclopyr and daminozid in aqueous suspensions of titanium dioxide. *Journal of Environmental Management*, 80 : 99–106.
- **Rabier F.,** 2007. Modélisation par la méthode des plans d'expériences du comportement dynamique d'un module IGBT utilisé en traction ferroviaire. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique, Toulouse.
- **Reardon K. F., Mosteller D. C., Bull Rogers J. D.,** 2000. Biodegradation kinetics of Benzene, Toluene and Phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F. *Biootechnology and Bioengineering*, 69 (4) : 385-400.
- **Rolland L.,** 2013. Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à cœur liquide. Thèse de Doctorat, Université pierre et marie curie, paris.
- **Ruey-Shin J., Shang-Yuan T.,** 2006. Enhanced biodegradation of mixed phenol and sodium salicylate by *Pseudomonas putida* in membrane contactors. *Water research*, 40: 3517 – 3526.
- **Sarantopoulos C.,** 2007. Photocatalyseurs à base de TiO₂ préparés par infiltration chimique en phase vapeur (CVI) sur supports microfibreux. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique, Toulouse.
- **Saratale R. G., Noh H.S., Song J.Y., Kim D.S.,** 2014. Influence of parameters on the photocatalytic degradation of phenolic contaminants in wastewater using TiO₂/UV system. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 49: 1542–1552.
- **Seok J.D., Cham K., Se G.L., Sung J.L., Houyoung K.,** 2008. Development of photocatalytic TiO₂ nanofibers by electrospinning and its application to degradation of dye pollutants, *Journal of Hazardous Materials*, 154 : 118-127.
- **Sheeja R.Y., Murugesan T.,** 2002. Mass transfer studies on the biodegradation of phenols in-uppacked bed reactors. *Journal of Harazadous Materials*, 89: 287-30.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Simon J.C., Dauby B., Nonet S.**, 2008. Evaluation de l'efficacité de l'oxydation avancée par photocatalyse hétérogène UV/TiO₂ sur un effluent industriel contaminé par des composés organiques non biodégradables (colorants). *Revue scientifique de ISILF* N° 22.
- **Soltani M.**, 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbanoclaste. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat, Université de Paris 6.
- **Sridevi V., Chandana Lakshmi M.V.V., Manasa M., Ravani M. S.**, 2012. Metabolic pathways for biodegradation of phenol. *International Journal of Engineering Science and Advanced Technology*, 2: 695-705.
- **Suryaman D., Hasegawa K.**, 2010. Biological and photocatalytic treatment integrated with separation and reuse of, titanium dioxide on the removal of chlorophenols in tap water. *Journal of Hazardous Materials*, 183: 490–496.
- **Tamer E., Zilouei H., Amin Magdy A., El Tayeb O., Mattiasson B., Guieysse B.**, 2006. Sequential UV–biological degradation of chlorophenols. *Chemosphere*, 63: 277–284.
- **Tarek A. G., Kyoko F., Shigeru K., Shigeo S., Toshinori K.**, 2008. Preparation and characterization of magnetically separable photocatalyst (TiO₂/SiO₂/Fe₃O₄): effect of carbon coating and calcinations temperature. *Journal of Hazardous Materials*, 154: 572-577.
- **Tatoba R. W., Mayur B. K., Ramchandra T. S., Chandrakant H. B., Byong-Hun J., Sanjay P. G.**, 2019. Sequential photocatalysis and biological treatment for the enhanced degradation of the persistent azo dye methyl red. *Journal of Hazardous Materials*, 371: 115-122.
- **Wang X., Lasse S., Ren S., Stefan W., Peter H., Aref M., Chuanxu Y., Yudong H., Bo B. I., Flemming B.**, 2014. The influence of crystallite size and crystallinity of anatase nanoparticles on the photo-degradation of phenol. *Journal of Catalysis*, 310: 100–108.
- **Yahiat S., Fourcade F., Brosillon S., Amrane A.**, 2011. Removal of antibiotics by an integrated process coupling photocatalysis and biological treatment Case of tetracycline and tylosin. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 997-1003.
- **Yahiat S., Fourcade F., Brosillon S., Amrane A.**, 2011. Photocatalysis as a pre-treatment prior to a biological degradation of cyproconazole. *Desalination*, 281: 61–67.
- **Zapata A., Malato S., Sanchez-perez J.A., Oller I., Maldonado M. I.**, 2010. Scale-up strategy for a combined solar photo-Fenton/biological system for remediation of pesticide-contaminated water. *Catalysis to day 151* : 100-106.
- **Zeghioud H., Khellaf N., Djelal H., Amrane A. and Bouhelassam M.**, 2016. Photocatalytic Reactors Dedicated to the Degradation of Hazardous Organic

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pollutants: Kinetics, Mechanistic Aspects, and Design – A Review. *Chemical Engineering Communications*, 203:1415–1431.

- *Zhang Y., Liu H., Shi W., Pu X., Zhang H., Rittmann B. E.*, 2010. Photodegradation of phenol with ultraviolet irradiation of new ceramic biofilm carriers. *Biodegradation*, 21: 881-887.

ANNEXES

ANNEXE 1

1.1. Milieu de culture

KH_2PO_4 : 0,5g

K_2HPO_4 : 1,5g

NaCl : 0,5g

MgSO_4 : 0,5g

NH_4NO_3 : 3g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,02g

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,02g

1.2. Le bouillon nutritif (h-leclerc, 1986) utilisé pour l'enrichissement, contient par litre :

Extrait de viande de boeuf..... .05g

Peptone tryptique.....10g

Chlorure de sodium......05g

Eau distillée01l

1.3. Réactifs : Les produits utilisés pour le dosage du phénol sont :

- Solution 4-amino-antipyrine (Fluka) à 20g/l .
- Solution ferricyanure de potassium (BIOCHEM) à 20g/l.
- Solution tampon: pH 9.5 de composition:

34g de NH_4Cl (MERCK) ;

200g tartrate double de Na et K (BIOCHEM) ;

15ml d'ammoniac concentré ;

Compléter à 1l et ajuster le PH à 9,5 au PH-mètre avec NH_3 concentré (MERCK).

1.4. Solution tampon pour le lavage des culots

NaCl : 8 g/l

KCl : 0,2g/l

K_2HPO_4 : 1,15g/l

KH_2PO_4 : 0,2g/l

ANNEXE 2

2.1. Courbe d'étalonnage de la biomasse microbienne

Technique :

200ml du milieu de culture bactérien est centrifugé puis lavé stérilement avec de l'eau distillée 3 fois,

- Le culot est remis en suspension dans 60ml d'eau distillée,
- La DO est lue au spectrophotomètre à 600nm,
- 50 ml de cette suspension est séchée à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant,
 $C_0 = (m - m_0)/50\text{ml}$

Avec :

m : masse de la suspension après séchage

m_0 : masse de la suspension avant séchage

- Le reste (10ml) est utilisé pour la préparation des dilutions. Pour chaque dilution, la prise de DO est effectuée à 600nm, (Chung et al. 2003 ; Li et al., 2010)
- Les matières sèches correspondantes à chaque dilution sont établies à partir de C_0 en le divisant par le facteur de dilution
- La courbe des DO en fonction des concentrations est établie

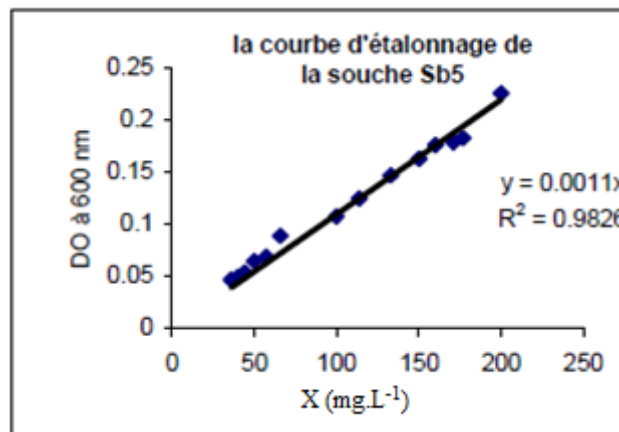


Figure : courbe d'étalonnage de la souche SB5

2.2. Courbe d'étalonnage du phénol

Technique

- Préparer une solution de 1g/l de phénol.
- Préparer des dilutions, de manière à obtenir des solutions étalon contenant respectivement 0 - 0,5 - 1 - 1,5-.....5mg.L⁻¹.

ANNEXES

- Prélever 100ml de chacune de ces solutions, ajuster le pH à 9,5 à l'aide de la solution tampon
- Introduire 1ml de la solution 4- amino-antipyrine ; mélanger le tout immédiatement.
- Ajouter 2ml de la solution de ferricyanure de potassium ; mélanger de nouveau.
- Laisser reposer pendant 5 min pour permettre le développement de la coloration (à température ambiante).

La figure montre la courbe qui exprime la relation entre la DO à 510nm et la concentration en phénol (mg.l^{-1}).

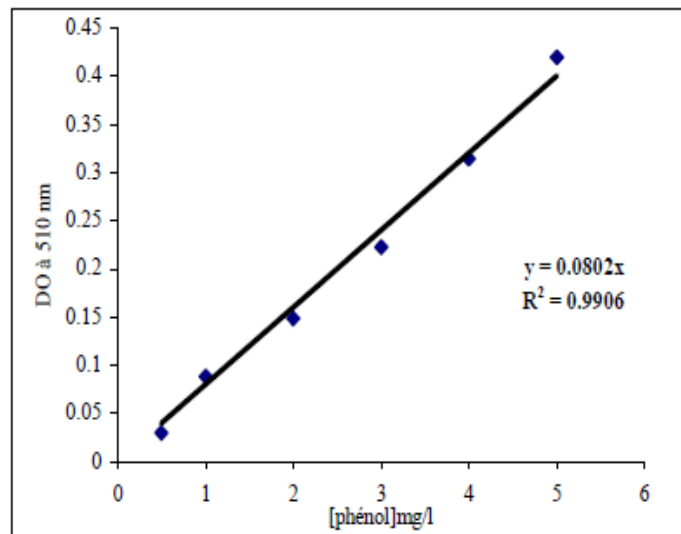


Figure : courbe d'étalonnage du phénol.

2.3. Méthode de Dosage du phénol

- Prélever un échantillon de 10ml à l'aide d'une pipette stérile, dans la zone stérile.
- Centrifuger l'échantillon (vitesse de 5770 tour .min⁻¹, durée 30minutes).
- Filtrer l'échantillon à partir du surnageant, en utilisant une fiole jaugée de 100ml toute en tenant compte de la limite de détection du phénol de la méthode (5mg.l^{-1}).
- Mettre les 100ml de la solution à doser dans un bêcher de 125ml, ajouter 5ml de la solution tampon afin d'ajuster le pH à 9,5.
- Ajouter 1ml de la solution 4 amino- antipyrine.
- Ajouter 2ml de la solution de ferricyanure de potassium.
- Nous laissons la coloration se développer à température ambiante pendant 5 min.

L'absorbance de la solution à 510nm est déterminée au spectrophotomètre, et par le biais de la courbe d'étalonnage la concentration en phénol est déterminée.