

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



**ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE**  
**Département de Génie de l'Environnement**  
**Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

**Présenté par :**

**LAZLI WASSILA**

**Pour l'obtention du diplôme**  
**d'Ingénieur en Génie de l'Environnement**

**Thème :**

***Etude comparative des méthodes d'analyse de la  
biodégradation du phénol par Pseudomonas aeruginosa***

**Soutenu le 23 juin 2008 devant le jury composé de :**

<b>Présidente :</b>	M <sup>me</sup> S. ZEBOU DJ	Maître de conférences	ENP
<b>Promotrice :</b>	M <sup>me</sup> A. HELLAL	Professeur	ENP
<b>Examineur :</b>	M <sup>me</sup> F. ZERROUK	Chargée de cours	INA
	M <sup>r</sup> A. NAMANE	Maître de conférences	ENP

**ENP, Avenue Hassan Badi, El-Harrach, Alger**

# *Dédicaces*

*À mes chers parents sans qui je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui ;*

*Je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous faites pour moi.*

*À mon très cher grand père ;*

*Ta présence parmi nous illumine nos jours. Que DIEU te protège.*

*À mon mari Djaafar ;*

*Ta bienveillance, ton soutien et ta présence à mes cotés me rendent plus confiante et plus épanouie.*

*À mes adorables frères : Abdelghani, Youcef, Hassan et Amine.*

*À ma cousine Nassiba*

*À mon amie Imene*

*À tous ceux qui me sont chers.*

# *Remerciements*

Ce travail a été réalisé au laboratoire des sciences et techniques de l'environnement du département de Génie de l'environnement de L'ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUES d'Alger.

Je tiens à exprimer tout d'abord ma très vive reconnaissance envers ma promotrice madame A.HELLAL, professeur à l'ENP, pour ses conseils, son aide, sa générosité et sa disponibilité tout au long de ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux aux membres du jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepté d'évaluer mon travail :

À M<sup>me</sup> S. ZEBOUJ, maître de conférences à l'ENP, pour avoir accepté de présider le jury ;  
À M<sup>me</sup> F. ZERROUK, chargée de cours à l'INA et à Mr A.NAMANE, maître de conférences à l'ENP, pour avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie aussi tous les membres de mon laboratoire pour leurs conseils, leur soutien et la chaleur familiale avec laquelle ils m'ont entouré, en particulier Oumessaad, Nacera, Dalila et Assira.

Je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué à ce travail, et en particulier OUMESSAAD ALI pour sa précieuse aide.

Je remercie également mes camarades : Hassiba, Hamza, Houcine, Kahina, Karim, Raouf, Seif, Thanina et Yassine pour tous les bons moments qu'on a partagé ces trois dernières années.

Enfin, je remercie toute ma famille qui m'a toujours soutenue, encouragée, aidée, guidée et aimée.

***Merci***

## Liste des abréviations

- DBO : Demande biochimique en oxygène (mg/l).
- DBO<sub>5</sub> : Demande biochimique en oxygène au bout de 5 jours (mg/l).
- DCO : Demande chimique en oxygène (mg/l).
- DTO : Demande théorique en oxygène (mg/l).
- HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.
- K<sub>s</sub> : Concentration de la demi-saturation (mg/l).
- K<sub>i</sub> : Constante d'inhibition (mg/l).
- MO : Matière organique (mg/l).
- μ : Taux de croissance (h<sup>-1</sup>).
- μ<sub>max</sub> : Taux de croissance exponentielle (h<sup>-1</sup>).
- n : Nombre de divisions.
- ps : Poids sec (mg/l)
- S : Concentration en substrat principal (mg/l).
- t : Temps de dégradation (h).
- tg ; Temps de génération (h).
- TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxine.
- WGK : Wassergefährdungsklassen.
- X : Concentration en biomasse (mg/l).
- X<sub>0</sub> : Concentration en biomasse au temps zéro (mg/l).

## Liste des figures

Figure	Page
<b>Figure I-1</b> : Structure du phénol	3
<b>Figure I-2</b> : Mécanisme de la biodégradation aérobie des phénols	9
<b>Figure I-3</b> : Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide adapté non renouvelé	11
<b>Figure I-4</b> : Profile d'un <i>Pseudomonas</i> : Gram <sup>-</sup> , mobile par flagelles polaires	14
<b>Figure I-5</b> : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (coloration de Gram)	15
<b>Figure I-6</b> : Courbes types obtenues dans des tests de traitabilité	20
<b>Figure II-1</b> : la condensation du phénol avec la 4-amino antipyrine	24
<b>Figure II-2</b> : respiromètre Oxitop (WTW)	25
<b>Figure II-3</b> : Dispositif expérimental	28
<b>Figure III-1</b> : Evolution de la dégradation du phénol, de la cinétique bactérienne et du pH dans l'eau distillée	30
<b>Figure III-2</b> : influence de la taille de l'inoculum sur la dégradation du phénol	31
<b>Figure III-3</b> : Analyse de la biodégradation par différentes méthodes	33
<b>Figure III-4</b> : La DBO enregistrée durant le test de traitabilité	34
<b>Figure III-5</b> : Analyse d'une biodégradation totale par différentes méthodes	36
<b>Figure III-6</b> : Corrélation entre la DCO et la concentration en phénol résiduel	37
<b>Figure III-7</b> : Corrélation entre la DCO théorique et la DCO mesurée	38

# Sommaire

# Sommaire

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

## Chapitre I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I-1 Généralités sur le phénol

I-1-1 Définition du phénol .....	3
I-1-2 Caractérisation .....	3
I-1-3 Fabrication.....	5
I-1-4 Production et utilisations .....	5
I-1-5 Les rejets phénoliques et leur devenir dans l'environnement .....	6
I-1-5-1 Milieu aquatique .....	6
I-1-5-2 Atmosphère .....	6
I-1-5-3 Sols .....	6
I-1-5-4 Dégradation et produits de décomposition .....	7
I-1-6 Pathologie et toxicologie .....	7
I-1-6-1 Etude chez l'homme .....	7
I-1-6-2 Etude chez l'animal .....	8

### I-2 Biodégradation du phénol

I-2-1 Définition .....	8
I-2-2 Biodégradation du phénol .....	9
I-2-2-1 En aérobiose .....	9
I-2-2-2 En anaérobiose .....	9
I-2-3 Les principales bactéries pouvant dégrader le phénol .....	10

### **I-3 Croissance bactérienne en culture pure**

I-3-1 Représentation de la croissance .....	10
I-3-2 Paramètres de croissance .....	11
I- 3-2-1 Le temps de génération .....	11
I- 3-2-2 Le taux de croissance .....	11
I- 3-3 Modélisation des courbes de croissance .....	12
I-3-3-1 Le modèle de Monod .....	12
I-3-3-2 Le modèle de Haldane .....	13

### **I-4 Généralités sur le genre *Pseudomonas***

I-4-1 Caractères bactériologiques .....	13
I-4-2 Diagnostic bactériologique .....	14
I-4-3 Métabolisme des <i>Pseudomonas</i> . .....	14
I-4-4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
I-4-4-1 Caractères bactériologiques .....	15
I-4-4-2 Habitat et pouvoir pathogène .....	16
I-4-4-3 Diagnostic bactériologique .....	17
I-4-4-4 Sensibilité aux antibiotiques .....	17

### **I-5 Méthodes globales de mesure de la pollution**

I-5-1 Evaluation de la pollution .....	17
I-5-2 Mesure de la demande biochimique en oxygène : DBO .....	18
I-5-2-1 Principe .....	18
I-5-2-2 Méthodes de mesure le la DBO .....	18
I-5-2-2-1 Méthode des dilutions .....	18
I-5-2-2-2 Méthode manométriques .....	19
I-5-2-2-3 Méthode indirecte de CATROUX et MORFAUX .....	19
I-5-2-3 Etude du phénomène .....	19
I-5-2-4 Tests de "traitabilité" .....	20
I-5-3 Mesure de la demande chimique en oxygène : DCO .....	21
I-5-3-1 Principe .....	21
I-5-3-2 Méthodes de mesure le la DCO .....	21
I-5-3-3 Relation entre la DCO et la DBO .....	22



## Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II-1 Matériel .....	23
II-1-1 Matériel biologique .....	23
II-1-2 Milieu de culture .....	23
II-1-3 Produits et matériels utilisés .....	23
II-2 Méthodes d'analyse .....	23
II-2-1 Mesure de la croissance bactérienne .....	23
II-2-2 Dosage du phénol .....	24
II-2-3 Mesure de la DCO .....	24
II-2-4 Mesure de la DBO .....	25
II-2-5 Conduite de la culture en bioréacteur .....	25
II-2-6 Mode opératoire .....	26
II-2-7 Dispositif expérimental .....	28

## Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III-1 Influence de la nature du milieu et de la taille de l'inoculum sur la dégradation du phénol.....	29
III-1-1 Evolution de la dégradation du phénol dans l'eau distillée .....	29
III-1-2 Evolution de la dégradation du phénol dans le milieu minéral .....	30
III-2 Analyse de la biodégradation par différentes méthodes et comparaison .....	32
III-3 Test de traitabilité .....	34
III-4 Amélioration de la biodégradation .....	35
III-5 Etude de la corrélation entre DCO et dégradation du phénol .....	37
Conclusion générale .....	39

Références bibliographiques

Annexes

# Introduction générale

## Introduction générale

Tributaire de l'eau comme tous les organismes vivants, l'homme a fondé ses civilisations le long des fleuves et des littoraux afin de l'utiliser et de l'exploiter pour la consommation, la production d'énergie, le transport...

Apporter de l'eau à chaque foyer, mettre en place un système de distribution capable de couvrir tous les besoins en eau liés aux activités humaines, notamment industrielles et agricoles, est un pari audacieux. Car il s'agit d'aboutir à la distribution d'un produit standardisé, répondant à des normes précises, le qualificatif de "potable" étant réservé à des eaux dont la composition et les qualités sont telles qu'elles ne puissent en aucun cas porter atteinte à la santé des consommateurs.

Une telle ambition se heurte à une série de difficultés dont la plus importante est liée à la distribution variable de la ressource. De plus l'accroissement démographique et la demande croissante en eau, due au développement économique, compliquent le problème davantage. L'autre problème auquel se heurte maintenant la distribution d'eau potable est la dégradation de nos milieux aquatiques. En fait la pollution des eaux constitue un facteur primordial de la diminution de disponibilité de cette ressource naturelle irremplaçable. Elle est sans doute un des aspects les plus inquiétants de la crise globale de l'environnement dont est responsable la civilisation contemporaine. Cette pollution des eaux est causée principalement par les activités industrielles de l'homme. En effet L'industrie est responsable de la quasi totalité des rejets toxiques : métaux lourds et polluants organiques persistants.

La responsabilité de tous, en tant qu'êtres humains, est de savoir répondre aux besoins actuels sans limiter la capacité des générations futures à satisfaire leurs propres besoins. En d'autres termes, préserver les différentes ressources naturelles, en priorité l'eau.

Le traitement des eaux usées, qu'elles soient d'origine domestique ou industrielle, s'impose afin de protéger la vie aquatique, et de permettre l'usage de l'eau en aval. Ceci éviterait l'usage abusif de cette ressource si précieuse.

Les traitements biologiques des eaux usées s'avèrent être les plus efficaces [1], car contrairement aux traitements physico-chimiques qui sont onéreux et qui ne font que déplacer

la pollution en la concentrant, les traitements biologiques quant à eux, permettent une minéralisation totale des matières organiques se trouvant dans ces eaux usées.

Dans les effluents industriels, parmi les rejets organiques les plus toxiques et les plus fréquents, on trouve les phénols. Ces composés aromatiques utilisés dans diverses industries, ont un effet préjudiciable sur la vie aquatique, les plantes et sur l'environnement en général [2].

On estime que les eaux usées contenant du phénol de l'ordre de 5-500 mg.L<sup>-1</sup> sont jugées appropriées pour le traitement par des processus biologiques [3]. Beaucoup de travaux ont fait l'objet d'étude de la biodégradation du phénol : le traitement aérobie et la digestion anaérobie, la biosorption ...etc.

Dans le présent travail nous nous intéresserons à l'évolution de la biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa*, en utilisant plusieurs méthodes d'analyse dans le but d'établir une éventuelle corrélation entre les différentes techniques et de souligner l'efficacité des unes par rapports aux autres.

# Chapitre I:

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## Chapitre I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I-1 Généralités sur le phénol

#### I-1-1 Définition du phénol

Le phénol est un composé organique aromatique de formule  $C_6H_5OH$ , appelé aussi hydroxybenzène, acide phénique, ou encore acide carbolique. Il est composé d'un cycle aromatique benzénique et d'une fonction hydroxyle. C'est la plus simple molécule de la famille des phénols [4].

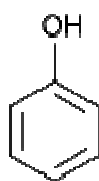


Figure I-1 Structure du phénol

#### I-1-2 Caractérisation

Les cristaux du phénol purifié sont incolores et en forme d'aiguilles. Ils fondent à  $43\text{ }^{\circ}\text{C}$  et bouillent à  $182\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Stockés, les cristaux deviennent roses et finalement brun-rouge. A température ambiante, le phénol est soluble dans l'eau et très soluble dans les solvants organiques [5].

**Note:** Dans la littérature, le point de fusion du phénol est cité différemment. Il est compris entre  $40 - 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Le tableau I-1 résume les principales propriétés physiques et chimiques du phénol

Tableau I-1 : principales propriétés physico-chimiques du phénol

Paramètre	Valeur	Etendue	Référence
<b>Facteur de conversion</b> (dans l'air à 20 °C)	1 ppm = 3,91 mg/m <sup>3</sup> 1 mg/m <sup>3</sup> = 0,26 ppm		[6]
<b>Masse molaire</b> (g/mol)	94,11 <sup>(1)</sup>	94,11 - 94,144	[6]
<b>Densité/eau</b>	1.071		[7]
<b>Point de fusion (°C)</b>	41	40 - 43	[7]
<b>Point d'ébullition</b> (°C)	181,8 <sup>(1)</sup>	181,75 - 182	[6]
<b>Pression de vapeur</b> (Pa)	28,7 à 20 °C <sup>(2)</sup> 54,4 à 25 °C <sup>(2)</sup>	20 - 47,6 46,8 - 69,9	[6]
<b>Solubilité dans l'eau</b> (mg/L)	83 500 à 20 °C <sup>(2)</sup> 85 700 à 25 °C <sup>(2)</sup>	82 000 - 84 000 70 000 - 93 000	[6]
<b>Température d'auto-inflammation (°C)</b>	715 °C		[7]
<b>Point d'éclair (°C)</b>	79 °C		[7]
<b>Constante de Henry (Pa.m<sup>3</sup>/mol)</b>	4,56.10 <sup>-2</sup> à 20 °C 4,02.10 <sup>-2</sup> à 25 °C		[6]
<b>Coefficient de diffusion dans l'air</b> (cm <sup>2</sup> /s)	8,2.10 <sup>-2</sup>		[6]
<b>Coefficient de diffusion dans l'eau</b> (cm <sup>2</sup> /s)	8,8.10 <sup>-6</sup> <sup>(2)</sup>	8,5.10 <sup>-6</sup> - 9,1.10 <sup>-6</sup>	[6]

(1) Valeur la plus fréquemment citée.

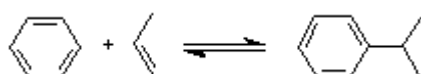
(2) Moyenne arithmétique de plusieurs valeurs.

### I-1-3 Fabrication

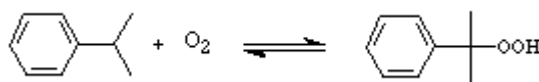
Le phénol est un composé d'une grande importance en chimie organique industrielle. Bien qu'il puisse être extrait des goudrons ou des eaux résiduelles des unités de craquage, le phénol est produit en majeure partie par synthèse et le procédé utilisant le cumène comme intermédiaire est utilisé à plus de 85 %. Il fût découvert en 1944 par Hock et Lang et il est exploité depuis les années 50 [8].

Le principe de la méthode de Hock : elle comprend trois phases

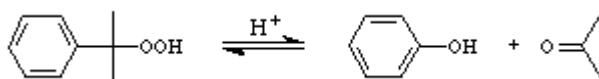
- Alkylation du benzène avec le propylène pour former de l'isopropylbenzène (cumène)



- Oxydation du cumène par l'oxygène de l'air donnant naissance à du tert-hydroperoxyde



- Séparation en phénol et acétone



Il existe une deuxième méthode, moins utilisée que la précédente, qui est la méthode "Dow" qui consiste à oxyder du toluène pour former de l'oxyde benzoïque puis à procéder à une décarboxylation oxydante permettant d'obtenir du phénol [6].

### I-4 Production et utilisations

En 2005, le phénol a été produit à hauteur de 8 800 000 T dans le monde dont 26 % aux USA. Le principal producteur est INEOS Phenol avec une capacité de production de 1 600 000 T [6].

Le phénol est principalement utilisé en synthèse organique. Il constitue la matière première dans la fabrication des résines phénoliques, du nylon, d'alkylphénols, de



chlorophénols, et autres substances chimiques, telles que l'acide adipique, la phénolphthaléine, l'acide picrique.

Il est également utilisé pour la désinfection, dans la fabrication de dissolvants pour peintures et vernis, dans la fabrication de laques, de peintures, de caoutchouc, d'adhésifs, de durcisseurs, de matériaux isolants et dans l'industrie pharmaceutique [6, 9].

### **I-1-5 Les rejets phénoliques et leur devenir dans l'environnement**

On s'attend à ce que la photo-oxydation dans l'air et la biodégradation dans l'eau et le sol soient les principaux facteurs de disparition du phénol.

#### **I-1-5-1 Milieu aquatique :**

Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer. Il se dissout lentement et, même dilué, continue de former des solutions toxiques. Au dessus de 68.4°C, il devient complètement miscible à l'eau. En raison de sa forte toxicité dans l'eau, le phénol figure dans la catégorie 2 de risque WGK (catégorie de risque de pollution de l'eau) en République fédérale d'Allemagne [6]. C'est-à-dire qu'il est classé comme polluant pour l'eau.

#### **I-1-5-2 Atmosphère:**

Dans l'atmosphère, le phénol existe surtout en phase gazeuse. En raison de sa courte durée de vie, qui varie en général en fonction des conditions atmosphériques, le phénol ne devrait pas franchir de grandes distances dans l'atmosphère. Il est susceptible d'en être éliminé par la photo-oxydation mettant en jeu des radicaux hydroxyle et nitrate, la photolyse et le dépôt humide et sec [9].

#### **I-1-5-3 Sols:**

Les propriétés physico-chimiques du sol qui influent sur le devenir et le comportement du phénol sont le pH, la capacité d'échange, la teneur en matière organique et la texture du sol. Le phénol peut participer à de nombreux processus entraînant son élimination, notamment la biodégradation, l'adsorption et la désorption, la volatilisation et l'oxydation. La dégradation microbienne aérobie ou anaérobie du phénol limite l'effet de son accumulation, cette accumulation est fonction de la présence de minéraux argileux (forte affinité avec l'oxyde d'aluminium) [9].

#### **I-1-5-4 Dégradation, produits de décomposition :**

La biodégradation des phénols naturels est en général très bonne, de sorte qu'une accumulation dans la flore ou la faune est peu probable [6]. Dans le sol, une condensation avec formation d'acide humique peut se produire. En revanche, la dégradabilité des phénols synthétiques est plus faible, car nombre d'entre eux ont une action bactéricide. Les métabolites des phénols peuvent également être très toxiques [9]: la combustion incomplète de 2,4,5-trichlorophénol peut donner naissance à la dioxine TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-para-dioxine). En règle générale, la dégradation biologique entraîne d'abord la formation de pyrocatéchine, de o-quinone et d'acide dicarboxylique, puis d'acide acétique et de CO<sub>2</sub>.

#### **I-1-6 Pathologie et toxicologie**

Les phénols de synthèse sont plus toxiques et moins dégradables que les phénols existant à l'état naturel. Plus ils contiennent d'atomes de chlore ou d'azote, plus leur toxicité est forte. Ainsi, le "pentachlorophénol" est le plus toxique des chlorophénols, et le trinitrophénol (acide picrique) le plus toxique des nitrophénols. Il convient donc de surveiller et de réglementer ces rejets de composés synthétiques [10].

Le phénol est un produit caustique dangereux, il peut pénétrer dans l'organisme par voie cutanée, par inhalation ou accidentellement par ingestion, il exerce à la fois une action locale sur la peau et les muqueuses et une action générale sur l'organisme [7].

##### **I-1-6-1 Etude chez l'homme**

Les intoxications aiguës professionnelles sont rares et interviennent essentiellement par voie cutanée, la faible volatilité du phénol limitant les risques d'inhalation de concentrations importantes. La gravité de l'intoxication cutanée est fonction du temps de contact, de l'étendue de la zone exposée, de la concentration de la solution et de la susceptibilité individuelle du sujet. Les symptômes apparaissent très rapidement (en 15 à 20 minutes) : maux de tête, faiblesse musculaire, étourdissement, trouble de la vision et de l'audition, respiration rapide et irrégulière, pouls faible, perte de conscience, la mort pourrait survenir par défaillance respiratoire (entre 30 minutes et quelques heures après le contact) ; en cas de rémission, on observe des atteintes rénale et hépatique.

L'inhalation donne en plus, des signes d'irritation respiratoire avec toux et dyspnée ; en cas d'ingestion, en plus de l'effet caustique sur le tube digestif, on observe des troubles

neurologiques, cardio-vasculaire, une cytolysse hépatique, une méthémoglobinémie avec hémolyse et une nécrose tubulaire rénale.

Les projections sur l'œil de phénol ou de solutions concentrées provoquant une irritation sévère qui peut aller jusqu'à la destruction de la cornée s'il n'y a pas de décontamination immédiate [7].

L'intoxication chronique se caractérise par des troubles digestifs, des troubles nerveux et des troubles cutanés. Dans les cas sévères, on note une atteinte hépatique et rénale [7].

### **I-1-6-2 Etude chez l'animal**

Le phénol est toxique pour les poissons à des concentrations très faibles de l'ordre de 5 à 25 mg/l [11,12]. L'ensemble des études de toxicité aiguë réalisée chez les différentes espèces de mammifères montre que la souris, le rat, le lapin et le chien ont des sensibilités assez comparables ; le chat en revanche est nettement plus sensible.

Quelle que soit la voie d'intoxication, les effets systémiques sont identiques et ils apparaissent rapidement, des convulsions sévères et une perte de conscience ; la fréquence cardiaque augmente puis baisse et devient irrégulière ; la tension artérielle, après une légère élévation, chute de façon importante. A l'autopsie, on met en évidence des lésions rénales. Localement le phénol exerce une action corrosive sur les tissus. C'est un irritant sévère pour la peau et pour les yeux.

En ce qui concerne l'intoxication chroniques [7], les études faites ont montré que les animaux exposés présentaient des difficultés respiratoires, des contractions musculaires et des convulsions, des paralysies, des phases dépressives et une perte de poids. A l'autopsie, il a été observé une nécrose étendue du myocarde, une pneumonie lobulaire aiguë, des lésions des vaisseaux, du foie et des reins.

## **I-2 Biodégradation du phénol**

### **I-2-1 Définition**

La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un composé organique en différents sous-produits, par l'action des microorganismes (bactéries et microbes). Ces composés sont convertis en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, Cl<sup>-</sup>..., mais aussi en produits organiques simples tels que les acides organiques [13,14].

### I-2-2 La biodégradation du phénol

Beaucoup de bactéries peuvent utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie. La dégradation du phénol a été observée aussi bien dans des conditions aérobies que dans celles assurant l'anaérobiose. Cependant, le procédé aérobie a été considéré le plus efficace avec sa facilité d'application. De plus, les méthodes de cultures anaérobies nécessitent une longue phase d'adaptation contrairement aux conditions aérobies [3].

#### I-2-2-1 En aérobiose

Les différentes études menées sur la biodégradation du phénol ont permis l'isolation de beaucoup de bactéries aérobies pouvant métaboliser ce composé et ont permis aussi de bien établir les voies de la dégradation aérobie du phénol [2]. La première étape consiste en l'oxygénation du phénol par une enzyme : l'hydroxylase pour former le catéchol.

Le mécanisme de la biodégradation du phénol est représenté dans la figure suivante :

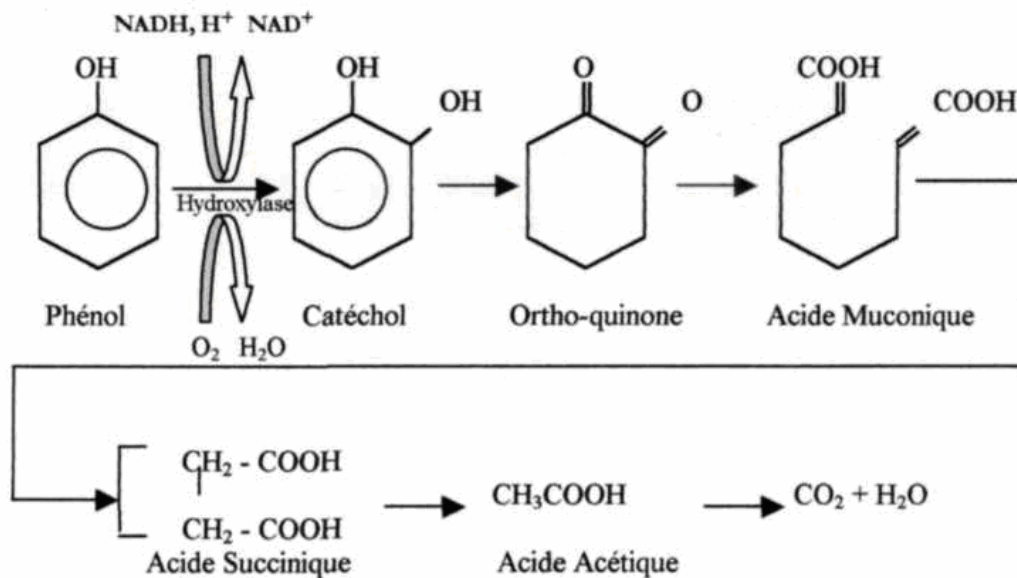


Figure I-2 Mécanisme de la biodégradation aérobie des phénols [27]

#### I-2-2-2 En anaérobiose

On a observé la croissance anaérobie sur le phénol pour diverses bactéries ; dans tous les cas étudiés, le phénol a semblé être carboxylé en 4-hydroxybenzoate et la croissance sur celui-ci dépendait de la présence de CO<sub>2</sub> [13].

### I-2-3 Les principales bactéries pouvant dégrader le phénol

La littérature rapporte qu'un grand nombre de microorganismes, essentiellement les bactéries aérobies, sont capables de dégrader le phénol grâce aux enzymes qu'elles peuvent sécréter pour métaboliser ce composé. Parmi les genres concernés on cite : les *Pseudomonas*, les *Vibrions*, les *Enterobacteries*, les *Alcaligenes*, les *Azotobacter*, les *Rhodococcus*, les *Phanerochaere* et les *Cryptococcus* [1].

### I-3 Croissance bactérienne en culture pure

#### I-3-1 Représentation de la croissance

Lorsque les conditions du milieu sont favorables (présence de nutriments, température et pH favorables, absence d'antiseptiques ou d'antibiotiques...), la croissance microbienne suit la courbe de la figure I-3 où on peut distinguer six phases [15,16,17] :

**1. phase de latence** : cette période sépare le moment de l'inoculation du moment où la croissance devient perceptible. C'est une période d'adaptation des microorganismes à leurs nouvelles conditions de vie.

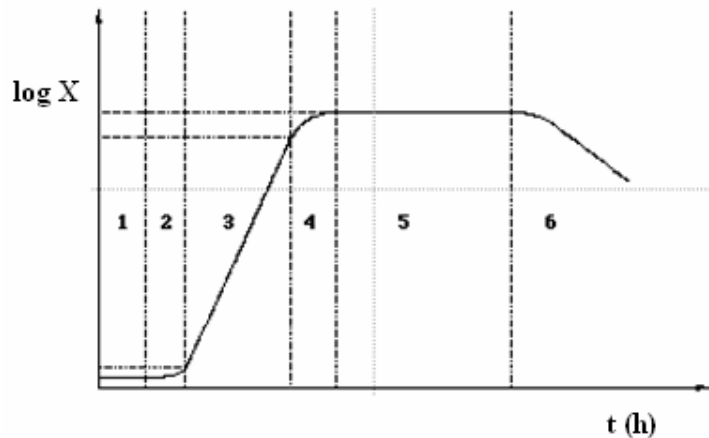
**2. phase d'accélération** phase de démarrage de la croissance avec augmentation de la vitesse de celle-ci.

**3. phase de croissance exponentielle** durant laquelle la vitesse de reproduction cellulaire est maximale ainsi que le taux de croissance.

**4. phase de ralentissement** : la vitesse de croissance diminue, il y a épuisement des nutriments du milieu de culture et accumulation des déchets.

**5. phase stationnaire** : il y a inactivation totale de la culture dont le nombre d'individus n'augmente plus, ceci est dû à un facteur limitant dans l'environnement.

**6. phase de déclin** : les ressources sont épuisées et le nombre de bactéries diminue, on assiste à une lyse cellulaire.



**Figure I-3** Courbe de croissance bactérienne en milieu liquide adapté non renouvelé (en abscisse figure le temps d'incubation et en ordonnée la valeur logarithmique du nombre de bactéries) [16].

### I-3-2 Paramètres de croissance

La croissance exponentielle peut être décrite par l'un des deux paramètres suivants : le temps de génération ( $t_g$ ) ou le taux de croissance exponentielle ( $\mu$ ).

#### I-3-2-1 Le temps de génération

Le temps de génération ( $t_g$ ) est le temps de doublement de la population, autrement dit, c'est l'intervalle de temps qui sépare deux divisions successives [17,18].

Si  $n$  : le nombre de divisions et  $t$  : le temps

Alors  $t_g = t / n$  ..... (I)

#### I-3-2-2 Le taux de croissance

Pendant la phase de croissance exponentielle, le logarithme de la concentration en biomasse ( $\ln X$ ) varie linéairement en fonction du temps (figure I-3).

Si l'on note  $X_0$  la concentration en biomasse au temps  $t_0$ , on aura :

$$\ln X - \ln X_0 = \mu (t - t_0) \text{ ..... (II)}$$

Où la constante  $\mu$  apparaît comme le taux de croissance exponentielle qu'on note  $\mu_{\max}$  ( $h^{-1}$ ).

Durant cette phase, l'accroissement du nombre des cellules suit une progression géométrique d'ordre 2 [17,18].

$$X = 2^n X_0$$

$$n = t / t_g = \mu t$$

$$X = 2^{\mu t} X_0$$

Le passage au logarithme donne

$$\ln X = \mu t \ln 2 + \ln X_0 \dots\dots\dots(III)$$

Ainsi le taux de croissance exponentielle  $\mu_{\max}$  peut être déduit à partir des courbes de croissance en traçant  $\ln X$  en fonction du temps. La pente de la droite étant égale à  $\mu \ln 2$ .

D'où  $\mu = \text{la pente} / \ln 2$ .

Si on reprend l'expression (II)

Et pour  $X = 2 X_0 \Rightarrow (t - t_0) = \text{tg}$

L'équation devient :

$$\ln (X/X_0) = \mu_{\max} \text{tg} \Rightarrow \ln 2 = \mu_{\max} \text{tg}$$

D'où  $\text{tg} = 0.69 / \mu_{\max}$

**I-3-3 Modélisation des courbes de croissance**

La croissance microbienne fait intervenir de nombreux facteurs qui exercent une influence directe sur le mécanisme de croissance et donc sur la cinétique.

Les premières recherches, ayant pour but la modélisation de la cinétique de croissance, ont considéré comme hypothèse de départ que le passage en phase de croissance ralentie était causé par l'épuisement du substrat principal. Donc la recherche de la fonction de dépendance  $\mu = f(S)$  a servi de point de départ à un certain nombre de démarches de modélisation [17].

La cinétique de croissance bactérienne est généralement modélisée par les deux modèles suivants :

**I-3-3-1 Le modèle de Monod**

C'est le modèle le plus ancien et le plus utilisé. Il permet de donner une bonne description de la plupart des fermentations en première approximation. Il s'agit d'un modèle empirique, dont l'expression est la suivante :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S}$$

Où  $K_S$  a la signification physique d'une concentration seuil au-dessous de laquelle le taux de croissance devient sensiblement dépendant de la concentration en substrat principal, c'est la concentration en substrat  $S$  correspondant à un taux de croissance demi-maximal ( $\mu = \mu_{\max}/2$ ).

$S$  étant la concentration du substrat ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) [17,2].

### III-3-3-2 Le modèle de Haldane

Le modèle de croissance de Haldane a été choisi en raison de sa simplicité mathématique et pour la considération du phénomène d'inhibition par excès de substrat. En effet, beaucoup de substances ont un effet inhibiteur sur la croissance des microorganismes si leur concentration dans le milieu est forte [2,3].

L'équation de cinétique de croissance de Haldane est donnée par l'expression suivante :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S + (S^2 / K_i)}$$

$K_i$  représente la constante d'inhibition.

L'équation de Haldane est souvent utilisée pour décrire la croissance cellulaire sur le phénol, car ce dernier devient un inhibiteur de la croissance si sa concentration dans le milieu est élevée [19].

## I-4 Généralités sur le genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* de la famille des *Pseudomonaceae* comprend plus d'une centaine d'espèces. Toutefois, certaines espèces sont des synonymes et au moins 11 espèces ne sont pas d'authentiques *Pseudomonas* [20].

### I-4-1 Caractères bactériologiques

Le genre *Pseudomonas* renferme des bacilles à Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1,5 à 5,0  $\mu\text{m}$  (ou plus) de longueur, non sporulé, très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires, aérobies, à métabolisme strictement respiratoire, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose), chimio-organotrophes, catalase positive, oxydase variable, non indologènes, ne produisant pas d'acétoïne et ne cultivant pas à un pH inférieur à 4,5.





**Figure I-4** Profile d'un *Pseudomonas*: Gram<sup>-</sup>, mobile par flagelles polaires [21].

Quelques espèces de *Pseudomonas* sont capables d'utiliser des sucres comme source de carbone et d'énergie en produisant de faibles quantités d'acides. Cette acidification résulte toujours d'un métabolisme oxydatif, elle est toujours faible et elle ne s'observe que lorsque les conditions d'oxygénation sont bonnes.

La plupart des *Pseudomonas* sont très ubiquistes et elles sont isolées de l'eau (eaux douces, eaux saumâtres, eaux de mer), du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. Les souches ubiquistes ont généralement une très large versatilité nutritionnelle et elles peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses.

En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier. De nombreuses souches sont psychrotrophes et elles peuvent altérer des denrées alimentaires, des réactifs biologiques, des solutés injectables et le sang ou les dérivés sanguins conservés au froid [20].

#### **I-4-2 Diagnostic bactériologique**

Les *Pseudomonas* isolés en médecine vétérinaire, n'ont pas d'exigences particulières et l'isolement peut être réalisé sur de nombreux milieux d'usage courant. Leur température optimale de croissance est inférieure à 37 °C et les boîtes devront être incubées à 30 °C. Le diagnostic présomptif du genre *Pseudomonas* doit être évoqué devant : des bacilles mobiles, à Gram négatif, aérobies, oxydase positive et non indologènes [18].

#### **I-4-3 Métabolisme des *Pseudomonas***

Les espèces du genre *Pseudomonas* utilisent plusieurs voies métaboliques ce qui leur permet d'assimiler un très grand nombre de substrat. Les principales voies sont :

- La voie d'Entner Doudouroff.
- La voie du  $\beta$ -cetoadipate.

Certaines bactéries suivant cette dernière voie sont utilisées dans la décontamination des sites pollués par des composés aromatiques complexes (comme le toluène et les hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP) [13].

Toutes les voies convergent vers le cycle de Krebs et permettent de fournir l'énergie nécessaire au développement des bactéries.

#### I-4-4 *Pseudomonas aeruginosa*

##### I-4-4-1 Caractères bactériologiques

Appelée aussi Bacille pyocyannique, *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Les souches de cette espèce sont à Gram négatif constituées de bacilles de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1,5 à 3,0  $\mu\text{m}$  de longueur, se présentant de manière isolée ou groupés par deux ou en courtes chaînes, non sporulés et mobiles grâce à une ciliature monotriche (quelques rares cellules portent cependant plusieurs flagelles polaires). Les souches de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* produisent le plus souvent des pigments, de la pyoverdine et de la pyocyanine essentiellement [20].



**Figure I-5 *Pseudomonas aeruginosa* (coloration de Gram) [22].**

*Pseudomonas aeruginosa* assimile de nombreux composés carbonés (acétamide, acétate, D-alanine, L-arginine, butyrate, géraniol, glucose, lactate, malonate, mannitol, propionate ...), mais elle n'utilise aucun des composés suivants : l'adonitol, l'inositol, le

maltose, le mucate, le saccharose, le sorbitol et le tréhalose. *Pseudomonas aeruginosa* a la propriété d'être catalase et oxydase positives, elle est également nitrate réductase positive et peut ainsi respirer les nitrates. *Pseudomonas aeruginosa* est incapable de fermenter le glucose [20,23]. Le germe pousse à 42 °C, mais aucune culture n'est obtenue à 4 °C ou à 46 °C. La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 °C. *Pseudomonas aeruginosa* est facilement cultivée sur les milieux d'usage courant en bactériologie (gélose nutritive, gélose trypticase-soja, gélose de Mueller-Hinton, gélose au sang ...). Les cultures dégagent une odeur très caractéristique de seringa [20].

Les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sont de trois types :

- 1) Les colonies *la* (large) sont grandes, rugueuses avec un centre plus bombé (colonies en œufs sur le plat) et un bord irrégulier.
- 2) Les colonies *sm* (small) sont rondes, petites, convexes et lisses.
- 3) Les colonies muqueuses sont bombées, opaques visqueuses, filantes, ou parfois coulantes. Elles possèdent une pseudocapsule constituée d'alginate.

Les souches isolées de prélèvement cliniques donnent généralement des colonies *la* alors que les souches isolées de l'environnement donnent le plus souvent des colonies *sm* [20].

### I-4-4-2 Habitat et pouvoir pathogène

*Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce bactérienne dont l'habitat est le plus vaste. Elle vit à l'état saprophyte dans l'eau et les sols humides (elle résiste mal à la dessiccation) ou à la surface des végétaux. Elle vit également à l'état commensal dans l'intestin de l'homme et des animaux. Plus rarement elle est isolée de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Les solutions antiseptiques contaminées présentent un danger potentiel important. Il s'agit soit d'antiseptiques inactifs sur le germe (par exemple les solutions à base d'ammonium quaternaire) soit de la présence de mutants résistants à des antiseptiques habituellement actifs [20,24].

*Pseudomonas aeruginosa* possède un grand nombre de facteurs de virulence jouant un rôle dans la colonisation, la survie de la bactérie et l'invasion des tissus. Elle peut être impliquée dans des infections communautaires et c'est l'une des bactéries les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales. À elle seule, elle représente environ 90 p. cent de tous les *Pseudomonas* isolées au laboratoire. *Pseudomonas aeruginosa* est peu virulente chez les individus normaux et, au contraire, très pathogène chez les sujets dont les

moyens de défense sont altérés. Elle est le prototype des bactéries pathogènes opportunistes et elle est isolée d'infections très diverses [20,24].

#### **I-4-4-3 Diagnostic bactériologique**

L'isolement peut être réalisé sur de nombreux milieux. Des milieux sélectifs, contenant un ammonium quaternaire (cétrimide ou bromure de céthyltriméthylammonium), permettent d'isoler le germe à partir de prélèvements contaminés. Outre son effet sélectif, la gélose Pyocyanosel (bioMérieux) a comme constituant de base le milieu de King A et elle favorise la production de pyocyanine. Le diagnostic présomptif du genre *Pseudomonas* doit être évoqué lorsque les bactéries sont mobiles, à Gram négatif, aérobies strictes, oxydase positive et non indologènes. Le diagnostic bactériologique des souches typiques est facile, il est fortement orienté par l'aspect des colonies et l'odeur des cultures. La mise en évidence de la pyocyanine (milieu de King A) et de la pyoverdine (milieu de King B) suffit à assurer le diagnostic [20].

#### **I-4-4-4 Sensibilité aux antibiotiques**

*Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et, au cours du temps, les souches ont développé une résistance acquise. La résistance résulte d'une imperméabilité de la membrane externe, d'un phénomène d'efflux, d'une altération des sites d'action ou de la production d'enzymes dégradant les bêta-lactamines et les aminosides.

La présence de plasmides et de phages tempérés explique les nombreuses variations génétiques observées dans cette espèce et elle explique, au moins partiellement, la fréquence des souches polyrésistantes aux antibiotiques [20].

## **I-5 Méthodes globales de mesure de la pollution**

### **I-5-1 Evaluation de la pollution**

La plupart des effluents pollués, qu'ils soient d'origine urbaine ou industrielle, sont des mélanges très complexes caractérisés par l'extrême variabilité dans le temps de leur débit et de leur niveau de pollution. C'est pour ces raisons là que les analyses chimiques longues et complexes sont inutiles et qu'on ait recours aux tests "globaux". Ces tests sont spécifiques d'un ensemble de propriétés ou de produits :

- Produits biodégradables,
- produits oxydables dans des conditions réactionnelles précises,

- hydrocarbures,
- matières ionisables,
- matières en suspension...

Parmi les tests globaux les plus utilisés et les plus représentatifs de la pollution figurent les tests de demande en oxygène. Que cette demande soit d'origine chimique ou biochimique, elle correspond en effet à l'évolution spontanée ou imposée d'un effluent vers une certaine stabilisation. Elle est à la fois la mesure d'une partie généralement importante de la pollution et un indice de traitabilité.

Dans ces tests globaux, il est essentiel de définir un "équivalent" de pollution qui serve d'unité de mesure commune à tous les composants d'un ensemble. Ainsi dans les tests d'oxydabilité chimique ou biologique, cet équivalent sera la demande en oxygène exprimée en mg de O<sub>2</sub> par litre d'effluent [17].

## **I-5-2 Mesure de la demande biochimique en oxygène : DBO**

### **I-5-2-1 Principe**

La demande biochimique en oxygène est la quantité d'oxygène consommée par les microorganismes aérobies pour assurer l'oxydation et la stabilisation de tous les composés présents biodégradables.

C'est de tous les moyens d'évaluer une pollution, le plus ancien, le plus utilisé mais aussi le plus ambigu et par conséquent le plus controversé. En fait ce test est très difficile à cerner du point de vue théorique car il recouvre un très grand nombre de phénomènes élémentaires se déroulant simultanément ou successivement [17,25].

### **I-5-2-2 Méthodes de mesure de la DBO**

Il existe deux types de méthodes classiques et une méthode indirecte d'introduction récente.

#### **I-5-2-2-1 Méthode des dilutions**

Elle consiste à diluer l'échantillon à analyser avec une eau ne présentant aucune demande propre en oxygène et dont la concentration en oxygène dissous est proche de la saturation [17]. On mesure la concentration en oxygène dissous immédiatement après le mélange et après 5 jours d'incubation à l'obscurité à 20°C. La différence des concentrations multipliées par le taux de dilution donne la DBO<sub>5</sub>.

Dans le cas des eaux industrielles, il est nécessaire de faire un ensemencement. La souche utilisée doit être adaptée aux produits à dégrader, cette précaution est indispensable afin d'éviter une période de latence qui fausserait grossièrement la DBO<sub>5</sub>.

#### **I-5-2-2-2 Méthode manométriques**

Elles consistent à réaliser une culture en batch, en atmosphère close. Si le CO<sub>2</sub> libéré est fixé sur une cartouche de potasse, la variation de la pression enregistrée sur l'atmosphère surmontant la culture est due à la consommation d'oxygène que l'on peut ainsi évaluer.

Ces méthodes manométriques semblent en général plus reproductibles que les méthodes de dilutions et elles ont surtout l'intérêt de permettre facilement de tracer la courbe de la DBO en fonction du temps qui apporte des informations sur la cinétique de dégradation qui ont beaucoup plus d'importance que la valeur numérique de la DBO<sub>5</sub>. Ces méthodes manométriques permettent aussi de travailler sur des volumes d'échantillon beaucoup plus importants et donc plus représentatifs [17].

#### **I-5-2-2-3 Méthode indirecte de CATROUX et MORFAUX**

Cette méthode repose sur l'idée que le terme final de l'oxydation du carbone, que ce soit par voie biologique ou chimique, est le CO<sub>2</sub> [17], donc que l'on peut terminer rapidement par voie chimique une oxydation qui a débuté par voie biologique. Ce qui revient à poser :

$$DBO_5 = DCO_0 - DCO_5$$

Où la DCO<sub>0</sub> est la DCO de l'effluent au temps zéro et DCO<sub>5</sub> la DCO de l'effluent ensemencé après 5 jours d'incubation à 20°C. L'oxydation chimique portant sur les deux cas à la fois sur les matières carbonées dissoutes, sur les substances chimiques présentes et sur la biomasse introduite ou édifiée.

#### **I-5-2-3 Etude du phénomène**

La réaction biochimique se déroulant dans un flacon à DBO est identique à toutes celles qui sont relatives aux fermentations aérobies et s'effectue en deux phases distinctes et successives [25]. Au départ, la matière organique est utilisée par les microorganismes pour assurer leurs besoins énergétiques et de croissance. Il en résulte une consommation d'oxygène et une croissance microbienne. Après disparition de la matière organique initiale, les microorganismes continuent à consommer de l'oxygène pour assurer leur métabolisme endogène. Après oxydation complète, le processus est achevé. Ce stade définit la DBO ultime.

#### I-5-2-4 Tests de "traitabilité"

Tous les DBO-mètres pourvus d'un enregistrement de la demande en oxygène sont utilisables pour effectuer des tests de traitabilité sur un effluent. La méthode consiste :

- 1) à mesurer la demande en oxygène sur une culture amenée en phase de respiration endogène pour avoir une référence,
- 2) à ajouter des quantités plus ou moins importantes de l'échantillon à tester et à mesurer la demande en oxygène qui en résulte.

Ainsi une augmentation de la demande en oxygène est considérée comme un bon indice de traitabilité alors qu'une diminution indique la présence de toxiques ou d'inhibiteurs [17]. La figure I-6 donne quelques courbes types obtenues par cette méthode :

- Pour un composé toxique, on remarque une baisse continue de la DBO ;
- Lorsqu'il s'agit d'un composé inhibiteur à concentration élevée, la DBO augmente légèrement au début puis décroît considérablement vu qu'il y a une inhibition de la croissance ;
- Pour un composé non biodégradable et qui ne présente aucune toxicité, les bactéries sont en phase de respiration endogène et la DBO enregistrée est nulle ;
- Dans le cas d'un composé biodégradable, la DBO croît jusqu'à atteindre une valeur maximale correspondant à la  $DBO_{ultime}$ .

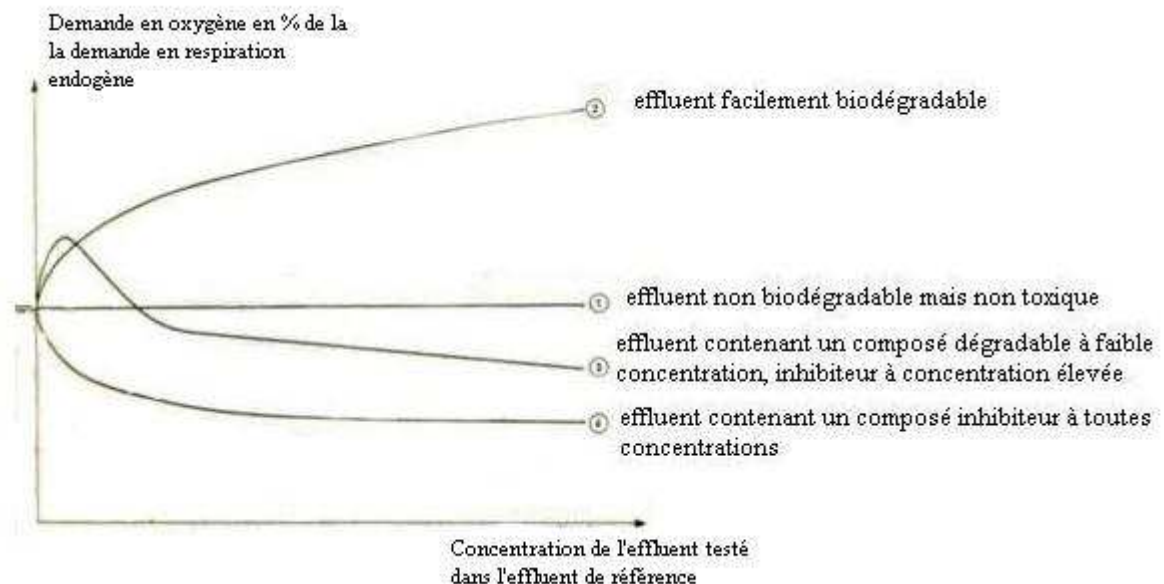


Figure I-6 Courbes types obtenues dans des tests de traitabilité [17]

### I-5-3 Mesure de la demande chimique en oxygène : DCO

#### I-5-3-1 Principe

La demande chimique en oxygène représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder, dans un certain contexte réactionnel, les substances oxydables contenues dans l'échantillon. La DCO intéresse indifféremment les substances minérales et organiques [17].

Par ailleurs, la technique de la DCO présente sur la DBO les avantages suivants :

- Plus grande précision: l'écart standard pour la DCO serait de 8 % contre 20 % pour la DBO.
- Plus grande rapidité : la mesure s'effectue en quelques heures.

#### I-5-3-2 Méthodes de mesure de la DCO

Parmi les principaux oxydants qui ont été préconisés pour la mesure de la DCO on peut citer le permanganate de potassium, le sulfate cérique et l'acide iodique. Mais actuellement, c'est la méthode au bichromate de potassium qui est la plus utilisée car le permanganate, les sels cériques et iodiques se sont révélés être des oxydants trop faibles, laissant inattaquées des proportions importantes de matière organiques [17].

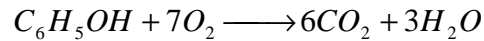
La procédure normalisée dans les Standard Methods fait appel à une oxydation à chaud par le bichromate de potassium. Du sulfate d'argent est ajouté comme catalyseur, utile en particulier pour permettre l'oxydation des composés aromatiques. Les chlorures interfèrent sur la DBO parce qu'ils précipitent les ions  $\text{Ag}^+$ , leur élimination est réalisée par addition de sulfate mercurique. La teneur maximale admissible en chlorures est de  $3 \text{ mg/L}^{-1}$  [17,25].

On peut considérer que, dans ces conditions, les composés présents sont oxydés à plus de 95 %. Il existe cependant des exceptions comme la pyridine qui n'est pratiquement pas dégradée et les carbures aromatiques qui le sont incomplètement. Une autre exception concerne l'azote ammoniacal qui reste sous forme de  $\text{NH}_3$  ou  $\text{NH}_4^+$  [17].

Les méthodes utilisant des réactifs chimiques sont les méthodes classiques qui ont fait l'objet de diverses tentatives d'automatisation. Récemment les méthodes instrumentales ont fait leur apparition, on peut citer comme exemple la méthode de l'"Aquarator" ou "CO<sub>2</sub> demande" qui consiste à faire réagir les matières organiques avec un courant de CO<sub>2</sub> à 900°C sur un catalyseur en platine [17].

La DTO (demande théorique en oxygène) des composés organiques peut être calculée sur la base de l'équation d'oxydo-réduction. Ainsi la DTO correspondant à l'oxydation de 1 g de phénol est calculée comme suit :





$$DTO = \frac{(1000) \cdot (224)}{(94)} = 2383 \text{mgO}_2 / \text{g de phénol}$$

### I-5-3-3 Relation entre la DCO et la DBO

La DCO peut être réalisée plus rapidement que la DBO et donne une image de la matière organique présente, pour cela il est important de développer des relations entre la DBO, la DCO et la DTO.

Dans le cas d'un composé totalement biodégradable, tel que le glucose, la  $DBO_{ultime}$  représentera environ 90% de la DTO et dans ce cas, la DCO mesurera la demande théorique en oxygène [25]. On a donc :

$$DCO = \frac{DBO_{ultime}}{0.9} = DTO$$

Le rapport DCO-DBO<sub>5</sub> permet d'évaluer le caractère biodégradable de la matière organique. On convient généralement des limites suivantes [26]:

- $DCO/DBO_5 < 2$  : l'effluent est facilement biodégradable ;
- $2 < DCO/DBO_5 < 3$  : l'effluent est biodégradable avec des souches sélectionnées ;
- $DCO/DBO_5 > 3$  : l'effluent n'est pas biodégradable.

Généralement, la DCO vaut de 1,5 à 2 fois la DBO<sub>5</sub> pour les eaux usées domestiques

La relation empirique suivante lie la DBO<sub>5</sub>, la DCO et la matière organique de l'échantillon (MO) :

$$MO = (2 DBO_5 + DCO) / 3$$

# Chapitre II

## MATERIEL ET METHODES

## Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

### II-1 Matériels :

#### II-1-1 Matériel biologique :

La bactérie utilisée dans ce travail est *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 fournie par l'Institut PASTEUR d'Alger, elle est conservée au réfrigérateur à une température de 4°C sur milieu gélosé incliné de conservation.

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

Le milieu de culture utilisé est un milieu minéral liquide contenant le phénol comme unique source de carbone et d'énergie et des éléments minéraux indispensables à la croissance des *Pseudomonas aeruginosa*. La composition de ce milieu est citée en annexe N°1.

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

- Les réactifs utilisés pour le dosage du phénol et pour la détermination de la DCO sont cités en annexe N°2.
- Les différents matériels utilisés sont résumés en annexe N°3.

### II-2 Méthodes d'analyse:

#### II-2-1 Mesure de la croissance bactérienne

La densité de biomasse a été déterminée au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm, en se référant à un blanc ne contenant que le milieu de culture. La mesure de la densité optique doit être inférieure à 0.7 pour pouvoir appliquer la loi de Beer-Lambert [19]. La valeur de la DO est ensuite convertie en poids cellulaire sec par le biais d'une courbe d'étalonnage présentée en annexe N°4 dont l'allure est une droite d'équation [13] :

$$X \text{ (mg/l)} = 434.78 \text{ DO (à 600 nm)}$$

### II-2-2 Dosage du phénol

Le phénol a été mesuré par méthode colorimétrique après réaction avec la 4-amino antipyrine. Il s'agit de la condensation en milieu basique de l'ion phénate sur la 4-amino antipyrine en présence d'un oxydant, l'hexacyanoferrate(III) de potassium (ferricyanure de potassium).

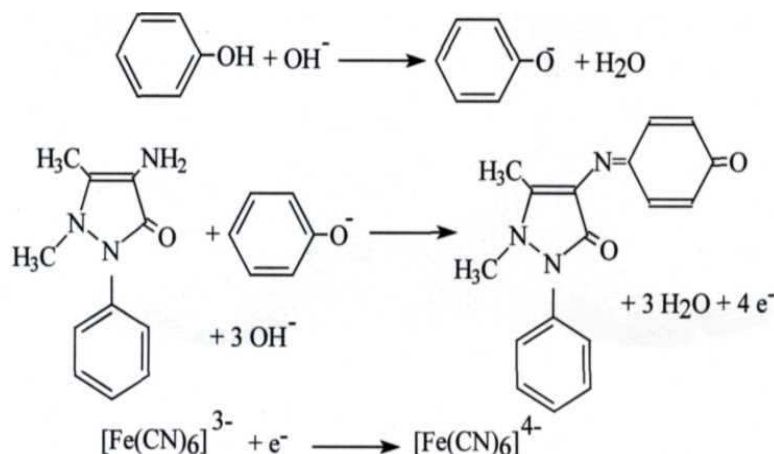


Figure II-1 la condensation du phénol avec la 4-amino antipyrine

Le complexe ainsi formé est de couleur rouge dont l'intensité dépend de la concentration en phénol. Cette méthode a une limite de détection de 5 mg/l d'où la nécessité de faire des dilutions quand on travaille à des concentrations élevées [27].

La concentration inconnue en phénol est déterminée en mesurant la DO à 510 nm au spectrophotomètre UV/visible et en utilisant la courbe d'étalonnage présentée en annexe N°4.

La concentration est déduite de l'équation de la droite suivante :

$$[\text{phénol}] \text{ (mg/l)} = 0.1109 \text{ DO (à 510 nm)}$$

### II-2-3 Mesure de la DCO

La méthode pratiquée est la méthode au bichromate de potassium dont le principe est le dosage colorimétrique du chrome trivalent formé au cours de la réaction d'oxydoréduction dans des conditions bien définies : milieu fortement acide, à chaud (température 150°C) et pendant 2h. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de bichromate de potassium réduit [28]. La concentration de la DCO de l'échantillon, exprimée en mg/l O<sub>2</sub>, est déduite, après mesure de la DO à 600 nm, de l'équation de la courbe d'étalonnage présentée en annexe N°4:

$$\text{DCO (mg/l O}_2\text{)} = 0.0003 \text{ DO (à 600 nm)}$$

#### II-2-4 Mesure de la DBO

La méthode adoptée est une méthode manométrique utilisant un respiromètre Oxitop (WTW). La mesure repose sur une mesure de la pression dans un système clos. Les micro-organismes qui se trouvent dans l'échantillon consomment l'oxygène en formant du CO<sub>2</sub>. Celui-ci est absorbé par NaOH. Il s'ensuit une dépression dont la mesure peut être lue directement dans la DBO en mg/l.



Figure II-2 respiromètre Oxitop (WTW)

Deux flacons ont été utilisés :

- Le premier servant de référence, contient 22.7 ml du milieu de culture sans phénol, afin de mesurer la consommation en oxygène due à la respiration endogène des bactéries.
  - Le deuxième contient un volume de 22.7 ml prélevé du fermenteur au début de l'expérience.
- La lecture de la DBO se fait directement sur un boîtier contrôleur.

#### II-2-5 Conduite de la culture en bioréacteur

##### ➤ Préparation de la culture bactérienne

Des colonies de *P.aeruginosa* sont prélevées d'un tube de conservation à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et ensemencées dans un flacon contenant du bouillon nutritif. Après 48h d'incubation à 37°C, un trouble indique une croissance bactérienne.

Après centrifugation pendant 15 mn à une vitesse de 6000 tours/mn, dans des tubes préalablement stérilisés, on récupère les bactéries à partir du culot et on fait un lavage avec de l'eau distillée stérilisée afin de les débarrasser de toute impureté comme le bouillon nutritif par exemple. Ensuite, on fait une deuxième centrifugation et les bactéries cette fois-ci sont mises en suspension dans 15 ml d'eau distillé stérilisée. Un volume de 10 ml constitue l'inoculum et les 5 ml restants servent à mesurer la taille de l'inoculum par lecture de la DO à 600 nm.

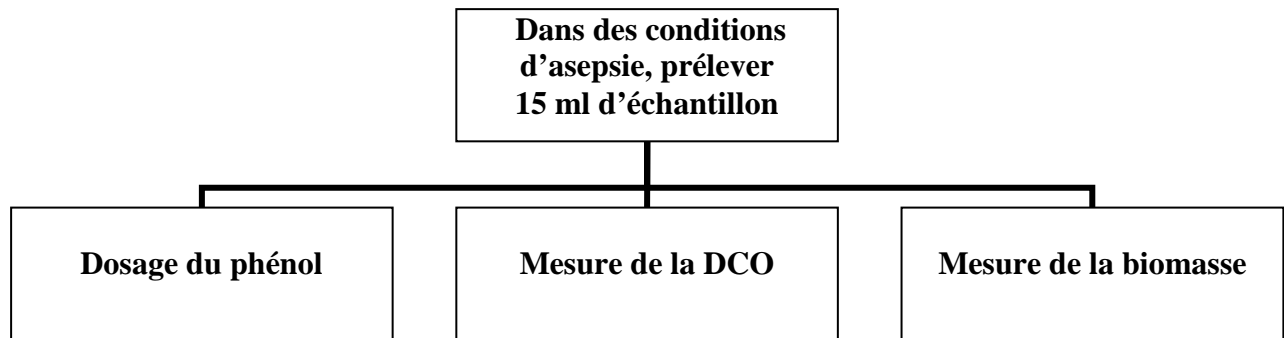
➤ **Culture en bioréacteur**

Pour assurer le bon fonctionnement du bioréacteur dans des conditions d'asepsie, nous avons procédé comme suit :

1. Stériliser le fermenteur de volume de 2 l, contenant 1 l de milieu de culture, à 120°C durant 20 mn à l'autoclave.
2. Devant un bec bunsen :
  - Ajouter par filtration stérilisante les solutions de  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{FeSO}_4$  ainsi que le phénol.
  - Ajouter l'inoculum de 1%.
3. Fixer les conditions opératoires (température de 30°C, faible agitation, aération de 0.42 l/mn d' $\text{O}_2$ ).
4. Des prélèvements sont effectués stérilement à des intervalles de temps réguliers.

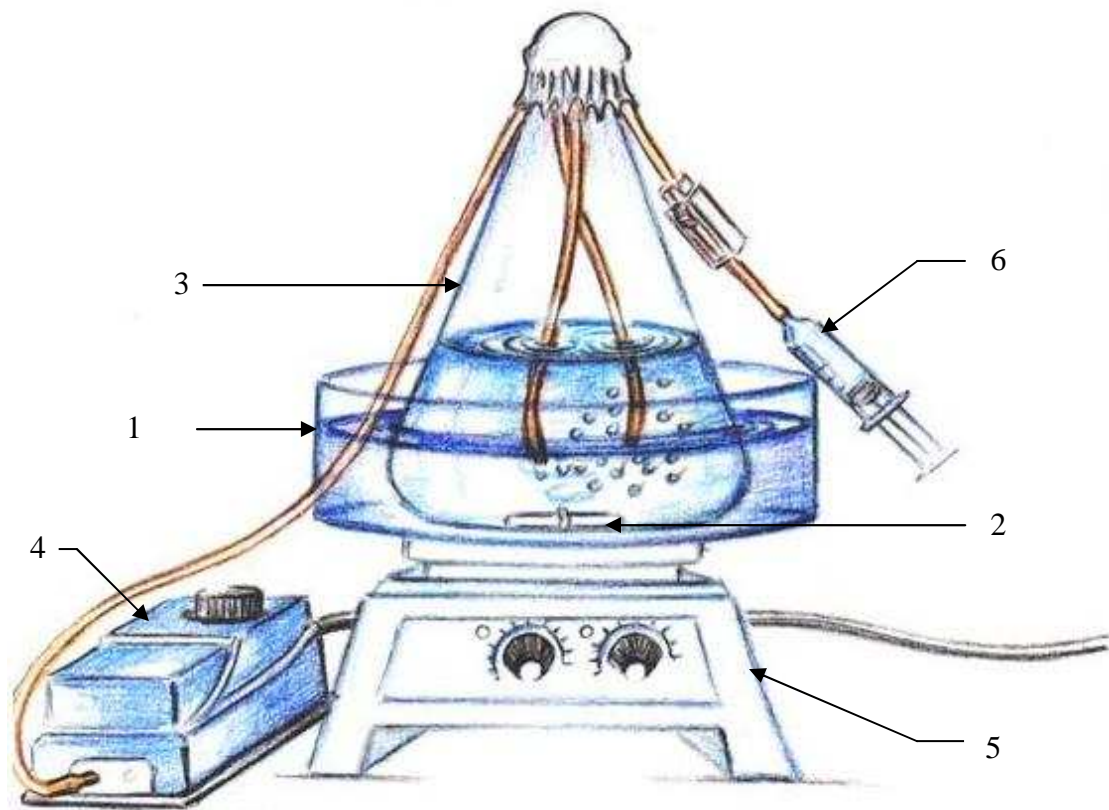
**II-2-6 Mode opératoire**

Pour la mesure de la biomasse, de la concentration en phénol et de la DCO, le protocole expérimental suivant a été adopté :



<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Centrifugation d'environ 7 ml de l'échantillon pendant 15 mn à une vitesse de 6000 tr/mn.</li> <li>▪ Dilution de 3 ml du surnageant dans une fiole de 100 ml avec de l'eau distillée.</li> <li>▪ Verser dans un bêcher, ajouter 5 ml de la solution tampon et agiter.</li> <li>▪ Ajouter 1 ml de la solution de 4-amino- antipyrine et agiter.</li> <li>▪ Ajouter 2 ml de la solution de ferricyanure de potassium et agiter.</li> <li>▪ Laisser la coloration se développer pendant 5 mn et lire la DO à 510 nm au spectrophotomètre.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Prélever 2.5 ml de l'échantillon et l'introduire dans une éprouvette.</li> <li>▪ Ajouter lentement 1.5 ml de la solution de digestion.</li> <li>▪ Ajouter lentement 3.5 ml du réactif acide.</li> <li>▪ Visser fermement le bouchon et mélanger à l'agitateur.</li> <li>▪ Porter à reflux dans un bloc chauffant à une température de 150°C pendant 2h.</li> <li>▪ Retirer l'éprouvette du bloc chauffant et laisser refroidir à la température ambiante.</li> <li>▪ Lire la DO à 600 nm au spectrophotomètre.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bien homogénéiser l'échantillon</li> <li>▪ Déterminer la DO à 600 nm par le spectrophotomètre.</li> </ul>
--	--	--

II-2-7 Dispositif expérimental



- 1-Bain marie ;
- 2-Barreau magnétique ;
- 3- Bioréacteur ;
- 4- Diffuseur d'air ;
- 5- Plaque d'agitation ;
- 6-Point de prélèvement

Figure II-3 dispositif expérimental



## Chapitre III:

# RESULTATS ET DISCUSSIONS

## Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

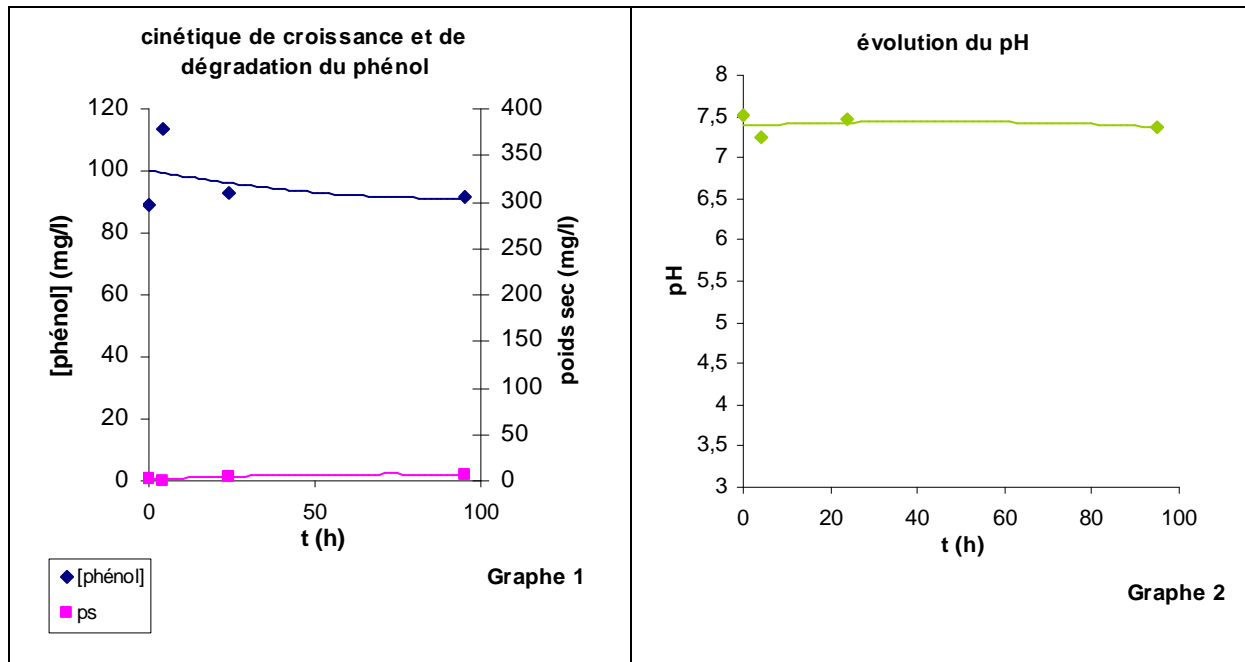
En se référant à la thèse de Magister Ali [13] réalisée au sein de l'équipe, et dont le thème porte sur l'étude de l'influence des conditions opératoires sur la dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa*, nous avons fixé les conditions opératoires qui ont permis d'avoir les meilleurs taux de dégradation. Il s'agit d'une température de 37°C, d'une aération de 0.42 l/mn d'O<sub>2</sub> et d'une concentration en phénol inférieure à 500 mg/l (concentration d'inhibition). Nous avons utilisé le milieu minéral avec une concentration initiale en phénol fixée à 100 mg/l tout au long des expériences menées.

### **III-1 Influence de la nature du milieu de culture et de la taille de l'inoculum sur la dégradation du phénol**

Pour que les bactéries aient uniquement le phénol comme source de carbone et d'énergie, nous avons utilisé deux milieux dépourvus de substrat carboné, le premier contient uniquement de l'eau distillée et le second est un milieu minéral.

#### **III-1-1 Evolution de la dégradation du phénol dans l'eau distillée**

L'expérience a été réalisée à une température maintenue à 37°C dans un milieu de culture ne contenant que de l'eau distillée et une concentration initiale en phénol de 100 mg/l. Un inoculum de 1% à partir de la préculture a été ajouté au milieu. Les cinétiques de croissance et de dégradation du phénol ainsi que l'évolution du pH, tracées à partir des résultats obtenus, sont représentées sur la figure III-1.



**Figure III-1 Evolution de la dégradation du phénol, de la cinétique bactérienne et du pH dans l'eau distillée**

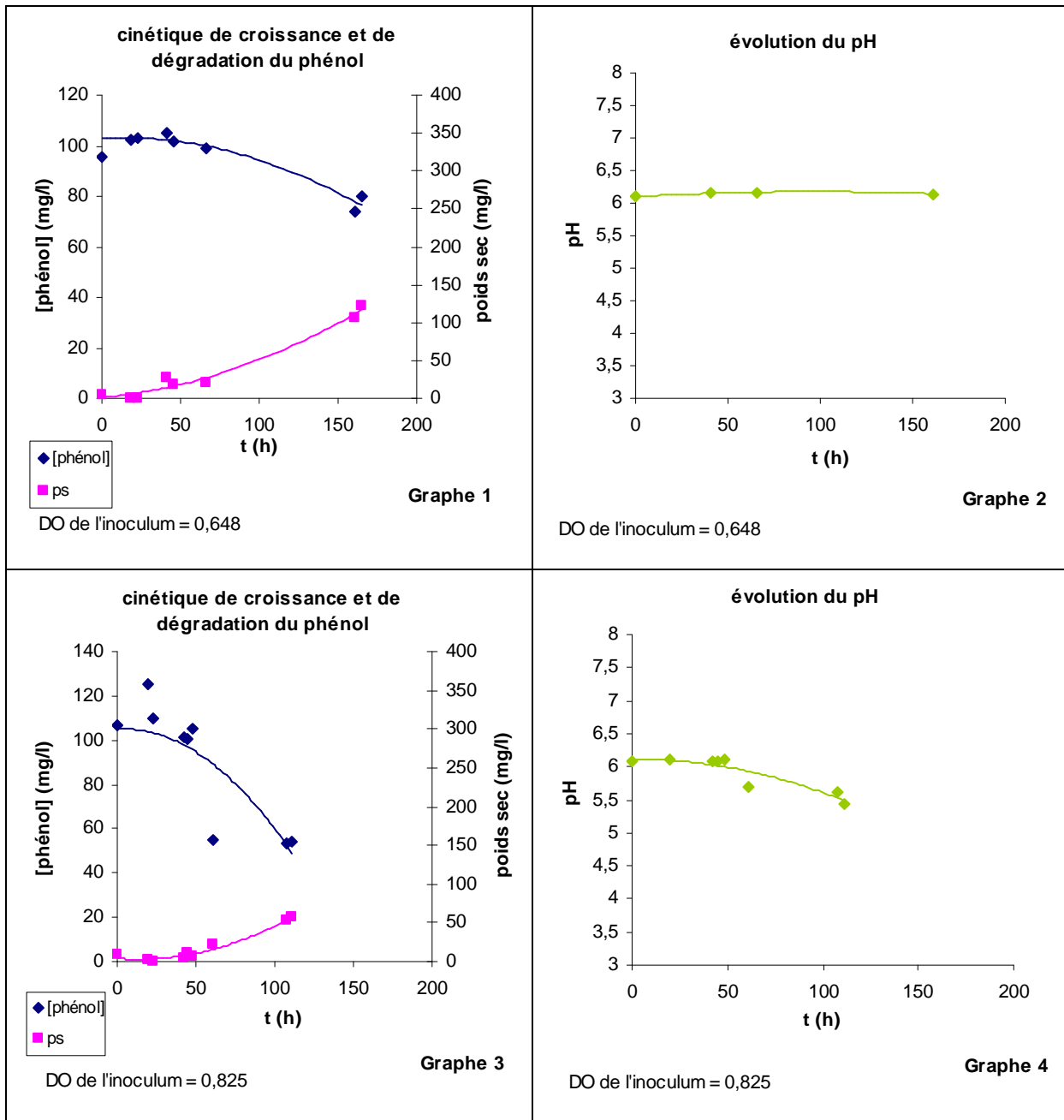
Le graphe 1 de la figure III-1 illustre une croissance bactérienne quasi nulle, cela est dû à l'absence des éléments minéraux indispensables pour le développement et la croissance des bactéries. Par conséquent, la dégradation du phénol est négligeable.

Suite à une activité bactérienne nulle, il n'y a pas production de métabolites et donc pas de variation du pH comme le montre le graphe 2 de la figure III-1.

### III-1-2 Evolution de la dégradation du phénol dans le milieu minéral

Le milieu de culture est un milieu minimum contenant les minéraux essentiels à la croissance des bactéries. La température, l'aération et la concentration initiale en phénol toujours maintenues aux mêmes valeurs, nous avons voulu voir l'influence de la taille de l'inoculum (c'est-à-dire le nombre de bactéries initialement présentes dans le milieu de culture) sur l'évolution de la dégradation et de la croissance bactérienne.

Les résultats obtenus ont permis de tracer les graphes représentés sur la figure III-2.



**Figure III-2 influence de la taille de l'inoculum sur la dégradation du phénol**

En comparant les graphes 1 et 3 de la figure III-2, on constate que la taille de l'inoculum influe sur la biodégradation. En effet, avec le premier inoculum de DO= 0.648, le taux de dégradation était de 20 % au bout de 164 heures. Alors qu'avec le deuxième inoculum, de taille plus grande (DO= 0.825), on a obtenu une meilleure dégradation en un temps plus réduit : un taux de dégradation de 50 % au bout de 110 heures. Beshay et al [29] ont montré qu'une augmentation du poids sec de l'inoculum augmentait le taux de dégradation du phénol.

L'évolution du pH confirme les résultats précédents, il n'y a pas de variation avec le premier inoculum suite à la faible dégradation observée, comme le montre le graphe 2 de la figure III-2. Tandis qu'avec le deuxième inoculum de taille plus importante, on a noté une variation appréciable du pH, de l'ordre de 10 %. Ce qui traduit une bonne activité bactérienne qui a fait baisser le pH du milieu par la production de métabolites acides (graphe 4 de la figure III-2).

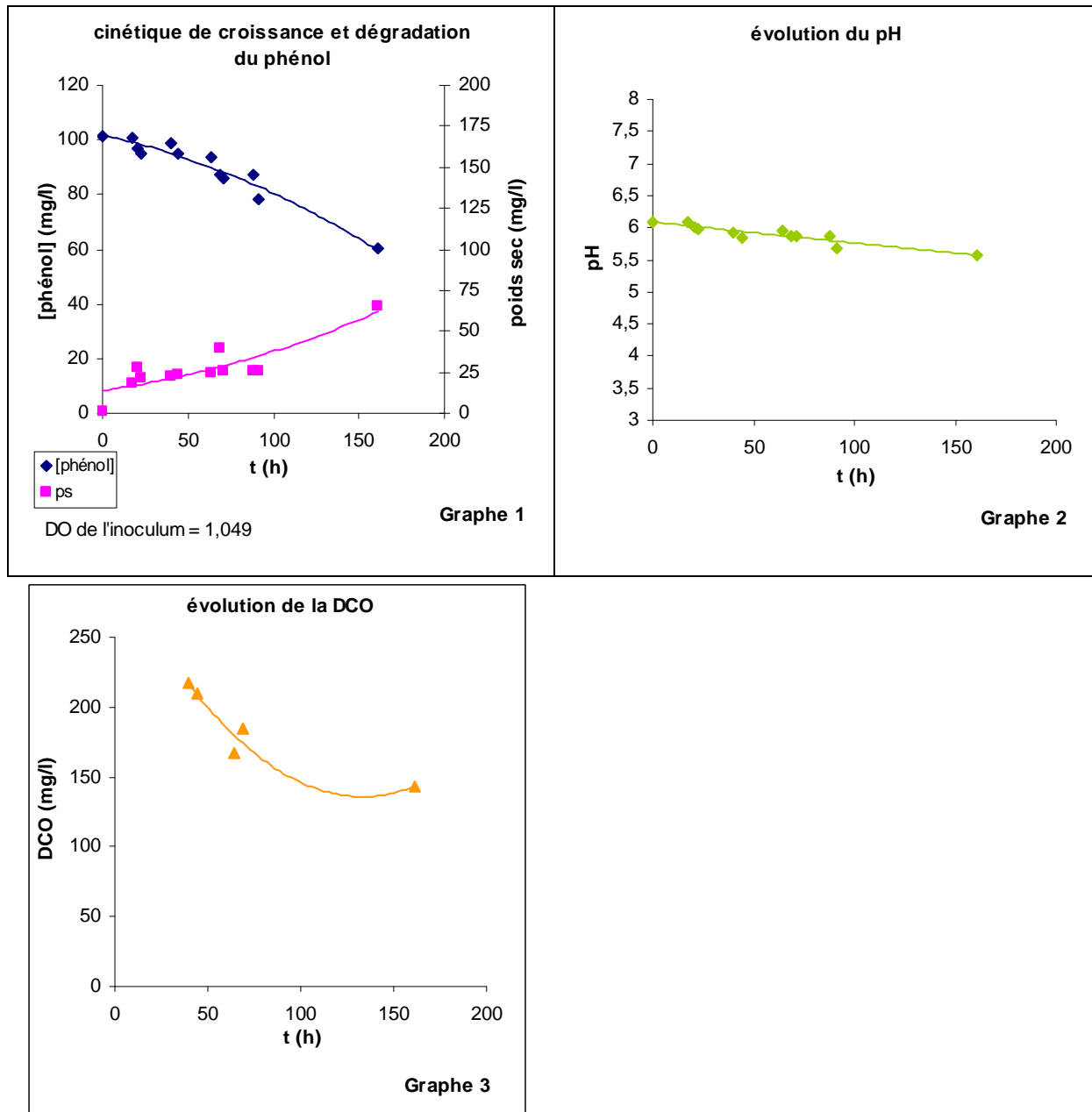
La croissance bactérienne quant à elle reste faible avec les deux inoculums utilisés puisque le milieu de culture est un milieu minéral, et les courbes de croissances mettent en avant la présence d'une phase de latence assez prolongée, cela peut être expliqué par le fait que les bactéries n'ont pas été adaptées au phénol lors de la préculture. Beaucoup de travaux ont été réalisés dans ce sens et ont montré la grande influence de l'adaptation des cellules au substrat sur l'amélioration du taux ainsi que du temps de la biodégradation et sur la réduction de la phase de latence [1,30,31,32].

### **III-2 Analyse de la biodégradation par différentes méthodes et comparaison**

Nous avons suivi l'évolution de la dégradation du phénol par trois méthodes différentes, et qui sont :

- le dosage direct du phénol par une méthode chimique basée sur la condensation du phénol avec la 4-amino-antipyrine ;
- la détermination de la croissance cellulaire ;
- la demande chimique en oxygène DCO.

Les résultats obtenus ont permis de tracer l'évolution de chaque paramètre en fonction du temps. Les graphes sont représentés sur la figure III-3.



**Figure III-3 Analyse de la biodégradation par différentes méthodes**

Les bactéries utilisées sont capables de métaboliser le phénol grâce aux enzymes qu'elles peuvent sécréter : le cycle aromatique est hydroxylé pour obtenir un dérivé du catéchol, puis il est ouvert par une ortho ou une meta oxydation pour aboutir à des acides organiques simples qui entreront dans le cycle de Krebs [13,32]. Ceci est bien représenté par toutes les cinétiques de croissance et de dégradations vues auparavant ainsi que par le graphe 1 de la figure III-3, qui montre qu'une augmentation du poids sec correspond à une diminution de la concentration résiduelle en phénol. Ce métabolisme est accompagné d'une

production de métabolites (acides organiques), qui font baisser le pH du milieu, le graphe 2 de la figure III-3 montre une variation de pH de 8 %.

La dégradation du phénol entraîne une baisse de la DCO, qui avait initialement une valeur théoriquement égale à 238.3 mg/l, correspondant à 100 mg/l de phénol, jusqu'à une valeur de 149 mg/l qui peut correspondre au 60 mg/l de phénol restant dans le milieu. En effet, cette concentration donne théoriquement une DCO égale à 142.98 mg/l la légère différence peut être attribuée à l'oxydation des minéraux présents dans le milieu, qui n'ont pas été considéré dans le calcul théorique de la DCO, et à la sensibilité de la technique. Dans les travaux de Afzal et al. [33], en présence de 1000 mg/l de phénol, *Pseudomonas aeruginosa* a réduit la DCO d'une valeur initiale de 2032 mg/l jusqu'à une valeur finale de 69 mg/l au bout de 48 heures seulement.

### III-3 Test de traitabilité

Un bon indice de traitabilité est exprimé par une augmentation de la demande en oxygène alors qu'une diminution indique la présence de toxiques ou d'inhibiteurs [17].

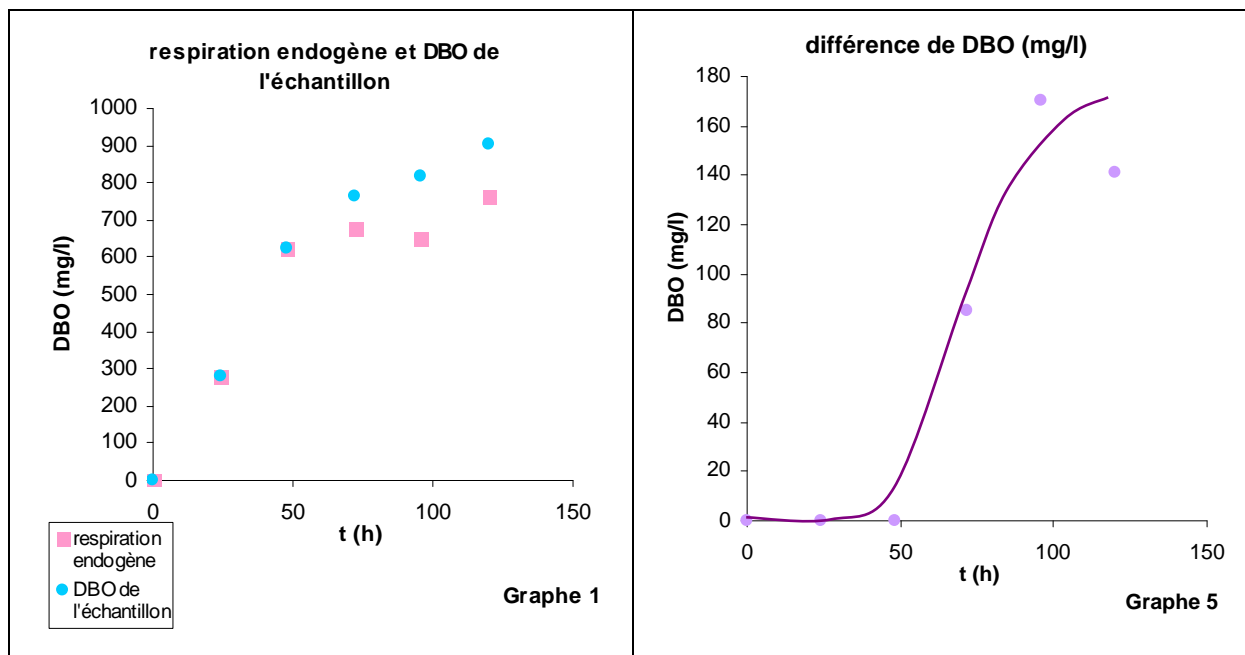


Figure III-4 La DBO enregistrée durant le test de traitabilité

Le test de traitabilité effectué sur un échantillon prélevé du bioréacteur au temps zéro a permis de tracer la courbe de la DBO et celle relative à la respiration endogène (graphe 1 de la figure III-4), la DBO de l'échantillon est au début égale à la demande en oxygène enregistrée

par les bactéries en phase de respiration endogène (le témoin), cela pourrait correspondre à une phase de latence par défaut d'une adaptation, phase pendant laquelle aucune activité n'est observée et où les bactéries sont en respiration endogène. Au-delà de 48 heures, la DBO de l'échantillon devient supérieure à celle du témoin, cette augmentation traduit une activité bactérienne qui est la métabolisation du phénol. La différence entre les deux courbes nous renseigne sur la biodégradabilité du composé. Cette différence est représentée dans le graphe 2 de la figure III-4 dont l'allure est une courbe croissante reflétant la bonne biodégradabilité du phénol par *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, l'augmentation de la demande en oxygène est considérée comme un bon indice de traitabilité alors que la diminution est un signe d'inhibition [17].

La DBO<sub>5</sub> de l'échantillon mesurée par le respiromètre vaut 141 mg/l. d'où un rapport DCO/DBO<sub>5</sub> égale à  $\frac{238.3}{141} = 1.7$

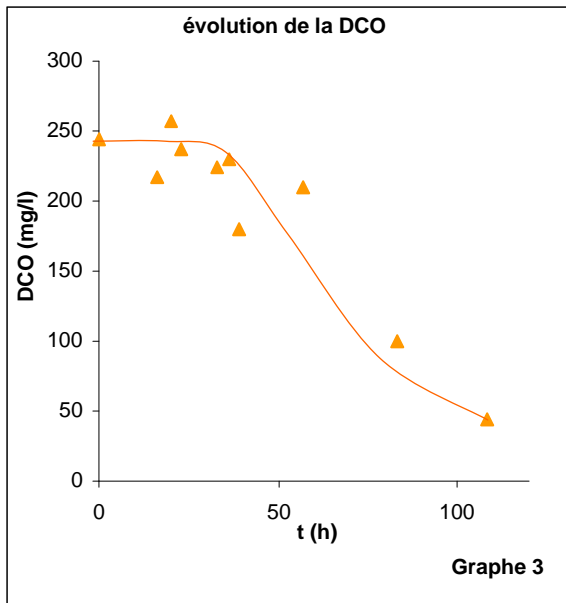
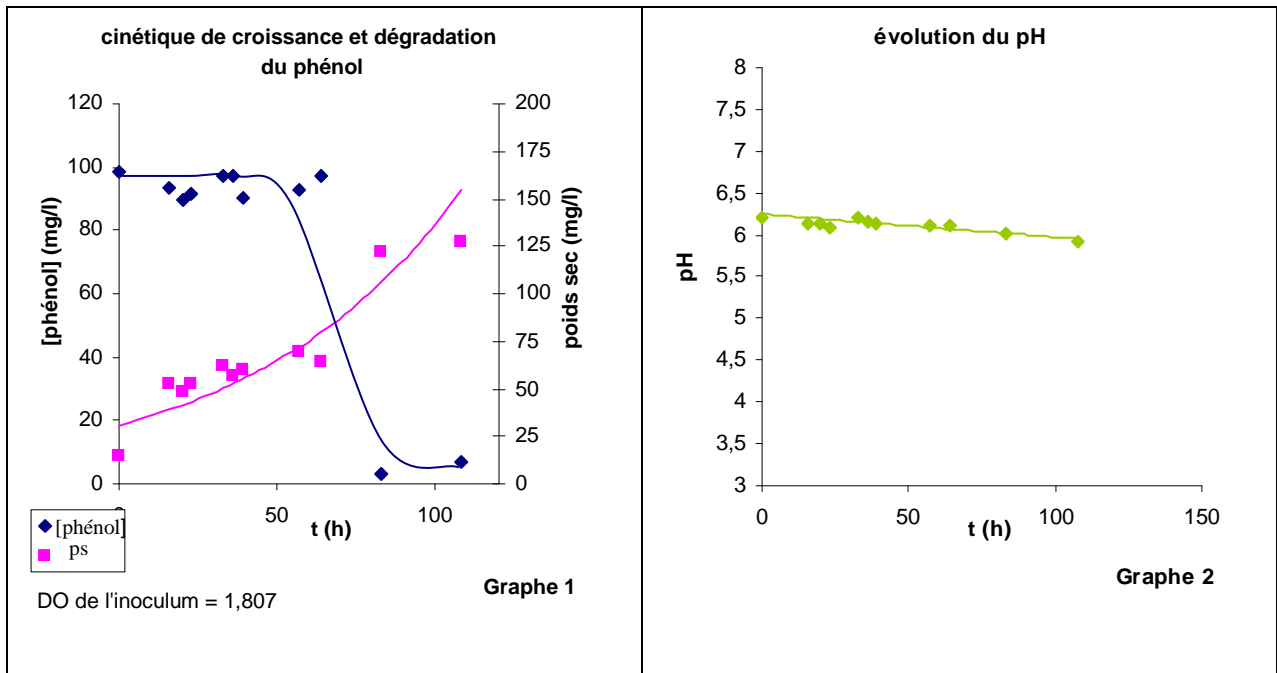
Il est important de rappeler que ce rapport permet d'évaluer le caractère biodégradable de la matière organique. Le rapport obtenu étant inférieure à 2 indique que le phénol est facilement biodégradable dans les conditions employées [26].

#### **III-4 Amélioration de la biodégradation**

Lors d'une autre expérience, l'analyse de la dégradation du phénol par les différentes méthodes, à l'exception de la DBO, a permis de tracer les graphes représentés sur la figure III-5.

Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les précédentes sauf que cette fois-ci on a procédé différemment pour inoculer le milieu de culture. Au lieu de faire la centrifugation, le lavage puis la mise en suspension pour ne récupérer que les cellules seulement, ce sont les 10 ml du bouillon nutritif dans lequel la préculture a été réalisée qui ont constitué l'inoculum de 1 %.





**Figure III-5 Analyse d'une biodégradation totale par différentes méthodes**

Au début, les bactéries présentes dans le bioréacteur avaient à leur disposition tous les nutriments essentiels à leur développement ce qui a permis une croissance considérable. Le phénol est, dans ce cas, une source d'énergie secondaire qui ne sera consommée qu'après épuisement de ces nutriments. Ceci explique bien l'allure de la courbe du graphe 1 de la figure III-5 qui présente un segment horizontal, montrant une absence de dégradation au début de l'expérience, puis une chute importante de la concentration résiduelle en phénol.

Suite au grand nombre de bactéries présentes dans le milieu, la biodégradation du phénol était totale au bout de 83 heures. Il s'en est suivit une baisse du pH du milieu relativement importante (graphe 2 de la figure III-5) traduisant un métabolisme d'utilisation du phénol.

La DCO quant à elle suit exactement la cinétique de dégradation (graphe 3 de la figure III-5), la disparition du phénol a conduit à une chute de la DCO d'une valeur initiale égale à 244 mg/l à une valeur finale de 44 mg/l. Soit une réduction de près de 82 % en un temps de 108 heures. Il est à noter que la valeur mesurée de la DCO finale (44 mg/l) est supérieure à ce qu'elle devrait être. En effet, au 7 mg/l de phénol restant, correspond une DCO théorique égale à 18 mg/l. La différence, qui est de 26 mg/l, peut être considérée comme une DCO réfractaire et peut être soustraite des valeurs de DCO mesurées. Ceci donnerait une DCO plus représentative de la biodégradation, relative au phénol uniquement.

### III-5 Etude la corrélation entre DCO et dégradation du phénol

La réduction de la DCO est à corrélérer avec la consommation de phénol représentée par le graphe 1 de la figure III-5 qui montre bien une dégradation quasi totale du phénol pour le même temps de culture et dans les mêmes conditions.

Cette corrélation est représentée par la figure III-6, en considérant la DCO théorique et la DCO expérimentale

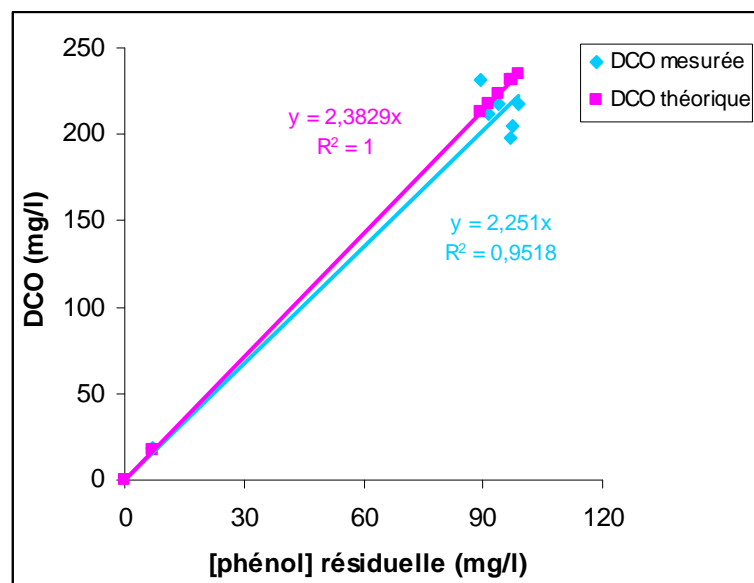


Figure III-6 Corrélation entre la DCO et la concentration en phénol résiduel

La DCO mesurée et la concentration résiduelle en phénol sont reliées linéairement comme le montre la figure III-6.

La relation linéaire obtenue est correcte, vue que le coefficient de corrélation est égal à 0.9518

La pente de la droite correspond à la variation de la DCO par rapport à la concentration en phénol et elle représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder 1 mg de phénol. Nous avons obtenue une valeur égale à 2.251 mg DCO/mg de phénol, légèrement inférieure à la valeur théorique de 2.383 mg DCO/mg de phénol.

La figure III-7 confirme que nos valeurs expérimentales concordent avec les valeurs théoriques car le rapport DCO mesurée/ DCO théorique obtenu est égal à 1.0524 et le coefficient de corrélation  $R^2 = 0.9523$  Ce qui signifie que la précision est appréciable.

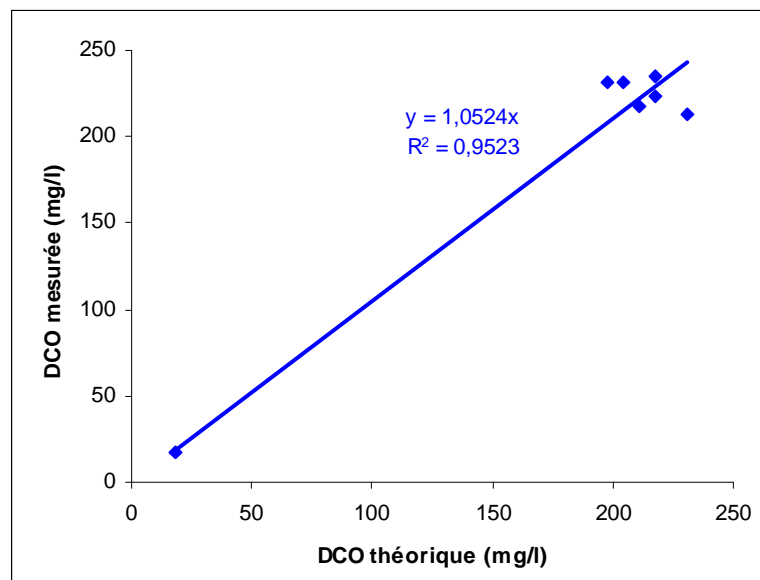


Figure III-7 Corrélation entre la DCO théorique et la DCO mesurée

# Conclusion générale

## Conclusion générale

Les traitements biologiques utilisant des microorganismes capables de métaboliser le phénol sont considérés comme un moyen efficace pour pallier à la pollution des eaux par ce composé toxique. C'est aussi une alternative intéressante aux traitements physico-chimiques qui sont onéreux et générateurs de sous produits.

La bactérie utilisée dans notre travail est *Pseudomonas aeruginosa*. Son efficacité à dégrader le phénol, a été révélée par de nombreuses études et vérifiée dans la notre.

Le taux et le temps de biodégradation dépendent, en plus des conditions physicochimiques, de la nature du milieu de culture ainsi que du nombre de bactéries présentes dans ce dernier. En effet, pour que les bactéries puissent se développer, il faut que les éléments indispensables à leur croissance soient présents dans le milieu de culture. C'est pour cette raison qu'aucune biodégradation n'a été observée dans l'eau distillée.

L'influence de la taille de l'inoculum sur la biodégradation a été démontrée, nous sommes arrivés à la conclusion suivante : plus le nombre de bactéries dans le bioréacteur est grand mieux est la biodégradation.

Le but de notre étude est d'analyser la biodégradation par différentes méthodes : le dosage chimique du phénol, la mesure de la croissance bactérienne, la mesure de la demande chimique en oxygène DCO et de la demande biochimique en oxygène DBO.

Nous avons trouvé que la biodégradation entraîne une augmentation de la croissance bactérienne, une baisse de la concentration résiduelle en phénol, du pH du milieu ainsi que de la DCO.

Comme la DCO suivait exactement la cinétique de dégradation du phénol, nous avons essayé de trouver une corrélation entre les deux. La relation obtenue est une relation linéaire et les valeurs expérimentales obtenues sont en parfaite corrélation avec les valeurs théoriques. En effet, le rapport DCO/phénol obtenu expérimentalement est égal à 2.251 mg DCO/mg de phénol, très proche du rapport théorique estimé à 2.383 mg DCO/mg de phénol.

La mesure de la DBO a permis de tirer des conclusions sur la biodégradabilité du phénol. La demande croissante en oxygène enregistrée indique la bonne biodégradabilité du phénol dans les conditions employées.

Nous avons obtenu un rapport  $DCO-DBO_5 = 1.7$  ; Ceci confirme le caractère biodégradable du phénol.

Quant à l'efficacité d'une méthode par rapport à une autre, nous pouvons dire qu'elles représentent toutes bien la biodégradation. Sauf que la DBO a le désavantage d'être une méthode lente dans le temps. Le dosage chimique du phénol par la 4-amino antipyrine est la méthode la plus représentative de la dégradation du phénol puisqu'elle ne cible que ce composé mais elle n'indique guère la présence de métabolites qui peuvent être non biodégradable et persistant. Cette partie de la matière organique non biodégradable est connue sous le nom de DCO réfractaire et elle apparaît dans la mesure de la DCO vue que cette méthode mesure toute la matière organique présente dans le milieu qu'elle soit biodégradable ou pas.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- [1] **J.-H. Kim, K.-K. Oh, S.-T. Lee, S.-W. Kim, S.-I. Hong.** Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. *Process Biochemistry*, Vol 37, N°12, July 2002 , pp. 1367-1373.
- [2] **K.Arinjay, K.Shashi and K.Surendra.** Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical engineering journal*, Vol.22, N°2, pp.151-159, 2005.
- [3] **Álvaro A.M.G. Monteiro<sup>1</sup>, Rui A.R. Boaventura, Alírio E. Rodrigues.** Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochemical Engineering Journal* 6 (2000), pp. 45–49.
- [4] **C.Ouahes**, chimie organique, office des publications universitaires, pp293-304, (2003).
- [5] "phénol" Encyclopédie Microsoft® Encarta® en ligne 2007 <http://fr.encarta.msn.com>
- [6] **A.Pichard.** Phénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS-Drc-01-25590-01DR021. N°2, 2005.
- [7] INRS, **phenol**, fiche toxicologique N°15, Paris (1997).
- [8] CUMENE, PHENOL. Capture par memo web à partir de <http://www.sfc.fr/donnees/orga/cumene/texcum.htm>
- [9] Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport d'évaluation pour le phénol, Loi canadienne sur la protection de l'environnement, page5 (1999).
- [10] Le phénol et l'environnement, capture par memo web à partir de [www.drirc.gouv.fr/poitoucharentes/environnement/themes/eau/f\\_marquants/arizona.html](http://www.drirc.gouv.fr/poitoucharentes/environnement/themes/eau/f_marquants/arizona.html)
- [11] **A. Mordocco, C. Kuek, R. Jenkins.** Continuous degradation of phenol at low Concentration using immobilized *Pseudomonas putida*. *Enzyme and Microbial Technology* 25 (1999). pp 530-536.
- [12] **T.-P. Chung, P.-C. Wu, R.-S. Juang.** Effect of solution Conditions of Phenol Degradation and Cell Growth in a Membrane Bioreactor.
- [13] **Ali O (2005)**, Etude de l'influence des paramètres opératoires sur la dégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* en fermenteur. Magister, ENP.
- [14] Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle : mécanismes et mise en œuvre. Rapport final. Mars 2003.
- [15] R.Scriban, **Biotechnologie**, TECH et DOC, Paris, (1999).



- [16] [www.med.univmontp1.fr/.../modbase/MB7\\_Bio\\_Med/Ressources\\_locales/BACTERIO/B2-Physiologie\\_bacterienne.pdf](http://www.med.univmontp1.fr/.../modbase/MB7_Bio_Med/Ressources_locales/BACTERIO/B2-Physiologie_bacterienne.pdf)
- [17] **H.Roques**. Fondements théoriques du traitement biologique des eaux. TEC et DOC, Vol.1, 1979.
- [18] **M. Sanaa**. microbiologie previsionnelle : principaux modeles de croissance utilises en appreciation quantitative des risques. Epidémiol. et santé anim, 41, pp.169-177,2002.
- [19] **S.-J. Wang, K.-C. Loh**. Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. Enzyme and Microbial Technology 25 (1999), pp.177–184.
- [20] <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/pp/aeruginosa.html>
- [21] <http://membres.lycos.fr/neb5000/BacteriologieI/Groupes%20Bacteriens/Pseudomonaceae.htm>
- [22] [http://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas\\_aeruginosa](http://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa)
- [23] <http://anne.decoستر.free.fr/bgn/pseudo.htm>
- [24] **R.Ruimy, A.Andremont**. Quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. Reanimation 13 (2004). pp 176-184
- [25] **W.W.Eckenfelder**. Gestion des eaux usées urbaines et industrielles. TEC et DOC Lavoisier, 1982.
- [26] La biodégradabilité des effluents urbains. Memotec n° 19 (2006), pages1-2.
- [27] **A.Benahmed Djilali (2006)**. Biodégradation du phénol par *Pseudomonas aeruginosa* immobilisé dans l'alginate de calcium. Magister, ENP.
- [28] **Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec**, Détermination de la demande chimique en oxygène dans les effluents : méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium. MA.315-DOC 1.0, Ministère de l'environnement du Québec, 14 p.
- [29] **U.Beshay, A.Desouky, H.Moawad, S.Zaki**. Phenol biodegradation by free and immobilized *Acinobacter*. Biotechnology letters 24. pp 1295-1297, 2002.
- [30] **A.P.Annachhatre, S.H.Gheewala**. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. Biotechnology Advances, Vol. 14, No. 1, pp. 35-56, 1996.
- [31] **G.Gonzalez, G.Herrera, Ma.T.Garcia, M.Pena**. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. Bioresource Technology 80 (2001), pp. 137-142
- [32] **P.Kumaran, Y.L.Paruchuri**. Kinetics of phenol biotransformation. Wat. Res. Vol.1, pp 11-22. 1997
- [33] **M. Afzal, S. Iqbal, S. R.Zafar, M. Khalid**. Characteristics of phenol biodegradation in Saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas*

pseudomallei. Journal of Hazardous Materials, Vol.149, Issue 1, October 2007,pp 60-66.

- [34] **Si-Jing Wang, Kai-Chee Loh.** Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. Enzyme and Microbial Technology 25 (1999), pp 177–184.

# Annexes

## Annexes

### **Annexe N°1: Composition du milieu de culture [34]:**

Pour la préparation d'un litre de milieu de culture, on introduit dans une fiole :

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 1.5 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  : 0.5 g
- $\text{NaCl}$  : 0.5 g
- $\text{MgSO}_4$  : 0.5 g
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$ : 3 g

On complète à 1 litre avec de l'eau distillée et on stérilise à l'autoclave. Puis on ajoute par filtration stérilisante :

- $\text{CaCl}_2$ : 0.02 g
- $\text{FeSO}_4$ : 0.02 g
- Phénol: 100 mg

### **Annexe N°2: Réactifs**

- **Dosage du phénol**

- Solution à 20 g/l de 4-amino-antipyrine, doit être conservée à l'obscurité, à l'abri de l'air et de l'humidité.
- Solution à 20 g/l de ferricyanure de potassium.
- Solution tampon qu'on prépare comme suite :

Pour 1 litre de solution, dissoudre dans 700 ml d'eau :

- 34 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 200 g de tartrate double de Na et K
- 15 ml de  $\text{NH}_3$  concentré

Compléter à 1 litre et ajuster le pH à 9.5 au pH-mètre avec de l'ammoniac concentré.

- **Mesure de la DCO**

- Solution de digestion :

Pour la préparation d'un litre de la solution de digestion, on procède comme suite :

Dissoudre 10.2 g de  $K_2Cr_2O_7$ , préalablement séché à  $105^\circ C$  pendant 2h, dans environ 500 ml d'eau. Ajouter doucement 167 ml de  $H_2SO_4$  et 33.3 g  $HgSO_4$ . Agiter jusqu'à dissolution complète, laisser refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- Réactif acide :

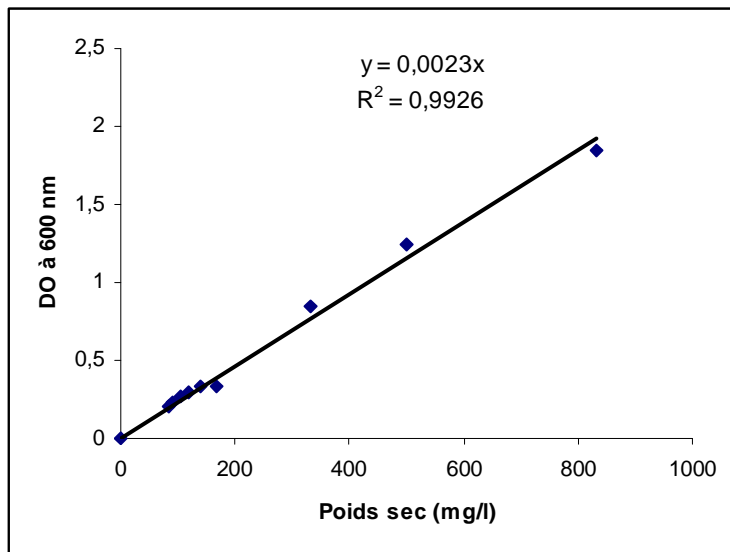
Dans une bouteille contenant 1 Kg de  $H_2SO_4$ , ajouter 5.5 g de  $Ag_2SO_4$ . Laisser reposer 1 à 2 jours afin que le  $Ag_2SO_4$  soit complètement dissous. La solution doit être conservée à l'obscurité.

**Annexe N°3: Matériel utilisé**

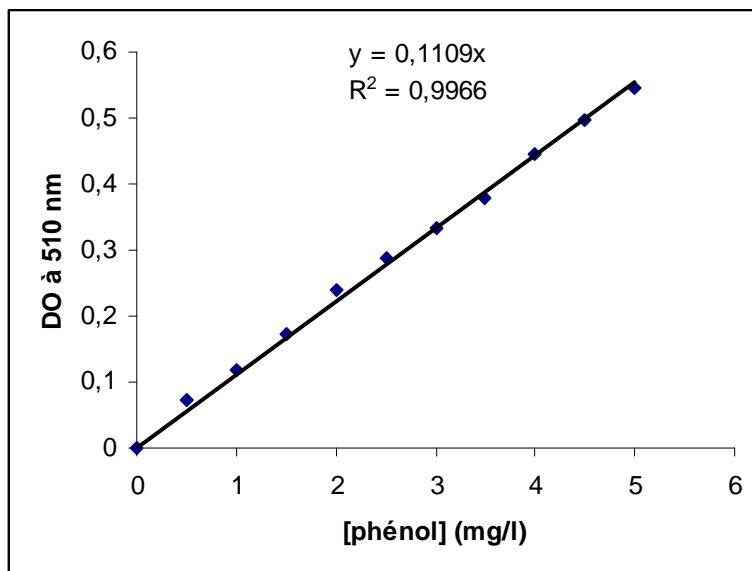
- Autoclave de marque CERTOCLAV
- Etuve de marque MEMMERT
- Spectrophotomètre UV/visible de marque SHIMADZU
- Erlenmeyer de 2 litre
- pH-mètre de marque HANNA
- Agitateur vortex de marque FISHER bioblock scientific
- Bloc chauffant à une température de  $150^\circ C$  de marque BIOBLOCK
- Eprouvettes 16 x 125 mm en verre
- Centrifugeuse de marque HATTICK
- Respiromètre de marque WTW OXITOP IS 6
- Plaque chauffante munie d'un agitateur de marque STUART
- Bec bunsen
- Micro filtres  $0.45 \mu m$
- Verrerie courante de laboratoire

**Annexe N°4: Les courbes d'étalonnage**

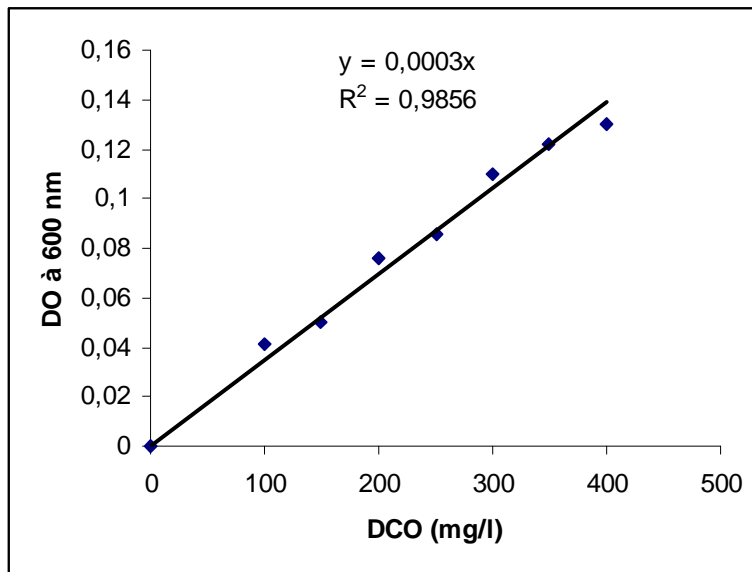
- La courbe d'étalonnage de la croissance bactérienne



- La courbe d'étalonnage du phénol



- La courbe d'étalonnage de la DCO



## ملخص:

تعتبر المعالجة البيولوجية للمياه الملوثة بالفينول طريقة فعالة للتخلص من هذه المادة السامة. في دراستنا هذه استخدمنا عدة طرق لمتابعة تطور التحلل البيولوجي للفينول من طرف بكتيريا بسودوموناس اريوجينوز. طرق التحليل المعتمدة هي معايرة الفينول الباقي في الوسط التجريبي بطريقة كيميائية تركز على تفاعله مع 4-أمينو انتيبيرين، متابعة النمو البكتيري، قياس كمية الأكسجين اللازمة للأكسدة الكيميائية (DCO) و الكمية اللازمة للأكسدة البيولوجية (DBO). سمحت كل هذه الطرق بمتابعة حركيات التخلص البيولوجي و باستنتاج خاصية التحلل البيولوجي الجيد للفينول في الشروط التجريبية المعتمدة.

**مفاتيح:** فينول، حركيات التخلص البيولوجي، بسودوموناس اريوجينوز، طرق معايرة التلوث

## Résumé :

Le traitement biologique des eaux contaminées par le phénol, s'avère être très efficaces. Dans le présent travail, nous avons analysé par différentes méthodes, la biodégradation du phénol par la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Ces méthodes sont : le dosage chimique du phénol résiduel par la 4-amino antipyrine ; la détermination de la croissance bactérienne ; la mesure de la demande chimique en oxygène DCO ; et la mesure de la demande biochimique en oxygène DBO. Toutes ces méthodes représentent bien la biodégradation et permettent d'évaluer le caractère biodégradable du phénol.

Par le test de traitabilité, par la mesure du rapport DCO/DBO ainsi que par les cinétiques de biodégradation, nous sommes arrivés à la conclusion que le phénol est biodégradable dans les conditions employées.

**Mots clés :** phénol, *Pseudomonas aeruginosa*, cinétique de biodégradation, méthodes d'évaluation de la pollution,

## Abstract :

The biological treatment of contaminated waters by the phenol, turns out to be very effective. In the present work, we have analyzed by various methods, the biodegradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. These methods are: the chemical dosage of the residual phenol by the 4-amino antipyrine; the determination of the bacterial growth; the measure of the chemical oxygen demand COD; and the measure of the biological oxygen demand BOD. All these methods represent well the biodegradation and allow estimating the biodegradable character of the phenol.

By the test of treatability, by the measure of the relationship COD / BOD as well as by the kinetics of biodegradation, we have concluded that the phenol is biodegradable in the used conditions.

**Keywords:** phenol, *Pseudomonas aeruginosa*, biodegradation kinetics, pollution evaluation's methods