

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITÉ SAÂD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des sciences de l'ingénieur  
Département de chimie industrielle**



## **MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

*En vue de l'obtention du diplôme de Master II*

*(LMD) en Génie des procédés*

**OPTION:** Procédés de Traitement des Effluents  
et Protection de l'environnement

**Thème :**

**Biodégradation du phénol à travers un biofiltre**

Réalisé par:

M<sup>lle</sup> **Jin Nàdia**

**Encadré par :**

Pr. M.W. Naceur.....**promoteur**

Mme. F. Kaidi .... **Co- Promotrice**

Promotion 2012- 2013

## Dédicaces

*Dédicace spéciale à mes parents*

*Mim António Kom et Duarte Maria José Alfredo !*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,  
l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu  
pour vous.*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et  
nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez  
consentis pour mon éducation et ma formation.*

*Je vous le dédie en témoignage de mon profond  
amour.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et  
vous accorder santé, longue vie et bonheur !*

*Je dédie également ce travail à mes frères et sœurs Hingino, Valdomar,  
Elsa, Amarildo et Carlos qu'ils retiennent que dans toute entreprise humaine  
seul l'effort est payant.*

*A mes grands- parents qui resteront à tout jamais dans mon cœur.*

*Mes pensées vont également au grand amour de ma vie, Alves Correia, qui  
m'a apporté un soutien considérable. Tu m'as aidé à être une meilleure  
personne que je ne sois déjà.*

*Je ne pourrais m'empêcher de penser à tous mes amis et connaissances qui ont  
eu une influence positive tant par leur soutien que par leurs conseils ; je pense  
ici à Armandine, Siana, Natércia, Jusceline, Chola Eudaldo et Général et  
tous les promotionnels de la spécialité PTEPE.*

*Nàdia*

## Résumé :

Ce travail est consacré à l'étude de la biodégradation du composé organique « phénol » par des bactéries autochtones dans un biofiltre où le support est un matériau local « terril de kenadsa » du sud ouest d'Algérie. A cet effet, des essais en batch et en biofiltre ont été entrepris. L'effet de l'acclimatation préalable des bactéries au phénol, ainsi que l'influence de la concentration initiale sur la cinétique de biodégradation ont été étudiées. La souche bactérienne *Pseudomonas* sp. adaptée préalablement au phénol avant sa mise en culture, a montré une meilleure disposition à le biodégrader pour une concentration initiale de 100 mg.L<sup>-1</sup> et ceci pendant 17 heures.

**Mots clés:** Phénol - Biodégradation - Bactérie autochtone - culture en batch – biofiltre.

## Abstract:

This work is devoted to study the biodegradation of organic compound « phenol » by indigenous bacteria in a biofilter where the carrier is a raw material (for the coal mine) located in the city of Kenadsa in the south west of Algeria. For this purpose, tests in batch and biofilter were undertaken. The effect of acclimatization of bacteria with phenol and the influence of the initial concentration on the biodegradation kinetics were studied. The bacterial strain *Pseudomonas* sp. adapted to phenol, showed greater biodegradation for an initial concentration of 100mg.L<sup>-1</sup>. in 17 hours.

**Keywords:** Phenol - Biodegradation - indigenous Bacteria –batch culture - biofiltre.

## ملخص :

هذا العمل مكرس لدراسة التحلل البيولوجي للمركب العضوي " الفينول " من طرف بكتيريا Autochtones في biofiltre مرشح عضوي، أين العامل هو أداة محلية " القنادسة – Terril بالجنوب الغربي للجزائر، لهذا تم انجاز اختبارات ب Batch و المرشح العضوي . و قد تم دراسة أثر L'acclimatation المسبقة لبكتيريا الفينول و كذا تأثير التركيز الابتدائي على حركية التحلل البيولوجي . الفصيلة البكتيرية *Pseudomonas* sp المتأقلمة مسبقا مع الفينول قبل زراعتها، بينت جاهزية مثلى للتحليل البيولوجي من أجل تركيز ابتدائي يساوي 100 مع. ل<sup>-1</sup> و هذا لمدة 17 ساعة .

شرح المفردات : الفينول - التحلل البيولوجي - بكتيريا ال - اختبارات ب Batch - Biofiltre .

## Remerciements

Dieu merci pour le courage et la volonté sans lesquels mon travail n'aurait jamais pu voir la lumière de ce jour.

Je voudrais exprimer mes remerciements à,

**Monsieur le Professeur M.W. Naceur**, qui m'a donné la possibilité d'effectuer ce projet de fin d'étude. Je le remercie vivement pour m'avoir apporté un appui constant, pour son soutien, ses orientations, sa disponibilité et ses remarques fructueuses. Nulle expression ne va pouvoir traduire les sentiments de considération que j'éprouve envers lui.

**Madame F. Kaidi**, d'avoir accepté de co-encadrer ce travail. Je la remercie également pour sa contribution, son assistance et son aide technique nécessaire qui m'a fait bénéficier de toute son expérience dans le domaine microbiologique, sans ses réunions précieuses je n'aurais pu assimiler cette partie pour la réalisation de ce mémoire. C'est un véritable bonheur de travailler à ses côtés. Qu'elle trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Mes vifs remerciements vont également aux membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par leurs propositions.

Au personnel de la Division Bioénergie et Environnement du Centre de Développement des Energies Renouvelables (CDER). Bouzaréah, pour m'avoir accordé un stage pratique et accueilli avec gentillesse dans leur laboratoire de recherche.

J'adresse également mes remerciements à tout le personnel du département de la Chimie industrielle, les professeurs, les doctorants, les collègues, les fonctionnaires et en particulier le technicien du laboratoire 206 Mr Rachid, pour leur disponibilité et sympathie qui a permis la réalisation de ce travail dans une ambiance agréable.

Et sans oublier à tous les travailleurs de la Cité 07 un IMMENSE MERCI pour l'accueil durant mon séjour en Algérie.

Je présente également mes sincères remerciements à ma famille en particulier oncle et tante José et Hinginia Dumba. Merci pour votre appui.

Enfin, que tous ceux qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce travail et à la réalisation de ce mémoire trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus profonds.

Merci à ceux que j'ai manqué de citer.

## **SOMMAIRE**

<b>I.1.Introduction générale</b>	<b>1</b>
----------------------------------	----------

### **CHAPITRE I**

#### **ETAT DE L'ART**

<b>I. Généralités sur le phénol</b>	<b>3</b>
<b>I.1. Définition</b>	<b>3</b>
<b>I.2. Origines et propriétés du phénol</b>	<b>3</b>
<b>I.2.1. Origines</b>	<b>3</b>
<b>I.2.2. Propriétés physico-chimiques du phénol</b>	<b>3</b>
<b>I.3. Source de contamination</b>	<b>4</b>
<b>1.4. Toxicité par le phénol</b>	<b>5</b>
<b>I.5. Impacts environnementaux</b>	<b>5</b>
<b>I.6. Procédés de traitement des eaux polluées par le phénol</b>	<b>6</b>
<b>I.6.1. Introduction</b>	<b>6</b>
<b>I.6.2. Biodégradation du phénol</b>	<b>7</b>
<b>I.6.3. Les microorganismes dans la biodégradation du phénol</b>	<b>7</b>
<b>I.6.4. Mécanisme de biodégradation du phénol</b>	<b>8</b>
<b>I.7. La croissance bactérienne</b>	<b>9</b>
<b>I.7. 1. Conditions de la croissance bactérienne</b>	<b>9</b>
a- <b>Besoins nutritifs</b>	<b>9</b>
<b>a-1. Besoins élémentaires</b>	<b>10</b>

<b>a-2. Besoins énergétiques</b>	<b>10</b>
<b>I.7. 2. Les facteurs influençant la croissance bactérienne</b>	<b>10</b>
<b>a- La température</b>	<b>10</b>
<b>b- Le pH</b>	<b>11</b>
<b>c- La concentration du substrat</b>	<b>11</b>
<b>d- La concentration d'oxygène dissous</b>	<b>12</b>
<b>I.8. Cinétique de la croissance bactérienne</b>	<b>12</b>
<b>I.8. 1. Les différentes phases de la croissance bactérienne</b>	<b>12</b>
<b>I.8. 2. Taux de croissance bactérienne</b>	<b>13</b>
<b>I.9. Réacteurs utilisés dans la biodégradation</b>	<b>14</b>

## **CHAPITRE II**

### **LES PROCEDES DE BIOFILTRATION**

<b>II. Procédés combinés</b>	<b>16</b>
<b>II.1. Généralités</b>	<b>16</b>
<b>II.2. La biofiltration</b>	<b>16</b>
<b>II.2.1. Les Biofiltres</b>	<b>16</b>
<b>II.2.2.1. Intérêt du Biofiltre</b>	<b>17</b>
<b>II. 3. Le Biofilm</b>	<b>17</b>
<b>II.3.1. Définition</b>	<b>18</b>
<b>II.3.2. Principales propriétés des biofilms</b>	<b>18</b>
<b>II.3.3. Comportement des micro-organismes en biofilm</b>	<b>18</b>
<b>II.3.4. Formation des biofilms</b>	<b>19</b>
<b>II.3.5. Facteurs influençant la formation et l'activité des biofilms</b>	<b>20</b>

<b>II.3.5.1. Caractéristiques des micro-organismes</b>	<b>21</b>
<b>II.3.5.2. Effet de la vitesse de circulation du fluide</b>	<b>21</b>
<b>II.3.5.3. Le support du biofilm</b>	<b>21</b>
<b>II.4. Immobilisation des cellules pour la dégradation du phénol</b>	<b>22</b>
<b>II.5. Valorisation du terril de Kenadsa pour le traitement des eaux</b>	<b>23</b>
<b>II.5.1. Introduction</b>	<b>23</b>
<b>II.5.2. Le terril</b>	<b>23</b>
<b>II.5.3. Origine et répartition</b>	<b>23</b>
<b>II.5.4. Caractéristiques du support</b>	<b>24</b>
<b>II.5.4.1. Analyse granulométrique</b>	<b>24</b>
<b>II.5.4.2. Taille effective</b>	<b>24</b>
<b>II.5.4.3. Coefficient d'uniformité</b>	<b>25</b>
<b>II.5.4.4. Equivalent de sable</b>	<b>25</b>
<b>II.5.4.5. Masse volumique</b>	<b>25</b>
<b>II.5.4.6. Porosité</b>	<b>25</b>
<b>II.5.4.7. Surface spécifique</b>	<b>26</b>
<b>II.5.4.8. Diffraction des rayons X (DRX)</b>	<b>26</b>

### **CHAPITRE III**

#### **MATERIELS ET METHODES**

<b>III.1. Matériels</b>	<b>27</b>
<b>III.1.1. Microorganismes</b>	<b>27</b>
<b>III.1. 2. Milieu de conservation</b>	<b>27</b>
<b>III.1. 3. Milieu de pré-culture</b>	<b>27</b>

III.1.4. Milieu de culture	27
III.1.5. Source de carbone	28
III.1.6. Le Support	28
III.1.7. Description du dispositif expérimental	29
II.2. Procédure expérimentale	30
III.2.1. Essais de la granulométrie	30
III.2.2. Détermination de la masse volumique apparente du terril	31
III.2.3. Détermination de la masse volumique absolue du terril	32
III.2.5. Essai d'équivalent de sable	33
III.2.6. Essai de DRX	34
III.2.7. Préparation de la biomasse	35
III.2.8. Adaptation de <i>Pseudomonas</i> sp. au phénol	35
III.2.9. Essais en batch pour la biodégradation du phénol	35
III.3. Dosage du phénol	36
III.4. Mesure de la densité bactérienne	36

## CHAPITRE IV

### RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Caractéristiques physico-chimiques du support	37
IV.1.1. Analyse granulométrique	37
IV.1.2. Composition minéralogique (DRX) du terril	39
IV. 2. Biodégradation du phénol en mode batch	41
IV. 2. 1. Cinétique de la croissance de <i>Pseudomonas</i> sp.	41
IV.2. 2. Biodégradation du phénol avec des bactéries non acclimatée	42
IV.3. Acclimatation de <i>Pseudomonas</i> sp. pour la dégradation du phénol	44

<b>IV. 3. 1: Réactivation de la souche <i>Pseudomonas</i> sp.</b>	<b>46</b>
<b>IV.3.2. Effet de l'acclimatation des bactéries au phénol sur la biodégradation</b>	<b>46</b>
<b>IV.4. Effet de la concentration sur la biodégradation du phénol</b>	<b>48</b>
<b>IV .5. La formation du biofilm pour la mise en application du procédé de la biodégradation du phénol</b>	<b>50</b>
<b>Conclusion</b>	<b>52</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexe</b>	

# Références Bibliographiques

# Introduction et problématique

# Chapitre I

## Etat de l'art

# Chapitre II

## Les procédés de biofiltration

# Chapitre III

## Matériels et Méthodes

# Chapitre IV

## Résultats et discussion

# Conclusion générale

# Sommaire

Annexe

## **Référence bibliographiques**

- [1] : A. Hamitouche (2012). Dégradation de polluants organiques par biofiltres, thèse de doctorat, université Hourii Boumediene.
- [2] : B. O. Opeolu, O. S. Fatoki et J. Odendaal. (2010). Development Of A Solid-Phase Extraction Method Followed By HPLC-UV Detection for The determination of Phenols In Water, *International Journal Of The Physical Sciences*, 5(5): 576-581.
- [3] : M. Ferhan, Z. Amed, S. Riazuddin, M.I. Rajoka et A.M. Khalid (2002). Estimation and removal of phenol in pharmaceutical industrial effluents from paracetamol and aspirin manufacturing units, *online journal of Biological sciences*, 2: 587-590.
- [4] : C. Indu Nair, K. Jayachandran et Shankar hashidhar (2008). Biodegradation of phenol, *African Journal of Biotechnology*, 7 (25): 4951-4958.
- [5] : A. Draffi (2008). Biodégradation des crésols par le microbiote des eaux usées de la ville de Constantine, thèse de magister, Département de Biochimie et de Microbiologie, Université Mentouri Constantine.
- [6] : J. Michałowicz, W. Duda. (2007). Phenols – Sources and Toxicity, *Polish J. of Environ. Stud*, university of łódź, Poland, 16, No. 3: 347-362.
- [7] : A. Daffri S.R. Noumeur S. Guenoune H. Bousseboua (2008). Cinétique de la biodegradation du m-cresol par le microbiote des eaux usées de la ville de Constantine, *Sciences & Technologie, A – N°27 Volume-B*, 85-89.
- [8] : N. Bonnord, M.-T. Brondeau, D. Jargot, D. Lafon, S. Miraval, O. Schneider(2008). Fenol. Fiche toxicologique, Institut National de Recherche et de Sécurité
- [9] : Dr. M.J. Khalil et N.Singh (2012). Mathematical model and parameter analysis of phenol degradation in biofilter, *International Journal of Science, Environment and Technology*, 1(4): 341 - 357.
- [11]: D. Singh et M. H. Fulekar. (2007). Bioremediation of phenol using microbial consortium in bioreactor, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 1: 31 – 36.
- [12] : B. Marrot, A. Barrios-Martinez, P. Moulin, N. Roche (2006). Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor, *Biochemical Engineering Journal*, 30: 174–183.
- [13] : A. Bousseboua, D. S. R. N. S. G. H. (2008). Cinétique de la biodegradation du m-cresol par le microbiote des eaux usées de la ville de constantine, *sciences et technologie, A B*: 85-89.
- [14] : I. Limam., A. G., Mohamed Ridha Driss , Laurent Mazeas (2010). Étude de la dégradation du phénol lors de la digestion anaérobie: optimisation d'une méthode d'analyse du phénol par spme-cg-sm iet mise en évidence de sa minéralisation par une approche isotopique, *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 12: 63-70

[15] L.C.Stéphane,(2004). Etude en laboratoire de la dégradation photochimique de polluants organiques persistants et mesures de leurs constantes de Henry.

[16] : M H. El-Naas, A. S. Al-Muhtaseb, S. Makhoulf (2009). Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel, journal of Hazardous Materials, 164: 720–725.

[18] : Décret exécutif n° 06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 Avril (2006), définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels, Journal officiel de la republique algerienne, N° 26.

[19] : A . M. Hannaford et C. Kuek, (1999). Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*., Journal of Industrial Microbiology & biotechnology 22(2): 121-126.

[20] : A. Ullhyan et U. K. Ghosh, (2012). Biodegradation of phenol with immobilized *Pseudomonas putida* activated carbon packed bio-filter tower, African Journal of Biotechnology, 11(85): 15160-15167.

[21] :Y. H. C. Wei, W. C.Chang, S. M. Chen, B. Y. (2010). Exploring Kinetics of Phenol Biodegradation by *Cupriavidus taiwanesis* 187, Int J Mol Sci, 11(12): 5065-5076.

[22] : P. H. Howard (1989). Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals, Large production and priority pollutants, Lewis Publishers, Boca Raton (Floride), Volume 1, 476.

[23] : P. Howard, R. Boethling,W. Jarvis,W. Meylan et E. Michalenko. 1991, Handbook of environmental degradation rates, Lewis Publishers, Boca Raton (Floride).

[24] : W.-Y. Shiu, K.-C. Ma, D. Varhanickova et D. Mackay.(1994). Chlorophenols and alkylphenols: a review and correlation of environmentally relevant properties and fate in an evaluative environment, Chemosphere,29: 1155–1224.

[25] : H. H. Tabak, C.W. Chambers et P.W Kabler. (1964). Microbial metabolism of decomposition of phenolic and aromatic hydrocarbons by phenol-adapted bacteria, J.Bacteriol, 87:910-919.

[26] : V. Sridevi, M. V. V. C. Lakshmi, M. Manasa, M. Sravani (2012). Metabolic pathways for the biodegradation of phenol, International journal of engineering science & advanced technology, 2(3): 695 – 705.

[27] : D. Das (2010). Treatment of industrial effluents using mixed culture of microorganisms in a bioreactor. thesis of master, departement of biotechnology and medical engineering, National Institute of Technology, Rourkela

[28] : A. A Krastanov, Zlatka et H. Yemendzhiev (2013). Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives, Engineering in Life Sciences, 13(1): 76-87.

- [29] : M. Nicolas (2003). Ecoulements dans les milieux poreux, thèse de doctorat, Université de Provence, Marseille.
- [30] : S. Dalal, R.R. Pandey et R.C. Dubey. Bacterial Degradation of Phenol and Cyanide from Industrial Wastewater.
- [31] : B. R. Folsom, I. P. J. C., et P. H. Pritchard (1990). Phenol and Trichloroethylene Degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: Kinetics and Interactions between Substrate, 56(5): 1279-1285
- [32] B. Hoyle, K. Scow, et al. (1995). Effect of carbon:nitrogen ratio on kinetics of phenol biodegradation by *Acinetobacter johnsonii* in saturated sand, Biodegradation, 6(4): 283-293.
- [33] : A. Kumar, S. K., S. Kumar (2004). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194, Biochemical Engineering Journal, 22:151–159.
- [34] : F. M. Duffner, U.Kirchner, M.P. Bauer, R. Muller (2000). Phenol/cresol degradation by the *thermophilic Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway, Gene, 256: 215–221.
- [35] : U. W. Kirchner, A. H. Muller, R. van Berkel, W. J. (2003). Phenol hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a two-protein component monooxygenase with a dual role for FAD, J Biol Chem, 278(48): 47545-47553.
- [36] :K. F. Reardon, D. C. M, Julia D. Bull Rogers (2000). Biodegradation Kinetics of Benzene Toluene, and Phenol as Single and Mixed Substrates for *pseudomonas putida* F1, Biotechnology and bioengineering, 69 (4): 385-400.
- [37] : G. Annadurai., M.S. Balan. et T. Murugesan (2000a). Desin of experiment biodegradation of phenol using immobilized *pseudomonas pictorium* NICM-2077 on activated carbon. Bioproc Eng, 22:101-107.
- [38] : G. Annadurai, L. Y. Ling et J-F. Lee (2007). Biodegradation of phenol by *Pseudomonas pictorium* immobilized with chitin, African Journal of Biotechnology 6 (3): 296-303.
- [39] : M.B. Prieto, A. Hidalgo, F.C Rodrigue, J.L.Serra et M.J. Llama (2002). Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastwater by *Rhodococcus erythropicus*. UPV-1 immobilized in air-stirred reactor with clarifier, Appl. Microbiol.Biotechnol, 58:683-851.
- [40] : D. A.-El-Haleem, U. B., Abdu O. Abdelhamid, H. Moawad et S. Zaki (2003). Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter* sp. strain W-17, African Journal of Biotechnology, 2 (1): 8–12.
- [41] : S. S. C. Aday, , M. Y. Lee, D. J. Ren, N. Q. (2007). Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granules, chemosphere, 67: 1566-1572.
- [42] : K. Arutchelvan, Elangovan, R Nagarajan, S Muralikrishnan, V (2006). Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*, Biochemical Engineering Journal, 9, 129(1): 216-222.

- [43] : M. Mailin, et F., Razili (2007). The kinetics of phenol degradation by immobilized *pseudomonas* sp in a repeated-batch process, *malays. appl. biol*, 36(1): 73–78.
- [44] : P. Saravanan, K. Pakshirajan, P. Saha (2011). Kinetics of phenol degradation and growth of predominant *Pseudomonas* species in a simple batch stirred tank reactor, *Bulgarian Chemical Communications*, 43 n° 4: 502 – 509.
- [45] : P. Saravanan, K. Pakshirajan, Prabirkuma Saha (2008). Performance of Batch Stirred Tank Bioreactor and Internal Loop Airlift Bioreactor in Degrading Phenol using *Pseudomonas spp.*-A Comparative Study, *Journal of environmental protection science*, 2: 81 – 86.
- [46] : K. M.Khleifat (2007). Biodegradation of Phenol by *Actinobacillus* Sp.: Mathematical Interpretation and Effect of Some Growth Conditions, *Bioremediation Journal*, 11(3): 103-112.
- [47] : S. E. Agarry, B. O. Solomon et S. K. Layokun (2008). Optimization of process variables for the microbial degradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology, 7 (14): 2409-2416.
- [48] : A. Puerto-Tello, J. C. Moreno-Piraján., A. M. Guzmán, M. E. Escudero, L.Velázquez, L.G. et K. Sapag (2009). Decomposition of phenol by *pseudomonas aeruginosa* immobilized on activated carbons, *j. environ. eng. manage.*, 19(2): 73-78
- [49] : D. Hank, N. saidani, A. Namane et A. Hellal (2010). Batch phenol biodegradation study and application of factorial experimental design, *Journal of Engineering Science and Technology Review*, 3 (1) 123-127.
- [50] : S. E. Agarry, B. O. Solomon et T. O. K. Audu (2010). Substrate utilization and inhibition kinetics: Batch degradation of phenol by indigenous monoculture of *Pseudomonas aeruginosa*, *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, 1(2): 22-30.
- [51] : N. Prasanna , N. Saravanan et P. Geetha ,M.Shanmugaprakash et P. Rajasekaran (2008). Biodegradation of Phenol and Toluene by *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*,and *Staphylococcus sp.*, Isolated from Pharmaceutical Industrial Effluent, *Research Article*, 20-24.
- [52] : S. Singh, B. B. Singh. et R. Chandra. (2009). biodegradation of phenol in batch culture by pure and mixed strains of *paenibacillus sp. and bacillus cereus*, *polish journal of microbiology*, 58 N°4: 319- 325.
- [53] : P. M. Tuah , N. A. A. Rashid. M. M. Salleh (2009). Degradation pathway of phenol through ortho-cleavage by *Candida tropicalis* RETL-Cr1, *Borneo science*, 24: 1-8
- [54] : K.-L. Ho , L. Bin, Chen, Yu-You et D.-J. Lee (2009). Biodegradation of phenol using *Corynebacterium sp.* DJ1 aerobic granules, *Bioresource technology*, 100(21): 5051-5055.

[55] : P. Christen, S. Davidson., Y. Combet-Blanc, R. Auria (2010 ). Phenol biodegradation by the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* 98/2 in a fed-batch bioreactor, Springer Science+Business Media.

[56] : N. Suhaila, Y. Ariff, A. M. Rosfarizan, et A. Latif, I., Ahmad, S.A., Norazah, M.N., Shukor, M.Y.A (2010 ). Optimization of Parameters for Phenol Degradation by *Rhodococcus* UKM-P in Shake Flask Culture, Proceedings of the World Congress on Engineering, I: 4.

[57] : G. Gurujeyalakshmi et P. Oriel (1989). Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase, Appl. Environ. Microbiol., 55(2):500.

[58] : D. Debadatta and K. Rajdeep (2012). Biodegradation of phenol by various indigenous microorganisms, 7 No. 2A,: 1009-1015.

[59] : K. M. Basha, A. Rajendran et V. Thangavelu (2010). Recent advances in the Biodegradation of Phenol: A review, Asian J. Exp. Biol. Sci, 1 (2): 219-234.

[60] : S. Mbaye, (2011). Couplage hydrodynamique-biomasse dans les procedes de depollution l'université de grenoble, thèse de doctorat, Université de Grenoble.

[61] : H. Bougherara (2011). La biodegradation par culture mixte en reacteur batch, mémoire de magister, departement de chimie, Université Mentouri Constantine.

[62] : S. Hemidouche (2008). Etude de la dégradation du phénol aux milieu aqueux par une bactérie acclimatée appartenant au genre *pseudomonas*. Mémoire de Magistère, Génie de l'environnement, F.G.M.G.P, USTHB.

[63] : S. G. Derveaux, (2004). Etude d'un traitement combiné bio-physico-chimique pour la décontamination des eaux polluées en atrazine, thèse de doctorat, L'institut national des sciences appliquées de Lyon.

[64] : S. hakraborty, T. Hattacharya, T. N. Patel. et. K. K. Iwari (2010). Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from coke processing wastewater, Journal of Environmental Biology, 31: 293-296.

[65] : M. Bajaj, C. Gallert, J. Winter (2009). Phenol degradation kinetics of an aerobic mixed culture, Biochemical Engineering Journal, 46: 205–209.:

[66] : F. Amrouche, A. Namane et A. Hellal (2011). Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones librement suspendus dans un réacteur batch, Revue des Energies Renouvelables, 14 (3): 533 – 541.

[67] : R. Pishgara, G. D. Najafpourb, N. Mousavia, Z. Bakhshia, M. Khorram(2012). Phenol Biodegradation Kinetics in the Presence of Supplementary Substrate, IJE Transactions B: Applications, 25, No. 3, 181-191.

[68] J.C. Augustin (2005). Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments. Mémoire d'habilitation à diriger des recherches. Université Paris XII Val de Marne.

- [69] : E. I.García-Peña, P. Zarate-Segura, P. Guerra-Blanco, T. Poznyak, I. Chairez (2012). Enhanced Phenol and Chlorinated Phenols Removal by Combining Ozonation and Biodegradation, *Water Air Soil Pollut*, 223: 4047-4064.
- [70] : S. Mukherjee et S. Dey (2010). Performance and kinetic evaluation of phenol biodegradation by mixed microbial culture in a batch reactor, *International Journal of Water Resources and Environmental Engineering*, 2(3): 40-49
- [71] : V. P. Ravi. R2 (2012). Biodegradation of phenol using mixed cultures, *International Journal of Bioprocess Technology*, 1(1): 1-6.
- [72] : Beshay, U. A.-E.- Haleem, D. Moawad, and Hassan S. Zaki (2002). Phenol biodegradation by free and immobilized *Acinetobacter*, *Biotechnology Letters*, 24(15): 1295-1297.
- [73] : W. Ying, T. Ye, H. Bin, Z. Hua-bing, B. Jian-nan, C. Bao-li (2006). Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter sp.* strain PD12, *Journal of Environmental Sciences*, 19:222-225.
- [74] : Z. Bakhshi, , G. Najafpour, et al. (2011). Growth kinetic models for phenol biodegradation in a batch culture of *Pseudomonas putida*, *Environmental Technology*, 32(16): 1835-1841.
- [75] : J.W. Costerton, Z Lewandowski., D.E.Caldwell, D.R Korber., and H.M. Lappin-Scott, 1995. *Microbial Biofilm*. *Annu Rev Microbiol.*, 49:711-745.
- [76] : N. Boutaleb (2007). Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable, thèse de doctorat, Université de Bretagne-Sud.
- [77] : Jouenne T. (2008). Biofilms bactériens. *Techniques de l'ingénieur*, BIO600.
- [78] C. picard, (2011). Transfert de matière dans un biofilm aéré sur membrane, thèse de doctorat, Université de Toulouse,
- [79] : L. F. Melo, (1997). Biofouling in Water Systems, *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14: 375-381.
- [80] : L. F.Melo, (1994). biofilm e o controle da população, *biotecnologia*, 48:10:25.
- [81] : S Parot,. (2007). Biofilms électroactifs: formation, caractérisation et mécanismes, thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de toulouse.
- [82] : G. A. O'Toole et R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for pseudomonas aeruginosa biofilm development, *Molecular Microbiology*, 30(2): 295-304.
- [83] D: Wall. and D.Kaiser, 1999. Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.*, 32:1-10.

[84] : A. Filloux et I. Vallet (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne, médecine sciences, 19, n° 1: 77-83.

[85] : M.-S. Chou et W-H Cheng (1997). Screening of Biofiltering Material for VOC Treatment, Journal of the Air & Waste Management Association, 47(6): 674-681.

[86] : F. Amrouche, A. Namane et A. Hellal. Biodégradation du phénol par des bactéries Autochtones immobilisées par inclusion dans l'alginate de calcium : Influence des conditions de réalisation des billes, 1-6.

[87] : H. M. Jena, G. K. Roy et. B. C. Meikap (2005). Comparative Study of Immobilized Cell Bioreactors for Industrial Wastewater Treatment

[88] : M. Misson et F. Razali (2007). Immobilization of phenol degrader *pseudomonas sp* in repeated batch culture using bioceramic and sponge as support materials, journal teknologi, jurnal teknologi, 49: 51-59.

[89] : Amine, K. M. (2012). Contribution à la valorisation des matériaux locaux destinés au prétraitement des eaux usées, Thèse de Magistère, Université de Béchar.

[90] : R. Dupain; K. Lanchon et J.C.Saint-Arroman (2004). Granulats, sols, ciment et Bétons: caractérisation des matériaux de génie civil par les essais de laboratoire. 3<sup>e</sup>. édition.

## Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail est de dégrader un polluant organique modèle qui est le phénol, en développant une technique de biodégradation utilisant des biofiltres constitués de culture bactérienne pour l'application en traitements des effluents contaminés par ses polluants organiques.

La première partie de l'étude s'est consacrée à la caractérisation du support biologique (terril de Kenadsa). Le terril a été choisi comme support à cause de ses avantages économiques et sa disponibilité dans la région sud ouest d'Algérie. Les résultats obtenus de diverses analyses (masse volumique, porosité, coefficient d'uniformité, surface spécifique) ont montré son efficacité afin de l'utiliser en tant que support filtrant biologique pour le traitement des eaux.

La technique de biodégradation a été employée dans ce travail à des fins environnementales, qui consiste en l'élimination du phénol par des bactéries en mode batch. Les essais de biodégradation montrent une faible croissance de *Pseudomonas* sp. sur le phénol comme seule source de carbone, ce qui a conduit à des essais d'adaptation de la bactérie au polluant organique « le phénol » et par conséquent comprendre le concept « acclimatation ».

Les résultats obtenus ont permis de conclure que :

- L'acclimatation des cellules bactériennes est une étape primordiale pour le processus de biodégradation;
- Les cellules acclimatées ont une grande aptitude à dégrader le phénol par rapport aux bactéries non adaptées.

Les essais d'acclimatation ont montré que l'adaptation préalable de *Pseudomonas* sp. au phénol présentait un meilleur taux de biodégradation, dans un milieu minéral de base (MMB) contenant du phénol comme seule source de carbone et d'énergie comparativement aux bactéries non adaptées. L'étude de la biodégradation du phénol a été conduite en conditions optimales établie (T= 30°C et pH = 7).

En plus, l'étude de l'effet de la concentration initiale du phénol a montré qu'une faible concentration ou celles inférieures à  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  sont facilement dégradées par rapport à des concentrations plus élevées.

La formation du biofilm par *Pseudomonas* sp. immobilisée dans le terril a été observé pour la mise en application du procédé de la biodégradation du phénol. Ce qui conduit à la valorisation d'un matériau local disponible pour son utilisation comme support du biofilm.

Vu l'importance de ce domaine, l'investigation de nombreuses pistes d'études peuvent être envisagées pour poursuivre ces travaux. Par ailleurs, d'autres polluants organiques peuvent être étudiés, ainsi que la biodégradation du phénol et de ses dérivés à l'aide de cellules immobilisées et leur mise en œuvre dans différentes configurations, en mode batch, en réacteur à lit fluidisé ou encore en réacteur torique, mérite également être étudiés.

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau I.1 :</b> Caractéristiques physico-chimiques du phénol	<b>4</b>
<b>Tableau I.2 :</b> Dégradation de phénol par divers micro-organismes	<b>7</b>
<b>Tableau I.3 :</b> Différents réacteurs utilisés pour la biodégradation du phénol	<b>14</b>
<b>Tableau III.1 :</b> Composition du milieu de culture (MMB)	<b>28</b>
<b>Tableau IV.1:</b> Caractéristiques du terril de Kenadsa	<b>38</b>
<b>Tableau IV.2 :</b> La composition minéral du de la fraction 1.25 mm terril.	<b>39</b>
<b>Tableau IV.3 :</b> La composition minérale du mélange du terril.	<b>39</b>

## Liste des figures

<b>Figure I.1 :</b> Structure chimique du phénol	<b>3</b>
<b>Figure I.2 :</b> Métabolites et enzymes des deux chemins oxydatifs « méta » et « ortho » pour la dégradation du phénol	<b>9</b>
<b>Figure I.3:</b> Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases	<b>13</b>
<b>Figure II.1:</b> Développement idéal d'un biofilm	<b>19</b>
<b>Figure II.2 :</b> Etapes de formation d'un biofilm	<b>20</b>
<b>Figure II.3 :</b> Terril de Kenadsa	<b>24</b>
<b>Figure III.1:</b> Terril de diamètre 1,25mm.	<b>28</b>
<b>Figure III.2 :</b> Schéma du dispositif de biofiltration	<b>29</b>
<b>Figure III.3 :</b> Dispositif experimental	<b>30</b>
<b>Figure III.4:</b> Photo de la colonne de tamis.	<b>31</b>
<b>Figure III.5 :</b> Essai de la masse volumique apparente.	<b>32</b>
<b>Figure III.6 :</b> Essai de masse volumique absolue.	<b>33</b>
<b>Figure III.7 :</b> Essai d'équivalent de sable.	<b>34</b>
<b>Figure III.8:</b> Essais d'acclimatation et biodégradation du phénol en Erlenmeyers	<b>36</b>
<b>Figure IV.1:</b> Représentation de l'analyse granulométrique	<b>38</b>
<b>Figure IV.2 :</b> Diagramme DRX du terril de la fraction 1.25 mm.	<b>40</b>
<b>Figure IV.3 :</b> Diagramme DRX du mélange du terril de kenadsa	<b>40</b>
<b>Figure IV. 4 :</b> Croissance bactérienne en fonction du temps dans le MMB.	<b>41</b>
<b>Figure IV.5 :</b> Cinétique de croissance de <i>Pseudomonas</i> sp. avec une concentration de 10 mg.L <sup>-1</sup> .	<b>42</b>
<b>Figure IV.6 :</b> Cinétique de croissance de <i>pseudomonas</i> sp. avec une concentration de 100 mg.L <sup>-1</sup> .	<b>43</b>
<b>Figure IV.7 :</b> Acclimatation des cellules bactériennes pour l'adaptation au phénol.	<b>45</b>
<b>Figure IV.8 :</b> Réactivation de <i>Pseudomonas</i> sp. acclimatée sur boîte de pétri.	<b>46</b>
<b>Figure IV.9 :</b> Biodégradation du phénol par des bactéries acclimatées (a) milieu renouvelé, (b) boîte de pétri, P <sub>hénol</sub> = 100mg.L <sup>-1</sup> .	<b>47</b>
<b>Figure IV.10 :</b> Effet de la concentration du phénol sur la dégradation (a) et (b) a= 10mg.L <sup>-1</sup> et b= 500mg.L <sup>-1</sup> .	<b>49</b>

<b>Figure IV.11 :</b> (a) début de la formation du biofilm	
(b) augmentation de la hauteur du biofilm 3cm	<b>50</b>
<b>Figure IV. 12 :</b> Biodégradation du phénol dans le réacteur.	<b>51</b>

## Liste des abréviations

**Pops:** Polluants organiques persistantes

**EPS:** Substances polymériques extracellulaires

**Mct :** Masse capsule et terril

**Mc :** Masse de la capsule

**ES :** Equivalent de sable

**DRX:** Diffraction des rayons X

**CDER :** Centre de Développement des Energies Renouvelables

**M.C :** Milieu de conservation

**M.P.C :** Milieu de pré-culture

**MMB:** Milieu minéral de base

**D.O:** Densité optique

**C.U:** Coefficient d'uniformité

**GN:** Gélose nutritive

**μ:** Taux de croissance

**B.P:** Boite de pétri

**Ren:** Renouvellement

**SAB :** Simultaneous Adsorption and Biodegradation

**BIM :** Immersed Membrane Bioreactor

**CAG:** Charbon Actif en Grain

## I. Généralités sur le phénol

### I.1. Définition

Le phénol est un composé organique simple de formule brute  $C_6H_6O$ , caractérisé par un noyau benzénique lié à un groupe hydroxyle (OH) [3], dont la formule développée est représentée dans la Figure I.1. C'est l'un des plus communs polluants de l'environnement.

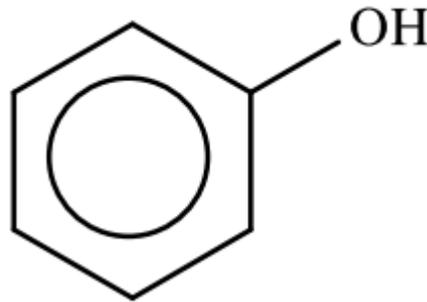


Figure I.1 : Structure chimique du phénol.

### I.2. Origines et propriétés du phénol

#### I.2.1. Origines

L'origine du phénol dans l'environnement est à la fois naturelle et industrielle [4]. Le phénol est présent dans les goudrons d'houille ou dans le pétrole [5]. On le trouve aussi dans les déchets organiques végétaux et animaux, en raison de la décomposition [6]. Le phénol est naturellement présent dans de nombreuses substances telles que le thé, le vin, les aliments fumés, etc. aussi dans les huiles essentielles de diverses plantes (fleurs de yucca gloriosa, jasmin, lys, conifères, santal, thymol, vanille, eugénol, acide gallique,...). Les phénols commercialisés sont des sous-produits de la distillation fractionnée du pétrole brut et du goudron de houille [1].

#### I.2.2. Propriétés physico-chimiques du phénol

Le phénol se présente sous forme d'un solide cristallin blanc à la température ambiante (o-crésol et p-crésol) ou de liquide incolore épais (m-crésol). En présence de l'air, la couleur de ses composés vire au brun. Il possède une odeur particulière, à la fois âcre et douceâtre, il est miscible avec de nombreux solvants organiques tels que l'éthanol, l'acétone et l'oxyde de diéthyle [1, 7]. En présence d'impuretés d'eau ou de lumière, le phénol se teint en rose ou rouge.

Le phénol est un acide faible, il peut réagir vivement avec les oxydants puissants. La réaction entre le phénol et de nombreuses substances (formaldéhyde, chlorure d'aluminium, nitrobenzène, nitrate de sodium, 1,3-butadiène...) peut être violente. À chaud, le phénol liquide attaque certains métaux (plomb, zinc, aluminium...) ainsi que certains plastiques, notamment le polyéthylène [8]. Le phénol est un produit chimique corrosif et inflammable [9].

Les caractéristiques physico-chimiques sont rassemblées dans le tableau I.1.

**Tableau I.1** : Caractéristiques physico-chimiques du phénol. [10]

propriétés physiques	Phénol
Nom enregistré	Acide carbolique, acide phénique, alcool phénique
Synonimes	Benzénol, hydroxybenzène, monophénol, Oxybenzène, phenyl alcohol, phenylhydrate, phenyl hydroxide
Masse molaire	94,12
Point de fusion	43
Point d'ébullition à pression atmosphérique (°C)	181,8
Tension du vapeur à 25°C	0.3513
Densité du liquide d <sub>4</sub> <sup>20</sup>	1,0576
Solubilité dans l'eau 25°C, g/L	87
Log Kow	1.46

### I.3. Source de contamination

La pollution des eaux usées par le phénol résulte de nombreuses activités domestiques et industrielles. Les principales sources de contamination des phénols dans la troposphère sont les rejets automobiles, la combustion de bois et les rejets industriels lors de la production d'huile, conversion du charbon, raffinage du pétrole, production du papier, produits chimiques, la fabrication de colorants, polymères, des produits pharmaceutiques, substances organiques telles que les pesticides, les matières plastiques et les explosifs, etc. [11, 112]. Naturellement, le phénol est également présent dans les déchets ménagers puisqu'il est retrouvé dans les lixiviats générés au cours de leur

dégradation dans les installations de stockage de déchets non dangereux [13,14,15]. D'autres sources naturelles de phénol comprennent les incendies de forêt, les ruissellements naturels des zones urbaines où l'asphalte est utilisé [2].

#### 1.4. Toxicité par le phénol

Le phénol est considéré comme étant un des polluants les plus dangereux. Il est certainement le plus difficile à éliminer. Le phénol peut être fatal par ingestion, inhalation ou absorption de la peau, car il pénètre rapidement à travers la peau et peut causer une grave irritation des yeux et des voies respiratoires [16].

Le phénol est un composé toxique même à faibles concentrations, il peut altérer le goût et l'odeur de l'eau potable [12]. Généralement, il se trouve dans les rejets à des concentrations allant jusqu'à  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ , mais cela peut aller jusqu'à  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$  dans les eaux très polluées comparativement à la norme algérienne qui est de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  [18].

Le phénol est très toxique pour les poissons, il est létale à des concentrations comprises entre 5 à 25 ppm, et confère le goût de l'eau à des concentrations beaucoup plus faibles que  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  [19-20].

L'exposition au phénol peut causer une mort instantanée, car elle arrête les systèmes de transmission de neurones. L'ingestion de 1g de phénol serait mortelle et de plus faibles quantités peuvent provoquer des symptômes tels que: la faiblesse musculaire, perte de coordination, paralysie, convulsions, coma et arrêt respiratoire. Toutefois, en raison de sa faible volatilité, le risque d'inhalation devrait être limité [21].

#### 1.5. Impacts environnementaux

La présence et l'étendue de la distribution du phénol à travers les différents milieux de l'environnement sont fonction de ses propriétés physico-chimiques et du site contaminé [5].

Dans l'atmosphère, le phénol se présente sous forme gazeuse. La demi-vie du phénol dans l'air est en fonction de sa vitesse de réaction avec les radicaux hydroxyles. Elle est de 2,8 à 22,8 h [22, 23]. Selon Shui et al., 1994 [24], le temps de demi-vie est de 17h sous l'action de la photo-oxydation.

Dans le sol, la vitesse de dégradation du phénol est plus rapide, donc la probabilité de contamination des eaux souterraines est faible. Cela peut être modifié en cas de déversement de pétrole ou de libération continue de lixiviat des sites d'enfouissement.

Les études sur l'adsorption du phénol dans le sol montrent que ces molécules ont une grande mobilité [25].

Dans l'eau, le phénol est très absorbé, car il a une solubilité de 9,8% et une pression de vapeur relativement faible. Grâce à ces propriétés, le phénol se trouve en grande partie dans la phase aqueuse et peut être photodégradé directement sur les surfaces de l'eau en raison de sa tendance à absorber la lumière.

Sa concentration faible dans l'eau naturelle est facilement biodégradable, mais à des concentrations plus élevées, l'inhibition de la communauté microbienne peut avoir lieu.

## **I.6. Procédés de traitement des eaux polluées par le phénol**

### **I.6.1. Introduction**

L'élimination du phénol représente aujourd'hui un enjeu important pour la préservation de l'eau et de l'environnement. Plusieurs procédés de traitement ont été étudiés et ont déjà fait preuve d'efficacité pour la dégradation du phénol dans les rejets aqueux. Ils incluent les procédés physico-chimiques (ozonation, dégradation photochimique, adsorption sur charbon actif, procédés membranaires, oxydation avancée, oxydation chimique, etc.) [12] et biologique (biodégradation, lagunage, boues activées et lits bactériens) [1].

Bien que les procédés physico-chimiques soient très efficaces, ils possèdent en revanche des inconvénients inhérents, en raison de leur tendance à former des produits intermédiaires toxiques et aussi du fait qu'ils sont très coûteux [12, 26]. Pour remédier à ces problèmes et afin de neutraliser ces substances, les traitements biologiques sont souvent mis en œuvre. En effet, la biodégradation est considérée comme l'une des technologies les plus prometteuse et rentable pour sa simplicité, efficacité et coût relativement bas. Aussi, cette technique offre la possibilité d'une minéralisation complète du composé, ce qui permet de le considérer comme procédé respectueux de l'environnement [16, 20, 27].

### I.6.2. Biodégradation du phénol

Le terme « biodégradation » a été proposé pour décrire la dégradation ultime et le recyclage d'une molécule organique et ses constituants minéraux. Ceci est utilisé pour décrire la minéralisation complète du composé de départ au plus simples composés inorganiques tels que: H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, etc. [4,26, 28].

### I.6.3. Les microorganismes dans la biodégradation du phénol

En raison de la présence généralisée du phénol dans l'environnement, de nombreux microorganismes l'utilisent comme seule source de carbone et d'énergie. Ces derniers peuvent être aérobies ou anaérobies. En effet, il existe des micro-organismes qui résistent au phénol et qui ont la capacité de le dégrader [29]. La dégradation du phénol se produit grâce à l'activité d'un grand nombre de micro-organismes comprenant des bactéries, des champignons, des levures et des algues. Les espèces bactériennes et fongiques capables de dégrader le phénol sont: *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter*, etc. *Achromobacter* sp., *Fusarium* sp., *Phanerocheate chrysosporium corious versicolor*, *Ralstonia* sp., aussi les *Streptomyces* sp. etc. [1, 4, 20, 30].

Le tableau II.2 regroupe un certain nombre de microorganismes qui ont l'aptitude de dégrader les phénols selon différents travaux.

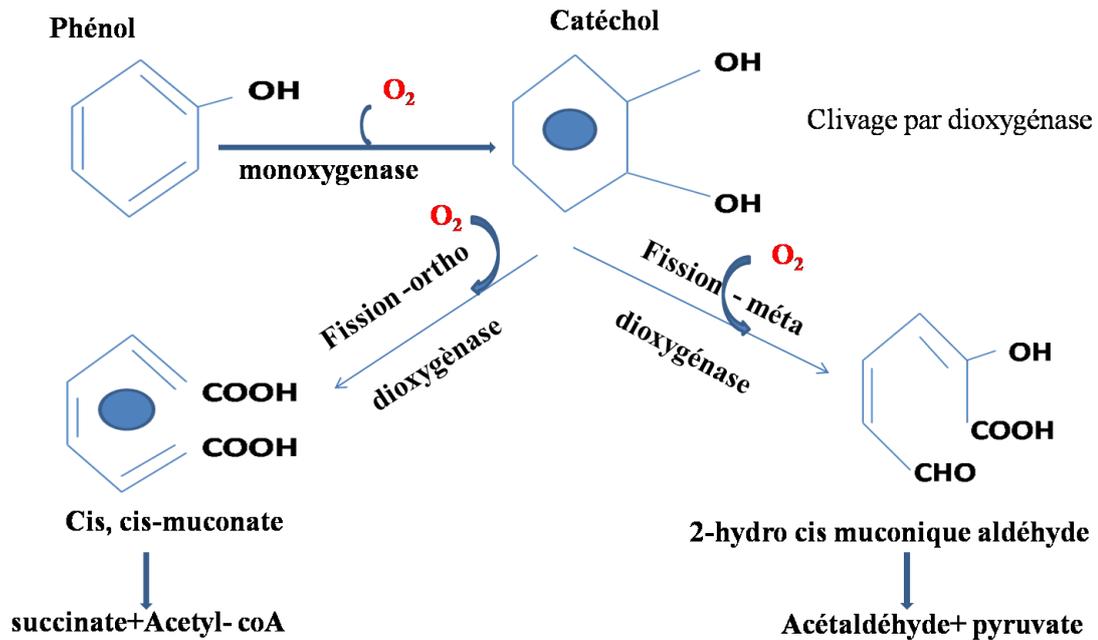
**Tableau I.2 :** Dégradation de phénol par divers micro-organismes.

N°	Microorganismes	Références
1	<i>Pseudomonas cepacia</i>	[31]
2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	[32]
3	<i>Pseudomonas putida</i>	[16, 19, 20, 30, 33]
4	<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>	[34, 35]
5	<i>Pseudomonas putida</i> F1	[36]
6	<i>Pseudomonas pictorium</i>	[37, 38]
7	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	[39]
8	<i>Acinetobacter</i> sp.	[40, 41]
9	<i>Bacillus brevis</i>	[42]

10	<i>Pseudomonas</i> sp.	[43, 44, 45]
11	<i>Acinetobacillus</i> sp.	[46]
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[47, 48, 49, 50]
13	<i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., et <i>staphylococcus</i> sp.	[51]
14	<i>Paenibacillus</i> sp. et <i>bacillus cereus</i>	[52]
15	<i>Candida tropicalis</i>	[53]
16	<i>Corynebacterium</i> sp.	[54]
17	<i>Thermoacidophilic archaeon Sulfolobus solfataricus</i>	[55]
18	<i>Cupriavidus taiwanesis</i>	[21]
19	<i>Rhodococcus</i> UKM-P	[56]

#### I.6.4. Mécanisme de biodégradation du phénol

Généralement, les composés aromatiques sont décomposés par les bactéries d'une manière naturelle. Cependant, les composés aromatiques cycliques sont récalcitrants en aérobiose, la dégradation du phénol commence par la déstabilisation du noyau aromatique via l'incorporation de l'oxygène moléculaire et l'action des enzymes mono-oxygénase (hydroxylase) conduisant ainsi à la conversion du phénol en catéchol (1, 2dihydroxybenzene) qui est un produit intermédiaire du métabolisme central. Le catéchol est ensuite dégradé par la voie alternative de fission ortho ou méta et par le clivage des enzymes dioxygénase qui va former l'acide cis-cis-muconique ou 2-hydroxy muconate semi aldéhyde (2-HMS). Suite à cela, l'intervention d'autres enzymes conduit à la formations d'un composé totalement minéralisé à savoir le succinate+ Acetyl-Coa (ortho) ou Acétaldéhyde+pyruvate (méta) (Figure I.2) [4, 27, 47, 57, 58, 69].



**Figure I.2 :** Métabolites et enzymes des deux chemins oxydatifs « méta » et « ortho » pour la dégradation du phénol [4].

## I.7. La croissance bactérienne

La croissance bactérienne est la multiplication du nombre de cellules d'une population bactérienne. Durant la croissance, la bactérie croit puis se divise en deux; l'ADN et les autres constituants de la cellule vont également se dupliquer à travers un ensemble de mécanismes enzymatiques [60].

### I.7. 1. Conditions de la croissance bactérienne

#### a- Besoins nutritifs

Les besoins nutritifs requis par les cellules font partie des facteurs clés qui déterminent la reviviscence des bactéries susceptibles de former un biofilm. Ils peuvent être classés en deux catégories: les macroéléments où les besoins élémentaires et les microéléments ou les besoins énergétiques [61].

### **a-1. Besoins élémentaires**

Ce sont des constituants majeurs et essentiels pour la prolifération des cellules bactériennes. Ils sont constitués de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre et de potassium.

### **a- 2. Besoins énergétique**

Les besoins énergétiques couvrent les dépenses engagées dans les processus de catabolisme et de biosynthèse. En effet, deux catégories de bactéries sont distinguées à savoir les phototrophes et les chimiotrophes [62].

## **I.7.2. Les facteurs influençant la croissance bactérienne**

Les paramètres les plus importants que pourraient influencer le développement bactérien sont notamment la température, le pH, la concentration en oxygène dissous, et les concentrations en substrat.

### **a- La température**

La température joue un rôle très important dans la croissance des microorganismes et dans la dégradation du phénol. Les changements de température affectent particulièrement l'état physiologique des micro-organismes [63].

Toute bactérie peut croître et se multiplier dans une plage optimale propre à elle. Ainsi, on peut classer les bactéries en quatre catégories :

- Les psychrophiles de 10 à 20°C.
- Les mésophiles de 25 à 35°C.
- Les thermophiles de 45 à 65°C.
- Les cryophiles dont la température optimale est inférieure à 0°C [1, 30].

Plusieurs travaux de recherche ont étudié l'effet de la température sur le taux de dégradation du phénol, les auteurs sont quasi unanimes concernant l'efficacité maximale d'élimination du phénol qui est obtenue à une température de 30°C. Toutefois, le taux de dégradation est relativement sensible aux écarts en dehors de la gamme optimale. Selon D. Hank ; 2010 [49] qui a étudié l'effet de la température sur la dégradation du phénol par

*Pseudomonas aeruginosa* dans un intervalle compris entre 30°C et 40°C, la dégradation a été obtenue à une température de 30°C. Il en est de même pour S. hakraborty et al., 2009 [64] qui ont pu avoir une dégradation complète du phénol à 30°C en variant la température de 20 à 45°C. En 2010, Das [27] a également dégradé le phénol en utilisant une culture mixte constituée de *Pseudomonas putida* (MTCC 1194) et *Escherichia coli*. Néanmoins, certains auteurs ont pu dégrader le phénol au-dessous de 30°C tel que Mini Bajaj [65] qui a observé une dégradation maximale du phénol à une température de 25°C en utilisant un consortium bactérien.

### **b- Le pH**

Le suivi du pH du milieu peut être un indicateur de la dégradation du phénol et l'un des facteurs importants dans la réussite du traitement biologique.

La majorité des bactéries présentent une croissance optimale pour un pH neutre entre 6,5 et 7,5, alors qu'un pH inférieur à 5,0 ou supérieur à 8,5 entraîne une inhibition de leur croissance [12, 61].

Différentes gammes de pH ont été étudiées pour la dégradation du phénol. Gurusamy Annadurai et al 2007 [38] ont étudié la dégradation du phénol par un consortium bactérien à différents pH initial allant de 7 à 9 et qui ont conclu que le pH initial influe fortement sur la croissance et la vitesse de dégradation. Un pH=7 a été trouvé comme étant optimal pour la dégradation du phénol et la production de la biomasse cellulaire. Le même résultat a été confirmé par S. Hakraborty et al 2009 [64] en faisant varier le pH de 5 à 10.

### **c- La concentration du substrat**

Le substrat carboné est l'un des facteurs de contrôle les plus importants pour la croissance microbienne. De ce fait, la disponibilité en carbone organique est essentielle à l'activité des bactéries car il fournit l'énergie nécessaire à leur métabolisme et constitue l'élément de base de leurs synthèses cellulaires. Des études montrent que des concentrations élevées de phénol inhibent la croissance microbienne. En 2011 F. Amrouche et al., [66] ont étudié la cinétique de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones en faisant varier les concentrations initiales du phénol de 100 à 800 mg.L<sup>-1</sup>. Les résultats montrent que pour la concentration de 800 mg.L<sup>-1</sup>, la souche bactérienne a dégradé 85 % de phénol, et pour des concentrations inférieures à 800 mg.L<sup>-1</sup>, le taux de

dégradation a été de 100%. Toutefois, R. Pishgara 2012 [67] a fait varier la concentration de 25-1000 mg.L<sup>-1</sup> où le taux de croissance a été observé à une concentration de phénol de 100 mg.L<sup>-1</sup>.

#### **d- La concentration d'oxygène dissous**

L'oxygène dissous est l'un des facteurs clés qui détermine le taux de dégradation de la matière organique dans des conditions de croissance aérobies. Etant toujours présent sous forme liée à divers composés du milieu ou au sein des bactéries: sa présence peut être indispensable ou au contraire toxique car il permet la formation de produits toxiques tels que le super oxyde (O<sub>2</sub>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou les radicaux hydroxyles.

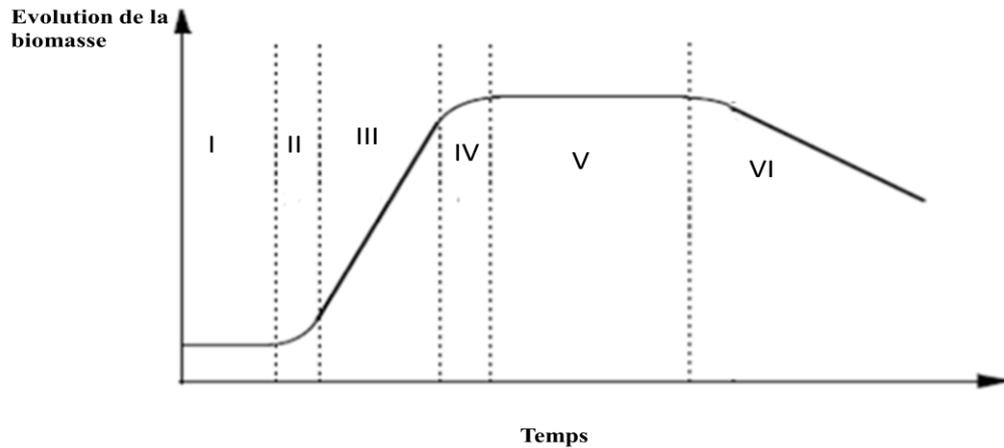
Selon leurs besoins en oxygène, on peut distinguer trois classes de microorganismes: les aérobies, les anaérobies (facultatifs et stricts) et les micro-aérophiles [61].

### **I.8. Cinétique de la croissance bactérienne**

Pour pouvoir suivre la cinétique de croissance, il a fallu à l'origine modéliser cette croissance dans un milieu non renouvelé, ce qui correspond à l'analyse « des cultures en batch ». Ce mode de croissance est obtenu en culture sur milieu liquide, réalisé en flacon (tubes à essais, Erlenmeyers,...) ou en bioréacteur pour mener des cultures en conditions contrôlées [61].

#### **I.8.1. Les différentes phases de la croissance bactérienne**

La croissance bactérienne peut se produire aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. La cinétique de croissance est répartie sur plusieurs phases distinctes dont l'enchaînement peut être représenté par une courbe de croissance (Figure I.3). Ces différentes phases peuvent être décrites comme suit :



**Figure I.3:** Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases [68].

(I) Phase de latence, (II) phase d'accélération (III) phase exponentielle, (IV) phase de ralentissement, (V) phase stationnaire, (VI) phases de déclin.

### I.8.2. Taux de croissance bactérienne

Le taux de croissance  $\mu$  peut être déterminé à l'aide de différentes techniques de mesures de l'évolution des populations microbiennes.

- Mesures directes du nombre de micro-organismes;
- Mesures indirectes basées sur l'évaluation de la densité des micro-organismes.

Au cours de la phase de croissance exponentielle, le taux de croissance est constant et maximal et il est donné par l'équation suivante [43]:

$$\mu = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt}$$

$\mu$  : Taux de croissance, ( $h^{-1}$ )

X: Concentration cellulaire en matière sèche de bactéries, ( $mg.L^{-1}$ )

t: Temps, (h)

C'est taux de croissance correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe,  $\ln X = f(t)$ .

### I.9. Réacteurs utilisés dans la biodégradation

Des études ont été effectuées sur la biodégradation du phénol en utilisant différents types de réacteurs et diverses souches bactériennes pures ou mixtes. En 2012 Garcia-pena et al., [69] ont rapporté que la dégradation du phénol dans un réacteur en mode batch inoculé par un consortium bactérien pouvait atteindre une concentration en phénol de 500 mg.L<sup>-1</sup>. Concernant le travail de Adh'ya-eddine en 2012 [1], la dégradation du phénol a atteint 99% en utilisant un consortium bactérien dans un biofiltre. En 2009, Muftah H. El-Nass [16] et ses collaborateurs ont pu dégrader le phénol en utilisant une espèce pure « *Pseudomonas putida* » dans un bioréacteur. D'autres travaux sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau I.3 :** Différents réacteurs utilisés pour la biodégradation du phénol.

N°	Référence/Réacteur	Microorganismes	Taux (%) de biodégradation
1	(Kenneth F. Reardon 2000) [36]/ batch	<i>Pseudomonas putida</i>	97.4%.
2	(Mukherjee 2010) [70]/ batch	culture mixte	dégradé jusqu'à 700 mg.L <sup>-1</sup> .
3	(Ravi R2 2012) [71]/ batch	culture mixte	85 à 98.5%.
4	(Kuek 1999) [19]/ batch	<i>Pseudomonas putida</i>	Dégradé jusqu'à 1200 mg.L <sup>-1</sup> .
5	(Mini Bajaj 2009) [65]/ batch	culture mixte	Dégradé jusqu'à 0.25–7.0 mmol.L <sup>-1</sup>
6	Beshay, Abd-El-Haleem et al. 2002)[72]/ batch	<i>Acinetobacter</i>	dégradé jusqu'à 500 mg.L <sup>-1</sup>
7	(Nor Suhaila 2010 ) [56]/ batch	<i>Rhodococcus</i> UKM-P	0,5 g.L <sup>-1</sup>
8	(Arinjay Kumar 2004) [33]/ batch	<i>Pseudomonas putida</i>	dégradé jusqu'à 1000 mg.L <sup>-1</sup>
9	Shail Singh et al.(2009) [52]/ batch	culture mixte	53,86%, 91,63 et 67,76% avec 168h

10	(Wang Ying 2006) [73]/ batch	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12	dégradé jusqu'à 500 mg.L <sup>-1</sup> 99,6%
11	(Bakhshi, Najafpour et al. 2011) [74]/batch	<i>Pseudomonas putida</i>	100%, 95.6%, 77.1% et 35.3%.
12	(Razali 2007) [71]/ batch	<i>Pseudomonas</i> sp.	dégradé jusqu'à 2000 mg.L <sup>-1</sup>
13	A. Ullhyan et al., (2012) [20]/ biofiltre-CAG	<i>Pseudomonas putida</i>	Adsorp (82,3%); SAB (97,2%)
14	F. Amrouche et al.,( 2011) [66]/ batch	<i>consortium</i>	100% pour 100, 300 et 500 mg.L <sup>-1</sup>
15	D. Han k et al.,(2010) [21]/ batch	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95%
16	B. Marrot at al.,(2006) [12]/ BMI	culture mixte	dégradé jusqu'à 700 mg.L <sup>-1</sup>
17	(P. Saravanan 2011) [44]/ batch	<i>Pseudomonas</i> sp	dégradé jusqu'à 400 mg.L <sup>-1</sup>

## **II. Procédés combinés**

### **II.1. Généralités**

Les techniques de traitement des eaux contaminées par les polluants organiques sont mises en œuvre pour corriger quelques unes des conséquences les plus déplorables de la première révolution industrielle. Les techniques telles que la filtration sur membrane, l'échange d'ions, l'adsorption sur charbon actif, etc. sont coûteuses et ont souvent un impact négatif sur l'environnement. Actuellement, les procédés biologiques tels que les lits bactériens, les boues activées et les bio-disques sont employés en raison de leurs propriétés épuratoires et leur faible impact environnemental. Ainsi, la biofiltration est devenue un procédé d'épuration particulièrement attractif.

### **II.2. La biofiltration**

En biofiltration, la dépollution s'effectue par l'intermédiaire de cultures bactériennes pouvant revêtir de très nombreuses formes. De ce fait, on peut trouver des réacteurs utilisant des procédés dits à cultures libres ou à cultures fixées.

Dans les procédés à cultures libres, utilisés uniquement en traitement des effluents liquides, on provoque le développement d'une culture bactérienne dispersée au sein du liquide à traiter. On utilise pour cela un bassin brassé dans lequel on maintient: soit, une certaine concentration en oxygène (aérobies) tels que les boues activées, le lagunage aéré ou naturel soit, au contraire, l'absence d'oxygène (anaérobies) comme les procédés à lit de boue ou le lagunage anaérobie.

Dans les techniques à cultures fixées, on utilise la capacité des micro-organismes à se fixer sur divers supports pour former un biofilm et obtenir des concentrations en biomasse plus importantes. Les cultures fixées peuvent revêtir plusieurs formes: lit fixe immergé (biofiltre) ou non (lit bactérien), ou les bio-disques [63].

#### **II.2.1. Les biofiltres**

Les biofiltres sont des unités qui utilisent des combinaisons de processus fondamentaux : adsorption, absorption, biodégradation et désorption. La connaissance et le contrôle des différents mécanismes de formation d'un biofilm permettent d'optimiser l'efficacité de celui-ci [63].

Le biofiltre est constitué d'un matériau granulaire où les micro-organismes sont immobilisés à la surface ou au sein de celui-ci. Empilés dans un réacteur généralement cylindrique: l'eau à traiter circule de manière ascendante ou descendante à travers un lit fixe. Le polluant contenu dans l'eau à traiter est adsorbé sur le biofilm ou les particules de support « garnissage » où la dégradation microbienne a lieu.

### II.2.2.1. Intérêt du biofiltre

Dans le cas des traitements biologiques et dans le cas des procédés à culture fixée, le biofiltre nous permet de [63] :

- Mettre en contact les microorganismes et les substances à dégrader;
- Apporter l'oxygène éventuellement nécessaire à la dégradation de substances organiques;
- Offrir aux bactéries un support d'accrochage ayant une grande surface spécifique.

Ce procédé de traitement est économique puisqu'il permet la régénération des «filtres» suite à la consommation du polluant par les micro-organismes. Des études sur la biodégradation du phénol utilisant des biofiltres ont montré leur efficacité. En effet, ce traitement combine adsorption et biodégradation afin d'éliminer 97,2 % de phénol en colonne de charbon actif en grain (CAG) inoculée par des *Pseudomonas putida* connues pour dégrader ce polluant organique dans un biofiltre [20].

## II. 3. Le biofilm

Le terme «biofilm» a été proposé pour la première fois en 1978 par John William Costerton *et al.* [75]. Ces derniers, l'avait défini comme étant des populations de bactéries adhérentes les unes aux autres et/ou à des surfaces ou interfaces. Cette définition inclut les agrégats et floculats bactériens ainsi que les bactéries fixées dans les interstices de milieux poreux. La notion de biofilm n'a cessé d'évoluer depuis, en fonction des avancements des travaux visant la compréhension de ce phénomène [76].

### II.3.1. Définition

Selon Jouenne en 2008 [77], un biofilm est défini comme un ensemble de micro-colonies bactériennes emprisonnées dans leurs propres exopolymères et adhérant à une surface vivante ou inerte. Il peut être constitué d'une seule espèce bactérienne mais le plus souvent plusieurs espèces coexistent au sein de la structure.

### II.3.2. Principales propriétés des biofilms

Un biofilm est une structure complexe dont les caractéristiques peuvent varier en fonction du temps, du support d'adhésion, des micro-organismes mis en jeu, et des paramètres physico-chimiques environnants. Il est composé essentiellement de bactéries et de substances polymériques extracellulaires (EPS) [78].

Un biofilm est une matrice d'aspect gélatineux constituée par une agglutination de micro-organismes. Ils sont le plus souvent hydrophiles. Cette propriété est attribuée à la présence de nombreux sucres hydrophiles au niveau de la pellicule extracellulaire de polysaccharides. L'adhésion sera donc facilitée à la surface d'un support hydrophile. En effet, l'adhésion au support solide se fait grâce à la présence de polymères extracellulaires (polysaccharides ou peptidoglycanes) présents à la surface des micro-organismes.

Un biofilm peut être organisé en différentes couches entre la base et la superficie du biofilm. On peut au sein d'un même biofilm, trouver des zones anaérobies au niveau de la base et des zones aérobies en contact avec le liquide circulant.

L'épaisseur et la densité du biofilm varient en fonction des propriétés physico-chimiques et biologiques du milieu environnant (conditions hydrodynamiques, composition du milieu circulant, vitesse de circulation...). Aussi, la diffusion d'un soluté à l'intérieur du biofilm dépend des caractéristiques du biofilm (densité, rugosité, etc...) et des conditions de circulation de la solution (vitesse de circulation du fluide...) ainsi que des propriétés du soluté en question [63].

### II.3.3. Comportement des micro-organismes en biofilm

Les microorganismes se comportent de manière très différente lorsqu'ils sont en suspension ou à la surface d'un support solide [63]. Il apparaît dans la nature que la bactérie « préfère » résider sur une surface dans un milieu aqueux plutôt que « flotter » librement [79]. Les changements fondamentaux au niveau physiologique et cellulaire qui apparaissent lors de

la formation d'un biofilm, peuvent se traduire par une augmentation de la résistance des microorganismes vis à vis des agressions extérieures [63].

D'autre part, la présence d'une matrice extracellulaire va modifier les propriétés physico-chimiques du milieu. La formation d'un biofilm va engendrer la création de gradient de concentration, de pH, de champs électriques, de zones d'aérobiose et anaérobiose qui vont induire à des changements dans le comportement des microorganismes [88, 63].

#### II.3.4. Formation des biofilms

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués [81].

L'épaississement d'un biofilm est en général représenté par une sigmoïde (Figure II.1). Après une courte période de conditionnement, le biofilm se développe rapidement puis se stabilise. Durant le conditionnement, les molécules organiques et inorganiques présentes dans le milieu se déposent à la surface du support. Ces molécules peuvent être des nutriments qui vont attirer les bactéries à la surface du support et ainsi initialiser le développement et l'épaississement en biofilm [80]. Quand le biofilm a atteint son épaisseur optimale, un équilibre s'établit entre la croissance cellulaire et l'érosion du biofilm due aux forces appliquées par la circulation du liquide.

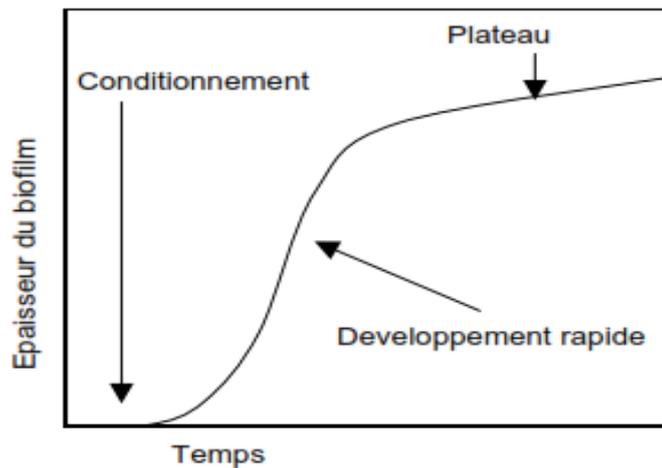


Figure II.1: Développement idéal d'un biofilm [80, 63].

Les différentes étapes de formation d'un biofilm sont illustrées dans la figure II.2 [80, 63].

1. Transfert de masse de (macro) molécules vers la surface du support et adsorption de celles-ci (formation d'un film de conditionnement).
2. Transport des micro-organismes vers la surface adsorbante et adhésion.
3. Adsorption des micro-organismes à la surface du support.
4. Transport de nutriments à l'interface liquide/biofilm et à l'intérieur du biofilm.
5. Production de nouvelles cellules et de polymères extracellulaires (EPS).
6. Transport des métabolites produits par le biofilm vers l'extérieur.
7. Processus de détachement du biofilm: érosion superficielle ou décollement engendré par les forces hydrodynamiques.

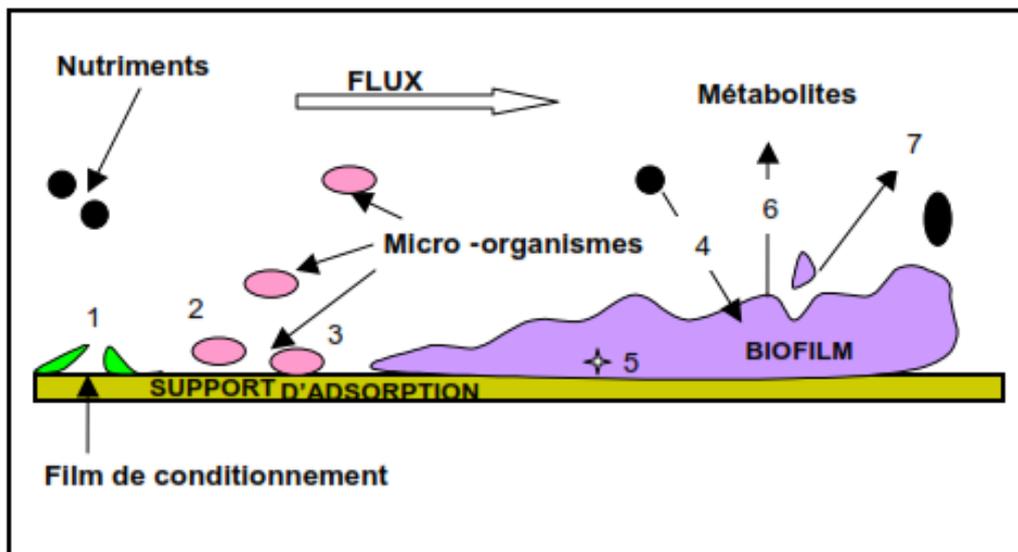


Figure II.2 : Etapes de formation d'un biofilm

### II.3.5. Facteurs influençant la formation et l'activité des biofilms

De nombreux facteurs influencent la formation du biofilm. Les principaux paramètres à prendre en compte sont: les caractéristiques des micro-organismes, la composition du support et ses propriétés physico-chimiques, la composition du fluide le traversant, ainsi que d'autres paramètres tels que la température, le pH, la force ionique... On devrait également tenir compte de la vitesse du fluide et de sa turbulence ainsi que de la présence de particules organiques ou minérales.

### II.3.5.1. Caractéristiques des micro-organismes

La formation de pellicule biologique dépend de la nature des micro-organismes présents; d'autre part, l'état physiologique de ces derniers associé à l'excrétion des polymères, sera déterminant pour l'adhésion à un support.

En 1998, Kolter [82] a développé une méthode de criblage génétique qui a permis de caractériser un certain nombre de déterminants importants dans la formation de biofilm, dont la présence d'appendice extracellulaire tels que les flagelles (qui permet à la bactérie de se déplacer en milieu liquide ou semi-solide) les pili de type IV (structures fibrillaires présentes au pôle de certaines bactéries à gram négatif Wall et Kaiser 1999 [83]) ou encore les appendices extracellulaires comme les fimbriae ou les curli.

L'adhésion aux supports solides est facilitée pour des micro-organismes ayant une forte capacité à produire les polymères extracellulaires (type alginate, lipopolysaccharides...). Ainsi une souche dite « muqueuse » pourra donner un biofilm d'une épaisseur moyenne de 40  $\mu\text{m}$ , alors qu'une souche « non muqueuse » ne pourra former qu'un biofilm de 6  $\mu\text{m}$  d'épaisseur [84].

### II.3.5.2. Effet de la vitesse de circulation du fluide

D'une manière générale, l'augmentation de la vitesse de circulation du fluide peut avoir deux effets : l'augmentation du transfert de masse (nutriments pour les micro-organismes), qui pourrait être bénéfique pour la croissance du biofilm et l'augmentation de l'érosion, pouvant entraîner le décollement du biofilm.

En effet, l'augmentation de la vitesse de circulation entraîne la formation de biofilm plus fins mais plus denses. Ainsi, la diffusion des nutriments est plus difficile que dans les biofilms formés à faibles flux. Cependant, un biofilm dense sera plus stable et aura une meilleure résistance à l'érosion, imposée par les forces hydrodynamiques extérieures.

### II.3.5.3. Le support du biofilm

La nature du support utilisé joue un rôle essentiel sur la fixation des micro-organismes ainsi que sur la filtration d'effluent. Ce support peut être constitué de particules homogènes ou hétérogènes, il peut être rugueux ou lisse. Quel que soit le matériau choisi, la connaissance de ses caractéristiques physico-chimiques et biologiques est fondamentale.

Ces propriétés permettent d'avoir une approche sur le comportement hydrodynamique du biofilm et la qualité de garnissage pour le développement et la croissance du biofilm [85].

Le support est un matériau solide qui peut être de nature :

- Organique : tourbe, compost végétal, écorce de pin, fumier, gousse de cacahuètes [63, 86] ou charbon actif;
- Inorganiques: matériaux argileux, verre ;
- Synthétiques : mousse, billes de polystyrène, structures Téflon ou encore des résines de type Ambérlite, etc... [63].

#### **II.4. Immobilisation des cellules pour la dégradation du phénol**

La biodégradation peut s'effectuer en utilisant des bactéries en suspension (libres) ou immobilisées dans ou sur les différents supports. Pour le procédé de traitement par les boues activées, plusieurs problèmes peuvent survenir à savoir : la nécessité d'avoir une concentration élevée en biomasse et donc des volumes de réacteurs importants, une vitesse et un rendement global de conversion limité suite à l'inhibition des bactéries par de fortes concentrations du polluant. De ce fait, le procédé de fixation des cellules vivantes sur des supports poreux naturels ou synthétiques est privilégié. Ceci permet d'avoir une forte concentration cellulaire avec des volumes de réacteurs et de temps de séjours fortement réduits, de diminuer l'effet inhibiteur suite aux limitations diffusionnelles et aussi la réutilisation des cellules aussi longtemps qu'elles gardent leurs activités. Cette technique facilite la mise en œuvre en continue du procédé de traitement biologique et permet d'avoir un rendement élevé [87].

L'immobilisation des microorganismes sur un support solide inerte est basée sur l'aptitude des cellules à coloniser les surfaces solides et à s'y développer. Cette technique, consiste à inclure des cellules bactériennes dans une matrice poreuse comme l'alginate calcium, la chitine et les dérivés de la cellulose, le gel de polyacrylamide, verre poreux, billes en plastic, charbon actif, sable, charbon de bois, la terre diatomée, boules de ciment faites de cendre de charbon, cellulose, matériaux polymères, ions polymères, chitosan, lignins, charbon, collagènes de la mousse polyuréthane, des particules à base de silice, etc. pour l'immobilisation des cellules entières [42, 88].

## **II.5. Valorisation du terril de Kenadsa pour le traitement des eaux**

### **II.5.1. Introduction**

Les produits naturels, disponibles en large quantité ou certains déchets industriels ou agricoles peuvent présenter un potentiel filtrant intéressant pour le traitement des eaux contaminées. De ce fait, le choix du matériau doit se faire en fonction de sa capacité de rétention, de la quantité disponible mais aussi de sa disponibilité géographique.

Dans cette optique et afin de valoriser quelques matériaux, locaux nous nous sommes intéressés aux terrils de charbon de Kenadsa qui font partie du paysage de la région sud ouest d'Algérie.

L'idée d'utiliser des matériaux naturels comme support pour le traitement d'eaux contaminées par le phénol a vu le jour dans un souci économique et environnemental. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux études déjà réalisées pour l'élaboration de procédés de dépollution des eaux par filtration sur des matériaux naturels, qui dans la plupart des cas, constituent une masse importante de déchets largement disponibles et valorisables.

### **II.5.2. Le terril**

Parmi les matériaux naturels potentiellement exploitables dans le domaine de traitement de l'eau, le terril de Kenadsa a fait l'objet d'étude dans notre travail de recherche.

En tant que procédé alternatif aux traitements classiques, le terril de Kenadsa est particulièrement intéressant étant donné que c'est un sous-produit de l'industrie de charbon et qui est abondamment disponible. Une efficacité particulièrement attractive de terril a permis de l'utiliser comme garnissage de biofiltres pour le traitement de l'eau où le terril joue le rôle de support d'adsorption des polluants et de croissance pour les micro-organismes, eux-mêmes responsables de la transformation ou de la dégradation des polluants [89].

### **II.5.3. Origine et répartition**

On peut rencontrer du terril de charbon dans la région du sud ouest Algérien qui renferme des gisements très importants de charbon. L'Algérie considère aujourd'hui les mines de charbon comme des réserves énergétiques pour les années après pétrole. La région de Kenadsa (situé à 19 Km de la ville de Béchar) a été pendant plus de 50 ans un centre important d'exploitation du charbon. L'exploitation du charbon a conduit à une accumulation de schistes. Après les opérations de tri effectuées à l'extérieur pour séparer le charbon et les

schistes, ces derniers sont mis en dépôt pour constituer des terrils tel que la figure III.3 l'illustre.



**Figure II.3 :** Terril de Kenadsa [89].

La surface sur laquelle se trouvent les terrils s'étend de Béchar Djedid à la ville de Kenadsa, berceau des mines de charbon, soit sur une longueur de 25 Km. La valorisation des matériaux contenu dans les terrils devient une urgence vu que ces terrils défigurent le paysage et bloquent l'extension des agglomérations avoisinantes sans compter des retombés du point vu santé de la population lors des périodes de vent de sable [89].

#### **II.5.4. Caractéristiques du support**

##### **II.5.4.1. Analyse granulométrique**

L'analyse granulométrique permet de déterminer la grosseur et les pourcentages pondéraux respectifs des différentes familles de grains constituant les échantillons. Le classement des différents grains effectué en utilisant une série de tamis, emboîtés les un sur les autres, dont les dimensions des ouvertures sont décroissantes du haut vers le bas et cela par vibration de la colonne de tamis.

##### **II.5.4.2. Taille effective**

La taille effective, exprimée en mm (ou  $\mu\text{m}$ ) et notée TE, correspond à l'ouverture de maille laissant passer 10% en poids de l'échantillon soumis à l'analyse.

### II.5.4.3. Coefficient d'uniformité

Le coefficient d'uniformité est égal au quotient de la diversité 60% par la taille effective. Ce coefficient donne une indication sur l'homogénéité granulométrique de la masse filtrante. Un coefficient d'uniformité égal à 1 est représentatif d'un sable homogène.

### II.5.4.4. Equivalent de sable

L'équivalent de sable est un indicateur caractérisant la propreté d'un sable ou d'un gravier. Il indique la teneur en éléments de diamètre inférieur à 0,5 mm, d'origine essentiellement argileuse, végétale ou organique à la surface des grains [89, 90].

### II.5.4.5. Masse volumique

La masse volumique d'un granulat est le rapport entre sa masse et son volume. Pour un granulat donné, ce rapport est une constante qui est propre aux caractéristiques physiques du granulat.

La masse volumique apparente du granulat désigne le rapport entre la masse du granulat et son volume apparent. Concernant la masse volumique absolue du granulat, elle désigne le rapport entre la masse du granulat et son volume absolu [89].

### II.5.4.6. La porosité

La porosité désigne le pourcentage du volume total des vides ouverts du matériau au volume apparent de l'échantillon. Elle est donnée par la formule suivante :

$$\varepsilon = \frac{V}{V_a} = \frac{V_a - V_s}{V_a} = 1 - \frac{V_s}{V_a} \implies \varepsilon = 1 - \frac{V_s}{V_a} \left\{ \begin{array}{l} \rho_a = \frac{m_s}{V_a} \\ \rho_s = \frac{m_s}{V_s} \end{array} \right.$$

#### II.5.4.7. Surface spécifique

La surface spécifique du sable ( $A_s$ ), comme pour tous autres matériaux granulaires, correspond à la surface totale des particules par unité de volume. Pour estimer la surface spécifique, les particules sont supposées sphériques [89].

$$A_s = \frac{\text{Surface de la particule}}{\text{Volume de la particule}} = \frac{\pi d^2}{\pi d^3/6} = \frac{6}{d_g}$$

$d_g$  : diamètre du grain [L]

$A_s$  : surface spécifique d'un grain [ $L^{-1}$ ]

#### II.5.4.8. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une méthode universellement utilisée pour identifier la nature et la structure des produits cristallisés. En effet, cette méthode ne s'applique qu'à des milieux cristallins (roches, cristaux, minéraux, pigments...). La méthode permet de distinguer clairement les produits amorphes et les produits cristallisés.

Selon la nature du renseignement que l'on désire obtenir, l'identification minéralogique simple ou structure cristalline et selon la nature du matériau, différentes analyses sont possibles. Les différentes méthodes DRX sont: la méthode de LAUE, la méthode des poudres ou de DEBYE-SCHERRER et la méthode du cristal tournant [89].

### III.1. Matériels

#### III.1.1. Microorganismes

La bactérie utilisée est une «*Pseudomonas sp.*» autochtone aérobie, isolée localement au niveau du CDER et provenant des boues de forage de Hassi Messaoud. Après purification, la souche bactérienne a été maintenue dans un milieu de conservation (MC).

#### III.1.2. Milieu de conservation

La mixture bactérienne est conservée pendant toute la période d'étude à 4°C dans un milieu liquide composé de [1]:

- Glucose 10 g.L<sup>-1</sup>
- Glycérol 200 g.L<sup>-1</sup>
- Extrait de levure 15 g.L<sup>-1</sup>

#### III.1.3. Milieu de pré-culture

Les essais en cultures pures ont été réalisés à partir de pré-cultures cellulaires, elle-même obtenues à partir des cellules conservées. Un volume de 1 à 2 ml de milieu de conservation (MC) est inoculé dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 200 ml de milieu de pré-culture (MP) composé de [1]:

- Peptone 15 g.L<sup>-1</sup>
- Extrait de levure 3 g.L<sup>-1</sup>
- Glucose 1 g.L<sup>-1</sup>
- Chlorure de sodium 6 g.L<sup>-1</sup>

#### III.1.4. Milieu de culture

Dans notre étude, les bactéries ont été cultivées dans un milieu minéral de base liquide (MMB) dont la source de carbone est le phénol. Ce milieu recouvre les exigences minérales et organiques nécessaires pour leur croissance. Sa composition pour un litre d'eau distillée est donnée dans le tableau suivant:

**Tableau III.1:** Composition du milieu de culture (MMB) [1].

Composés	Concentration (g.L <sup>-1</sup> )
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub>	3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1
Ph	7

### III.1.5. Source de carbone

La source de carbone est le phénol dont les concentrations initiales varient de 10 à 500 mg.L<sup>-1</sup>. Les concentrations en phénol ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre (Biomat3) par la méthode sans complexation à une longueur d'onde de 270 nm.

### III.1.6. Le Support

Le support utilisé est le terril noir de Kenadsa qui est un sous produit provenant des mines de charbon de la région de Béchar du sud ouest Algérien.

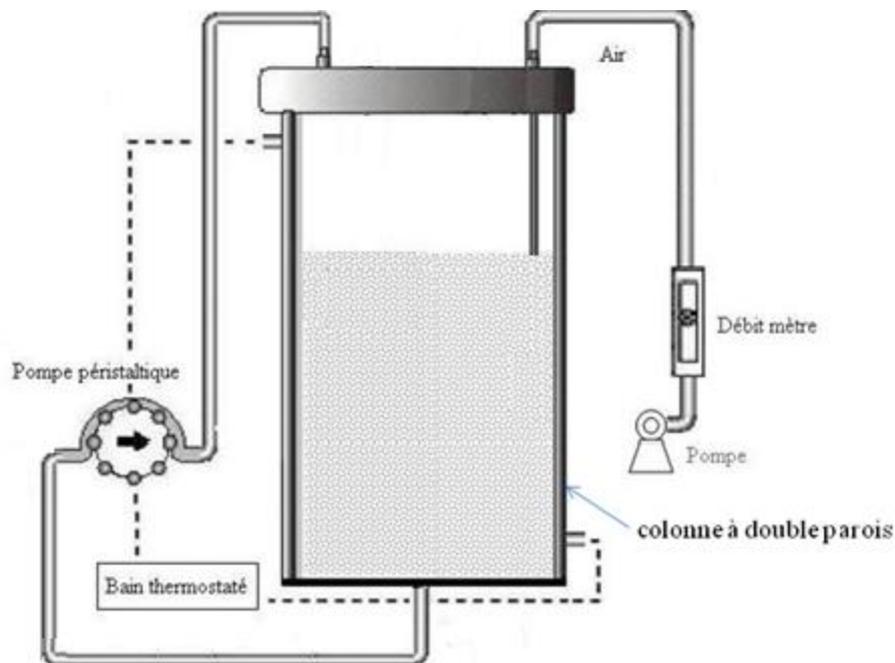
Les grains ont été préalablement séchés à 105°C pendant 24h. Après le tamisage des échantillons selon les méthodes normalisés EN 933-1 et EN 933-2, les grains de diamètre entre 0,063 et 5 mm [90] ont été retenus. Ces derniers sont lavés à plusieurs reprises avec de l'eau distillée afin d'enlever les fines particules, puis sont séchés dans les mêmes conditions et stérilisés par la suite à 120°C pendant 20 min.

**Figure III.1:** Terril de diamètre 1,25mm.

### III.1.7. Description du dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé dans ce travail est constitué d'une colonne en verre à double parois d'une hauteur de 29 cm et d'un diamètre interne de 9 cm. La hauteur effective du lit filtrant est de 12 cm de terril. L'eau à filtrer est maintenue constante le long de l'expérience afin de garder la même charge hydraulique sur le lit filtrant.

Pour constituer un lit fixe granulaire comme support bactérien, la colonne est remplie de grains de 1,25 mm de diamètre à 9 cm de hauteur. Ce lit granulaire est maintenu par un drain de 3 cm de hauteur et 5 mm de diamètre. La circulation du liquide dans la colonne se fait dans un circuit fermé à un débit constant de  $25 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  grâce à une pompe péristaltique. La température est maintenue à  $30^\circ\text{C}$  grâce à un bain thermostaté. Afin d'apporter de fines bulles d'air et d'assurer une bonne dispersion de l'oxygène dans toute la surface du système, un diffuseur poreux relié à un compresseur d'air est placé à l'intérieur du bioréacteur. Enfin une seringue est placée à la sortie du bioréacteur pour la prise d'essai. Le débit d'air de  $0,9 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$  est contrôlé par un débitmètre.



**Figure III.2 :** Schéma du dispositif de biofiltration



**Figure III.3 :** Dispositif expérimental

## **III.2. Procédure expérimentale**

### **III.2.1. Essais de la granulométrie**

À partir des méthodes normalisées EN 933-1 et EN 933-2, le mélange du terril lavé et séché est pesé initialement. En suite, il est déposé en haut de la colonne de tamis et il est soumis à une vibration à l'aide d'une tamiseuse électrique. Les différentes répartitions sont récupérées et pesées après un temps de tamisage de 20 min afin de tracer la courbe de granulométrie.

Nous avons utilisé une série de 08 tamis dont les diamètres d'ouvertures sont respectivement: 5; 4; 2,5; 2; 1,6 ; 1,25; 1 et 0,063 mm (Figure III.4) de manière à ce que la progression soit décroissante.



**Figure III.4:** Photo de la colonne de tamis.

### III.2.2. Détermination de la masse volumique apparente du terril

Pour déterminer la masse volumique apparente du terril, nous avons utilisé la méthode du cylindre métallique. La première étape consiste à remplir le cylindre préalablement pesé à vide ( $M_c$ ) avec du terril, ensuite, le cylindre plein est arasé soigneusement pour avoir une surface uniforme puis il est pesé à nouveau ( $M_{ct}$ ).

La masse volumique apparente du solide est définie comme étant le rapport de la différence de masse du terril sur son volume, elle est exprimée par la formule:

$$\rho_{app} = \frac{(M_{ct}) - (M_c)}{V_t}$$

Avec :

$\rho_{app}$  : masse volumique apparent ( $\text{kg/m}^3$ );

$M_c$ : masse de la capsule métallique à vide (kg);

$M_{ct}$ : masse de la capsule + terril (kg);

$V_t$  : volume total du cylindre métallique ( $\text{cm}^3$ ).



**Figure III.5 :** Essai de la masse volumique apparente.

### III.2.3. Détermination de la masse volumique absolue du terril

La masse volumique absolue du solide a été déterminée à partir de la méthode de l'éprouvette graduée dont le principe consiste à remplir une éprouvette avec un volume  $V1$  d'eau. Ensuite, introduire une masse du solide bien déterminée ( $m$ ) dans l'éprouvette graduée contenant  $V1$  en prenant soin d'éliminer toutes les bulles d'air et lire à nouveau le volume  $V2$ . Cette opération est répétée encore une fois pour la précision. La figure III. 6 illustre cette méthode.

La masse volumique absolue du terril est obtenue par la formule :

$$\rho_{abs} = \frac{(m)}{V2 - V1}$$

Avec :

$\rho_{abs}$ : masse volumique absolue ( $\text{kg/m}^3$ );

$V1$ : volume d'eau distillée ( $\text{cm}^3$ );

$V2$ : volume contenant l'eau distillé + masse du terril ( $\text{cm}^3$ );

$m$ : masse de terril (kg).



**Figure III.6 :** Essai de masse volumique absolue.

### III.2.5. Essai d'équivalent de sable

L'essai est effectué sur la fraction du terril inférieure à 5 mm dans une éprouvette en plexiglas avec une masse à l'état naturel de 120g. L'échantillon est lavé selon un processus normalisé (NF P 18-598) puis laissé au repos pendant 20 min. Par la suite, les hauteurs sont mesurées (Figure III.7):

- h1: sable propre + élément fins ;
- h2: sable propre seulement.

L'équivalent de sable est donné par la formule:

$$ES=100 \times (h2/ h1)$$



**Figure III.7 :** Essai d'équivalent de sable.

### III.2.6. Essai de DRX

La méthode la plus utilisée pour l'analyse DRX lorsque le matériau est réductible à une fine poudre est celle des poudres ou DEBYE-SCHERRER. Le principe consiste à faire passer le faisceau de rayons X (monochromatique) sur l'échantillon solide finement broyé (poudre microcristalline) disposé sur des porte-échantillons adéquats pour être diffracté par les plans réticulaires des phases cristallines présentes.

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un diffractomètre PANalytical: XPERT- PRO en utilisant le DataCollector de PANalytical comme logiciel pour l'acquisition et le traitement des données. Les conditions opératoires sont:

- Longueur d'onde  $\text{CuK}\alpha$  [ $\text{\AA}$ ]: 1,5418
- Angle de départ [ $^{\circ}2\text{Th.}$ ]: 2,0000
- Angle final [ $^{\circ}2\text{Th.}$ ]: 70,0000
- Taille du pas [ $^{\circ}2\text{Th.}$ ]: 0,0167
- Temps du pas [s]: 85.725
- Vitesse de balayage [ $^{\circ}/\text{s}$ ] : 0.024757

### III.2.7. Préparation de la biomasse

Les bactéries sont incubées dans le milieu de pré culture à 30°C pendant 18h. Après cela, le culot riche en cellules bactériennes est récupéré suite à une centrifugation à 3000 rpm pendant 20 min. Une fois le surnageant éliminé, une solution d'eau physiologique (NaCl à 0,9 %) est ajoutée au culot. Après homogénéisation de cette dernière, les tubes sont centrifugés de nouveau et cette opération est répétée une deuxième fois jusqu'à la disparition de la couleur jaune.

### III.2.8. Adaptation de *Pseudomonas* sp. au phénol

La souche *Pseudomonas* sp. est mise en croissance en présence du glucose comme seule source de carbone puis adaptée à des concentrations de plus en plus élevées de phénol. Pour cela, des Erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml de MMB et 10 ml d'inoculum récupéré de la culture précédente. Cette opération est répétée en faisant augmenter la concentration en phénol et diminuer celle du glucose jusqu'à obtention d'une bactérie adaptée au phénol comme seule source de carbone.

Tout le matériel est autoclavé à 120°C pendant 20 min. Le phénol et le glucose sont ajoutés séparément au milieu de culture à l'aide d'un filtre seringue de porosité (0.2 µm) [33].

### III.2.9. Essais en batch pour la biodégradation du phénol

Après l'acclimatation, les bactéries ont été transférées dans des Erlenmeyers de 250 ml, contenant chacun un volume de 100 ml de MMB avec 10% (v/v) d'inoculum de bactérie acclimatés et 1% (v/v) de diverses concentrations de phénol, s'étendant de 10 jusqu'à 500 mg.L<sup>-1</sup> en tant que source unique de carbone et d'énergie. Les Erlenmeyers sont ensuite incubés à 30°C sans agitation. La dégradation du phénol et la croissance de la biomasse ont été suivies dans un intervalle de temps donné. La même procédure est effectuée dans le biofiltre. Le lavage du réacteur et la tuyauterie sont effectués en utilisant une solution de NaCl à 0,9%.



**Figure III.8:** Essais d'acclimatation et biodégradation du phénol en Erlenmeyers.

### III.3. Dosage du phénol

Des prélèvements ont été effectués à intervalles de temps réguliers afin de suivre le taux de biodégradation du phénol en évaluant sa concentration résiduelle dans le milieu. Le dosage du phénol se fait par une analyse spectrophotométrique à une longueur d'onde de 270 nm.

La concentration de phénol exprimée en  $\text{mg.L}^{-1}$ , est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie à la même longueur d'onde (annexe).

### III.4. Mesure de la densité bactérienne

La variation de la densité cellulaire est déterminée par spectrométrie d'adsorption moléculaire UV/ Visible à une longueur d'onde de 600 nm, dans une cuve de 1cm de trajet optique avec l'eau distillée comme référence.

L'interprétation des données recueillies dans ce travail, nous permet d'obtenir de nombreuses réponses quant au comportement du procédé de biodégradation à la fois en ce qui concerne l'élimination des composés organiques et la valorisation du matériau. Les résultats obtenus nous ont amené à cerner et à quantifier l'effet de plusieurs paramètres.

Tous les résultats expérimentaux rapportés dans ce chapitre ont été basés sur la moyenne des résultats des expériences répétées plusieurs fois.

Dans une première partie, une caractérisation physico-chimique du terril est présentée, l'analyse granulométrique permet la détermination des principaux paramètres (coefficient d'uniformité, diamètre effectif), l'analyse minéralogique (DRX) nous a permis de quantifier les éléments minéraux contenus dans le milieu poreux étudié.

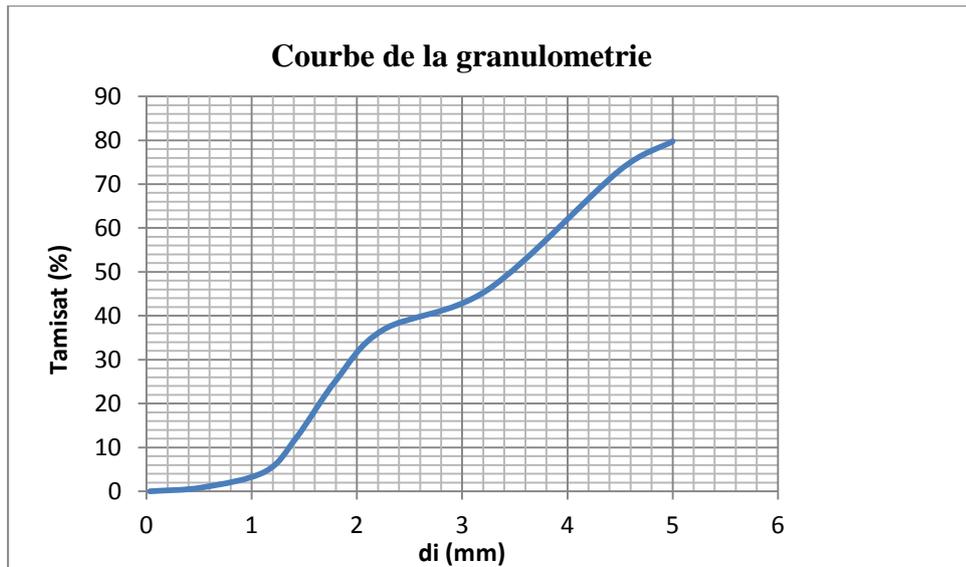
Enfin, tous les essais pour la biodégradation ont été réalisés à une température de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Dans cette partie du travail, l'étude de l'influence d'acclimatation des cellules, ainsi que les différentes concentrations initiales en phénol sur la biodégradation ont été conduites expérimentalement.

#### **IV.1. Caractéristiques physico-chimiques du support**

Le support filtrant utilisé dans ce travail, est le terril de Kenadsa, qui en plus de sa disponibilité, présente des caractéristiques favorables pour son utilisation comme filtre dans les traitements des eaux.

##### **IV.1.1. Analyse granulométrique**

La courbe granulométrique du lit filtrant (Figure IV.1) a été établie par passage sur des colonnes de tamis selon les méthodes normalisées EN 933-1 et EN 933-2 [90] représentée dans le tableau.1 (annexe). Les résultats des refus sont exprimés en pourcentage de la masse sèche dans la Figure IV.1.



**Figure IV.1:** Représentation de l'analyse granulométrique.

A partir des données de la courbe de granulométrie, les caractéristiques du terril sont rassemblées dans le tableau IV.1.

**Tableau IV.1:** Caractéristiques du terril de Kenadsa

Paramètres	Valeurs
Taille de particules (mm)	1,25 – 5
Humidité (kg)	67,02
Masse volumique apparente ( $\text{kg/m}^3$ ) $10^3$	1,1
Masse volumique absolue ( $\text{kg/m}^3$ ) $10^3$	2,29
Porosité ( $\epsilon$ ) %	52
Equivalent de sable E/S (%)	95,6
Diamètre effectif $d_{10}$ (mm)	1,38
Coefficient d'uniformité (C.U)	2,78
Surface spécifique du matériau ( $\text{mm}^{-1}$ )	$\phi(1,25) = 4,8$ ; $\phi(5) = 1,2$

Selon les caractéristiques, le terril étudié appartient à la catégorie de particules grossière (poreux) et propres [90], cela est bien confirmé par sa moyenne de porosité 52% qui est proche de ceux trouvés dans la littérature et l'équivalent de sable qui nous renseigne sur la propreté de la particule. Pour la perméabilité, nous avons classé le terril en tant que particules perméables à cause de son caractère grossier. Selon [89], le coefficient d'uniformité doit être comprise entre 1- 2, ce qui n'est pas conforme pour le terril où C.U= 2,78. De ce fait, le terril présente une granulométrie non uniforme.

**IV.1.2. Composition minéralogique (DRX) du terril**

L'analyse minéralogique DRX réalisée sur la fraction globale du terril nous a fournit une information qualitative sur la composition de l'échantillon. Les Tableaux IV. 2 et IV. 3 regroupent la composition minérale du terril:

**Tableau IV.2 :** Composition minéral du de la fraction 1.25 mm terril.

Quartz	Si O <sub>2</sub>
Gypse	Ca S O <sub>4</sub> !2 H <sub>2</sub> O
Jarosite	K Fe <sub>3</sub> ( S O <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ( O H ) <sub>6</sub>
Argiles	
Illite	K (Al <sub>4</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>9</sub> (O H) <sub>3</sub> )
Kaolinite	Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ( O H ) <sub>4</sub>
Corrensite	Mg <sub>8</sub> Al <sub>3</sub> Si <sub>6</sub> O <sub>20</sub> ( O H ) <sub>10</sub> , 4 H <sub>2</sub> O

**Tableau IV.3 :** Composition minérale du mélange du terril.

Quartz	Si O <sub>2</sub>
Gypsum	Ca S O <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O
Jarosite	K Fe <sub>3</sub> ( S O <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ( O H ) <sub>6</sub>
Illite	( K , H <sub>3</sub> O ) Al <sub>2</sub> Si <sub>3</sub> Al O <sub>10</sub> ( O H ) <sub>2</sub>
Corrensite	Mg <sub>8</sub> Al <sub>3</sub> Si <sub>6</sub> O <sub>20</sub> ( O H ) <sub>10</sub> , 4 H <sub>2</sub> O
Kaolinite	Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ( O H ) <sub>4</sub>
Clinochlore	(Mg , Al , Fe ) <sub>6</sub> ( Si , Al ) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> ( O H ) <sub>8</sub>

L'identification minéralogique du terril nécessite le recours à l'analyse par diffractométrie aux rayons X. Dans notre cas, nous avons utilisé la méthode des poudres ou DEBYE-SCHERRER pour les deux échantillons (fraction de ϕ 1,25 mm et le mélange).

Cette méthode nous a permis de montrer que les deux échantillons du terril sont principalement composés d'une proportion assez importante de quartz ( $\text{SiO}_2$ ) (Figures IV.2 et 3).

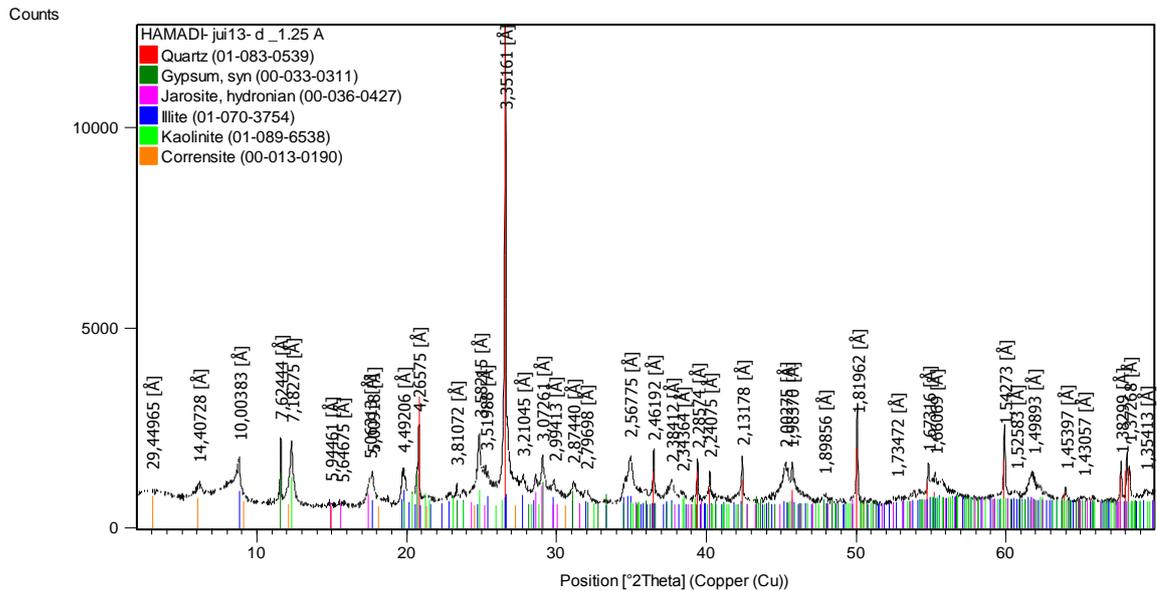


Figure IV.2 : Diagramme DRX du terril de la fraction 1.25 mm.

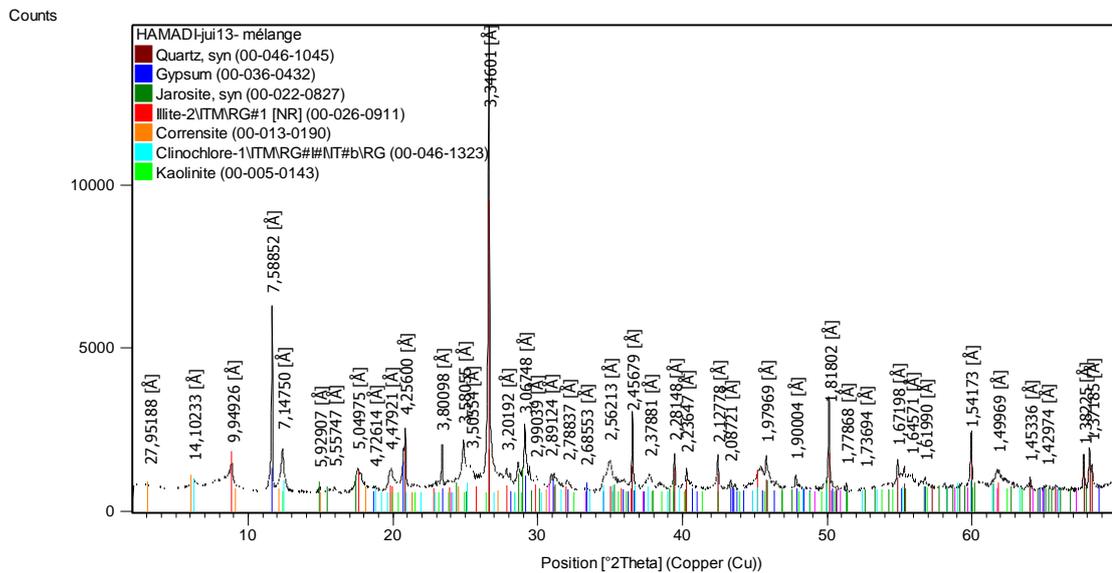


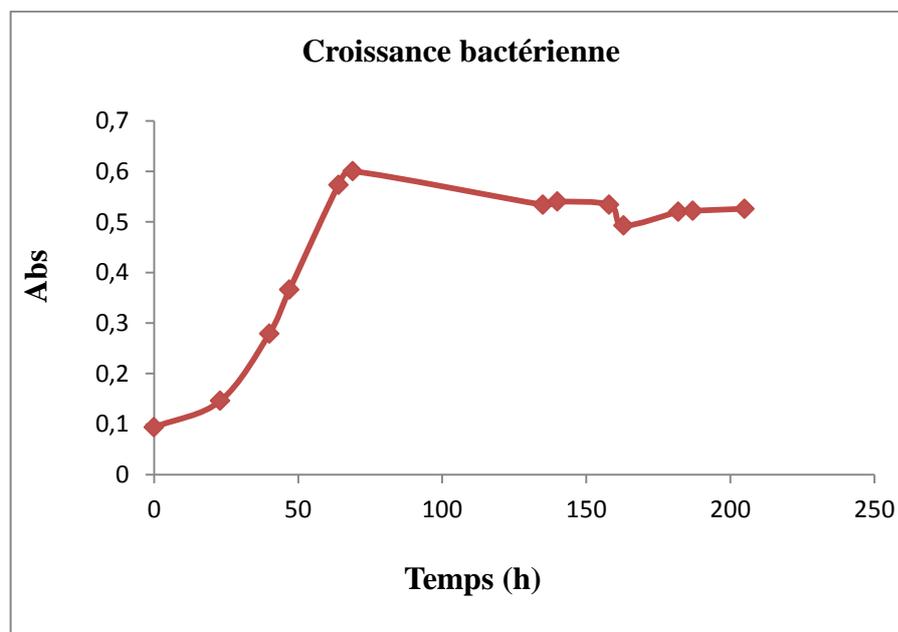
Figure IV.3 : Diagramme DRX du mélange du terril de kenadsa.

## IV.2. Biodégradation du phénol en mode batch

Dans la présente étude, la cinétique de la biodégradation du phénol a été étudiée. Les résultats obtenus sont employés pour calculer le rapport optimal de la cinétique de biodégradation.

### IV. 2. 1. Cinétique de la croissance de *Pseudomonas* sp.

Le suivi de l'évolution de la concentration en biomasse au cours du temps se fait par lecture directe de l'absorbance par spectrophotométrie à 600 nm. La figure IV.4 montre le développement de la souche bactérienne dans le milieu MMB en absence du phénol.



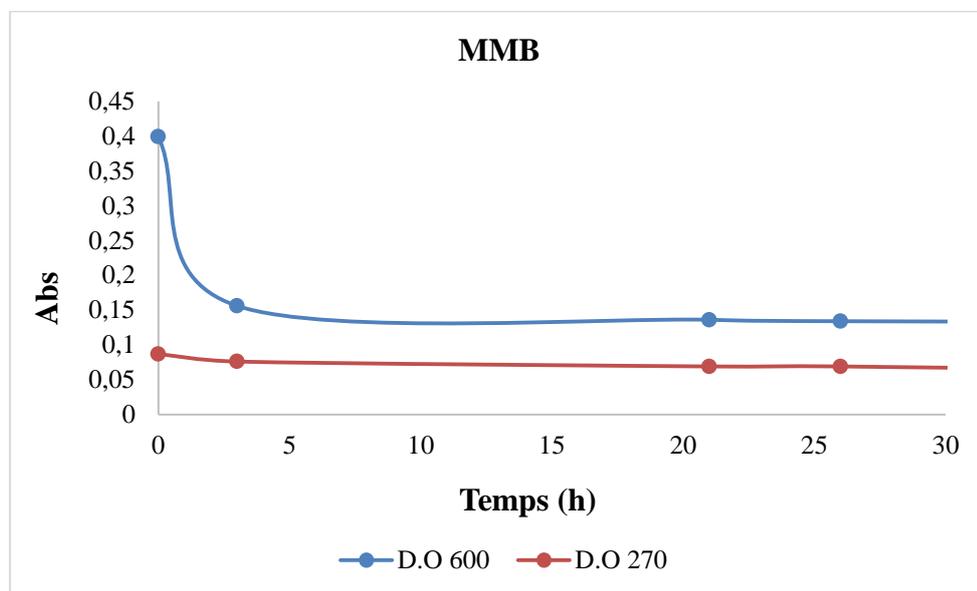
**Figure IV. 4 :** Croissance bactérienne en fonction du temps dans le MMB.

D'après la figure IV. 4, on voit clairement qu'après la phase de latence, la souche *Pseudomonas* sp. mise en culture sur le milieu minéral de base (MMB) présente en 69 heures une bonne croissance bactérienne qui correspond à la phase exponentielle. Au delà de 69 heures une phase stationnaire est observé.

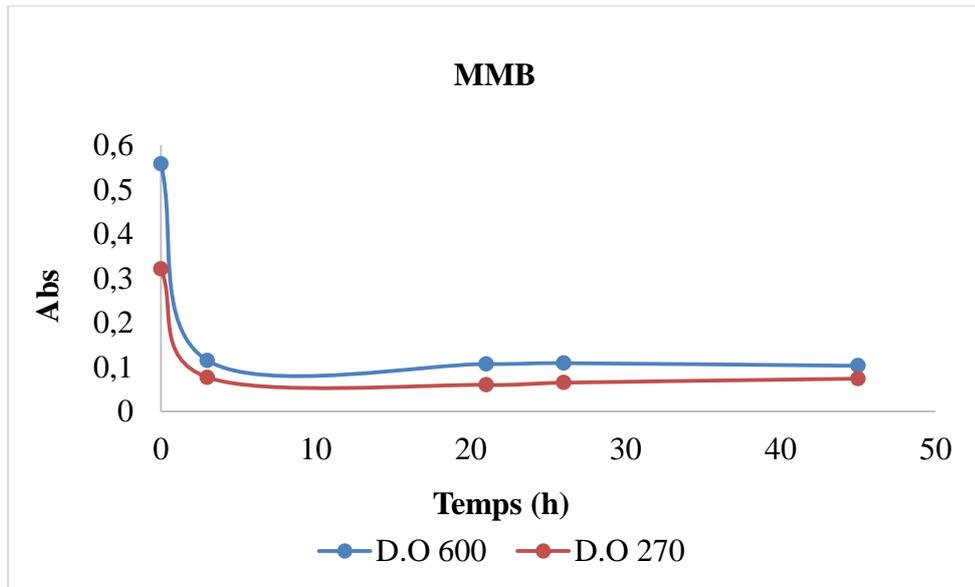
En plus, il est intéressant de noter que cette souche bactérienne dans le milieu MMB présente une absorbance de 0,6 avec un taux de croissance ( $\mu$ ) de  $0,036 \text{ h}^{-1}$ .

#### IV.2.2. Biodégradation du phénol avec des bactéries non acclimatées

Les essais ont été menés dans les mêmes conditions opératoires avec des bactéries non acclimatées à différentes concentrations du phénol ( $10$  et  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Les figures 5 et 6, montrent le comportement de la souche bactérienne dans le processus de biodégradation du phénol.



**Figure IV.5 :** Cinétique de croissance de *Pseudomonas* sp. avec une concentration de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ .



**Figure IV.6 :** Cinétique de croissance de *pseudomonas* sp. avec une concentration de 100 mg.L<sup>-1</sup>.

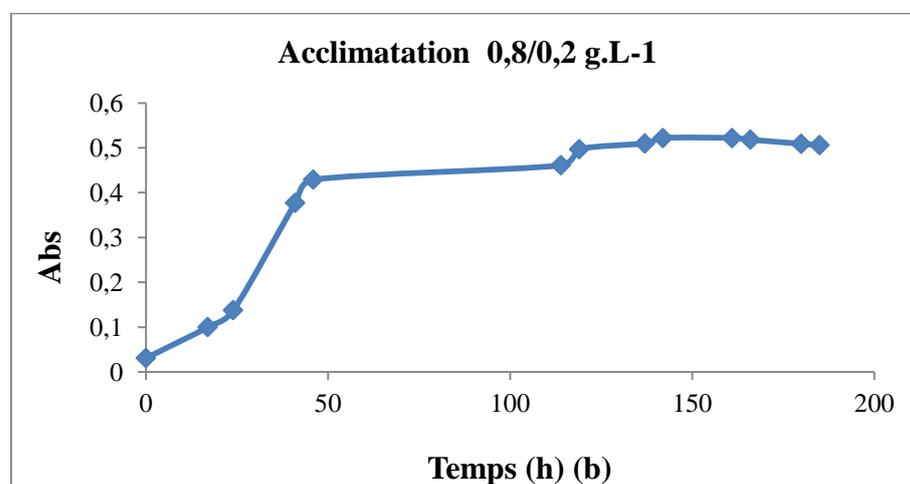
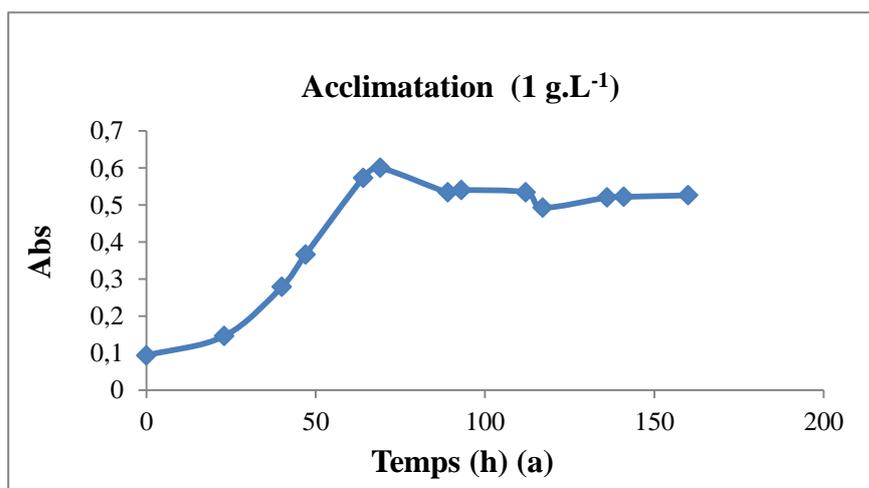
A la lumière des résultats obtenus (Figure IV. 5), une légère décroissance du phénol est observée avec la diminution de la croissance bactérienne au bout de 3 heures, au-delà, on remarque une linéarité de la concentration de la biomasse et du phénol. Par contre, la figure IV. 6, illustre une inhibition automatique des bactéries par la forte réduction de 76,9% dans le même intervalle du temps. Ce qui peut être expliquée par une lyse bactérienne qui est provoquée par la consommation du phénol après la mise en culture. Les essais de biodégradation avec la souche bactérienne *Pseudomonas* sp. ont présenté une faible croissance sur le milieu MMB en présence de phénol.

En première approximation, on se trouve dans une situation où la souche bactérienne n'arrive pas à utiliser le phénol comme seule source de carbone pour sa croissance et donc, la non dégradation du phénol. De ce fait, l'acclimatation de *Pseudomonas* sp. s'est avérée obligatoire ou nécessaire. Pour cela, des essais d'acclimatation de la souche ont été entrepris pour l'adaptation de la bactérie au polluant organique qui est le phénol.

### IV.3. Acclimatation de *Pseudomonas* sp. pour la dégradation du phénol

Afin de dégrader le phénol, les bactéries doivent être adaptées à un environnement contenant le phénol comme la source de carbone. Pendant le processus d'acclimatation, certaines enzymes sont induites de sorte qu'elles soient disponibles pour participer dans la réaction du métabolisme. Par conséquent, l'acclimatation de la mixture bactérienne a été effectuée pour adapter les cellules à assimiler le phénol comme source unique de carbone et d'énergie pendant sa biodégradation. Ceci est très important en traitant les composés toxiques tels que le phénol et autres composés organiques [33].

La bactérie *Pseudomonas* sp. a été mise en culture pour se développer et s'acclimater sur le milieu MMB contenant le phénol et le glucose comme source de carbone jusqu'à une concentration de  $800 \text{ mg.L}^{-1}$  du phénol. L'acclimatation détaillée de la culture est illustrée sur la figure IV.7 (a, b, c, d et e) où l'adaptation des bactéries a été conduite graduellement sur des concentrations de plus en plus élevées de phénol.



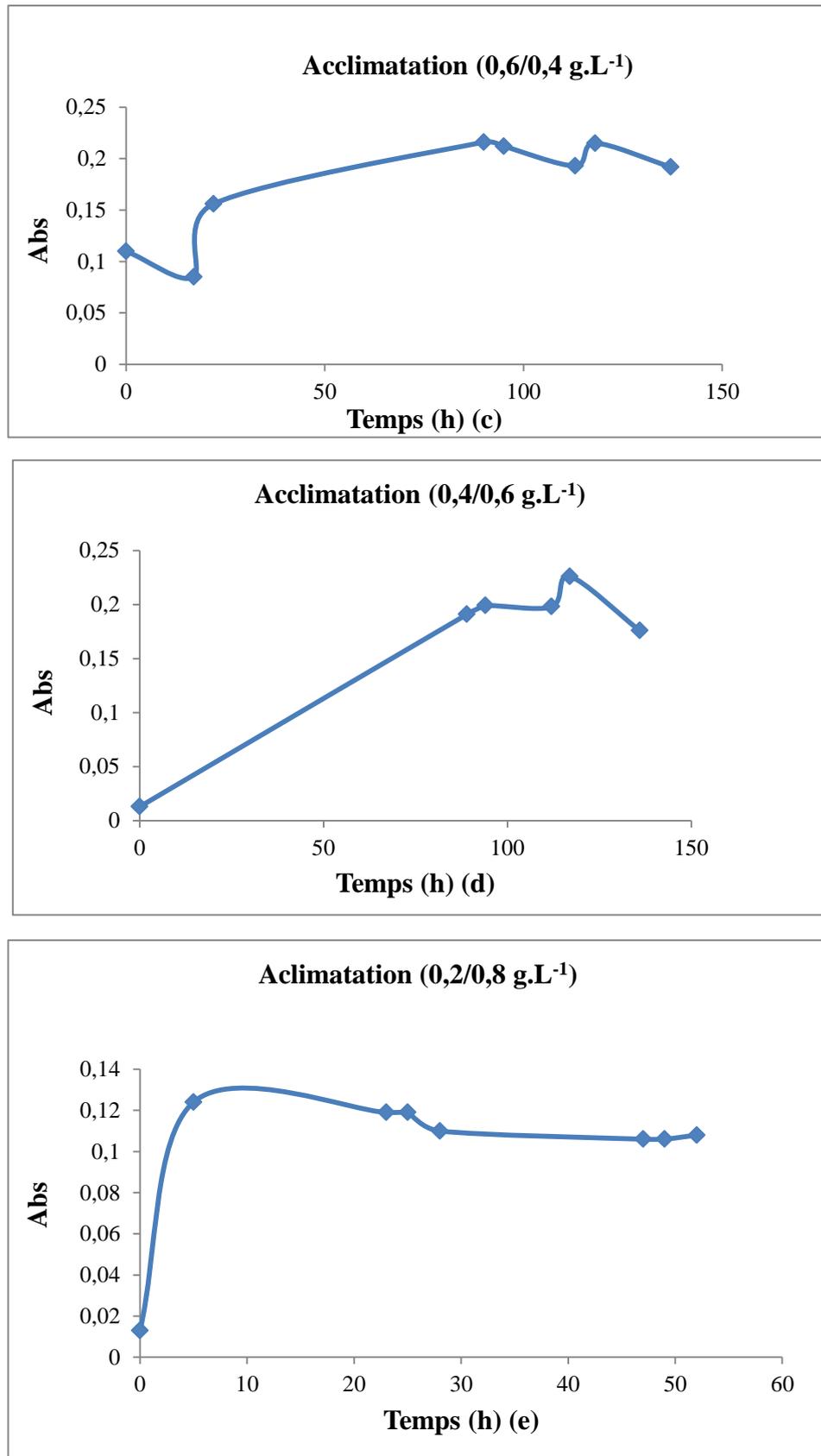


Figure IV.7 : Acclimation des cellules bactériennes pour l'adaptation au phénol.

L'adaptation des cellules à une concentration de 800 mg.L<sup>-1</sup> de phénol a été possible en utilisant une culture après 24h d'incubation à 30°C. On remarque que le rapport 0,8/0,2 présente une meilleure allure et par conséquent une meilleure valeur de l'absorbance pour la cinétique de biodégradation par rapport à d'autres fractions.

Ceci peut être expliqué par la grande quantité du glucose présente dans le milieu comme source de carbone la plus assimilée par les microorganismes. Cependant, on observe une faible croissance pour le rapport 0,2/0,8 dans lequel le phénol est présent en grande quantité. Ce qui peut être expliqué par le fait que les cellules sont adaptées au phénol mais pas assez pour avoir une bonne croissance et donc une sorte d'inhibition par le phénol.

#### IV.3.1. Réactivation de la souche *Pseudomonas* sp.

La bactérie du genre *Pseudomonas* sp. acclimatée a été réactivée dans des boîtes de Pétri chaque 24h sur gélose nutritive. Les boîtes de Pétri ont été maintenues dans un incubateur à 30°C. Les bactéries ont été stockées par la suite dans un réfrigérateur. La figure IV.8 illustre les stries de *Pseudomonas* sp. sur boîtes de Pétri.



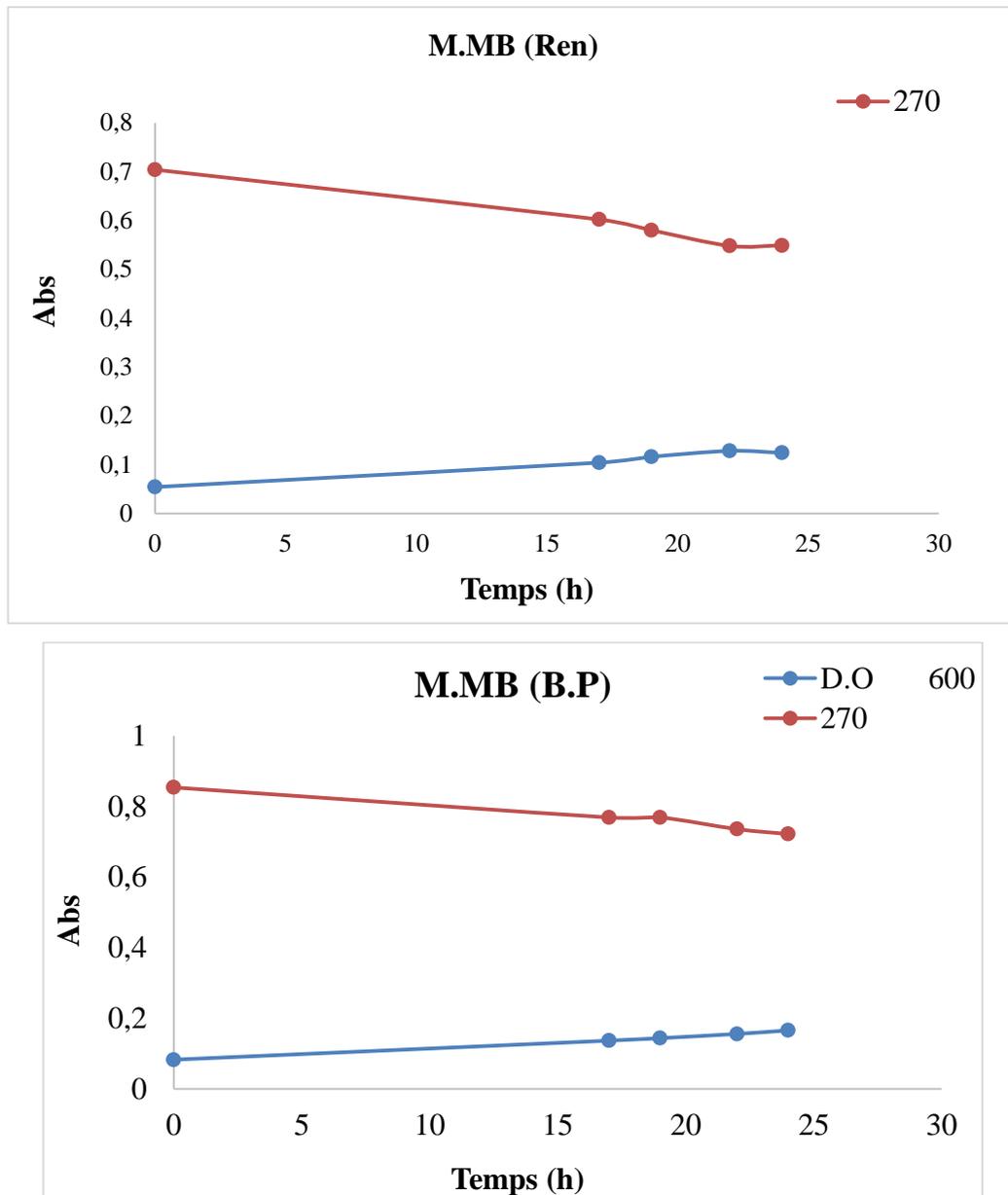
**Figure IV.8 :** Réactivation de *Pseudomonas* sp. acclimatée sur boîte de pétri.

#### IV.3.2. Effet de l'acclimatation des bactéries au phénol sur la biodégradation

L'amélioration des microorganismes adaptés à dégrader le phénol se manifeste par l'amélioration de la cinétique de croissance des cellules bactériennes, ainsi que l'augmentation de l'absorbance de croissance des bactéries libres.

La figure IV.9 (a et b) représente le profil de biodégradation du phénol à  $100\text{mg.L}^{-1}$  au cours du temps par la bactérie *Pseudomonas* sp. acclimatée à  $200\text{ mg.L}^{-1}$  de phénol à partir d'un milieu de renouvellement des souches acclimatées et aussi à partir des boites de pétri.

La cinétique de biodégradation pour les bactéries adaptées est plus rapide, et le phénomène de biodégradation se déclenche immédiatement après leur mise en culture, contrairement aux bactéries non adaptées qui prennent plus de temps à se développer et à biodégrader le phénol.



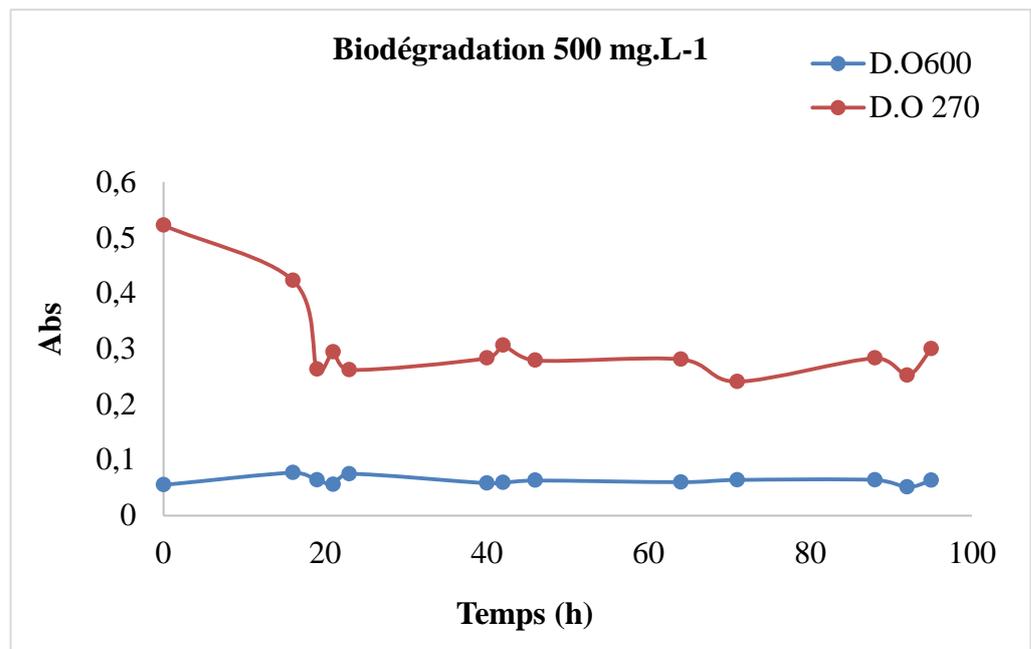
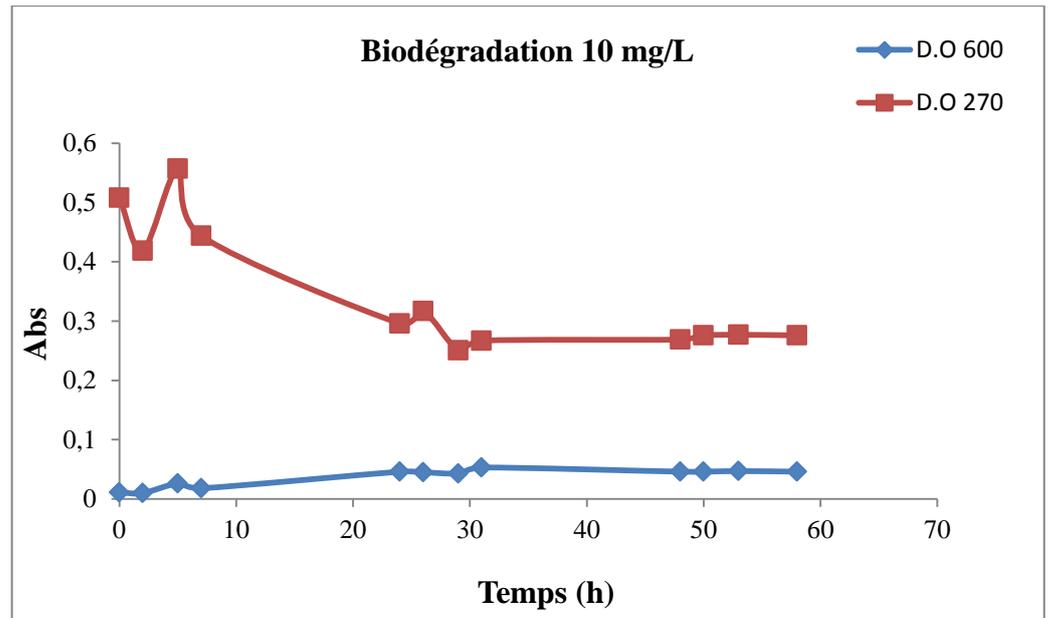
**Figure IV.9 (a et b) :** Biodégradation du phénol par des bactéries acclimatées  
 (a) milieu renouvelée, (b) boite de pétri,  $P_{\text{phénol}} = 100\text{mg.L}^{-1}$ .

Selon cette figure, une phase de latence de 17 heures est observée à partir de laquelle la dégradation commence mais selon un profil faible. Seulement 22 et 15,4 % de la concentration initiale du phénol sont dégradées que ce soit pour l'inoculum prélevé de la boîte de pétri ou du milieu de renouvellement.

En conclusion, le profil de la dégradation du phénol par des cellules acclimatées, illustre une décroissance ordinaire du phénol par rapport aux cellules non acclimatées.

#### **IV.4. Effet de la concentration sur la biodégradation du phénol**

La figure IV.10 (a et b), représente la biodégradation du phénol à des concentrations de 10 et 500 mg.L<sup>-1</sup> de phénol. Cela nous montre que cette souche bactérienne a pu dégrader 51 et 49,6 % de la concentration initiale du phénol après 29h de croissance pour 10mg.L<sup>-1</sup> et 19h pour 500mg.L<sup>-1</sup> respectivement.



**Figure IV.10 (a et b):** Effet de la concentration du phénol sur la dégradation, a= 10mg.L<sup>-1</sup> et b= 500mg.L<sup>-1</sup>.

Ces deux figures nous montrent que l'augmentation de la concentration initiale en phénol induit à une inhibition des bactéries. Il a été remarqué que pour la concentration de 10 mg.L<sup>-1</sup> la croissance est très rapide contrairement à la concentration de 500 mg.L<sup>-1</sup>.

De ce fait, on peut dire que la souche ne peut pas croître à des concentrations élevées en phénol et qu'une inhibition de la croissance et donc de la dégradation est observée.

#### IV.5. La formation du biofilm pour la mise en application du procédé de la biodégradation du phénol

Après l'ensemencement du réacteur avec la bactérie acclimatée, l'apparition du biofilm sur le biofiltre à la surface du support est observée après 2 jours. Un développement du biofilm de 3cm de hauteur a été observé au cours de l'expérience, au-delà de ces deux jours, une augmentation brusque de la température atteignant plus de 38°C à provoquée une inhibition de la croissance et donc le non développement du biofilm.

Les expositions de la figure IV.11 (a et b) chronomètrent le profil de la formation du biofilm pour la dégradation du phénol dans le réacteur aérobique.

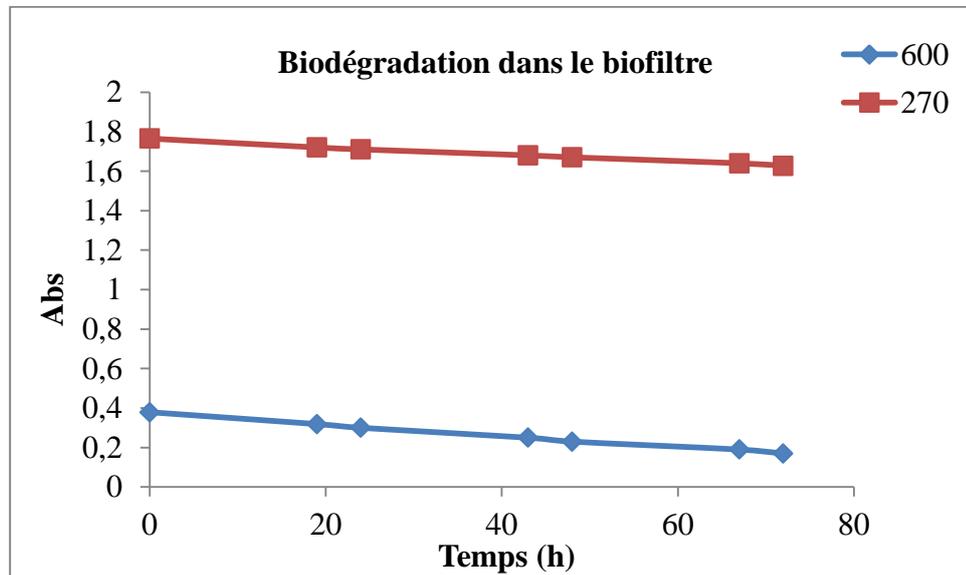


**Figure IV.11** (a) début de la formation du biofilm

(b) augmentation de la hauteur du biofilm 3cm

L'essai a été renouvelé une autre fois dans les mêmes conditions et la figure IV.12 présente l'évolution de la croissance bactérienne qui traduit le comportement des bactéries en présence d'une source de carbone «le phénol» à 100 mg.L<sup>-1</sup>. D'après cette figure,

l'absorbance diminue avec une légère diminution du phénol sans pour autant le consommer.



**Figure IV. 12:** Biodégradation du phénol dans le réacteur.

On peut conclure que la souche est partiellement inhibée par le phénol sans que cela n'influe sur sa croissance. De ce fait, on peut suggérer d'augmenter la quantité de l'inoculum au début de l'expérience afin de permettre une bonne croissance et par conséquent une dégradation du phénol.

## **Introduction générale**

La pollution environnementale est considérée comme un effet secondaire de la société industrielle moderne qui rejette des composés organiques synthétiques dans le milieu naturel.

Le phénol représente un composé aromatique modèle connu pour son effet inhibiteur sur les microbes, il est très répandu dans l'environnement et présente une toxicité élevée pour de nombreuses espèces [1]. Les phénols se trouvent dans les effluents aqueux à des concentrations allant jusqu'à  $25 \text{ mg.L}^{-1}$ , en raison de leur large utilisation dans de nombreux processus de fabrications. Les phénols sont nocifs et suspectés d'être cancérigène même à faibles concentrations [1, 2].

Le rejet des eaux chargées en phénol dans l'écosystème est une source de pollution, d'eutrophisation et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique, il présente un danger potentiel de bioaccumulation qui peut engendrer à court ou long terme des conséquences très graves pour la santé ainsi que pour l'hygiène publique à travers la chaîne alimentaire et avoir des répercussions économiques. Comme la majorité des polluants, les phénols sont persistants et récalcitrants à la biodégradation naturelle, cela implique une difficulté à les dégrader par rapport à d'autres composés, ce qui explique leurs accumulations dans le sol et les eaux de surface pouvant être entraînés et disséminés par les eaux de pluies dans les nappes phréatiques.

En raison de leur toxicité et propriétés organoleptiques désagréables et leur omniprésence dans l'environnement, la US Environmental Protection Agency (EPA) et la Communauté Européenne (CE) ont inclus les phénols dans leur liste de polluants prioritaires [2].

De ce fait, la résolution des problèmes environnementaux engendrés par ces molécules indésirables et leur élimination sont une priorité incontournable. L'emploi des procédés spécifiques permet actuellement d'éliminer la plupart de ces pollutions de façon satisfaisante, mais souvent ils représentent des inconvénients tels que le coût et l'efficacité parfois limités.

Notre travail, consiste à étudier la biodégradation du phénol dans un biofiltre, constitué d'une souche bactérienne autochtone immobilisée dans un support minéral, «le terril» de la région sud ouest d'Algérie.

Pour atteindre ces objectifs, ce travail sera structuré en quatre chapitres:

Un premier chapitre qui est subdivisé en deux volets : Le premier exposera l'état de l'art sur le phénol, la pollution qu'il engendre et les procédés de traitement des milieux aqueux pollués. Le deuxième sera consacré à des notions relatives à la biodégradation du phénol, aux mécanismes de dégradation et aussi à la croissance microbienne en utilisant un biofiltre comme support qui seront présentés et confortés à divers travaux de recherche.

Un second chapitre est consacré aux milieux poreux. Dans une première partie, des généralités sur le procédé de biofiltration seront présentées suivie d'une partie détaillée sur la formation du biofilm et des notions sur le support utilisé pour la valorisation des matériaux locaux (analyse granulométrique d'où la détermination des principaux paramètres: la porosité, C.U, l'analyse minéralogique).

Le troisième chapitre définit les moyens matériels mis en œuvre pour caractériser les différents phénomènes et les méthodes expérimentales pour le procédé de biodégradation en mode batch et dans le biofiltre, ainsi que les différentes analyses effectuées.

Dans le quatrième chapitre, nous analyseront et exploiterons les résultats expérimentaux de l'étude de la cinétique de croissance bactérienne et de biodégradation, réalisée dans les conditions optimales établies.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale où les résultats essentiels et les perspectives seront présentés.

# ANNEXE

## 1. La courbe d'étalonnage du phénol:

Une série d'échantillons a été préparé en vue de l'établissement de la courbe d'étalonnage à partir de la solution mère 1g/l. Cette dernière comprendra les concentrations suivantes: 100 mg.L<sup>-1</sup> à 800 mg.L<sup>-1</sup>. L'analyse par spectrophotométrie à l'UV a donné les résultats suivants (Figures (a et b)).

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

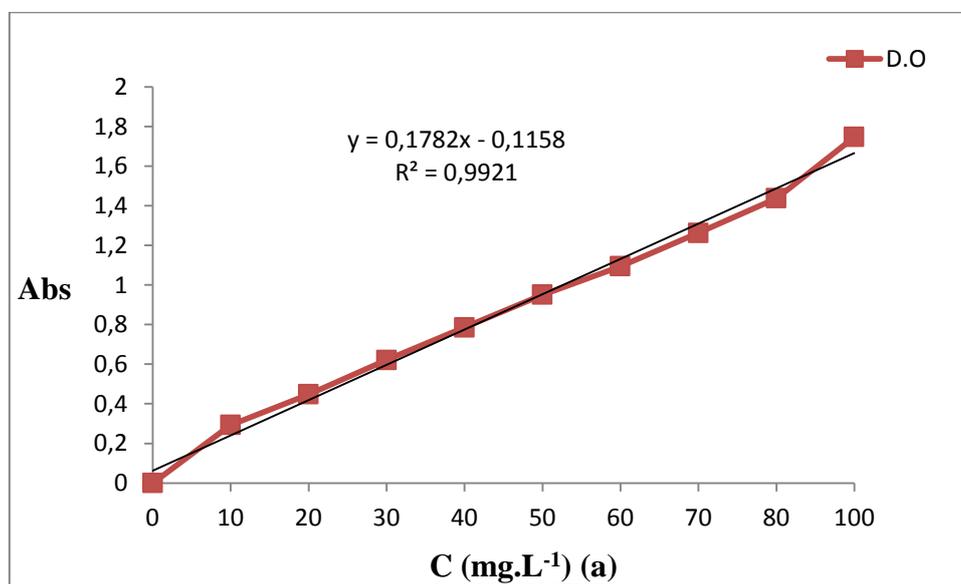
Avec:

C<sub>1</sub>: concentration de la solution mère ;

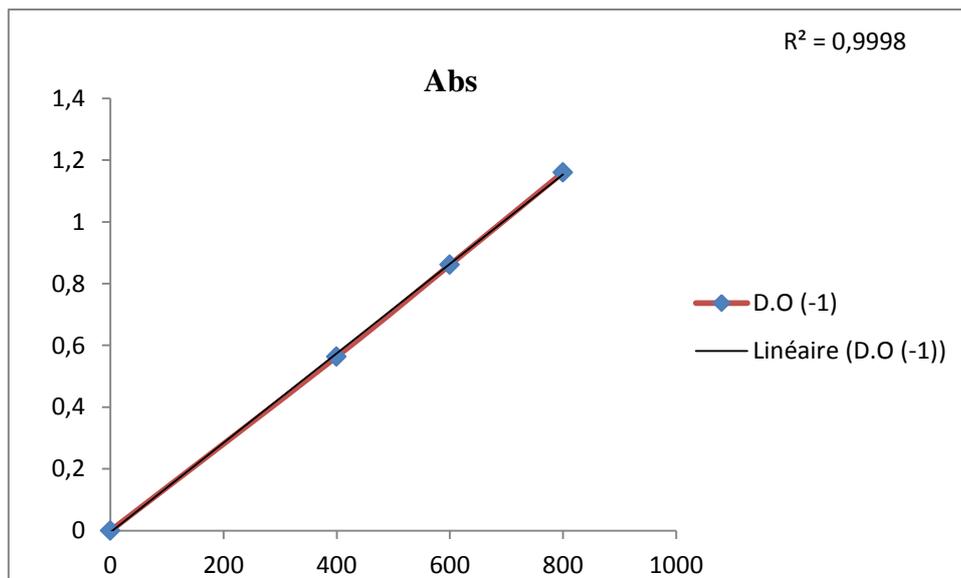
C<sub>2</sub>: concentration des solutions à préparer ;

V<sub>1</sub>: volume à prélever de la solution mère ;

V<sub>2</sub>: volume des solutions préparé, fixés à 50 mL.



**Figure a:** Courbes d'étalonnage du phénol de 10 à 100 mg.L<sup>-1</sup> à 270nm.



**Figure b:** Courbes d'étalonnage du phénol de 100 à 800mg.L<sup>-1</sup> 270nm.

## 2. Analyse granulométrique

Les courbes granulométriques des lits filtrants ont été établies par passages sur des colonnes de tamis (méthodes normalisés EN 933-1 et EN 933-2). Le tableau.1 regroupe les résultats de la distribution granulométrique. Les résultats des refus sont exprimés en pourcentage de la masse sèche de M1 de départ.

**Tableau1:**Résultats de la distribution granulométrique.

Tamis dt (mm)	di (mm)	Refus partiel	Refus cumulé (%).M1	Refus cumulés (%)	Tamisats (%)
5	5	405,7	405,7	20,25	79,75
4	4,5	130,23	536,23	26,77	73,23
2,5	3,25	544,16	1080,39	53,95	46,05
2	2,25	184,9	1265,29	63,18	36,82
1,6	1,8	231,49	1496,78	74,74	25,26
1,25	1,425	260,44	1757,22	87,75	12,25
1	1,125	156,13	1913,35	95,54	4,46
0,063	0,5315	71,42	1984,77	99,11	0,89
Fond	0,0315	17,71	2002,48	100	0