

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
Département De Génie De l'Environnement
Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement
(L S T E)

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 IMMOBILISATION DE BACTERIES

Présenté par
M^{lle} Amrouche Fethia
Ingénieur d'État en Génie Chimique (USTHB)

Devant le jury :

Président :	Mme. A. HELLAL	Professeur, ENP
Directeur :	Mr. A. NAMANE	Docteur, Chargé de Cours, ENP
Examineurs :	Mme. S. ZEBOU DJ	Maître de Conférences, ENP
	Mme. F. FEZOUANE	Maître de Conférences, Boumerdès
	Mme. F. ZERROUKI	Chargée de Cours, INA

Juin 2008

ENP 10, avenue Hassen Badi, El Harrach, Alger

Au nom de Dieu le clément et qui manifeste sa clémence

Dieu est la lumière des cieux et de la terre. Cette lumière est comme un foyer dont la flamme luit au centre de glaces de cristal qui ont l'éclat d'une étoile. L'huile d'un olivier béni qui ne se trouve ni en Orient ni en Occident l'alimente. Peu s'en faut que cette huile ne s'enflamme d'elle même. C'est une lumière enveloppée de lumière. Dieu dirige vers cette lumière qui il veut. Dieu cite des exemples aux homme. Il embrasse tout.

Verset 35, Sourate ElNour.

La science est un don de dieu

Je Dédie Ce Travail À
Papa Et Maman
Ma Famille
Mes Amis

Remerciement

Je tiens en premier lieu à exprimer ma sincère gratitude au Pr. Amina Hellal, Directeur de Recherche à l'ENP, pour m'avoir accueilli dès le stage de magister au sein du Laboratoire de Sciences et Techniques Environnementales qu'elle dirige. Merci de m'avoir fait découvrir la Microbiologie et pour la confiance que vous avez su m'accorder le long de cette recherche. Je salue encore votre rigueur scientifique ainsi que vos grandes valeurs humaines. Je tiens aujourd'hui à vous remercier chaleureusement pour votre rôle dans l'élaboration de ce mémoire.

J'adresse aussi tous mes remerciements à mon promoteur Docteur Abdel Kader Namane, Chargé de cours à l'ENP. Dont la pertinence des observations a considérablement contribué à l'aboutissement de mon travail, Je salue aussi sa souplesse et l'ouverture d'esprit ainsi que son immense intérêt pour la recherche.

Je remercie tous particulièrement Madame S. Zeboudj, Maître de Conférence à l'ENP, et Madame F. Fezouane, Maître de Conférence à l'Université de Boumerdès, ainsi que Madame F. Zerrouki, Charge de Cours à l'FNA, qui ont accepté de juger ce travail.

Je voudrais montrer toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail, qui m'ont côtoyé et supporté durant ces années de formation, qui m'ont soutenu et encouragé.

Je souhaiterais enfin finir par une pensée envers mes proches, mes parents bien sûr pour leur soutien tout le long de mes études, mes sœurs et frères et toute ma famille. Je n'oublie pas non plus mes plus chers amis qui m'ont accompagné durant ces années.

Sommaire

Sommaire	I
Nomenclature	V
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	X
Introduction générale.....	1

Chapitre I : Étude bibliographique

1. État des connaissances sur le phénol	
1.1. La Pollution par le phénol	3
1.1.1. Identification du phénol	3
1.1.2. Principes de production	3
1.1.3. Utilisations.....	4
1.1.4. Sources de rejets.....	4
1.1.5. Distribution dans l'environnement	4
1.1.6. Toxicologie.....	5
1.1.7. Législation sur le phénol.....	6
1.2. Traitements des effluents phénoliques.....	6
1.2.1. Traitements physicochimiques.....	6
1.2.2. Traitements biologiques.....	6
2. Techniques d'immobilisation du matériel biologique	
2.1. Définition de l'immobilisation.....	10
2.2. Différentes techniques d'immobilisation	11
2.3. Les différents supports utilisés pour l'immobilisation	13
3. Immobilisation par inclusion des cellules dans l'Alginate de Calcium	
3.1. Technique d'inclusion des cellules.....	16
3.1.1. Définition de l'inclusion des microorganismes.....	16
3.1.2. Techniques de réalisation	16
3.2. Matrice d'Alginate de Calcium.....	18
3.2.1. Présentation de l' Alginate.....	18
3.2.2. Source de l'Alginate.....	20
3.2.3. Procédés de fabrication d'Alginate à partir des algues brunes.....	20
3.2.4. Formes commerciales de l'Alginate.....	21
3.2.5. Spécificité de l'Alginate.....	22
3.2.6. Gélification ionotropique de l'Alginate.....	22
3.2.7. Structure du gel d'Alginate de Calcium.....	23
3.3. Avantages	24
3.4. Inconvénients	25
3.5. Utilisations	26
4. Facteurs agissant sur l'immobilisation par inclusion dans Ca-Alginate	
4.1. Les facteurs influençant la technique l'inclusion	27
4.1.1. Alginate.....	27
4.1.2. Ions de Calcium.....	27

4.1.3. Temps et température de durcissement	27
4.1.4. Diamètre des particules.....	28
4.1.5. Quantité initiale des cellules immobilisées.....	28
4.1.6. Effets des conditions de culture sur les billes d'Alginate de Calcium....	28
4.1.7. Facteurs biologiques.....	30
4.2. Morphologie des billes.....	30
4.3. Principe du relargage cellulaire des billes.....	31
4.4. Distribution et performance de la biomasse dans les billes de gel.....	31
4.5. Dynamique de croissance et physiologie des cellules immobilisées.....	32
5. Dynamique de croissance bactérienne	
5.1. La croissance bactérienne.....	33
5.1.1. Modèles mathématiques de la cinétique bactérienne.....	34
5.2. Rendement de biodégradation.....	36

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel.....	37
1.1. Matériel biologique.....	37
1.2. Réactifs et matériel utilisés.....	37
1.3. Dispositif expérimental.....	37
2. Méthodes.....	38
2.1. Protocole expérimental de l'immobilisation	38
2.1.1. Mise en œuvre de l'inoculum.....	38
2.1.2. Préparation de la solution d'alginate de sodium.....	39
2.1.3. Préparation de la solution de chlorure de calcium.....	39
2.1.4. Élaboration des billes.....	39
2.2. Méthode d'analyses.....	43
2.2.1. Mesure de la densité bactérienne.....	43
2.2.2. Dosage du phénol.....	43
2.2.3. Analyse par HPLC.....	43
2.2.4. Analyse par microscope optique.....	44
2.2.5. Méthode d'identification des bactéries.....	44

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Caractérisation de la bactérie SB6.....	45
1.1. Description de la colonie et coloration de Gram	45
1.2. Galeries biochimiques.....	46
2. Étude de la biodégradation du phénol par des bactéries SB6 libres.....	48
2.1. L'effet de l'adaptation des bactéries SB6 libres au phénol sur la biodégradation.....	48
2.2. L'effet de la concentration sur la biodégradation du phénol par des bactéries SB6 libres.....	49
2.3. Calcul des constantes cinétiques	51

2.3.1. Modèle de Monod.....	51
2.3.2. Modèle d'Andrew.....	52
3. Cinétique d'adsorption du phénol par les billes d'alginate.....	53
4. Cinétiques de la biodégradation du phénol par des bactéries libres et immobilisées.....	54
4.1. Cellules non adaptées au phénol.....	55
4.2. Cellules adaptées au phénol	56
5. L'effet de l'adaptation des bactéries SB6 immobilisées à différentes concentrations en phénol sur la biodégradation.....	57
6. L'effet du pourcentage en Alginate de Sodium sur la biodégradation du phénol.....	59
6.1. Analyse par microscope optique de la surface des billes de différentes concentrations en Alginate de sodium Fluka.....	60
7. L'effet du pourcentage en chlorure de calcium sur la biodégradation du phénol.....	61
8. L'effet du temps de durcissement des billes sur la biodégradation du phénol.....	63
9. L'effet du diamètre des billes sur la biodégradation du phénol.....	64
10. L'effet de la biomasse immobilisée sur la biodégradation du phénol.....	67
11. Influence de la concentration sur la biodégradation du phénol par des bactéries SB6 immobilisées.....	68
12. Comparaison entre les cinétiques de biodégradation du phénol par les bactéries SB6 libres et immobilisées.....	69
13. Étude de la différence entre deux alginates distinctes sur la biodégradation du phénol par les bactéries SB6 immobilisées	70
14. Cinétiques de la biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisées par inclusion dans l'alginate de calcium.....	71
15. Comparaison entre les cinétiques de biodégradation de différentes concentrations du phénol par les bactérie autochtones SB6 et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisées.....	73

16. Amélioration de quelques paramètres pour la biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisées.....	74
16.1. Cinétiques de biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> libres et immobilisées	74
16.2. Changement de milieu de culture minéral pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75
16.3. Cinétiques de biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisées adaptées à 100 mg.L ⁻¹ et à 400 mg.L ⁻¹ de phénol	77
16.4. Effet du changement d'alginate de sodium sur la biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisées.....	78
17. Analyses par microscope optique des billes d'alginate de calcium.....	80
17.1. Avant culture et à la surface externe de la bille.....	80
17.2. Après une culture de 300 mg.L ⁻¹ de phénol.....	80
17.2.1. À la surface externe de la bille.....	80
17.2.2. À l'intérieur des billes.....	81
17.3. Après une culture de 3000 mg.L ⁻¹	82
17.3.1. À la surface externe de la bille.....	82
17.3.2. À l'intérieur de la bille.....	83
18. Analyses chromatographiques.....	84
Conclusion générale.....	86
Références bibliographique.....	88
Annexe.....	102

Nomenclature

Abréviations

ADH	Arginine Décarboxylase
AMY	Amygdaline
ARA	Arabinose
ATCC	American Type Culture Collection
Ca-Alginate	Alginate de calcium
Ca-Pectate	Pectate de calcium
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMC	Carboxymethyl cellulose
13C-NMR	Spectroscopie de Résonance Magnifique Nucléaire - basée sur la résonance du Carbone
COV	Composés Organiques Volatils
DEAE	Diethylamino Ethyl
DO	Densité Optique
EC	Commission Européenne
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPA	Agence de Protection de l'Environnement
EPS	Exopolysaccharide
GEL	Gélatine
1H-NMR	Spectroscopie de Résonance Magnifique Nucléaire - basée sur la résonance de l'Hydrogène
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
LDC	Lysine Décarboxylase
INO	Inositol
imm	immobilisées
MEL	Melibiose
NaCl	Chlorure de sodium
ODC	Ornithine Décarboxylase
ONPG	Orthonitrophényl-galactose
<i>P. aeruginosa (PA)</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PEI	Polyethyleneimine
PVA	Polyvinylalcohol
PVC	Chlorure de polyvinyle
PVI	Poly(4vinylimidazole)
PVP	Poly(vinylpyridine)
ppb	Partie par billion
ppm	Partie par million
RHA	Rhamnose
SAC	Saccharose
SB6	Souche bactérienne autochtone
SOR	Sorbitol
TDA	Tryptophane Désaminase
TSI	Triple Sugar Iron
VP	Voges-Proskauer
UV	Ultraviolet

Alphabets

d	Diamètre des billes
K_s	Constante de la saturation du substrat (g.L ⁻¹)
K_i	Constante d'inhibition (g.L ⁻¹)
S	Concentration en substrat (g.L ⁻¹)
S₀	Concentration initiale du substrat (g.L ⁻¹)
S_f	Concentration finale du substrat (g.L ⁻¹)
t	Temps (h)
t_g	Temps de génération (h)
R	Rendement de biodégradation (%)
V	Volume (L)
X	Concentration cellulaire (g.L ⁻¹)
X₀	Concentration cellulaire initiale (g.L ⁻¹)

Symboles chimiques

CaCl₂	Chlorure de calcium
(C₆H₇O₆ - Ca_z)_n	Alginate de Calcium
(C₆H₇O₆ - Na_z)_n	Alginate de Sodium
C₆H₆O	Phénol
CO₂	Dioxyde de carbone (gaz)
H₂O	Eau
HCl	Acide chlorhydrique
NaOH	Hydroxyde de sodium -Soude caustique-
Na₂CO₃	Carbonate de sodium
NH₄	Ammonium
NO₃	Nitrate

Symboles grecques

μ	Taux de croissance (h ⁻¹)
μ_{max}	Taux de croissance maximale (h ⁻¹)

Liste des figures

Figure 1 : Voies métaboliques de la dégradation du cycle aromatique dans cas du phénol [41,71,73].....	8
Figure 2 : Classification des techniques d'immobilisation [77,79].....	10
Figure 3 : Schéma de la mise en œuvre des méthodes d'émulsion et d'extrusion dans le cas de l'alginate de sodium réticulée avec une solution de chlorure de calcium [131].....	17
Figure 4 : Représentation de l'acide β -D-mannuronique (M) et l'acide α -L-guluronique (G) [153].....	19
Figure 5 : Structure chimique des Alginates : Conformations du poly G-Blocs (à gauche), poly M-Blocs (à droite) et blocs mixtes MG (au centre) [153,155,156].....	19
Figure 6 : Représentation du diagramme simplifié des deux procédés de production d'alginate à partir des algues brunes [137].....	21
Figure 7 : Schéma du modèle "boîtes à oeufs" [147,173].....	24
Figure 8 : En haut, la représentation de la transformation d'une bille d'alginate de calcium en acide alginique, en bas, la corrélation entre le pH et la perte de poids [153]....	29
Figure 9 : Les phases de croissance établies par Buchanan (1918) [195].....	33
Figure 10 : Photo du dispositif expérimental.....	38
Figure 11 : Schéma synoptique descriptif de la méthode d'immobilisation.....	40
Figure 12 : Illustration des étapes de réalisation de l'immobilisation des bactéries dans un support sphérique d'alginate de calcium.....	42
Figure 13 : Boîte de Pétri représentant la culture de SB6.....	45
Figure 14 : Résultat de la coloration de Gram	45
Figure 15 : Représentation des tests et des résultats des galeries biochimiques.....	46
Figure 16 : Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries SB6 libres adaptées et non adaptées au phénol.....	48
Figure 17 : Cinétiques de croissance de SB6 libres adaptées et non adaptées au phénol.....	48
Figure 18 : Influence des concentrations initiales sur la cinétique de biodégradation.....	49
Figure 19 : Influence des concentrations initiales sur la cinétique de croissance.....	50
Figure 20 : Taux de croissance de SB6 libres à différentes concentrations initiales en phénol.....	50
Figure 21 : Durée de la phase de latence en fonction de la concentration initiale en phénol	51
Figure 22 : Les constantes cinétiques déterminées par l'application du modèle de Monod.	52
Figure 23 : Les constantes cinétiques déterminées par l'application du modèle d'Andrew.	52
Figure 24 : Cinétique d'adsorption du phénol par des billes d'alginate de calcium déterminée à 510 nm	53
Figure 25 : Cinétique d'adsorption du phénol par des billes d'alginate de calcium déterminée à 270 nm.....	54
Figure 26 : Cinétiques de biodégradation du phénol par des cellules libres et immobilisées non adaptées au phénol	55
Figure 27 : Effet du non adaptation des bactéries SB6 libres et immobilisées sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées.....	55
Figure 28 : Cinétiques de biodégradation du phénol par des cellules SB6 libres et immobilisées adaptées à 100 mg.L ⁻¹ de phénol.....	56
Figure 29 : Effet de l'adaptation des bactéries SB6 libres et immobilisées sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées.....	57

Figure 30 : Influence de l'adaptation des bactéries sur la cinétique de biodégradation.....	58
Figure 31 : Effet de l'adaptation des bactéries SB6 sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées.....	58
Figure 32 : Effet du pourcentage en alginate de sodium sur la cinétique de biodégradation du phénol.....	59
Figure 33 : Effet du pourcentage en alginate de sodium sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que la concentration des cellules relarguées.....	60
Figure 34 : Photos de la surface des billes d'alginate de calcium (X 250).....	61
Figure 35 : Effet du pourcentage en chlorure de calcium sur la cinétique de biodégradation du phénol.....	62
Figure 36 : Effet du pourcentage en chlorure de calcium sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que la concentration des cellules relarguées.....	62
Figure 37 : Effet du temps de durcissement des billes d'alginate de calcium sur la cinétique de biodégradation du phénol.....	63
Figure 38 : Effet du temps de durcissement des billes d'alginate de calcium sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées.....	64
Figure 39 : Photos représentant l'effet du diamètre d'extrusion sur le diamètre des billes...	65
Figure 40 : Effet des diamètres des billes sur la cinétique de biodégradation du phénol.....	66
Figure 41 : Effet des diamètres des billes sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées.....	66
Figure 42 : Effet de la biomasse immobilisée sur la cinétique de biodégradation du phénol.....	67
Figure 43 : Effet de la biomasse immobilisée sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que la concentration des cellules relarguées.....	68
Figure 44 : Cinétiques de biodégradation du phénol à différentes concentrations initiales..	69
Figure 45 : Comparaison entre les cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries libres et immobilisées.....	70
Figure 46 : Comparaison entre les cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries SB6 immobilisées par différents alginate de sodium.....	71
Figure 47 : Influence de la concentration initiale sur la cinétique de biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
Figure 48 : Comparaison entre les cinétiques de biodégradation du phénol à différentes concentration initiales par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et SB6.....	73
Figure 49 : Comparaison entre les cellules relarguées pour les deux bactéries.....	74
Figure 50 : Cinétiques de biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> libres et immobilisées adaptées à 100mg.L ⁻¹ de phénol.....	75
Figure 51 : Cinétiques de biodégradation du phénol dans deux milieux de culture minéral par les bactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisées.....	76
Figure 52 : Effet du changement de milieu sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que la concentration des cellules relarguées.....	77
Figure 53 : Cinétiques de biodégradation du phénol par des cellules <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisées adaptées à différentes concentrations en phénol.....	78
Figure 54 : Cinétiques de biodégradation du phénol par les cellules <i>Pseudomonas aeruginosa</i> immobilisées par l'alginate Sigma et Fluka.....	79

Figure 55 : Photographies de la surface externe de la bille.....	80
Figure 56 : Photographies de la surface externe de la bille.....	80
Figure 57 : Photographies du cœur de la bille après une culture de 300 mg.L ⁻¹	81
Figure 58 : Photographies de la surface interne de la bille après une culture de 300 mg.L ⁻¹	82
Figure 59 : Photographies de la surface externe de la bille après une culture de 3000 mg.L ⁻¹	83
Figure 60 : Photographies de l'intérieur de la bille après une culture de 3000 mg.L ⁻¹ de phénol.....	83
Figure 61 : Chromatogramme de la solution étalon (phénol- eau distillée).....	84
Figure 62 : Chromatogramme de la solution étalon (phénol- milieu minéral).....	84
Figure 63 : Chromatogramme de l'échantillon après biodégradation.....	85

Liste des tableaux

Tableau 1 : La répartition théorique du phénol dans l'environnement [34].....	5
Tableau 2 : Comparaison entre différentes techniques d'immobilisation [77,96].....	12
Tableau 3 : Représentation de quelques exemples de supports et leurs caractéristiques	13
Tableau 4 : Illustration de la technique d'immobilisation et exemples de support lui correspondant utilisés.....	14
Tableau 5 : Caractéristiques techniques d'extrusion et d'émulsion [131].....	17
Tableau 6 : Les compositions des Alginate obtenues de différentes espèces d'algues, d'après la classification de Smidsrod et Draget 1996 [154, 147].....	20
Tableau 7 : Variation de la viscosité (mPa.s) en fonction de la concentration de la solution d'alginate de sodium à 20°C [137].....	27
Tableau 8 : Les conditions chromatographiques de fonctionnement.....	44
Tableau 9 : Résultats des analyses biochimiques	47
Tableau 10 : Paramètre de croissance bactérienne.....	49
Tableau 11 : Paramètre de croissance bactérienne.....	50
Tableau 12 : Conditions opératoires.....	54
Tableau 13 : Conditions opératoires.....	57
Tableau 14 : Conditions opératoires.....	59
Tableau 15 : Conditions opératoires.....	61
Tableau 16 : Conditions opératoires.....	63
Tableau 17 : Conditions opératoires.....	65
Tableau 18 : Conditions opératoires.....	67
Tableau 19 : Conditions opératoires.....	69
Tableau 20 : Conditions opératoires.....	71
Tableau 21 : Conditions opératoires.....	72
Tableau 22 : Conditions opératoires.....	75
Tableau 23 : Conditions opératoires.....	76
Tableau 24 : Conditions opératoires.....	78
Tableau 25 : Conditions opératoires.....	79

Introduction générale

L'un des problèmes majeurs du 21^{ème} siècle est la pollution qui ravage notre environnement et menace notre propre existence. Cette dernière est causée principalement par une forte industrialisation qui rejette des polluants toxiques sans se soucier de leurs effets.

Comme la majorité des polluants, les composés phénoliques sont très dangereux, ils se trouvent dans les effluents de nombreuses industries telles que les industries chimiques et pétrochimiques, des explosifs, celles des résines et des cokeries, des pesticides, du textile, du papier et même dans l'industrie pharmaceutique et beaucoup d'autres [1,2]. C'est pour cela que ce sont les polluants les plus fréquemment rencontrés dans les rivières, les eaux marines, les rejets industriels, les effluents urbains et même dans les nappes phréatiques contaminées [3,4,5].

Connaissant la toxicité du phénol et de ses dérivés, une législation stricte a été mise en place par beaucoup d'organismes pour limiter sa présence dans la nature.

Pour neutraliser ces polluants, des méthodes de traitement ont été pensées et réalisées. Pour certains traitements tels que physicochimiques, des inconvénients sont notés tel que le rendement limité, la génération de sous produits nocifs ou la régénération des matières premières utilisées, ou alors un coût de réalisation élevé [6]. Ainsi une alternative très prometteuse et efficace qui est simple et peu coûteuse se reflète dans le traitement biologique [7].

Cette méthode d'élimination qui est la biodégradation consiste à utiliser des microorganismes qui ont la capacité de dégrader le polluant et donc de le métaboliser en substances non toxiques grâce à des réactions biochimiques [8].

La biodégradation peut s'effectuer en utilisant des bactéries en suspension (libres) ou bien immobilisées dans ou sur différents supports. Pour le premier procédé déjà utilisé dans le cas des boues activées et dans les réacteurs agités plusieurs problèmes peuvent survenir comme celui de la nécessité d'avoir une concentration élevée en biomasse et donc des volumes de réacteurs importants, ainsi qu'une vitesse et un rendement globale de conversion limités suite à l'inhibition des bactéries face aux fortes concentrations de phénol [2].

C'est pour cela que l'on privilégie le second procédé, celui de l'immobilisation, qui est la fixation des cellules vivantes sur des supports poreux, par différentes techniques. Cette méthode permet d'avoir une forte concentration cellulaire avec des volumes de réacteurs et de temps de séjours fortement réduits [9], un effet inhibiteur restreint suite aux limitations diffusionnelles, et qui permet aussi la réutilisation des cellules aussi longtemps qu'elles gardent leurs activités [10]. Elle facilite la mise en œuvre en continu du procédé de traitement biologique et permet d'avoir une productivité et un rendement élevés.

Parmi les techniques d'immobilisation, l'inclusion des cellules sur des supports de polysaccharide notamment l'alginate de calcium est très utilisée, car elle est simple à réaliser

et n'affecte aucunement ni l'activité, ni la viabilité des cellules vivantes, sachant que ce polymère a de très bonnes caractéristiques physicochimiques en plus d'un coût faible [11].

Dans le cadre de ce travail, nous réaliserons des essais de biodégradation du phénol, par des bactéries immobilisées par inclusion dans des billes sphériques d'alginate de calcium en mode batch. Afin d'optimiser la cinétique de biodégradation, nous varierons les différents paramètres intervenant dans ce processus.

Tout le long de notre travail, nous essayerons de mettre en évidence la supériorité de cette technique par rapport à celle d'une culture de bactéries libres. Nous nous intéresserons aussi à l'influence de la morphologie des billes sur le mécanisme de biodégradation.

Ce document comporte trois chapitres. Le premier chapitre présente une étude des principales données bibliographiques concernant, le phénol dans l'environnement, ainsi que quelques éléments relatifs aux traitements et surtout biologiques de ce dernier, puis nous ferons une brève étude bibliographique sur la méthode d'immobilisation et des différents supports utilisés, nous aborderons une étude théorique sur la méthode d'immobilisation par inclusion sur un support d'alginate de calcium, nous essayerons aussi de comprendre les paramètres qui influencent le rendement de cette méthode et enfin étudierons la cinétique de biodégradation. L'ensemble du matériel et des méthodes utilisés pour la culture et l'étude de la composition est ensuite décrit dans le deuxième chapitre. Dans le troisième et dernier chapitre, nous exposerons et discuterons l'ensemble des résultats expérimentaux relatifs aux cinétiques de biodégradation réalisées avec les différents paramètres et nous établirons au fur et mesure les paramètres optimaux pour le meilleur rendement de biodégradation.

Chapitre I : Étude bibliographique

1. État des connaissances sur le phénol

Les risques liés à la pollution par le phénol sont connus de nos jours, et leurs maîtrises résident dans la prévention et le traitement de cette dernière. Pour réaliser notre travail, il est donc indispensable d'établir une recherche bibliographique concernant ce polluant, ainsi que les traitements appliqués pour l'éliminer, en s'intéressant tout particulièrement au traitement biologique qui constitue le fondement de notre étude.

1.1. LA POLLUTION PAR LE PHENOL

1.1.1. Identification du phénol

Les phénols ont une formule générale de ArOH (ou Ar est un groupe qui inclus un ou plusieurs groupements benzoïques) dont le premier terme qui est le phénol a une formule brute de C₆H₆O [12].

Le phénol est une molécule organique aromatique naturelle ou de synthèse [13]. Il a une odeur douceâtre [12]. À l'état pur, c'est un solide à température ambiante, mais il reste le plus souvent liquide en solutions [14]. Il porte aussi les noms de : hydroxybenzène, acide phénique, acide carbolique [1]. Ces caractéristiques physiques et chimiques sont données en annexe 1.

1.1.2. Principes de production

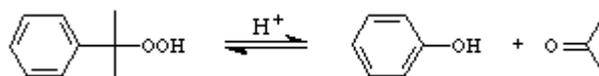
Le phénol fut d'abord essentiellement extrait du goudron de houille. Ensuite, quand la demande n'a cessé de croître, il fut synthétisé. Il existe plusieurs méthodes de production du phénol, mais seules deux d'entre elles sont mises en oeuvre industriellement :

- La méthode de Hock : Elle fût découverte en 1944 par Hock et Lang et elle est exploitée depuis les années 50. Cette synthèse qui est actuellement utilisée à plus de 85% dans le monde [14] a lieu en trois étapes indépendantes:

- 1) La première consiste à oxyder le cumène par de l'air, elle aboutit à la formation d'hydroperoxyde de cumyle [15, 16] :



- 2) La seconde, est la scission de l'hydroperoxyde de cumyle en phénol et acétone en milieu acide suivant la réaction exothermique suivante [15, 16] :



- 3) La troisième est la séparation du phénol et de l'acétone [15], sachant que l'on obtient 0,6 tonne d'acétone par tonne de phénol [16].

- La méthode "Dow" qui consiste à oxyder du toluène pour former de l'oxyde benzoïque. Une décarboxylation oxydante permet d'obtenir ensuite du phénol [15].

1.1.3. Utilisations

Le phénol est principalement utilisé en synthèse organique. Il trouve ainsi une large gamme d'applications, notamment comme matière première dans la fabrication d'autres substances comme : l'alkylphénols, l'acide salicylique, le diphényl-éthers de chlorophénols, l'acide adipique, l'aniline, la phénolphtaléine, l'acide picrique [15], le bisphénol utilisé dans la synthèse des résines phénoliques [17,18,19,20] et le caprolactame utilisé dans la fabrication du nylon, et beaucoup d'autres. Cependant, le phénol est aussi utilisé pour la fabrication d'explosifs [12,20], d'adhésifs [21], de céramique [22,23], de coke [7,24], de peintures et de décapants [7,25], de textiles [26], d'engrais et de pesticides [7,27], de gaz d'éclairage [1], d'agents de préservation du bois [9], etc.

Le phénol sert aussi d'anesthésiant et d'antiseptique [21] et est même utilisé pour des préparations pharmacologiques ainsi que pour l'élaboration de parfums et de bakélite [1,28].

1.1.4. Sources de rejets

1.1.4.1. Sources naturelles

Le phénol peut être naturellement présent dans l'eau et le sol en tant que produit de la décomposition des végétaux ainsi que des déchets végétaux et animaux [1,3]. Les incendies de forêt peuvent en augmenter les concentrations naturelles [1].

1.1.4.2. Sources anthropiques

La présence de phénol dans l'environnement provient des eaux résiduaires et des flux d'air rejetés lors de la production, de la transformation ou de l'utilisation du phénol comme intermédiaire de synthèse et cela dans l'industrie chimique [29,15], pharmaceutique [30], celle du pétrole et de la pétrochimique [31,32,33] ainsi que dans l'industrie du charbon [32]. La combustion incomplète dans le cycle des moteurs thermiques émet aussi des phénols [34] ainsi que la combustion du bois et tabac [1, 15]. La dégradation des COV (Composés Organiques Volatils) comme le benzène produit jusqu' à 50 % de phénol dans l'atmosphère [35].

1.1.5. Distribution dans l'environnement

Le phénol est un polluant ubiquitaire, donc il peut être détecté dans tout l'environnement à différentes concentrations:

- **Air** : On possède très peu de données sur les concentrations de phénol dans l'air ambiant, mais ces données montrent que celles ci sont très faibles de l'ordre de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$, sauf à proximité des sources émettrices ponctuelles comme les zones urbaines à fort trafic routier et les zones industrielles où des concentrations importantes peuvent être détectées [1].
- **Sols** : On possède peu de données attestant de la présence de phénol dans le sol, parce qu'il est rapidement adsorbé/désorbé, oxydé mais plus généralement biodégradé ou drainé dans l'eau et/ou volatilisé dans l'air [1].

- **Eaux** : C'est le polluant le plus fréquemment trouvé dans les rivières [3, 30,36], eaux marines, les effluents industriels [3, 4], et urbains et même dans les nappes phréatiques, avec des concentrations variant de quelques ppm jusqu' à $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ et pouvant atteindre $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ [5] dans le cas de pollution typique ou accidentelle (valeurs extrêmes pour certains effluents d'industries chimiques et pétrochimiques) [2].
- **Sédiments** : Il n'existe pas suffisamment de données montrant la présence de phénol dans ces derniers, mais elle est estimée très faible et il y a peu de chance que celui ci s'y accumule [15].

Le tableau suivant représente la répartition théorique du phénol dans l'environnement suivant le model de répartition de Mackay [34].

Tableau 1 : La répartition théorique du phénol dans l'environnement [34]

Milieu	Pourcentage (%)
Air	0,8
Eaux	98,8
Sols	0,2
Sédiments	0,2

1.1.6. Toxicologie

Le phénol a été classé comme polluant toxique pour les microorganismes, animaux, végétaux et les êtres humains à différentes concentrations [32,37].

1.1.6.1. Hommes

Le contact cutané et oculaire avec des solutions de phénol entraîne de sévères brûlures [21]. L'inhalation de vapeurs a un effet caustique sur les voies respiratoires et les poumons. L'exposition prolongée entraîne une paralysie du système nerveux central ainsi que des atteintes rénales et pulmonaires, cette paralysie peut finalement entraîner la mort. L'intoxication s'accompagne de symptômes tels que maux de tête, bourdonnements, vertiges, troubles gastriques et intestinaux, étourdissement, collapsus, empoisonnement, perte de conscience, respiration irrégulière, défaillance respiratoire, troubles cardiaques, et parfois convulsions [15]. L'ingestion de 1g de phénol est létale pour les êtres humains [37].

1.1.6.2. Animaux

D'après les études réalisées, le rein semble l'organe cible de la toxicité attribuable au phénol. Parmi les autres effets sensibles observés chez les animaux de laboratoire, il y a les transformations histopathologiques du foie et du thymus, la réduction du nombre de certaines cellules du sang, la suppression de la réaction immunitaire et des effets néfastes sur le système nerveux [1].

À des faibles concentrations de $5\text{-}25 \text{ mg.L}^{-1}$, il peut mettre en danger la vie des poissons [22, 37,38].

1.1.6.3. Végétaux

Perturbation de la perméabilité passive; inhibition de la croissance [28].

1.1.7. Législation sur le phénol

Une concentration maximale admissible du phénol de 1ppb [6, 20,23] pour les eaux de surfaces, a été établie par l'agence américaine de protection de l'environnement EPA en revanche pour la communauté européenne, on tolère une concentration maximale totale en phénol dans les eaux potables de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (directive 80/778/EC) [7].

L'Algérie tolère une concentration maximale des phénols de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ pour les rejets industriels (décret exécutif N° 93-160 du 10 juillet 1993) [39].

1.2. TRAITEMENTS DES EFFLUENTS PHENOLIQUES

Pour éliminer le phénol qui se trouve principalement dans l'eau, plusieurs techniques de traitement ont été élaborées, procédés en constante évolution afin d'améliorer leurs efficacités.

Ce dernier peut être éliminé avec ou sans possibilité de récupération selon les moyens employés pour le faire, reste que les techniques de son traitement sont classées en deux catégories selon la mise en œuvre :

1.2.1. Traitements physicochimiques

Les traitements physicochimiques correspondent le plus souvent à des traitements appliqués aux eaux résiduaires brutes[8]. On peut citer parmi ces techniques : la filtration [8,40], la chloration [6,32], la séparation par membrane [32], l'oxydation [20,28], la photocatalyse [28,41], l'ozonation [7,32], la radiation UV [28], l'échange d'ion [7,42], l'extraction par solvant [20,32] l'adsorption[32] (charbon actif [7,20,42]), la coagulation [32], la sédimentation [40,41], la flottation [40], la floculation [6,32].

Une combinaison de ces méthodes de traitement est parfois indispensable pour aboutir à de bons résultats [40]. Suivant la méthode de réalisation des traitements physicochimiques, des inconvénients peuvent apparaître comme :

- ✓ Un rendement technique d'élimination limité [9].
- ✓ La génération de sous-produits polluants [9, 21] comme les cyanates, phénol chlorinés, les hydrocarbonés [6, 32], etc.
- ✓ La nécessité de la régénération des matières premières utilisées [7],
- ✓ Un coût de conception [6, 9, 22,32] et de maintenance [2, 8] élevés.

C'est pour cela que nous nous intéressons à la seconde méthode de traitement qui est :

1.2.2. Traitements biologiques

Leur importance dans le cas du traitement du phénol n'est plus à démontrer [20, 24,43]. Les traitements biologiques ont pour but d'éliminer la matière organique dissoute par l'action de microorganismes [8]. La pollution joue le rôle de substrat (source de carbone) et d'apport énergétique [20, 44]. L'ensemble des réactions chimiques est catalysé par les enzymes sécrétées par les microorganismes qui, par ailleurs, leur servent de support [40].

Cette méthode efficace [7,45], simple, peu coûteuse et facile à réaliser [7, 21,46] est parfaitement appropriée pour le cas du traitement du phénol [37, 45].

La biodégradation des phénols par les microorganismes a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell [41]. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter [29, 44]. En se basant sur la fréquence d'isolement, les genres bactériens prédominants sont *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligènes*, *Vibro*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacteria*, et *Nocardia* [41,47,48,49,50]. Ces organismes dégradant les hydrocarbures sont ubiquistes [41], ils ont même été rencontrés dans les écosystèmes extrêmes comme les régions polaires [51], les déserts [52,53] ou les sources chaudes [54,55]. Sachant que des bactéries sont capables de dégrader les phénols à des concentrations allant jusqu'à plus de 3g.L^{-1} [5,56].

La capacité de se développer sur les phénols ne se limite pas uniquement aux bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de dégrader ces polluants [41] à des concentrations variant de 100mg.L^{-1} jusqu'à plus $1,7\text{g.L}^{-1}$ [22,57,58,22,59].

Signalons enfin que certaines micro-algues sont capables d'attaquer les phénols, citons l'exemple de *Protatheca zopfii* qui a été étudiée par Walker et Coll., [60] ainsi que par Takahiro et Coll., [61], et qui arrive à dégrader 40 % du pétrole brut.

Cependant parmi les microorganismes aptes à se développer sur les phénols, les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser ces substrats [1, 62]. Et cela en utilisant des cultures pures ou mixtes [30, 37, 46, 63, 64].

1.2.2.1. La biodégradation du phénol

➤ Mécanisme de la biodégradation

La biodégradabilité des phénols est un phénomène bien maîtrisé dans les épurations biologiques aérobies [20, 23] pour peu que l'alimentation en ces composés soit relativement constante et qu'il n'y a pas coprésence d'agents inhibiteurs. En cokerie, on peut ainsi traiter directement les eaux ammoniacales du procédé, contenant jusqu'à $2,5\text{g.L}^{-1}$ de phénols avec un rendement d'élimination supérieur à 99,5% [33].

Les microorganismes ont des capacités enzymatiques qui leur permettent d'oxyder les composés aromatiques et polyaromatiques [65, 66, 59,67]. Les bactéries oxydent initialement ces composés aromatiques par l'incorporation de deux atomes d'oxygènes dans le substrat pour former des dihydrodiols de configuration cis [41, 68]. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la dioxygénase. L'oxydation des cis-dihydrodiols conduit à la formation de catéchols [41,68].

Le catéchol est donc l'intermédiaire le plus important qui résulte du métabolisme de biodégradation du phénol par différents microorganismes. Généralement, deux modes d'attaque pour le clivage du catéchol sont possibles selon les bactéries concernées. L'oxydation se traduit par une rupture ortho [20,56,69] ou ce qu'ont appelé l'orthofission (rupture de la liaison entre les deux carbones portant les groupements hydroxyles) ou meta [23,56,70,71] communément appelée la metafission (rupture d'une liaison entre un carbone portant un groupement hydroxyle et le carbone immédiatement voisin ne portant pas de groupement hydroxyle) du cycle qui est assuré par une autre dioxygénase [41,71,72,73], comme le montre la figure 1 qui représente les voies métaboliques de la dégradation du cycle aromatique dans cas du phénol.

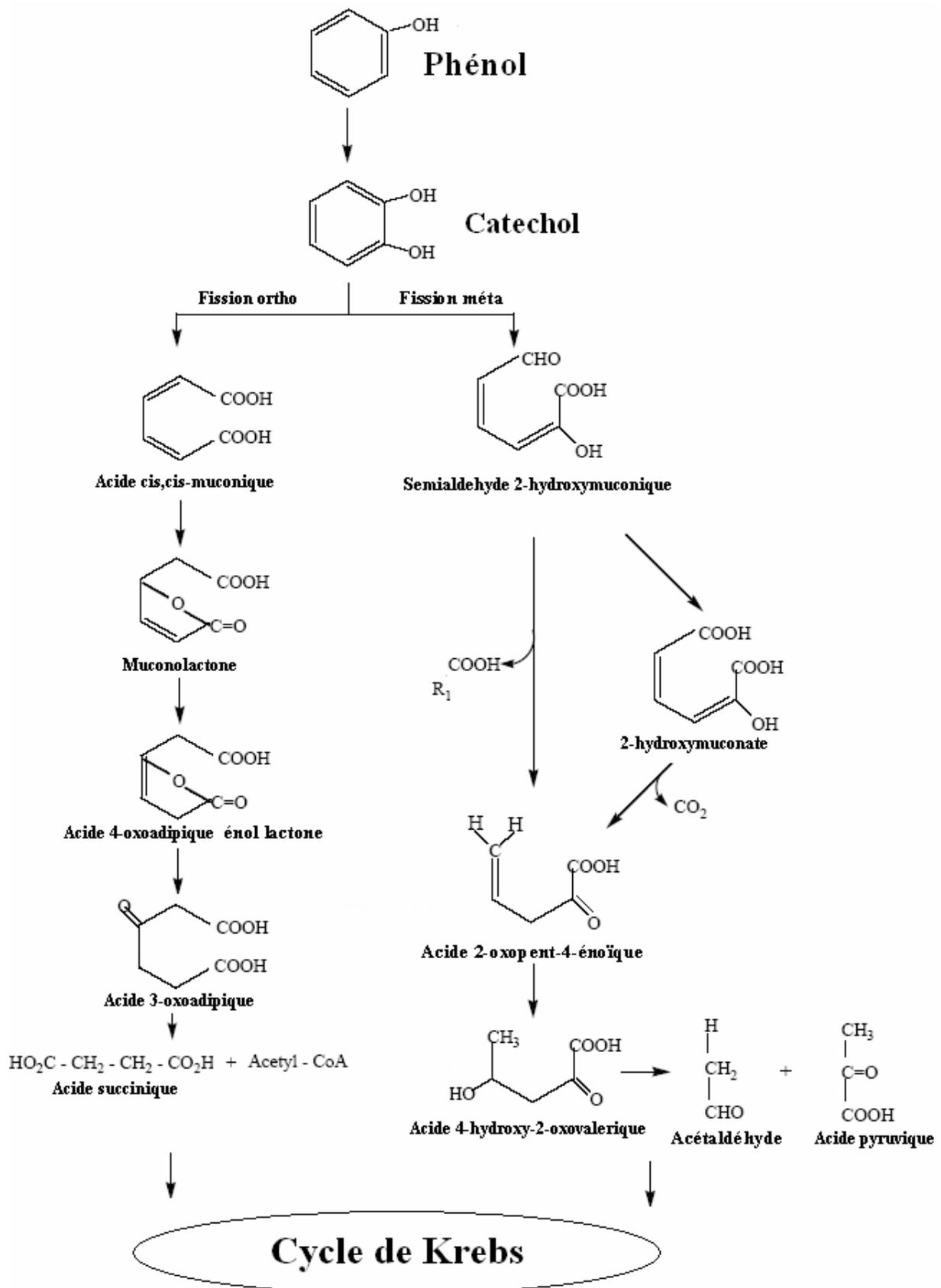


Figure 1 : Voies métaboliques de la dégradation du cycle aromatique dans cas du phénol [41, 71,73]

La biodégradation des phénols par voie anaérobie est possible [19, 23] et fait l'objet d'études de développement qui ne semblent pas intéresser les effluents de raffinage et de la pétrochimie en raison des trop faibles concentrations rencontrées [33].

Les bactéries aérobies sont plus efficaces pour dégrader les composés toxiques car elles se multiplient plus rapidement que celles anaérobies et transforment toujours les composés organiques en composés inorganiques (CO_2 , H_2O) [36, 46, 63].

➤ Les différentes méthodes de réalisation

La mise en œuvre d'un système de traitement biologique dépend du déploiement des cellules vivantes, qui peuvent être soit utilisées en [9, 74]:

- **culture libre** : dans l'effluent à traiter, les bactéries sont dispersées sous forme de floes.
- **culture fixée** : Les bactéries sont immobilisées sur des supports poreux ou emprisonnées dans des matrices.

La biodégradation du phénol peut s'effectuer dans une culture en batch c'est à dire dans un réacteur fermé, Fed batch (réacteur alimenté) ou bien en continu.

Les techniques qui utilisent des cultures libres pour l'élimination du phénol comme les boues activées, imposent une maintenance de la concentration cellulaire, la purge de l'excès de boues ainsi que leur recyclage. Des problèmes peuvent surgir comme, la sédimentation des boues [32], la limitation du rendement global due à l'inhibition par des concentrations élevées en phénol [2], etc.

Tous ces inconvénients seront éliminés si nous utilisons des cellules immobilisées dans des matrices solides poreuses [32]. Car contrairement aux cultures libres, les cultures fixées bénéficient de plusieurs avantages dont la réutilisation de la biomasse tant qu'elle reste active, une grande vitesse de conversion [75], une concentration cellulaire élevée [9, 75] avec un volume et un temps de séjours du réacteur réduits, sans oublier la diminution de l'effet inhibiteur par la création d'un microenvironnement surfacique où la concentration du phénol est plus faible qu'à l'extérieur et cela suite aux limitations diffusionnelles [2, 75]. Sachant aussi, que le traitement biologique par des cellules immobilisées facilite non seulement la mise en œuvre batch mais aussi celle en continue en améliorant le rendement [2]. C'est pour cela que plusieurs techniques ont été élaborées dont l'immobilisation par inclusion sur un support d'alginate de calcium qui fait l'objet de notre étude.

2. Techniques d'immobilisation du matériel biologique

L'utilisation des microorganismes au service de l'humanité n'est pas chose nouvelle, mais l'amélioration du procédé ainsi que sa généralisation ne cessent de se développer.

Parmi ces nouvelles technologies qui apparaissent comme une solution révolutionnaire dans beaucoup d'applications « **l'immobilisation de microorganismes** », fait l'objet d'une étude bibliographique dans ce chapitre.

2.1. DEFINITION DE L'IMMOBILISATION

C'est une technique dans laquelle on maintient les organismes ou les cellules soit fixés à des surfaces soit inclus dans des matrices [10]. L'immobilisation protège le matériel biologique fragile et permet sa réutilisation [10, 76]. Dans le cas de biofilms fixés, la colonisation se fait naturellement, par adhésion et par agrégation. L'immobilisation artificielle se différencie du processus naturel par les points suivants [77] :

- ❖ L'immobilisation est un processus contrôlé, basé sur des techniques de la biophysique et de la biochimie.
- ❖ La croissance et la régénération des cellules immobilisées n'est pas nécessaire, parfois même indésirable.

Les cellules immobilisées ont un rôle de catalyseurs biologiques qui peuvent produire les effets suivants [77] :

- Séparation d'enzymes et purification,
- Stabilisation in vitro de la structure enzymatique,
- Coprocesseur lors de nombreuses réactions enzymatiques
- Contrôle de la désactivation et garantie de l'irréversibilité de la réaction enzymatique.

Classification des techniques d'immobilisation

De nombreuses méthodes d'immobilisation de matériel biologique, ont été décrites dans la bibliographie depuis plusieurs années [78]. La figure suivante représente la classification de ces techniques.

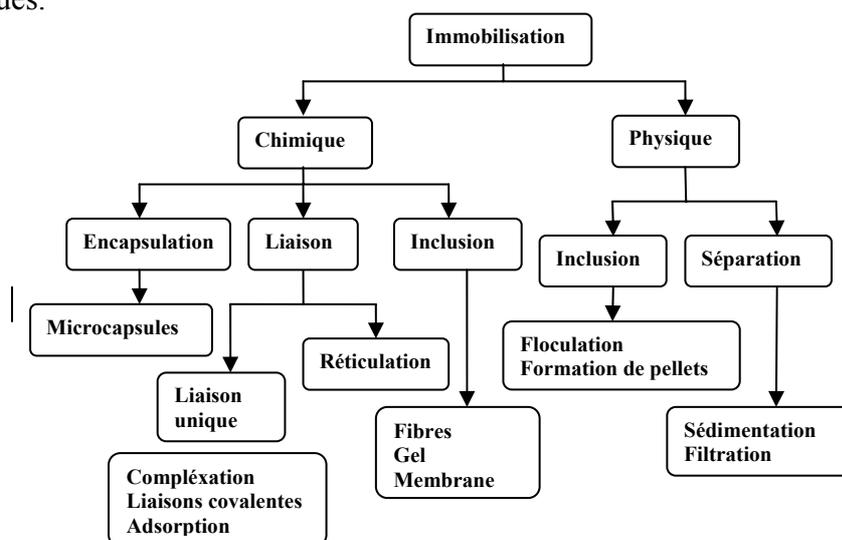


Figure 2 : Classification des techniques d'immobilisation [77, 79]

2.2. DIFFERENTES TECHNIQUES D'IMMOBILISATION

Comme nous avons pu le voir sur la figure précédente, suivant la classe considérée, il existe différentes techniques d'immobilisation dont les principales sont :

- **La liaison covalente :** Le mécanisme utilisé pour ce procédé est basé sur la formation de liaisons covalentes entre un support inorganique actif et les cellules en présence d'agents de liaison. Cette méthode, consiste donc à choisir un support porteur de groupements fonctionnels, qui sont les groupes amino, carboxyles, hydroxyles et phénols de protéines, etc. [79] que l'on active chimiquement pour les rendre plus réactifs avec la surface cellulaire [77, 78]. Cette technique est plus utilisée pour l'immobilisation d'enzymes que pour les bactéries [81].
- **De réticulation :** Cette réticulation chimique s'effectue en utilisant des agents de réticulation bifonctionnels [81] comme le glutaraldéhyde [77,80] ou le toluenediisocyanate [80]. Les propriétés physicochimiques du polymère obtenu sont souvent améliorées par l'addition d'une protéine inerte comme la sérumalbumine, l'hémoglobine ou la gélatine ou bien le collagène [81, 82]. Ces protéines protègent les cellules contre le réactif chimique de réticulation [82].
- **D'adsorption :** Ce fut les premiers travaux réalisés dans ce domaine, beaucoup de bactéries ont été immobilisées par cette méthode sur différents supports comme le bois, le verre, la céramique, le plastique, etc. Les cellules immobilisées grâce à cette technique sont attachées à la surface du support [83] grâce à des interactions électrostatiques et ioniques [79, 81], ce qui fait que la croissance cellulaire qui a lieu à la surface du support provoque progressivement la formation d'un biofilm, qui dépend largement des caractéristiques du support, sachant que le risque de relargage est très élevé.
- **De complexation :** Il s'agit d'immobiliser du matériel biologique dans un complexe par l'interaction électrostatique [86, 87, 88]. On peut aussi procéder à un recouvrement par complexation des polymères contenant le matériel biologique [87, 89]. On parle de complexation polyelectrolytique [87, 89, 90, 91].
- **D' inclusion:** L'immobilisation par inclusion des cellules est la plus étudiée et utilisée actuellement [80,83]. Cette technique fut en premier temps utilisée pour les enzymes et appliquée par la suite avec succès pour les bactéries [80].
Ce procédé est basé sur l'inclusion de cellules dans des matériaux solides pour les protéger de l'hostilité du milieu environnant, sans pour cela affecter l'alimentation du substrat [80]. L'inclusion s'effectue dans des polymères naturels comme l'agar, l'agarose, la gélatine, l'alginate, le Carraghénane [81], la cellulose et ces dérivées ainsi que le collagène [80]. Des polymères synthétiques sont aussi utilisés comme les résines photoréticulants, résines d'époxy, polyesters, polystyrènes [80], prépolymères polyuréthane et les polymères acryliques comme polyacrylamide. Un des inconvénients de

cette technique est la limitation diffusionnelle qui peut être minimisée en utilisant des fines fibres de cellulose d'acétate ou autres matières synthétiques [81].

- **D'encapsulation:** Technique qui met en jeu une capsule (enveloppe) sous forme d'une membrane sphérique [83,92] ou d'autres formes [92], de quelques microns jusqu'à 1mm d'épaisseur [83, 93], semi perméable à la fois fine et solide [92] entourant un noyau liquide [93]. La structure ainsi formée est connue sous le nom de mur [92]. La technique d'encapsulation trouve certaines applications dans les domaines pharmaceutique et médical [79, 94]. L'encapsulation peut être naturelle ou de synthèse, la première se produit quand les bactéries croissent et produisent des exo-polysaccharides. Les cellules microbiennes sont immobilisées donc dans leurs propres sécrétions qui agissent comme une structure de protection, en réduisant la perméabilité du matériel. La capsule ainsi obtenue, les rend moins exposées aux facteurs environnementaux [92]. Quant à la seconde, des polymères comme l'alginate, le chitosane, le carboxyméthyl cellulose (CMC), le Carraghénane, la gélatine et la pectine sont très employés, et cela en utilisant les techniques de microencapsulation qui sont [93]: le spray séchage, le spray congélation, l'extrusion, la méthode électrostatique, la coacervation qui est une technique de séparation de phase, enveloppage par fluidisation [93]. En utilisant la technique d'émulsification / gélification, nous pouvons obtenir des microcapsules < 100µm [83, 92, 94, 95].

Le tableau suivant représente une brève comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation :

Tableau 2 : Comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation [77, 96]

Caractéristiques	réticulation	adsorption	complexation	liaisons covalentes	encapsulation	inclusion
Réalisation	moyenne	facile	facile	difficile	facile	moyenne
Energie de liaison	forte	faible	moyenne	forte	forte	moyenne
Stabilité	faible	élevée	moyenne	faible	élevée	moyenne
Régénération	impossible	possible	possible	rare	impossible	impossible
Coût	moyen	faible	faible	élevé	élevé	faible
Souvent utilisée	non	oui	oui	non	oui	oui
atteinte bactérienne	non	oui	oui	non	non	oui
Viabilité	non	oui	oui	non	oui	oui

D'après ce tableau, nous pouvons opter pour l'utilisation d'une méthode d'immobilisation ou d'une autre, et cela suivant les caractéristiques techniques et économiques qui nous intéressent. Chaque technique a des avantages ainsi que des inconvénients, mais nous pouvons dire que l'immobilisation par inclusion apparaît comme une solution convenable par son coût, sa stabilité, sa facilité de réalisation ainsi que la viabilité des cellules incluses, c'est ce qui fait qu'elle est communément utilisée.

2.3. LES DIFFERENTS SUPPORTS UTILISES POUR L'IMMOBILISATION

L'immobilisation s'effectue dans/sur des supports inorganiques (silice, oxydes métalliques, etc.) [75, 97] ou organiques qui peuvent être naturels (cellulose et dérivées) ou de synthèses (polyacrylamide) [98, 99] qui ont une grande porosité, en plus d'avoir une aptitude à être utilisés dans plusieurs types de réacteurs [75].

Le tableau suivant représente des exemples de supports et leurs caractéristiques.

Tableau 3 : Représentation de quelques exemples de supports et leurs caractéristiques

Support	Utilisation	Toxicité	Propriétés
Gel polyacrylamide [100, 101, 102] , Billes Polyuréthane [97, 104]; Fibre et grain de polyacrylonitrile [105]; Polysulfone [98]; Polyamide[106, 107]; Polyaryamide[102].	Fréquemment utilisés pour les bactéries et les enzymes	toxique	Polymères de synthèses, (acrylamide : catalyse facile, effet de liaison entre domaines différents) [103].
Pectine citrique [108] ; Gel de gélatine [103, 109] ; κ -Carraghénane [75]; Chitosan [110, 107]; Gel de Pectate de calcium [110]; Gerlite[97]; Gel d'agar [77]; Gomme de gellane [79]; Gel de collagène [77] , Alginate de calcium [80], Corragunam de collagène [77, 111].	Fréquemment utilisés pour les bactéries et les enzymes	non toxiques	Supports organiques naturels, biodégradables [95,111]. Appartiennent à la famille des polysaccharides [79].
Fibre de charbon actif [100,104]; Fibre de noix de coco [104]; Fibre de laine [112] ; Pumice [19]; Verre poreux [32, 112]; Sable [97, 100]; Silicate poreuse [19].	Fréquemment utilisés pour les bactéries	non toxiques	Supports inorganiques naturels.
Oxydes hydratés de métaux (Ti^{4+} , Zr^{4+}) [77,80]	Fréquemment utilisés pour les bactéries	toxiques	Formation d'un polymère de métal et d'hydroxyle gélatineux [77, 80].

Tableau 4 : Illustration de la technique d'immobilisation et exemples de support lui correspondant utilisés.

<p>Réticulation [82, 99]</p> 	<p>Glutaraldéhyde [77], Toluenediisocyanate [80], Serum-Albumine, Gélatine, l'hémoglobine, le collagène [78, 81] etc.</p>
<p>Adsorption [82, 96, 99]</p> 	<p>Verre, silice, alumine, DEAE cellulose[112], Fibre de charbon actif [100,104] , Fibre de noix de coco [104], Fibre de laine[112], Pumice[19], Verre poreux [113, 114, 115] , Sable [97, 100], Silicate poreuse[19], Billes Polyuréthane [86, 88, 93], Fibre et grain de polyacrylonitrile[105], Polysulfone [98], etc.</p>
<p>Inclusion [82, 96, 99,117]</p> 	<p>Gel de polyacrylamide [75, 77, 103], Alginate, PVC [97], PVA [97, 116], Agar [76, 103], Nylon [89], Pectine citrique [103], Gelatine[103] polyethyleneimine [89], κ-Carraghénane [75, 103], Chitosane [110, 107], Gel de Pectate de calcium [110], Gerlite[97], collagène[77], Polyacrilate[107], Polyamide [107], etc.</p>
<p>Complexation [86]</p>  <p>Site actif</p>	<p>Carboxymethylcellulose [87], polysaccharide [87], PVP poly(vinylpyridine) [118] ; PVI poly(4vinylimidazole) [118], poly(méthylène co-guanidine) [89], etc.</p>
<p>Liaisons covalentes [82, 96,99]</p> 	<p>Silicate [80], de l'hydroxyde de Titanium [80], etc.</p>
<p>Encapsulation [92,96,99]</p> 	<p>Alginate, chitosane, carboxymethyl cellulose (CMC), carrageenan, gélatine, pectine [80,92], gel de polyacrylamide[80], Ca-pectate[80], etc.</p>

L'enveloppement de cellules déjà immobilisées dans des billes par d'autres polymères est une nouvelle technique qui confère une très grande stabilité à ces dernières. Koyame et Seki [119] l'ont réalisée en enveloppant les billes d'alginate de calcium par une autre couche d'alginate, pour avoir une meilleure stabilité des billes. Alors que Baruch et Machluf [120] ont réalisé l'immobilisation de cellules dans une matrice Alginate-Chitosane en deux étapes, et cela pour améliorer la stabilité des matrices à long terme. Alors que Klinkenberg et coll.,[121] ont étudié l'enveloppement de *Lactococcus lactis ssp. Lactis* en multicouches de chitosane et d'alginate et cela en plusieurs étapes afin de diminuer le relargage des cellules.

Steffan et coll.,[122] ont constaté qu'envelopper des billes d'alginate de calcium dans de l'Eudragit RL 100 (un copolymère de résine acrylique) donne une meilleure diffusion de substrat, de très bonnes caractéristiques mécaniques, avec un relargage cellulaire moindre. Récemment, Panesar et coll.,[123] ont découvert que le gel de pectate de calcium est une meilleure alternative que l'alginate de calcium [123] car il confère de meilleures

caractéristiques physiques (amélioration considérable de la stabilité) et chimiques (une sensibilité moindre aux anions de chélation et aux agents chimiques) en maintenant une très bonne diffusion dans la matière [80, 124, 125], c'est ce qu'ont aussi trouvé Stano et coll., [126] en comparant le gel de pectate d'alginate et de glutaraldehyde.

Des études récentes, ont abouti à l'obtention de gels complexes malléables de chitosane/ k-Carraghénane et xanthane/chitosane en présence de NaCl, et il a été observé que les microorganismes immobilisés dans ces complexes sont très stables et ont une activité cellulaire supérieure à 5 fois l'activité des cellules libres [80, 91]. Dans des études similaires, Muzzarelli et coll., [127] ont réalisé des microsphères de polyélectrolyte complexe à partir d'une solution de carbamate chitosane mélangée avec une série de différentes solutions d'anions de polysaccharides (le k-Carraghénane, l'alginate, le xanthane, la pectine, le guarane, la cellulose, et la gomme d'acacia).

L'incorporation d'additifs dans le gel de l'immobilisation pour améliorer les caractéristiques mécaniques de ce dernier a aussi été employée, comme le sable, la silice, l'alumine, et diverses gommages. Nous pouvons aussi citer l'utilisation des mélanges comme celui de l'alginate et de l'agarose [98], de l'alginate et du polyvinyle alcool [128], du Polysulfone et de l'acétate de cellulose [98], du PVA et de l'acide borique ou bien du PVA avec de l'alginate de sodium [97], la cellulose et l'alginate [85], le Polyvinyl alcool et l'alginate de sodium [110], l'alginate polylysine [107] ou encore de l'alginate avec de la poudre de charbon actif [100] etc. Nah'alka et coll., [124] ont utilisé un gel de calcium pectate-silica-PEI (polyéthylèneimine) pour immobiliser *E. coli* et ils ont remarqué que cette matrice est stable avec diminution de relargage des cellules [124].

De nouveaux dérivés ont été utilisés comme le polyvinylalcool-SbQ dont la polymérisation est initiée par un procédé photochimique. La polymérisation par voie électrochimique du pyrrole et de ses dérivés est également en plein développement [78].

De basses températures de radiations induisent la polymérisation de verre en formant un monomère, a été réalisé avec succès, pour l'immobilisation des microorganismes. L'une des avantages de cette technique est qu'elle produit des matrices macromoléculaires dont la pureté ne peut être obtenue avec une polymérisation conventionnelle. Divers microorganismes ont été immobilisés dans cette matrice comme la bactérie *Streptomyces haechromogenes*, et le champignon *Trichoderma resei* [80].

Des groupes de chercheurs Japonais ont développé une nouvelle procédure d'immobilisation qui requiert l'utilisation de résine photoréticulante. Ils ont utilisé du glycol réticulé avec du polyéthylène pour constituer une matrice tridimensionnelle [119]. L'immobilisation des cellules est produite par irradiation du mélange de cellules et résine, et cela en utilisant une lampe en mercure à basse pression de longueur d'ondes de 300–400 nm [80].

Les fibres microporeuses, qui constituent une nouvelle alternative, peuvent être soit vides à l'intérieure, soit pleines, elles sont généralement réalisées à partir de polymères (colle de silicone, polysulfone, acétate de cellulose, polypropylène, etc.) et forment une membrane semi-perméable, les cellules bactériennes y forment un biofilm [129], mais il est possible de procéder à une inclusion des microorganismes dans ces fibres [77].

3. Immobilisation par inclusion des cellules dans l'Alginate de Calcium

3.1. TECHNIQUE D'INCLUSION DES CELLULES

3.1.1. Définition de l'inclusion des microorganismes

Le concept de cette technique consiste à incorporer le matériel biologique actif à une solution contenant des monomères susceptibles de polymériser dans des conditions adéquates. L'élément biologique se trouve alors piégé mécaniquement à l'intérieur du polymère qui l'entoure avec une membrane semi-perméable. Cette membrane assure la diffusion des nutriments et de l'oxygène et protège les cellules vivantes du stress mécanique et de la toxicité des polluants présents dans le milieu [78]. Parmi les polymères utilisés, les gels d'alginate qui peuvent être façonnés sous forme de billes, la géométrie sphérique permettant alors d'augmenter les transferts de masse par rapport aux films [79, 130].

3.1.2. Techniques de réalisation

Deux techniques peuvent être utilisées pour la formation des billes de gel qui sont : l'extrusion (l'extrusion de gouttelettes dans un bain de durcissement) ou l'émulsion (système à deux phases) [79,131].

3.1.2.1. Technique d'émulsion

Un petit volume de suspension aqueuse formé de cellules-polymère (bactéries-alginate de sodium) appelé phase discontinue, est dispersé dans un grand volume d'huile, (huile d'olive, de tournesol, ...) [132], la mixture est agitée et homogénéisée pour former une émulsion d'eau dans huile [79] que l'on appelle phase continue [131]. Le polymère soluble dans l'eau est alors désolubilisé pour former de petites particules de gel dans la phase huileuse. Le choix de la méthode de désolubilisation dépend du type de matériel d'inclusion utilisé [131] (la solution d'Alginate de sodium est réticulée avec une solution de chlorure de calcium). Les billes sont récupérées, après, par filtration [131,133].

La dimension des particules obtenue est proportionnelle à la grosseur des particules internes de la phase d'émulsion, qui est contrôlée par la vitesse d'agitation et du type d'émulsifiant utilisé [131].

Dans la technique d'émulsion, il est indispensable que l'alginate soit incorporée en premier à l'huile pour former l'émulsion [131, 133].

3.1.2.2. Technique d'extrusion

L'extrusion est la technique la plus ancienne et la plus couramment utilisée dans l'immobilisation de cellules par inclusion et par encapsulation dans des hydrocoloïdes. Cette méthode nécessite la préparation d'une solution d'hydrocoloïdes (alginate de sodium), dans laquelle on incorpore les microorganismes. La suspension cellulaire est par la suite extrudée à travers un orifice (seringue, burette,...) sous forme de gouttelettes qui tombent librement (en chute libre) dans un bain de durcissement ¹³¹ (polyélectrolyte faible de charge opposée par exemple du chlorure de calcium [79]). La dimension et la forme des gouttes dépendent du diamètre de l'orifice de l'extrusion [93, 123, 131], de la viscosité du gel [131] ainsi que de la distance de chute libre [93, 123] qui sont contrôlés par les lois de la mécanique des fluides et

de l'hydrodynamisme [134]. L'utilisation d'un système réglable d'injection d'air peut calibrer la taille des billes qui est proportionnelle au débit d'air [135].

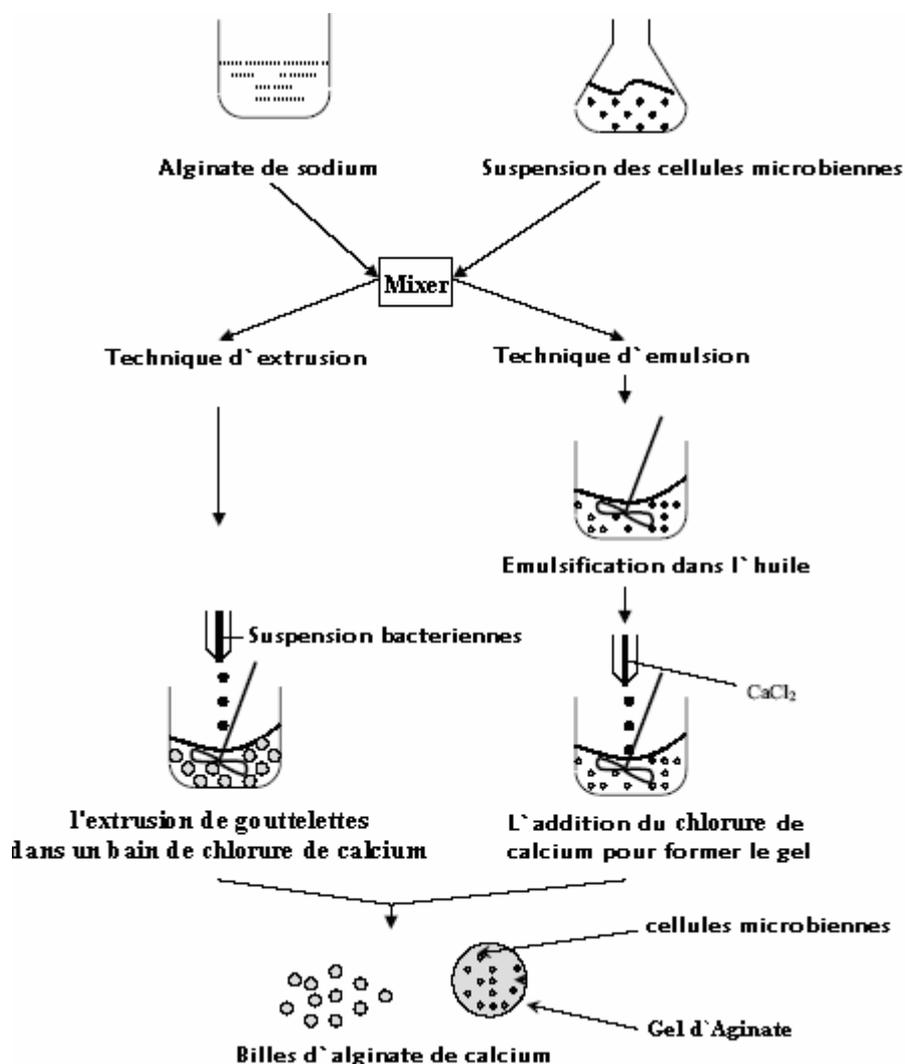


Figure 3 : Schéma de la mise en œuvre des méthodes d'émulsion et d'extrusion dans le cas de l'alginate de sodium réticulée avec une solution de chlorure de calcium [131]

3.1.2.3. Avantages et inconvénients des deux techniques d'émulsion et d'extrusion

Pour l'inclusion des cellules vivantes, les techniques d'extrusion et d'émulsion sont applicables. Les avantages et les inconvénients de ces procédés sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Caractéristiques techniques d'extrusion et d'émulsion [131]

	Extrusion	Emulsion
Cadence industrielle de production	Difficile à augmenter	Facile à augmenter
Coût	Faible	Elevé
Simplicité	Elevée	Faible
Viabilité des microorganismes [136]	80-95%	
Dimension des billes	2-5 mm	25µm-2 mm

L'extrusion est une technique utilisée plus pour l'inclusion des cellules que pour l'encapsulation. Par cette technique il est difficile de satisfaire la production à grande échelle à cause de la lenteur de la formation des billes comparée à la technique d'émulsion [131].

Relativement nouvelle, la technique d'émulsion est simple à réaliser et facile à produire à grande échelle. Les dimensions des billes réalisées par cette méthode sont plus petites (25 µm à 2 mm) que celles réalisées par extrusion (2–5mm). L'utilisation d'huile, dans la méthode d'émulsion rend le coût de réalisation de cette dernière plus important que celui de la méthode d'extrusion [131].

Notre choix s'est orienté vers l'application de la méthode d'extrusion à cause de la commodité de sa mise en oeuvre, son faible coût et aux conditions de réalisation simples qui garantissent en plus une forte rétention de cellules viables [131].

Les billes d'alginate de calcium ainsi obtenues peuvent être utilisées fraîches ou séchées; le séchage augmente leur solidité et réduit leur capacité à se dissoudre, ainsi après réhydratation, il y aura plus de cellules par unité de volume [137]. Le séchage peut être effectué par différents procédés (dessiccation [138], lyophilisation [92, 139, 140], séchage à air ambiant [139] ou chaud [92, 141], et par congélation [92, 142],...etc.). Ce séchage entraînant un surcoût, en plus d'une mise au point pour certains procédés complexe contrairement à l'utilisation des billes fraîches.

3.2. MATRICE D'ALGINATE DE CALCIUM

L'inclusion des cellules peut se faire dans différents types de matrice, cependant l'utilisation de polymères non toxiques permet d'obtenir de meilleurs taux de survie après immobilisation. Les polysaccharides en particulier l'alginate est de loin le polymère le plus largement répandu dans les technologies d'immobilisation [143] cellulaires (plus de 80 % des procédés d'immobilisation de cellules sont réalisés dans des matrices d'alginate [144]).

Les premières expériences scientifiques sur l'extraction de l'alginate à partir d'algues brunes ont été réalisées par le chimiste anglais Stanford à la fin du 19^{ième} siècle. Mais le début de la production industrielle de cette dernière ne fut que dans les années 1930 aux USA. L'alginate est l'un des biopolymères les plus « polyvalents » car il possède de nombreuses propriétés: épaississantes, stabilisantes, gélifiantes, et forme des biofilms [145].

3.2.1. Présentation de l'Alginate

L'alginate est un polysaccharide linéaire à longues chaînes moléculaire [135, 146] soluble dans l'eau [147] présentant des propriétés gélifiantes lorsqu'elle est complexée avec des ions [135, 148]. L'alginate qui est un copolymère anionique naturel, est un acide polyuronique constitué par l'enchaînement alternant de l'acide β-D-mannuronique et de l'acide α-L-guluronique liés entre eux en (1→4) par des liaisons glycosidiques [93, 149, 150], de proportion et d'arrangement séquentiel variable [151]. Les supports d'alginate sont habituellement faits en réticulant, par liaisons physiques, le groupe carboxylique de l'acide α-L-guluronique avec un ligand cationique [143, 152].

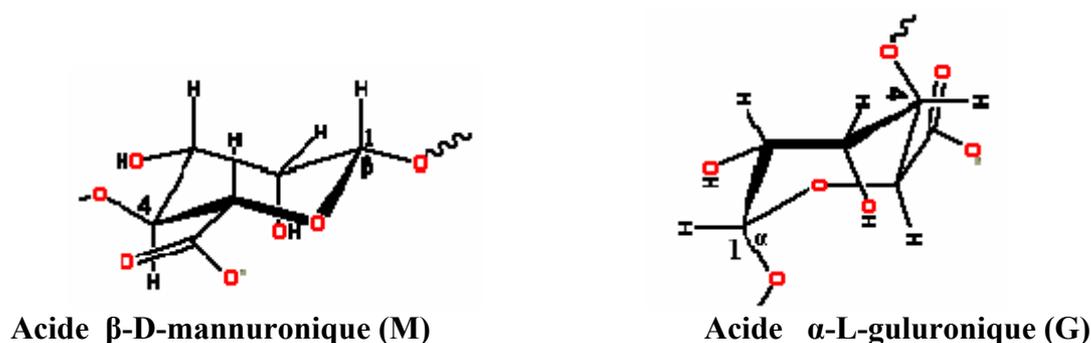


Figure 4 : Représentation de l'acide β -D-mannuronique (M) et l'acide α -L-guluronique (G) [153]

Contrairement aux autres polysaccharides comme la pectine (poly- α -1,4-D-galacturonique acide) ou la cellulose (poly- β -1,4-D-glucose), les séquences d'alginate ne sont pas répétitives, mais des motifs appelés "Blocs" sont observés : séquence (M-blocs) riches en acide mannuronique, séquences (G-blocs) riches en acide guluronique, séquence M-G ou G-M où les deux Blocs d'acides uroniques sont liées alternativement entre elles [146, 153]. La résistance mécanique du gel dépend des proportions des blocs présents et suit l'ordre croissant suivant $MG < MM < GG$ [154], et donc elle dépend de la proportion en bloc G [137, 148]. Les structures cristallines des segments de l'acide polymannuronique et de l'acide polyguluronique ont été déterminés grâce à des études réalisées sur spectroscopie de diffraction des rayons X et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier [147].

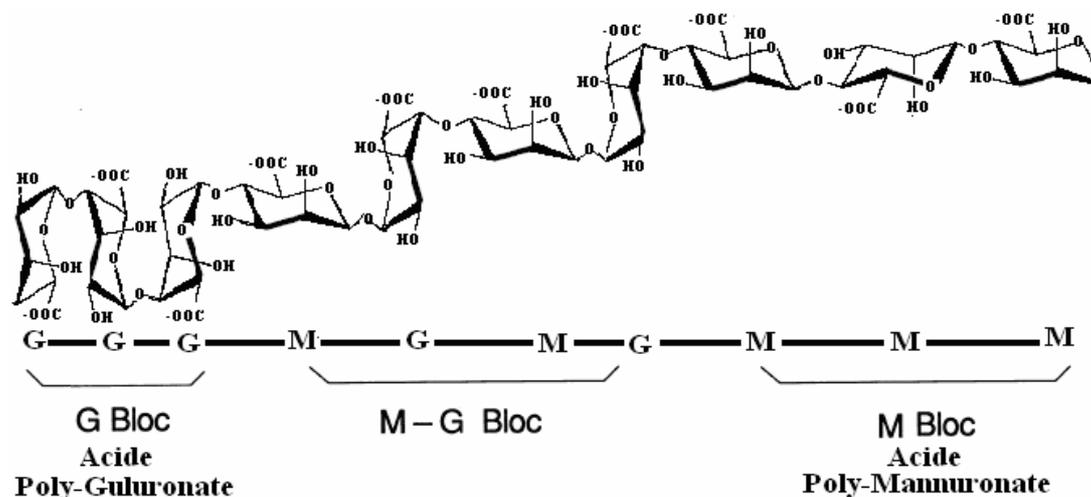


Figure 5 : Structure chimique des Alginate : Conformations du poly G-Blocs (à gauche), poly M-Blocs (à droite) et blocs mixtes MG(au centre) [153, 155, 156]

Autrement dit, l'acide alginique et ces sels sont des blocs de copolymère, contenant tous des MM et des GG blocs homopolymères et des blocs mixtes contenant des séquences d'unités irrégulières de M et de G [93], de proportion variable [153] qui varie avec la variation de la source d'alginate [137, 147, 148]. La proportion, la distribution et la longueur de ces blocs déterminent les propriétés chimiques et physiques de la molécule d'alginate [157].

Généralement, la structure de l'alginate (La séquence exacte est difficile à déterminer) est décrite avec les fréquences des quatre diades (MM, GG, MG, GM) et les huit triades (GGG, GGM, MGG, MGM, MMM, MMG, GMM, et GMG) [153]. La technologie utilisée pour évaluer ces séquences est la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire : 1H-RMN [154, 158, 159, 160, 161] et la 13C-RMN [154, 162]. Reste que la spectroscopie 1H RMN est préférable pour la caractérisation de la composition et de la distribution séquentielle dans un échantillon d'algue, et est particulièrement utilisée pour des études quantitatives [163].

3.2.2. Source de l'Alginate

Les alginates sont généralement obtenues par extraction [153] des grandes algues brunes dont elles constituent les parois cellulaires [135], celles qui sont les plus commercialisées sont : *Laminaria*, *Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Lessonia*, *Sargassum* et *Turbinaria* [137, 151]. Si l'extraction de l'alginate est facile (par précipitation ou par centrifugation), des dangers environnementaux comme les conditions climatiques ou la pollution peut en affecter la production [153].

D'autres paramètres peuvent influencer (à moindre effet) les propriétés physiques et chimiques de l'alginate : la nature des tissus (pied: quantité élevée de blocs G, lame: quantité élevée de blocs M), l'âge des tissus, la zone de croissance, lieux de récolte (M/G plus petit dans les modes battus) et la saison [145].

Différentes compositions pour différentes espèces d'algues sont citées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Les compositions des Alginates obtenues de différentes espèces d'algues, d'après la classification de Smidsrod et Draget 1996 [147, 154]

Espèces	M (%)	G (%)	Rapport M/G
<i>Macrocystis pyrifera</i>	61	39	1,56
<i>Ascophyllum nodosum</i>	65	35	1,85
<i>Laminaria digitata</i>	59	41	1,45
<i>Laminaria hyperborea</i>	31	69	0,45
<i>Ecklonia cava</i>	62	38	1,63
<i>Durvillea antarctica</i>	71	29	2,44
<i>Sargassum asperifolium</i> ¹⁶³	41	59	0,69

Beaucoup de bactéries comme les aérobies *Azotobacter vinelandii* [164, 165, 166, 167] et les opportunistes pathogènes *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas spp* produisent de l'alginate et peuvent donc être des sources alternatives de production [137, 151, 153]. Mais par rapport aux autres bactéries, seule l'alginate synthétisée par *Azotobacter vinelandii* a une structure similaire à son équivalent en algues et est actuellement la plus étudiée pour la production industrielle [153, 159].

3.2.3. Procédés de fabrication d'alginate à partir des algues brunes

Le procédé chimique utilisé pour fabriquer de l'alginate de sodium à partir des algues brunes est relativement simple. La difficulté réside dans la séparation physique des résidus visqueux et flasques qui résistent à la filtration et à la centrifugation. Il existe deux procédés de préparation d'alginate de sodium à partir des algues brunes schématisé par [137] :

Sels insolubles d'acide Alginate de Calcium et de Magnésium présent dans les algues

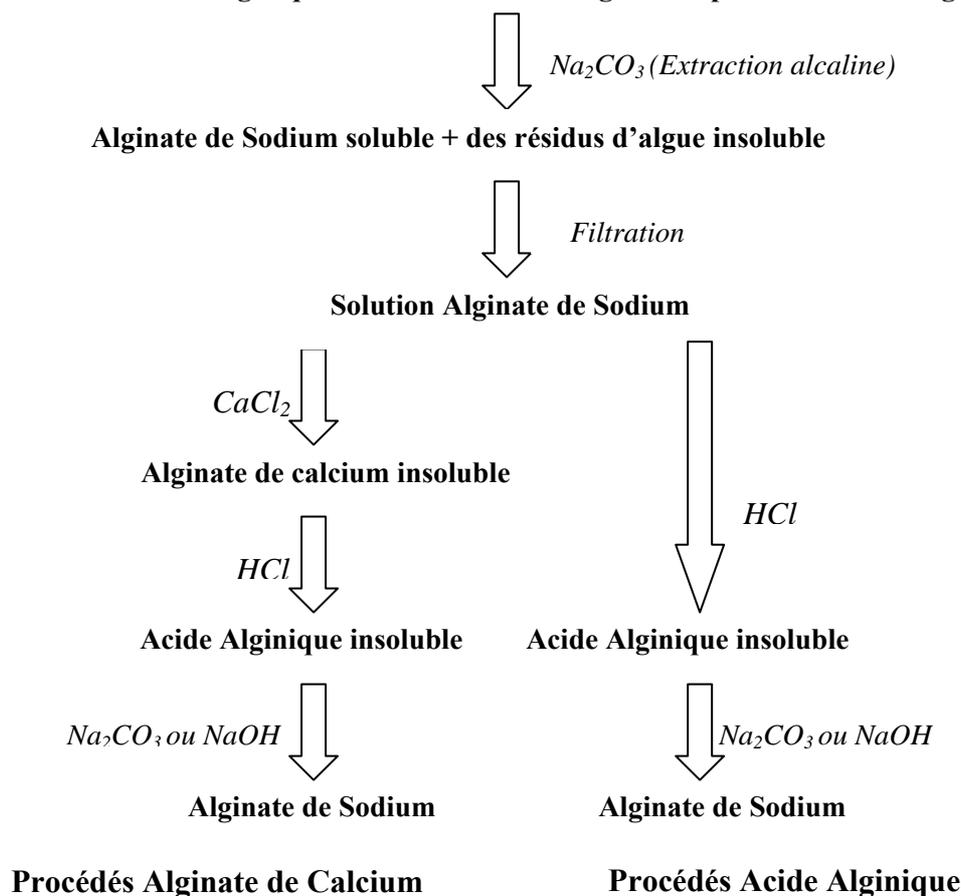


Figure 6 : Représentation du diagramme simplifié des deux procédés de production d'alginate à partir des algues brunes [137]

Dans le premier procédé, les intermédiaires de production sont l'alginate de calcium et l'acide alginate. Dans le second, seule la formation de l'acide alginate est constatée.

Parmi les nombreux avantages du premier procédé, est que l'alginate de calcium précipite sous forme de fibres facilement séparables de la masse; et peuvent être alors aisément converties en acide alginate qui reste sous forme de fibres.

Le second procédé, s'effectue en une seule étape pour former l'alginate de sodium, mais il présente plusieurs inconvénients: lors de la précipitation de l'acide alginate, se forme un dépôt gélatineux difficilement dissociable de la masse. De plus l'élimination de l'eau présente dans l'acide alginate par extraction par solvant (alcool), rend ce procédé très onéreux [137].

3.2.4. Formes commerciales de l'alginate

L'alginate de Sodium E 401 [145] est la forme la plus connue. Mais d'autres sont produites, citant l'acide alginate E 400 [145], l'alginate d'ammonium E 403 [168], l'alginate de calcium E 404 [168], l'alginate de potassium E 402 [168], l'alginate de triéthanolamine, Propylène Glycol Alginate (Propane-1,2, diol alginate) E 405 [168].

L'alginate de calcium et l'acide alginate sont produits durant le procédé de fabrication de l'alginate de sodium; chacun peut être extrait à un stade approprié du processus, et après un

lessivage, il peut être séché et moulu. Les autres sels sont fabriqués par neutralisation de l'acide alginique humide avec une base appropriée. Le sel de triethanolamine est hygroscopique, il est séché sous forme de filme puis moulu [137]. Quant au Propylène Glycol Alginate, il est fabriqué lors de la réaction entre l'oxyde de propylène et l'acide alginique, les groupes d'acides carboxyliques dans les chaînes d'acides uroniques sont estérifiés [137].

Les dérivés commerciaux de l'alginate les plus employés sont l'alginate de sodium, le propylène glycol alginate et l'acide alginique [137].

3.2.5. Spécificité de l'alginate

Le comportement de l'alginate diffère suivant qu'elle est confrontée à des agents physiques chimiques ou biologiques, les paramètres les plus influents sont :

- **Température** : La viscosité décroît avec la croissance de la température. Cependant, si la solution d'alginate est maintenue à une température supérieure à 50°C pour plusieurs heures, une dépolymérisation peut se produire causant une perte permanente de la viscosité. La solution d'alginate peut être gelée puis dégelée sans que cela ne provoque un changement dans la viscosité initiale, aussi longtemps que le calcium est absent (moins de 0,5 %); par contre si le calcium est présent, la viscosité va augmenter et le gel peut prendre formes et ce changement est irréversible [137].
- **pH** : La viscosité d'une solution d'alginate n'est aucunement affectée dans l'intervalle de pH variant entre 5-11, avec un pH entre 3-4, un gel se formera systématiquement, cependant si la solution d'alginate contient des résidus de calcium, la gélification se fera à un pH de 5. Si le pH diminue rapidement de 6 à 2, une précipitation gélatineuse d'acide alginique se formera. À un pH 11, une petite dépolymérisation se produit dans la solution d'alginate, provoquant une chute de la viscosité [137].
- **Suspension bactérienne** : Les microorganismes peuvent croître aisément dans des solutions commerciales, cette croissance peut toutefois causer une dépolymérisation et une perte de la viscosité de la solution d'alginate [137].
- **Produits chimiques** : La présence de sucre, d'amidon, les sels monovalents comme le chlorure de sodium dans l'eau, réduit la vitesse d'hydratation et dissolution de l'alginate. L'alginate de sodium est difficilement soluble dans une eau dure ou le lait car ces substances contiennent des ions de calcium [137].

3.2.6. Gélification ionotropique de l'alginate

Quand un polyélectrolyte est combiné à un ion multivalent de charge opposée, il peut former un hydrogel physique connu sous le nom d'hydrogel "ionotropique" [169, 153]. N'importe quel cation peut causer la gélification de l'alginate, sauf le Magnésium qui fait exception à cette règle. La résistance mécanique du gel reflète le degré d'affinité [147], qui varie légèrement suivant la source d'alginate : $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} = Ni^{2+} = Zn^{2+} > Mn^{2+}$ [153]. Quelques cations qui ont une bonne affinité avec l'alginate, peuvent être toxique pour les cellules vivantes comme Ba^{2+} et Sr^{2+} [170].

Des différences entre les propriétés mécaniques des billes sont obtenues : les ions avec une haute affinité donne toujours une résistance mécanique supérieure, excepté pour les ions de nickel ou elle est plus faible. Les ions trivalents comme Ti^{3+} et Al^{3+} sont aussi utilisés pour la

production de polymère d'alginate. Une possibilité d'échange d'ions d'affinité supérieure a été réalisée pour le traitement des eaux résiduaires et pour l'élimination des métaux lourds [153]. L'alginate forme aussi de puissants complexes avec les polycations comme le chitosane, l'acide polyamino, polyéthylèneamine, ou polyacrylamide [147].

Les ions de calcium sont les plus communément utilisés pour la polymérisation à cause de leur faible coût, leur abondance [137] et leur faible toxicité. Le cation Ca^{2+} réagit avec le groupe de carboxyle du polysaccharide agissant comme un agent de réticulation [171, 172].

3.2.7. Structure du gel d'alginate de calcium

Les premières hypothèses sur la gélification étaient que les ions de calcium déplacent les ions d'hydrogène des chaînes adjacentes des groupes d'acide carboxylique et forment un pont ionique entre les chaînes. Plus tard, Rees développa le modèle de "boîte à oeufs" [153, 173] qui admet qu'une chaîne bouclée de blocs d'acide guluronique représenté en deux dimension analogue à une ondulation de boîte à œufs avec des interstices dans lesquelles les ions de calcium sont emballés et coordonnés. Alors que le calcium aide à maintenir les molécules liées, leur nature polymérique et leur agrégation font qu'elles se lient au calcium plus fortement; c'est ce que l'on appelle "liaisons coopératives" [137]. Ce qui conduit à la formation de gel d'alginate de calcium $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6 - \text{Ca}_z)_n$ [93, 155].

Lors du fractionnement en gouttes de la solution initiale d'alginate de sodium $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6 - \text{Na}_z)_n$ [173] contenant les microorganismes, dans celle de chlorure calcium, la polymérisation interfaciale est instantanée [131], avec précipitation de l'alginate de calcium suivie par une gélification graduelle de l'intérieur selon la perméation des ions à travers le système du gel d'alginate, le gel est réticulé par interactions ioniques, emprisonnant les cellules vivantes dans une matrice tridimensionnelle [131]. Une partie de l'eau présente dans la solution d'alginate de sodium est piégée dans la matrice, après réticulation, et peut migrer librement dans cette dernière [39], et l'autre partie est expulsée de la matrice d'alginate de calcium [153, 174].

La dimension des pores de la structure d'alginate reste sujette à des discussions, une dimension élevée des pores coïncide avec une alginate de forte teneur en acide guluronique, ce qui induit à une grande résistance à la pression de cette structure [153]. Typiquement 2% Ca-alginate montre une dimension des pores de 5 à 200 nm dans des études de microscope électronique [153].

Le coefficient de diffusion des nutriments, métabolites et oxygène dans le gel est plus faible avec l'augmentation de la concentration du calcium et de l'alginate, quand le réseau est ferme [153].

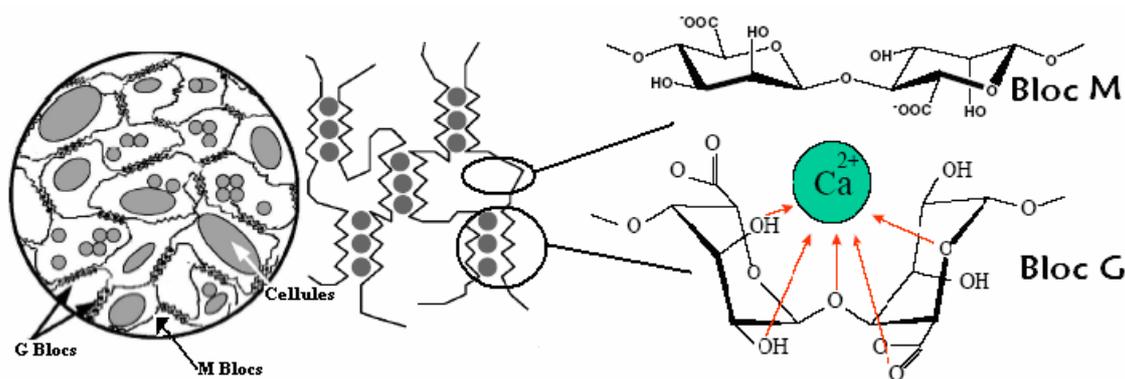


Figure 7 : Schéma du modèle “boîtes à oeufs” [147, 173]

La gélification peut être reversée avec des agents de chélation de calcium (produits chimiques séquestrant qui vont entrer en concurrence avec l’alginate pour se lier au calcium) comme le phosphate, le citrate et le lactate ou avec un excès d’ions anti-gélification comme Na^+ ou Mg^{2+} [136], ainsi que les ions K^+ , PO_4^{-3} [7, 175], ce qui permet la récupération des cellules.

3.3. AVANTAGES

- La simplicité de la conception du procédés [144] et la facilité de mise en œuvre [78, 103, 121, 125].
- La protection des microorganismes contre les conditions physiques et chimiques [83] extérieures défavorables comme (le pH, la température et la concentration du milieu [144]....etc.) [1]. En plus de conférer une protection supplémentaire aux cellules durant la réhydratation et lyophilisation [92].
- La stabilité biologique élevée [83, 176] des bioparticules pendant une période prolongée de fermentation [11, 177] et après plusieurs cultures répétées [143] avec une régénération constante des cellules [83, 144, 177, 178]. Ce qui permet de procéder en continu [179, 180]. Des cellules de pavot immobilisées dans de l’alginate de calcium gardent leur activité biologique pendant plus de 6 mois [126], alors que Romo et Perezmartinez[103] ont constaté une viabilité des microorganismes immobilisés dans l’alginate de calcium durant une période supérieure à 18 mois.
- Le faible coût [11, 103, 121, 125, 170], cette méthode peut être utilisée pour des applications environnementales où de grands volumes de microorganismes immobilisés sont nécessaires.
- Les billes d’alginate sont inertes chimiquement, non toxiques [103, 119, 125, 147] et biodégradables [141, 147, 181, 182].
- La rétention physique des microorganismes dans la matrice, facilite la séparation des cellules de leurs métabolites [92].
- Une bonne croissance des cellules dans un support solide poreux et hydrophile [170, 183]
- Il permet une bonne diffusion des nutriments et des métabolites [95, 181,184].

- Durant l'incubation dans un milieu nutritif adéquat, il en résulte la formation d'une région de densité cellulaire élevée [144, 176, 180], concentration cellulaire variant de 5×10^{10} to 5×10^{11} UFC/mL), qui est de 10 à 50 fois supérieure à une culture traditionnelle en batch [178]. Ceci améliore la résistance à la contamination et aux attaques des bactériophages [83, 144, 180], augmente la stabilité du plasmide [83] et prévient du lessivage durant un processus en continu [178].
- Une productivité volumétrique très élevée [144, 180] et constante [144], avec de petite dimension de fermenteur [144] et un temps de réaction plus court [144].

3.4. INCONVENIENTS

- Pour les bactéries aérobies, la diffusion limitante de l'oxygène entraîne la dispersion des cellules dans le support, les cellules se concentrent là où l'oxygène est disponible [5, 184]. Ce phénomène est fortement lié à la composition de l'alginate et à sa concentration dans le gel [110].
- La croissance bactérienne dans les billes d'alginate, peut conduire à ce que les bactéries prolifèrent dans des sites préférentiels (cela est due à l'augmentation de la résistance de transfert de matière), et à l'abrasion de la surface des billes, ce qui provoque le relargage des cellules à l'extérieur de la matrice [137].
- De nombreuses études ont démontré que l'immobilisation et le relargage des cellules dans le milieu produit un changement dans la croissance cellulaire, la morphologie et la physiologie comparée à une culture conventionnelle de cellules libre [178].
- Les conditions d'asepsie rendent cette méthode difficile à réaliser à grande échelle [185].
- Les billes d'alginate contenant les cellules vivantes peuvent être rompues (ouvertes) ou dissoutes par différents moyens, incluant des facteurs physiques (diffusion, contraintes par torsion et par cisaillement causées par l'agitation dans le réacteur [5], la croissance cellulaire, pression, pH...ext.) [93] et chimiques (agents chélatations) [99, 124, 143].
- Les billes ainsi que l'activité cellulaire ont une durée de vie limitée [123].

La technique d'immobilisation par inclusion dans une matrice d'alginate de calcium peut aller au delà de ses inconvénients en améliorant sa propre méthode d'élaboration [119].

Pour remédier à ces inconvénients, par exemple, celui du relargage, il est possible d'en diminuer le taux, en durcissant le gel d'alginate avec des cations de potassium [80]. Il est aussi possible d'envelopper la matrice ou d'ajouter des additifs dans le gel d'alginate lors de la formation des billes [99]. Quant aux problèmes de diffusion, ils peuvent être résolus partiellement en utilisant des alginates avec une viscosité optimale permettant une bonne gélification avec une meilleure porosité, ainsi que l'utilisation de diamètre relativement petit permettant la diffusion sans pour cela provoquer l'inhibition.

Les alginates constituent un groupe hétérogène de polymères, ils présentent une gamme étendue de propriétés fonctionnelles. Leur utilisation comme matrice d'immobilisation doit reposer, pour chaque application, sur un choix approprié de matériel et de méthodologie [135].

Ainsi, les alginates riches en acide gluconique seront indiqués en bioréacteur en raison de leur bonne stabilité mécanique, de leur forte porosité, et de leur tolérance aux sels et agents chélateurs. Des billes formées avec de telles alginates sont aussi résistantes à des variations de leur environnement, supportant particulièrement la dessiccation, les contraintes par torsion et par cisaillement [135]. Les alginates pauvres en acide gluconique formeront au contraire des gels moins fermes. Ils seront utilisés quand leur dissolution est nécessaire à un moment du procédé, en particulier si la récupération des cellules est prévue [135].

3.5. UTILISATIONS

Des systèmes de cellules immobilisées par inclusion dans des supports d'alginate de calcium sont utilisés pour des tâches analytiques (biosenseurs), dans l'industrie agroalimentaire [87, 99] et celles des breuvages [144]. Cette technique est couramment utilisée pour la production de métabolites spécifiques comme les enzymes [186], les amino-acides, les alcools, les arômes, les polysaccharides, les pigments, le Xylitol [98] ou le sucre invertie [96], et des produits fermentés comme, le cidre, le vinaigre, le saké, ou des produits laitiers [144] comme le yoghourt, les fromages, les glaces et les mayonnaises [92].

Dans l'industrie pharmaceutique et médicale, cette méthode est utilisée pour la production de protéines cellulaires, et la culture d'implantation [170] de cellules des mammifères [76]. Elle est même souhaitable lors de la vaccination du BCG par voie orale [132] ainsi que la production de grande quantité de drogue comme le Taxol [99] et celle d'anticorps [153], mais aussi dans la fabrication de biocarburant (éthanol) [153]. L'immobilisation par inclusion dans Ca-Alginate d'embryons de plante a été réalisée avec succès [153].

Récemment, des cellules immobilisées ont été employées avec une grande réussite comme biocatalyseurs dans la protection de l'environnement [177].

C'est dans le traitement des effluents [87, 95, 99], que cette technique a suscité un très vif intérêt, spécialement pour la biodégradation des composés toxiques qui contaminent l'environnement comme les métaux lourds et les composés aromatiques [76]. Il existe une multitude d'articles qui étudient les traitements biologiques par des microorganismes immobilisés par inclusion dans une matrice d'alginate de calcium dont nous pouvons citer en exemples :

- Celui de Dias et coll., réalisés en 2000 qui ont étudié la biodégradation de l'acétonitrile par *Candida guilliermondii* UFMG-Y65 en utilisant plusieurs matrices dont l'alginate, et ils ont par leurs résultats démontrés l'efficacité de cette dernière par rapport aux autres matrices [108].
- Abd-El-Haleem et coll., en 2002 qui ont étudié la biodégradation du phénol par *Acinetobacter sp* en présence de hautes concentrations de composés azotés (NH_4 et NO_3) et ils ont pu justement confirmer la possibilité de la réutilisation des billes d'alginate, qui dans leur cas ont été utilisées plus de 5 fois en donnant toujours une biodégradation de 100% [3].
- Tandis que Abou Seoud et coll. en 2003, ont étudié la biodégradation du phénol [2] et du naphtalène [75] par l'inclusion de *Pseudomonas sp* dans l'alginate de calcium, ils ont mis en évidence l'efficacité des cellules immobilisées par rapport à celles libres.
- Alors que Steffan et coll., en 2005 ont étudié la biodégradation de Azo dye (éthyle orange) qui est une teinte synthétique très toxique, ils ont obtenu des résultats très intéressants [122].

4. Facteurs agissant sur l'immobilisation par inclusion dans Ca-Alginate

4.1. LES FACTEURS INFLUENÇANT LA TECHNIQUE DE L'INCLUSION

Diverses travaux ont été réalisés afin d'étudier l'influence des paramètres liés à l'élaboration des billes comme la source de l'alginate (espèce d'algue), sa concentration, la concentration en chlorure de calcium [137], le temps de durcissement du gel, la densité cellulaire dans la matrice [93], etc. Ces paramètres sont liés entre eux et le moindre changement affectera l'efficacité de fonctionnement du biomatériau.

4.1.1. Alginate

Suivant la composition de l'alginate de sodium et sa concentration, nous obtenons différentes viscosités de la solution [131]. Le coefficient de diffusion dans la matrice diminue avec l'augmentation de la viscosité [77]. Ce qui provoque un mauvais transfert de matière (métabolites et substrats) à travers le gel [187].

L'influence de la nature de l'alginate et de sa concentration sur la viscosité, sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Variation de la viscosité (mPa.s) en fonction de la concentration de la solution d'alginate de sodium à 20°C [137]

Type d'alginate	Concentration				
	1%	1,5%	2%	3%	4%
Viscosité très faible	10	20	45	130	350
Viscosité faible	20	60	180	650	2200
Viscosité moyenne	350	1800	6000	Non mesurable	
Viscosité élevée	800	4000	9000	Non mesurable	

4.1.2. Ions de Calcium

Walewijka et coll. [171], ont étudié la distribution des ions de calcium à travers les billes d'alginate, et ont montré la non uniformité de la distribution de ces ions dans la bille, avec une concentration élevée à la surface. Le mécanisme de gélification allant de la surface vers l'intérieur.

D'après Mendes et coll. [174], Walewijka et coll. [171], les ions de calcium agissent comme des agents réticulants qui stabilisent les chaînes d'alginate formant une structure de gel. En conséquence, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} présente dans la solution augmente la réticulation des chaînes du polymère, permettant l'élévation de la viscosité et la formation d'un gel plus ferme. L'utilisation d'une concentration de chlorure de calcium supérieure à celle de l'alginate conduit à la formation d'un gel plus rigide [174, 189]. Alors que celui obtenu avec une concentration supérieure en alginate forme un gel plus mou [174].

4.1.3. Temps et température de durcissement

Le temps dont ont besoin les billes pour se durcir peut être contrôlé par la solubilité du sel de calcium, la taille de la bille et la température de formation du gel [137].

Payet et coll. [152], ont montré que l'augmentation de la température entraîne une diminution du temps de gélification et que la variation de ce temps en fonction de la température suit la loi d'Arrhénius :

$$\ln(\theta_g) = E_a/RT + \text{cste.}$$

Où θ_g est le temps de gélification, E_a l'énergie d'activation liée au processus de gélification, R la constante des gaz parfaits et T la température absolue.

La nature différente des liaisons formées lors de la gélification se traduit par une énergie d'activation relativement faible, de l'ordre de quelques $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ presque équivalente aux liaisons de Van der Waals. En revanche, la variation de la température de 5 à 30 °C, n'a pas d'influence significative sur la structure des gels formés au voisinage du temps de gélification [152].

4.1.4. Diamètre des particules

Considérant que les billes d'une plus grande taille vont permettre de suspendre une densité de cellules plus élevée [143]. Cependant une fois en bioréacteur l'espace interstitiel est plus grand et par conséquent, en plus de fragiliser la cohésion des billes, on aura un moins bon transfert entre le milieu de culture et les billes [143].

Des petites billes permettent une charge des cellules moins importante, mais la diminution de la distance entre les microorganismes et le milieu de culture assure une meilleure diffusion du substrat et de l'oxygène [175] et donc une bonne croissance qui fragilise la matrice.

4.1.5. Quantité initiale des cellules immobilisées

L'immobilisation des bactéries est l'un des moyens utilisé pour la conservation de densités élevées de cellules dans le bioréacteur [143]. Ce qui fait que ce paramètre est directement lié à la taille des billes, mais d'autres paramètres interviennent dans le choix de ce dernier, car une trop forte densité peut constituer une barrière à l'approvisionnement des cellules en substrat et oxygène [143, 180], alors qu'une trop faible densité peut conduire à de faibles productivités. Ce qui nous oblige à trouver un compromis [143].

4.1.6. Effets des conditions de culture sur les billes d'Alginate de Calcium

4.1.6.1. Température

D'après une étude effectuées, en chauffant des billes d'alginate de calcium de 25°C à 130°C pour une période supérieur à 30 mn, diverses modifications structurelles des billes ont été constatées, incluant une contraction de la matrice. Il a été conclu que le rétrécissement des billes est dû au réarrangement des chaînes du polymère d'alginate, en plus de la perte d'eau générée par le chauffage [155, 170].

D'après Mohan et coll. [170], la décomposition de la matrice d'alginate de calcium commence à 60°C et elle est dû à la perte d'eau dans la matrice; puis s'opère une rupture des liaisons C-H conduisant à une perte de 50% de la masse de la matrice (masse qu'il faut signaler, reste inchangée jusqu'à 258°C). À 590°C il ne reste plus que 35% de la masse.

Le mécanisme de dégradation des polysaccharides s'opère via le clivage des liaisons glycosidique qui résulte de la formation d'acétals. Ces liaisons sont assez résistantes à l'hydrolyse. La dégradation thermique du gel d'alginate nécessite la rupture des liaisons covalentes – C – O –, avec des séries de réactions de radicaux libres causant la scission non réversible des chaînes [155].

Alors que l'abaissement de la température au delà de -196°C n'influence aucunement la stabilité de ces billes d'alginate de calcium [92].

Par contre, la température peut nuire sérieusement à la survie des cellules vivante, c'est pour cela que le choix des températures lors de la fermentation dépend de la tolérance des microorganismes à cette dernière avec un léger décalage sachant que des bactéries immobilisées ont une meilleur tolérance à la température que celles misent en culture libre ⁷.

4.1.6.2. pH

Suite à différentes études établies, il a été constaté que des bactéries immobilisées dans de billes d'alginate de calcium survivaient dans des milieux acides de $\text{pH} = 2,5$ [83, 92] (ce qui implique que l'immobilisation améliore la tolérance des cellules au changement du pH par rapport à des microorganismes libres). Kailasapathy et coll. [92], suggèrent que des bactéries immobilisées et incorporées dans des desserts laitiers fermentés frigorifiés ($T < 0^{\circ}\text{C}$) peuvent survivre à des pH faibles dans le produit, et même dans des conditions acides, comme dans l'estomac humain où le pH est de 2.

Une étude effectuée par Heinemann, décrit parfaitement le comportement des billes d'alginate de calcium face à la diminution du pH. Quand le pH chute fortement, les fonctions carboxyates de l'alginate sont transformées en acides alginiques. Ce dernier est un hydrogel solide, ce qui explique pourquoi l'intégrité de la bille est maintenue et donc le gel se raffermi et durci [137]. Une corrélation entre la chute du pH et la perte du poids des billes a été proposée comme nous pouvons le voir sur la figure 8 [153].

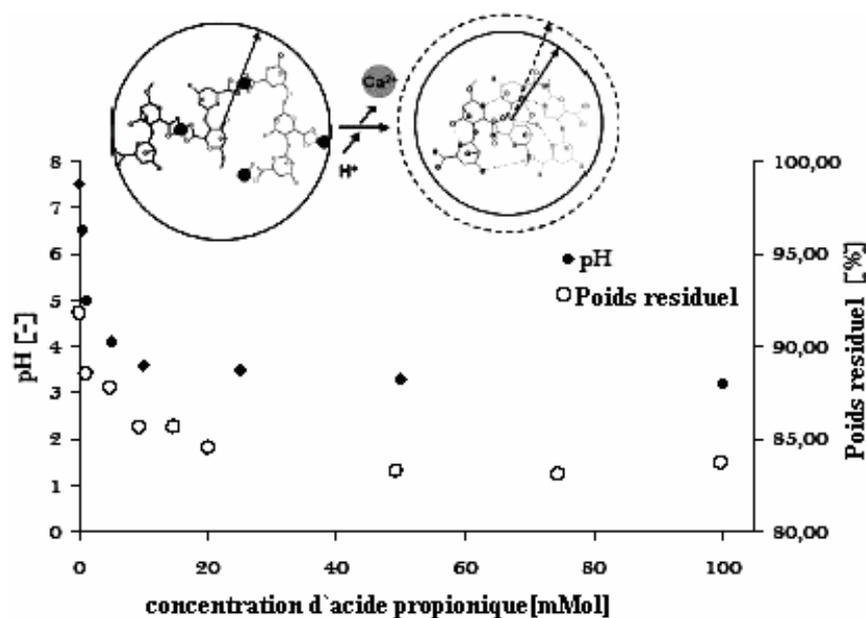


Figure 8 : En haut, la représentation de la transformation d'une bille d'alginate de calcium en acide alginique. En bas, la corrélation entre le pH et la perte de poids [153]

D'après Smidsrød et coll. [154] et McHugh [137] une dissolution des billes peut s'opérer à des pH supérieurs à 10.

4.1.6.3. Vitesse d'agitation

La vitesse d'agitation ne doit pas être trop grande, car la création d'un vortex limite le phénomène de transfert de masse, et risque de générer des contraintes mécaniques qui endommageront la structure des billes, conduisant à leurs ruptures. Une agitation optimale doit être choisie, qui toute en favorisant un bon transfert de masse dans le milieu de culture, préserve l'intégrité des billes. Une vitesse d'agitation variant entre 78 à 250 tr/mn fut choisie par plusieurs auteurs [39, 190].

4.1.7. Facteurs biologiques

Le comportement des cellules immobilisées est différent, selon les bactéries. Dans des conditions données, certaines, ont une grande tolérance à l'immobilisation avec une très grande productivité, largement supérieure à celle des cellules libres, par contre d'autres supportent mal cet état en donnant un résultat opposé [92].

La vitesse de biodégradation d'un polluant dans un environnement naturel est affectée par plusieurs facteurs, qui incluent l'adaptation de la communauté microbienne :

- Elle peut être définie comme une augmentation de la capacité d'une population de microorganismes à dégrader un produit chimique après une longue exposition à ce dernier.
- Elle provoque de différentes altérations dans la structure et fonction des microorganismes.

Certaines bactéries secrètent des polysaccharides connus sous le terme "exopolysaccharide" (EPS). Ou "polysaccharide exocellulaire", dont le rôle est de les protéger vis à vis de l'environnement [92, 164]. La capacité de s'enrober dans une couche d'EPS avec une forte teneur en eau, rend la bactérie plus résistante à la dessiccation et à la déprédation des protozoaires [176]. De plus, une couche d'EPS autour de la cellule influence significativement la diffusion de différentes molécules aussi bien vers l'extérieur que vers l'intérieur de la cellule. C'est l'EPS qui rend la bactérie capable de s'attacher aux surfaces et qui protège contre les surfactants et même les antibiotiques [176, 180]. Ceci peut entraîner des modifications à l'intérieur du réseau de la matrice de Ca-Alginate.

4.2. MORPHOLOGIE DES BILLES

En utilisant un microscope optique, il a été observé que des billes produites à partir d'alginate ont de petites anfractuosités qui évoluent avec la viscosité de l'alginate et sa concentration ainsi que la concentration en CaCl_2 [174]. Ces pores permettent la diffusion de petites molécules alors que la diffusion de celles des grandes est affectée mais non stoppée [153]. Dans certaines conditions le microscope optique peut aussi permettre la visualisation, à la surface des billes, des colonies des microorganismes immobilisés.

Lors de la mise au point de la technique par extrusion, la distance entre l'orifice et le bain de durcissement influence fortement la forme des billes qui peuvent perdre leur sphéricité ou former des queues. C'est pour cela qu'une distance optimale variant entre 10 à 30 cm sera parfaite pour la production des billes sphériques [153, 191].

4.3. PRINCIPE DU RELARGAGE CELLULAIRE DES BILLES

Au cours de la fermentation, différents paramètres peuvent influencer le relargage des cellules dans le milieu comme :

- ❖ La taille [180], la composition et la géométrie des billes [79] ainsi que la densité des microcolonies à la surface des billes [180],
- ❖ Le type et les caractéristiques de croissance des microorganismes immobilisés [79],
- ❖ Les conditions hydrodynamiques du milieu (forces de cisaillements, agitation) [79, 180].

Par contre, le relargage cellulaire est peu influencé par la densité cellulaire initiale dans les billes [180]. Lors de fermentation, des observations microscopiques réalisées sur des billes, ont montré des ruptures et abrasions localisées à la surface du gel au niveau des cavités contenant des microcolonies. Ces tensions dans le gel qui causent le relargage cellulaire des billes s'effectuent spontanément sous l'influence de la croissance bactérienne à la périphérie des billes, des forces de cisaillement dues à l'agitation mécanique et aux collisions entre les billes [180].

Le phénomène de relargage est favorisé par les petites dimensions des billes, en raison de leur structure qui se dégrade facilement sous l'action du développement cellulaire au centre des billes ce dernier étant proche de la surface. Le relargage cellulaire est à la base du procédé à cellules immobilisées de fabrication de biomasse libre [130].

4.4. DISTRIBUTION ET PERFORMANCE DE LA BIOMASSE DANS LES BILLES DE GEL

La performance du biomatériau dépend des cinétiques de réaction cellulaires, des transferts de masse interne et externe des substrats et des produits d'inhibition, ainsi que du relargage cellulaire dans le milieu externe [130].

Le phénomène compétitif de diffusion-réaction explique la croissance cellulaire non uniforme dans les billes colonisées. Une région de haute densité bactérienne est ainsi formée à la périphérie des billes où les conditions de croissance sont plus propices. L'épaisseur et la concentration bactérienne de cette couche dépendent, de l'effet d'obstruction et des vitesses de diffusion dans la couche cellulaire ainsi que d'autres paramètres de fermentation tels que le pH, la concentration en substrats et en produits et la température [79, 130].

Des recherches ont montré la formation progressive d'une couche cellulaire dense à la périphérie des billes durant des fermentations continues ou non avec des bactéries lactiques immobilisées dans des billes de gel d'alginate. L'épaisseur de cette couche lors de l'immobilisation de *Lactobacillus casei*, estimée en microscopie optique, fut proche de 0.4 mm, ce qui représentait approximativement 84% du volume total des billes de 1.75 mm de diamètre [130].

4.5. DYNAMIQUE DE CROISSANCE ET PHYSIOLOGIE DES CELLULES IMMOBILISEES

L'immobilisation dans une matrice et les concentrations bactériennes potentiellement très élevées limitent la diffusion des nutriments ainsi que l'élimination des produits du métabolisme bactérien. Les conditions environnantes des cellules libres et immobilisées sont donc très différentes et peuvent en résulter des comportements physiologiques et des morphologies cellulaires distinctes [130].

L'inclusion de bactéries dans une matrice composée de polysaccharides crée un microenvironnement particulier pour les bactéries modifiant la physiologie et l'activité cellulaires. En effet, de la surface vers le centre de la bille vont se former des gradients chimiques et physicochimiques (nutriments, pH, oxygène, etc.). Les conditions de croissance cellulaire sont, en général, plus favorables à la périphérie des billes de gel qu'au centre notamment car l'accès aux substrats et l'évacuation des produits métaboliques sont plus faciles à la périphérie qu'au cœur des billes, ce qui explique que la biomasse soit plus importante dans la partie périphérique. La croissance cellulaire très active à la surface des billes est contrebalancée par une libération des microorganismes dans le milieu liquide [79].

L'immobilisation cellulaire induit des changements physiologiques importants, en effet, les cellules immobilisées semblent [79] :

- Plus tolérantes envers les composés toxiques (alcools, phénols, antibiotiques,...etc.) et les produits d'inhibition.
- Elles sont aussi moins sensibles aux variations de pH qui peuvent intervenir au cours d'une fermentation.
- Leur physiologie varie aussi suivant leur localisation dans la bille.
- L'augmenter de la stabilité plasmidique.
- Elle assure aussi une protection contre le stress oxydatif et les forces de cisaillements dus à l'agitation.
- Diminue aussi les risques de contamination de la culture comparée aux fermentations avec cellules libres.

5. Dynamique de croissance bactérienne

Plusieurs études dont celles établies par Abouseoud et coll.[2], Arutchelvan et coll.[6], Dursun et coll.[7], Stoilova et coll.[29], Bandhyopadhyay et coll.[32], Nuhoglu et coll.[37], Shalaby et coll.[70], Banerjee et coll.[192], Tziotziou et coll.[193] ont montré la difficulté d'établissement de la cinétique de biodégradation du phénol par les microorganismes, car plusieurs phénomènes y interviennent, et cela devient encore plus complexe avec l'utilisation des cellules immobilisées.

5.1. LA CROISSANCE BACTERIENNE

Le schéma standard de la croissance d'une population microbienne en milieu non renouvelé a été établie par Buchanan en 1918, comme nous pouvons le voir dans la Figure 9. Il décompose la cinétique d'une population microbienne en sept phases distinctes [194, 195] :

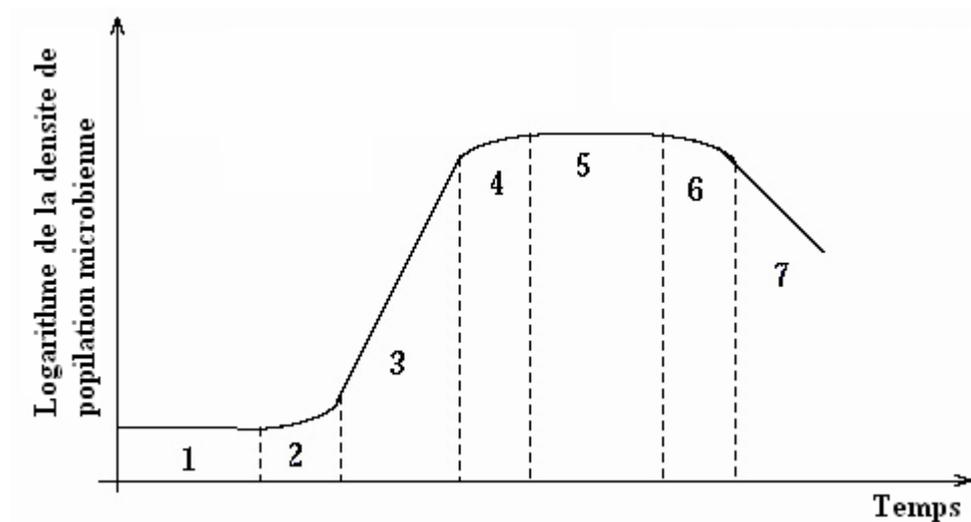


Figure 9 : Les phases de croissance [195]

1- Phase initiale stationnaire ou phase de latence : phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance (phase d'adaptation au nouvel environnement), le taux de croissance est nul ($\mu = 0$). Le temps écoulé durant cette phase est nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (pas de phase de latence si repiquage sur milieu identique au précédent). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu.

2- Phase d'accélération de la croissance : augmentation du taux de croissance.

3- Phase de croissance exponentielle : dite aussi phase de croissance maximale; cette phase est considérée en première approximation comme purement exponentielle. Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

Cette phase est caractérisée par deux paramètres importants qui sont :

- **Taux de croissance μ :**

Les microorganismes suivent une progression géométrique d'ordre 2 et de raison μ [39,196].

$$X = 2^{\mu t} X_0 \quad (1)$$

Ou X : concentration cellulaire (g L^{-1})

X_0 : concentration cellulaire initiale (g L^{-1})

t : temps (h)

μ : taux de croissance (h^{-1})

Par intégration nous obtenons :

$$\mu = \mu_{\max} = \frac{1}{t} \cdot \frac{\ln X - \ln X_0}{\ln 2} \quad (2)$$

La linéarisation de cette équation (2) permet de déterminer graphiquement le taux de croissance μ ,

$$\ln X = \mu t \ln 2 + \ln X_0 \quad (3)$$

- **Temps de génération t_g (h) :**

C'est le temps nécessaire au dédoublement de la population et il est donné par la relation suivante [196] :

$$t_g = \frac{0,69}{\mu} \quad (4)$$

4- Phase de décélération ou phase de freinage, intervient au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent, le taux de croissance régresse. Il existe un début d'autolyse des bactéries.

5- Phase stationnaire maximale, le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

6- Phase d'accélération de la décroissance, le taux de croissance μ bascule vers le négatif.

7- Phase de décroissance exponentielle, qui apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des cellules bactériennes. Le taux de croissance est négatif ($\mu < 0$). Toutes les ressources nutritives sont épuisées. Il y a accumulation de métabolites toxiques. Il se produit une diminution d'organismes viables et une lyse cellulaire sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes.

5.1.1. Modèles mathématiques de la cinétique bactérienne

Les cinétiques de croissance observées en pratique sont loin de correspondre au schéma simple et classique de la Figure 9 et présentent une grande variabilité. La complexité de ce phénomène biologique nécessite l'utilisation de modèles non linéaires pour identifier les paramètres de croissance. Les cinétiques de croissance bactérienne sont le plus souvent représentées en coordonnées semi-logarithmiques, et la méthode la plus évidente et classique d'estimation du taux de croissance maximum est donc une analyse par régression linéaire

dans la partie linéaire de la courbe correspondant à la phase de croissance exponentielle (phase 3) [194].

5.1.1.1. Modèle de Monod

Les principes de la cinétique de croissance microbienne, qui sont la relation entre la vitesse spécifique de croissance et la concentration du substrat, ont été développés principalement entre 1940 et 1970. Ils sont basés (dans le cas de composés non inhibiteurs) sur la limitation du taux de croissance par la concentration du substrat comme il est décrit dans la célèbre équation de Monod, 1949 [22, 70, 197, 198].

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_S + S)} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

Avec : μ_{\max} : taux de croissance maximal (h^{-1})

μ : taux de croissance (h^{-1})

S : concentration en substrat ($g \cdot L^{-1}$)

X : concentration cellulaire ($g \cdot L^{-1}$)

K_S : constante de la saturation du substrat (la concentration du substrat est égale à K_S lorsque $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$, autrement dit, K_S est la concentration du substrat nécessaire pour que la bactérie atteigne $(1/2) \mu_{\max}$) ($g \cdot L^{-1}$)

À des faibles concentrations en substrat, la vitesse de croissance est similaire à une cinétique du premier ordre ($K_S \gg S$), à des fortes concentration en substrat, elle suit une cinétique d'ordre zéro ($K_S \ll S$) [70, 197].

La méthode de Lineweaver-Burk, qui linéarise et simplifie l'équation de Monod (5), nous permet d'avoir l'équation suivante [198, 200, 201] :

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

Et donc le tracé de la droite $1/\mu$ en fonction de $(1/S)$ nous permet d'avoir μ_{\max} et K_S respectivement à partir de l'ordonnée à l'origine et la pente.

Quand le substrat inhibe sa propre biodégradation, le modèle original de Monod devient insatisfaisant. Dans ce cas, des modèles dérivés de celui de Monod qui apportent une correction pour l'inhibition par le substrat ou d'autre modèle qui se distingue de ce dernier, peuvent être utilisés pour décrire la cinétique de croissance bactérienne.

5.1.1.2. Modèle de Andrew

Parmi les modèles les plus pertinents, l'équation d'Andrew établie en 1968, (équivalente à l'équation de Haldane, 1930, utilisée pour la cinétique des enzymes) est largement utilisée pour décrire la croissance bactérienne en présence d'inhibition par le substrat [70, 197], elle est représentée par l'équation suivante [193, 197, 199] :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_S + S + \frac{S^2}{K_i})} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (7)$$

K_i : représente la constante d'inhibition (g. L^{-1})

Pour la détermination de la constante d'inhibition K_i , il est indispensable de passer par la linéarisation de l'équation d'Andrew (7), qui devient [6, 29,63]:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_S}{\mu_{\max}} + \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{S}{K_i \cdot \mu_{\max}} \quad (8)$$

Le tracé de la droite $1/\mu$ en fonction de la concentration du substrat S , nous permet grâce au calcul de la pente, de déterminer K_i . Sachant que $1/S \cdot K_S/\mu_{\max}$ tend vers zéro quand $S \gg K_S$. Dans le cas où le taux de croissance maximale μ_{\max} est atteint et cela lorsque tous les sites bactériens sont saturés de substrat, la vitesse devient indépendante de la concentration de substrat, c'est la phase exponentielle, qui est la plus importante dans la cinétique bactérienne [6].

5.2. Rendement de biodégradation

C'est le rapport qui correspond à la concentration du substrat (dans notre cas le phénol) consommé, sur sa valeur initiale [39]:

$$R = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \quad (9)$$

S_0 : Concentration initiale du substrat (g. L^{-1})

S_f : Concentration finale du substrat (g. L^{-1})

Chapitre II : Matériel et méthodes

Dans ce chapitre nous allons décrire les modes opératoires et méthodes suivis au cours de cette étude ainsi que le matériel utilisé.

1. MATERIEL

1.1. Matériel biologique

- **Souche bactérienne** : Nous avons utilisé deux souches bactériennes :
 - La première est une bactérie autochtone, qui a été isolée à partir des eaux résiduelles de Oued El Harrach, dont les caractéristiques biologiques vont faire l'objet d'une étude.
 - La seconde est une *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, qui nous a été délivrée par l'Institut Pasteur d'Alger dans des tubes de gélose nutritive, dont les caractéristiques biologiques sont données en annexe 2.
- **Milieux de culture** : C'est un mélange solide ou liquide qui contient les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne. Pour notre travail, nous avons utilisé plusieurs milieux, qui sont :
 - **Milieu de conservation** : Les souches bactériennes sont conservées à 4⁰C au réfrigérateur dans des tubes à essais remplis de gélose nutritive solide inclinée dont la composition est citée dans l'annexe 3.
 - **Milieux de pré-culture** : La pré-culture est réalisée avant l'immobilisation des bactéries, elle nous permet d'avoir une population bactérienne suffisante. Plusieurs milieux ont été utilisés à cet effet, qui sont :
 - Le bouillon nutritif dont la composition est indiquée dans l'annexe 4, est utilisé pour la revitalisation des bactéries réfrigérées à 4⁰C. Cette étape est primordiale pour obtenir une concentration bactérienne suffisante.
 - Milieu de culture minéral, utilisé pour adapter des bactéries au phénol, sa composition est citée en annexe 5.

1.2. Réactifs et matériel utilisés

Les réactifs pour le dosage du phénol et le matériel utilisés sont cités dans les annexes 6 et 7

1.3. Dispositif expérimental

➤ Réacteur

Le réacteur utilisé au cours de l'expérimentation est constitué d'un Erlenmeyer de 3 L comportant une sortie permettant d'effectuer des prélèvements réguliers (à proximité d'un bec bunsen). L'aération en continu, générée par une pompe à air, se fait à travers un diffuseur. La variation de la température (bain marie) et de l'agitation se fait par l'intermédiaire d'une plaque magnétique chauffante, (BIBBY STUARTL), la figure 10 suivante représente notre dispositif expérimental.



Figure 10 : Photo du dispositif expérimental

Notre travail consiste à réaliser une étude de biodégradation du phénol par des bactéries libres et immobilisées en batch dans un erlenmeyer de 3 L qui contient 1L de milieu de culture minéral stérilisé cité en annexe 5 contenant une concentration donnée en phénol, sous les conditions opératoires suivantes :

- Température de 37 °C ;
- pH proche de la neutralité ;
- Faible agitation de 75 tr/mn. Ce qui permet aux billes de rester en suspension ;
- Aération de 0,4 L/mn d'air qui préserve les bactéries du phénomène de saturation ;

Ces conditions ont été fixées afin de ne pas interférer dans l'optimisation des autres paramètres étudiés, sachant que ces valeurs permettent une excellente stabilité pour les bactéries et pour la matrice.

2. METHODES

2.1. Protocole expérimental de l'immobilisation par inclusion dans l'alginate de calcium

2.1.1. Mise en œuvre de l'inoculum : Sa préparation s'effectue en deux étapes :

1. **Ensemencement de la souche** : S'effectue à partir d'un tube de gélose nutritive (conservé à 4 °C), quelques colonies sont prélevées et mises dans un tube de 10 mL de bouillon nutritif et incubées à 37 °C pendant 24h jusqu'à apparition d'un trouble qui indique une croissance bactérienne.
2. **Pré-culture** : Les bactéries sont ensuite adaptées au phénol et cela dans une culture dans le milieu minéral cité précédemment à une concentration de 100mg. L⁻¹ [7]. Après incubation à 37 °C pendant 48 à 72 h, les bactéries sont récupérées par centrifugation (10 mn à 6000 tr/mn à 4°C [203], le culot obtenu est lavé 2 fois à l'eau distillée stérilisée afin

d'éliminer toute trace du milieu. Les cellules sont ensuite mises en suspension dans 10 mL d'eau physiologique stérilisée [39].

La concentration en bactéries de cette suspension est déterminée en mesurant la densité cellulaire par spectrométrie UV/Visible et cela à 600 nm. La correspondance densité optique / concentration se fait à partir d'une courbe d'étalonnage établie au préalable.

2.1.2. Préparation de la solution d'alginate de sodium

100 mL d'eau distillée sont chauffés jusqu'à 70 °C sous agitation [99], par la suite 3 g de poudre d'alginate de sodium (Fluka) sont incorporés par petites quantités, (3% poids/volume) sans cesser l'agitation pour éviter toute formation de grumeaux et cela pendant 15 mn jusqu'à dissolution totale de la poudre et homogénéisation de la solution [143]. La solution visqueuse est autoclavée à 121 °C pendant 15 mn [103] sous une pression de 1,5 bar, puis conservée au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à l'utilisation [151].

2.1.3. Préparation de la solution de chlorure de calcium

3 g de poudre de chlorure de calcium CaCl_2 sont dissous dans 100 mL d'eau distillée (3% poids/volume). La solution est ensuite stérilisée à 120 °C pendant 15 mn à 1,5 bar, puis conservée au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à utilisation [151]. Sachant que le pH des deux solutions est de 6,68.

2.1.4. Élaboration des billes

Des billes sphériques d'alginate de calcium sont préparées par extrusion à partir d'une solution d'alginate de sodium contenant la suspension bactérienne et une solution de chlorure de calcium. Le schéma synoptique suivant résume les étapes de réalisation de l'immobilisation des bactéries par inclusion:

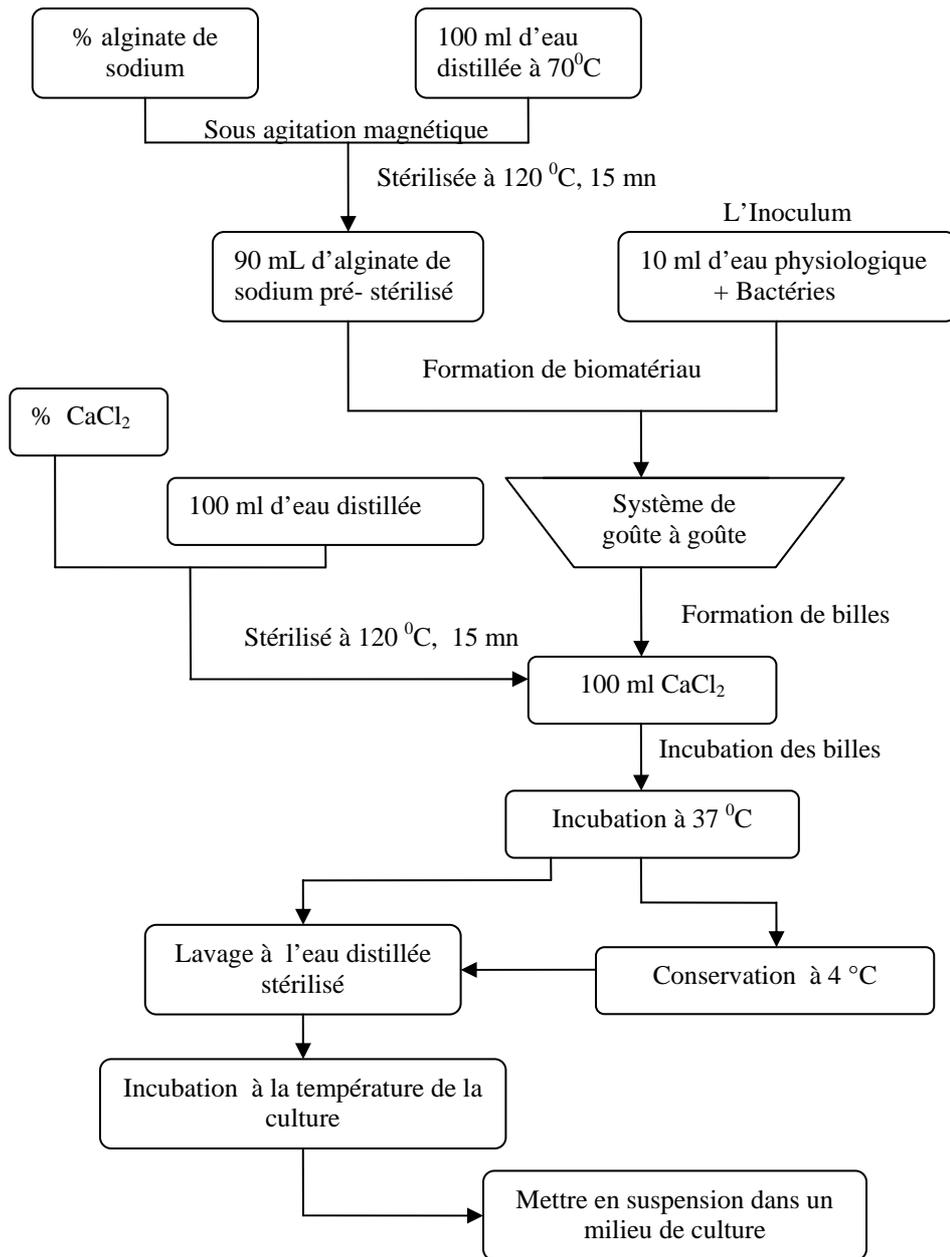


Figure 11 : Schéma synoptique descriptif de la méthode d'immobilisation par inclusion

La formation des billes d'alginate de calcium s'effectue par le mélange de la solution de chlorure de calcium avec l'alginate de sodium contenant les cellules précédemment suspendues dans l'eau physiologique (inoculum). Un rapport volumique (V/V) de gel d'alginate de sodium / Inoculum est choisi égal à 9 (10% de la biomasse bactérienne) [3] avec une masse sèche des cellules immobilisées de 14 mg.

Le mélange s'effectue par dispersion du gel d'alginate de sodium dans la solution de chlorure de calcium par un système de goutte à goutte qui permet d'obtenir des billes sphériques. Ces billes en entrant en contact avec la solution de chlorure de calcium se solidifient grâce à l'action de ce dernier qui renforce les interactions hydrophobes et cela sous une faible

agitation mécanique pour éviter toute collision entre les billes déjà formées et les gouttelettes (billes) [39, 153].

Le diamètre des billes est fonction de l'orifice du système de goutte à goutte utilisé, avec un orifice d'extrusion de 1mm, nous obtenons des billes de diamètre de 4 mm. La hauteur de chute libre des bille entre l'orifice d'extrusion et bain de durcissement de chlorure de calcium doit être ajuster de façon à avoir une forme sphérique : Trop basse, les gouttes s'écrasent à la surface du chlorure de calcium, trop haute, elles auront une forme de comète. Pour nos manipulations, nous avons choisi une hauteur de chute variant entre 10 et 15 cm [191, 204]. Avec un débit de la solution d'alginate de sodium d'une goutte par seconde [204].

Les billes sont ensuite, entreposées dans l'incubateur pendant une durée déterminée de 2 heures à 37 °C afin d'améliorer l'échange d'ions entre le sodium et le calcium [152,110].

Avant utilisation, les billes sont lavées plusieurs fois à l'eau distillée stérilisée afin d'éliminer l'excès de calcium, [143, 205, 206].

Pour un meilleur résultat de biodégradation il est nécessaire d'avoir la même température des billes et du milieu de culture, lors de la mise en culture afin de diminuer le temps d'adaptation des bactéries à la température du milieu.

Afin de réaliser des billes d'alginate sans risque de contamination, toutes les étapes d'immobilisation ont été effectuées dans un périmètre stérilisé.

Une illustration des étapes de réalisation de l'immobilisation par inclusion dans des billes d'alginate de calcium est représentée dans la figure 12, dont le mécanisme d'extrusion peut être une burette, représentée par une flèche en continue, ou une seringue représentée ici avec une flèche en discontinue.

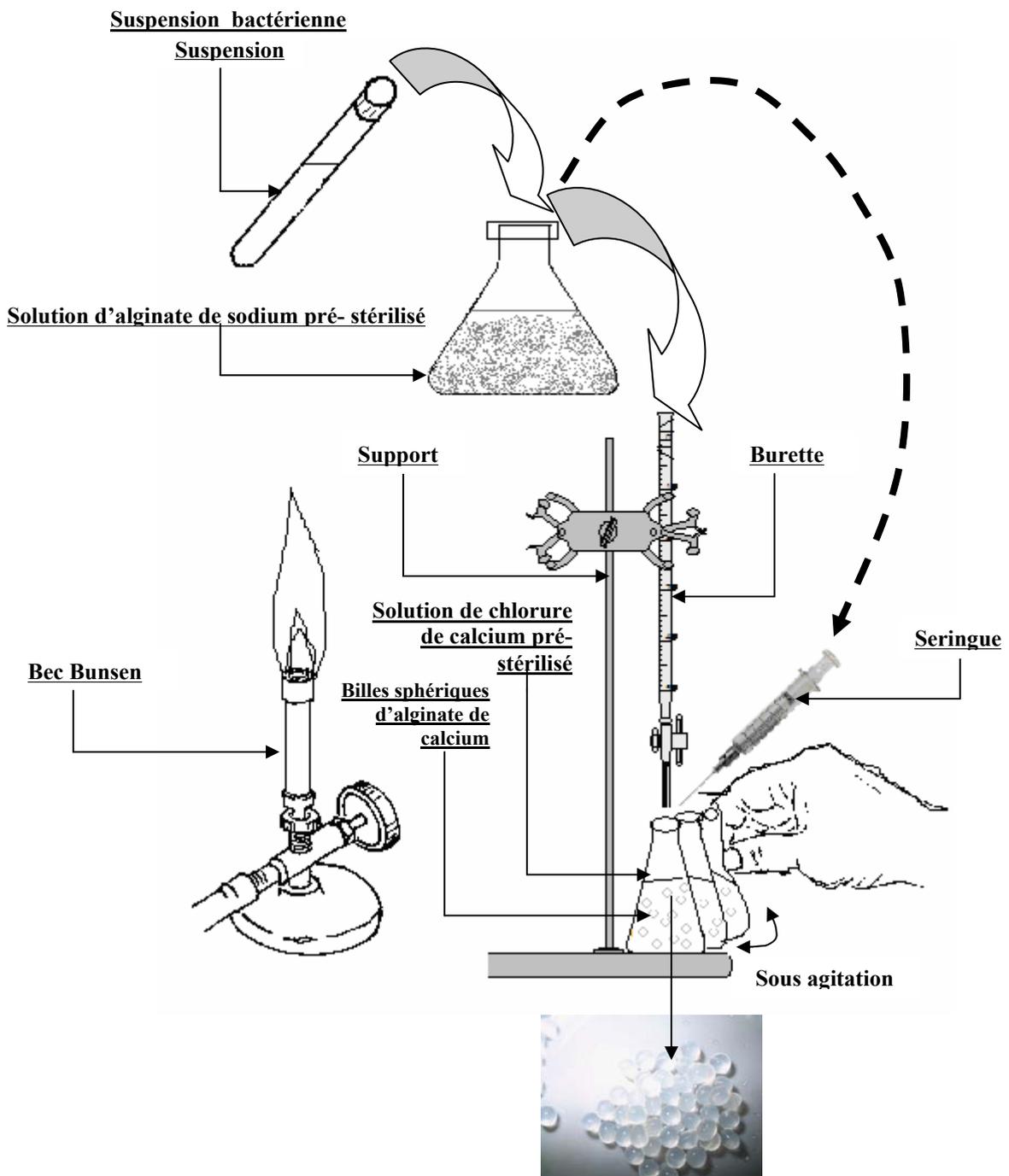


Figure 12 : Illustration des étapes de réalisation de l'immobilisation par inclusion des bactéries dans un support sphérique d'alginate de calcium

Le but de notre travail, est d'optimiser les paramètres de mise en œuvre de la technique d'immobilisation de bactéries par inclusion dans l'alginate de calcium pour une biodégradation du phénol maximale. Pour cela l'influence de divers paramètres opératoires sur la cinétique de biodégradation ainsi que sur le taux de biodégradation ont été étudiés :

- 1) La concentration de l'alginate de sodium (1 à 4%) ;
- 2) La concentration de CaCl_2 (2 à 5%) ;

- 3) Temps de durcissement des billes (de 0 à 24 h) ;
- 4) Taille des billes (3 à 5mm) ;
- 5) La quantité de l'inoculum (9 à 26 mg) ;
- 6) Changement d'alginate de sodium (Fluka) à viscosité moyenne par celle (Sigma) à viscosité élevée, dont les caractéristiques sont cités respectivement en annexe 8 et 9 ;
- 7) Changement de la souche autochtone par *Pseudomonas aeruginosa* ;
- 8) Changement de milieu de culture minéral cité précédemment par un autre modifié cité en annexe10.

L'effet de l'adaptation des cellules bactériennes au phénol a aussi été étudié, ainsi que le comportement des bactéries libres par rapport à celles immobilisées dans les mêmes conditions opératoires, afin de mettre en évidence l'effet de l'immobilisation sur les bactéries.

2.2. Méthode d'analyses

Des prélèvements à intervalles de temps réguliers ont été effectués afin de suivre les taux de biodégradation du phénol ainsi que de la cinétique de la biomasse relarguée.

2.2.1. Mesure de la densité bactérienne

La variation de la densité cellulaire est déterminée par spectrophotométrie d'adsorption moléculaire UV/ Visible (SHIMADZU UV MIN-1240) à une longueur d'onde de 600 nm. En utilisant la courbe d'étalonnage préalablement établie à la même longueur d'onde (voir l'annexe 11-1, 11-2 respectivement pour les bactéries autochtones et les *Pseudomonas aeruginosa*), la densité optique lue est convertie en concentration de matière sèche de biomasse exprimée en (mg de matière sèche.L⁻¹) [39, 143].

2.2.2. Dosage du phénol

La détermination de la concentration résiduelle en phénol, a été faite selon la norme européenne AFNOR NF T 90-204 (1979) [17]; Il s'agit de la condensation en milieu basique de l'ion phénate sur la 1-phényl-2,3-diméthyl-4-amino-5-pyrazolone connu sous le nom de 4-amino antipyrine en présence d'un oxydant, l'hexacyanoferrate(III) de potassium communément appelle ferricyanure de potassium. La coloration rouge se développe en 5 min. La solution est analysée par spectrophotométrie d'adsorption moléculaire UV/ Visible à une longueur d'onde de 510 nm. En utilisant la courbe d'étalonnage préalablement établie, (voir l'annexe 12), la densité optique lue est convertie en concentration de phénol en (mg.L⁻¹) [17]. Cette méthode est conditionnée par une concentration en phénol n'excédant pas les 5mg.L⁻¹ [9].

2.2.3. Analyse par CLHP

Une analyse qualitative par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) en anglais (HPLC) a été effectuée, dans les conditions suivantes :

Tableau 8 : Les conditions chromatographiques de fonctionnement

Conditions opératoires de fonctionnement	
Colonne	Colonne HPLC type symmetry C ¹⁸ de dimension (150. 4,6 mm) d'origine Waters
Phase mobile	Acétonitrile–Eau (75:25, v/v)
Longueur d'onde	270 nm
Débit	1mL.mn ⁻¹
Volume injecté	20µL

Le matériel chromatographique utilisé ainsi que le principe de fonctionnement de cette technique d'analyse sont cités en annexe 13.

2.2.4. Analyse par microscope optique

Une observation de la surface des billes d'alginate et donc leur morphologie, a été réalisée par un microscope optique Zeiss Axiostar plus équipé d'une caméra CCD reliée à un moniteur pilotée par ordinateur.

2.2.5. Méthode d'identification des bactéries

Du point de vue identification biochimique, il existe deux types d'identification, celle du genre et celle de l'espèce : l'identification du genre, est basée sur l'aspect morphologique, la coloration de Gram et les caractères culturels. Alors que l'identification de l'espèce, se fait par l'utilisation de galeries biochimiques [207].

Une culture pure sert à l'ensemencement d'un tube de gélose nutritive inclinée qui sera incubé à 37⁰C pendant 24h. Une colonie est prélevée pour réaliser la coloration de Gram et une autre diluée dans 5 mL d'eau distillée stérilisée pour les galeries biochimiques.

2.2.5.1. La coloration de GRAM

C'est la paroi qui donne à la bactérie sa forme. Et donc grâce à cette coloration, nous pouvons déterminer la forme de notre bactérie. En plus cette technique, nous permet d'avoir une autre information, celle du type. Il y a deux grands types de bactéries, mis en évidence par la coloration de Gram (réalisée en 3 étapes : coloration au violet de gentiane, décoloration à l'alcool, coloration à la fuchsine) [207] :

- Les bactéries à **Gram négatif**, dont la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme et qui prend une coloration de fuchsia après coloration à la fuchsine.
- Les bactéries à **Gram positif**, dont la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet de gentiane [207].

2.2.5.2. Les galeries biochimiques

La suspension bactérienne préalablement préparée, est introduite dans des tubes contenant des milieux de cultures et des solutions spécifiques permettant de mettre en évidence quelques caractères biochimiques des bactéries et de les différencier [207]. Les protocoles utilisés pour chaque galerie sont décrits et illustrés en annexe 14.

Chapitre III : Résultats et discussion

Plusieurs manipulations ont été effectuées afin d'étudier l'influence de divers paramètres opératoires intervenant dans le processus de biodégradation du phénol par des bactéries immobilisées par inclusion dans les billes d'alginate de calcium. Par la suite, une comparaison cellules libres et immobilisées, bactéries différentes, fut faite, pour déterminer l'influence de l'immobilisation et du type de bactérie sur le rendement de biodégradation. Une étude de la morphologie des billes a aussi été réalisée, afin de visualiser le phénomène d'immobilisation au niveau de la bille.

Afin de mieux connaître la bactérie autochtone utilisée pour cette étude, nous commençons notre travail par une approche d'identification physique et biochimique concernant cette souche bactérienne (que l'on nommera SB6). Sachant que cette dernière a été isolée à partir d'eaux résiduaires de Oued El Harrach.

1. CARACTERISATION DE LA BACTERIE SB6

1.1. Description de la colonie et coloration de Gram



Figure 13 : Boîte de Pétri représentant la culture de SB6

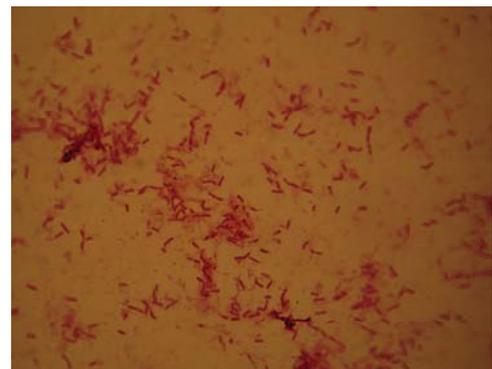


Figure 14 : Résultat de la coloration de Gram

La figure 13 représente une culture de SB6 dans une gélose Nutritive, nous permet de décrire la colonie dont les caractéristiques sont : forme ronde, plus ou moins grosse, plate, et lisse, régulière, opaque, sans odeur spécifique.

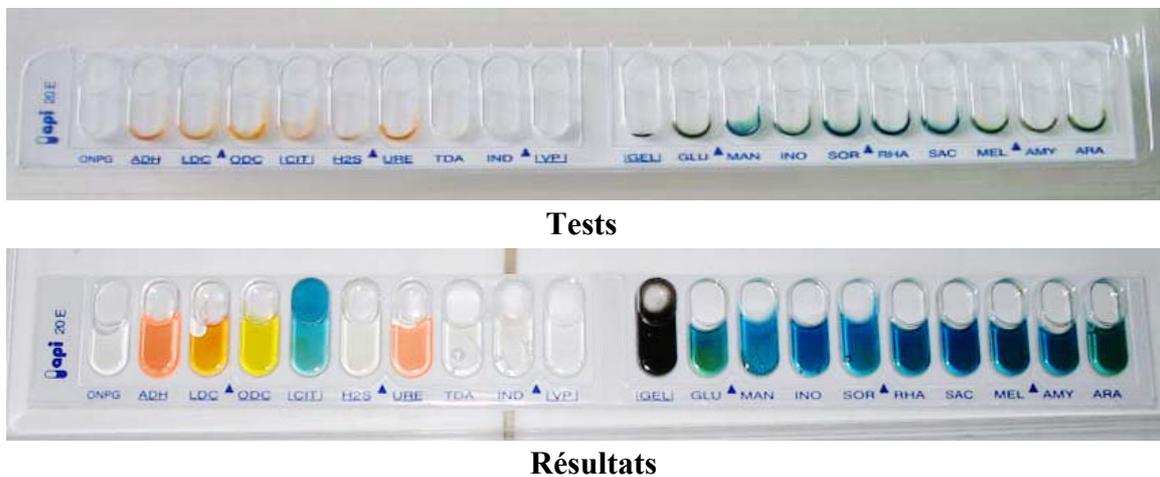
La coloration de Gram représentée dans la figure 14, nous a permis de déterminer la morphologie de ces bactéries qui sont des **Bacilles** courts, ainsi que le test de Gram qui est **Négatif** car les bactéries se sont colorées à la fuchsine. Ces indications nous permettent déjà d'orienter notre recherche vers des familles bactériennes précises dont les plus plausibles sont : *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*, *Vibrionaceae*, *Moraxellaceae*.

Mais pour plus de précision sur la famille bactérienne, le genre et l'espèce des analyses biochimiques sont indispensables.

1.2. Galeries biochimiques



a) Mini galerie biochimique



b) Galerie biochimique API20E

Figure 15 : Représentation des tests et des résultats des galeries biochimiques

La galerie API20E nous a permis de confirmer et de compléter les résultats effectués par la mini galerie réalisée précédemment, et un code n° : 6216006 fut déterminé.

Tous les résultats sont portés sur le tableau suivant:

Tableau 9 : Résultats des analyses biochimiques

Analyse	Elément visé	Résultat
Milieu TSI (Triple Sugar Iron)	Fermentation du Glucose	+
	Fermentation du Lactose	+
	Production de Gaz	-
	Production d'H ₂ S	-
Milieu Mannitol - Mobilité		-
Citrate de Simmons	Source de carbone	+
	Urée : enzyme uréase,	+
Milieu Urée Indole	Indole : Tryptophanase.	-
	TDA : Tryptophane Désaminase	-
	Témoin	+
Acides Aminés	ODC (Ornithine Décarboxylase)	-
	ADH (Arginine Décarboxylase)	+
	LDC (Lysine Décarboxylase)	+
ONPG (orthonitrophényl-galactose)		-
VP (Voges-Proskauer)		-
GEL (Gélatine)		+
INO (Inositol)		-
SOR (Sorbitol)		-
RHA (Rhamnose)		-
SAC (Saccharose)		-
MEL (Melibiose)		-
AMY (Amygdaline)		-
ARA (L-arabinose)		-
OXYDASE		+
CATALASE		+

Les résultats ainsi obtenus nous permettent de dire que SB6 est :

- ❖ Bacille gram négatif,
- ❖ Aérobie strict,
- ❖ De la famille de *Vibrionaceae* parce qu'elle possède une oxydase et une catalase en plus de fermenter le glucose sans production de gaz,
- ❖ C'est une *Aeromonas*, parce que les testes biochimiques correspondent le plus à ce genre.

Le code de la galerie API20E, nous a pas permis d'identifier la souche bactérienne. Mais des analyses complémentaires nous permettront de déterminer l'espèce exacte et de confirmer nos résultats.

2. ÉTUDE DE LA BIODEGRADATION DU PHÉNOL PAR DES BACTÉRIES SB6 LIBRES

Il est impératif de déterminer les paramètres de croissance des bactéries autochtones SB6 nouvellement utilisées pour cette technique, afin de connaître le comportement des cellules libres et de pouvoir les comparer avec celles immobilisées.

2.1. L'effet de l'adaptation des bactéries SB6 libres au phénol sur la biodégradation

Pour la mise en évidence du phénomène de l'adaptation des bactéries au phénol, nous suivons la cinétique de biodégradation de ce dernier par des bactéries adaptées et non. Pour cela, 14 mg de bactéries SB6 vont être mises en culture dans une solution phénolique de 100 mg.L⁻¹ Périodiquement, des échantillons sont prélevés et analysés, par spectrophotométrie UV-Visible à 510 nm. Les résultats expérimentaux sont représentés graphiquement sur la figure suivante :

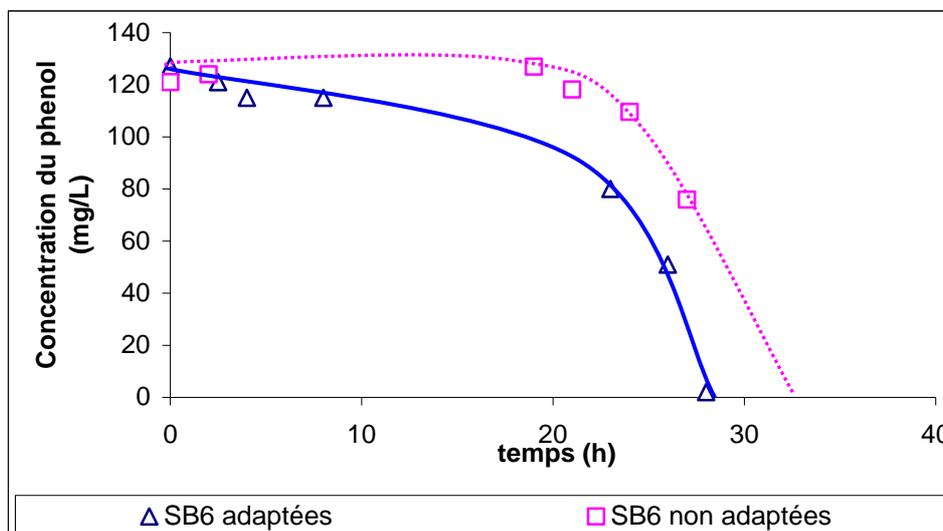


Figure 16 : Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries SB6 libres adaptées et non adaptées au phénol

Les cinétiques de croissance bactérienne sont représentées dans la figure suivante :

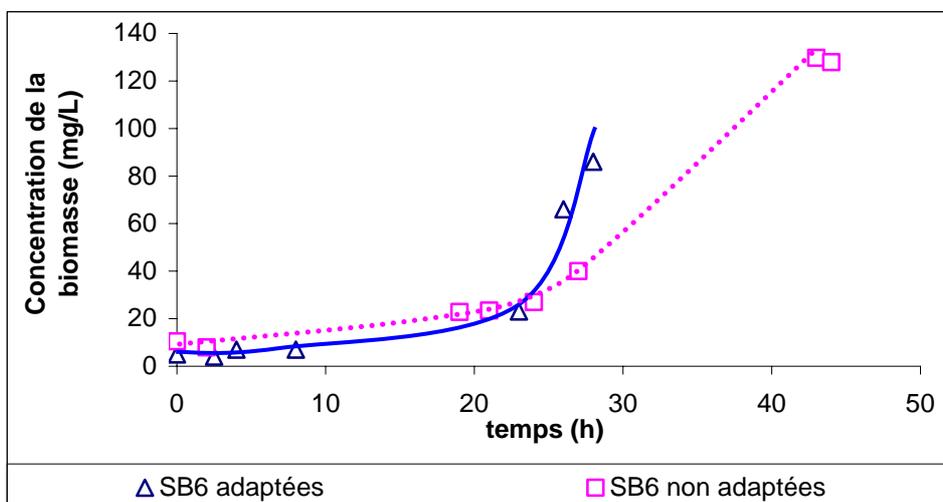


Figure 17 : Cinétiques de croissance de SB6 libres adaptées et non adaptées au phénol

Les différents calculs sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Paramètre de croissance bactérienne

Etat des bactéries	Equation de courbe de croissance	$\mu = \mu_{\max} (h^{-1})$
non adaptées	$Y = 0,0565x + 2,387$	0,081
adaptées	$Y = 0,0939x + 2,6023$	0,135

L'adaptation des microorganismes au phénol améliore leurs capacités de biodégradation comme nous pouvons le voir sur la figure 16, cette amélioration se manifeste par l'augmentation du taux de croissance des bactéries libres de 0,081 à 0,135h⁻¹, ce qui confirme les résultats trouvés par Shimp et Pfaender, 1987 [208].

2.2. L'effet de la concentration sur la biodégradation du phénol par des bactéries SB6 libres

Des bactéries SB6 d'un poids de 14 mg préalablement adaptées à 100 mg.L⁻¹ de phénol, sont introduites dans 1L de milieu de culture minérale contenant des concentrations croissantes de phénol, 100, 300, 500 et 800 mg.L⁻¹. L'analyse de la concentration résiduelle est représentée sur la figure suivante :

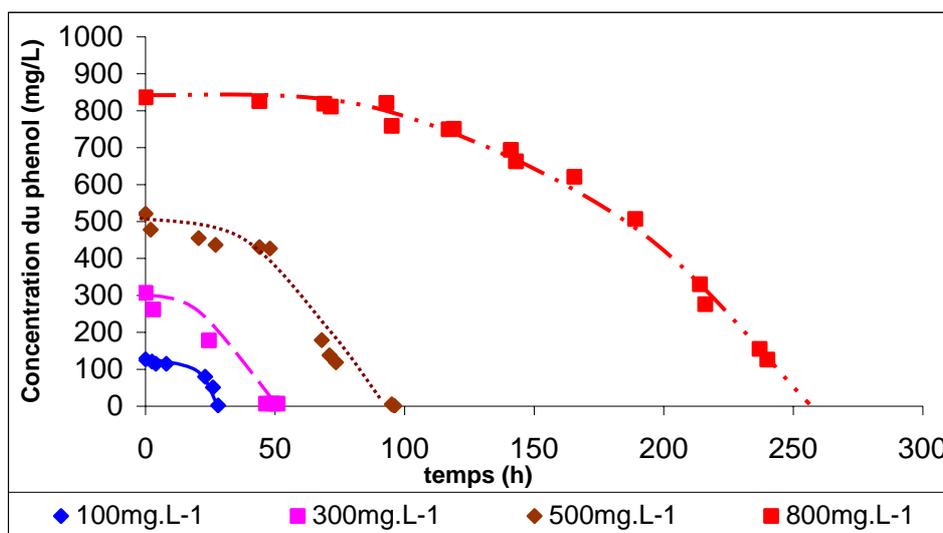


Figure 18 : Influence des concentrations initiales sur la cinétique de biodégradation

Nous remarquons que la biodégradation du substrat est totale pour les concentrations étudiées. Les cinétiques de croissance bactérienne sont représentées dans la figure suivante :

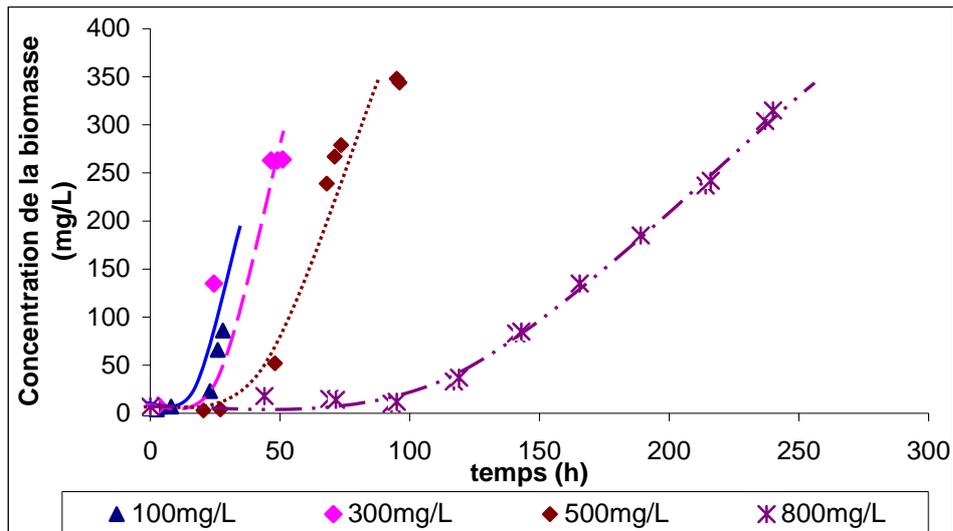


Figure 19 : Influence des concentrations initiales sur la cinétique de croissance

Grâce à ces courbes, nous avons pu déterminer les paramètres de croissance représentés dans le tableau suivant.

Tableau 11 : Paramètre de croissance bactérienne

Concentration (mg.L ⁻¹)	Equation de courbe de croissance	$\mu = \mu_{max}$ (1/h)
100	$Y = 0,0939x + 2,6023$	0,135
300	$Y = 0,0803 x + 2,2001$	0,118
500	$Y = 0,069 x + 0,6656$	0,099
800	$Y = 0,0197x + 1,2646$	0,028

Le graphe qui suit, représente le taux de croissance à différentes concentrations initiales en phénol :

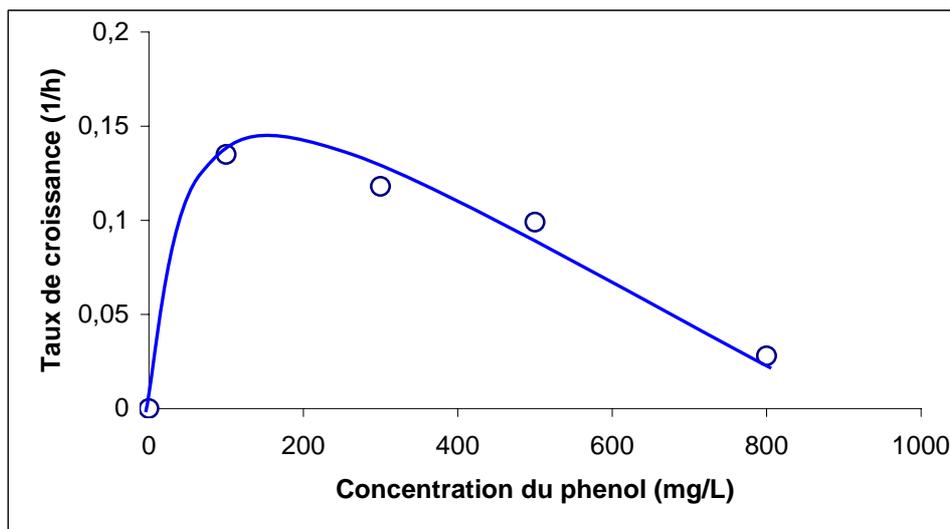


Figure 20 : Taux de croissance de SB6 libres à différentes concentrations initiales en phénol

Comme on le constate, la croissance maximale est obtenue pour une concentration comprise entre 100 et 200mg.L⁻¹.

L'influence de la concentration initiale du phénol sur la durée de la phase de latence (temps déterminé à partir de la droite horizontale correspondant à la densité initiale et l'intersection avec la tangente de la courbe utiliser pour la détermination de la de la phase de croissance exponentielle) est représentée dans la figure suivante :

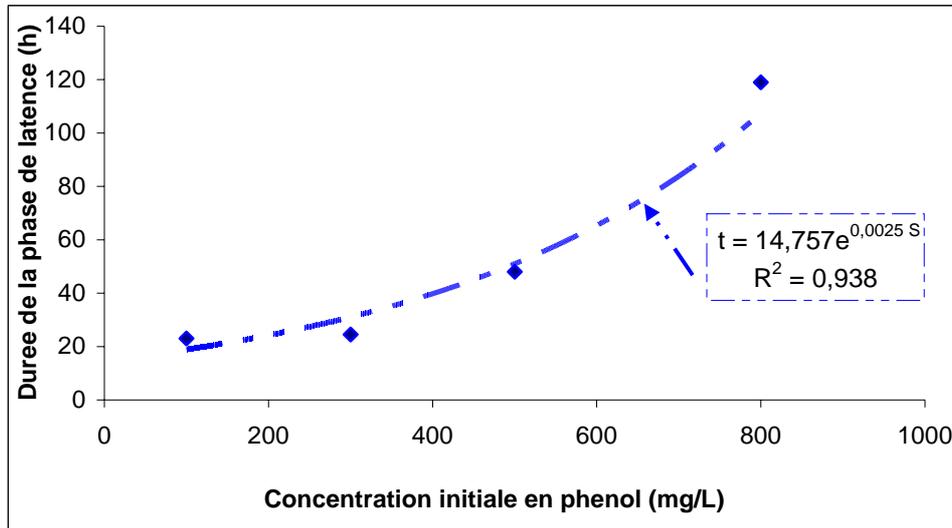


Figure 21 : Durée de la phase de latence en fonction de la concentration initiale en phénol

D'après la figure 21, l'augmentation de la concentration initiale en phénol provoque l'augmentation de la phase de latence entre 100 et 800 mg.L⁻¹. Car l'élévation de la concentration du substrat, oblige les cellules à s'adapter à des concentrations supérieures de ce dernier ce qui provoque l'allongement du temps de la phase de latence. C'est ce qui été observé par Saravanan et coll., (2008) [209] pour la biodégradation du phénol en culture mixe. Alors que Monteiro et coll., (2000) [63] en biodégradant le phénol par *Pseudomonas putida* en culture libre en batch, ces derniers ont observé que la durée de la phase de latence croît linéairement avec la concentration du phénol entre une concentration comprise entre 5 et 100 mg.L⁻¹, contrairement à Dapaals et coll., (1992) (cités par la même source) qui eux en utilisant la même souche bactérienne, ont constaté que la durée de latence croît exponentiellement avec la concentration du phénol dans l'intervalle (60-600 mg.L⁻¹) et c'est ce qui correspond le plus à nos données expérimentales.

2.3. Calcul des constantes cinétiques

2.3.1. Modèle de Monod

En appliquant le modèle de Monod linéarisé et en traçant l'inverse du taux de croissance ($1/\mu$) en fonction de l'inverse des concentrations initiales en phénol ($1/S$), nous obtenons la courbe suivante :

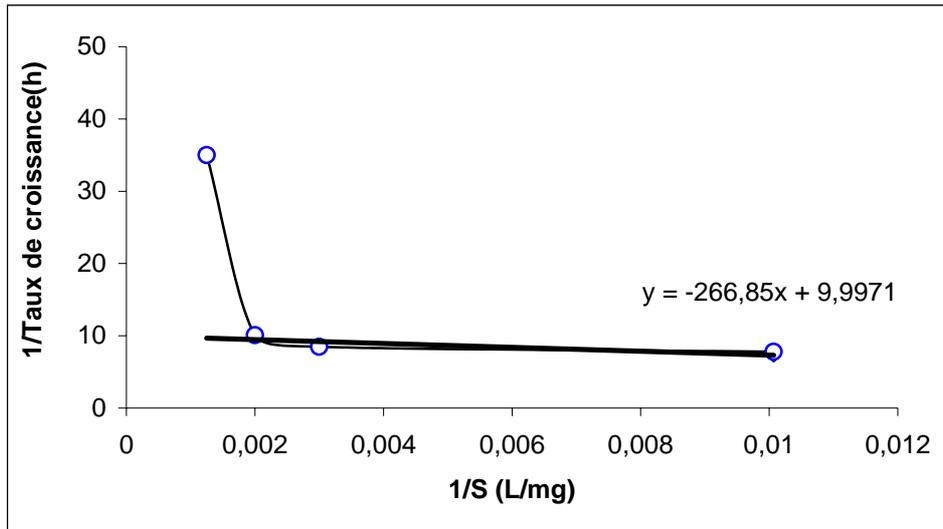


Figure 22 : Les constantes cinétiques déterminées par l'application du modèle de Monod

D'après la figure 22 : $\mu_{max} = 0,10 \text{ h}^{-1}$; $Ks = 26,6 \text{ mg.L}^{-1}$

D'où l'équation de Monod est :
$$\mu = 0,10 \frac{S}{26,6 + S}$$

D'après l'allure de la courbe une inhibition par le phénol est constatée, c'est pour cela que nous nous sommes orientés vers le modèle d'Andrew pour déterminer le paramètre d'inhibition.

2.3.2. Modèle d'Andrew

En appliquant le modèle d'Andrew linéarisé et en traçant l'inverse du taux de croissance ($1/\mu$) en fonction des concentrations initiales en phénol (S), nous obtenons :

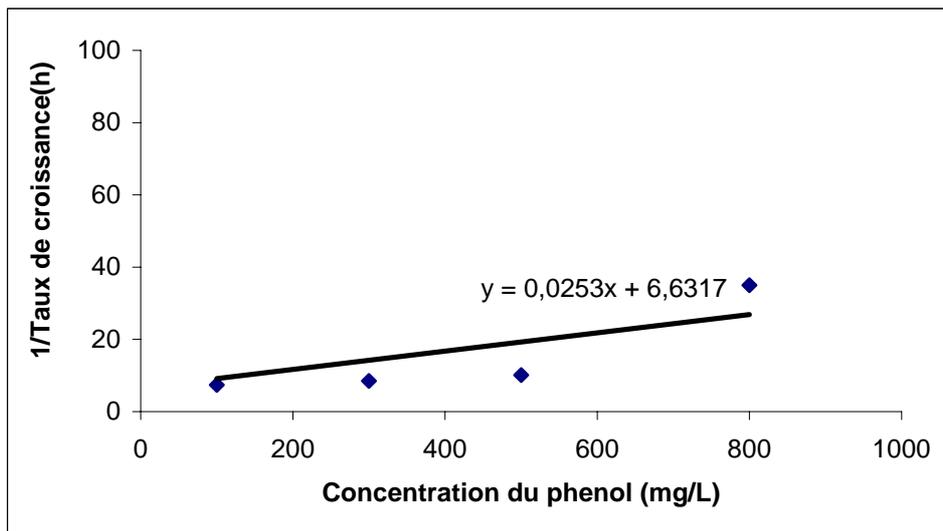


Figure 23 : Les constantes cinétiques déterminées par l'application du modèle d'Andrew

D'après la figure 23: $\mu_{max} = 0,15 \text{ h}^{-1}$; $Ki = 262,12 \text{ mg.L}^{-1}$

D'où l'équation d'Andrew est :
$$\mu = 0,15 \frac{S}{26,6 + S + (S^2 / 262,12)}$$

3. CINÉTIQUE D'ADSORPTION DU PHÉNOL PAR LES BILLES D'ALGINATE

Pour s'assurer qu'aucun phénomène que la biodégradation n'intervient dans l'élimination du phénol dans le cas des bactéries immobilisées, dans un réacteur de 1L de milieu de culture minéral contenant une concentration de 300 mg.L^{-1} de phénol, des billes d'alginate dépourvues de bactéries sont introduites. Périodiquement des prélèvements sont analysés pour déterminer la concentration résiduelle du phénol par la technique spectrophotométrie du 4-aminoantypirine à 510 nm.

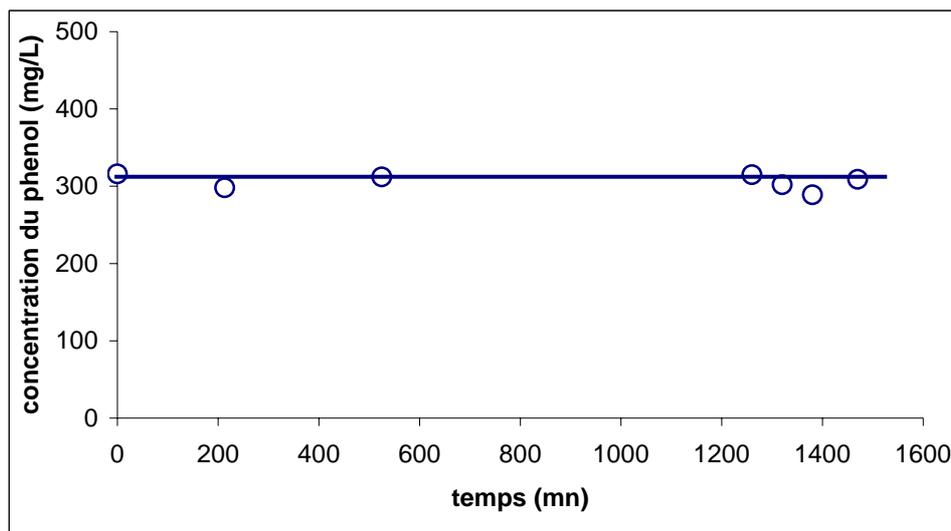


Figure 24 : Cinétique d'adsorption du phénol par des billes d'alginate de calcium déterminée à 510 nm

Le résultat de cette cinétique, nous permet de confirmer qu'il n'y a pas d'adsorption du phénol par les billes d'alginate de calcium. La différence de concentration en phénol entre le début et la fin de l'expérience est infime (7 mg.L^{-1} , écart de l'ordre de 2%) due probablement à la sensibilité de la méthode d'analyse.

Pour confirmer notre résultat, nous avons refait notre expérience en utilisant les mêmes conditions opératoires et la même concentration du phénol de 300 mg.L^{-1} , mais nous avons utilisé une autre méthode pour analyser le phénol qui est basée sur la spectrométrie d'absorption UV. Des prélèvements sont analysés par spectroscopie UV à une longueur d'onde de 270nm (pour la méthode d'analyse et la courbe d'étalonnage voir annexe 15), nous obtenons la courbe suivante:

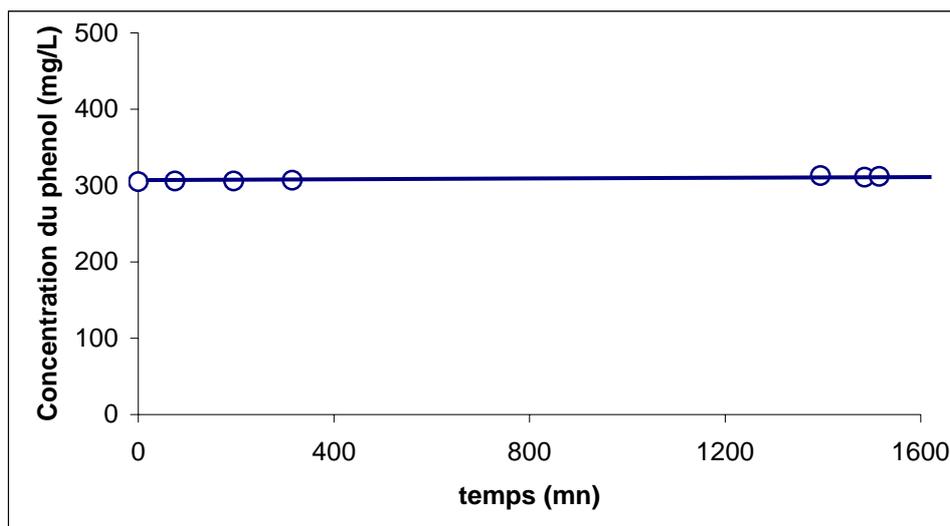


Figure 25 : Cinétique d'adsorption du phénol par des billes d'alginate de calcium déterminée à 270 nm

Nous constatons que la différence de concentration du phénol entre le début de mise en réacteur et la fin est quasi nulle de l'ordre de 8 mg.L^{-1} ce qui confirme le résultat précédent. Cette expérience a permis aussi de vérifier que les deux techniques d'analyse employées sont équivalentes.

4. CINÉTIQUE DE LA BIODEGRADATION DU PHÉNOL PAR DES BACTÉRIES LIBRES ET IMMOBILISÉES

Pour comparer entre la biodégradation du phénol par des cellules libres et immobilisées (adaptées ou non au phénol), nous avons réalisé des expériences dans les conditions opératoires citées dans le tableau 12 et suivi les cinétiques de biodégradation d'une concentration initiale en phénol de 100 mg.L^{-1} et la croissance bactérienne.

Tableau 12 : Conditions opératoires

État des cellules	Conditions opératoires
Libres	Quantité de l'inoculum 14 mg ;
Immobilisées	Concentration de l'alginate de sodium Fluka 3 % ; Concentration de CaCl_2 3 % ; Temps de durcissement des billes 2 h à 37°C ; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg .

4.1. Cellules non adaptées au phénol

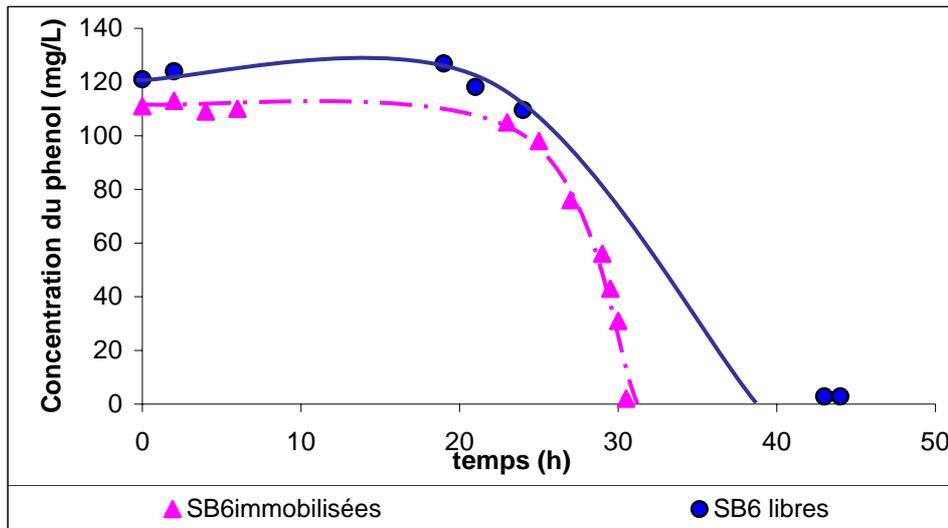


Figure 26 : Cinétiques de biodégradation du phénol par des cellules libres et immobilisées non adaptées au phénol

Grâce à cette courbe, nous pouvons déduire que la cinétique de biodégradation des cellules immobilisées est meilleure que celle des libres. Pour un temps de $t = 30$ heures, alors que les cellules immobilisées dégradent 100%, celles libres ne dégradent que 25 %.

La figure suivante représente simultanément, le temps de biodégradation total du phénol, ainsi que la concentration maximale des cellules relarguées pour les cas.

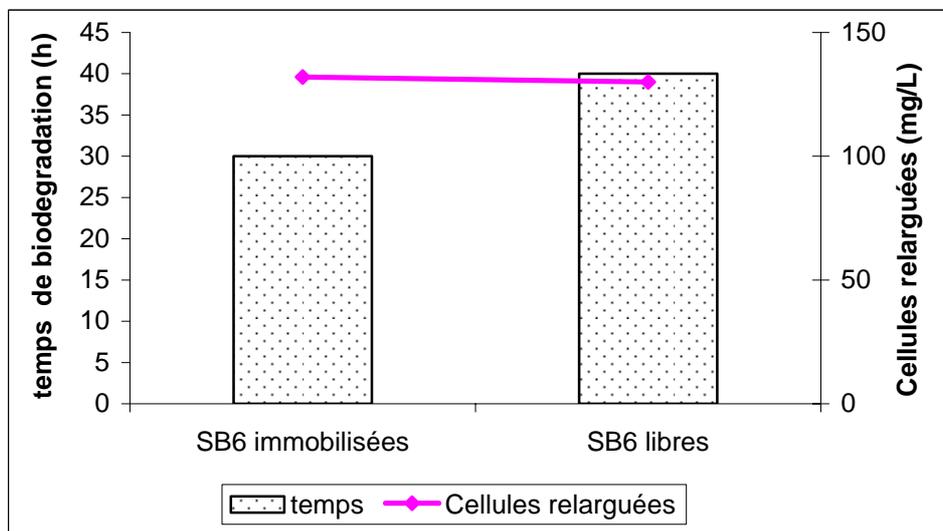


Figure 27 : Effet du non adaptation des bactéries SB6 libres et immobilisées sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées

Cette courbe nous permet de constater une concentration cellulaire relarguée aussi importante que celle des bactéries en suspension alors que le temps de biodégradation des cellules immobilisées est meilleur que pour les cellules libres.

Dans le cas des bactéries non adaptées au phénol, une fois mises en culture, elles migrent à la surface de la bille là où les conditions de croissance sont meilleures. Une fois adaptées,

elles génèrent un relargage cellulaire issu de la croissance de ces dernières à la surface de la bille (encombrement cellulaire).

4.2. Cellules adaptées au phénol

Nous avons réalisé les mêmes expériences que précédemment, mais cette fois les bactéries ont été adaptées à 100 mg.L^{-1} de phénol. Nous obtenons les courbes suivantes :

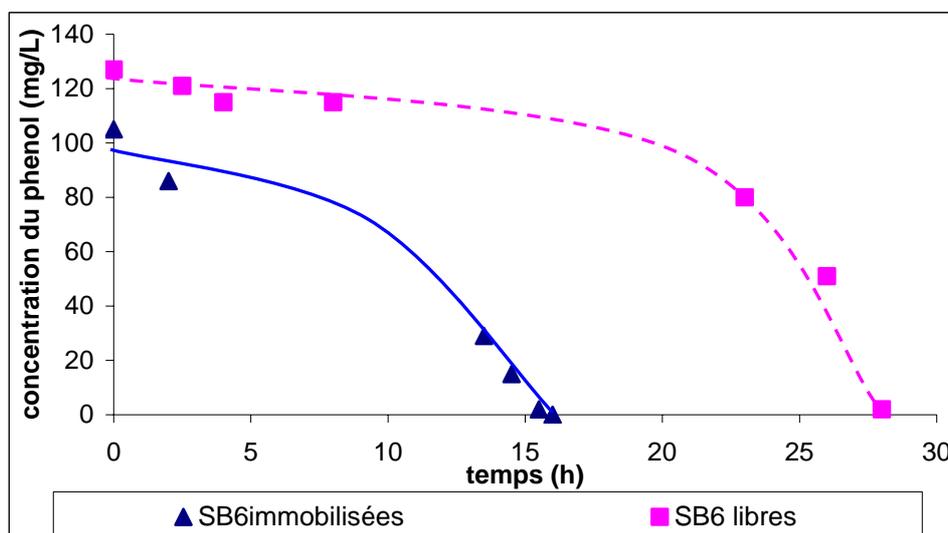


Figure 28 : Cinétiques de biodégradation du phénol par des cellules SB6 libres et immobilisées adaptées à 100 mg.L^{-1} de phénol

L'adaptation permet encore d'améliorer le temps de biodégradation puisqu'il ne faut plus que la moitié du temps précédent ($t=16$ heures) pour dégrader totalement le phénol par les cellules immobilisées.

Ceci peut s'expliquer par le fait que pour les cellules immobilisées, le gradient de concentration existant entre le milieu environnant et la surface de la sphère, fournit en permanence du substrat jusqu'à épuisement de ce dernier, les bactéries étant adaptées, et étant à des faibles concentrations en phénol, le temps d'adaptation des cellules est pratiquement nul.

Pour les cellules libres, c'est la disponibilité spatiale qui pose problème, la bactérie doit aller chercher ce substrat et cela se répercute sur la cinétique de biodégradation.

Ce résultat est conforme à ceux trouvés par Chen et coll., (2002) [102], Abd-El-Haleem et coll., (2003) [3] ainsi que celui de Benahmed Djilali (2005) [39].

La figure suivante représente, le temps de biodégradation total du phénol, ainsi que la concentration maximale des cellules relarguées pour les cas.

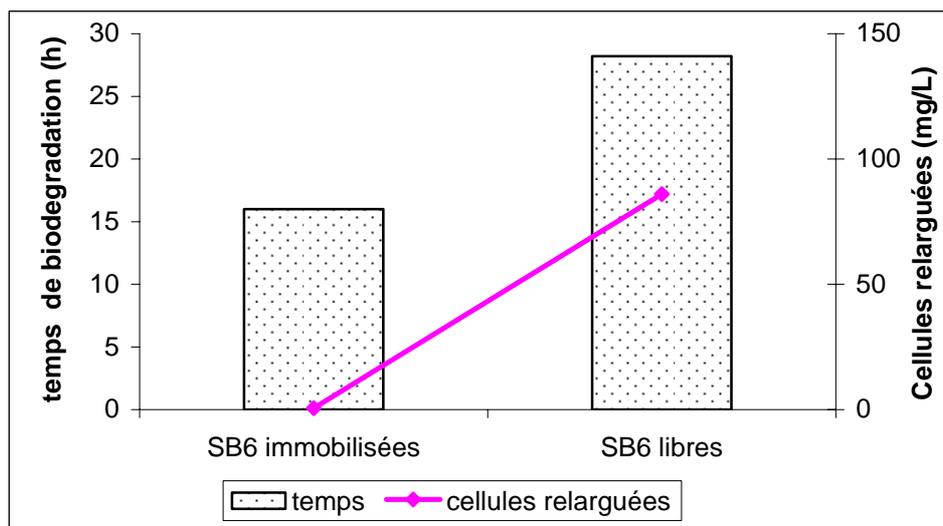


Figure 29 : Effet de l'adaptation des bactéries SB6 libres et immobilisées sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées

Comme pour les cellules libres l'adaptation joue un rôle important dans la cinétique de biodégradation du phénol par les cellules immobilisées. En plus d'améliorer la cinétique de biodégradation, l'adaptation annule dans ce cas le relargage des cellules des billes d'alginate. Nous remarquons que pour les cellules SB6 immobilisées, l'effet de l'adaptation influence non seulement la cinétique de biodégradation mais aussi le relargage cellulaire dans le milieu de culture, c'est pour cela que nous allons étudier ce paramètre plus amplement dans ce qui va suivre.

5. L'EFFET DE L'ADAPTATION DES BACTERIES SB6 IMMOBILISEES A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN PHENOL SUR LA BIODEGRADATION

Les bactéries avant immobilisation ont été adaptées à différentes concentrations en phénol. Les billes d'alginate obtenues suite à cela ont été introduites dans le milieu de culture minéral contenant 100 mg.L^{-1} de phénol en maintenant les autres conditions opératoires pour chaque cas, qui sont présentées dans le tableau 13 suivant :

Tableau 13 : Conditions opératoires

Concentration d'adaptation au phénol (mg.L^{-1})	Conditions opératoires
0 50 100 200	Concentration de l'alginate de sodium Fluka 3 % ; Concentration de CaCl_2 3 % ; Temps de durcissement des billes 2 h à 37°C ; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg .

Nous obtenons les courbes suivantes :

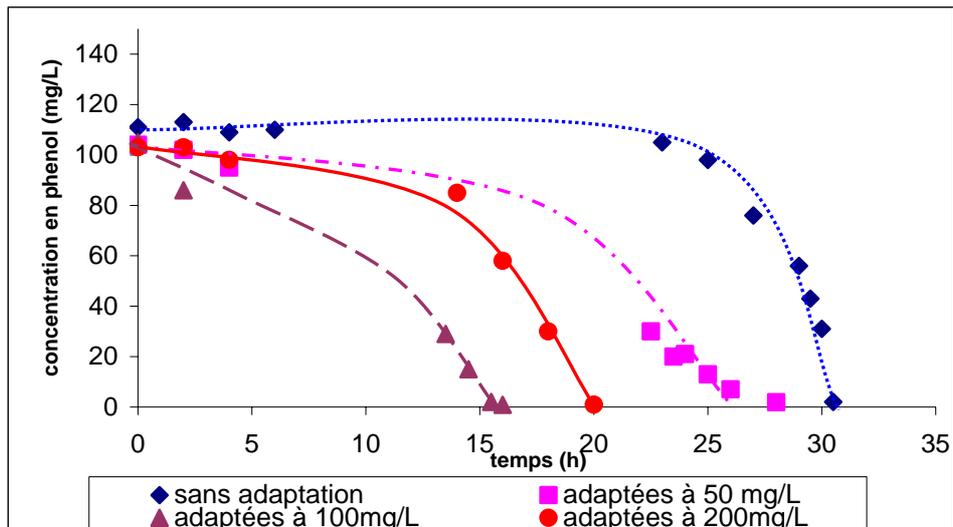


Figure 30 : Influence de l'adaptation des bactéries sur la cinétique de biodégradation

Comme nous pouvons le voir sur la figure 30, l'adaptation qui donne une cinétique de biodégradation optimale du phénol correspond à 100 mgL⁻¹.

L'adaptation permet d'améliorer la cinétique de biodégradation, le but de cette expérience est d'optimiser cet état, et on constate qu'au-delà de 100 mg.L⁻¹, l'effet inhibiteur (on oublie souvent que cet élément est un antiseptique) du phénol commence à apparaître.

L'évolution de la biomasse résiduelle et le temps de biodégradation totale ont été représentés sur la figure suivante :

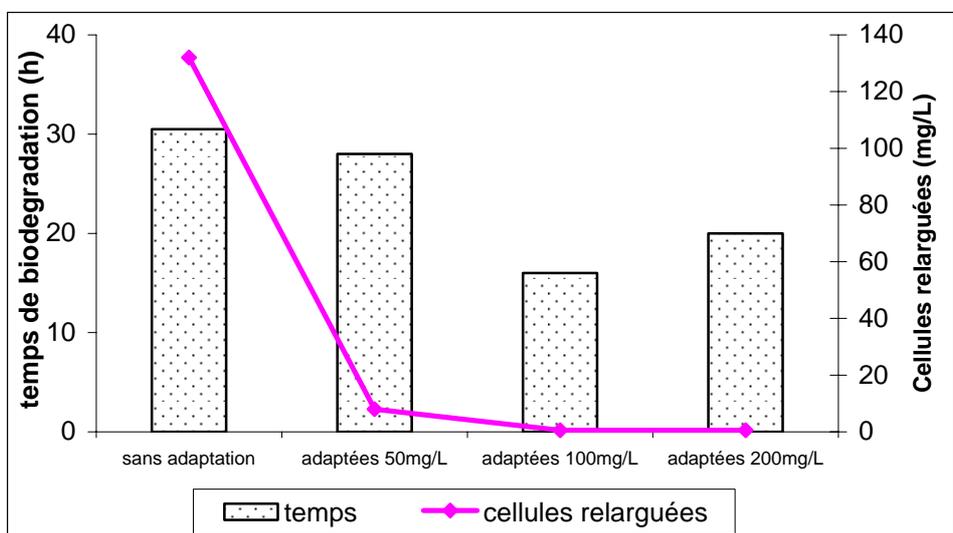


Figure 31 : Effet de l'adaptation des bactéries SB6 sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées

Ce graphe, nous confirme, non seulement le fait que la meilleure biodégradation par les cellules immobilisées est réalisée par celles adaptées préalablement à 100 mg.L⁻¹, mais que cette valeur nous permet d'avoir un taux de relargage cellulaire nul. Les bactéries se répartissent sur la périphérie interne de la surface, où elles trouvent les conditions optimales à

leur croissance, et tout en s'accroissant elles occupent la couche située à cette périphérie, n'étant pas à la surface, elles ne provoquent pas de relargage.

Et donc pour tout notre travail avec cette bactérie, nous allons fixer l'adaptation des cellules à une concentration de 100 mgL^{-1} .

6. L'EFFET DU POURCENTAGE EN ALGinate DE SODIUM SUR LA BIODEGRADATION DU PHENOL

La détermination du pourcentage optimal en alginate de sodium entrant dans l'élaboration des billes d'alginate est l'un des paramètres les plus influant sur la biodégradation. La figure 32 représente le suivi des cinétiques de biodégradation d'une concentration de 100 mg.L^{-1} de phénol par des bactéries SB6 immobilisées dans des billes d'alginate de calcium de différents pourcentages (p/v) (1%, 2%, 3%, 4%) en alginate de sodium « Fluka », dont les conditions opératoires sont représentées dans le tableau 14 :

Tableau 14 : Conditions opératoires

Concentration de l'alginate de sodium Fluka (%)	Conditions opératoires
1	Adaptation 100 mg.L^{-1} ; Concentration de CaCl_2 3 % ; Temps de durcissement des billes 2 h à 37°C ; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg .
2	
3	
4	

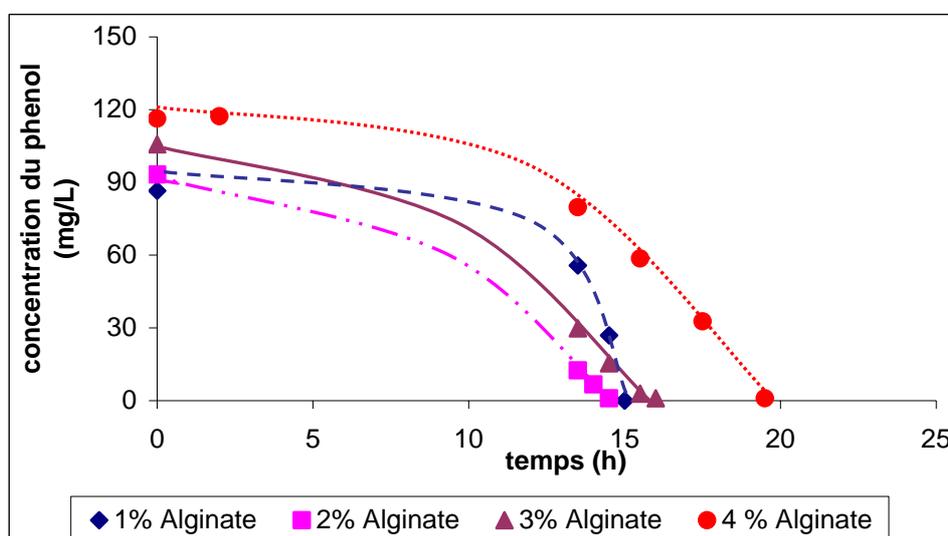


Figure 32 : Effet du pourcentage en alginate de sodium sur la cinétique de biodégradation du phénol

La modification dans la composition des billes en alginate change considérablement la structure interne de la bille, et l'efficacité d'élimination s'en trouve amoindrie. L'augmentation du pourcentage en alginate de sodium durcit les billes et limite l'effet de la

diffusion des nutriments et de l'oxygène. On remarque que le pourcentage donnant la cinétique la plus rapide est celui de 2%, alors qu'une concentration de 1% donne une apparence molle aux billes qui deviennent très fragile et difficile à réaliser.

Le suivi de la biomasse relarguée ainsi que le temps de biodégradation totale donne :

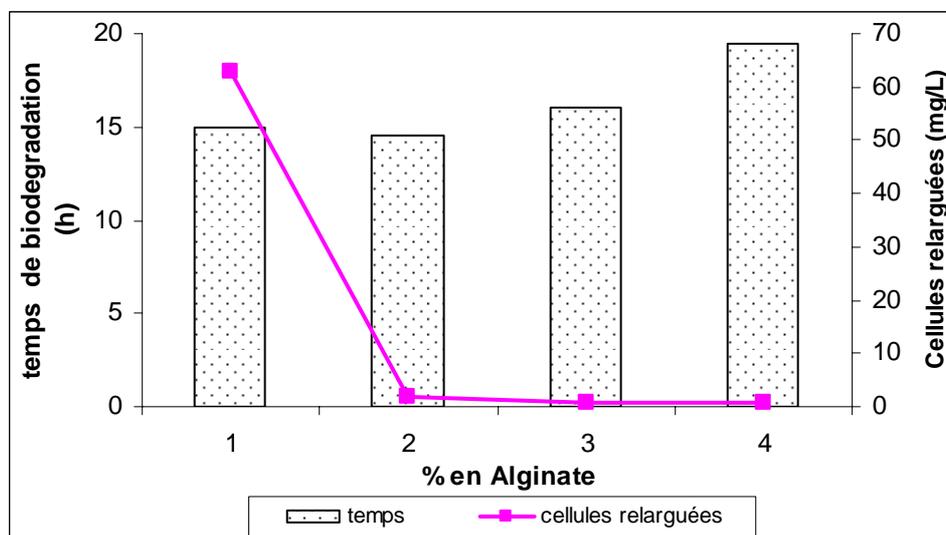


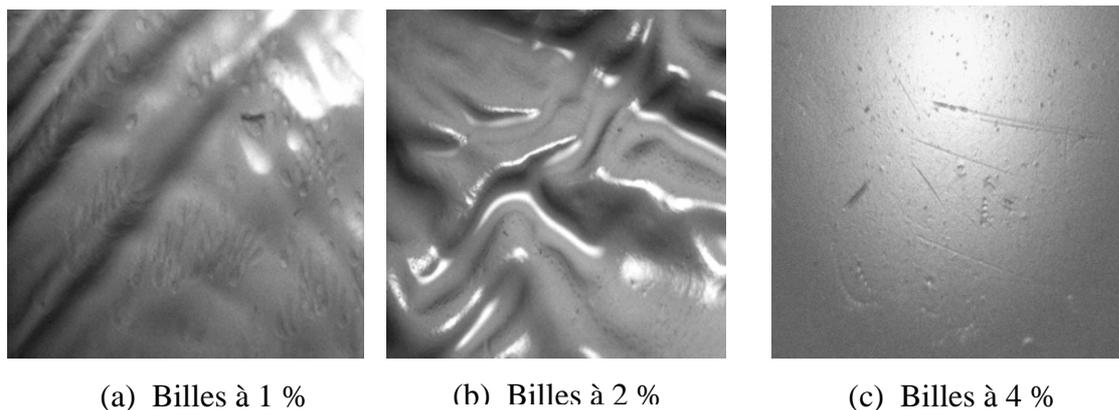
Figure 33 : Effet du pourcentage en alginate de sodium sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que la concentration des cellules relarguées

Ce graphe nous montre clairement que l'augmentation de l'alginate de 1 à 2% diminue la quantité de cellules relarguées de 97%. À partir de 2%, cette quantité est pratiquement nulle, mais le temps de biodégradation augmente avec l'augmentation de ce pourcentage, pour les raisons invoquées précédemment.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Givry (2006) [143], Konsoula et coll., (2006) [210], Idris et coll., (2006) [110], Jianlong et coll., (2001) [206], Boyaval et coll., (1985) [211]. Qui en modifiant la concentration en alginate de sodium ont obtenu une productivité maximale des billes d'alginate de calcium de 2%. Ce résultat permet d'améliorer l'efficacité de cette technique tout en participant à la diminution du coût, et donc adopté dans la fabrication des futures billes d'alginate.

6.1. Analyse par microscope optique de la surface des billes de différentes concentrations en Alginate de sodium Fluka

Pour mieux voir l'influence de la concentration de l'alginate de sodium sur la bille d'alginate de sodium produite, des photographies ont été prises par un microscope :



(a) Billes à 1 %

(b) Billes à 2 %

(c) Billes à 4 %

Figure 34 : Photos de la surface des billes d'alginate de calcium (X 250)

- Nous remarquons que les billes produites avec une concentration d'alginate de sodium, de 4% (p/v) donnent lieu à des billes rigides dont la texture va ralentir les échanges de diffusion membranaire.
- Celles faites avec une concentration de 1 %, sont très fragiles. Mais la structure permet néanmoins une immobilisation cellulaire, avec toutes les conséquences y afférentes, lors de leurs mises en exploitations.
- Avec des billes de 2%, nous obtenons un matériau adéquat pour la suite des opérations. La surface presque lisse, ne présente pas sillons de fuite de produit, preuve de sa stabilité mécanique lors de sa chute libre dans le bain de durcissement.

7. L'EFFET DU POURCENTAGE EN CHLORURE DE CALCIUM SUR LA BIODEGRADATION DU PHENOL

Comme pour l'alginate, nous allons étudier l'effet sur la biodégradation d'une concentration en phénol de 100 mg.L^{-1} , d'un autre constituant entrant dans l'élaboration des billes d'alginate qui est le chlorure de calcium et cela en fixant les autres paramètres comme indiquées dans le tableau 15. Le suivi de la cinétique de biodégradation nous a permis d'obtenir les courbes de la figure 35.

Tableau 15 : Conditions opératoires

Concentration de CaCl_2 (%)	Conditions opératoires
2	Adaptation 100 mg.L^{-1}
2,5	Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ;
3	Temps de durcissement des billes 2 h à 37°C ;
3,5	Taille des billes 4 mm ;
4	Quantité de l'inoculum 14 mg.
5	

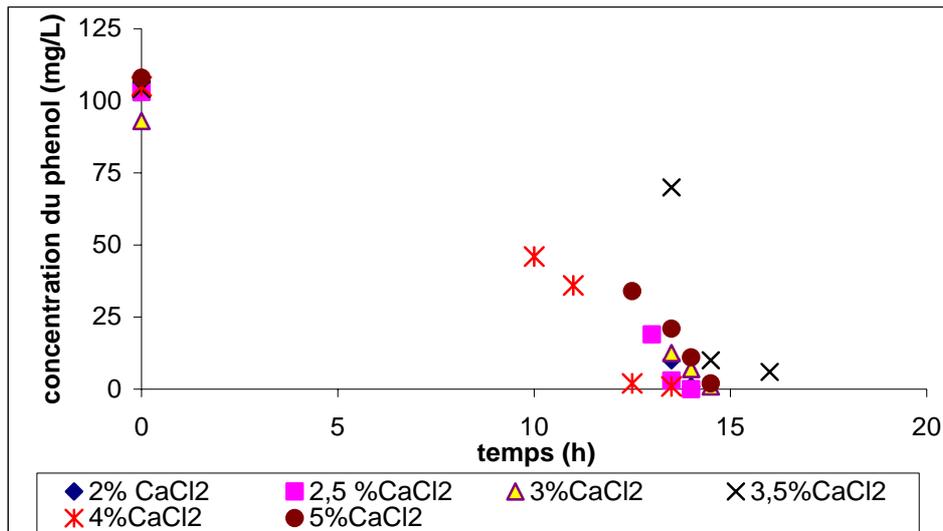


Figure 35 : Effet du pourcentage en chlorure de calcium sur la cinétique de biodégradation du phénol

Ce graphe nous permet de comparer entre les performances des billes d’alginate produites à partir de plusieurs concentrations en CaCl₂ (2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 5%), il est constaté une biodégradation du phénol de 100% pour toutes les concentrations, et que la concentration optimale permettant d’obtenir la meilleur cinétique de biodégradation est de 4%.

La figure suivante, permet de déterminer la meilleure concentration en CaCl₂ pour une meilleure biodégradation en prenant en considération le taux de cellules relarguées :

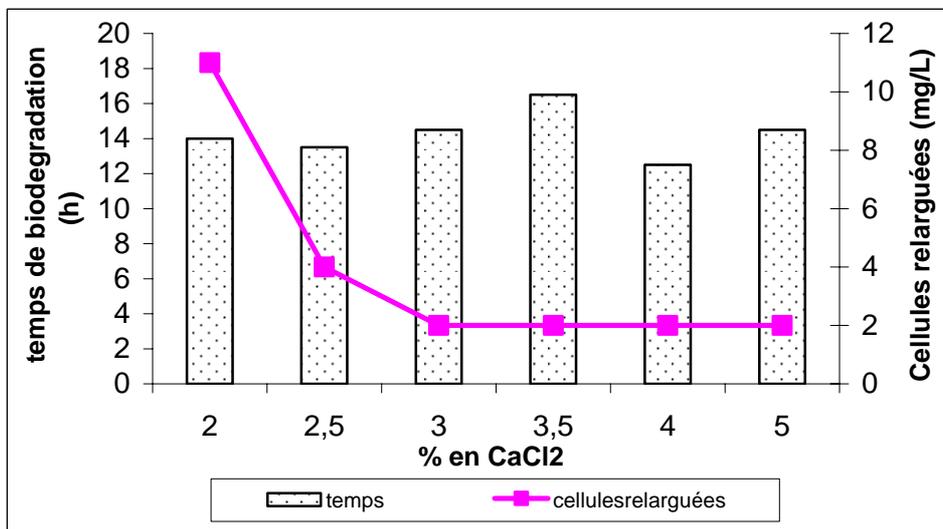


Figure 36 : Effet du pourcentage en chlorure de calcium sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que la concentration des cellules relarguées

L’augmentation de la concentration de CaCl₂ de 2 à 3% diminue de 82 % l’effet du relargage cellulaire, même si il n’est pas important (inférieur à 12mgL⁻¹), mais le choix de la concentration de 4% permet d’améliorer le temps de biodégradation total du phénol, car le déploiement des ions à l’intérieur de la matrice permet d’avoir un réseau polymérique de

structure plus stable permettant une diffusion des nutriments et oxygène optimale. Ce raisonnement fut suivi par Givry (2006) [143], Konsoula et coll., (2006), Jianlong et coll., (2001) [206] et Anisha et coll., (2007) [212], Boyaval et coll., (1985) [211] pour la détermination de la concentration optimale de CaCl_2 . La concentration de CaCl_2 sera fixée durant la suite de notre étude à 4 %.

8. L'EFFET DU TEMPS DE DURCISSEMENT DES BILLES SUR LA BIODEGRADATION DU PHENOL

Il est nécessaire de déterminer le temps optimal qui permet d'obtenir le durcissement des billes. La figure 37 représente les cinétiques de biodégradation d'une solution phénolique de 100 mg.L^{-1} , par des billes d'alginate qui ont subi différents temps de durcissement, dans les conditions opératoires citées dans le tableau suivant :

Tableau 16 : Conditions opératoires

Temps de durcissement à 37°C des billes (mn)	Conditions opératoires
0	Adaptation 100 mg.L^{-1} ;
30	Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ;
120	Concentration de CaCl_2 4 % ;
240	Taille des billes 4 mm ;
1440	Quantité de l'inoculum 14 mg .

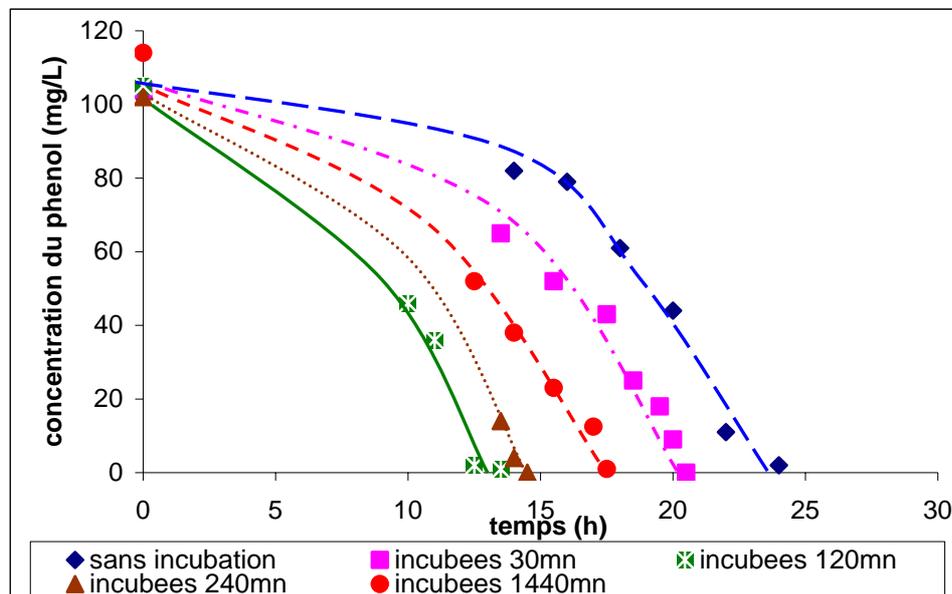


Figure 37 : Effet du temps de durcissement des billes d'alginate de calcium sur la cinétique de biodégradation du phénol

La biodégradation du phénol est totale pour toutes les concentrations. Celle donnant le temps de biodégradation le plus court est celle de deux heures (120mn) de durcissement.

Il s'agit maintenant de quantifier le phénomène de relargage simultanément avec le temps de biodégradation du phénol, c'est pour cela que nous avons tracé la figure suivante :

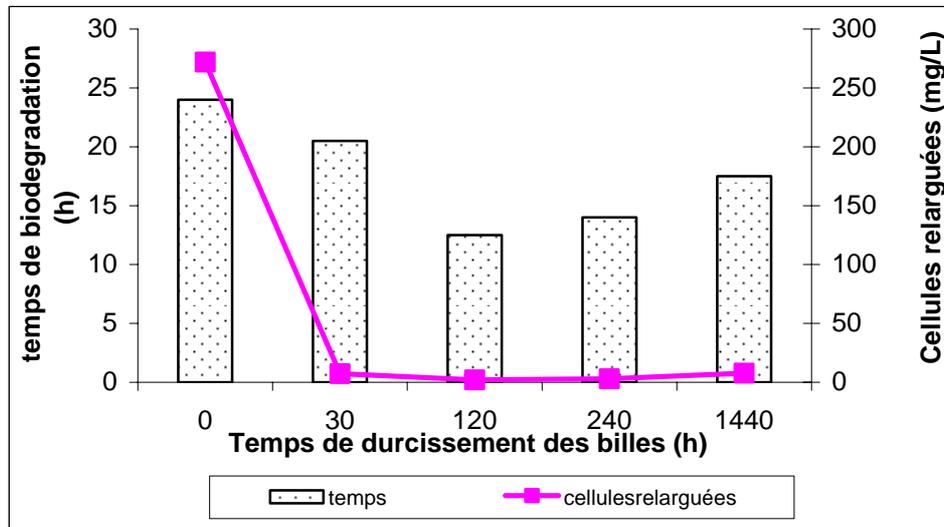


Figure 38 : Effet du temps de durcissement des billes d'alginate de calcium sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées

L'augmentation du temps de durcissement des billes dans le bain de chlorure de calcium de 0 h à 30 mn diminue le relargage cellulaire de 97 %, mais un temps de durcissement optimal de 120mn nous permet d'avoir la meilleur cinétique de biodégradation.

Un temps de durcissement trop faible, ne permet pas une bonne gélification ce qui donne lieu à un gel de faibles résistances mécaniques, conduisant forcément au relargage cellulaire en plus d'une moins bonne cinétique de biodégradation les cellules étant confrontées directement au phénol sans rempare. Mais l'augmentation de ce temps, toute en limitant relargage cellulaire, donne lieu aussi à une moins bonne cinétique de biodégradation suite au limitation diffusionnelle causées par le durcissement des billes.

Un temps de durcissement des billes de 2 heures a aussi été entrepris par Benahmed Djilali (2005) [39], Banerjee et coll., (2001) [192].

9. L'EFFET DU DIAMETRE DES BILLES SUR LA BIODEGRADATION DU PHENOL

L'étude du diamètre des billes est un paramètre important pour cette technique, il est directement lié à l'orifice d'extrusion comme nous pouvons le voir sur la figure suivante :

Avec un diamètre d'extrusion de 0,9 mm, nous obtenons des billes de 3mm



Avec un diamètre d'extrusion de 1 mm, nous obtenons des billes de 4 mm



Avec un diamètre d'extrusion de 2,5 mm, nous obtenons des billes de 5mm



Figure 39 : Photos représentant l'effet du diamètre d'extrusion sur le diamètre des billes

Pour en déterminer son influence, différents diamètres (3, 4, 5 mm) dans les conditions opératoires représentées dans le tableau 17 ont été étudiés dans le cas de la biodégradation de 100 mg.L^{-1} de phénol et les résultats expérimentaux représentés graphiquement dans la figure 40 :

Tableau 17 : Conditions opératoires

Taille des billes (mm)	Conditions opératoires
3	Adaptation 100 mg.L^{-1} ;
4	Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ;
5	Concentration de CaCl_2 4 % ;
	Temps de durcissement des billes 2 h à 37°C ;
	Quantité de l'inoculum 14 mg .

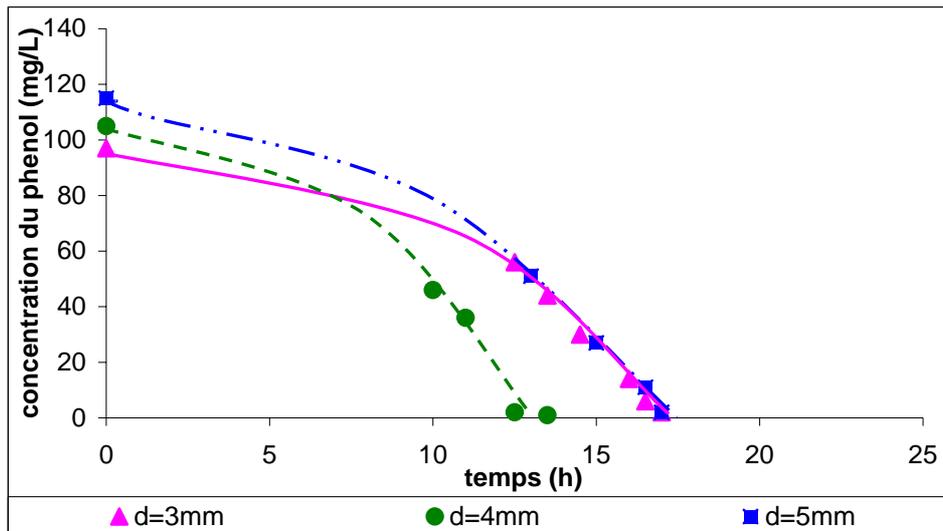


Figure 40 : Effet des diamètres des billes sur la cinétique de biodégradation du phénol

La Figure 40 montre que pour tous les diamètres, la biodégradation du phénol est totale, mais la cinétique la plus rapide est celle réalisée avec des billes de 4 mm.

Le suivi de la biomasse relarguée nous fournit d'autres informations sur l'effet du diamètre :

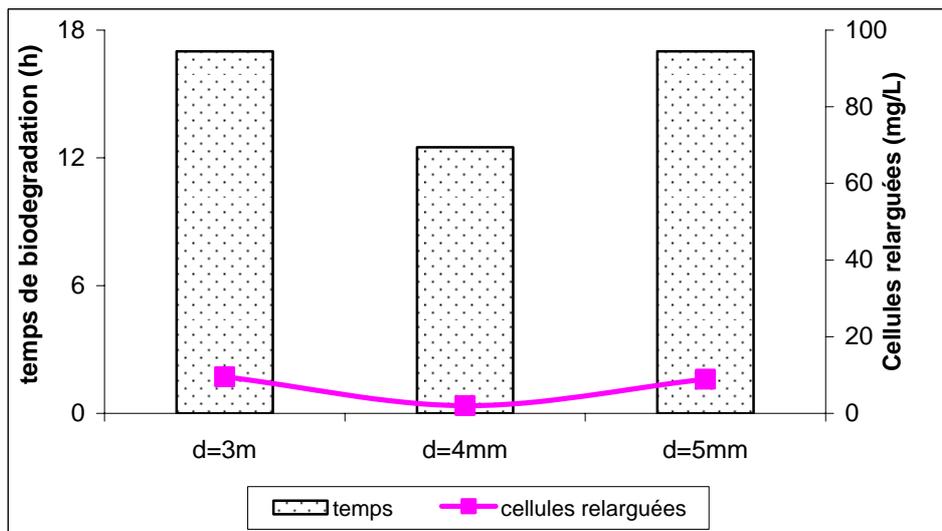


Figure 41 : Effet des diamètres des billes sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que sur la concentration des cellules relarguées

Comme on le constate, la quantité de biomasse relarguée est faible dans les trois cas, inférieure à 10 mg.L^{-1} . L'amélioration temporelle est approximativement de l'ordre de 26%, en se basant sur le gain de temps le diamètre de 4 mm est celui permettant un échange membranaire optimal.

Pour des diamètres plus grands, l'espace interstitiel étant plus grand, la vitesse d'échange est plus lente, en plus de fragiliser la structure de la bille.

Quant aux billes trop petites, c'est l'inverse qui se passe, c'est l'encombrement cellulaire qui empêche une bonne diffusion, retardant par là la biodégradation du substrat.

Une étude réalisée par Anisha et coll., (2007) [212] confirme ce résultat avec l'utilisation de billes d'un diamètre de 4 mm.

10. L'EFFET DE LA BIOMASSE IMMOBILISEE SUR LA BIODEGRADATION DU PHENOL

Pour en déterminer son effet, des expériences étudiant la cinétique de biodégradation de 100 mg.L⁻¹ de phénol dans un milieu de culture ont été réalisées avec des conditions opératoires données dans le tableau 18, dont la quantité initiale de bactéries immobilisées changera (9, 14, 26 mg pour 90 mL d'alginate de sodium) tout en fixant les autres paramètres pour chaque cas. Nous obtenons les courbes de la figure 42.

Tableau 18 : Conditions opératoires

Quantité de l'inoculum (mg)	Conditions opératoires
9	Adaptation 100mg.L ⁻¹ ;
14	Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ;
28	Concentration de CaCl ₂ 4 % ;
	Temps de durcissement des billes 2 h à 37 °C ;
	Taille des billes 4 mm ;
	Concentration initiale en phénol 100 mg.L ⁻¹ .

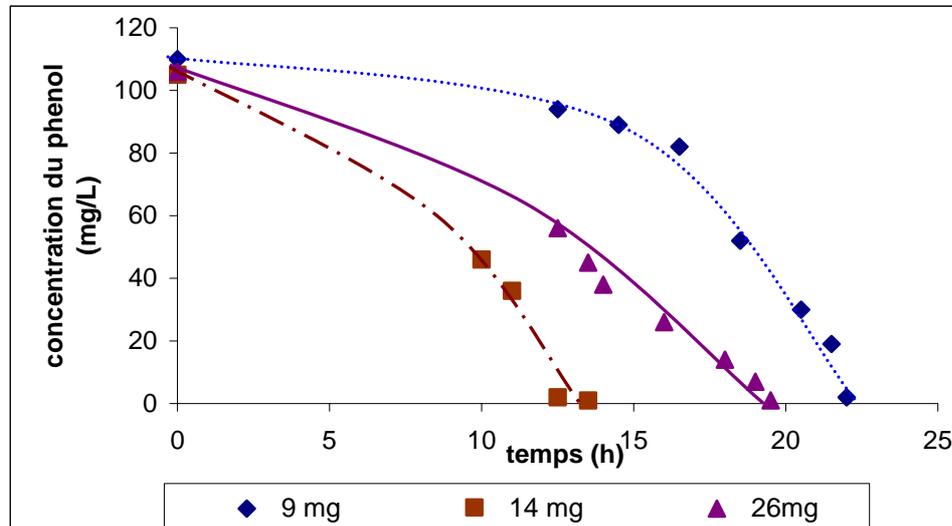


Figure 42 : Effet de la biomasse immobilisée sur la cinétique de biodégradation du phénol

Une biodégradation du phénol de 100% est constatée pour les trois masses des bactéries immobilisées, mais une cinétique plus rapide est enregistrée pour une biomasse de 14 mg pour 90 ml de solution d'alginate de sodium.

Le relargage cellulaire et le temps de biodégradation sont représentés simultanément sur la figure 43 :

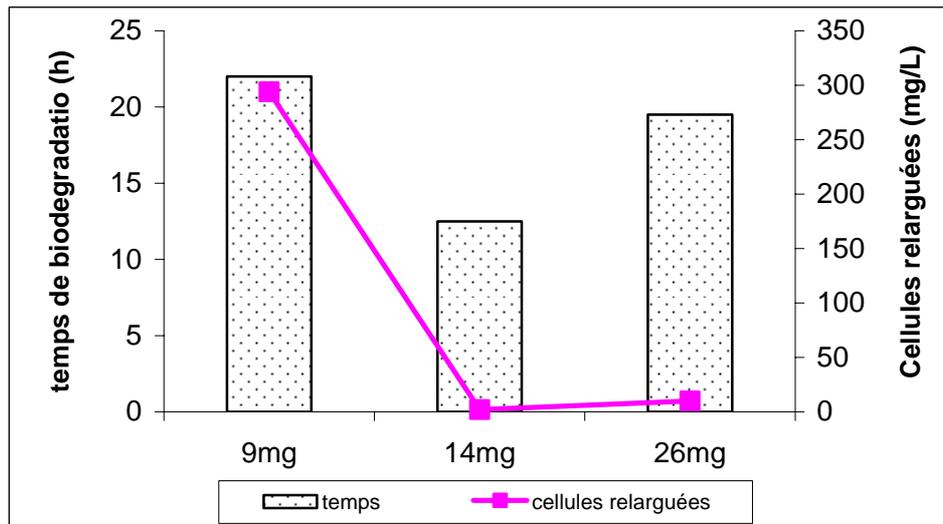


Figure 43 : Effet de la biomasse immobilisée sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que la concentration des cellules relarguées

Une trop forte densité cellulaire peut causer une consommation des nutriments plus rapidement qu'ils diffusent dans le gel et donc la diffusion devient limitée, vers l'intérieur et l'extérieur ce qui peut expliquer le fait que dans ce cas il y a moins de relargage cellulaire et une moins bonne cinétique de biodégradation. C'est ce qui a été remarqué par Jianlong et coll., (2001) [206].

Une faible densité cellulaire entraîne une diminution de la dégradation des nutriments, ce qui conduit à une moins bonne cinétique de biodégradation du phénol, de plus, une faible densité cellulaire fragilise la bille car les cellules contribuent à sa cohésion et améliorent sa stabilité mécanique d'où un relargage plus important. Dans ce qui va suivre la quantité de biomasse immobilisée sera maintenue à 14 mg dans 90ml de solution d'alginate de sodium.

Une trop forte biomasse immobilisée ne conduit pas nécessairement à une plus grande quantité de cellules relarguées, et vis versa, c'est ce qui confirme le résultat de Doleyres (2003) [180].

11. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SUR LA BIODEGRADATION DU PHENOL PAR DES BACTERIES SB6 IMMOBILISEES

Après avoir étudié les effets des paramètres opératoires sur la biodégradation du phénol et fixé les plus judicieux, intéressons-nous maintenant à un autre paramètre qui est le milieu extérieur. Nous avons fait varier pour cela sa concentration en phénol de 100 à 2000 mg.L⁻¹, avec les conditions opératoires évoquées dans le tableau suivant :

Tableau 19 : Conditions opératoires

Concentration initiale en phénol (mg.L ⁻¹)	Conditions opératoires
100	Adaptation 100 mg.L ⁻¹ ; Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ; Concentration de CaCl ₂ 4 % ; Temps de durcissement des billes 2 h à 37 °C ; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg .
300	
500	
800	
1000	
2000	

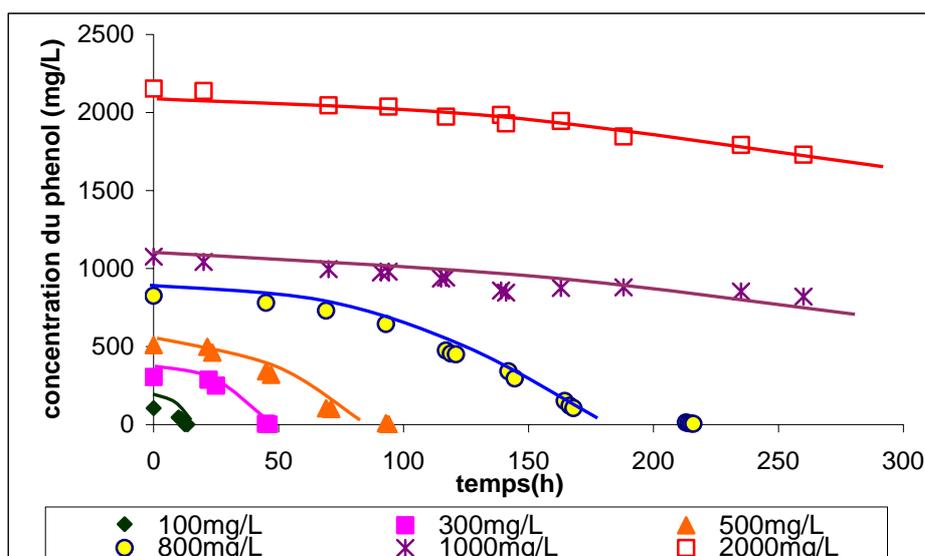


Figure 44 : Cinétiques de biodégradation du phénol à différentes concentrations initiales

Nous remarquons qu'une biodégradation de 100 % est obtenue pour des concentrations inférieures à 800 mg.L⁻¹. Au-delà, la biodégradation n'est que partielle (23 % pour une concentration de 1000mg.L⁻¹ et 19 % pour celle de 2000mg.L⁻¹ après plus de 10 jours). L'avantage avec les bactéries immobilisées dans des billes d'alginate est qu'elles continuent à dégrader le substrat même à haute concentration. Elles sont protégées par la couche constituée par les bactéries mortes limitant ainsi la diffusion du substrat.

12. COMPARAISON ENTRE LES CINÉTIQUES DE BIODEGRADATION DU PHÉNOL PAR LES BACTÉRIES SB6 LIBRES ET IMMOBILISÉES

Les résultats obtenus précédemment, nous permettent de comparer entre les cinétiques de biodégradation du phénol par des cellules libres et immobilisées :

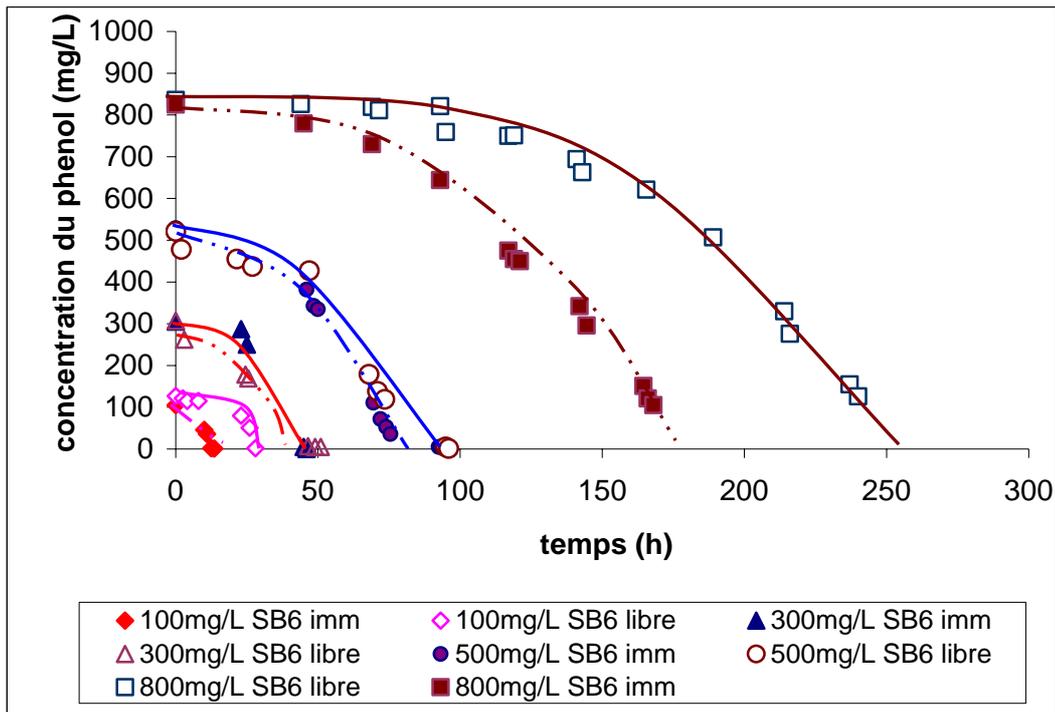


Figure 45 : Comparaison entre les cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries libres et immobilisées

Aux faibles concentrations (inférieure à 800 mg.L^{-1}) le temps de biodégradation est comparable pour les deux entités avec un léger avantage pour les cellules immobilisées.

Aux fortes concentrations (supérieure à 800 mg.L^{-1}), les cellules libres sont confrontées à une inhibition de l'activité bactérienne. Alors que pour les cellules immobilisées, étant à l'intérieur de la matrice, elles sont protégées et donc elles ne subissent pas les mêmes agressions. Une barrière limitative joue un rôle de régulateur de diffusion.

Ces intervalles ont aussi été retrouvés dans les études faites par Chen et coll., (2002) [22], pour la biodégradation du phénol par les cellules *Candida tropicalis* mais bien sûr les valeurs des concentrations de cet intervalle sont différentes.

13. ÉTUDE DE LA DIFFERENCE ENTRE DEUX ALGINATES DISTINCTES SUR LA BIODEGRADATION DU PHENOL PAR LES BACTERIES SB6 IMMOBILISEES

Nous avons changé l'alginate '*Fluka*' (contient 69 % de G blocs) utilisée précédemment par une autre fabriquée par '*Sigma*' (contient 39 % de G blocs), à haute viscosité. Dans les conditions opératoires citées dans le tableau 20 pour une concentration du phénol dans le milieu de culture de 800 mg.L^{-1} , nous obtenons la figure 46.

Tableau 20 : Conditions opératoires

Type d'alginate	Conditions opératoires
Alginate FLUKA Alginate SIGMA	Adaptation 100 mg.L ⁻¹ ; Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ; Concentration de CaCl ₂ 4 % ; Temps de durcissement des billes 2 h à 37 °C; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg .

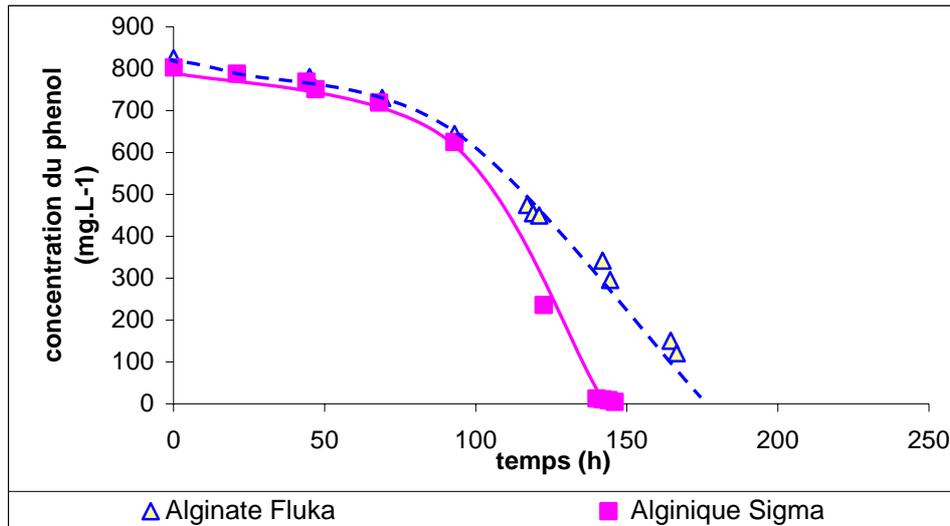


Figure 46 : Comparaison entre les cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries SB6 immobilisées par différents alginate de sodium

Nous remarquons que l'alginate de sodium '*Sigma*' donne un meilleur résultat que celle de '*Fluka*' utilisée jusqu'à maintenant. Tel que une biodégradation du phénol de 100% pour l'alginate Sigma opérée en 146h, correspond à une biodégradation de 65% pour l'alginate fluka.

Pour SB6 les constituants de l'alginate sigma lui ont permis de se développer plus aisément (une structure plus stable pour cette bactérie). Conformément à ce qui a été proposé par Celper., (2003) [157], Boyaval et coll., (1985) [211].

14. CINÉTIQUES DE LA BIODEGRADATION DU PHÉNOL PAR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IMMOBILISÉES PAR INCLUSION DANS L'ALGINATE DE CALCIUM

Pour déterminer l'influence bactérienne sur l'immobilisation dans l'alginate de calcium aux mêmes conditions et avec les mêmes paramètres déterminés précédemment pour SB6, nous avons effectué des essais de biodégradation à différentes concentrations initiales de phénol par des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées dont les conditions opératoires sont représentées dans le tableau 21. Nous avons obtenu les courbes de la figure 47.

Tableau 21 : Conditions opératoires

Concentration initiale en phénol (mg.L ⁻¹)	Conditions opératoires
300 500 1000 2000 3000	Adaptation 100 mg.L ⁻¹ ; Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ; Concentration de CaCl ₂ 4 % ; Temps de durcissement des billes 2 h à 37 °C ; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg .

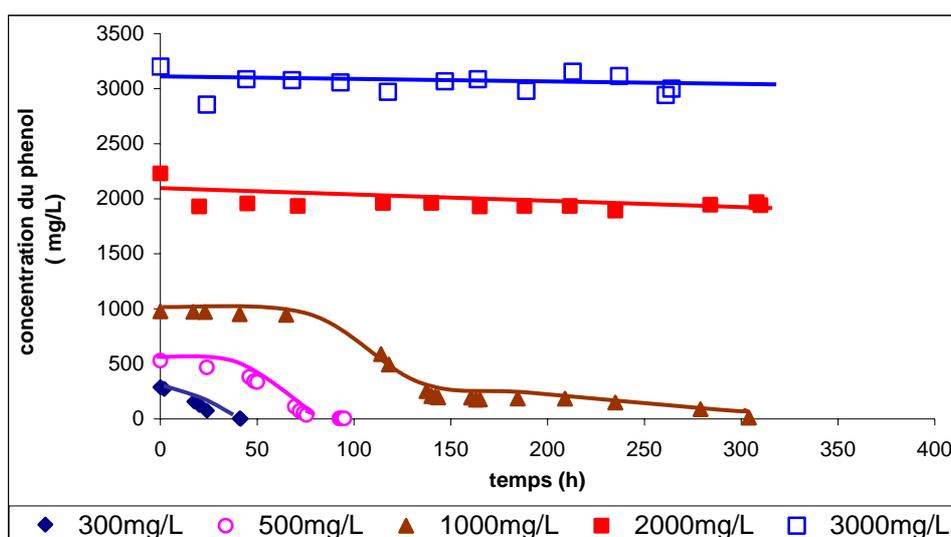


Figure 47 : Influence de la concentration initiale sur la cinétique de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa*

Nous constatons une biodégradation totale pour des concentrations inférieures à 1000 mg.L⁻¹. Alors qu'elle n'est que de 13 % et de 6 % respectivement pour 2000 mg.L⁻¹ et 3000 mg.L⁻¹ pour un temps dépassant 10 jours.

Nous remarquons que pour la concentration de 1000 mg.L⁻¹, nous avons deux paliers :

- le premier dans un intervalle de temps variant entre 0 et 65h avec une faible biodégradation du phénol (3%).
- le deuxième palier apparaît après 140 heures, où le reste du phénol est dégradé en plus de 160 heures (approximativement 10 % de la charge initiale).

Entre les deux une phase rapide où plus de 80% de phénol sont dégradés en moins de 78 heures.

Ce phénomène a aussi été remarqué par Benahmed Djilali., (2005) [39], qui a utilisé *P.aeruginosa* et les mêmes paliers ont été constatés pour une même concentration de 1000 mg.L⁻¹, idem pour Chung et coll., (2005) [129] qui eux ont utilisé *Pseudomonas putida*.

Cela s'explique par le fait que les cellules se déplacent à la périphérie de la surface de la bille, les concentrations étant fortes, il y a une lyse de bactéries qui permet de former une fine couche constituée de cellules mortes qui donne une protection supplémentaire aux cellules et améliore la diffusion à l'intérieur de la bille en offrant un gradient de concentration

permettant la croissance cellulaire sans inhibition cette étape constitue le premier palier. Cette dernière permet de déclencher une croissance importante et donc une très forte biodégradation. Mais cette croissance provoque une densité cellulaire trop élevée au niveau de la bille ce qui induit à un phénomène de consommation des nutriments plus rapide qu'ils diffusent dans le gel et donc la diffusion devient limitée, ce qui crée le deuxième palier.

Quant aux fortes concentrations en phénol ($>1000 \text{ mg.L}^{-1}$), la couche protectrice est tellement épaisse qu'elle empêche la diffusion du substrat ce qui protège les cellules survivantes des fortes concentrations en phénol.

Alors que pour les faibles concentrations, aucun problème de ce genre n'apparaît permettant une bonne dégradation.

15. COMPARAISON ENTRE LES CINÉTIQUES DE BIODEGRADATION DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DU PHÉNOL PAR LES BACTÉRIE AUTOCHTONES SB6 ET *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IMMOBILISÉES

Le fait de reprendre les courbes de la cinétique de biodégradation du phénol à différentes concentrations par SB6 et *P.aeruginosa*, nous permet plus facilement de comparer entre les deux bactéries immobilisées.

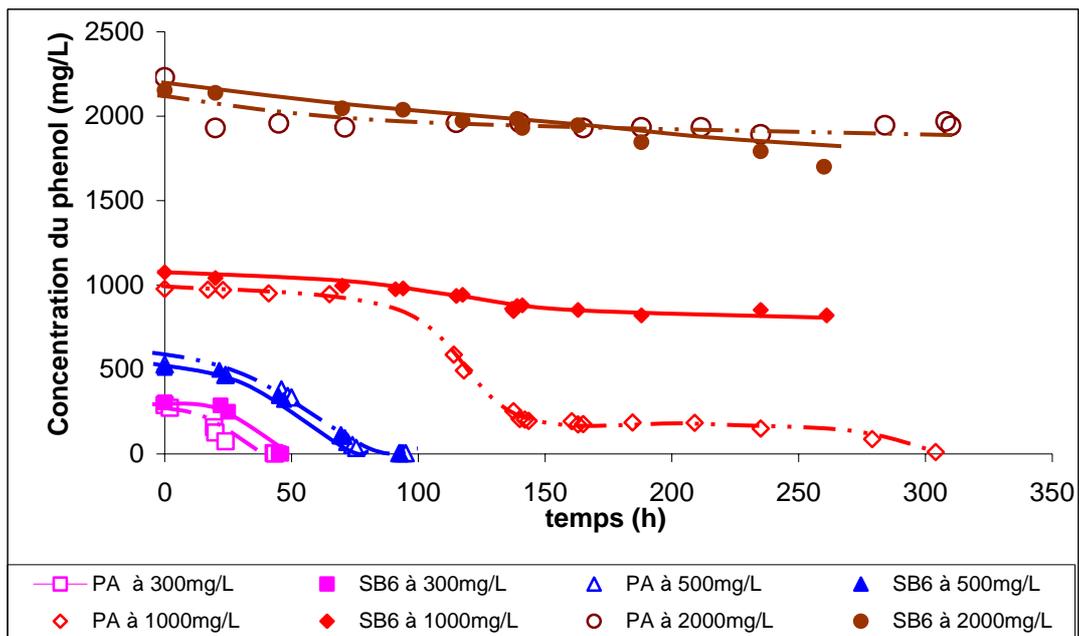


Figure 48 : Comparaison entre les cinétiques de biodégradation du phénol à différentes concentration initiales par *Pseudomonas aeruginosa* et SB6

Pour des concentrations inférieures à 500 mg.L^{-1} , les cinétiques sont comparables pour les deux entités.

Pour la concentration de 1000 mg.L^{-1} , En 260 heures SB6 ne dégrade que 25% de cette concentration, contrairement à *P. aeruginosa* qui dégrade 95 % et atteint les 100 % en 300 heures. Même à des concentrations qui sont supérieur à 1000 mg.L^{-1} *P. aeruginosa* et SB6 arrivent à biodégrader faiblement le phénol avec des cinétiques qui sont presque similaires.

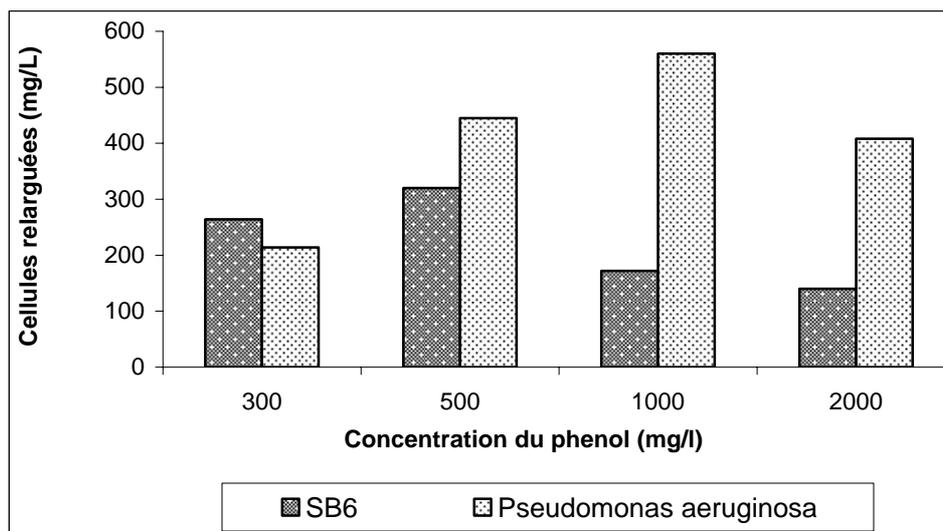


Figure 49 : Comparaison entre les cellules relarguées pour les deux bactéries

Nous remarquons qu'à partir de 300 mg.L⁻¹ les cellules relarguées par *P. aeruginosa* sont plus élevées que pour SB6.

La biodégradation du phénol par SB6 à des concentrations inférieures à 800 mg.L⁻¹ est plus indiquée dans ces conditions que pour *P. aeruginosa*, car elles permettent une biodégradation du phénol de 100 % avec un relargage des cellules immobilisées dans le milieu plus faible. Mais au-delà c'est l'incapacité de cette bactérie à tolérer le phénol et à le biodégrader qui la défavorise, contrairement à *P. aeruginosa* qui peut dégrader intégralement le phénol à une concentration de 1000 mg.L⁻¹.

16. AMELIORATION DE QUELQUES PARAMETRES POUR LA BIODEGRADATION DU PHENOL PAR *PSEUDOMONAS AERUGINOA* IMMOBILISEES

En partant du fait que pour chaque bactérie des paramètres d'optimisation de mise en œuvre sont à déterminer, et possédant des données sur le comportement de la bactérie en culture libre (en batch) faites par des études antérieures [196], ceci nous permet de préparer le biomatériau en fonction de ces indices. Mais ces résultats ne le seront qu'à titre indicatif, car pour connaître l'influence de tous les paramètres étudiés préalablement, il convient de faire une autre étude spécifique pour cette bactérie, comme il a été fait précédemment pour SB6. Cependant, ce travail nous permettra de confirmer l'influence de quelques paramètres étudiés antérieurement sur la biodégradation du phénol par des bactéries immobilisées.

16.1. Cinétiques de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* libres et immobilisées

Ces essais consistent à suivre la cinétique de biodégradation de 500 mg.L⁻¹ de phénol dans un milieu de culture minéral par des cellules *P.aeruginosa* libres et immobilisées. Pour effectuer ces expériences, nous avons entrepris exactement le même protocole expérimental que précédemment, et dans les conditions opératoires citées dans le tableau 22, nous obtenons les courbes de la figure 50 :

Tableau 22 : Conditions opératoires

État des cellules	Conditions opératoires
Libres	Adaptation 100 mg.L ⁻¹ ; Quantité de l'inoculum 14 mg.
Immobilisées	Adaptation 100 mg.L ⁻¹ ; Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ; Concentration de CaCl ₂ 4 % ; Temps de durcissement des billes 2 h à 37 °C ; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg.

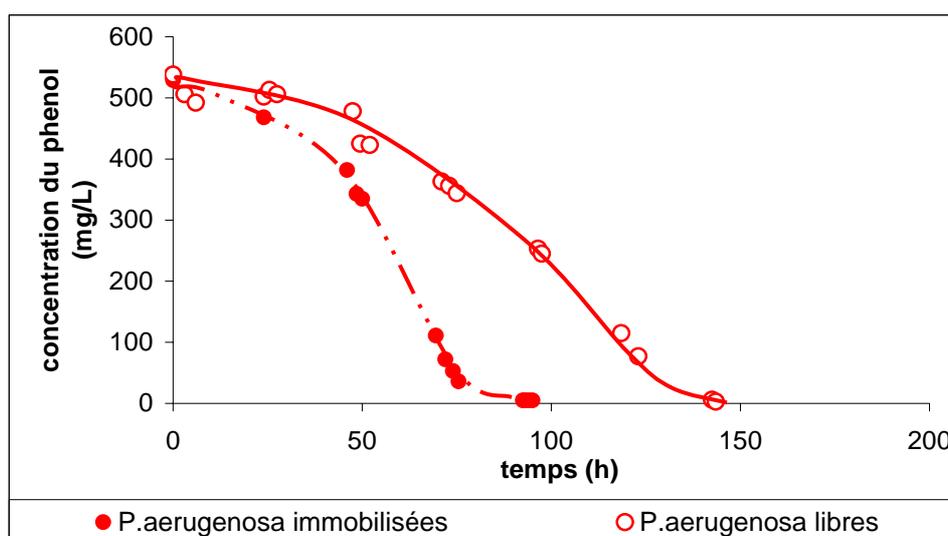


Figure 50 : Cinétiques de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* libres et immobilisées adaptées à 100 mg.L⁻¹ de phénol

Comme nous avons pu le voir précédemment pour SB6, l'immobilisation par inclusion améliore nettement la cinétique de biodégradation, *P. aeruginosa* ne déroge pas à cette règle, puisque c'est le même phénomène qui est constaté. Pour un temps de 92, heures, une biodégradation de 100% du phénol par les cellules immobilisées, correspond à une biodégradation de 53 % pour les cellules libres.

16.2. Changement de milieu de culture minéral pour *Pseudomonas aeruginosa*

Ayant remarqué un relargage cellulaire important pour *P. aeruginosa* dans le milieu de culture minéral, nous avons décidé de changer le milieu utilisé pendant notre étude avec un autre modifié qui moins riche en composés minéraux, pour ce faire nous avons effectué des essais ou une concentration en phénol de 300 mg.L⁻¹ est utilisée dans les deux milieu, avec les conditions opératoires représentées dans le tableau 23 en suivant la cinétique de biodégradation, nous avons obtenus la figure 51 :

Tableau 23 : Conditions opératoires

Milieu minéral	Conditions opératoires
Milieu minéral Milieu minéral modifié (cité en annexe10)	Adaptation 100 mg.L ⁻¹ ; Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ; Concentration de CaCl ₂ 4 % ; Temps de durcissement des billes 2 h ; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg .

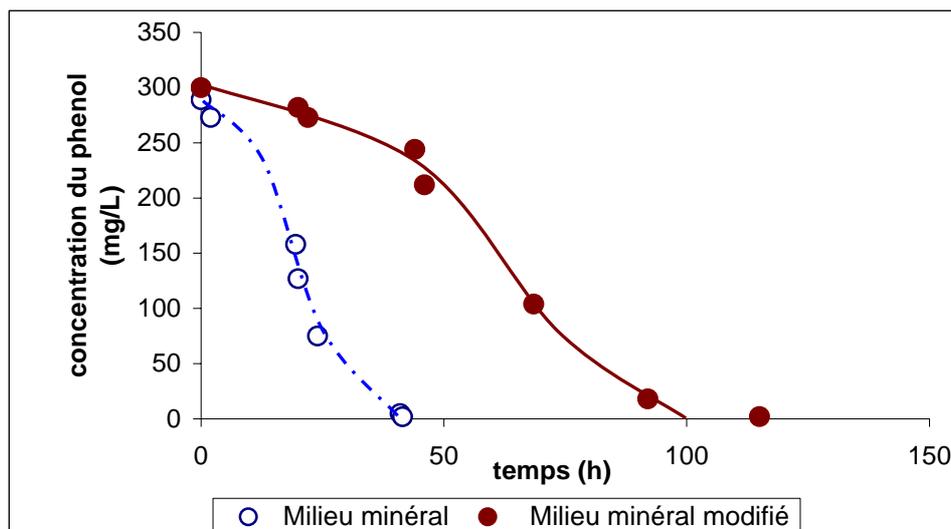


Figure 51 : Cinétiques de biodégradation du phénol dans deux milieux de culture minéral par les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées

Enfinement le milieu minéral choisi initialement donne de meilleurs résultats. 40 heures suffisent pour dégrader 100% de phénol, alors qu'il en faut plus de 100 heures pour le milieu minéral modifié.

La figure suivante représente simultanément, le temps de biodégradation total du phénol, ainsi que la concentration maximale des cellules relarguées pour les deux milieux.

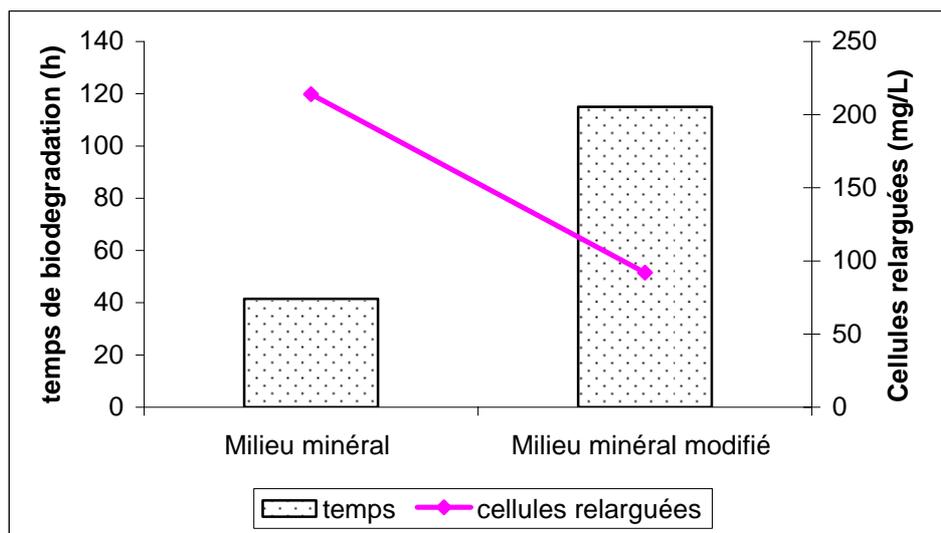


Figure 52 : Effet du changement de milieu sur le temps de biodégradation du phénol ainsi que la concentration des cellules relarguées

Nous remarquons qu'en changeant la composition du milieu de culture minéral d'un milieu riche en nutriment minéraux à un autre moins pourvu, nous obtenons une biodégradation moins bonne et donc une cinétique plus lente mais avec un relargage cellulaire plus faible. Les bactéries souffrent de carence nutritionnelle, ce qui gêne la croissance et donc les cellules relarguées sont moindres, même si elles arrivent à biodégrader complètement le phénol, elles le font en un temps plus long que celles mises en culture dans le milieu minéral initialement utilisé.

Cela nous permet d'avoir le choix de favoriser un paramètre par rapport l'autre, si ce qui nous intéresse c'est la biodégradation totale à moindre relargage cellulaires indépendamment du temps le milieu minéral modifié est le plus indiqué. Si au contraire c'est le temps de biodégradation qui prime alors, c'est le milieu minéral initialement utilisé qui convient de choisir.

16.3. Cinétiques de biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées adaptées à 100 mg.L⁻¹ et à 400 mg.L⁻¹ de phénol

L'effet de l'adaptation a été mis en évidence précédemment avec SB6, et grâce à des études précédentes effectuées par Ali (2005) [196]. La valeur qui permet d'avoir le taux de croissance cellulaire maximal pour *P. aeruginosa* est de 400 mg.L⁻¹. C'est pour cela que nous avons entrepris d'adapter ces bactéries à cette concentration. Par la suite, nous avons comparé nos résultats avec ceux des bactéries immobilisées adaptées à 100 mg.L⁻¹. Pour une culture dans un milieu minéral contenant 500 mg.L⁻¹ de phénol avec les conditions opératoires données dans le tableau 24, nous obtenons la figure 53 :

Tableau 24 : Conditions opératoires

Concentration d'adaptation au phénol (mg.L ⁻¹)	Conditions opératoires
100 400	Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ; Concentration de CaCl ₂ 4 % ; Temps de durcissement des billes 2 h à 37 °C; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg .

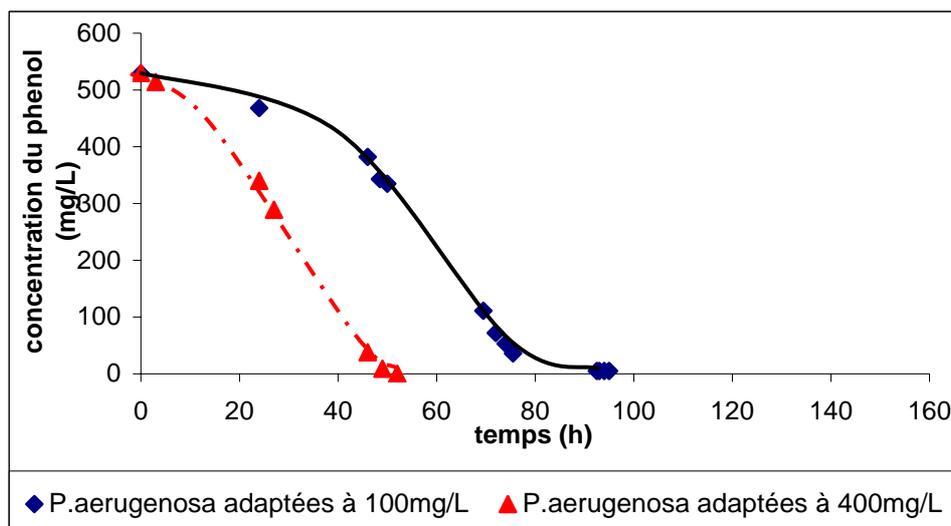


Figure 53 : Cinétiques de biodégradation du phénol par des cellules *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées adaptées à différentes concentrations en phénol

Nous remarquons que l'adaptation avant l'immobilisation des cellules *P. aeruginosa* à une concentration de 400 mg.L⁻¹ de phénol améliore considérablement la biodégradation de ce dernier. Pour une durée de 52 heures, une biodégradation du phénol de 100% et 36% est notée respectivement pour les cellules adaptées à 400 mg.L⁻¹ et celles adaptées à 100 mg.L⁻¹.

16.4. Effet du changement d'alginate de sodium sur la biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées

Comme il a été fait pour SB6, nous avons changé d'alginate de sodium Fluka par celle à haute viscosité Sigma pour voir les différents effets sur la biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées et adaptées à 400mg.L⁻¹. Pour se faire nous avons suivi la cinétique de biodégradation de 500 mg.L⁻¹ du phénol dans un milieu de culture minéral avec les conditions opératoires citées dans le tableau 25. Nous obtenons les courbes suivantes :

Tableau 25 : Conditions opératoires

Type d'alginate	Conditions opératoires
Alginate FLUKA Alginate SIGMA	Adaptation 400 mg.L ⁻¹ ; Concentration de l'alginate de sodium Fluka 2 % ; Concentration de CaCl ₂ 4 % ; Temps de durcissement des billes 2 h ; Taille des billes 4 mm ; Quantité de l'inoculum 14 mg .

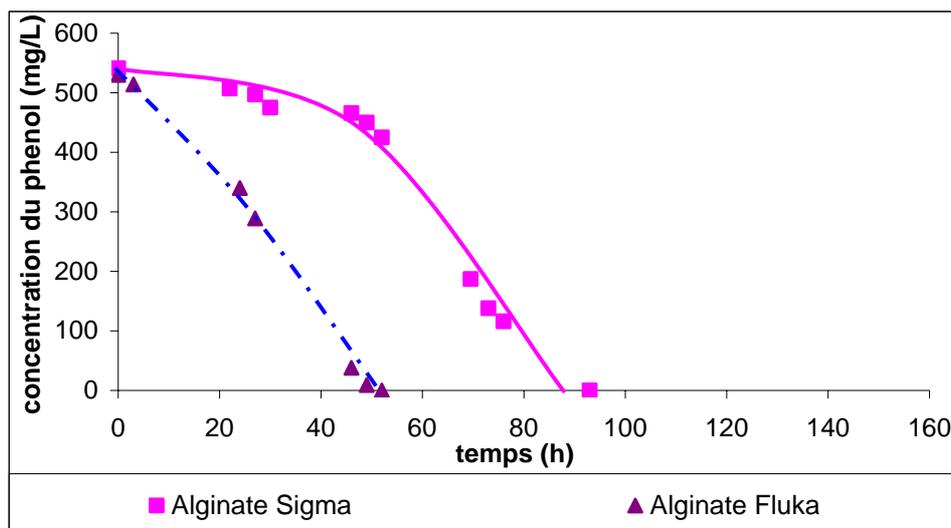


Figure 54 : Cinétiques de biodégradation du phénol par les cellules *Pseudomonas aeruginosa* immobilisées par l'alginate Sigma et Fluka

Nous remarquons que pour les deux alginate, nous obtenons une biodégradation de 100% de phénol. Mais l'immobilisation par inclusion de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'alginate de sodium Fluka à moyenne viscosité (riche en G-Blocs) donne un meilleur résultat que celui obtenu par Sigma à forte viscosité (riche en M-Blocs). Une biodégradation de 100% du phénol par des cellules immobilisées dans l'alginate de sodium Fluka effectuées en 52 heures correspond une biodégradation de 21% pour les cellules immobilisée dans l'alginate Sigma.

Cela est due au fait que les bactéries *P. aeruginosa* produisent du polysaccharide (secrètent de l'alginate riche en M-Blocs durant leur croissance) [153,164] et donne lieu à un équilibre entre la présence des deux blocs G et M dans la matrice. Le coefficient de diffusivité est plus grand dans la première que dans la seconde, il permet un meilleur échange bactéries - nutriments.

17. Analyses par microscope optique des billes d'alginate de calcium

Pour visualiser ce qui se passe à l'intérieur et à la périphérie d'une bille d'alginate de calcium contenant les bactéries, nous avons pris des photos avec un microscope optique pour une meilleure compréhension des phénomènes s'y déroulant.

Pour ce faire, nous avons en premier lieu photographié la morphologie des billes d'alginate de calcium contenant les bactéries *P. aeruginosa*, avant et après la mise en culture :

17.1. Avant culture et à la surface externe de la bille

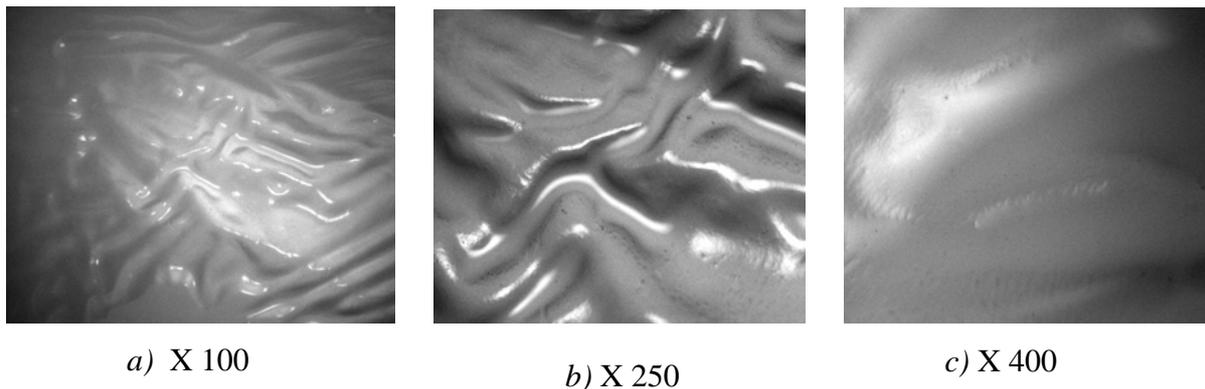


Figure 55 : Photographies de la surface externe de la bille

Nous remarquons que la surface de la bille est lisse et homogène, légèrement 'fripée' .

Sachant que les phénomènes de diffusion sont fonction du gradient de concentration, nous avons décidé d'étudier la morphologie interne et externe des billes pour une culture de concentration de 300 mg.L^{-1} et 3000 mg.L^{-1} .

17.2. Après une culture de 300 mg.L^{-1} de phénol

17.2.1. À la surface externe de la bille

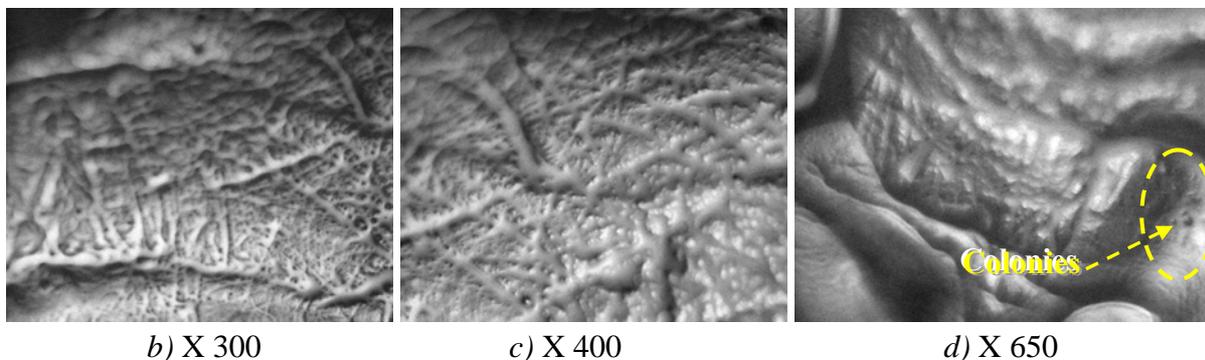


Figure 56 : Photographies de la surface externe de la bille

Nous remarquons que dans ces conditions, la surface des billes se fripe et des ruptures apparaissent au niveau de certaines cavités, provoquant le relargage cellulaire, et cela est due au fait qu'à cette concentration l'activité cellulaire est tellement importante, que les bactéries en s'accroissant à la périphérie de la surface de la bille provoquent des ruptures et abrasion de la surface au niveau des cavités des microcolonies, provoquant le relargage cellulaire, qui laisse ces traces derrière lui.

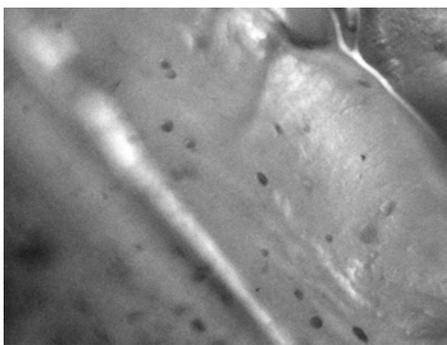
Sur la prise de vue (56-d), nous distinguons quelques colonies qui ont une forme bombées (en relief), prêtes à perforer la membrane cellulaire.

Ce phénomène a largement été étudié par Bailliez et coll.,(1985) [213] confirmant parfaitement nos résultats.

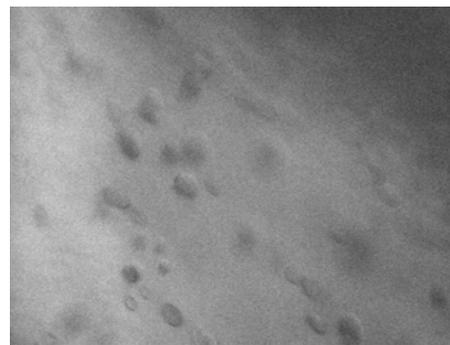
17.2.2. À l'intérieur des billes

Une coupe transversale de la bille fut faite pour examiner l'intérieur de cette matrice. Nous distinguons deux parties :

○ Au cœur de la bille



a) X 400



b) X 650

Figure 57 : Photographies du cœur de la bille après une culture de 300 mg.L⁻¹

Nous remarquons qu'au centre de la bille, les colonies ne sont pas très nombreuses. Car comme nous l'avant vu précédemment, les cellules migrent à la périphérie de la surface interne où les conditions de croissance sont nettement plus favorables, même si à l'intérieur de cette dernière les conditions permettent encore le développement de quelques colonies. Cela confirme l'étude qui a été faite par Grattepanche (2005) [130].

○ À la périphérie de la surface interne de la bille

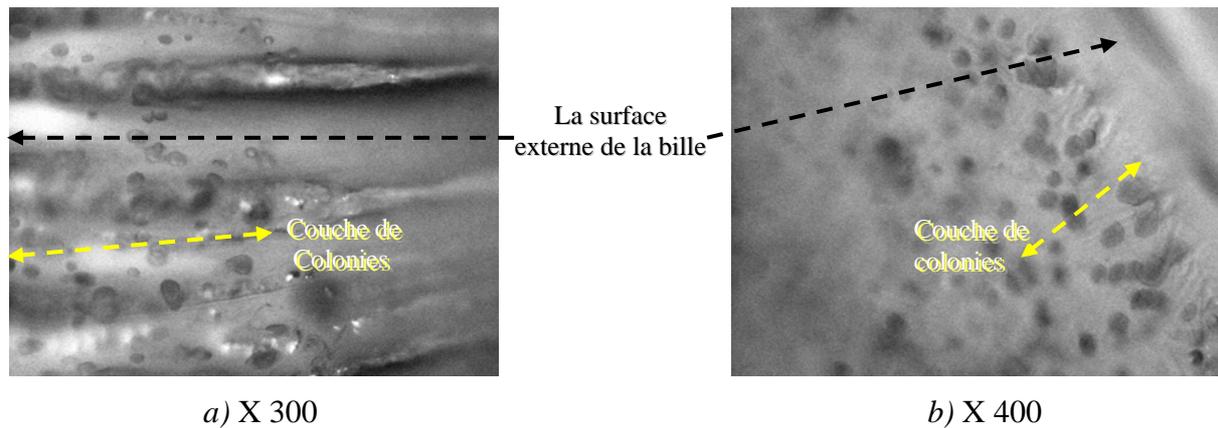


Figure 58 : Photographies de la surface interne de la bille après une culture de 300 mg.L⁻¹

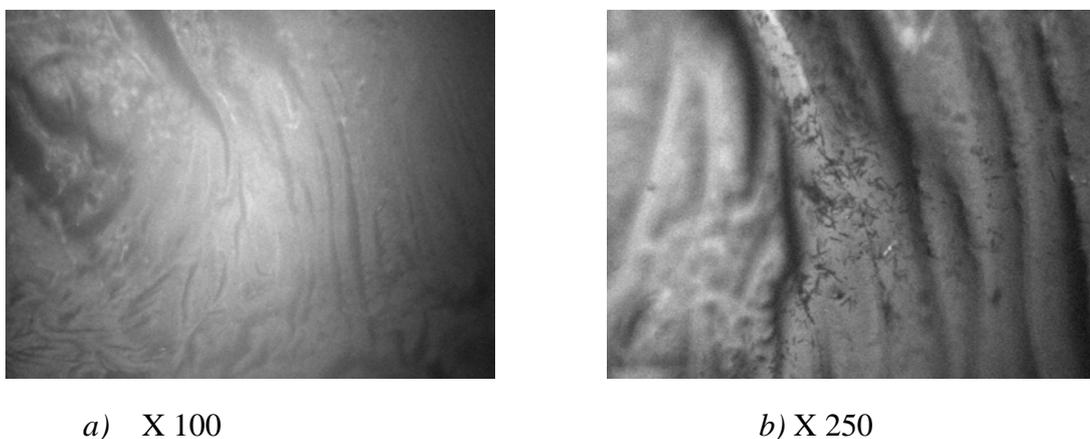
Comme nous pouvons le voir sur ces photos, les colonies sont beaucoup plus nombreuses par rapport au cœur de la bille, et la formation d'une couche de colonies dense et épaisse dans cette zone. Ce développement à proximité de la surface interne provoque le relargage cellulaire.

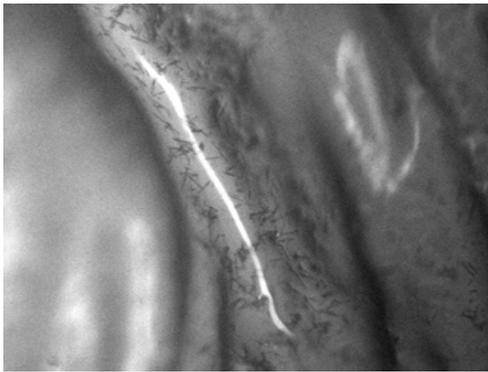
Cette distribution des cellules dans les billes d'alginate de calcium fut aussi observée par Laca et coll., (2000) [202], ils confirment le fait que les bactéries, '*Serratia marcescens*', désertent le centre des billes et se concentrent à la périphérie de la surface interne. Sachant que c'est le substrat qui contrôle la croissance cellulaire et donc contrôle aussi le relargage.

17.3. Après une culture de 3000 mg.L⁻¹

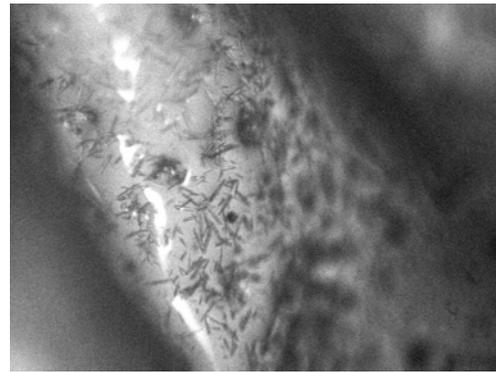
Des concentrations élevées conduisent inéluctablement à l'inhibition des cellules et la lyse de ces dernières, l'observation faite par le microscope optique nous permet de voir de plus près ce phénomène.

17.3.1. À la surface externe de la bille





c) X 300

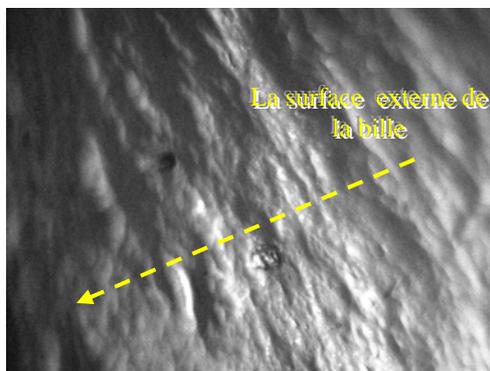


d) X 400

Figure 59 : Photographies de la surface externe de la bille après une culture de 3000 mg.L⁻¹

Ces photos nous permettent de voir directement l'effet que provoquent les fortes concentrations en phénol. Les cellules en désertant l'intérieur de la bille, migrent vers la périphérie où elles forment une couche très fine, confrontée directement à une concentration élevée, elles meurent et forment la fameuse couche de cellules mortes qui en limitant la diffusion du substrat, provoque la diminution du gradient de concentration, et donc protégera le reste des colonies formées par les cellules survivantes.

17.3.2. À l'intérieur de la bille



a) X 300 à la périphérie de la surface interne



b) X 300 au cœur

Figure 60 : Photographies de l'intérieur de la bille après une culture de 3000 mg.L⁻¹ de phénol

La coupe transversale de la bille montre qu'à l'intérieur (cœur et périphérie de la surface interne) de la bille il n'y a aucune colonie, car la diffusion à l'intérieur de cette dernière, dans ces conditions de concentration de 3000 mg.L⁻¹ est pratiquement interrompue. Le peu de bactéries ayant survécu meurent à leur tour faute de nutriments.

18. ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES

Des analyses par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) ont été effectuées. Pour ce faire, nous avons choisi d'analyser un échantillon qui se rapporte à la biodégradation de 300 mg.L^{-1} de phénol dans le milieu de culture minéral, par des bactéries SB6 libres adaptées à 100 mg.L^{-1} de phénol.

Le temps de rétention du phénol a été déterminé en faisant passer un échantillon étalon (eau distillée-phénol) nous avons obtenu le résultat suivant :

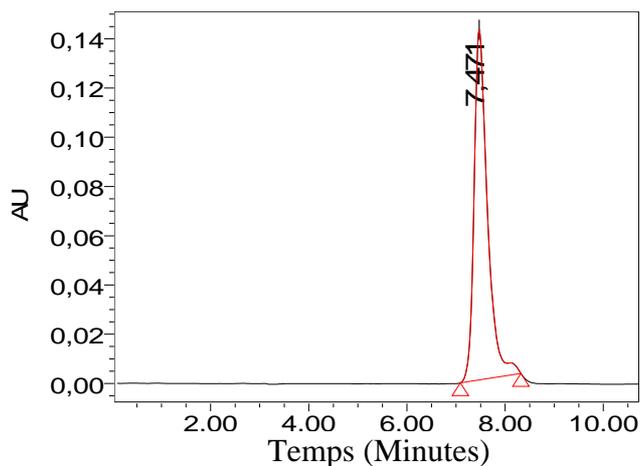


Figure 61 : Chromatogramme de la solution étalon (phénol- eau distillée)

Dans les conditions opératoires citées précédemment, nous obtenons un temps de rétention du phénol de 7,471 mn.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé le temps de rétention du phénol mais dans le milieu minéral utilisé, dans les mêmes conditions opératoires :

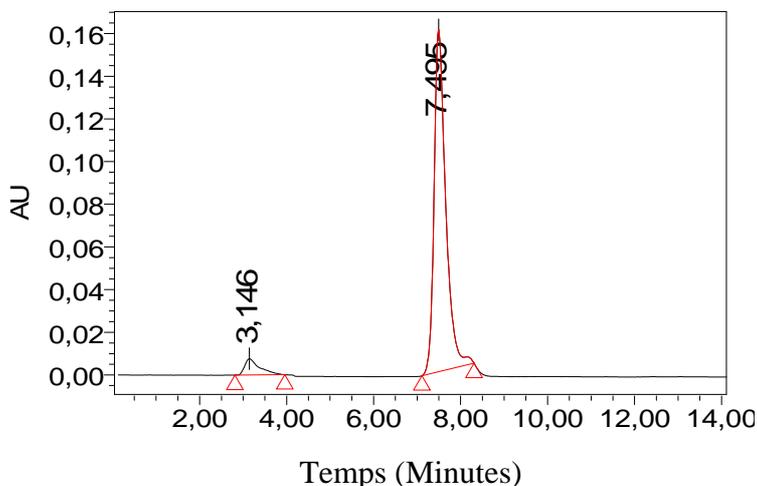


Figure 62 : : Chromatogramme de la solution étalon (phénol- milieu minéral)

Nous remarquons la présence d'un pic à 3,146 mn, qui représente un des composés du milieu de culture minéral dont la séparation chromatographique lui permet d'être détecté dans ces conditions. La présence des autres composés décale le temps de rétention du phénol de quelques millisecondes, qui devient de 7,496 mn.

Dans un troisième temps, nous avons pris un échantillon du milieu de culture après biodégradation de phénol par SB6, et après filtration nous l'avons fait passer dans le chromatographe, nous avons obtenu les pics suivants :

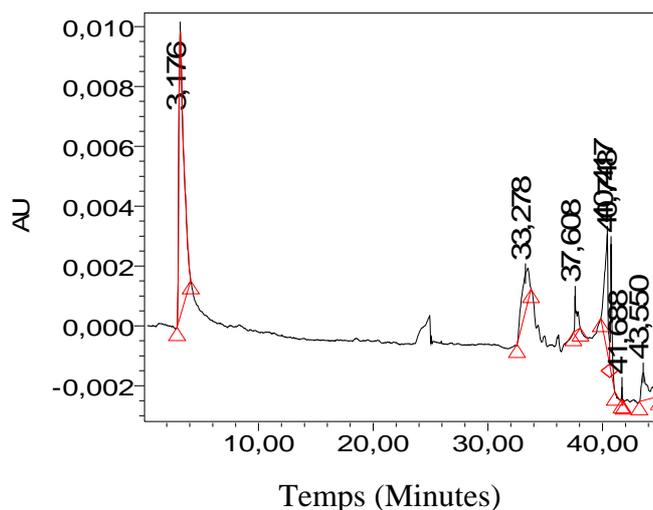


Figure 63 : Chromatogramme de l'échantillon après biodégradation

Nous remarquons qu'au temps de rétention du phénol, aucun pic n'est présent, ce qui signifie que la biodégradation de ce dernier est totale, quant au composé du milieu de culture minéral préalablement détecté, il est toujours présent avec un léger décalage dans le temps de rétention de quelque milliseconde, il devient à 3,176 mn. Mais d'autres composés sont apparus suite à la biodégradation du phénol qui représente les métabolites.

Ces analyses permettent de mettre donc en évidence la présence de métabolites résultant de la biodégradation du phénol.

Conclusion générale

L'élimination du phénol par des bactéries immobilisées par inclusion dans un support sphérique d'alginate de calcium, technique nouvellement employée, doit être exploitée pour ce qu'elle présente comme avantages, qui sont beaucoup plus intéressants qu'un traitement biologique classique.

Plusieurs manipulations ont été effectuées afin d'étudier l'influence de divers paramètres opératoires intervenant dans le processus de biodégradation du phénol par des bactéries immobilisées dans les billes d'alginate de calcium. Par la suite, une comparaison sur la cinétique de biodégradation fut faite entre des cellules libres et immobilisées, et entre bactéries différentes, pour en déterminer l'influence de l'immobilisation et du type de bactérie.

Notre étude a commencé par une tentative d'identification physique et biochimique de la souche bactérienne autochtone (SB6: Souche Bactérienne N°6). Les résultats nous permettent de la classer dans la famille de *Vibrionaceae* alors que la concordance biochimique l'attribue au genre *Aeromonas*.

Une étude en batch de la bactérie autochtone (non immobilisée) a été réalisée et les constantes biocinétiques déterminées pour compléter notre connaissance sur cette souche nouvellement utilisée.

Par la suite, nous avons étudié l'influence de divers paramètres opératoires intervenant dans la biodégradation du phénol, et les résultats obtenus nous permettent de dire que :

- Aucun autre phénomène que la biodégradation n'intervient dans l'élimination du phénol.
- Une optimisation des conditions de mise en oeuvre et de la composition en constituants entrant dans la préparation des billes d'alginate : Un mélange de 2 % (p/v) d'alginate de sodium Fluka à moyenne viscosité et de 4% (p/v) de chlorure de calcium, contenant une biomasse de 14 mg. Le diamètre des billes sphériques adopté est de 4mm pour un temps de durcissement de 2 heures. La souche est préalablement adaptée à une concentration de 100mg.L⁻¹ de phénol. .
- Les billes ainsi obtenues, permettent une biodégradation totale de plus de 800 mg.L⁻¹ de substrat. Au delà nous avons une biodégradation partielle qui diminue avec l'accroissement de la concentration du milieu.
- La comparaison entre les cellules libres et immobilisée nous a permis de déduire que la biodégradation du phénol par des cellules immobilisées est meilleure pour les concentrations variant entre 100 mg.L⁻¹ et de 800 mg.L⁻¹. Cet avantage augmente avec l'augmentation de la concentration et donc aux fortes concentrations (supérieure à 800 mg.L⁻¹).
- La comparaison entre les deux bactéries SB6 et *Pseudomonas aeruginosa* a montré que:
 - La biodégradation du phénol par SB6 à des concentrations inférieures à 800 mg.L⁻¹ est plus indiquée dans ces conditions, car elles permettent une biodégradation totale du phénol avec un relargage cellulaire dans le milieu moindres. Sachant que les deux cinétiques de biodégradation du substrat sont similaires pour les deux souches.

- À des concentrations supérieures à 1000 mg.L^{-1} , c'est l'incapacité de la bactérie SB6 à biodégrader phénol qui la défavorise, contrairement à *P. aeruginosa* qui peut le dégrader intégralement à une concentration de 1000 mg.L^{-1} . Au delà, la biodégradation du phénol est partielle pour les deux souches.

- L'influence de la composition de l'alginate en M-Blocs et G- blocs sur la biodégradation du phénol est étroitement liée à la nature de la bactérie. Pour SB6 les constituants de l'alginate Sigma de forte proportion en M-blocs lui ont permis de se développer plus aisément, contrairement à *Pseudomonas aeruginosa* qui, elle évolue mieux dans l'alginate Fluka riche en G-blocs.

- Des essais complémentaires sur *Pseudomonas aeruginosa*, nous ont permis de confirmer l'influence de quelques paramètres étudiés précédemment par SB6.

- Les photos des billes prises au moyen d'un microscope optique, nous ont permis de visualiser et donc de comprendre les phénomènes qui se déroulent à l'intérieure et à la périphérie.

- Les analyses faites par HPLC, ont confirmé la biodégradation du phénol par des bactéries SB6 et mis en évidence l'apparition de métabolites suite à cette biodégradation.

Pour la suite de cette étude, il serait intéressant d'établir un modèle mathématique qui permettra de prévoir l'évolution de la cinétique de biodégradation en fonction des paramètres étudiés durant notre étude.

Références bibliographiques

- 1- Environnement et Santé Canada (2000). Liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation : Phénol. Publ. No de cat. En40-215/45F. ISBN 0-662-84220-0.
- 2- M. Abouseoud, R. Maachi (2001). Biodégradation du phénol par des cellules de *Pseudomonas sp* libres et immobilisées dans l'alginate de calcium, ACPE3, 324-334.
- 3- D. Abd-El-Haleem, U. Beshay, A. O. Abdelhamid, H. Moawad, S. Zaki (2003). Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter sp*. Strain W-17. African journal of biotechnology, 2, 8-12.
- 4- S. Zaki, D. Abd-El-Halim, A. Abulhamd, H. Elbery, G. AbuElreesh (2006). Influence of phenolics on the sensitivity of free and immobilized bioluminescent *Acinetobacter bacterium*. Microbiological Research, doi: 10.1016/j.micres.2006.07.006.
- 5- A. M. Hannaford, C. Kuek (1999). Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 22, 121-126.
- 6- V. Arutchelvan, V. Kanakasabai, R. Elangovan, S. Nagarajan, V. Muralikrishnan (2006). Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*. Journal of Hazardous Materials B129, 216–222.
- 7- A. Y. Dursun, O. Tepe (2005). Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*. Journal of Hazardous Materials B 126, 105-111.
- 8- N. Hamlil-Tahar (2005). Traitement biologique des eaux contaminées par les hydrocarbures dans un bioréacteur à lit fluidisé triphasique. Mémoire de magister, USTRHB Bab Ezzour, Alger.
- 9- K. V. Shetty, I. Kalifathulla, G. Srinikethan (2007). Performance of pulsed plate bioreactor for biodegradation of phenol. Journal Hazardous Materials 140, 346-352.
- 10- European Federation of Biotechnology (EFB), Task Group on Public Perceptions of Biotechnology (1997). What's what in Biotechnology ? . Briefing Paper no 6, April 1997.
- 11- CRNC (2005). Immobilisation de microorganismes dans le chitosane pour des applications environnementales. CRNC N° 10344 et 11390. IPSO 10707.
- 12- C. Vargel, M. Jacques, M. P. Schmidt (2004). Corrosion of Aluminium. Ed 1, Elsevier, ISBN: 0 08 044495 4.
- 13- F. Ramade (2002). Dictionnaire Encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'Environnement. Ed 2. Dunod. ISBN 2 10 006670 6.
- 14- M. Mortier, P. Vansina, B. Gielens (2004). Phénol. Check-list, SPF Emploi, Travail et Concertation Sociale, Contrôle du Bien-être au Travail, Division du contrôle des risques chimiques. CRC/CL/0011-F version 1.0. SPF Emploi, crc@meta.fgov.be.
- 15- A. PICHARD (2005), Phénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS–DRC-01-25590-01DR021. N°2-1.
- 17- S. Mannan (2005), PE, CSP. Lee's Loss Prevention in the Process Industries. Hazard Identification, Assessment and Control. Ed : 3. Volume 3, Elsevier Butterworth-Heinemann. ISBN: 0 -7506-7589 -3.

- 18- L. G. Torres, A. Sfinchez-de-la-Vega, N. A. Beltran, B. E. Jimenez. Production and characterization of a Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol and chlorophenols from wastewaters. *Journal of Biochemistry* 33 , 625-634.
- 19- N. K. Pazarlioglu, A. Telfoncu (2004). Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles. *Process and Biochemistry*, doi: 10.1016/j.procbio.2004.06.043.
- 20- Z. Aksu, G. Bulbul (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. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 397-403.
- 21- T. V. Ojumu, O. O. Bello, J. A. Sonibare, B. O. Solomon (2005). Evaluation of microbial systems for bioremediation of petroleum refinery effluents in Nigeria. *African journal of Biotechnology* 4 , 31-35.
- 22- J. Yan, W. Jianping, L. Hongmei, Y. Suliang, H. Zongding (2005). The biodegradation of phenol at high initial concentration by yeast *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal* 24, 243-247.
- 23- J. S. Melo, S. Kholi, A. W. Patwardhan, S. F. D'Souza (2004). Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. *Process of Biochemistry*, doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.049.
- 24- F. Woodard (2001). *Industrial Waste Treatment Handbook*. Ed Butterworth–Heinemann. ISBN 0-7506-7317-6.
- 25- M. Doble, A. Kumar (2005). *Biotreatment of Industrial Effluents*. Ed Elsevier, ISBN: 0-7506-7838-0.
- 26- S. Judd, B. Jefferson (2003). *Membranes for Industrial Wastewater Recovery and Re-use*. Ed Elsevier Science, ISBN 1856173895.
- 27- R. E. Weiner, R. A. Matthews (2003). *Environmental engineering*. Ed : 4, Butterworth-Heinemann, Elsevier Science. ISBN: 0750672943.
- 28- A. Namane (2006). Adsorption- biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilise sur du charbon actif en grains. Thèse de Doctorat, ENP El Harrach, Alger.
- 29- I. Stoilova, A. Krastanov, V. Stanchev, D. Daniel, M. Gerginova, Z. Alexieva (2006). Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1036-1041.
- 30- A. Gallego, M. S. Fortunato, J. Foglia, S. Rossi, V. Gemini, L. Gomez, C. E. Gomez, L. E. Higa, S. E. Korol (2003). Biodegradation and detoxification of phenolic compounds by pure and mixed indigenous culture in aerobic reactors. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52, 261-267.
- 31- W. C. Lyons (1996). *Standard handbook of petroleum and natural gas engineering*. Vol. 1, Gulf Publishing Company, Houston, Texas. ISBN 0-88415-642-7
- 32- K. Bandhyopadhyay, D. Das, P. Bhattacharyya, B. R. Maiti (2001). Reaction engineering studies on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* MTCC 1194 immobilized on calcium alginate. *Biochemical Engineering Journal* 8, 179-186.
- 33 – F. Berne, J. Cordonnier (1991). *Traitement des eaux de raffinerie, épuration des eaux résiduaire de raffinage*. Ed Technip, Paris ISBN 2.7108-0613-4.

- 34- CE (2000). Risk assessment Phenol. European Commission. Brussels, Belgium.
- 35- E. Turpin (2004). Cinétique et mécanisme de dégradation atmosphérique de trois composés organiques volatiles : l'acétone, le phénol et le catéchol. Thèse de Doctorat, université des sciences technologiques de Lille 1, France.
- 36- G. Borighem, J. Vereecken (1978). Study of degradation of phenol in river water. *Ecological Modelling* 4, 51-59.
- 37- A. Nuhoglu, B. Yalcin (2005). Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochemistry* 40, 1233-1239.
- 38- A. Mordocco, C. Kuek, R. Jenkins (1999). Continuous degradation of phenol at low concentration using immobilised *Pseudomonas putida*. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 530-536.
- 39- A. Benahmed Djilali (2005). Biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisée dans l'Alginate de Calcium. Mémoire de magister, ENP El Harrach, Alger.
- 40- Degrément (1989). Mémento technique de l'eau. Éd : 9. Tome 2, Lavoisier. ISBN 2950398405.
- 41- M. Soltani (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat, université Paris 6, France.
- 42- J. R. Backhurst, J. F. Richardson, J. H. Harker. (2002). *Chemical Engineering. Particle Technology and Separation Processes*. Ed 5. Vol 2, Butterworth-Heinemann, Elsevier Science, ISBN 0 7506 4445 1.
- 43- R. Vazquez-Duhalt, R. Quintero-Ramirez (2004). *Petroleum Biotechnology, Developments and Perspectives. Studies in Surface Science and Catalysis*. Ed 1. Vol. 151, Elsevier B.V. ISBN: 0 444 51699 9.
- 44- A. Viggiani, G. Olivieri, L. Siani, A. Di Donato, A. Marzocchella, P. Salatino, P. Barbieri, E. Galli (2006). An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Journal of Biotechnology* 123, 464-477.
- 45- L. Toumi, M. Fedailaine, K. Allia (2007). Modelling three-phase fluidized bed bioreactor for wastewater treatment. *Récents Progrès en génie des Procédés*, Ed. SFGP, N 94. ISBN 2-910239-68-3. Paris, France.
- 46- J. H. Kim, K. K. Oh, S. T. Lee, S. W. Kim, S. I. Hong (2002). Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. *Process biochemistry* 37, 1367-1373.
- 47- J. G. Leahy, R. R. Colwell (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305-315.
- 48- B. A. McKew, F. Coulon, A. M. Osborn, K. N. Timmis, T. J. McGenity¹ (2007). Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology* 9, 165-176.
- 49- R. S. Norman, P. Moeller, T. J. McDonald, P. J. Morris (2004). Effect of Pyocyanin on a Crude-Oil-Degrading Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4004-4011
- 50- J. D. Van Hamme, A. Singh, O. P. Ward (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 503-549.

- 51- D. Delille, E. Pelletier, F. Coulon (2007). The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated subAntarctic soil. The Fourth International Conference on Contaminants in Freezing Ground, Fairbanks, Alaska Volume 48, Issue 2, 74-83.
- 52- S. S. Radwan, R. H. Al-Hasan, N. Ali, S. Salamah, M. Khanafer (2005). Oil-consuming microbial consortia floating in the Arabian Gulf. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56, 28–33.
- 53- N. A. Sorkhoh, A. S. Ibrahim, M. A. Ghannoum, S. S. Radwan (1993). High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert. *Biotechnology* 39, 123-126.
- 54- M. M. Yakimov, L. Heinrich, P. N. Golyshev (2003). *Thermoleophilum album* and *Thermoleophilum minutum* are culturable representatives of group 2 of the Rubrobacteridae (Actinobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 377–380.
- 55- H. J. M. Harmsen, D. Prieur, C. Jeanthonn (1997). Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes To Identify Thermophilic Bacteria in Marine Hydrothermal Vents. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4061–4068.
- 56- W. El-Sayed, M. K. Ibrahim, M. Abu-Shady, F. El-Beih, N. Ohmura, H. Saiki, A. Ando (2003). Isolation and characterization of phenol-catabolizing bacteria from a coking plant. *Bioscience, biotechnology, biochemistry* 67, 2026-2029.
- 57- K. A. Hughes, P. Bridge, M. S. Clark (2007). Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the Total Environment* 372, 539–548.
- 58- S. Pallerla, R. Chambers (1997). Characterization of A Ca–alginate–immobilized *trametes versicolor* bioreactor for decolorization and AOX reduction of paper mill effluents. *Bioresource Technology* 60, 1-8.
- 59- C. E. Cerniglia, D. T. Gibson (1979). Oxidation of benzo[a]pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 254, 12174-12180.
- 60- J. D. Walker, R. R. Colwell, L. Petrakis (1975). Degradation of Petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Applied Microbiology* 30, 79–81.
- 61- T. Suzuki, T. Yamaguchi, M. Ishida (1998). Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons. *Process Biochemistry* 33, 541-546.
- 62- S. J. Macnaughton, J. R. Stephen, A. D. Venosa (1999), Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill. *American Society for Microbiology* 65, 3566–3574.
- 63- A. A. M. G. Monteiro, R. A. R. Boaventura, A. E. Rodrigues (2000). Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochemical Engineering journal* 6, 45-49.
- 64- A. Lallai, G. Mura (1989). pH variation during phenol biodegradation in mixed cultures of microorganisms. *Water Resources* 23, 1335-1338.
- 65- J. D. Moody, J. P. Freeman, P. P. Fu, C. E. Cerniglia (2004). Degradation of Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 340–345.

- 66- J. Schneider, R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, D. Warshawsky (1996). Degradation of Pyrene, Benz[a]anthracene, and Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium sp.* Strain RJGII-135, Isolated from a Former Coal Gasification Site. *American Society for Microbiology* 62 , 13–19.
- 67- A. L. juhasz, M. L. Britz, G. A. Stanley (1997), Degradation of fluorethene, pyrene, benzo[a]anthracene and dibenz[a,h] anthracene by *Burkholderia cepacia*. *journal of Applied Microbiology* 83, 189-198
- 68- R. E. Parales, N. C. Bruce, A. Schmid, L. P. Wackett (2002). Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4699-4709.
- 69- R. L. Autenrieth, J. S. Bonner (1991). Biodegradation of phenolic wastes. *Journal of Hazardous Materials* 28, 29-53.
- 70- M. E. A. Shalaby (2003). Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4. Thèse de Doctorat, faculté de Kafr El-Sheikh d'Agriculture, université de Tanta, Egypte.
- 71- R. Scriban (1989). *Biotechnologie*. Ed 5, Technique et documentation, Lavoisier. ISBN : 2 7430 0309 X.
- 72- W. L. Collinsworth, P. J. Chapman, S. Dagley (1973). Stereospecific Enzymes in the Degradation of Aromatic Compounds by *Pseudomonas putida*. *American Society for Microbiology* 113, 922-931.
- 73- E. Díaz (2004), Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Journal Microbiology* 7,173–180.
- 74- D. Hank (2005). Étude de la biosorption du phénol dans un lit de charbon actifensemencé par *Pseudomonas aeruginosa* en système continu. Mémoire magister, ENP El Harrach, Alger.
- 75- M. Abou Seoud, R. Maachi (2003). Biodegradation of Naphthalene by free and Alginate Entrapped *Pseudomonas sp.* *Z. Naturforsch* 58C, 726-731.
- 76- D. F. Dwyer, M. L. Krumme, S. A. Boyd, J. M. Tiedje (1989). Kinetics of phenol biodegradation by immobilized Methanogenic Consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 52, No. 2, 345-351.
- 77- R. Schmidt (1999). Comportement des matériaux dans les milieux biologiques- Application en médecine et biotechnologie. éd : 1, *Traité des matériaux*. Presses polytechniques et universitaires romandes. ISBN 2-88074-403-2.
- 78- J. Boudrant, G. Corrieu, P. Couet (1994). *Capteurs et mesures en biotechnologie*. Technique et Documentation- lavoisier. ISBN : 2-85206-933-4.
- 79- C F. Cinquin (2005), Développement et validation d'un nouveau modèle de fermentation colique in vitro avec cellules immobilisées. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec.
- 80 - S. V. Ramkrishna, R. S. Prakasham (1999). Microbial fermentation with immobilized cells. *Curr Science* 77, 87-100.
- 81 - S. F. D'Souza (1998) , Immobilized enzymes in bioprocess. *Curr. Science* 77, 69–79.
- 82- C. Burstein (2000). *Biotechnologie enzymatique*. Mode d'emploi, Industrie alimentaire-environnement- Médical. Ed Economica. ISBN 2-84054-062-2.

- 83- Y. Doleyres, C. Lacroix (2004). Cell immobilization for the dairy industry. Article 1-18. Nisco engineering AG, institut technologique de la federation de Swiss, Zurich, Swiss. <http://www.nisco.ch/download/27.pdf>
- 84- A. Mittal, S. Khurane, H. Singh, R. C. Kamboj (2005). Characterisation of dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) immobilized in Ca alginate beads. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 318-323.
- 85- S. Sharma, A. Mittal, V. K. Gupa, H. Singh (2007). Improved stabilisation of microencapsulated Cathepsin B in harsh conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 337-342.
- 86- V. Grabovac, A. Bernkop-Schnurch (2006). Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain. *International Journal of Pharmaceutics* 326, 153–159.
- 87- C. Capitani, O. E. Perez, B. Pacheco, M. Teresa, A. M. R. Pilosof (2007), Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of α -lactalbumin and b-lactoglobulin. *Food Hydrocolloids* 21, 1344–1354.
- 88- G. A. Sellek, J. B. Chaudhuri (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 471–482.
- 89- E. Hearn, R. J. Neufeld (2000). Process Biochemistry Poly(methylene co-guanidine) coated alginate as an encapsulation matrix for urease. *Department of Chemical Engineering* 35, 1253–1260.
- 90- M. I. Pividori, A. Merkoç, S. Alegret (2001). Classical dot–blot format implemented as an amperometric hybridisation genosensor *Grup de Sensors & Biosensors. Biosensors & Bioelectronics* 16, 1133–1142.
- 91 – F. Chellat (1999). Biocompatibilité, Biodégradation et Influence de la stérilisation sur le complexe Chitosane-Xanthane. Mémoire de maîtrise, Ecole polytechnique de Montréal, Canada.
- 92 – K. Kailasapathy (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria : Technology and Potential Applications. *Current. Issues Intest. Microbiology* 3, 39-48. Horizon Scientific Press.
- 93- A. K. Anal, H. Singh (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 18, 240-251.
- 94 – E. P. Espinosa, L. Barillé, B. Allam (2007). Use of encapsulated live microalgae to investigate pre-ingestive selection in the oyster *Crassostrea gigas* , *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 343, 118-126.
- 95 – E. P. Espinosa, L. Barillé, B. Allam (2007), Use of encapsulated live microalgae to investigate pre-ingestive selection in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 343, 118–126.
- 96 – M. Chaplin (2004). Methods of immobilisation. London south bank university, faculty of engineering science and build environment, www.lsbu.ac.uk/water/chaplin.html.
- 97- W. Yujian, Y. Xiaojuan, T. Wei, L. Hongyu (2007). High- rate ferrous iron oxidation by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* with complex of PVA and sodium alginate. *Journal of Microbiological Methods* 68, 212-217.

- 98- Y. Li, K. C. Loh (2006). Activated Carbon impregnated polysulfone hollow fiber membrane for cell immobilization and cometabolic biotransformation of 4-chlorophenol in presence of phenol. *Journal of Membrane Science* 276, 81-90.
- 99 – A. W. I. Tan (2006). Applications of Whole Cell Biotransformations for the Production of Chiral Alcohols. Thèse de doctorat, Université de Rheinische Friedrich-Wilhelms de Bonn, Allemagne.
- 100- T. Murugesan, R. Y. Sheeja (2005). A correlation for the masse transfer coefficients during the biodegradation of phenolic effluents in a packed bed reactor. *Separation and Purification Technology* 42, 103-110.
- 101- X. Lijun, W. Bochu, L. Zhimin, D. Chuanren, W. Qinghong, L. Liu (2005). Linear alkyl benzene sulfonate (LAS) degradation by immobilized *Pseudomonas aeruginosa* under low intensity ultrasound. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 40, 25-29.
- 102 – K. C. Chen, Y. H. Lin, W. H. Chen, Y. C. Liu (2002). Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 490-497.
- 103 – K. Adinarayana, B. Jyothi, P. Ellaiah (2005). Production of Alkaline Protease with Immobilized Cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in Various Matrices by Entrapment Technique. *AAPS PharmSciTech* 48, 391-397.
- 104 – A. M. Gerrard, J. P. Junior, A. Kosteckova, J. Paca, M. Stiborova, C. R. Soccol (2006). Simple model for continuous aerobic biodegradation of phenol in a packed bed reactor. *Brazilian archives of biology and technology* 49, 669-676.
- 105 – T. Godjevargova, Z. Aleksieva, D. Ivanova (2000). Cell immobilization of *Trichosporon cutaneum* stain with phenol degradation ability on new modified polymer carriers. *Process Biochemistry* 35, 699-704.
- 106 - T. Godjevargova, D. Ivanova, Z. Aleksieva, G. Burdelova (2006). Biodegradation of phenol by immobilized *Trichosporon cutaneum* R57 on modified polymer membranes. *Process Biochemistry* 41, 2342-2346.
- 107- W. T. Qi, J. Ma, W. T. Yu, Y. B. Xie, W. Wang, X. Ma (2006). Behaviour of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 697-704.
- 108 – J. C. T. Dias, R. P. Rezende, V. R. Linardi (2000). Biodegradation of acetonitrile by cells of *Candida Guilliermondii* UFMG-Y65 immobilized in Alginate, κ -Carrageenan and Citric Pectin. *Brazilian journal of Microbiology* 31, 61-66.
- 109 – A. Tanriseven, Z. Olcer (2007). A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatine. *Biochemistry and Engineering Journal*. (2007), doi:10.1016/j.bej.2007.10.011
- 110 – A. Idris, W. Suzana (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry* 41, 1117-1123.
- 111- T. W. Chunga, M. C. Yang, W. J. Tsai (2006). A fibrin encapsulated liposomes-in-chitosan matrix (FLCM) for delivering water-soluble drugs Influences of the surface properties of liposomes and the crosslinked fibrin network. *International Journal of Pharmaceutics* 311, 122–129.

- 112 – A. Milovanovic, N. Bozic, Z. Vujcic (2006). Cell wall invertase immobilization within calcium alginate bead. Food Chemistry, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.0001.
- 113-U. Beshay, D. Abd-El-Haleem, H. Moawad, S. Zaki (2002). Phenol biodegradation by free and immobilized *Acinetobacter*. Biotechnology Letters 24, 1295-1297.
- 114- R. F. Branco, J. C. Santos, L. Y. Murakami, S. I. Mussatto, G. Dragone, S. S. Silva (2007). Xylitol production in a bubble column bioreactor: influence of the aeration rate and immobilized system concentration. Process Biochemistry 42, 258-262.
- 115- W. Carvalho, J. C. Santos, L. Canilha, S. S. Silva, P. Perego, A. Converti (2005). Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate Metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca alginate, Biochemical and Engineering Journal 25, 25–31.
- 116- M. Szczesna-Antczak, T. Antczak, S. Bielecki (2004). Stability of extracellular proteinase productivity by *Bacillus subtilis* cells immobilized in PVA-cryogel. Enzyme and Microbial Technology 34, 168–176.
- 117 – F. Sahin, G. Demirel, H. Tunturk (2005). A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase. International Journal of Biological Macromolecules 37, 148–153.
- 118 – E. I. Iwuoha, M. R. Smyth (1997), Organic phase enzyme electrodes: kinetics and analytical applications. Biosensors & Bioelectronics 12, 53-75.
- 119 – K. Koyama, M. Seki (2004). Cultivation of yeast and plant entrapped in the low-viscous liquid-core of an alginate membrane capsule prepared using polyethylene glycol, journal of bioscience and bioengineering 97, 111-118.
- 120- L. Baruch, M. Machluf (2006). Alginate–Chitosan Complex Coacervation for Cell Encapsulation: Effect on Mechanical Properties and on Long-Term Viability. Wiley InterScience, DOI 10.1002/bip.20509.
- 121- G. Klinkenberg, K. Q. Lystad, D. W. Levine, N. Dyrset (2001). Cell Release from Alginate Immobilized *Lactococcus lactis ssp. Lactis* in Chitosan and Alginate Coated Beads. Journal of Dairy Science 84, 1118–1127 .
- 122- S. Steffan, L. Bardi, M. Marzona (2005). Azo dye biodegradation by microbial cultures immobilized in alginate beads. Environment International 31, 201– 205.
- 123 – P. S. Panesar, J. F. Kennedy, C. J. Knill, M. R. Kosseva (2007). Applicability of pectate-entrapped *Lactobacillus casei* cells for L(+) lactic acid production from whey. Applied Microbiology and Biotechnology 74, 35-42.
- 124 – J. Nahalka, B. Wu, J. Shao, P. Gemeiner, P. G. Wang (2004). Production of cytidine 5'-monophospho-N-acetyl-β-Dneuraminic acid (CMP-sialic acid) using enzymes or whole cells entrapped in calcium pectate–silica-gel beads. Biotechnology Applied Biochemistry 40, 101–106.
- 125 – J. Nahalka, Z. Liu, X. Chen, P. G. Wang (2003). Superbeads: Immobilization in TMSweet Chemistry. Chemistry European Journal 9, No. 2 WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim.
- 126 – J. Stano, K. Micieta, D. Kakoniova, M. Duricek (2003). Study of Some Aminopeptidases in Immobilized Cells of *Papaver somniferum* L. Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae 50, 132-138.

- 127- C. Muzzarellia, V. Stanic, L. Gobbi, G. Tosib, R. A. A. Muzzarellia (2004). Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres. *Carbohydrate Polymers* 57, 73–82.
- 128- X. Quan, H. Shi, J. Wang, Y. Qian (2003). Biodegradation of 2,4-dichlorophenol in sequencing batch reactors augmented with immobilized mixed culture. *Chemosphere* 50, 1069-1074.
- 129 – T. P. Chung, P. C. Wu, R. S. Juang (2005). Use of microporous hollow fibers improved biodegradation of high- strength phenol solutions. *Journal of Membrane Science* 258, 55-63.
- 130- F. Grattepanche (2005). Etude d'un système de Préfermentation en continu du lait par une culture mixte immobilisée fonctionnelle. Thèse de Doctorat, Université de Laval, Québec.
- 131- W. Krasaekoopt, B. Bhandari, H. Deeth (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* 13, 3–13.
- 132- F. Dobakhti, S. Ajdary, M. Taghikhani, S. Rafiei, K. Bayati, M. Rafiee-Tehrani1 (2006). Immune Response Following Oral Immunization with BCG Encapsulated in Alginate Microspheres. *Iran Journal of Immunology* 3, N 3.
- 133- P. K. Choudhury, M. Kar (2005). Preparation of Alginate Gel Beads Containing Metformin Hydrochloride Using Emulsion- Gelation Method. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 4 , 489-493
- 134- F. Anduze, D. Polerisse (2000). Temps de vidage d'un récipient. Projets de fin d'études, Sciences de la nature. Collège Ahuntsic www.apsq.org/sautquantique/telechargement/projets_Ahuntsic_1999-2000.pdf
- 135- A. Smidsrod, G. Skjak-Braek (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71- 78.
- 136- S. Saibron (1997). Les aromes alimentaires. Synthèse documentaire. Formation à l'IRTD - CCI Rouen, France.
- 137- D. J. McHugh (1987). Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO Fisheries Technical Paper 288. Pub FAO. ISBN 92-5-102612-2
- 138- K. M. Khoo, Y. P. Ting (2001). Biosorption of gold by immobilized fungal biomass *Biochemical Engineering Journal* 8, 51–59.
- 139- E. Prouzet, M. Tokumoto, A. Krivaya (2004). Method for preparing beads containing a croolinked mineral matrix. WO/2004/009229).
- 140- D. H. Kim, M. Abidian, D. C. Martin (2004). Conducting polymers grown in hydrogel scaffolds coated on neural prosthetic devices. Wiley InterScience DOI: 10.1002/jbm.a.30124
- 141- I. E. Burak (2007). Micro/nanoencapsulation of proteins within alginate/chitosane matrix by spray drying. These de master, Université du Queen's, Kingston, Ontario, Canada.
- 142- A. Nussinovitch, R. Zvitov-Marabi (2008), Unique shape, surface and porosity of dried electrified alginate gels. *Food Hydrocolloids* 22, 364–372
- 143- S. Givry (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bif fermentans*. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne, France.
- 144- V. A. Nedovic, I. Leskosek-Cukalovic, G. Vunjak-Novakovic (1999). Immobilized Cell Technology in Beer Fermentation – a Possibility for Environmentally Sustainable and Cost-Effective Process. Available at: <http://www.rcub.bg.ac.yu/>

- 145- D. Jouanneau (2007). Les Phycocolloïdes. www.sb-roscoff.fr/Phyto/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=360.
- 146- D. L. Fleming (2004). Evaluating bacterial cell immobilization matrices for use in a biosensor. Thèse de Master, Institut polytechnique de Virginie, USA.
- 147- N. O. Dhoot (2002). Microencapsulation for Therapeutic Applications. Thèse de doctorat, Faculte de Drexel University, USA.
- 148- C. Moulis (2006). Ingénierie rationnelle de la Dextraesaccharase DSR-S: Compréhension du mécanisme de Polymérisation pour la synthèse de Dextranes de taille contrôlée. Thèse de Doctorat, Université de INSA de Toulouse, France.
- 149- V. Roeder (2006). Recherche et étude de marqueurs moléculaire de la réponse au stress chez l'algue brin *Laminaria digitata*. Thèse de doctorat, Université de Renne 1, France.
- 150- G. Ruiz (2005). Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges. Thèse de doctorat, Université de Limoges. France.
- 151- A. Sharma, M. N. Gupta (2002). Three phase partitioning of carbohydrate polymers: separation and purification of alginates. *Carbohydrate Polymers* 48, 391-395.
- 152- L. Payet, A. Ponton, F. Agnely, P. Colinart, J. L. Grossiord (2002). Caractérisation rhéologique de la gélification d'alginate et de chitosane : Effet de la température. *Rhéologie* 2, 46-51.
- 153- B. Doumèche (2002). Fundamental phenomenological description and experimental optimization of gel-stabilized biocatalysts in a two-phase system. These de doctorat. RWTH-Aachen, Allemagne.
- 154- K. I. Drajet, O. Smidsrod, G. Skjak-Break (2005). Alginates from Algae. Ed Wiley-VCH Et Verlag GmbH et Co KgaA, Weinheim. ISBN : 3 527313451.
- 155- P. V. Nichols (2006). An Investigation of the Dimensional Stability of Dental Alginates. Thèse de Master. Université de Sydney, Australie.
- 156- C. E. Chitnis, D. E. Ohman (1990). Cloning of *Pseudomonas aeruginosa* algG, Which Controls Alginate Structure, *Journal of Bacteriology* 172, 2894-2900.
- 157- S. Celper (2003). Bioartificial Pancreas: The MR Microscopy of Poly-L-Lysine Coated Alginate Beads. Thèse de Master, Université de Floride, USA.
- 158- J. Götz (2004). Applications of NMR to Food and Model Systems in Process Engineering. These de doctorat, Université de Munich, Suisse.
- 159- R. H. Flo (2001). Receptors involved in cell activation by defined uronic acid polymers and bacterial components. Thèse de doctorat. Université des sciences et de la technologie de Norvège, NTNU Trondheim. Norvège.
- 160- B. Ren, Y. Gao, L. Lu, X. Liu, Z. Tong (2006). Aggregates of alginates binding with surfactants of single and twin alkyl chains in aqueous solutions: Fluorescence and dynamic light scattering studies. *Carbohydrate Polymers* 66, 266-273.
- 161- C. Theilacker, F. T. Coleman, S. Mueschenborn, N. Llosa, M. Grout, G. B. Pier (2003). Construction and Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Mucoïd Exopolysaccharide-Alginate Conjugate Vaccine. *Infection and Immunity* 71, 3875-3884.
- 162- A. Narbad, M. J. E. Hewlins, P. Gacesa, N. J. Russell (1990). The use of ¹³C-n.m.r. spectroscopy to monitor alginate biosynthesis in mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biochemistry* 267, 579-584.

- 163- B. Larsen, D. M. S. A. Salem, M. A. E. Sallam, M. M. Mishrikey, A. I. Beltagy (2003). Characterization of the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Sea coast. *Carbohydrate Research* 338, 2325-2336.
- 164- W. Sabra (1998). Microaerophilic production of alginate by *Azotobacter vinelandii*. Thèse de doctorat, Université d'Alexandrie, Egypte.
- 165- N. Saude, H. Cheze-Lange, D. Beunard, P. Dhulster, D. Guillochon, A. M. Caze, M. Morcellet, G. A. Junter (2002). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in a membrane bioreactor. *Process Biochemistry* 38, 273-278.
- 166- N. Saude, G. A. Junter (2002). Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry* 37, 895-900.
- 167- E. Galindo, C. Peña, C. Núñez, D. Segura, G. Espín (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories* doi:10.1186/1475-2859-6-7.
- 168- R. Myrvold, E. Onsøyen (2004). Alginate. Section 16, FMC BioPolymer RS. <http://www.fmcbiopolymer.com/Portals/bio/content/Docs/Pharmaceuticals/Problem%20Solve%20r/PS-Section%2016.pdf>.
- 169- G. E. Remondetto (2003). Propriétés de rétention et de libération de micronutriments par des réseaux protéiques : Étude du système gélifié β -lactoglobuline/fer. Thèse de Doctorat, Université Laval, Québec.
- 170- N. Mohan, P D. Nair, S C (2005). Novel Porous, Polysaccharide Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Trends Biomaterial. Artificial. Organs*, 18 (2), <http://www.sbaoi.org>.
- 171- A. Walewijka, J. J. Cooper-White, D. E. Dunstana (2007), Adhesion measurements between alginate gel surfaces via texture analysis. *Crown, Elsevier Ltd.* doi:10.1016/j.foodhyd.2007.05.005.
- 172- M. J. Koeffler (2004). Actualisation de la prise en charge des escarres : application dans un hôpital gériatrique. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg U.F.R., France.
- 173- T. Visted, R. Bjerkvig, P. Øyvind Enger (2001). Cell encapsulation technology as a therapeutic strategy for CNS malignancies. *Neuro-Oncology* 201-210.
- 174- R. A. Rezende, P. J. Bártolo, A. Mendes, R. Maciel Filho (2004). Experimental Characterisation of the Alginate Gelation Process for Rapid Prototyping. Polytechnic Institute of Leiria, Portugal. Projects POCI/SAU-BMA/60287/2004 and POCTI/EME/60650/2004. <http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/icheap8pres07/icheap8webpapers/134%20Rezende.pdf>.
- 175- P. Tataridis, P. Ntagas, I. Voulgaris, E. T. Nerantzis (2004). Production of sparkling wine with immobilized yeast fermentation. Rapport du programme de recherche ATHINA 2004. T E I d'Athènes, Grèce.
- 176- D. Bergmaier (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *LB. Rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de permeat de Lactoserum, Thèse de doctorat, Université de Laval, Québec.

- 177- R. N. Z. Abd Rahman, F. M. Ghazali, A. B. Salleh, M. Basri (2006). Biodegradation of Hydrocarbon Contamination by Immobilized Bacterial Cells. *Journal of Microbiology* 44, 354-359,
- 178- C. Lacroix, S. Yildirim (2007). Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 176–183.
- 179- G. Najafpour, H. Younesi, K. S. K. Ismail (2004). Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology* 92, 251-260.
- 180- Y. Doleyeres (2003). Production en continu de ferments lactiques Probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat, Université de Laval, Québec.
- 181- A. Vij, J. S. Fisher, A .P. Lee (2005). Cell Encapsulation for Tissue Engineering. Applied Science Northwestern University, Final Project Integrated Micro/Nano Summer Undergraduate Research Experience (IMSURE). http://www.urop.uci.edu/im-sure/2005_summer/im_sure_web_projects.html
- 182- Y. Bashan, J. P. Hernandez, L. A. Leyva, B. Macario (2002). Alginate Microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fertil Soils* 35, 359-368.
- 183- R. M. Johanna, P. Renaud (2007). Microfluidic patterning of alginate hydrogels. *Biointerphases* 2 (2), American Vacuum Society, DOI: 10.1116/1.2746873.
- 184- A. Talwalkar, K. Kailasapathy (2004). The Role of Oxygen in the Viability of Probiotic Bacteria with Reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Issues Intest. Microbiology* 5, 1-8.
- 185- C. M. Silva, A. J. Ribeiro, M. Figueiredo, D. Ferreira, F. Veiga (2006). E903 Microencapsulation of Hemoglobin in Chitosan-coated Alginate Microspheres Prepared by Emulsification/Internal Gelation. *The AAPS Journal*, 7 903 – 913.
- 186- P. Ellaiah, T. Prabhakar, B. Ramakrishna, A. T. Taleb, K. Adinarayana (2004). Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 39, 525–528.
- 187- A. Mortazavian, S. E. Razavi, M. R. Ehsani, S. Sohrabvandi (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology* 5, 1-18.
- 188- K. Kailasapathy (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt Probiotic and Encapsulated. *LWT* 39,1221–1227.
- 189- C. Laville (2005). La gastronomie moléculaire : une science pluridisciplinaire. Institut des Hautes Etudes Scientifiques, Bures-sur-Yvettes, France.
- 90- A. Viggiani, G. Olivieri, L. Siani, A. Di Donato, A. Marzocchella, P. Salatino, P. Barbieri, E. Galli (2006). Airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Journal of Biotechnology* 123, 464-477.
- 191- J. Martitz, H. M. Krieg, C. A. Yeates, A. L. Botes, J. C. Breytenbach (2003). Calcium alginate entrapment of the yeast *Rhodospodium toruloides* for the kinetic resolution of 2,2-epoxyoctane. *Biotechnology Letters* 25, 1775-1781.

- 192- I. Banerjee, J. M. Modak, K. Bandopadhyay, D. Das, B. R. Maiti (2001). Mathematical model for evaluation of mass transfer limitations in phenol biodegradation by immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology* 87, 211–223.
- 193- G. Tziotziosa, G. Lyberatosb, S. Pavlob, D. V. Vayenasa (2007). Modelling of biological phenol removal in draw-fill reactors using suspended and attached growth olive pulp bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*. doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.06.002.
- 194- S. Charles-Bajard (1996). Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *Listeria monocytogenes*. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon I, Villeurbanne, France.
- 195- M. L. Delignette-Muller (1995). Méthodes de prédiction des aptitudes de croissance des populations de micro-organismes. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon I, Villeurbanne, France.
- 196- O. Ali (2005). Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en fermenteur. Mémoire de magister, ENP El Harrach Alger.
- 197- G. C. Okpokwasili, C. O. Nweke (2005). Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African Journal of Biotechnology* 5, 305-317,
- 198- W. Cai, J. Li , Z. Z. Zhejiang (2007). The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium sp.* *Journal of Hazardous Materials* 148, 38–42.
- 199- T. Abuhamed, E. Bayraktar, T. Mehmetolu, Ü. Mehmetolu (2004). Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry* 39, 983–988.
- 200- P. Namour (1999). Auto – épuration des rejets organiques domestiques, nature de la matière organique résiduaire et son effet en rivière. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard- Lion I, France.
- 201- H. Barhoumi (2006). Elaboration et caractérisations de nouvelles membranes enzymatiques pour application "biocapteur" en hémodialyse rénale. Thèse de Docteur, Faculté des Sciences de Monastir et de l'Ecole Centrale de Lyon. France.
- 202- A. Laca, L. A. Garcia, M. Diaz (2000). Analysis and description of the evolution of alginate immobilised cells systems. *Journal of Biotechnology* 80, 203-215.
- 203- C. C. Wang, C. M. Lee, C. J. Lu, M. S. Chuang (2000). Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in presence of primary substrate by immobilized pure culture bacteria, *Chemosphere* 41, 1873-1879.
- 204- S. M. Moreira, M. Moreira-Santos, L. Guilhermino, R. Ribeiro (2006). Immobilization of marine microalga *phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 135-141.
- 205- A. Blandino, M. Macias, D. Cantero (1999). Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics. *Journal of bioscience and bioengineering* 88, 686-689.
- 206- W. Jianlong, H. Liping, S. Hanchang, Q. Yi (2001). Biodegradation of quinoline by gel immobilized *Burkholderia sp.* *Chemosphere* 44, 1041-1046.

- 207- J. H heritage, E. G. V. Evans, R. A. Killington (1996). Introductory microbiology. Cambridge University press 1996. ISBN 0521 58692 5.
- 208- R. J. Shimp, K. Pfaender (1987). Microbiology Effect of Adaptation to Phenol on Biodegradation of Monosubstituted Phenols by Aquatic Microbial. Applied and Environmental Microbiology 53, 1496-1499.
- 209- P. Saravanan, K. Pakshirajan, P. Saha (2008). Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor. Bioresource Technology 99, 205-209.
- 210- Z. Konsoula, M. Liakopoulou-Kyriakides (2006). Thermostable α -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. Enzyme and Microbial Technology 39, 690-696.
- 211- P. Boyaval, A. Lebrun, J. Goulet (1985). Etude de l'immobilisation de *Lactobacillus helveticus* dans des billes d'alginate de calcium. Le Lait 65, 185-199
- 212- G. S. Anisha, P. Prema (2007). Cell immobilization technique for the enhanced production of α -galactosidase by *Streptomyces griseoloalbus*. Bioresource Technology. doi:10.1016/j.biortech.2007.08.023.
- 213- C. Bailliez, C. Largeau, E. Casadevall(1985). Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. Applied Microbiology Biotechnology 23, 99-105.
- 214- J. P. Larpent, M. Larpent-Gourgand (1985). Eléments de Microbiologie. Ed Hermann. ISBN 2 7056 5987 0.
- 215- F. Rouessac, A. Rouessac(1992). Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes -. Ed Masson.

Annexe

Annexe 1

Le phénol est un alcool aromatique avec une odeur douceâtre. À l'état pur, c'est un solide à température ambiante mais il reste le plus souvent liquide en solutions, ses caractéristiques physiques et chimiques sont [14]:

Synonymes : hydroxybenzène, acide carbolique

Formule chimique : C_6H_5OH

Numéro CAS: 108-95-2

Numéro UN: 1671

Numéro CE: 604-001-00-2

Numéro EINECS: 203-632-7

Code NFPA: 3-2-0 [1]

Masse moléculaire: 94

Point d'ébullition: 182°C

Point de fusion 41°C

Masse spécifique à 50°C: 1050 kg/m³

Densité des vapeurs (air = 1): 3,24

Coefficient de dilatation thermique volumique à 50°C : 0,00088 mL/g °K

Pression de vapeur: à 20°C: 0,2 mbar

à 58°C: 5 mbar

à 69°C: 10 mbar

Point d'éclair 79°C

Limites d'explosion dans l'air 1,3 – 9,5 vol %

Température d'auto inflammation dans l'air sous 1atm : 715 °C

Le phénol est facilement soluble dans la plupart des solvants organiques comme les hydrocarbures aromatiques, les alcools, les cétones, les éthers, les acides et les hydrocarbures halogénés.

Solutions aqueuses de phénol [14]:

- Le phénol est partiellement soluble dans l'eau jusqu'à une température de 68°C. Au-delà de cette température, il est entièrement soluble dans l'eau.
- La présence d'eau augmente également le point d'éclair. Pour des solutions aqueuses de phénol contenant de 1 à 4% d'eau, le point d'éclair se situe aux alentours des 81°C, alors que l'on peut considérer qu'il se situe au-dessus des 100°C pour des concentrations supérieures à 4,5 %.

Annexe 2

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste de l'homme pathogène ubiquitaire, fait partie de la famille des Pseudomonaceae, dont les caractéristiques sont [39,196]:

- Bacille court à gram négatif mesurant 0,5 à 0,8 µm
- Aérobie stricte (possédant une oxydase)

- Résistance à beaucoup d'antibiotique
- Très mobile grâce à des flagelle polaire (ciliature monotriche)
- Elle se développe à un pH optimal de 6,5 à 7
- Température de développement optimale variant de 10 à 40 °C.
- La structure du LPS (lipopolysaccharide) de cette membrane est également très hétérogène, non sporulée.
- Une odeur caractéristique de fleur de seringas s'exhale des cultures.
- Résiste mal à la dessiccation.

Caractères biochimiques [214]

Donnant une réponse négative aux tests : Nitrate réductase, citrate de Simmons , hydrolysant la gélatine (gélatinase très active), ADH (Arginine-deshydrogénase), catalase.

Donnant une réponse négative aux tests : LDC(Lysine-décarboxylase), ODC(Ornithine-décarboxylase), TDA(tryptophane-désaminase), indole, uréase, production d'hydrogène sulfuré H₂S, hydrolyse de l'amidon, hydrolyse de l'esculine et lécithinase, ONPG - (orthonitrophényl-galactose), urée et oxydase.

Tableau 1.1 : Facteurs de diagnostic de *Pseudomonas aeruginosa* [39]

Colonies bleu+vert dans l'agar chaud	Fluorescence sous une lampe UV	Arome fruitée
Reflète métallique des colonies	Pyocyanine (pigment bleu) Non fluorescent	Polyverdine (pigment vert) Fluorescent
Oxydase (+)	Lactose (-)	

Annexe 3

Préparation du bouillon nutritif GN (Gélose Nutritive) pour 1 L:

Extrait de viande 1,0g Extrait de levure 2,0g Peptone 5,0g Chlorure de sodium 5,0g Agar 15,0g Autoclaver pendant 20mn.	}	Dans une fiole d'un litre mélanger les sels avec d'eau distillée et ajuster à l'eau distillée au trait de jauge. Le pH est ajusté à 7
---	---	---

Annexe : 4

Préparation de BN (Bouillon Nutritif) pour 1L :

8.6 g Peptone de viande 6.4 g NaCl	}	Dans une fiole d'un litre mélanger les sels avec d'eau distillée et ajuster à l'eau distillée au trait de jauge
---------------------------------------	---	---

autoclaver pendant 20mn.

Annexe : 5**Préparation du milieu de culture minéral pour 1L :**

1.5 g KH_2PO_4	}	Mélanger dans une fiole d'un litre l'eau distillée bien mélanger
0.5 g K_2HPO_4		
0.5 g NaCl		
0.5 g MgSO_4		
3 g NH_4NO_3		

Ajuster le pH à 7 avec une solution 1N de NaOH

On autoclave 20mn à une température de 121.1°C.

On mélange dans un peu d'eau distillée stérile :

0.02 g CaCl_2	}	bien mélanger pour dissoudre les sels et les ajouter la solution par filtration stérilisante grâce à un filtre de 0.2 μm de pore.
0.02 g FeSO_4		
Selon la concentration voulu de Phénol		

Annexe : 6**Pour le dosage du phénol on utilise les réactifs suivant :****1. solution tampon pour 1L :**

34 g NH_4Cl (MERCK)	}	Bien mélanger dans un peu d'eau distillée jusqu'à ce que les sels fondent puis ajouter 10 ml de NH_3 (MERCK) pour avoir un pH = 9.5 et ajuster au trait de jauge
200 g tartre double		

2. solution de 4-amino-antipyrine

20 g 4-amino-antipyrine (ALDRICH) dans 1L

3. solution de Ferricyanure de potassium

20 g Ferricyanure de potassium (PROLABO) dans 1L

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

Annexe : 7**Tableau 7.1 : Le matériel utilisé est le suivant**

Matériel	Marque
Étuve	MEMMERT UE -400
Autoclave	WEBECO-GMPH BAD SCHWARTAU
Spectromètre UV/Visible	SHIMADZU UV MINI-1240
Centrifugeuse	MIKRO 22R HETTICH
pH mètre	HANNE INSTRUMENTS 211
Plaque chauffante muni d'un système d'agitation	BIBBY STUART
Balance de précision	DENVER INSTRUMENT
Microscope	ZEISS AXIOSTAR PLUS
Microfiltre 0,2 µm	MILLEX-HA
Bec bunsen	-

Annexe 8 :**Alginate de Sodium Fluka BioChemika 71238 :**

- Extrait d'algue brune, *Laminaria hyperborea* blades.
- Sel hygroscopique,
- perte de poids au séchage 15%
- Cendre < 30%
- pH = (10mg/mL H₂O) 6-7,5
- Produit indiqué pour l'immobilisation de microorganisme et enzyme
- Moyenne viscosité

Annexe 9 :**Alginate de Sodium Sigma A-7128 :**

- Extrait d'algue brune *Macrocystis pyrifera* (Kelp)
- Haute viscosité
- Viscosité d'une solution de 2 % à (25⁰C) est de 14,000 Cps

Annexe 10 :**Préparation du milieu de culture minéral modifié pour 1L :**

0,035g KH₂PO₄
 0,05g MgSO₄
 0,3g (NH₄)₂SO₄.7H₂O

} Mélanger dans une fiole d'un litre l'eau distillée bien mélanger

Ajuster le pH à 7 avec une solution 1N de NaOH

On autoclave 20mn à une température de 121.1°C.

On mélange dans un peu d'eau distillée stérile :

0.02 g CaCl₂
 0.02 g FeSO₄
 Selon la concentration voulu de Phénol

} bien mélanger pour dissoudre les sels et les ajouter la solution par filtration stérilisante grâce à un filtre de 0.2 µm de pore.

Annexe : 11**Courbes d'étalonnage de la croissance bactérienne**

La mesure de la densité optique est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 600 nm (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus faible). Dans des conditions techniques précises, l'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire. La turbidité étant inversement proportionnelle à la surface de la particule, pour que la turbidité soit une mesure précise de la masse bactérienne, il faut que la surface cellulaire moyenne reste constante au cours de la mesure. Cette situation ne se produit qu'au cours de la phase active de croissance et toute mesure effectuée sur des cellules au repos est erronée. La mesure de la densité optique a une sensibilité modérée (il faut au moins 10⁷ bactéries par mL pour pouvoir mesurer une densité optique), elle est inutilisable avec des milieux très colorés et elle est incapable de différencier les cellules vivantes des cellules mortes [143,207].

La courbe d'étalonnage est réalisée comme suite :

A partir d'une culture en batch dans un milieu minéral contenant la bactérie, on prélève 200 mL de milieu que l'on centrifuge pendant 30mn à 6000 tr/mn, on récupère le culot que l'on lave deux fois à l'eau distillée stérilise, et on centrifuge à chaque fois. Puis on remet le culot en suspension dans 60 mL d'eau distillée, alors on pèse 50 ml du culot en suspension pour déterminer le poids en biomasse fraîche, puis on sèche dans une étuve à 105⁰C jusqu'à poids constant (m-m₀), durant 18 à 24 heures, pour déterminer le poids en biomasse en matière sèche.

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

Prendre 10mL du culot en suspension, et à l'aide d'un spectromètre UV-Visible on détermine la densité optique de différentes dilutions de la suspension initiale (1,1/2, 1/4, 1/8, 1/16...) à 600nm.

Le trace du graphe absorbance (DO) en fonction de la concentration cellulaire en cellules sèche nous donne les courbes d'étalonnage suivantes :

1) La bactérie autochtone SB6

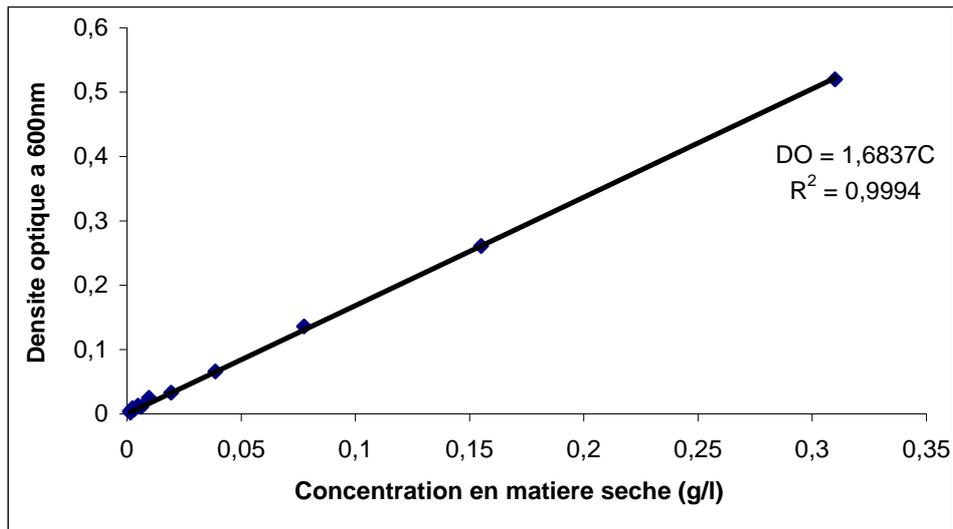


Figure 11.1 : Droite d'étalonnage SB6 : Absorbance = f (concentration de cellules)

$C = DO / \text{Pente de la courbe d'étalonnage} \cdot 1000$ Tell que la pente = $1,68 \text{ L.g}^{-1}$

$$C = \frac{DO}{1,68} \cdot 1000$$

2) La bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

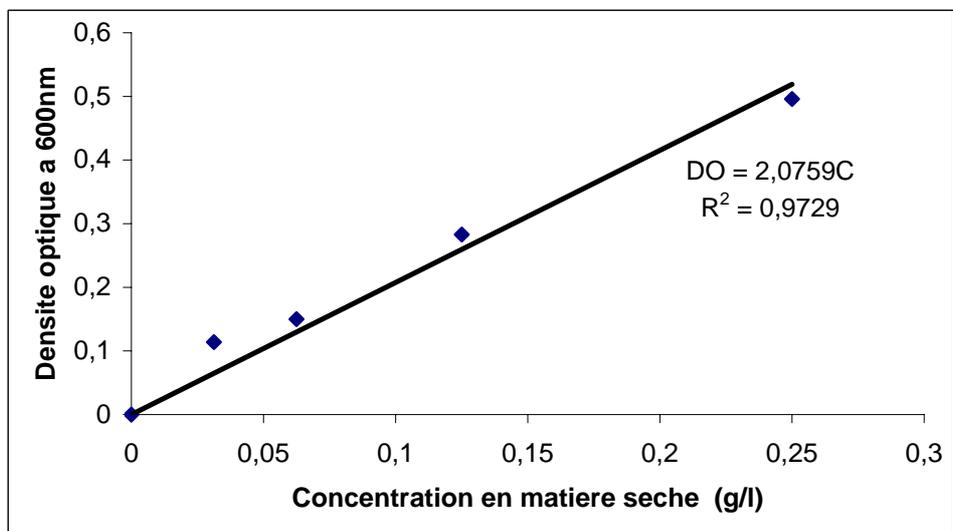


Figure 11.2 : Droite d'étalonnage *Pseudomonas aeruginosa* : Absorbance = f (concentration de cellules)

$C = DO / \text{Pente de la courbe d'étalonnage} \cdot 1000$ Tell que la pente = $2,07 \text{ L.g}^{-1}$

$$C = \frac{DO}{2,07} \cdot 1000$$

Annexe : 12**Courbes d'étalonnage du phénol**

On dispose d'une solution étalon de phénol à 1 g.L^{-1} . Diluer 200 fois cette solution, soit 5 mL dans une fiole jaugée de 1000 mL.

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

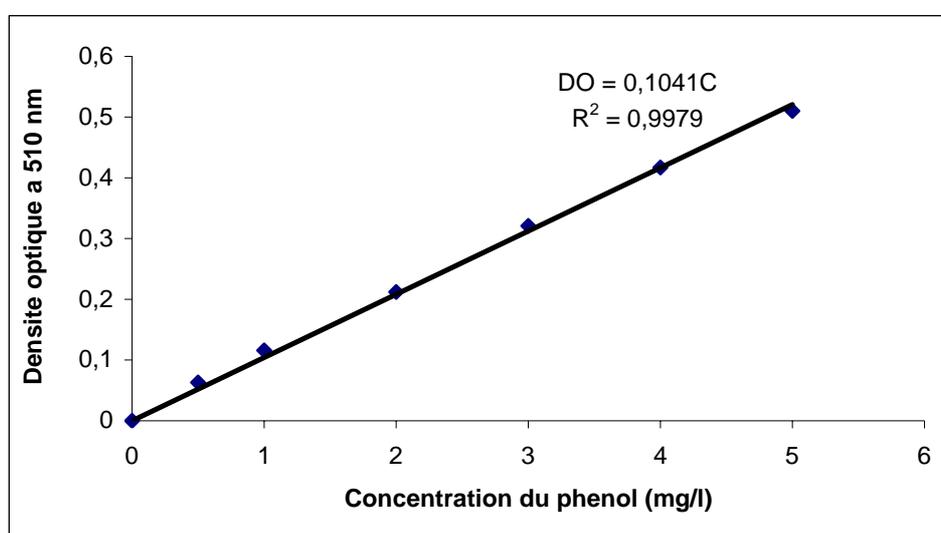


Figure 12.1 : Droite d'étalonnage : Absorbance = f (concentration du phénol)

$C = DO \cdot 100 / \text{Pente de la courbe d'étalonnage} \cdot V_{\text{prélevé}}$ Tell que la pente = $0,104 \text{ L.mg}^{-1}$.

$$C = \frac{DO}{V_{\text{prélevé}} \cdot 0,104} \cdot 100$$

Solution inconnue :

- 10 ml du milieu sont prélevés et centrifuges pendant 30mn à 6000tr/mn;
- 1 ml du surnageant est prélevé, compléter à 100 mL avec de l'eau distillée;
- placer en bécher de 125 mL et ajouter 5 mL de tampon pH = 9.5;
- ajouter 1.0 mL de la solution de 4-amino antipyrine, agiter immédiatement ;
- ajouter 2.0 mL de solution de ferricyanure de potassium, agiter;
- laisser la coloration se développer à température ambiante pendant 5 min, lire la densité optique à 510 nm.

Annexe : 13**Le matériel chromatographique utilisé est constitué par :**

- Une pompe Jasco PU-980 (intelligent hplc pump).
- Un dégazeur waters IN-LINE degasser.
- Un injecteur Rhéodyne 7725 muni d'une boucle de 20 μ L.
- Un détecteur Waters 2487 (Dual absorbance detector) couplé à un ordinateur Digital PC muni d'un logiciel spécialisé de référence MILLENIUM 32;

Principe [215] :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Le schéma suivant représente une installation de base en CLHP.

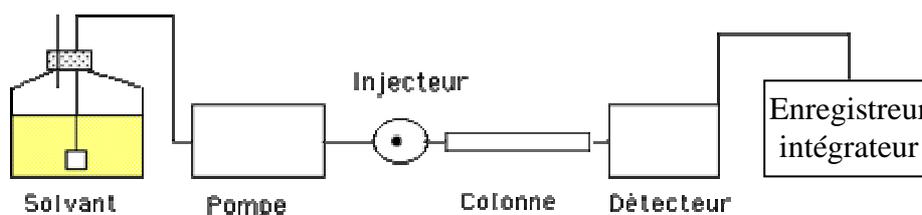
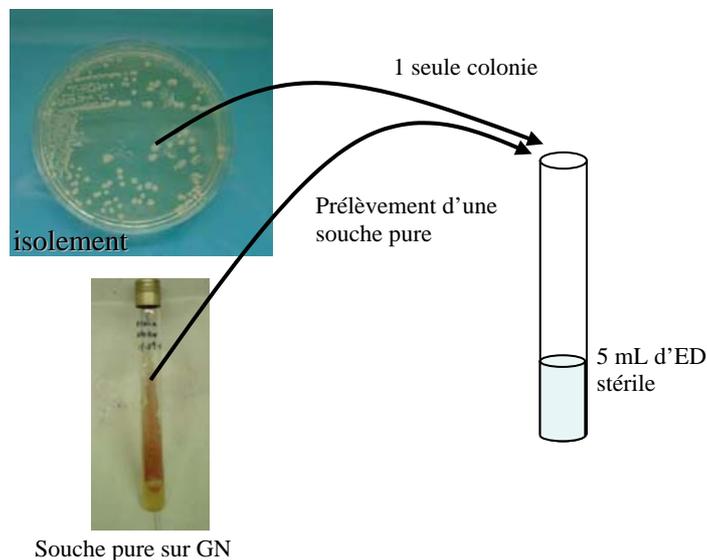


Figure 13.1 : Schéma d'une installation de base en CLHP[215]

Annexe : 14

❖ Préparation de la Galerie biochimique miniaturisée : API 20 E

1- Préparation de l'inoculum



2- Ensemencement de la galerie API 20 E

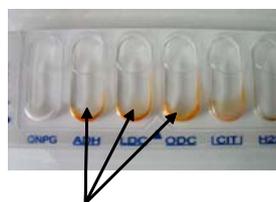
Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles



Pour certains caractères:



Remplir de suspension le tube et la cupule
CIT, VP, GEL



Remplir le tube de suspension et recouvrir d'huile de paraffine
ADH, LDC, ODC, H₂S, URE

Figure 14.1 : Illustration du protocole de réalisation de galerie biochimique API20E

Le remplissage des microtubes a été effectué en évitant la formation de bulles d'air qui empêcheraient le contact entre bactéries à identifier et le réactif ou substrat à tester.

Les cupules ont été remplies en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe.

Après incubation à 30°C pendant 16 à 24 heures, les résultats, interprétés en référence au tableau de lecture.

L'addition des chiffres associés aux réactions positives et lus sur la fiche détermine un profil métabolique correspondant à un profil numérique. Ce dernier permet, soit par la consultation du Catalogue Analytique.

api® 20 E

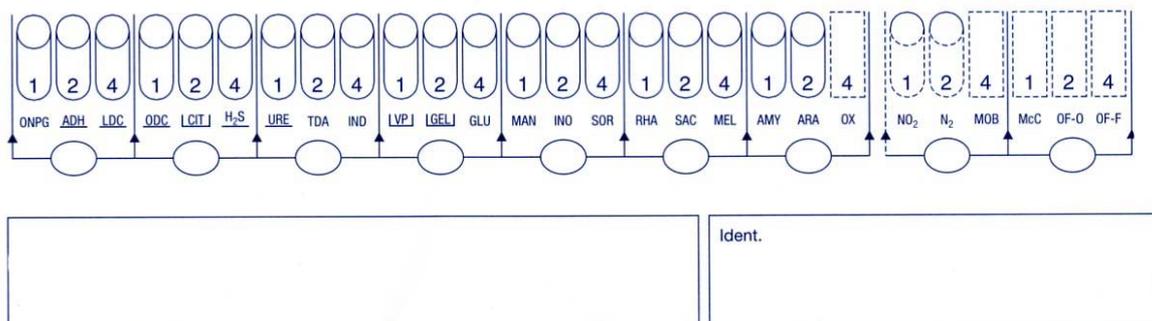


Figure 14.2 : Fiche d'identification

Test de l'oxydase

Les colonies à tester qui sont en suspects sont prélevées avec une anse stérile et déposées sur un petit disque oxydase (filtre imprégné de la solution oxydase). Les bactéries positives pour l'enzyme phénylène diamine oxydase prennent une rapide coloration rose au contact du réactif.

Test de la catalase

Une goutte d'eau oxygénée à 3 %, prélevée à l'aide d'une pipette pasteur est déposée sur une lame de microscope optique. Une partie de la colonie à tester est alors déposée sur la goutte d' H_2O_2 , à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. La formation de bulle engendrée par la production d'oxygène (O_2), due à l'activité de la catalase, indique une réaction positive.

❖ Préparation de la mini Galerie biochimique:

Ensemencer 1 tube de TSI : - à l'aide de stries serrées sur la pente,
- suivies d'une piqûre centrale,
- 37°C, 18 à 24h et lire le résultat.

Milieu Mannitol – Mobilité : Ensemencer par piqûre centrale, incubé à 37°C, 24h et lire le résultat.

Citrate de Simmons : Ensemencer le milieu gélosé de Citrate de Simmons de coloration verdâtre, par une strie sur la partie inférieure, la partie supérieure servira de témoin. Incuber 37°C, 24h et lire le résultat.

Milieu Urée Indole : Ensemencer le milieu Urée-Indole à l'aide d'une colonie puis incuber à 37°C, 24h et lire le résultat. Ensuite quelque soit le résultat de l'Urée, répartir le tube en deux parties :

- Une partie dans la quelle on ajoute 2 gouttes de Kowacs, servira à la recherche de l'indole
- L'autre partie dans la quelle on ajoute 2 gouttes TDA, servira à la recherche de la TDA.

Acides Aminés : LDC, ODC et ADH : Faire une suspension bactérienne en eau physiologique. Ensemencer les tubes suivants à l'aide de 3 à 4 gouttes :

- 1 tube contenant la LDC ou Lysine Décarboxylase,
- 1 tube contenant la ODC ou Ornithine Décarboxylase
- 1 tube contenant l'ADH ou Arginine Décarboxylase

Ajouter une couche d'huile de vaseline, puis incuber à 37°C, 24h et lire le résultat.

Annexe : 15

Pour effectuer la courbe d'étalonnage du phénol à 270 nm, nous avons pris une solution mère du phénol de 1 g.L⁻¹, que l'on a dilué plusieurs fois à chaque fois on lit la densité optique à 270nm, et ont a obtenu la courbe d'étalonnage suivante.

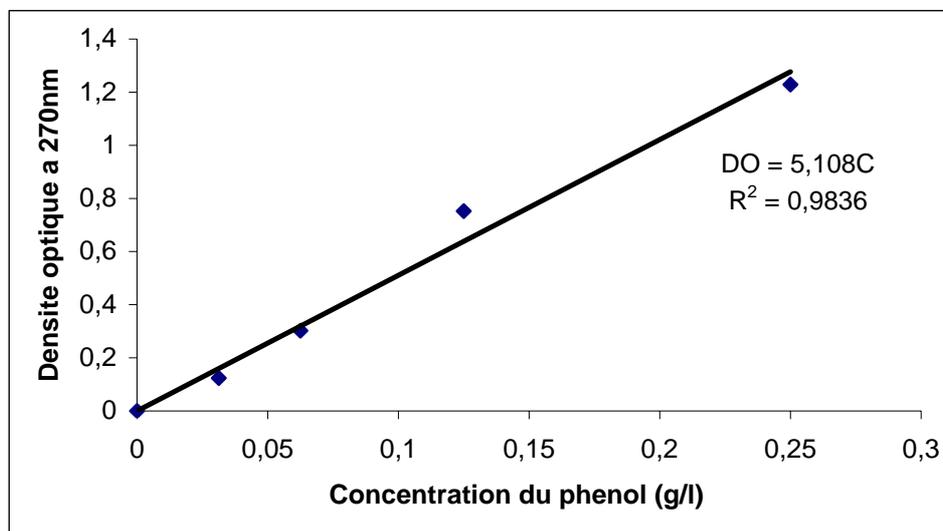


Figure 15.1 : Droite d'étalonnage : Absorbance_{270nm} = f (concentration du phénol)

$C = DO \cdot 1000 / \text{Pente de la courbe d'étalonnage}$ Tell que la pente = 5,108 L.g⁻¹.

$$C = \frac{DO}{5,108} \cdot 1000$$

ملخص :

محتوى هذا البحث يتمثل في إزالة الفينول بطريقة بيولوجية و ذلك بتثبيت بكتيريا محلية بالإحتواء على دعامة من جينات الكالسيوم ، تم تحديد الشروط التجريبية الملائمة وذلك بتغيير مختلف الشروط كتأقلم البكتيريا قبل التثبيت على الفينول، نوع وتركيز جينات الصوديوم، تركيز كلوريدات الكالسيوم ، كمية البكتيريا المثبتة، الوقت المستغرق لتكوين الحبيبات البلورية و حجمها، وذلك لتحسين حركية الإزالة ، وقد تم كذلك تغيير تركيز كمية الفينول في المحتوى لملاحظة التأثيرات التي تتولد منه. مقارنة بين البكتيريا الحرة و المثبتة و مقارنة أخرى ما بين هذه البكتيريا و بسودوموناس/أيروجينوزا/ATCC27853 عند الشروط الملائمة قد أقيمت و تحسينات أخرى خاصة بالشروط التجريبية لإقامة التثبيت وضعت للبكتيريا بسودوموناس أيروجينوزا مع تقديم فحوصات بالمجهر الضوئي للجسم (بلورات/بكتيريا)، نتائج هذه التجارب أثبتت أهمية هذه التقنية في إزالة الفينول، و أن أي تغيير في الشروط التجريبية لإقامة التثبيت بالإحتواء أو في البكتيريا تؤثر على قدرات البلورات في الإزالة.

مفاتيح : الفينول ,جينات الكالسيوم, إزالة بطريقة بيولوجية, التثبيت بالإحتواء

Résume

Le présent travail consiste à étudier la cinétique de biodégradation du phénol dans un réacteur batch par des bactéries autochtones immobilisées par inclusion dans un support sphérique d'alginate de calcium. Les conditions d'immobilisation comme l'adaptation préalable des cellules au phénol, le type d'alginate de sodium et sa concentration, la concentration de chlorure de calcium, la biomasse initiale immobilisées, le temps de durcissement ainsi que le diamètre des billes ont été étudiés en vue d'améliorer la cinétique de biodégradation du phénol. De même que l'influence de la concentration initiale en phénol dans le milieu a été étudiée. Une comparaison entre les cellules libres et immobilisées, entre les cellules autochtones et *Pseudomonas aeruginosa* a été faite. Les résultats montrent que cette technique est très intéressante concernant la biodégradation du phénol, et que les conditions de réalisation des billes ainsi que les caractéristiques du milieu ont une influence considérable sur la biodégradation du phénol.

Mots clefs : phénol, biodégradation, immobilisation, Alginate de calcium

Abstract

The present work consists to investigate the phenol biodegradation in a batch reactor by bacteria indigenous, immobilized by inclusion in a spherical support of calcium alginate. The conditions of immobilization such as, the adaptation cells, the type of sodium alginate and its concentration, the concentration of calcium chloride, the initial biomass immobilized, the hardening time and the bead diameter were studied with a view to improving the kinetics of phenol biodegradation. As the effect of the initial phenol concentration was studied. A comparison between the free and immobilized cells, the indigenous cells and *Pseudomonas aeruginosa* has been made. The results show that this technique is very interesting on the biodegradation of phenol, and that the conditions for achieving the beads as well as environmental characteristics have considerable influence on the biodegradation of phenol.

Keywords : phenol, biodegradation, immobilization, Calcium alginate.