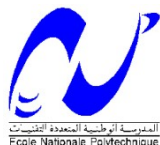


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



**ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE**

Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire des Sciences et Technique de l'Environnement.

**MEMOIRE DE MAGISTER**

Pour l'obtention du titre de

**Magister en Génie de l'Environnement**

**Option : Génie de l'Environnement**

**Thème:**

***BIODEGRADATION DU PHENOL PAR  
Pseudomonas aeruginosa IMMOBILISE DANS  
L'ALGINATE DE CALCIUM***

**Présenté par :**

**M<sup>lle</sup> BENAHMED DJILALI ADIBA**

**Ingénieur d'Etat en Technologie Alimentaire (Boumerdès)**

**Soutenu le 21 Juin 2006 devant le jury composé de :**

<b>M<sup>me</sup> N. BELHANECHÉ</b>	<b>Professeur, (ENP)</b>	<b>Président de jury</b>
<b>M<sup>r</sup> A. NAMANE</b>	<b>Chargée de cours, (ENP)</b>	<b>Rapporteur (directeur de thèse).</b>
<b>M<sup>me</sup> A. HELLAL</b>	<b>Professeur, (ENP)</b>	<b>Rapporteur (Co-directrice de thèse).</b>
<b>M<sup>me</sup> K. MOUSSAOUI</b>	<b>Professeur, (ENP)</b>	<b>Examinatrice.</b>
<b>M<sup>me</sup> F. ZERROUK</b>	<b>Chargée de cours, (ENP)</b>	<b>Examinatrice.</b>
<b>M<sup>me</sup> Y. DJEMAI-ZOGLACHE</b>	<b>Chargé de cours, (ENP)</b>	<b>Examinatrice.</b>

**2005-2006**

**ENP 10, avenue Hassen Badi, El-Harrach, Alger.**

# Liste des abréviations

**A.T.C.C.**: American Type Culture Collection.

**I.P.A** : Institut Pasteur d'Alger.

$\mu_{\max}$  : Taux de croissance maximale ( $\text{h}^{-1}$ ).

**R** : Taux d'élimination du substrat (%).

**S<sub>0</sub>** : Concentration initiale du substrat (mg/l).

**S** : Concentration du substrat (mg/l).

**X** : La matière sèche (g/l).

**V** : la vitesse moyenne de biodégradation du substrat (mg/l h).

**t** : Temps (heures)

**T** : Température (degrés celcius).

**UV** : Ultra- violet.

**DO** : Densité optique.

**G** : Temps de génération (h).

**NAD<sup>+</sup>, NADH** : Nicotinamide Adénine dinucléotides (oxydé, réduit).

**K<sub>oc</sub>** : Coefficient de sorption du phénol par le sol (l/kg).

**CL<sub>50</sub>** : Concentration limite (mg/kg)

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.

**CE** : Commission européenne.

**ATSDR** : Agence des substances toxiques et enregistrement des maladies.

**IUCLID** : Informations Internationales des données chimiques Uniformes.

**INRS** : Institut National de Recherche et de Sécurité.

**HSDB** : Banque des données des substances toxiques. (Librairie Nationale de Médecine).

**OMS IPCS** : Organisation Mondiale de la Santé (Programme Internationale de Sécurité Chimique).

**US EPA (IRIS)** : Agence de Protection de l'Environnement (Agence – Système d'Information des risques intégrés) Integrated Risk Information System.

# liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Page</b>
<b>Figure n° (II.1) :</b> Mécanisme de la biodégradation aérobie des phénols	<b>9</b>
<b>Figure n° (III.1):</b> Classification des systèmes d'immobilisation.	<b>13</b>
<b>Figure n° (IV.1) :</b> Acide gluronique (G) et mannuronique	<b>18</b>
<b>Figure n° (IV.2):</b> Assemblage en « boîte à œufs »	<b>20</b>
<b>Figure n° (V.1):</b> Phases de la croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (Évolution du logarithme de la concentration cellulaire)	<b>22</b>
<b>Figure n° (VI.1):</b> Appareillage de la technique d'immobilisation des bactéries par inclusion.	<b>30</b>
<b>Figure n° (VI.2) :</b> Protocole de travail expérimental	<b>31</b>
<b>Figure n° (VII.1) :</b> Cinétique d'adsorption du phénol par les billes d'alginate de calcium.	<b>33</b>
<b>Figure n° (VII.2):</b> Evolution de la biodégradabilité du phénol en fonction du temps.	<b>34</b>
<b>Figure n° (VII.3):</b> Evolution de la croissance des cellules libres et des cellules relarguées en fonction du temps.	<b>35</b>
<b>Figure n° (VII .4) :</b> Cinétique de biodégradation du phénol à différentes concentrations initiales.	<b>38</b>
<b>Figure n° (VII .5):</b> Effet de la concentration initiale du phénol sur le taux de croissance des cellules relarguées.	<b>40</b>
<b>Figure n° (VII.6):</b> Les différents phénomènes observés à différentes concentrations du phénol.	<b>41</b>
<b>Figure n° (VII .7) :</b> Effet de la variation de la taille des billes sur la cinétique de biodégradation du phénol (1000 mg/l).	<b>43</b>
<b>Figure n° (VII .8):</b> Evolution de la biomasse des cellules relarguées en fonction du temps.	<b>45</b>
<b>Figure n° (VII .9) :</b> Effet de recyclage des billes sur la cinétique de biodégradation du phénol (4000 mg/l).	<b>47</b>
<b>Figure n° (VII .10) :</b> Effet de recyclage des billes sur la vitesse de biodégradation et le taux d'élimination du phénol (4000 mg/l).	<b>48</b>
<b>Figure n° (VII .11):</b> Effet de l'adaptation des billes sur la cinétique de biodégradation du phénol.	<b>49</b>
<b>Figure n° (VII .12):</b> Effet de l'adaptation des billes sur la vitesse de biodégradation et le taux d'élimination du phénol (4000 mg/l).	<b>50</b>

# liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau n° (II.1) :</b> Facteur de diagnostic de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	<b>10</b>
<b>Tableau n° (III. 1):</b> Systèmes des billes pour la culture de cellules.	<b>14</b>
<b>Tableau n° (V.1) :</b> Description des étapes de la croissance discontinue.	<b>23</b>
<b>Tableau n° (VII.1):</b> Conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch dans le cas des cellules libres et immobilisées dans l'alginate de calcium.	<b>34</b>
<b>Tableau n° (VII .2):</b> Valeurs des vitesses de dégradation.	<b>36</b>
<b>Tableau n° (VII .3):</b> Paramètre de la croissance bactérienne et le rendement d'élimination du phénol.	<b>36</b>
<b>Tableau n° (VII.4) :</b> Conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch dans le cas de la variation des concentrations initiales.	<b>37</b>
<b>Tableau n° (VII.5):</b> Valeurs des vitesses moyennes de dégradation.	<b>39</b>
<b>Tableau n° (VII.6):</b> Conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch dans le cas de la variation de la taille des billes.	<b>42</b>
<b>Tableau n° (VII .7) :</b> Valeurs des vitesses moyennes de dégradation.	<b>43</b>
<b>Tableau n° (VII.8) :</b> Valeurs des taux de croissance des cellules relarguées.	<b>45</b>
<b>Tableau n° (VII.9):</b> Conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch dans le cas de recyclage des cellules.	<b>46</b>
<b>Tableau n° (VII .10):</b> Valeurs des vitesses moyennes et le rendement de dégradation.	<b>47</b>
<b>Tableau n° (VII .11):</b> Valeurs des vitesses moyennes de dégradation.	<b>49</b>

*Mes louanges à ALLAH le tout puissant qui m'a aidée à réaliser ce  
modeste travail*

## **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'ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE.*

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance et mes chaleureux remerciements à madame A.HELLAL, professeur et à Monsieur A. NAMANE, chargé de cours à L'ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE pour leur générosité, et la qualité de leur conseils et avis sur les travaux que j'ai mené, qui m'ont guidée et orientée tout au long de la réalisation de mon travail en prodiguant leurs conseils précieux et leurs encouragements.*

*Je tiens à remercier madame N. BELHANECHÉ, professeur à L'ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.*

*Mes remerciements sont adressés à :*

*Madame K. MOUSSAOUI professeur à L'ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE, Madame F. ZERROUK, chargée de cours à L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE, Madame Y. ZOGHLACHE, chargée de cours à L'ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE, pour l'honneur qu'elles m'ont fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements vont également à madame DJ. ANNOU chargée de cours à l'Université de Boumerdès, madame A.NADIR. Chef de service au laboratoire de l'unité EPBR à Regahia pour leur aide.*

*Ma reconnaissance va également à monsieur DJALAL, chef du service milieu de culture de l'I.P.A, pour m'avoir généreusement donné les filtres biologiques.*

*Je tiens à remercier aussi mesdemoiselles N. LARDJANE, D. ATEK, OUMESSAAD ALI, D.HANK, Z.BELKBIR, N. HACHEMI, Monsieur T. AHMED ZAID, pour leurs précieuses aides.*

*Un grand merci à l'ensemble des enseignants et étudiantes du laboratoire que j'ai pu côtoyer durant ces années passées au laboratoire pour leur bonne humeur et leurs compétences.*

*A toutes les personnes qui m'ont aidé à la réalisation de ce mémoire,*

*Merci*

# Sommaire

# Sommaire

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	II
Liste des abréviations.....	III
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Introduction générale.....	1

## **Chapitre I : Généralités sur le phénol.**

I-1-Définition du phénol .....	3
I-2-Principe de fabrication.....	3
I-3-Utilisations.....	3
I-4- Comportement dans l'environnement.....	4
I-5-La toxicité du phénol.....	4
I-5-1-Étude chez l'homme.....	4
I-5-2-Étude chez l'animal.....	5
I-6-Les procédés de traitement des rejets phénoliques.....	6
I-6-1-Les procédés physico-chimiques.....	7
I-6-2-Les procédés biologiques.....	7
I-6-3-Normes de rejet du phénol.....	7

## **Chapitre II : La biodégradation du phénol.**

II-1-La biodégradation du phénol.....	8
II-2-Utilisation des <i>Pseudomonas</i> dans la dégradation des composés phénoliques...9	
II-2-1-La souche sélectionnée : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
II-2-1-1-Mode de développement :	
II-2-1-2-Caractères bactériologiques.....	10
II-2-1-3-Isolement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11

## **Chapitre III : Technologie de cellules immobilisées.**

III-1-Définition de l'immobilisation.....	12
III-2-Applications.....	12

III-3-Choix du support.....	14
III-4-Immobilisation de cellules par inclusion.....	14
III-5-Les avantages et les inconvénients de la technique d'immobilisation.....	15
III-6-Analyse quantitative des cellules immobilisées.....	16
III-7-Application dans le domaine de l'environnement (Méthode de traitements biologiques).....	16

**Chapitre IV: Les alginates et leurs applications dans les matrices d'immobilisation.**

IV-1-Définition de l'alginate.....	18
IV-2- Fabrication des alginates.....	18
IV-3-Structure.....	18
IV-4-Propriétés de l'alginate.....	19
IV-5-Mécanisme de gélification.....	19
IV-6-Propriétés des billes d'alginate.....	20
IV-7-Utilisation des alginates dans les matrices d'immobilisation.....	21

**Chapitre V : Cinétique de croissance bactérienne et de biodégradation.**

V-1-Etude de la croissance bactérienne discontinue.....	22
V-2- Les paramètres de la croissance.....	23
V-3-Les principes de la cinétique microbienne de croissance.....	24
V-3-1-Le modèle de Monod.....	24
V-3-2-Modèle de Haldane.....	25
V-2- Les paramètres de la croissance.....	25
V-4-Détermination des constantes de croissance ( $\mu_{max}$ , $K_S$ , $K_i$ ).....	25
V-5-Détermination des constantes de biodégradation (V, R).....	26

**Chapitre VI : Matériels et méthodes.**

VI- Matériels et méthodes.....	27
VI-1-Matériels.....	27
VI-1-1-Matériel biologique.....	27
VI-1-2-Milieu de culture.....	27
VI-1-3-Produits utilisés.....	27
VI-2-La méthodologie.....	27



VI-2-1-Préparation de l'inoculum (suspension bactérienne).....	27
VI-2-2-Technique d'immobilisation des cellules (formation des billes).....	28
VI-3- Etude d'adsorption du phénol par les billes d'alginate de calcium.....	31
VI-4-Estimation des différents paramètres de la biodégradation.....	31
VI-4-1- Estimation des densités de biomasse.....	32
VI-4-2-Analyse du phénol.....	32

## **Chapitre VII: Résultats et discussions.**

VII-1-Cinétique d'adsorption du phénol par les billes d'alginate de Calcium.....	33
VII-2-Etude comparative de la biodégradation du phénol par des bactéries en suspension (Libres) et immobilisées.....	34
VII-3-Etude de la biodégradation du phénol par des cellules immobilisées.....	37
VII-3-2-Etude de l'effet de la taille des billes sur la biodégradation du phénol...42	
VII-3-3- Etude de l'effet de la réutilisation des billes (Recyclage).....	46
VIII-3-4- Etude de l'effet de l'adaptation des billes.....	49
Conclusions Générales .....	51
Annexes.	
Références bibliographiques.	

# Introduction Générale

# Introduction Générale

Au cours des dernières décennies, la pollution chimique de l'environnement n'a cessé d'augmenter avec la croissance de l'industrialisation et de l'urbanisation. De nombreux polluants risquent ainsi de s'accumuler dans le milieu naturel. Parmi les polluants organiques majeurs de l'environnement, le phénol et ses dérivés chlorés, largement utilisés dans une variété de procédés industriels tels que les raffineries de pétrole, les usines chimiques, les industries pharmaceutiques et industries des matières plastiques, sont des composés ubiquistes.

Ces polluants sont facilement absorbés par les animaux et les humains par la peau et les organes, principalement les poumons, le foie et les reins. Ils sont susceptibles d'engendrer des effets mutagènes vis-à-vis de la faune et de la flore. Par ailleurs, ils sont bien connus comme précurseurs de dioxine [1].

Ils ont été inscrits en 1976 dans la liste des polluants prioritaires, établie par l'agence pour la protection de l'environnement des Etats-Unis (Environmental Protection Agency, EPA).

La législation Algérienne a établi une concentration limite maximale des phénols de 0.5 mg/l pour les rejets industriels (décret exécutif N° 93-160 du 10 juillet 1993) [2].

Les traitements des eaux usées qui contiennent du phénol utilisent généralement des techniques physico-chimiques pouvant engendrer la formation de sous-produits toxiques et qui ne font que transférer la pollution d'un milieu vers un autre en la concentrant [3]. Les traitements biologiques d'élimination de ce type de polluants prennent de plus en plus de place surtout qu'ils ne sont pas coûteux, et ils permettent une minéralisation totale des composés phénoliques.

Actuellement il est bien admis que ces méthodes biologiques de dépollution représentent une alternative efficace à des coûts réduits pour l'élimination des composés organiques toxiques [4].

Le phénol et ses dérivés ont des effets toxiques qui limitent le traitement biologique parce qu'ils peuvent être inhibiteurs de croissance même des espèces qui

ont les possibilités métaboliques de les utiliser comme substrat pour la croissance [4,5].

Les bactéries sont des êtres vivants microscopiques qui se trouvent dans tout l'environnement (le sol, l'air et l'eau). Leur forte activité métabolique et leur multiplication rapide, leur confèrent de l'importance dans le domaine de l'épuration des eaux résiduaires [4]. Les bactéries les plus couramment utilisées sont habituellement aérobies, car elles sont plus aptes à dégrader les composés toxiques ainsi qu'à minéraliser complètement la matière organique.

L'utilisation des cellules libres dans les traitements biologiques du phénol a posé certains problèmes tels que le maintien de la concentration cellulaire, l'élimination des boues cellulaires, le tassement et la sédimentation des boues, le recyclage des boues...etc. D'où l'intérêt de mettre au point des procédés biologiques évitant ces inconvénients. Les techniques d'immobilisation des bactéries ont montré une grande efficacité, comparativement à la technique des cellules libres, évitant ainsi l'accumulation des boues tout en offrant la possibilité de réutiliser les bactéries fixées [6].

Le présent travail consiste en l'étude de l'élimination du phénol en milieu aqueux par une biodégradation par des bactéries immobilisées dans l'alginate de calcium en mode batch. Pour cela, les cellules bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* seront immobilisées par inclusion dans l'alginate de calcium formant ainsi des billes.

Des suivis de cinétique de dégradation du phénol seront menés, en faisant varier certains paramètres comme la concentration initiale du substrat et la taille des billes. Des essais de réutilisation des bactéries encapsulées seront étudiés en vue de tester la viabilité de la bactérie après recyclage.

# CHAPITRE: I

"Généralités sur les rejets phénolés"

## I Généralités sur les rejets phénolés.

### I-1-Définition du phénol :

Le phénol, découvert en 1839, est un alcool aromatique de formule brute  $C_6H_6O$ . Il est libéré dans l'environnement comme sous-produit par divers secteurs industriels.

A 20 °C, le phénol pur est un solide qui se présente sous forme d'une masse, cristalline ou d'aiguilles incolores, hygroscopique, et d'odeur particulière. Son point de fusion est de l'ordre de 41°C.

Le phénol est très soluble dans l'eau (83,5 g/l à 20 °C); il est également soluble dans les solvants usuels (l'éthanol et l'oxyde d'éthylène); il s'évapore à une température de 182°C [7].

### I-2-Principe de fabrication :

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

**1-La méthode de Hock** : qui comporte trois phases :

Alkylation du benzène + propène  $\longrightarrow$  l'isopropylbenzène (cumène).

Cumène  $\xrightarrow{\text{Oxydation}}$  tert-hydroperoxyde  $\xrightarrow{\text{Séparation}}$  phénol + acétone.

**2-La méthode "Dow"** : qui consiste à oxyder le toluène pour former de l'oxyde benzoïque puis à procéder à une décarboxylation oxydante permettant d'obtenir du phénol [7].

En outre, on peut obtenir du phénol à partir de fractions de distillation de goudron de houille [8].

### I-3-Utilisations :

Le phénol est utilisé principalement comme intermédiaire dans la synthèse organique. Il constitue la matière première pour la production des résines phénoliques, il est également utilisé dans différentes industries [9,11] :

- Raffinage de pétrole,
- Industries des matières plastiques (fabrication du nylon..);
- Industries des fibres synthétiques.
- Industrie pharmaceutique (produits de beauté et préparations médicales).
- Fabrication de détergents, pesticides, colorants, additifs pour huiles etc....

**I-4- Comportement dans l'environnement :**

**-Milieu aquatique :** Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer. Au dessus de 68,4°C, il devient complètement miscible à l'eau [12].

**-Atmosphère :** Le phénol s'oxyde à l'air, et son processus d'oxydation est accéléré par la lumière ou par des impuretés à effet catalytique.

**-Sols :** Dans le sol, le phénol subit une dégradation microbienne aérobie ou anaérobie de sorte que l'effet d'accumulation reste limité. D'après les différentes valeurs trouvées du coefficient de sorption dans le sol (Koc), le phénol serait mobile à moyennement mobile dans les sols [13].

**-Dégradation, produits de décomposition :** La biodégradation des phénols simples est en général très bonne, de sorte qu'une accumulation dans la flore ou la faune est peu probable.

En revanche, la biodégradabilité des phénols synthétiques est plus faible, car nombre d'entre eux ont une action bactéricide.

**-Chaîne alimentaire:** L'accumulation dans les produits alimentaires est limitée. Les personnes à risques sont les fumeurs, car la fumée de cigarette contient des phénols. La présence de phénol dans la nappe phréatique a pour effet de polluer l'eau potable et ceci par sa combinaison avec des teneurs même extrêmement faibles en chlore dans l'eau qui implique l'apparition des chlorophénols qui provoquent des odeurs et des goûts désagréables. Pour ce qui est du phénol pur, une réduction de la teneur à 1 µg/l est suffisante pour être à l'abri des goûts. Quant au chlorophénol on peut déceler des traces de goût avec une teneur de 0,01 à 0,1 µg/l. Le seuil de détection organoleptique des chlorophénols étant largement inférieur aux valeurs dangereuses pour la santé, l'élimination de ces substances se fait jusqu'à les rendre indétectables au goût [14].

**I-5-La toxicité du phénol.**

Le phénol est un produit caustique dangereux, il exerce une action générale sur des différents organismes vivants (hommes et animaux).

**I-5-1-Étude chez l'homme :**

Le phénol est rapidement absorbé par toutes les voies d'exposition. Le foie, les poumons et la muqueuse gastro-intestinale sont les principaux sites de métabolisation du phénol. Ceux-ci dépendent de la voie d'exposition. Le phénol est essentiellement éliminé par voie urinaire.

**A-Toxicité aiguë :***\*Par voie cutanée :*

La gravité de l'intoxication cutanée est fonction du temps de contact, de l'étendue de la zone exposée, de la concentration et de la successibilité individuelle au sujet. Les symptômes apparaissent très rapidement: maux de tête, faiblesse musculaire, trouble de la vision, respiration rapide et irrégulière.

Les effets locaux rapportés sont des érythèmes ou des dépigmentations cutanées et, dans les cas les plus sévères, des lésions corrosions pouvant même atteindre le stade de nécrose [11,15].

*\*Par l'ingestion accidentelle :*

En plus de l'effet toxique sur le tube digestif, on observe des troubles neurologiques, cardio-vasculaires et une cytolysé hépatique [15].

**B- Toxicité chronique :**

Plusieurs études réalisées en milieu professionnel rapportent des cas d'intoxication chronique qui se caractérisent par des troubles digestifs (vomissements, difficulté à avaler, ptyalisme, diarrhées), des troubles nerveux (vertiges, maux de tête) et des troubles cutanés (érythèmes, eczémas). Ces symptômes sont connus sous le nom de marasme phénique. Dans le cas sévère, on note une atteinte hépatique et rénale [11,15].

**I-5-2-Étude chez l'animal :**

Le phénol est toxique (réduit l'activité enzymatique) ou mortel pour les poissons même à des concentrations très basses, par exemple, 5 à 25 mg [16,17].

Parmi les effets sensibles observés chez les animaux de laboratoire, il y a les transformations histo-pathologiques du foie et du thymus, la réduction du nombre de certaines cellules du sang, la suppression de la réaction immunitaire et des effets sur le système nerveux. Aucune DL<sub>50</sub> (dose létale) n'a été publiée [11].



**I-6-Les procédés de traitement des rejets phénoliques :**

Les procédés de traitement des rejets d'eaux phénoliques se repartissent en deux grandes catégories.

La première catégorie vise la récupération des phénols par des méthodes d'extraction et d'évaporation. En effet, si le volume d'eau rejeté par jour est élevé et si les conditions techniques sont présentes, la récupération du phénol s'avère être la meilleure solution.

Par contre, la deuxième catégorie permet leur élimination. Ainsi, pour les petites exploitations où le volume n'atteint que quelques mètres cubes par jour, la récupération n'est pas rentable. L'élimination des composés phénoliques peut se faire par le biais de procédés physico-chimiques ou biologiques. Cependant les techniques physico-chimiques s'avèrent assez coûteuses comparées aux méthodes biologiques.

**I-6-1-Les procédés physico-chimiques :***A- Traitement par l'ozone:*

L'ozone présente une action directe sous sa forme moléculaire qui oxyde, par cyclo-addition. La décomposition de l'ozone entraîne la formation de radicaux libres qui lui confèrent une action oxydante très puissante [18].

Plusieurs auteurs ont montré que l'ozone peut induire l'oxydation des composés phénoliques et les produits d'ozonation de ces derniers sont plus biodégradables que les composés à l'état initial [19,20].

*B-Traitement par les radiations U.V :*

Une partie de l'action globale de ce traitement consiste en l'activation du composé oxydé au moyen des photons introduits dans le milieu. Gurol et Vatisstas [21], ont montré que les rayons U.V, donnent à l'eau, en présence d'oxygène, des réactions radicalaires en chaîne produisant des radicaux tels que  $\text{OH}^\bullet$  et  $\text{O}_2\text{H}^\bullet$  (hydroxyde et hydro peroxyde).

*C-Traitement par l'ozone et U.V :*

Il a été observé par plusieurs auteurs que l'association ozone-UV est plus performante pour l'élimination des composés phénoliques que l'ozone seul.

*D-Traitement par le peroxyde d'hydrogène :*

Le peroxyde d'hydrogène est un composé à fort pouvoir oxydant; il est utilisé pour traiter différents types d'eaux résiduaires industrielles et urbaines. Son emploi est particulièrement intéressant, car il agit comme décolorant, désodorisant et désinfectant [2].

*E-Traitement par adsorption sur charbon actif :*

Suivant sa nature, sa structure ainsi que sa surface spécifique, le charbon actif possède une bonne capacité d'adsorber les composés organiques ou inorganiques. Son utilisation en traitement des eaux, est large du fait que sa fabrication ne coûte pas chère et il peut être régénéré facilement.

**I-6-2-Les procédés biologiques :**

La nocivité d'un produit toxique pour l'environnement dépend largement de sa durée de vie. La plupart des polluants sont instables: l'action combinée des micro-organismes et de facteurs physico-chimiques provoquent la décomposition de ces produits en substances non polluantes.

Plusieurs microorganismes appartenant à diverses espèces ont prouvé leur capacité à utiliser le phénol comme source de carbone et d'énergie pour le maintien de leur métabolisme de base et le transformer en substance non toxique suite à un ensemble de réactions catalysées par des enzymes.

**I-6-3-Normes de rejet du phénol :**

Les normes américaines accordent une concentration limite des composés phénoliques dans l'eau de  $1\mu\text{g} / \text{l}$  [22].

Tandis que la réglementation Française prévoit que les phénols ne doivent pas être détectables organoleptiquement après ajout de  $2 \text{ mg/l}$  de chlore [23].

# CHAPITRE:II

"La biodégradation du phéno!"

## II

## La biodégradation du phénol.

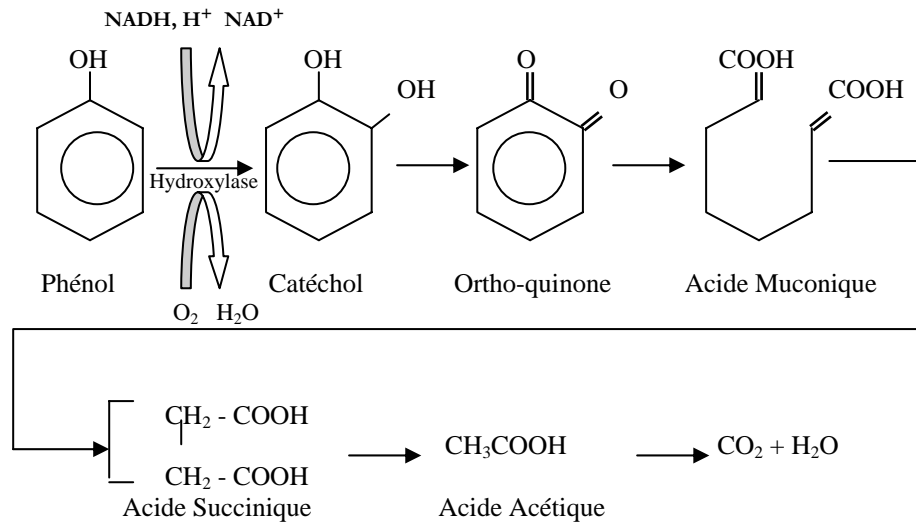
## II-1-La biodégradation du phénol.

Plusieurs micro-organismes appartenant à diverses espèces ont montré leur capacité à utiliser le phénol comme source de carbone et d'énergie, par transformation en substances non toxiques suite à un ensemble de réactions catalysées par des enzymes de nature inductible. Il s'agit le plus souvent d'une mono-oxygénase fonctionnant comme hydroxylase. Cette enzyme fonctionne avec l'oxygène de l'air et une source d'électrons (ici NADH). L'un des atomes d'oxygène  $O_2$  est incorporé dans le substrat, l'autre se trouve dans une molécule d'eau pour donner le 1,2 dihydroxy-benzène ou le catéchol, celui-ci est éventuellement métabolisé en succinate plus l'acétate en  $(C_4+C_2)$  [24].

La biodégradation des composés phénoliques est maîtrisée dans les épurations biologiques aérobies, à condition qu'il n'y ait pas coprésence d'agents inhibiteurs tels que les  $S^{2-}$ , à de trop fortes concentrations [25].

Le processus aérobie peut se poursuivre jusqu'à minéralisation complète du substrat biodégradable et conduit alors à des métabolites constituants de la matière organique (C, H, N, P, S), dioxyde de carbone ( $CO_2$ ), eau ( $H_2O$ ), eau carbonatée ( $CO_3^{2-}$ ), bicarbonates ( $HCO_3^-$ ), nitrates ( $NO_3^-$ ), phosphates ( $PO_4^{3-}$ ), sulfates figure n°(II.1) [26 , 27] .

Les noyaux aromatiques et les composés cycliques sont d'une façon générale accessibles aux attaques bactériennes : *Pseudomonas*, *Vibrions*, *Achromobacterae* et *Mycobacterium*, qui constituent des artisans fréquents de cette dégradation. Le phénol est oxydé également et conduit au catéchol, ce produit est lui-même repris et transformé en acide muconique par des *Pseudomonas* et des *Vibrions*. Notamment *P. aeruginosa* est capable d'oxyder rapidement le catéchol [28].



**Figure n° (II.1) : Mécanisme de la biodégradation aérobie des phénols [25].**

La biodégradation du phénol dans des conditions anaérobies a été étudiée par plusieurs auteurs. Cependant le procédé aérobie a été considéré le plus efficace avec sa facilité d'application [29,30]. De plus, les méthodes de culture anaérobies nécessitent une longue phase d'adaptation contrairement aux conditions aérobie [31].

## II-2-Utilisation de *Pseudomonas* dans la dégradation des composés phénoliques :

- Famille des *Pseudomonaceae* qui comprend plus de 140 espèces (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepaciae*, *Pseudomonas putida*...). Bacille à gram négatif, aérobie strict, mobile, et incapable de fermenter les sucres, largement présent dans l'environnement (eau, sol, végétaux).
- On les rencontre dans l'environnement hospitalier à des fréquences variables selon les lieux. Ils sont souvent la cause dans les petites épidémies d'infection nosocomiales [32].
- Certaines espèces ont un pouvoir pathogène ou de caractères particuliers. Les *Pseudomonas* sont réputées être assez résistantes aux antibiotiques selon les espèces.

### II-2-1-La souche sélectionnée : *Pseudomonas aeruginosa*.

*Bactrium aeruginosium* décrit par Shroter en 1872 et Migula en 1900 cités par Todar [34], est plus communément appelé le bacille pyocyanique. Cette bactérie vit à l'état saprophytique dans l'eau (eau douce ou eau de mer), le sol humide, et sur les végétaux.

*Pseudomonas aeruginosa*, bacille court à gram négatif mesurant 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$ , est un biotype d'une souche pathogène opportuniste de l'homme [33].

Elle se développe facilement sur un milieu ordinaire à pH optimal 6.6 à 7 et à une température variant de 10 à 40°C [34].

### II-2-1-1-Mode de développement :

*Pseudomonas aeruginosa* dans la nature peut se développer [35] soit :

- \* dans un biofilm attaché à une certaine surface ou substrat.
- \* en une forme planctonique, comme cellule libre nuageuse activement mobile au moyen de flagelles.
- \* en commensale dans le tube digestif de l'homme.
- \* au sein des organismes immunodéprimés dans les poumons des personnes.

### II-2-1-2-Caractères bactériologiques :

*Pseudomonas aeruginosa* n'est pas particulièrement distinctive comme un Pseudomonad. Il a quelques caractéristiques qui sont remarquables, et qui ont une relation avec ses pathogénèses [33, 36,37].

- bacille gram négatif ;
- très mobile grâce à des flagelles polaires (déplacement en ligne droite) ;
- aérobie strict ;
- réduction des nitrates en nitrites ;
- résiste peu à la dessiccation ;
- les facteurs de croissance organiques ne sont pas exigés ;
- peut utiliser plus de 30 composés organiques pour la croissance; elle peut se développer dans l'eau distillée.
- est naturellement résistante à beaucoup d'antibiotiques

**Tableau n° (II.1) : Facteur de diagnostic de *Pseudomonas aeruginosa* [29].**

Colonies bleu+vert dans l'agar chaud	Fluorescence sous une lampe UV	Arôme fruité
Refllet métallique des colonies	Pyocyanine (pigment bleu) non fluorescent.	Pyoverdine (pigment vert) Fluorescent.
Oxydase (+)	Lactose (-)	/

**II-2-1-3-Isolement de *Pseudomonas aeruginosa* :**

Cette bactérie en général peut être isolée du sol et de l'eau, des surfaces des plantes et des animaux. Il existe quelques milieux spécifiques pour certains genres, en particulier pour *Pseudomonas*, il s'agit dans ce cas de milieux dérivés du milieu King A. La gélose CFC (ou milieu de Mead et Adams), est un milieu sélectif pour les *Pseudomonas* en général, pigmentés ou non [36].

# CHAPITRE:III

"Technologie des cellules immobilisées"



### III

## Technologie des cellules immobilisées.

### III-1-Définition de l'immobilisation :

L'immobilisation des micro-organismes est une technique qui permet de les protéger et de leur conférer une grande viabilité. Cette technique est intéressante pour la conservation des souches mais aussi pour la mise en œuvre de procédés continus de bioconversion et de traitement biologique des effluents [38,39].

Les techniques d'immobilisation de cellules imitent ce qui se passe dans la nature, où les cellules des micro-organismes croissent presque toujours dans un biofilm.

Le biofilm est l'assemblage des cellules et des polymères attachés. C'est une surface d'accumulation qui n'est pas uniforme dans le temps ou dans l'espace, de structure adsorbante et poreuse. De cet assemblage résulte un dépôt constitué de matériaux adsorbés et piégés telles que des particules inorganiques dans une matrice biotique [40].

Le rôle écologique et économique du biofilm est donc considérable aussi bien par ses effets positifs (épuration), que par ses effets négatifs (biocorrosion, lésions des tissus ....)[41, 42].

### III-2-Applications :

La première application des microcapsules a été proposée par Chang en 1964. La méthode est basée sur la polymérisation de la diamine en solution avec un acide organique dans une émulsion [43].

L'application de la micro encapsulation dans la biotechnologie n'est plus à démontrer, pour ne citer que le domaine médical (organe artificiel), pharmaceutique (vaccin), et cosmétique. Cependant, elle reste seulement bénéfique dans le domaine agronomique, sciences de l'alimentation (la fermentation alimentaire) et le biotraitement environnemental [44].



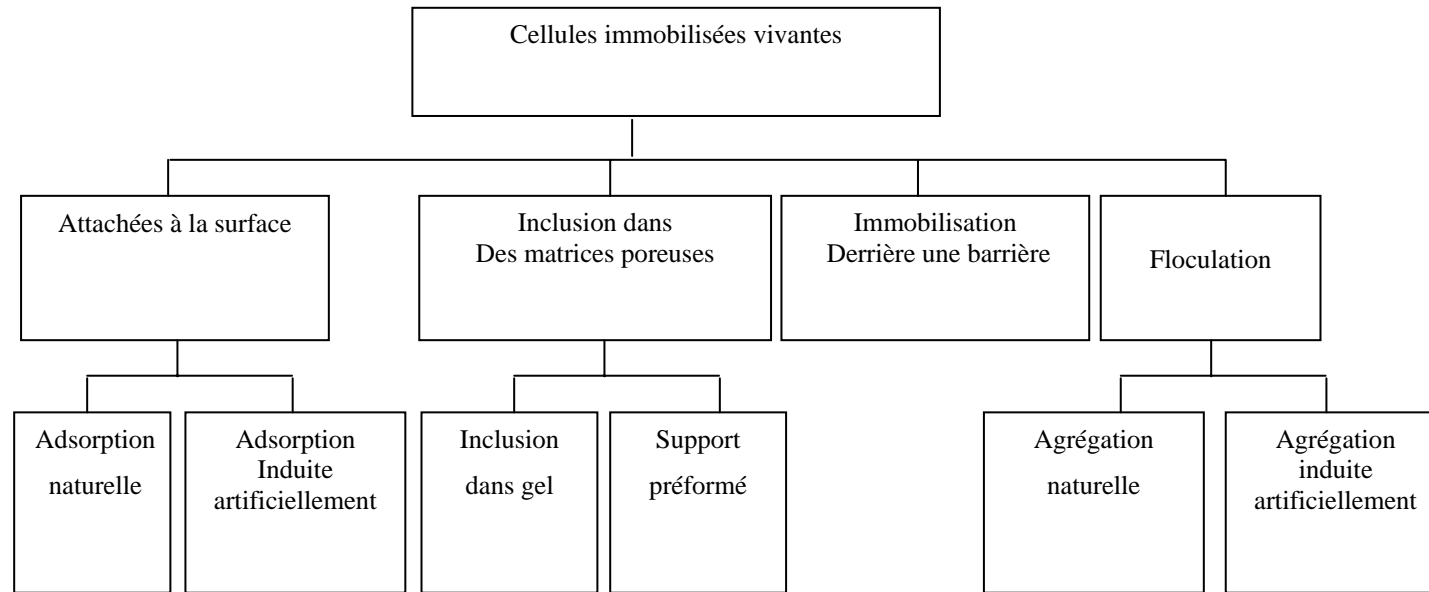


Figure n° (III.1): Classification des systèmes d'immobilisation [45]



**III-3-Choix du support :**

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer le meilleur support pour l'adhésion des micro-organismes. Bien que le choix semble directement lié à la nature de l'effluent à traiter [46], il est nécessaire d'utiliser un support ne présentant aucune toxicité ; le microorganisme pourra alors être inclus dans un polymère naturel tel que les alginates.

Le support doit montrer des propriétés physiques et chimiques favorisant l'immobilisation et doit être choisi selon les propriétés cellulaires qui dépendent de l'adhésion, de l'alimentation en substrat nutritif et de l'activité cellulaire [47,48].

**III-4-Immobilisation de cellules par inclusion:**

L'inclusion de cellules se fait dans une matrice poreuse qui est un gel de polymère, L'ensemble forme ainsi un biocatalyseur. Ce biocatalyseur est souvent obtenu par dispersion d'une solution de polysaccharide et/ou les cellules, ensuite par solidification (gélification) de cette solution, la dispersion peut être réalisée par extrusion ou par émulsification [49-51].

Parmi les polymères d'inclusion possibles, on peut citer les alginates, polysaccharides extraits des algues brunes qui sont utilisés pour leurs propriétés épaississantes et gélifiantes dans divers domaines (agro-alimentaire, textile, papeterie et pharmaceutique) [52,53].

La gélification par diffusion des alginates dans des bains de sels de calcium est utilisée industriellement pour la formation de petites structures comme des capsules, membranes et billes. Les billes sont notamment utilisées pour l'immobilisation de cellules et d'enzymes [54].

**Tableau n° (III. 1): Systèmes des billes pour la culture de cellules [55]**

<i>Systèmes de billes</i>	<i>Types d'immobilisation</i>	<i>Références</i>
Agarose	Immobilisation dans la matrice	Nilsson et Coll. (1983)
Alginate	Immobilisation dans la matrice	Familletti et Fredericks (1988)
Micro supports diamètre : 130-250µm	Immobilisation sur la surface	Miller et Coll. (1989)

**III-5-Les avantages et les inconvénients de la technique d'immobilisation :**

La technologie des cellules immobilisées, comparativement aux systèmes à cellules libres comporte de nombreux avantages, mais aussi des inconvénients.

**III-5-1-Les avantages :**

\*Le procédé d'immobilisation des cellules dans un réacteur permet de les réutiliser aussi longtemps qu'elles conservent leur activité [49] ;

\*L'immobilisation de cellules permet le maintien d'une grande densité de biomasse qui peut atteindre  $10^8$  cellules/ml [50];

\*De plus une augmentation de la productivité a été systématiquement observée dans les systèmes à haute densité cellulaire [56];

\*L'immobilisation de cellules facilite la mise en œuvre en continu de procédés de fermentations ou de cultures cellulaires [57].

**III-5-2-Les inconvénients:**

Quelques désavantages peuvent limiter leur utilisation :

\*Un premier problème crucial pour de nombreux procédés est celui de la stérilité des réacteurs, à cellules libres ou immobilisées, pendant des périodes prolongées de fonctionnement.

\*Le comptage direct des cellules vivantes et mortes devient impossible provoquant une culture hétérogène de populations de cellules, caractérisées par différents états physiologiques [56];

\*L'utilisation de supports solides pour l'immobilisation de cellules introduit de nouvelles résistances dans le transfert des nutriments et des produits. Ce problème est particulièrement aigu avec les procédés aérobies pour lesquels la diffusion de l'oxygène devient rapidement limitante avec pour conséquence des chutes parfois considérables de productivité et de rendement [58];

\*Les cellules peuvent se séparer du support (le phénomène de relargage) ;

\*Stabilité mécanique et chimique de certains supports peut être insuffisante (cisaillement, dissolution, décomposition par le produit) ;

\*Limitation de la diffusion peut restreindre la bioconversion ;

\*Cette technique peut être trop chère pour une utilisation à grande échelle, nécessite d'entreposer les cellules ou de prévenir leur mortalité lors des périodes d'arrêt de production [59].

**III-6-Analyse quantitative des cellules immobilisées:**

La quantité de biomasse est un paramètre important pour l'analyse et le contrôle d'un système de fermentation. La quantification précise de la biomasse immobilisée peut être difficile surtout si elle est immobilisée sur des supports solides et poreux [60].

Si les cellules sont incluses dans des billes de gel, la matrice du support est communément détruite ou dissoute et les cellules vivantes sont ensuite comptées.

La spectroscopie diélectrique et la résonance magnétique nucléaire sont deux méthodes non destructives pouvant servir à doser des cellules microbiennes immobilisées. Un autre moyen de quantifier les cellules immobilisées est le dosage d'un de leurs composants.

**III-7-Application dans le domaine de l'environnement (Méthode de traitements biologiques) :**

\* Alhakawati et Coll. [61], ont utilisé la mousse Hypol pour immobiliser la poudre de charbon actif et les micro-organismes viables dégradant le phénol en aérobiose. L'immobilisation est achevée en mixant préalablement la poudre de charbon actif (PAC) et les micro-organismes avec le liquide *Hypol* pour former une matrice. La matrice est ensuite coupée en cubes, la concentration d'effluent à 500 mg/l est réduite à 20 mg/l.

\*Amsden et Coll. [62], ont fait dégrader du phénol(2 g/l) par *Pseudomonas putida* ATCC (11172) immobilisées dans un polymère de synthèse polyéthylène-co-vinyl acétate EVA sous forme de billes de 3,4mm.

\*Dans une étude récente Prieto [63] décrit l'utilisation des cellules de *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilisées sur des billes de la céramique biolite pour dégrader le phénol.

\*Une autre étude dans la quelle Zeroual et Coll. [64], ont étudié la dépollution des eaux mercurielle en bioréacteur à lit fluidisé, en utilisant une souche bactérienne *Klebsiella pneumoniae* immobilisée dans différents supports. L'élimination totale de la charge polluante a été observée dans le cas de l'utilisation des billes d'alginate.

\*La dégradation du phénol a été recherchée par Bettermann et Rehm [65], qui ont fait une étude comparative par l'immobilisation de *Pseudomonas putida* dans l'alginate et dans le polyacrylamide hydrazide (PAAH) séparément. Il a été démontré que le PAAH était plus efficace que l'alginate avec respect de l'activité de dégradation du phénol.

\*Heitkamp et Coll. [66], ont étudié l'immobilisation d'une population bactérienne mixte, en vue de traiter du charbon de terre contenant des composés phénoliques par deux support différents :

l'un est un support de cellulose et l'autre la combinaison de tri acétate de cellulose avec l'alginate de calcium comme un bisupport. Le premier procédé est préférable pour sa simplicité de préparation, avec une meilleure performance opérationnelle.

\*A l'aide de bactéries méthanogènes immobilisées dans du gel d'agar, de polyacrylamide ou de collagène, il est possible de produire du méthane à partir d'eaux usées. La production de gaz par cette technique peut atteindre 450 mmol /h.g de matière sèche [47];

\*La dégradation du phénol (100-2800 mg/l) par *Pseudomonas putida* CCRC14365 dans un réacteur à fibres creuses de polypropylène a été étudiée par Chung et Coll. [67]. La souche bactérienne dégrade 2000 mg/l de phénol en 73 h.



# CHAPITRE:IV

"Application des alginates  
dans les matrices d'immobilisation"

## IV

**Application des alginates dans les matrices d'immobilisation.****IV-1-Définition de l'alginate :**

L'alginate ou l'acide alginique est un polysaccharide de la paroi cellulaire des algues brunes ou *phaeophyceae*. Il a été découvert pour la première fois par Stanford (1881) cité par Moll et Moll [68], grâce à une extraction alcaline des algues brunes *Laminaria digitata* : procédé utilisé pour l'extraction de l'iode.

L'acide alginique est absent de tout autre tissu végétal sauf chez certaines bactéries (comme *Azotobacter*), où il se retrouve acétylé [69].

**IV-2- Fabrication des alginates :**

La fabrication des alginates dépend :

1-Des alginates des métaux alcalins qui sont solubles dans l'eau.

2-De l'acide alginique et son dérivé calcique qui sont tous les deux insolubles dans l'eau.

De nombreuses procédures de purification des alginates sont décrites dans la littérature; celles-ci font appel à la filtration, la précipitation et l'extraction [68,70].

Après les opérations de purification, il s'ensuit l'étape où les algues sont mises à macérer en présence d'un acide minéral dilué de manière à réaliser un échange d'ions entre le calcium lié à l'alginate et l'hydrogène de l'acide.

L'acide alginique humide est ensuite malaxé avec la base ou le carbonate alcalin correspondant  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et le propylène glycol.

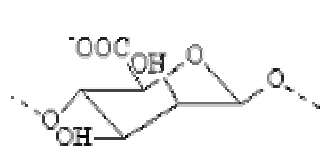
**IV-3-Structure :**

L'alginate de sodium est un sel de l'acide alginique.

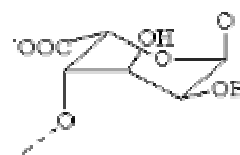
Cet acide naturel est constitué d'un enchaînement linéaire de deux acides :

1-L'acide  $\beta$  1-4 D mannuronique (M).

2-L'acide  $\alpha$ 1-4 L glucuronique (G).



(1-4)  $\alpha$ -L glucuronique



(1 - 4)  $\beta$ -D mannuronique

**Figure n° (IV.1): Acide glucuronique (G) et mannuronique [68].**

Trois types de séquences peuvent être observées dans une molécule d'alginate : des séquences G-G, M-M et/ou M-G. La proportion et la distribution de ces monomères déterminent en grande partie les propriétés physico-chimiques de l'alginate.

#### IV-4-Propriétés de l'alginate :

##### ❖ Solubilité :

L'alginate de sodium  $(C_6H_7NaO_6)_n$  ou bien E401 se présente sous la forme d'une poudre jaunâtre pâle inodore et insipide, lentement soluble dans l'eau en formant une solution visqueuse et colloïdale, pratiquement insoluble dans l'alcool et dans l'éther.

L'acide alginique pur est insoluble dans l'eau, la solubilité ou non dans l'eau dépend du type de sels métalliques qui lui sont associés, donc le choix d'un bon sel de calcium est lié à un phénomène de gélification par diffusion [71].

##### ❖ Rapport M/G :

La qualité de l'alginate est appréciée par le rapport M/G. Ce rapport est fonction de l'espèce, de la variation saisonnière, de la partie et la portion de l'algue brune en étude.

Le rapport M/G des monomères se situe entre 0,25 et 2,25 selon l'espèce. L'espèce *Lamiara hyperborea* a une valeur inférieure à 0,5 [72,73].

#### IV-5-Mécanisme de gélification :

L'apport d'ions  $Ca^{2+}$  provoque l'alignement des chaînes d'alginate puis un apport plus important qui provoque un écoulement des chaînes en « *fermeture éclair* ». La structure spatiale globale a un aspect de « *boîte à œufs* ». On peut comparer ceci à une colle intermoléculaire joignant les polymères d'alginate les uns aux autres, ce qui conduit à un enchevêtrement de la solution [74].

Après enchevêtrement, les molécules d'eau sont physiquement emprisonnées par la matrice d'alginate ou le réseau, mais restent libres de migrer.

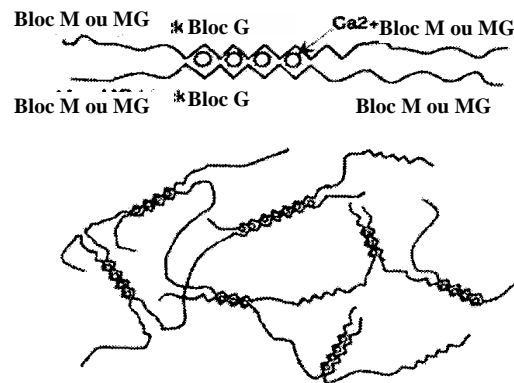


Figure n° (IV.2): Assemblage en « boîte à œufs » [68].

#### IV-6-Propriétés des billes d'alginate :

Les billes d'alginate ont des propriétés déterminées principalement par :

- La nature de l'alginate : pour former le gel, l'alginate doit contenir un nombre important de blocs (G). Les blocs (G) sont longs et rigides, ils formeront des gels cassants possédant une grande porosité et une bonne stabilité à la température en présence d'ions  $\text{Na}^+$ , qui sont les caractéristiques souhaitées pour la constitution d'une matrice d'immobilisation [54]. Tandis que l'alginate riche en bloc (M) forme des gels plus élastiques et plus mous. Les blocs (M) sont utilisés quand leur dissolution est nécessaire à un moment du processus, en particulier si la récupération des cellules est prévue [75];
- La concentration de l'alginate en solution : l'accroissement de la concentration en alginate entraîne une augmentation de la rigidité de la matrice mais, la diffusion des substrats et des produits dans la matrice est de ce fait diminuée [55];
- Les propriétés diffusionnelles dans les billes d'un élément de taille connue dépendent de la composition, des conditions de fabrication, du pH et de la température [76,77];
- Les billes formées avec de tels alginates sont aussi résistantes à des variations de leur environnement, supportant particulièrement la dessiccation [75].

**IV-7-Utilisation des alginates dans les matrices d'immobilisation :**

Les alginates possèdent plusieurs avantages:

\*Tout d'abord, leur rigidité mécanique, leur stabilité chimique, et leur porosité, trois propriétés dont l'étude est indispensable et de ce fait permet de conserver une excellente viabilité aux cellules microbiennes et d'être facilement redissous pour la récupération de cellules [75,78,79] ;

\*Il est connu que l'utilisation de l'alginate comme matrice d'encapsulation offre une meilleure stabilité de l'activité bactérienne; cette stabilité serait dûe aux conditions douces de polymérisation de ce gel [80].

\* les billes de gel sont en général préférées aux films à cause de leur géométrie sphérique qui augmente la surface de contact [49];

\*Les études menées par Urbina et Dussán [81] sur l'évaluation d'une matrice pour l'immobilisation de *Pseudomonas spp* dans la biorémediation du phénol, avaient montré que le temps de dégradation du phénol était de l'ordre de 23 jours en milieu sans matrice ,15 jours dans la matrice de polyuréthane et 7 jours dans les matrices d'alginates avec une même concentration initiale de la souche dans chaque matrice.

# CHAPITRE :V

"Cinétique de croissance  
bactérienne et de biodégradation"

**SV- Croissance bactérienne discontinue :****V-1-Etude de la croissance :**

La croissance d'une biomasse, placée dans des conditions idéales de culture peut se quantifier par l'expression suivante :

$$N_1 = N_0 2^n \dots (V.1)$$

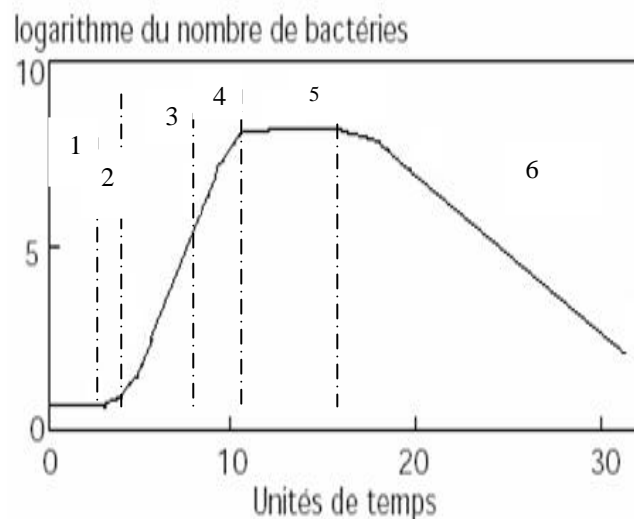
Avec  $N_0$  = nombre de bactéries au temps égal 0.

$N_1$  = Nombre de bactéries au temps t.

n = Nombre de divisions.

La croissance discontinue peut se représenter par une courbe spécifique. On distingue six phases spécifiques. La représentation est la suivante :

- 1-Latence
- 2-Accélération.
- 3-Exponentielle.
- 4-Ralentissement.
- 5-Stationnaire.
- 6-Déclin.



**Figure n° (V.1): Phases de la croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé**  
(Évolution du logarithme de la concentration cellulaire [18].

Les étapes les plus représentatives sont au nombre de quatre (tableau n° V.1).

**Tableau n° (V.1): Description des étapes de la croissance discontinue [18,35].**

Phases	Interprétation
Phase de latence	La vitesse spécifique de croissance est nulle. Il y a adaptation des cellules au milieu avec synthèse d'enzymes
Phase Exponentielle	Phase où toutes les cellules se trouvent dans leur état physiologique maximal et peuvent se multiplier sans entraves. La vitesse de reproduction atteint son maximum et reste constante pendant toute cette phase.
Phase Stationnaire	Le nombre de bactéries vivantes reste constant. Cette phase est attribuée à l'épuisement du substrat, l'accumulation de déchets toxiques ou l'évolution défavorable des conditions physico-chimiques comme le pH
Phase de déclin	La biomasse est dans la phase d'autolyse. Le nombre de bactéries chute.

**V-2- Les paramètres de la croissance :**

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

**\*Le temps de génération :**

Il correspond à l'intervalle de temps compris entre deux divisions successives, c'est le temps nécessaire au doublement de la population microbienne.

$$G = t/n \dots\dots\dots (V.2)$$

Où :

t : temps ; n : nombre de divisions.

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

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

$$X = 2^n X_0 \dots\dots\dots (V.3)$$

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

n: Nombre de générations.



La relation liant X et t est :

$$dX / dt = \mu X \quad \frac{dX}{X} \mu(t - t_0) \dots\dots\dots (V.4)$$

$\mu$  : Taux de croissance des cellules (h<sup>-1</sup>).

Comme :  $X = 2^{\mu t} X_0$ .

D'où :  $n = \mu t$

$$\ln X = \mu t \ln 2 + \ln X_0 \dots\dots\dots (V.5)$$

Selon les courbes de croissance, on peut déduire le taux de croissance des cellules pendant la phase exponentielle pour chaque concentration initiale en phénol, en traçant ln X en fonction du temps selon l'équation (V.5), de laquelle on déduit la valeur de  $\mu$ .

Soit  $\mu$  = la pente de la droite /ln2.

**V-3-Les principes de la cinétique microbienne de croissance :**

La cinétique microbienne de croissance est principalement caractérisée en phase exponentielle au cours de laquelle le taux de croissance est maximal et constant ( $\mu_{max}$ ).

**V-3-1-Le modèle de Monod :** basé sur un certain nombre d'hypothèses qui permettent de prendre en compte un minimum de facteurs affectant la cinétique de biodégradation. Les facteurs concernés sont la concentration en substrat et le nombre de micro-organismes adaptés à sa biodégradation. Monod proposa d'exprimer le taux de croissance  $\mu$  en fonction de la concentration du substrat limitant S par la relation empirique suivante [82] :

Le taux de croissance  $\mu$  d'une population de micro-organismes est relié à la concentration en substrat S :

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S} \dots\dots\dots (V.6)$$

Avec:

$\mu_{max}$ : Taux de croissance maximal (h<sup>-1</sup>).

S : Concentration en substrat (mg/l).

$K_s$ : La constante d'affinité de microorganismes pour le substrat considérée égale à la concentration en substrat lorsque le taux de croissance vaut  $\mu_{max}/2$ .

**V-3-2-Modèle de Haldane :**

Pour des concentrations élevées, le modèle de Monod n'était plus applicable, Une déperdition était constatée dans, pour en tenir compte, d'autres modèles ont été élaborés tenant compte de ce nouveau paramètre qui est l'inhibition des bactéries par le substrat. Le modèle le plus connu est basé sur l'équation de Haldane (V.7), [83].

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S + \left( \frac{S^2}{K_i} \right)} \dots\dots\dots (V.7)$$

$K_i$  : représente la constante d'inhibition.

**V-4-Détermination des constantes de croissance ( $\mu_{\max}$ ,  $K_S$ ,  $K_i$ ) :**

Les constantes cinétiques ( $\mu_{\max}$ ,  $K_S$ ), sont déterminées, en prenant la forme linéarisée de l'équation de Monod définie précédemment.

La forme linéarisée de l'équation de Monod:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \dots\dots\dots (V.8)$$

En traçant l'inverse de la vitesse d'élimination du substrat  $1/\mu$  en fonction de l'inverse de la concentration initiale  $1/S$ .

La forme linéarisée de l'équation de Haldane :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{S\mu_{\max}} + \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{S}{K_i \mu_{\max}} \dots\dots\dots (V.9)$$

La constante d'inhibition  $K_i$  est déterminée graphiquement en portant  $1/\mu$  en fonction de  $S$ , on utilisant la forme linéarisée de l'équation de Haldane d'après l'équation (V.9).

**V-5-Rendement d'élimination :**

Le rendement de dégradation du substrat est défini par le rapport R, équation (V.10), où  $S_0$  et S respectivement les concentrations initiale et restante en substrat (mg/l).

$$R(\%) = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \dots\dots\dots (V.10)$$

**V-6-Calcul de la vitesse moyenne de biodégradation:**

A partir des valeurs de la concentration instantanée en phénol en fonction du temps, la valeur de la vitesse moyenne de biodégradation a été définie comme suit :

$$V = \frac{-dS}{dt} \dots\dots\dots (V.11)$$

Où V : La vitesse de biodégradation (mg/l h).

S: Concentration en substrat (mg/l).

t : Temps de biodégradation(h).

# CHAPITRE : VI

"Matériels et méthodes"

---

## VI

### Matériels et méthodes.

#### VI-1-Matériel :

##### VI-1-1-Matériel biologique :

La souche utilisée dans notre étude est *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (American Type Culture Collection), qui nous a été fournie par l'Institut Pasteur d'Alger. Cette souche est conservée dans un réfrigérateur à une température de 4°C sur milieu gélosé incliné de conservation.

##### VI-1-2-Milieu de culture :

Les cultures de *Pseudomonas aeruginosa* ont été réalisées en batch dans un milieu de culture minéral liquide dont la composition est citée en annexe N°1[84].

##### VI-1-3-Produits et matériels utilisés :

Les réactifs utilisés pour le dosage du phénol sont cités en annexe N°2[85].

Les différents matériels utilisés au cours de notre étude sont cités en annexe N°3.

#### VI-2-La méthodologie :

Notre étude a porté sur la préparation des billes d'alginate de calcium, capables d'encapsuler des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* afin de dégrader le phénol en batch. Pour ce faire, nous avons au cours de tous nos essais, adopté les étapes suivantes :

##### VI-2-1-Préparation de l'inoculum (suspension bactérienne) :

###### ➤ *Ensemencement de la souche :*

A partir d'un tube de conservation de *P. aeruginosa*, l'ensemencement de quelques colonies a été fait dans un tube de bouillon nutritif. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, un trouble indique une croissance cellulaire.

###### ➤ *Adaptation des cellules au phénol :*

Les cellules obtenues lors de la préculture ont été cultivées dans un milieu minéral (cité en annexe N°1) à raison de 1% avec le phénol comme seule source de carbone à une concentration de 500mg/l.

Après incubation à 30°C pendant 48 heures, les cellules ont été séparées par centrifugation (6000 tours par minute pendant 30 minutes à (10°C), lavées deux fois à l'eau distillée stérile, puis remises en suspension dans 10 ml d'eau physiologique.

La mesure de la densité des cellules de l'inoculum a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV /visible à 600 nm avec le milieu de culture comme référence. Les concentrations ont été déterminées à partir de la courbe d'étalonnage préalablement établie. Les bactéries de l'inoculum sont utilisées pour la biodégradation du phénol après leur fixation sur l'alginate de sodium.

#### **VI-2-2-Technique d'immobilisation des cellules (formation des billes):**

##### **❖ *Préparation de la solution d'alginate de sodium par solubilisation :***

Plusieurs travaux ont servi pour déterminer les concentrations utilisées en alginate de sodium dans l'eau, ainsi que le CaCl<sub>2</sub> et le rapport inoculum/alginate.

Afin de former de bonnes billes, nous avons procédé à des essais préliminaires. Un bon enchevêtrement était obtenu à une concentration d'alginate de sodium de 3% (p/v) dans l'eau distillée.

L'alginate de sodium est versé petit à petit dans un bécher qui contient de l'eau distillée avec agitation pour faciliter la dissolution de l'alginate et éviter la formation de grumeaux. La solution sous forme de gel est ensuite stérilisée à 120°C durant 20 minutes et conservée à 4°C en attente de son utilisation.

##### **❖ *Préparation de la solution de chlorure de calcium :***

La majorité des études rapportées dans la littérature indiquent l'intérêt d'utilisation du chlorure de calcium dans les techniques d'immobilisation des cellules. L'ion calcium renforce la stabilité mécanique des différents biofilms [86,87] et protège les cellules contre l'excès de concentration de phénol [88].

La source de calcium utilisée au cours de notre étude expérimentale est le chlorure de calcium (Prolabo), préparé à une concentration de 3% (p/v) dans l'eau distillée. Le pH de la solution est ramené à la neutralité par une solution de NaOH 1N (Prolabo) avant sa stérilisation à 120°C pendant 20 minutes et sa conservation à 4 °C.

**❖ Formation des billes d'alginate de calcium : "L'échange d'ions".**

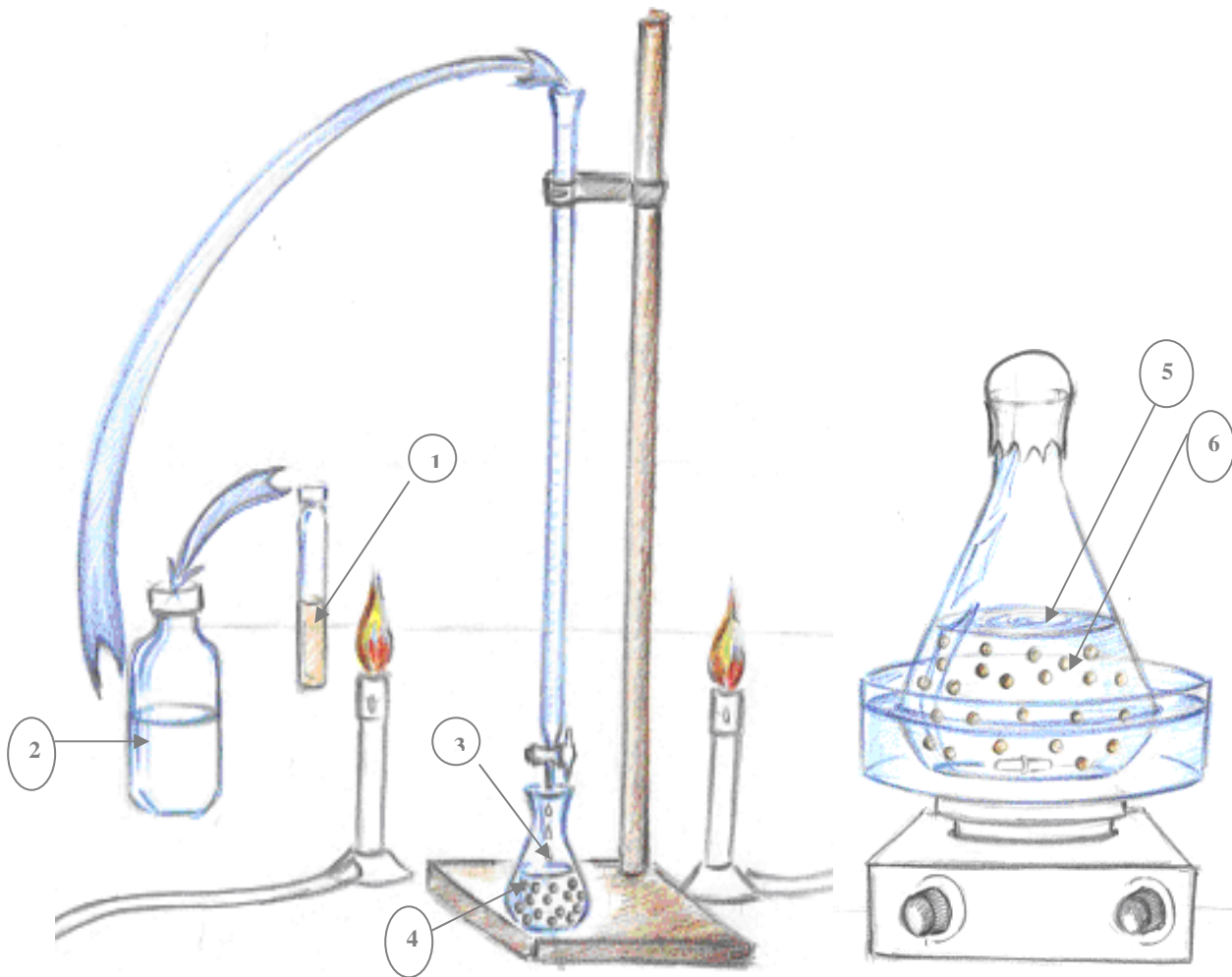
La technique utilisée dans notre étude est une immobilisation par inclusion.

Le principe de cette technique consiste à disperser un gel d'alginate de sodium contenant les cellules de *Pseudomonas aeruginosa* dans une solution saline  $\text{CaCl}_2$  (3% p/v). Le rôle du sel est de renforcer les interactions hydrophobes et donc de faciliter la séparation des particules obtenus lors de la dispersion [89].

Le rapport volumique inoculum/alginate de sodium utilisé est de 1/9 (v/v), rapport préconisé par Mordocco et Coll. [90]. Le mélange obtenu est ajouté par un système de goutte à goutte à la solution de chlorure de calcium sous une agitation faible.

Les gouttes d'alginate débutent leur échange d'ions dès l'entrée dans la solution, générant ainsi des billes sphériques qui sédimentent au fond de la solution (figure n° VI.1). Le diamètre des billes est fonction du diamètre de la burette utilisée. Les billes sont laissées au repos pendant 2 heures dans une étuve à 37°C, afin de compléter l'échange d'ions entre sodium et calcium.

A la fin de la réalisation, les billes d'alginate de calcium sont conservées à 4°C, afin de bloquer l'activité enzymatique des cellules. Toutes les étapes d'immobilisation ont été effectuées stérilement voir la figure n° (VI.2).



- 1 : Suspension bactérienne ;  
2 : Gel d'alginate de sodium préstérilisé ;  
3 : Solution de  $\text{CaCl}_2$  préstérilisée ;  
4 : Formation des billes d'alginate de calcium ;  
5 : Milieu minéral préstérilisé + solution du phénol  
6 : Billes prélevées.

**Figure n° (VI.1): Appareillage utilisé pour la technique d'immobilisation des bactéries par inclusion.**



L'ensemble des étapes est présenté sur la figure n° (VI.2).

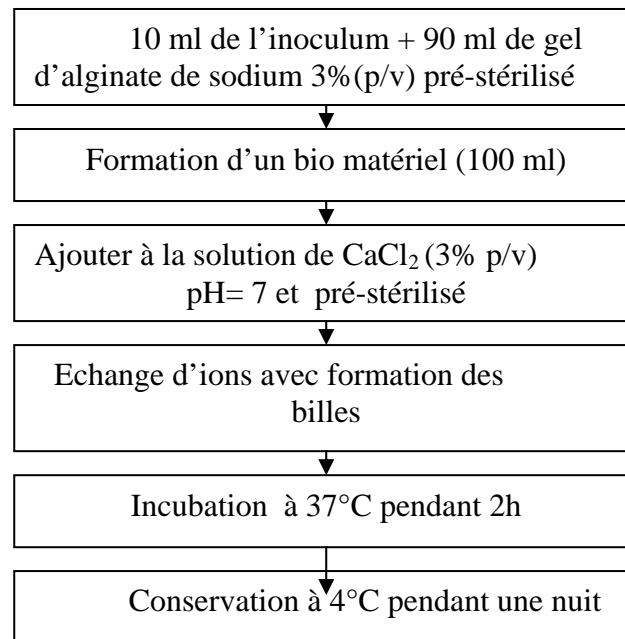


Figure n° (VI.2) : Protocole de travail expérimental [85].

### VI-3-Etude d'adsorption du phénol par les billes d'alginate de calcium.

Une étude d'adsorption du phénol sur les billes d'alginate dans le but de savoir s'il s'adsorbe sur le support. Pour cela dans un volume de 1,5l contenant une solution phénolique à 200 mg/l, nous avons mis 100 g de billes d'alginate de calcium. Périodiquement des échantillons sont prélevés et analysés par simple lecture de la DO à une longueur d'onde de 270 nm, préalablement déterminée.

### VI-4-Estimation des différents paramètres de la biodégradation :

Les essais de biodégradation sont réalisés dans des erlenmeyers de 3 l, remplis à 1,5 l de milieu de culture minéral additionné de phénol, à une température de 37°C sous faible agitation de 78 tours/ mn. Les cellules encapsulées obtenues sous forme de billes d'alginate de calcium constituent l'inoculum du milieu de culture.

A des intervalles de temps réguliers, des prélèvements sont effectués afin de suivre l'évolution de la croissance bactérienne dans le milieu, ainsi que le taux de biodégradation du phénol en évaluant la concentration résiduelle.

**VI-4-1- Estimation des densités de biomasse :**

Au lieu de dénombrer les bactéries, il est possible d'estimer la biomasse (masse bactérienne) par unité de volume, c'est-à-dire la densité bactérienne. La turbidimétrie permet de suivre l'évolution de la densité optique, reliée à la densité bactérienne par la loi de Beer-Lambert [36].

La biomasse est déterminée par mesure de l'absorbance des aliquotes prélevés à partir des cultures à une longueur d'onde de 600 nm au spectrophotomètre d'absorption moléculaire UV /visible (SHIMADZU UV MINI-1240), en se référant à un blanc ne contenant que le milieu de culture. Une courbe d'étalonnage préalablement établie à la même longueur d'onde permet la conversion de la DO en matière sèche (mg/l) (annexe N°4).

**VI-4-2-Analyse du phénol :**

La concentration résiduelle et initiale en phénol est mesurée par une méthode colorimétrique selon la norme NF (T90-204) basée sur la réaction entre le phénol et le 4-aminoantipyrine. Cette méthode est efficace pour la détection de phénol aux concentrations qui ne dépassent pas 5 mg/l [91].

Il s'agit de la condensation en milieu basique de l'ion phénate sur le composé 4-aminoantipyrine en présence d'un oxydant, l'hexacyanoferrate (III) de potassium (ferricyanure de potassium) à pH= 10.

Le complexe obtenu de couleur rouge est analysé à la longueur d'onde de 510 nm au spectrophotomètre d'absorption moléculaire UV /visible (SHIMADZU UV MINI-1240) et à l'aide d'une courbe d'étalonnage précédemment établie à la même longueur d'onde. La DO est convertie en concentration résiduelle en phénol (mg/l) (voir annexe N° 2).

# CHAPITRE :VII

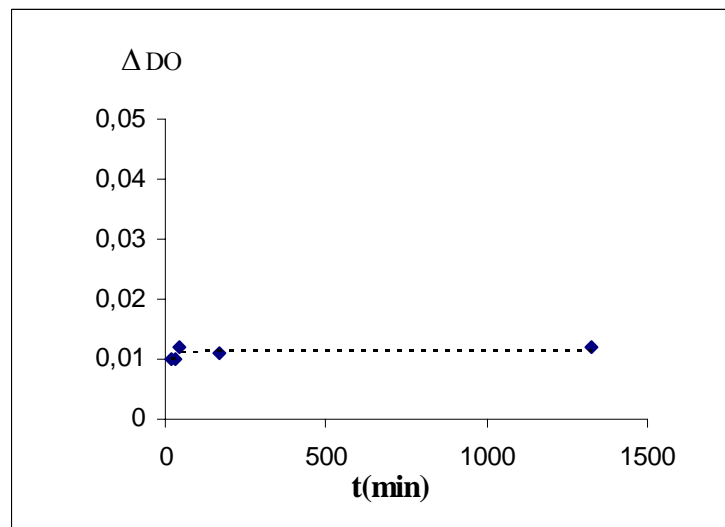
"Résultats et discussions"

## VII

## Résultats et discussions.

**VII-1-CINETIQUE D'ADSORPTION DU PHENOL PAR LES BILLES D'ALGINATE DE CALCIUM:**

Afin de monter la nature du transfert dans les billes d'alginate de calcium nous avons présentés la cinétique d'adsorption du phénol par les billes dans la figure ci-dessous.



**Figure n° (VII.1) : Cinétique d'adsorption du phénol par les billes d'alginate de calcium.**

Le suivi de la concentration résiduelle en fonction du temps nous a permis de constater qu'il n'y a pas adsorption du phénol sur les billes d'alginate. La concentration est restée constante pendant plus de 20 heures. La différence de concentration entre l'état initial et final est pratiquement nulle (inférieure à 0,02 mg/l).

Ce même résultat a été constaté par Bandhyopadhyay et Coll.[92] et Banerjee et Coll. [85].

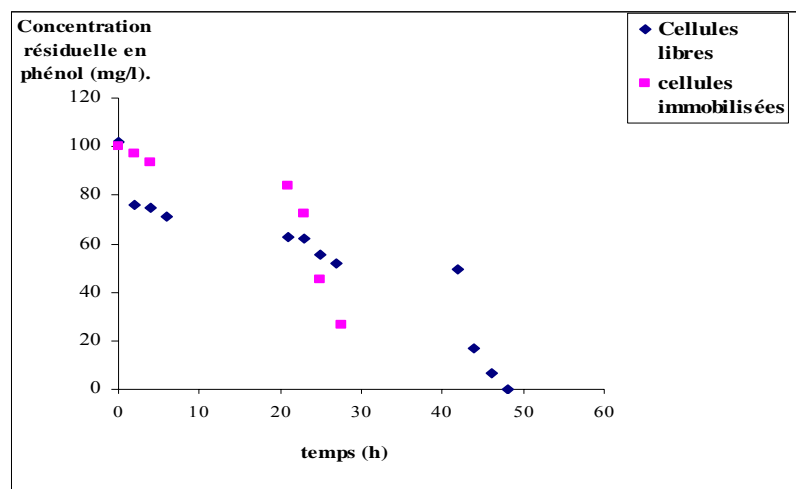
**VII-2-ETUDE COMPARATIVE DE LA BIODEGRADATION DU PHENOL PAR DES BACTERIES EN SUSPENSION (LIBRES) ET IMMOBILISEES.**

Nous avons effectué deux essais de biodégradation d'une solution phénolique à 100 mg/l en batch, par des cellules libres et des cellules immobilisées dans l'alginate de calcium. Les conditions opératoires sont décrites en détail dans le tableau n° (VII.1).

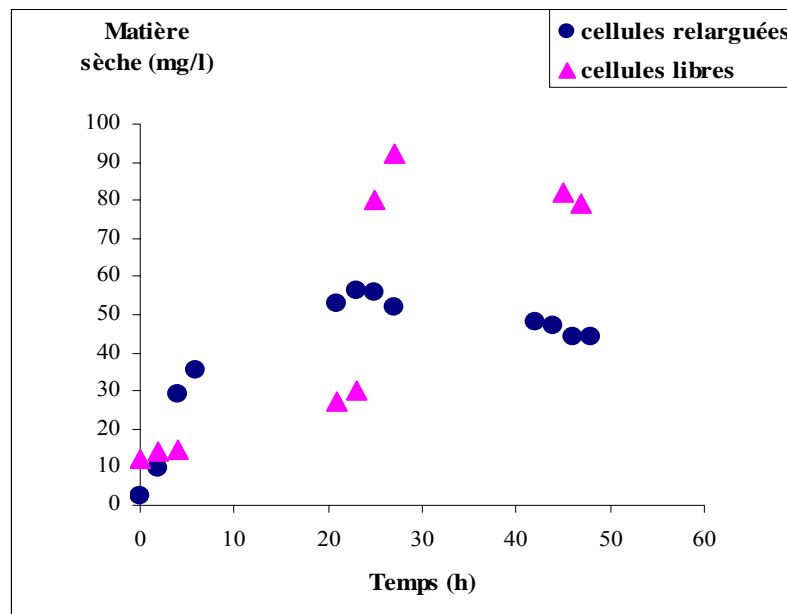
**Tableau n° (VII.1): Conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch dans le cas des cellules libres et immobilisées dans l'alginate de calcium.**

Concentration initiale en phénol (mg/l)	Les conditions opératoires
100 mg/l	1% de préculture. Rapport inoculum/alginate 1 /9. Diamètres des billes 1,5mm. pH initial du milieu minéral=7. Température=37°C. Agitation =78 tours/ mn

La figure n° (VII.2) montre les différents résultats de l'évolution de la concentration résiduelle du phénol en fonction du temps dans les deux cas étudiés.



**Figure n° (VII.2): Evolution de la biodégradabilité du phénol en fonction du temps.**



**Figure n° (VII.3): Evolution de la croissance des cellules libres et les cellules relarguées en fonction du temps.**

Nous remarquons d'après la figure n° (VII .2), que la quantité du phénol dégradée par les cellules libres est plus importante (plus de 40%), dans l'intervalle du temps (0-20 h) que celle enregistrée par les cellules immobilisées (20%). Cela est dû au fait que le polluant est difficilement disponible pour les cellules immobilisées, pour des concentrations faibles, le gradient de concentration est faible et non encore établi, entraînant un faible apport de soluté aux bactéries immobilisées [93].

Au-delà de 20 heures, une biodégradation totale et rapide du phénol est associée au nombre croissant des bactéries observé figure n° (VII .3).

Concernant la biodégradation par les cellules immobilisées, deux phénomènes sont à noter: la biodégradation se fait par des cellules immobilisées et des cellules relarguées par les billes. Il s'avère que le gradient de concentration est insuffisant à satisfaire les conditions de croissance des cellules immobilisées, d'où le relargage observé des cellules dans le milieu pour satisfaire leurs besoins en substrat et en nutriments. Ce relargage est noté dès le début de la culture (figure n° (VII .3)). Dans ce cas, une augmentation de la vitesse de dégradation s'observe à partir de 20 heures de contact ce qui correspond au maximum de cellules relarguées. Un calcul des cinétiques de biodégradation confirme cet état tableau n° (VII.2).

**Tableau n° (VII .2): Valeurs des vitesses de dégradation V(mg/l.h) .**

	Cellules libres	Cellules immobilisées
Entre 0 et 20 h	1,77	0,79
Après 20 h	2,32	3,02

Concernant les deux cas étudiés nous avons calculé le taux de croissance en phase exponentielle.

**Tableau n° (VII.3): Paramètre de la croissance bactérienne**

Nature des cellules	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
Cellules libres	0,33
Cellules relarguées	0,67

Dans le cas des cellules libres, nous avons remarqué une phase de latence importante d'une durée de 20 heures. Au cours de la phase exponentielle de croissance le taux de croissance maximal était de l'ordre de 0,33 h<sup>-1</sup>.

Ce resultat est en accord avec les résultats des travaux antérieurs présentés par Humphrey et Yang [94], ayant travaillé sur la biodégradation du phénol par des cultures pures (*Pseudomonas putida* et une moisissure) , avec un  $\mu_{\max}$  (0,1-0,3h<sup>-1</sup>) respectivement.

Concernant les cellules relarguées, nous avons noté l'absence d'une phase de latence et un taux de croissance relativement élevé de l'ordre de 0,67 h<sup>-1</sup>. Ceci est dû à une adaptation des cellules au phénol lors du séjour dans les billes d'alginate.

Concernant les cellules libres, nos résultats complètent ceux de Ali [95], prouvant par là l'aptitude de *Pseudomonas aeruginosa* à dégrader le phénol avec un rendement d'élimination de 63% pour Ali [95] et de 100%, dans notre cas.

Concernant les cellules immobilisées, l'élimination du phénol à 100% est obtenue plus rapidement pour les raisons citées précédemment.

### **3-ETUDE DE LA BIODEGRADATION DU PHENOL PAR DES CELLULES IMMOBILISEES :**

#### **VII-3-1-Etude de l'effet de la concentration initiale :**

Nous avons fait varier la concentration initiale du phénol de 100 jusqu'à 5000 mg/l, tout en gardant les autres paramètres fixes. Ceci afin de voir l'évolution de la biodégradation, c'est à dire le comportement de notre bactérie immobilisée vis-à-vis d'une concentration croissante en polluant.

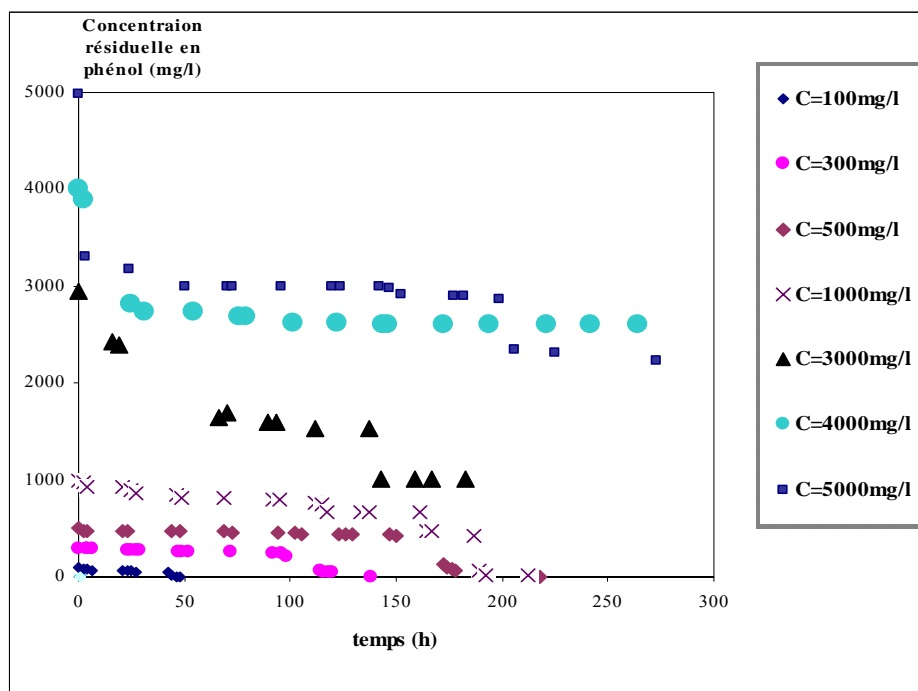
Les conditions opératoires sont reprises dans le tableau n° (VII.4)

**Tableau n° (VII.4) : Conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch dans le cas de la variation des concentrations initiales.**

<b>Concentration initiale en phénol (mg/l)</b>	<b>Les conditions opératoires</b>
100	1% de préculture. Rapport inoculum/alginat 1 :9. Diamètres des billes 1,5 mm. pH initial du milieu minéral=7. Température=37°C. Agitation =78 tour/ mn
300	
500	
1000	
3000	
4000	
5000	

L'évolution de la concentration résiduelle de phénol en fonction du temps pour chaque concentration initiale en phénol est représentée sur la figure n° (VII .4).





**Figure n° (VII .4): Cinétiques de biodégradation du phénol à différentes concentrations initiales.**

Pour des concentrations initiales comprises entre 100 et 1000mg/l, la dégradation du phénol est totale (rendement de 100% obtenu à différents temps). En augmentant la concentration au delà de 1000 mg/l, la dégradation est rapide entre 0 et 50 heures, phase au cours de laquelle 1000 à 2000 mg du phénol sont dégradés. L'activité de dégradation semble s'arrêter à partir de 50 heures donnant un plateau n'atteignant jamais les 100% de dégradation. On assiste alors à un phénomène d'inhibition lorsqu'on se trouve en présence de fortes concentrations en phénol (> 1000 mg/l).

A titre de comparaison avec les travaux de Ali [95], qui a travaillé avec la même souche mais avec des cellules libres en batch, l'inhibition par le substrat s'est révélée à des concentrations moindres, inférieures à 500mg/l. Ce résultat est aussi en accord avec ceux de Pelmont [25] et Prieto [63]. Il s'avère que l'immobilisation tend à protéger la bactérie contre l'effet bactéricide du phénol. A la surface de la bille d'alginate, il s'établirait un gradient de concentration qui va en diminuant du milieu vers la surface. D'où une biodégradation plus importante et à des concentrations initiales plus élevées. De plus, les cellules immobilisées acquièrent une résistance accrue vis-à-vis du milieu [88].

Entre 1000 et 5000mg/l, en augmentant la concentration, le rendement diminue (R = 100% à 36%). Le phénomène d'inhibition s'accroît avec l'accroissement de la concentration initiale.

Contrairement aux cellules libres, les cellules immobilisées continuent malgré les fortes concentrations, à dégrader partiellement le phénol. Ceci serait dû au fait que les cellules à l'intérieur des billes d'alginate, sont protégées par la couche extérieure constituée de bactéries mortes [85]. La diffusion du phénol, ainsi que le transfert des nutriments et de l'oxygène sont perturbés par les fortes concentrations en phénol. Ce qui se traduit par un changement dans le métabolisme (insuffisance en apport enzymatique), il devient plus lent entraînant une diminution du taux de biodégradation [58,96].

❖ **La vitesse moyenne de biodégradation du phénol :**

La vitesse moyenne de biodégradation du phénol a été calculée pour différentes concentrations. A des concentrations en phénol supérieures à 1000 mg/l, la vitesse moyenne de biodégradation a été calculée en se basant sur le même temps (212 heures), temps correspondant à celui de la biodégradation totale (correspondant à une concentration de 1000mg/l).

Les valeurs de la vitesse de biodégradation sont représentées dans le tableau n° (VII .5).

**Tableau n° (VII.5): Valeurs des vitesses moyennes de dégradation.**

<b>C<sub>i</sub>(mg/l)</b>	100	300	500	1000	3000	4000	5000
<b>V(mg/lh)</b>	2,11	2,10	2,25	4,62	8,01	6,60	8,49
<b>R (%)</b>	100	100	100	100	56	35	36

C<sub>i</sub> : concentration initiale

Il est par ailleurs important de noter qu'un phénomène de relargage des cellules a été observé pour les cultures contenant des concentrations en phénol inférieures à 1000 mg/l. Et donc la biodégradation du phénol dans ces cas était attribuée à l'ensemble des bactéries (immobilisées et libres). Au delà de 1000 mg/l, le phénomène de relargage disparaît progressivement et devient inexistant à partir de 1500 mg/l.

Pour bien évaluer le développement des cellules relarguées, nous avons suivi leurs cinétiques de croissance dans les conditions citées plus haut. Une courbe représentant le taux de croissance maximal en fonction de la concentration en phénol figure n° (VII.5) permet de confirmer nos observations. En effet,  $\mu_{\max}$  atteint une valeur négligeable à partir de 1000 mg/l qui reste constante pour les concentrations supérieures, traduisant ainsi

l'absence de tout développement microbien à l'état libre dans ces conditions. A l'inverse, le  $\mu_{\max}$  est relativement élevé pour les concentrations inférieures à 1000 mg/l.

L'absence de relargage des cellules bactériennes aux fortes concentrations en phénol s'explique par l'effet toxique sur les cellules libres alors que l'immobilisation leur assure une bonne protection [9]. Ce qui nous a permis de tirer les conclusions suivantes ;

- Le phénomène de relargage est dû à un faible gradient de concentration. La concentration en substrat est insuffisante pour la masse bactérienne immobilisée.
- Pour C=500-1500mg/l :La vitesse de biodégradation augmente, du fait de l'apport plus important de substrat. L'élimination du substrat est totale (R =100%).
- Pour C=1500-5000 mg/l :Le phénomène d'inhibition apparaît. Cependant les cellules restent immobilisées et exposées à des concentrations élevées du phénol sans perdre la viabilité et la protection de cette dernière.

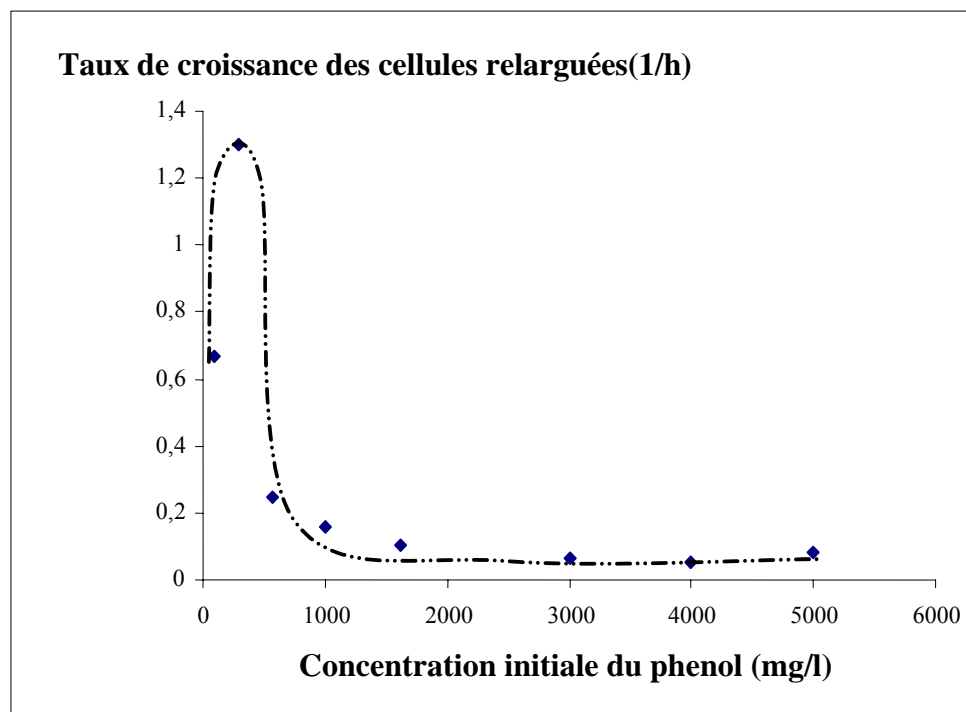
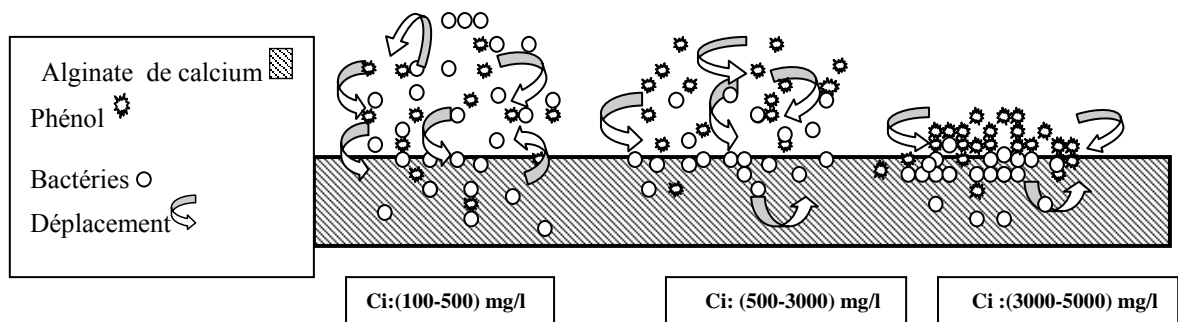


Figure n° (VII .5) :Effet de la concentration initiale du phénol sur le taux de croissance des cellules relarguées.

On remarque d'après la figure 12 que le taux de croissance maximal des cellules relarguées est élevé pour les concentrations inférieures à 500mg/l. Donc, son apport dans la biodégradation du phénol n'est pas négligeable. Au delà, de cette valeur, il n'y a pratiquement pas de cellules relarguées dans le milieu, ce qui est représenté par un taux de croissance relativement faible.

Une explication du mécanisme de biodégradation peut être schématisée par la figure n° (VII .6) :



**Figure n° (VII.6): Les différents phénomènes observés à différentes concentrations du phénol.**

- $C_i=100-500\text{mg/l}$  : le gradient de concentration du phénol est faible ce qui provoque le déplacement des cellules vers le milieu.
- $C_i=500-3000\text{mg/l}$  : le gradient de concentration est moyennement élevé et les cellules restent immobilisées dans les billes d'alginate de calcium.
- $C_i=3000-5000\text{mg/l}$  : le gradient de concentration est très élevé, provoquant ainsi le durcissement des billes d'alginate qui est dû à la formation d'une couche de cellules mortes sur la surface des billes d'alginate de calcium.

### **VII-3-2-ETUDE DE L'EFFET DE LA TAILLE DES BILLES SUR LA BIODEGRADATION DU PHENOL :**

L'intérêt de la variation de la taille des billes réside dans le fait que si cette dernière augmente, on augmente le nombre de bactéries immobilisées de même que la surface d'échange. Ce qui laisse supposer une meilleure biodégradation [97].

Pour une même quantité d'alginate et afin de déterminer le diamètre optimal des billes optimal permettant la meilleure biodégradation nous avons préparé des billes de différentes tailles (1 ; 1,5 ; 2,5 mm) en jouant sur le diamètre de sortie des burettes utilisées

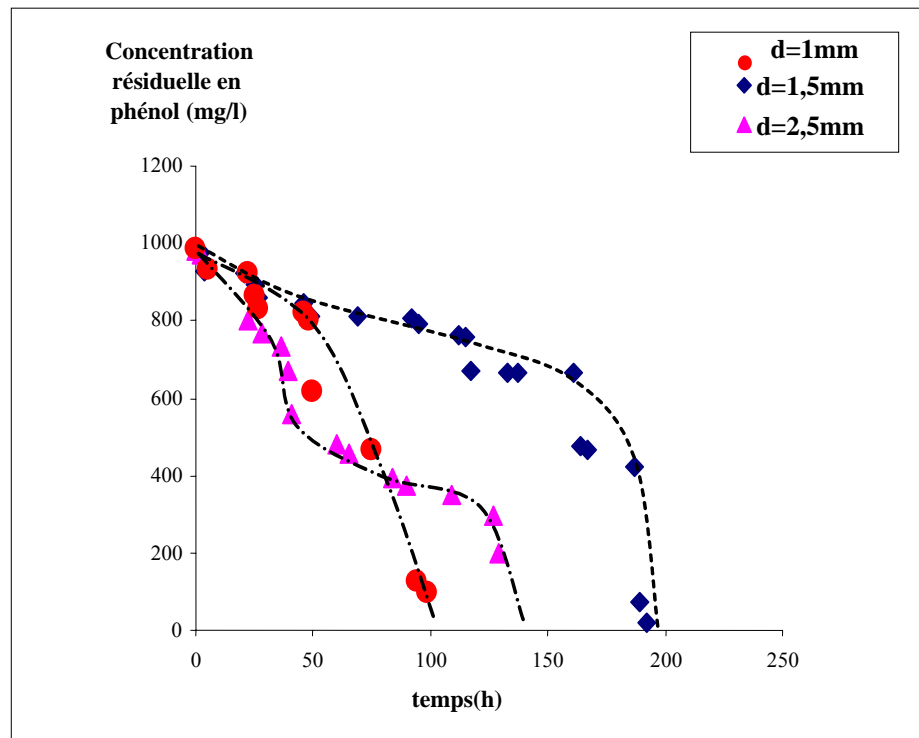
La concentration initiale de la solution phénolique choisie est de 1000 mg/l tout en gardant les autres paramètres fixes.

Le tableau n° (VII.6) regroupe les conditions opératoires.

**Tableau n° (VII.6): Conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch dans le cas de la variation de la taille des billes.**

<b>Diamètres des billes (mm)</b>	<b>Les conditions opératoires</b>
d <sub>1</sub> =1	1% de préculture. Rapport inoculum/alginate 1 :9. Milieu minéral + 1000 (mg/l) du phénol pH initial du milieu minéral=7. Température=37°C. Agitation =78 tours/ mn
d <sub>2</sub> =1,5	
d <sub>3</sub> =2,5	

Nous avons représenté graphiquement l'évolution de la biodégradation du phénol en fonction des trois diamètres des billes.



**Figure n° (VII .7): Effet de la variation de la taille des billes sur la cinétique de biodégradation du phénol (1000 mg/l).**

Nous constatons, d'après la figure n° (VII .7), que la biodégradation du phénol est totale pour les trois diamètres considérés mais à des vitesses différentes.

Afin de mettre en évidence l'effet de la variation de la taille des billes sur la cinétique de dégradation du phénol, nous avons calculé les vitesses pour les trois diamètres.

**Tableau n° (VII .7) : Valeurs des vitesses moyennes de dégradation**

	d <sub>1</sub> =1mm	d <sub>2</sub> =1,5mm	d <sub>3</sub> =2,5mm
V(mg/lh)	9,52	4,87	7,14

Il est évident que la meilleure vitesse de biodégradation du phénol est obtenue avec des billes de faible diamètre. La durée de dégradation totale avec des billes de 1 mm est réduite de moitié par rapport aux billes de 1,5 mm (on passe de 200 heures à 100 heures) (figure 14). Pour les faibles diamètres, il s'avère qu'il y a une meilleure répartition des bactéries dans le volume considéré entraînant une meilleure biodégradation. Dalili et Chau ont suggéré que la taille des billes qui aboutit à une meilleure dégradation est de l'ordre de 1 mm[98].

Dans les systèmes d'immobilisation des bactéries, il a été montré que les coefficients de transfert de masse augmentent avec une diminution du diamètre des billes. Le coefficient de transfert de masse est plus élevé dans le cas des plus petites particules à cause de la surface d'échange accrue [99]. Ou alors avec des grands diamètres, la surface d'échange et le nombre de bactéries sur la surface des billes diminue ce qui entraîne la formation d'une couche de substrat autour des billes. Cette couche s'épaissait au cours du temps, d'où le transfert de masse devient limitant.

Par ailleurs, Dursun et Tepe [100] ont montré qu'une augmentation de la taille des billes entraîne une augmentation des limitations diffusionnelles dans les billes et des faibles vitesses de déplacement de substrat sont obtenus avec des billes de taille élevée. Pour des vitesses d'échange maximales, la taille des particules doit être aussi petite que possible.

A ce propos les études qui ont été menées par Bandhyopadhyay et Coll.[92], montrent que le processus de biodégradation du phénol par les billes d'alginate est affecté par l'effet de la diffusion interparticulaire (phénomène de limitation diffusionnelle) dans l'intervalle de concentration (100-1000 mg/l) ; ceci provoque une diminution dans le taux de dégradation. Ce phénomène est causé par l'existence d'une résistance interne dans les billes d'alginate qui est dû au processus de durcissement des billes d'alginate (la diffusion dans les pores des billes d'alginate est très faible).

Les même auteurs ont montré que la taille des billes entraîne le phénomène de limitation diffusionnelle; ils ont aussi constaté que pour des billes de petite taille, l'effet de la diffusion interparticulaire est absent. Cependant, en augmentant la taille des billes c'est le début de ce phénomène.

D'autres chercheurs Mordocco et Coll.[90], ayant travaillé sur la biodégradation du phénol par *P.putida* sont parvenus à la même constatation.

Donc, pour les concentrations élevées, il est préconisé de travailler avec des billes de faibles diamètres puisqu'à ces concentrations, le phénomène de relargage est inexistant. Pour des faibles concentrations on recommande de travailler directement avec des cellules libres [66].

A cette concentration 1000 mg/l, la quantité éliminée est causée par les cellules immobilisées et relarguées. Déterminons la contribution des cellules relarguées en fonction des diamètres des billes. Nous avons représenté l'évolution de la biomasse des cellules relarguées en fonction du temps.

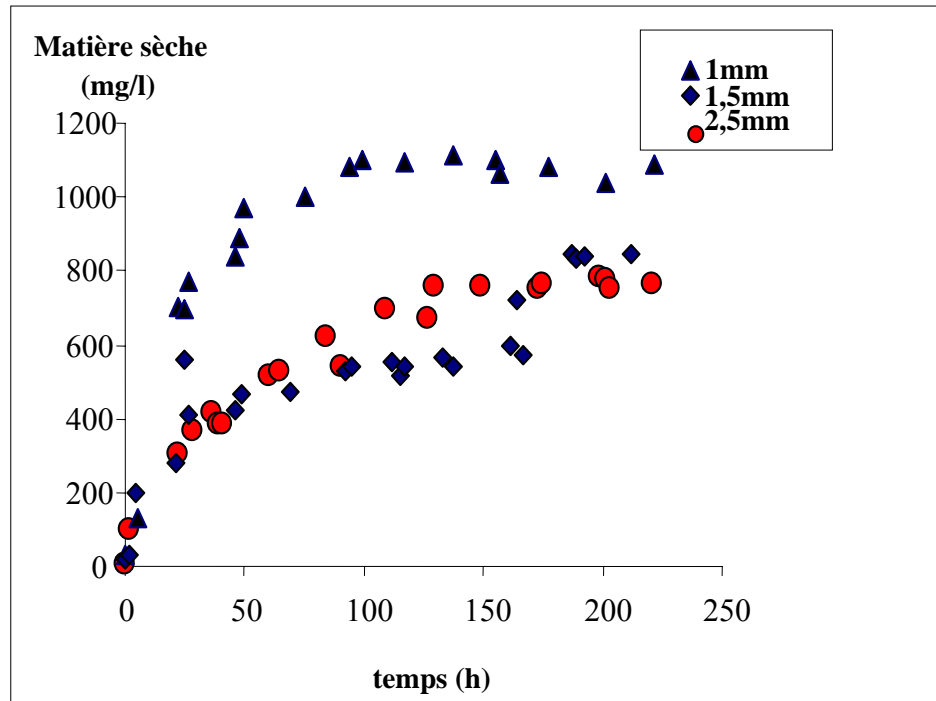


Figure n° (VII.8): Evolution de la biomasse des cellules relarguées en fonction du temps.

Nous avons calculé le taux de croissance des cellules relarguées. L'ensemble des résultats obtenus pour chaque essai est illustré dans le tableau n° (VII.8).

Tableau n° (VII.8) : Valeurs des taux de croissance des cellules relarguées.

Tailles des billes	d1=1mm	d2=1,5 mm	d3=2,5mm
$\mu_{\max} (h^{-1})$	0,157	0,143	0,106

On constate que le taux de relargage n'est pas important pour les différentes tailles des billes. Ceci montre que le phénomène de relargage ne dépend pas du diamètre des billes mais du gradient de concentration en substrat .



**VII-3-3- ETUDE DE L'EFFET DE LA REUTILISATION DES BILLES( RECYCLAGE) :**

L'étude de la réutilisation des billes a pour but de vérifier la viabilité de la bactérie après un cycle d'activité. Des billes de cellules utilisées une fois sont lavées stérilement et remises en suspension dans un milieu contenant les nutriments et le substrat à la même concentration que celle déjà dégradée par la bactérie. Ce test est réalisé afin de savoir si des cellules adaptées à une concentration donnée maintiennent leur activité.

Nous avons considéré les billes utilisées à 4000 mg/l de phénol c'est-à-dire adaptées à une forte concentration en polluant. Deux recyclages successifs ont été adoptés dans les mêmes conditions. Nous avons choisi les conditions qui sont ainsi regroupées dans le tableau ci-dessous tableau n° (VII.9).

**Tableau n° (VII.9): Conditions opératoires maintenues pour la biodégradation du phénol en batch dans le cas de recyclage des cellules.**

Nature des billes utilisées	Les conditions opératoires
Billes adaptées et recyclée dans 4000 mg/l du phénol (1 <sup>er</sup> +2 <sup>ème</sup> recyclage)	1% de préculture. Rapport inoculum/alginate 1/9 Milieu minéral + 4000 (mg/l) du phénol pH initial du milieu minéral=7. Température=37°C. Agitation =78 tour/ mn

La figure 17 indique que globalement *P. aeruginosa* maintient son activité aussi bien après le premier que le second recyclage présentant toutefois une sensible augmentation du rendement de dégradation tableau n° (VII .10).

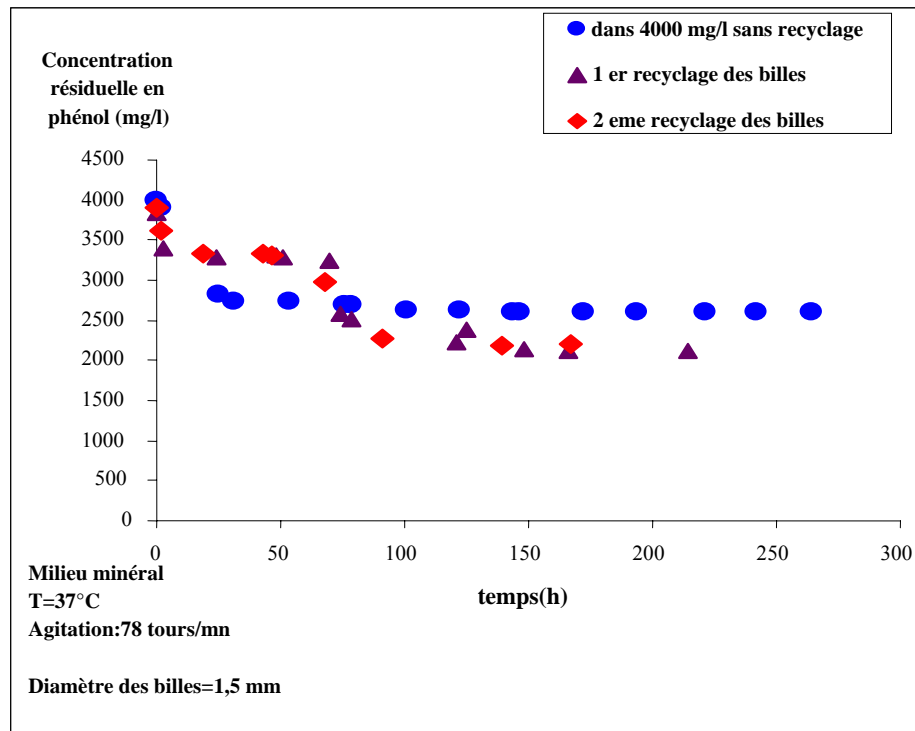
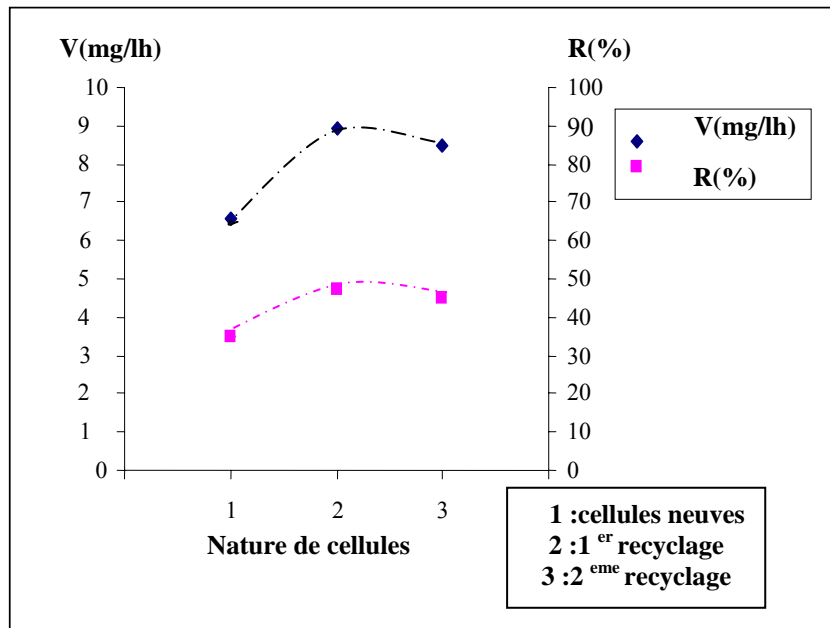


Figure n° (VII .9): Effet de recyclage des billes sur la cinétique de biodégradation du phénol (4000 mg/l).

Tableau n° (VII .10): Rendements de dégradation

C <sub>0</sub> =4000(mg/l)	Cellules neuves	1 <sup>er</sup> recyclage des cellules	2 <sup>eme</sup> recyclage des cellules
V(mg/lh)	6,60	8,92	8,51
R (%)	35	47	45

Nous avons représenté graphiquement l'évolution de la vitesse de biodégradation et le rendement d'élimination en fonction du type des billes utilisées sur la figure n° (VII .10).



**Figure n° (VII .10) :Effet de recyclage des billes sur la vitesse de biodégradation et le taux d'élimination du phénol(4000 mg/l).**

L'adaptation des bactéries améliore sensiblement le taux d'élimination de plus de 20% pour le premier recyclage, phénomène non constaté pour des recyclages ultérieurs.

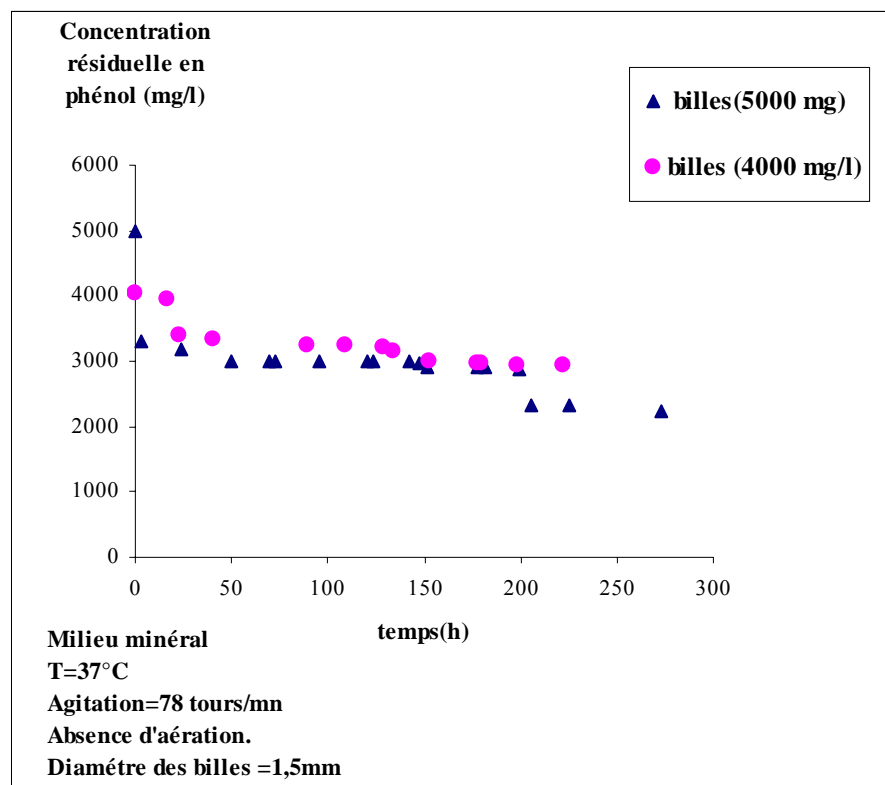
Concernant le deuxième recyclage, il s'avère que le recyclage des billes d'alginate entraîne une formation d'une couche d'épaisseur croissante de cellules mortes à la surface des billes. La diffusion du phénol et des nutriments devient limitante d'où la diminution du taux d'élimination du phénol [85].

La vitesse est en premier lieu accélérée (premier recyclage). Ceci est d'ailleurs vérifié par les vitesses de biodégradation. Par la suite l'accroissement de l'épaisseur de la couche entraîne une diminution de la vitesse.

L'augmentation de la vitesse de dégradation du phénol peut être expliquée par le fait que l'effet de l'adaptation des billes à la même concentration du substrat favorise la croissance des cellules à la surface des billes qui est en relation avec l'apport du substrat et les nutriments tout en synthétisant les enzymes qui sont nécessaires à la biodégradation.

**VIII-3-4- ETUDE DE L'EFFET DE L'ADAPTATION DES BILLES:**

En ce qui concerne les bactéries adaptées à une concentration supérieures à 5000 mg/l et aptes à dégrader à des concentrations plus faibles (4000 mg/l), la cinétique de dégradation est représentée sur la figure n° (VII .11).



**Figure n° (VII.11) : Effet de l'adaptation des billes sur la cinétique de biodégradation du phénol.**

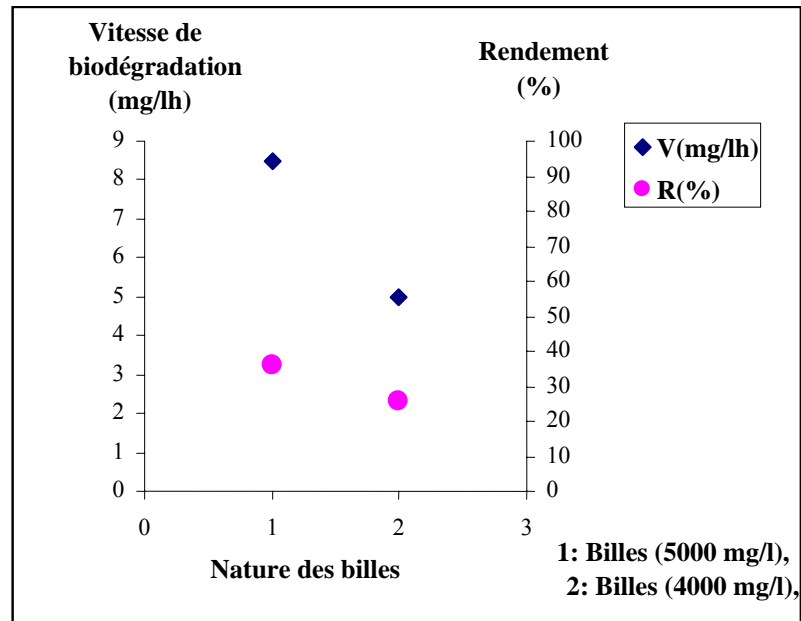
❖ **La vitesse moyenne de biodégradation du phénol :**

Les valeurs de la vitesse de biodégradations sont reprises dans le tableau n° (VII. 11).

**Tableau n° (VII .11): Valeurs des vitesses moyennes de dégradation.**

Nature des cellules	V(mg/lh)	R(%)
Billes (5000 mg/l)	8,49	36
Billes (4000 mg/l)	4,98	26

La figure n° (VII .12) montre l'effet de l'adaptation des billes sur la variation du taux d'élimination et la vitesse de dégradation du phénol.



**Figure n° (VII .12) :Effet de l’adaptation des billes sur la vitesse de biodégradation et le taux d’élimination du phénol (4000 mg/l).**

Durant cette étude, nous avons remarqué que l'effet de l'adaptation des billes à une concentration élevée (5000 mg/l) n'améliore pas le taux d'élimination du phénol pour une concentration inférieure (4000 mg/l).

Nous obtenons un rendement très bas (26%) par rapport à celui trouvé lors du recyclage des billes à 4000 mg/l. Cela se traduit par une diminution de la vitesse de dégradation du phénol qui peut être expliquée par un abaissement de l'activité des bactéries qui est due au durcissement des billes d'alginate par la formation de la couche des cellules mortes( phénomène de limitation diffusionnelle).

# Conclusion générale

# Conclusion générale

L'étude de la biodégradation du phénol par des cellules libres et immobilisées de *Pseudomonas aeruginosa* a été réalisée dans des cultures en batch. La méthode d'immobilisation par inclusion dans l'alginate de sodium a été adoptée.

Ce travail a permis de montrer qu'il est possible de préparer des billes d'alginate selon un procédé simple en optimisant les paramètres expérimentaux.

Cette méthode présente plusieurs avantages tels que la simplicité de mise en œuvre, la conservation de l'activité catalytique des cellules.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que les billes d'alginate de calcium n'adsorbent pas le phénol et le transfert de matière s'effectue par diffusion.

Cette étude a montré que pour un pH optimal de 7 et une température de 37°C, les cellules immobilisées ont permis d'obtenir un rendement d'élimination maximal pour une gamme de concentration allant jusqu'à 1000 mg/l. A cette concentration élevée la bactérie résiste à l'effet toxique du phénol contrairement aux cellules libres qui sont inhibées dès la concentration de 500 mg/l

On a constaté que la vitesse de biodégradation par les cellules immobilisées augmente avec l'augmentation de la concentration en substrat puis elle se stabilise.

La limitation diffusionnelle qui est due à la formation d'une couche des cellules mortes sur la surface des billes d'alginates de calcium joue un rôle important dans la protection des cellules contre l'excès du phénol, pouvant ainsi provoquer l'inhibition.

Durant cette étude, nous avons remarqué que le phénomène de relargage surgit à des intervalles de concentrations (100-500 mg/l) du phénol avec une croissance microbienne notable. Donc la contribution des cellules relarguées dans la biodégradation du phénol n'est pas négligeable.

La variation de la taille des billes nous a permis de déduire que pour des faibles diamètres, la répartition des bactéries est meilleure entraînant une bonne

biodégradation. La vitesse de biodégradation passe par un diamètre optimal de fabrication qui est de l'ordre de 1 mm approximativement.

Il serait judicieux de travailler soit avec des billes de faibles diamètres, ceci augmentera la surface d'échange pour un nombre de bactéries immobilisées restreint et l'effet de la diffusion à l'intérieur des billes est absent.

Concernant les concentrations élevées, il est préconisé de travailler avec des billes alors que pour les faibles concentrations on recommande de travailler directement avec des cellules libres.

Les résultats indiquent une amélioration dans le taux d'élimination pour le premier recyclage des billes à 4000 mg/l du phénol avec une augmentation de la vitesse de dégradation du phénol qui est dûe à une croissance des cellules à la surface des billes. Ceci est en relation avec l'apport du substrat et les nutriments la synthèse des enzymes nécessaires à la biodégradation.

Les recyclages ultérieurs des billes d'alginate à la même concentration entraînent une formation d'une couche d'épaisseur croissante de cellules mortes à la surface des billes. La diffusion du phénol et des nutriments devient limitante d'où la diminution du taux d'élimination du phénol.

On a constaté que l'adaptation des billes à une concentration élevée (5000 mg/l) n'améliore pas le taux d'élimination du phénol pour une concentration (4000 mg/l).

Il serait intéressant de procéder à la biodégradation par des bactéries immobilisées dans des billes d'alginate en système continu puisqu'il s'est avéré que la bactérie conserve son activité après recyclage. L'intérêt serait d'augmenter la durée du bioprocédé tout en évitant l'effet inhibiteur et toxique des fortes concentrations initiales en phénol.



# Références bibliographiques

# Références bibliographiques

- [1] Young L.Y et Cerniglia C.E (1995). Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss. 27-64.
- [2] Aidoud N (1999). Elimination en continu du phénol par la combinaison adsorption sur charbon actif biodégradation. Projet de Fin d'Etudes, ENP.
- [3] Klein J.A et Lee D.D (1978). Biological treatment of aqueous wastes from usual conversion processes. Biotechnol Bioeng Symp. Vol 8.89-94.
- [4] Mendoca E, Martins A, Anselmo A.M (2004). Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*. J Electro Biotechnol. 717-3458.  
File: ///G:BIP%20.Biodegradation%20F%20natral%20phenolic%20.com
- [5] Allsop P.J, Chisti Y, Moo-Young M, Sullivan G.R (1993). Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. Biotech. Bioeng. Vol 41. 572-580.
- [6] Bayley R.C, Barbour G (1984). The biodegradation of aromatic compounds by meta and gentisate path ways. Biochemistry and Regulation. Ed: Microbial Degr org comp. New York. 253-294.
- [7] Pichard A (2005). Phénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS–DRC-01-25590-01DR021. N°2-1.
- [8] CE (2000). Risk Assessment phenol. European Commission. Brussels, Belgium.
- [9] Aksu Z, Bulbülç (1998). Investigation of the combined effects of external mass transfer and biodegradation rates on phenol removal using immobilized *P.putida* in a packed-bed column reactor. Enz microb technol. Vol 22. 397-403.
- [10] Patterson J.W (1985). Wastewater Treatment Technology. Ann Arbor Sci Pub. Inc USA. 199-215.
- [11] Brémond R et Vuichard R (1973). Paramètre de la qualité des eaux. Ministère de la protection de la nature et de l'environnement. SPEPE. Paris. 179. <http://www.cig.ensmp.fr/~hgggt/fiphenol.htm>.
- [12] Sorensen J.M, And Arlt W (1980). Liquid- Liquid equilibrium. Data Collection De chema Vol 3.
- [13] Hempfling R, Doetsch P, Stubenrauch S, Mahr A, Bauer D, Koschmieder H.J et Grünhoff D (1997). USM-System zur Atlantenbeurteilung - Instrumente für diepfadübergreifende Abschätzung und Beurteilung von atlasverdächtigen Flächen Institut Fresenius. Erlangen & Focon-Ingenieurgesellschaft, Aachen.
- [14] Degrémont (1978). Mémento technique de l'eau. Éd : 8. Vol 646. 99-100.
- [15] INRS (1997). Phénol. Fiche toxicologique N° 15.
- [16] Wallace J (1991). Phenol. Encyclopaedia chemical technol. New York: Wiley & Sons. 592-602.
- [17] George, Prpich - Andrew, Daugulis J (2004). Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid-liquid, two phase partitioning bioreactor. Biodégradation Vol 16. 329-339. Department of Chemical Engineering. Canada K7L 3N6

- [18] Cardot.C (1999). Les traitements de l'eau. Procédés physico-chimiques et biologiques. Cours et problèmes résolus. Vol 62. 185. 99-101.
- [19] Fabre et Truhaut (1985). Précis de Toxicologie. Tome 1. Ed SEDES. Paris.
- [20] Yurteri Et Gurul M.D (1989). Evaluation of kinetic parameters for the ozonation of organic micropolluants. Wat. Sci. Tech. Vol 21. 465-476.
- [21] Gurol M.D et Vatistas R (1987). Photolytic ozonation of phenol. Wat sci Tech.Vol 19. 177-1180.
- [22] Brisou J (1971). Métabolisme des produits cycliques et aromatiques. Techniques d'enzymologie bactérienne. Ed : MASSON et CIE Paris.
- [23] Barker E.L, Peter E.B, Petrecia F, Grant S.K (1978). Phenol poisoning due to contaminated drinking water. Arch. Env. Health.Vol 33. 89-94.
- [24] Rodier J (1984). Analyse De L'eau.7<sup>ème</sup> Ed Dunod Paris.
- [25] Pelmont J (1995). Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques Vol 1 .Cha 11. Off pub Univ. Grenoble.
- [26] Berné F (1989). Biodégradation des phénols. Chimie des eaux naturelles et des eaux résiduaires industrielles. Degrémont.
- [27] Vincent F (1991). Contribution à l'étude du fonctionnement d'une décharge, modélisation d'un type de déchet. Thèse de doctorat Ecole National Supérieur des mines.
- [28] Rippen S (1989). Phenol application. <File://A:phénol.html>.
- [29] Kobayashi H, Rittman B.E (1982). Microbial removal of hazardous organic compounds. Env Sc Tech . Vol 16. 170-183.
- [30] Singleton I (1994). Microbial metabolism of xenobiotics fundamental and applied research. J. Chem. Technol. Biotechnol. Vol 59.23.
- [31] Friedrich-Henkel W (2002). Phenol. risk assessment. CAS: N°: 108-95-2. EINECS-N°: 203-632-7  
[chemg@baw.bund](mailto:chemg@baw.bund)
- [32] Medic D (1995). *Pseudomonas*. <File://A:Pseudomonas.htm>.
- [33] Todar K (2002). *Pseudomonas aeruginosa*. Gram strain of *Pseudomonas aeruginosa* cell.  
[http://www.bact.wisc.edu/bact\\_330/bact330\\_hemp](http://www.bact.wisc.edu/bact_330/bact330_hemp).
- [34] Bugnicourt M (1995). Dictionnaire de microbiologie générale. Ed Ellipses. France. 829-830.
- [35] Vilian S (2002). Introduction sur les bactéries et bio films. <File://A:Pseudomonas.htm>.
- [36] Guiraud J.P (2003). Microbiologie Alimentaire. Ed: RIA Dunod.
- [37] Bleves S. *Pseudomonas aeruginosa*. Travaux pratique de microbiologie. Atelier Sécrétion, Maîtrise de biochimie et biologie cellulaire.[bleves@ibsm.cnrs-mrs.fr](mailto:bleves@ibsm.cnrs-mrs.fr)

- [38] Sumino T, Kon M, Mori N, Nakajima K (1985). Development of wastewater treatment technique by immobilized micro-organisms. *J. Water Waste*. Vol 27. 52-57.
- [39] Hyde F.W, Huntg R et Erredel A (1991). Immobilization of bacteria and *Sccharomyces cerevisiae* in poly (tetra fluoroeethylene) membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 57. 219-222.
- [40] Characklis W.G., Marshall, K.C. (1989). *Bio films processes*. John Wiley & Sons. New York, 195-233.
- [41] Yves-Litzler P (2002). Les antimicrobiens et les micro-organismes (gram EA 2656). <File://A:\\bacteriesetbiofilms.htm>
- [42] Enzyme Immobilization Protocol. Entrapement in alginate gel. [www.eng.umd.edu~nsw/en.ch485/lab7b.html](http://www.eng.umd.edu~nsw/en.ch485/lab7b.html)
- [43] Background A (1998). Bio encapsulation, innovation and technologies. COST 840. Annexe 17.
- [44] Ramakrishna S.V, Prakasham R.S (1999). Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Sci Bangalore*. Vol 77. 87-100.
- [45] Willaert R.G, Baron G.V (1996). Gel entrapment and micro-encapsulation: Methods, applications and engineering principles. *Rev Chem Eng*. Vol 12. 85-115.
- [46] Michaud M.S (2001). Etude hydrodynamique et biologique d'un procédé de méthanisation à bio film : Le réacteur à lit tubulaire inverse. Thèse de Doctorat N°: 623. Toulouse.
- [47] Schmidt R (1999). Les biofilms et leurs applications. *Traité des matériaux, comportement des matériaux dans les milieux biologiques. Applications en médecine et biotechnologie*. 1<sup>ère</sup> Ed presse polytech univ romandes.
- [48] Arnaud J.P, Lacroix C, Chopin L (1989). Effect of lactic fermentation on the rheological properties of K – carraghenanes /locust bean gum mixed gels inoculated with *S. thermophilus*. *Biotechnol. Bioeng*. Vol 34. 1403-1408.
- [49] Groboillot A, Boadi D.K, Poncelet D, Neufeld R.J (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* Vol 14. 75-107.
- [50] Champagne C.P, Acroix C.L et Sodini-Gallot I (1994). Immobilized cell technology for the dairy industry. *Crit Rev Biotechnol*. Vol 14. 109-134.
- [51] Prenosil J.E, Kut Ö.M, Dunne I.J, Heinzle E (1995). Immobilized biocatalysts . *Encyclopedia of indu chem*. GERMANY.
- [52] Application Of Sodium Alginate. File [Http://CHINA-JIEJING.COM](http://CHINA-JIEJING.COM)
- [53] Proprietes Recherches Des Alginates. site File: [Http://A:DANISCO De LANDERNEOU 2.html](http://A:DANISCO De LANDERNEOU 2.html)
- [54] Nagai T et Yano T (1991). Surface micro structure of various calcium alginate xero-gels and ITS fractal analysis . *NIPPON SHKUHIN KOGGO GAKKAISHI* N° 38. Vol 4. 50 -356
- [55] Martisen (1990). Alginates as immobilization materials. A study of some molecular and functional properties. *Biomaterials* Vol 17. 1069-1079.

- [56] Merten O.W (1993). Cultures cellulaires. Biotechnologies d'aujourd'hui, Dix domaines stratégiques à l'aube du troisième millénaire. Presse Univ Limoges. 279-289.
- [57] Lamboley L, Lacroix C (1999). Long-term mechanical and biological stability of an immobilized cell reactor for continuous mixed-strain mesophilic lactic starter production in whey permeate. *Biotechnol. Pro.* Vol 15. 646-654.
- [58] Engasser J.M (1993). Réacteurs à enzymes et cellules immobilisées. *Biotechnol.* 4<sup>ème</sup> Ed. Tech et Doc Lavoisier.
- [59] Bergmaier D (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb. Rhamnosus* Rw-9595m d'un milieu à base de perméase de lactosérum. Thèse de doctorat. Université Laval Québec.
- [60] Wang S.D (1988). Fundamentals of biopolymer accumulation in immobilized *Acinetobacter calcoaceticus* system. Technol Cambridge USA. 280. Thèse Ph.D. Department of applied. [www.theses.ulaval.ca/2002/20383/20383-Bibliogr.html](http://www.theses.ulaval.ca/2002/20383/20383-Bibliogr.html).
- [61] Alhakawati M.S, Banks C.G, Smallman D (2003). Evaluation of two types of polyurethane for the immobilization of *Rhizopus oryzae* for copper up take. *Water Sci technol.* N°9. Vol 47. 151-156.
- [62] Amsden B.G (2003). Le bulletin des biotechnologies N° 214.
- [63] Prieto M.B (2002). La biodégradation des phénols par des cellules de *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 en suspension ou immobilisées. *Applied Microbiol Biotechnol.* Vol 58. 853-860.
- [64] Zeroual Y, Moutaouakkil A, Blaghen M (2002). Volatilisation du mercure par *Klebsiella pneumoniae* immobilisée dans différents supports en bio réacteurs à lit fluidisé. *Congres de Biochimie.* Casablanca. Vol 9.
- [65] Bettermann H, Rehm H.J (1984). Degradation of phenol by polymer entrapped microorganism. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol 20.121-326.
- [66] Heitkamp N.A, Camel V, Runter T.J, Adams W.J (1990). Biodegradation of *P-nitrophenol* in an aqueous waste stream by immobilized bacteria. *Appl. Enviro. Microbiol.* Vol 56. 2967-2976.
- [67] Chung T.P, Wu P.C, Juang R.S (2004). Effect Of Solution Conditions On Phenol Degradation And Cell Growth In A Membrane Bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* Vol 87. 219-227.
- [68] Moll M, Moll N (1998). Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. 2<sup>ème</sup> éditions Dunod. Paris.
- [69] Prévost H, Cavin J.F, Cachon R, Divies C (1994). Les micro-organismes immobilisées et l'industrie alimentaire. *Biofutur.* 42-45
- [70] De Vos P, De Haan B.J, Wotters G.H (1997). Bio Compatibility But Limited Graft Survival After Purification Of Alginate For Micro Encapsulation Of Pancreatic Islets. *Diabetologia* N° 40.Vol 3. 262-270.
- [71] Alginate De Sodium (Cacher Certifie). File: [Http: //bmex.51.net/product.html](http://bmex.51.net/product.html).
- [72] Application of Alginates. File [Http://www.snapalginate.comfr.html](http://www.snapalginate.comfr.html).
- [73] Minghou M.H.C.J, Yojun W, Zuhong X, Yucai G (1984). Studies On The M/G Ratios In Alginate". *Hydrobiology.* N°7, Vol 116, 554-556.

- [74] Mikkelsen A et Elgsaeter A (1995) . Density distribution of calcium-induced alginate gels. A num study Biopol. Vol 368. 17-41.
- [75] Smidsrod A, Skjak-Braek G (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. Tibtech. Vol 8. 71-78. <File://A:\L'IMMOBILISATION DE CELLULES PAR LES ALGINATES.htm>
- [76] Martinsen M., Storro I et Skjak-Break G (1992). Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. Biotechnol bioeng Vol 39. 186-194.
- [77] Thue B, Smidsrd O et Skjak-Braek G (1996). Immobilized cells: Basics and applications. Prog. Biotechnol. Vol 11.19-31.
- [78] Prevost H, Divies C (1987). Fresh fermented cheese production with continuous prefermented milk by a mixed culture of mesophilic lactic Streptococci entrapped in Ca-alginate. Biotechnol. Lett. Vol 9.789-794.
- [79] Keweloh H, Heipeiper H.J, Rehm H.J (1989). Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in Ca-alginate. Appl. Microbiol.Biotech. Vol 3. 383-389.
- [80] Martinsen M, Skjak-Break G et Ando.Smidsrod (1989). Alginate as immobilization material, correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. Biotechnol. bioeng. Vol 33. 79-89.
- [81] Urbina L.C, Dussán J (2003). Matrix evaluation for *Pseudomonas spp.* Immobilization in phenol bioremediation. [http://www.rcb.unal.edu.co/ingles/revista/vol5num2/matrix\\_evaluation.pdf](http://www.rcb.unal.edu.co/ingles/revista/vol5num2/matrix_evaluation.pdf).
- [82] Bimbenet J, Duquenoy A, Trystram G (2002). Génie des procédés alimentaires : Des bases aux applications. Ed: Dunod Paris.
- [83] Schroder M, Muller C, Posten C, Deckwer W.D, Hecht V (1997). Inhibition kinetics of phenol degradation from unstable steady-state data. Biotechnol. Bioeng. Vol 54. 567-567.
- [84] Sheeja R.Y Et Murugesan T (2002). Mass transfer studies on the biodegradation of phenols in up-Flow packed bed reactors. J Haz. Mat. 287-301.
- [85]:Banerjee I, Modac J.M, Bandopadhyay K, Das D, Maiti B.R (2001). Mathematical model for evaluation of mass transfer limitations in phenol biodegradation by immobilized *Pseudomonas putida*. J. Biotechnol. Vol 87. 211-223.
- [86] Rose R.K (2000). The role of calcium in oral streptococcal aggregation and the implications for bio film formation and retention. Bioch. Bioph. Acta Gen.Subj. N° 1475. Vol 1. 76-82.
- [87] Korstgens V, Flemming H.J, Wingender J, Borchard W ( 2001). Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *P.aeruginosa*. Water Sci Technol. N° 6. Vol 43. 49-57.
- [88] Tamponnet C, Matsumara Met Veliky I.A (1989). Physical Stabilization Of *Euglenagracilis* Cells By High Extracellular Calcium (100 M M). Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 32. 211-217.
- [89] Léonard M, Rastello M, Hubut P (2002). Préparation et caractérisation de microparticules à base d'alginate associatifs. Application à l'encapsulation des protéines. Ed: Dellacherie Matériaux.
- [90] Mordocco A, Kuek C, Jean-Kins R (1999). Continuous degradation of phenol at low concentration using immobilized *Pseudomonas putida*. Enz. Microb. Technol. Vol 25. 530-536.

- [91] Norme Française (1986). Essais des eaux effluents aqueux des raffineries de pétrole. NF(T 90-204). 464-467.
- [92] Bandhyopadhyay K, Das D, Bhattacharyya P, Maiti B.R (2001). Reaction engineering on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* MTCC 1194 immobilized on calcium alginate. J Bioch Eng. Vol 8. 179-186.
- [93] Blondel T (2001). Pollution souterraine, paramètre et paramétrage des modèles en écoulement et en transport de polluants. Programme INERIS. Projet TRANSPOL. Vol 2. 1-120.
- [94] Yang R.D Et Humphrey A.E (1975). Dynamique and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. Biotechnol Bioeng. Vol 17. 1211-1235.  
Humphery
- [95] Ali O (2005). Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en fermenteur".Memoire de magister ENP El Harrach Alger.
- [96] El-Sayed A (2003). Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4. Thèse de doctorat Université De Carolo-Wilhelmina zu Brunswick
- [97] Merten O.W (1993). Cultures cellulaires. Biotechnologies d'aujourd'hui, Dix domaines stratégiques à l'aube du troisième millénaire. Presse de l'Université de Limoges. 279-289.
- [98] Dalili M et Chau P.C (1987). Intraparticle diffusional effects in immobilised cell particles. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol.26. 500-506.
- [99] Sheeja R.Y Et Murugesan T (2002). Masse transfer studies on the biodegradation of phenols in up-Flow packed bed reactors. J Haz Mat. 287-301.
- [100] Arzu Y.Dursun\*, Ozlem Tepe(2005). Internal mass transfert effet on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*.J. Haz. Mat. Vol 126.105-111





# Annexes

## ANNEXES

### ANNEXE N° 1 : Composition du milieu de culture [84].

Pour un litre d'eau distillée, on introduit les composants suivants :

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : (1,5g);

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ : (0,5g);

$\text{NaCl}$  : (0,5g);

$\text{MgSO}_4$  : (0,5g);

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ : (3g);

$\text{CaCl}_2$  (0,02g);

$\text{FeSO}_4$ : (0,02g).

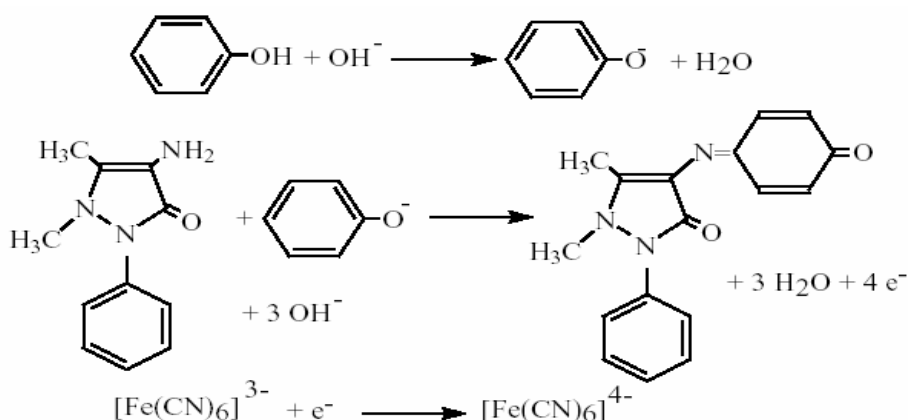
Le pH du milieu est ajusté à 7 à l'aide d'une solution de  $\text{NaOH}$  1N, ensuite il est stérilisé dans l'autoclave (120 °C, 1 atm), pendant 15 minutes, puis mis à conservation à 4 °C en attente de son utilisation pour l'expérimentation.

**N.B** : Les deux sels minéraux  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ , et le substrat (phénol), sont ajoutés par filtration stérilisante (0,2 $\mu$  Millipore) aux concentrations correspondants au milieu de culture préalablement stérilisé.

### ANNEXE N° 2 : DOSAGE DU PHÉNOL [85].

#### 1-Principe :

Il s'agit de la condensation en milieu basique de l'ion phénate sur la 4-aminoantipyrine en présence d'un oxydant, l'hexacyanoferrate (III) de potassium). Cette méthode a une limite de détection du phénol de 5 mg/l.



## ANNEXES

### 2-Réactifs :

•Solution tampon, pour 1 L :

\*Dissoudre dans 700 ml d'eau :

34g Chlorure d'ammonium  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (MERCK),

200g Tartrate double de sodium et de potassium,

15 ml d'ammoniac concentré  $\text{NH}_3$  (MERCK),

\*Compléter à 1 L et ajuster le pH à 9,5 au pH-mètre avec  $\text{NH}_3$  concentré ;

•Solution 4-amino-antipyrine (ALDRICH) à 20 g/l (flacon en verre teinté, fermé, conservé à l'abri de l'air et de l'humidité) ;

•Solution de ferricyanure de potassium (PROLABO) à 20g/l.

### 3-Méthodologie :

La gamme d'étalonnage se fait comme suit : A partir d'une solution de phénol étalon mère à 1 g/l, 5 ml de cette solution sont dilués 200 fois, soit 5mg dans 1000 ml.

Nous préparons la gamme suivante :

Dans des fioles de 100 ml, nous introduisons des volumes de la solution étalon contenant : 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 mg de phénol.

Soit V (ml) le volume d'étalon de phénol est complété avec de l'eau distillée à 100 ml au quel on lui rajoute :

\* 5 ml de tampon pH=9,5,

\* 1 ml de la solution de 4-amino-pyrine, agiter ;

\* 2 ml de solution de ferricyanure de potassium, agiter ;

\*Laisser la coloration se développer à température ambiante pendant 5 mn.

\*Après 5 min, la lecture est effectuée au spectromètre à la longueur d'onde de 510 nm.

\*Tracer la courbe DO à 510 nm en fonction la concentration en phénol (mg/l)

### 4- Solution inconnue :

#### Mode opératoire :

\* 10 ml du milieu sont prélevés et centrifugés pendant 30 min à la vitesse de 6000 tr/min.

\*2 ml du surnageant sont complétés à 100 ml avec de l'eau distillée auquel on ajoute :

\* 5 ml de tampon pH=9,5,

\*1 ml de la solution de 4-amino-antipyrine, agiter ;

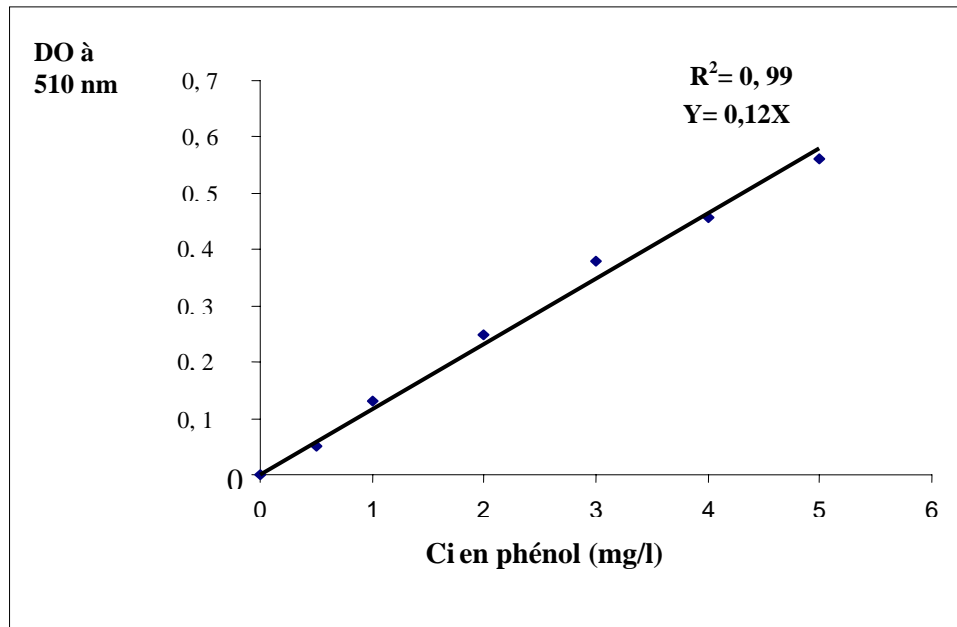
\*2 ml de solution de ferricyanure de potassium, agiter ;

## ANNEXES

\*Laisser la coloration se développer à température ambiante pendant 5 mn.

\* Après 5 min, la lecture est effectuée au spectromètre à la longueur d'onde de 510 nm.

$$C(\text{phénol}) = \frac{DO \cdot 100}{(V \text{ prélevé}) \cdot 0,12}$$



*Figure N1 : Courbe d'étalonnage du phénol*

### ANNEXE N°3 : Matériels utilisés.

- Etuve de marque MEMMERT UE -400;
- Autoclave de marque WEBECO-GMPH BAD SCHWARTAU ;
- Spectrophotomètres UV/visible de marque SHIMADZU UV MINI-1240;
- Centrifugeuse de marque MIKRO 22R HETTICH ;
- pH mètre de marque HANNE INSTRUMENTS 211 ;
- Micro filtres Minisart 0,20 µm ;
- Plaque chauffante muni d'un système d'agitation BIBBY STUART ;
- Balance de précision de marque DENVER INSTRUMENT ;
- Bec benzène.

## ANNEXES

### **ANNEXE N° 4 : Mesure de la quantité de biomasse par la méthode directe.**

L'augmentation de la population microbienne au cours de la croissance résulte de la multiplication qui peut se faire, selon des modes variables, d'un type de micro-organisme à un autre. L'étude de la croissance des bactéries est possible grâce à l'utilisation des techniques d'évaluation et de dénombrement.

Plusieurs méthodes sont disponibles. Les facteurs qui influencent le choix d'une méthode sont les propriétés de la biomasse, les caractéristiques du milieu etc...

Deux grandeurs permettent de définir ou d'estimer une population microbienne : la masse cellulaire et le nombre des cellules. Ces deux paramètres varient lors de la croissance cellulaire [36].

- **Principe :**

Lorsque des cellules sont en suspension dans un milieu liquide traversé par un faisceau lumineux monochromatique, la quantité de lumière absorbée par la suspension est proportionnelle à la concentration des cellules.

Pour déterminer la concentration en cellules d'une suspension, on utilise une méthode graphique : on mesure l'absorbance d'un échantillon, après dilution si nécessaire, et on reporte la valeur obtenue sur la droite d'étalonnage Absorbance = f (concentration en cellules) pour en déduire sa concentration.

- **Description de la méthode :**

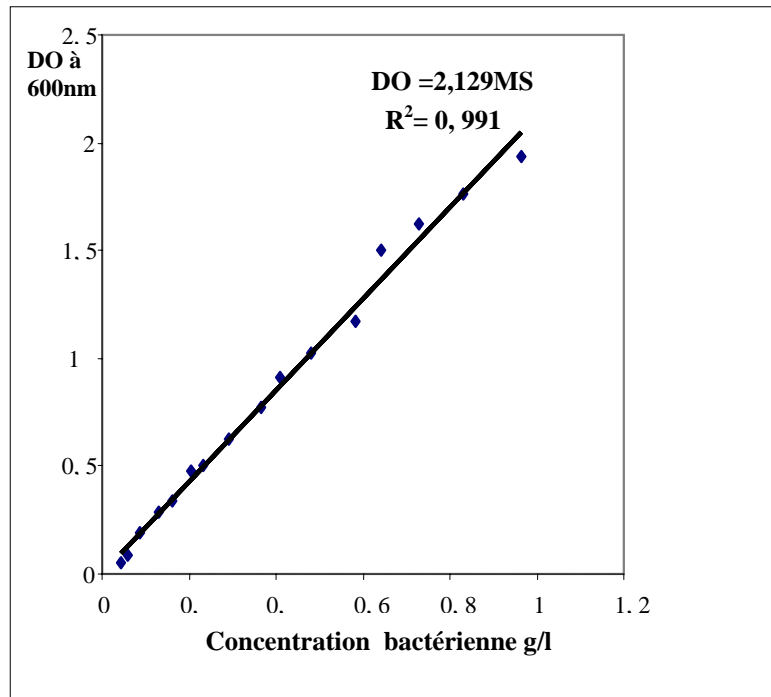
La méthode utilisée au cours de notre expérimentation est décrite comme suite :  
A la fin de l'expérience, on récupère 200 ml du milieu, qu'on centrifuge à 6000 tours/minutes pendant 30 minutes, on récupère le culot qu'on lave deux fois avec l'eau distillée stérilisée et on centrifuge à chaque lavage.

- Remettre le culot en suspension dans 60 ml d'eau distillée stérilisée.
- On pèse 50 ml du culot en suspension pour déterminer le poids en biomasse fraîche puis on sèche dans une étuve à 105 °C jusqu'à poids constant ( $m-m_0$ ), durant 18 à 24 heures pour déterminer le poids en biomasse en matière sèche.

$$C_0 = (m - m_0) / 50 \text{ml}$$

## ANNEXES

- Prendre 10 ml du culot en suspension, et à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible on détermine la densité optique de différentes dilutions de la suspension initiale (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16....), à 600 nm.
- Construire le graphique Absorbance = f (concentration en cellules).
- La courbe obtenue nous donne la correspondance entre la concentration bactérienne en solution (mg/l) et la masse sèche.



*Figure N°2 : La droite d'étalonnage : Absorbance = f [concentration de cellules.]*

## ملخص:

محتوى هذا البحث يتمثل في دراسة إزالة الفينول عن طريق تقنية جديدة والتي تتمثل في التحلل البيولوجي لهذه المادة باستعمال بكتيري *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) مثبتة على دعامة جديدة ألا وهي ألجينات الكالسيوم (عن طريق الاحتواء) .

بعد تمكننا من طريقة التجمد وياحتواء البكتيريا تابعنا دراسة تحلل الفينول بيولوجيا وذلك بتغير مختلف الشروط التجريبية المخبرية ( التركيز الأولي للملوث ، حجم الكويرات).

من هذا درسنا إعادة استعمال كويرات الألجينات، أثبتت النتائج أن التقنية أعطت إمكانيات جد حسنة مقارنة مع المعالجة المعمول بها والتي تتمثل في استعمال خلايا البكتيريا الحرة أو المثبتة على حبيبات الفحم المنشط .

مفاتيح: فينول، التخلص البيولوجي، البكتيريا، التثبيت، الألجينات والماء الملوث.

## Résumé :

Le présent travail consiste en l'étude de l'élimination du phénol par biodégradation par une bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) en appliquant une nouvelle technique, immobilisation des bactéries par inclusion dans des billes d'alginate de calcium (gel de polysaccharide).

Après avoir maîtrisé la technique de gélification et d'inclusion de bactéries, nous avons étudié la biodégradation du phénol en faisant varier différents paramètres opératoires (concentrations initiales en polluant, tailles des billes). Par la suite nous avons étudié la réutilisation des billes d'alginate.

Les résultats montrent que cette technique de traitement offre des possibilités nettement meilleurs que ceux des traitements conventionnels de cellules libres ou fixées sur du charbon actif en grains.

**Mots clefs :** phénol, biodégradation, bactéries, immobilisation, alginate, eaux usées.

## Abstract.

This work consists on the study of the phenol elimination by a new technique which is the biological treatment by bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) immobilized by inclusion in a new support which is the calcium alginate (polysaccharide). After the technique of gelation and inclusion of bacteria is controlled, the biological elimination of phenol was studied with different operating parameters (initial concentration, size of the beads).

In the next step, the elimination of phenol by reutilisation of alginate beads was studied. The results showed that this technique offers better possibilities than those of the conventional treatments of cells free or fixed on granular activated carbon.

**Keywords:** Phenol, Biodegradation, Bacteria, Immobilization, Alginate of calcium, wastes waters