

Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones librement suspendus dans un réacteur batch

F. Amrouche^{1*}, A. Namane² et A. Hellal²

¹ Division Hydrogène, Centre de Développement des Energies Renouvelables,
B.P. 62, Route de l'Observatoire, Bouzaréah, Alger, Algérie

² Laboratoire des Sciences et Technique de l'Environnement,
Ecole Nationale Polytechnique, B.P. 182, Avenue Hassen Badi, Alger, Algérie

(reçu le 10 Janvier 2011 – accepté le 26 Septembre 2011)

Résumé - Dans cet article, la biodégradation du phénol dans un réacteur batch par des bactéries autochtones, bacilles à Gram négatif et aérobies strictes, isolées à partir des eaux résiduaires usées de l'oued El Harrach, Alger, a été étudiée. L'effet de l'adaptation préalable des cellules au phénol, ainsi que l'influence de la concentration initiale sur la cinétique de biodégradation ont été déterminées. Les cellules adaptées préalablement au phénol avant la mise en culture, ont montré une meilleure disposition à le biodégrader, ainsi qu'un meilleur taux de croissance bactérien qui a atteint $0,10 \text{ h}^{-1}$ pour une concentration initiale en phénol de 100 mg/l. L'inhibition des cellules par le phénol a été observée pour une concentration de 100 mg/l. Ce travail a montré que cette souche bactérienne autochtone en culture libre a une très grande aptitude à biodégrader le phénol dans un réacteur batch.

Abstract - In this paper, the biodegradation of phenol in a batch reactor by indigenous bacteria, which is Gram-negative and strictly aerobic, isolated from wastewater from sewage 'oued El Harrach, Algiers', was studied. The effect of prior adaptation of cells to phenol and the influence of initial concentration on the kinetics of biodegradation were determined. Cells previously adapted to phenol, showed a better disposition to biodegrade it and a higher rate of bacterial growth, which reached 0.10 h^{-1} for an initial concentration of phenol of 100 mg/l. The inhibition of cells by phenol was observed at a concentration of 100 mg/l. This work has shown that this bacterial strain has a great free ability to biodegrade phenol in a batch reactor.

Mots clés: Phénol - Biodégradation - Bactéries autochtone - Culture en batch.

1. INTRODUCTION

La pollution de l'eau par les composés organiques est causée principalement par une forte industrialisation qui rejette des polluants toxiques dans l'environnement. Comme la majorité des polluants, les composés phénoliques sont nocifs, et ils se trouvent dans les effluents de nombreuses industries, telles que les industries chimiques et pétrochimiques, celles des résines et des cokeries, des pesticides, du textile, du papier et même dans l'industrie pharmaceutique et beaucoup d'autres.

C'est pour cela que ce sont les polluants les plus fréquemment rencontrés dans les rivières, les eaux marines, les rejets industriels, les effluents urbains et même dans les nappes phréatiques contaminées.

* fethia.amrouche@gmail.com

Pour neutraliser ces polluants, une technique très prometteuse et efficace qui est simple et peu coûteuse se reflète dans le traitement biologique de ces effluents. Cette méthode d'élimination qui est la biodégradation consiste à utiliser des microorganismes qui ont la capacité de dégrader le polluant et donc de le métaboliser en substances non toxiques grâce à des réactions biochimiques.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Souche bactérienne

La souche bactérienne est une bactérie autochtone, qui a été isolée à partir des eaux résiduaires de l'oued El Harrach dans des travaux antérieurs et qui est capable de biodégrader le phénol.

2.2 Milieu de culture du bioréacteur

Les bactéries ont été cultivées dans un réacteur agité en batch dans un milieu de culture minéral liquide contenant pour 1000 ml d'eau distillée, la composition suivante: 1,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g NaCl; 0,5 g MgSO_4 ; 3 g NH_4NO_3 ; 0,02 g CaCl_2 ; 0,02 g FeSO_4 .

Le phénol est ajouté par filtration stérilisante (0.2 μm de pore) à partir d'une solution concentrée au milieu minéral stérilisé dans un autoclave à 121.1 °C et 1 atm pendant 20 mn.

L'adaptation des cellules à une concentration de 100 mg/l de phénol a été possible en utilisant une culture après 4 8h d'incubation à 37 °C.

2.3 Etude de la biodégradation

Dans ce travail, l'étude de l'influence de l'adaptation des cellules, ainsi que différentes concentrations initiales en phénol sur la biodégradation ont été conduites expérimentalement.

Les conditions de la réalisation de ces essais sont décrites dans le **Tableau 1**.

Tableau 1: Conditions de la réalisation des essais de la biodégradation du phénol par des cellules autochtone librement suspendus dans un réacteur batch

Essai	Adaptation	Concentration initiale de phénol
Influence de l'adaptation	Cellules non adaptées au phénol	100 mg/l
	Cellules adaptées au phénol à 100 mg/l de phénol	
Influence de la Concentration	Cellules adaptées au phénol à 100 mg/l de phénol	100 – 300 – 500 – 800 mg/l

Le réacteur utilisé au cours de l'expérimentation est constitué d'un Erlenmeyer thermostaté de 3 litres. qui contient 1 litre de milieu de culture minéral stérilisé, comportant une sortie permettant d'effectuer des prélèvements réguliers en zone stérile.

L'aération en continue, est générée par un compresseur à travers un diffuseur d'air, sous les conditions opératoires suivantes:

- Température de 37 °C; - pH proche de la neutralité; - Faible agitation de 75 tr/mn;
- Aération de 0,4 l/mn d'air.

L'ensemencement se fait à partir d'une suspension diluée de cellules ayant une concentration connue de masse sèche de 7 mg.

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

Des essais ont été menés dans les mêmes conditions sans ensemencement pour évaluer le taux d'élimination du phénol par voie abiotique.

2.4 Analyse

2.4.1 Dosage du phénol

Des prélèvements à intervalles de temps réguliers ont été effectués afin de suivre le taux de biodégradation du phénol. Le dosage du phénol a été effectuée par une analyse spectrophotométrique du phénol selon la méthode colorimétrique NF T 90-204 (1979) [1].

Il s'agit de la condensation en milieu basique de l'ion phénate par le 4-amino antipyrine en présence d'un oxydant, le ferricyanure de potassium. La solution de coloration rouge est analysée par spectrophotométrie d'adsorption moléculaire UV/Visible (Shiadzu UV Min-1240) à une longueur d'onde de 510 nm dans une cuve de 2 mm de trajet optique avec l'eau distillée comme référence.

La concentration de phénol, exprimée en mg/l, est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie à la même longueur d'onde.

2.4.2 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 2 mm de trajet optique avec l'eau distillée comme référence.

En utilisant la courbe d'étalonnage préalablement établie, la valeur de la densité optique lue est ensuite convertie en concentration de matière sèche de biomasse, exprimée en mg de matière sèche par litre.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Le taux spécifique de croissance de cette souche bactérienne autochtone a été déterminé par la procédure usuelle pour l'analyse cinétique de culture en batch. Au cours de la phase de croissance exponentielle, le taux de croissance est constant et maximal ($\mu = \mu_{\max}$) est donné par l'équation suivante [2]:

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

μ : Taux de croissance, (h^{-1})

X : Concentration cellulaire en matière sèche de bactéries, (mg/l)

t : Temps, (h)

Ce taux de croissance correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe, $\ln X = f(t)$, [3, 4].

La vitesse spécifique de biodégradation du phénol est donnée par l'équation suivante: [4, 5]

$$v = -\frac{1}{X} \times \frac{dS}{dt} \quad (2)$$

v : Vitesse spécifique de biodégradation (consommation) du phénol, (mg/mg.h)

X : Concentration de la biomasse en matière sèche de bactéries, (mg/l)

S : Concentration instantanée en phénol, (mg/l)

t : Temps d'incubation (h)

3.1 Effet de l'adaptation des bactéries au phénol sur la biodégradation

La figure 1 représente le profil de biodégradation de 100 mg/l de phénol au cours du temps par des bactéries autochtones non adaptées et adaptées à 100 mg/l de phénol. La vitesse spécifique de biodégradation (consommation) du phénol est de 0.059 mg/mg.h et 0.11 mg/mg.h respectivement pour les cellules non adaptées et adaptées au phénol.

Pour les cellules adaptées au phénol comme seule source de carbone, la cinétique de biodégradation est plus rapide, et le phénomène de biodégradation se déclenche immédiatement après la mise en culture des cellules adaptées, contrairement aux cellules non adaptées.

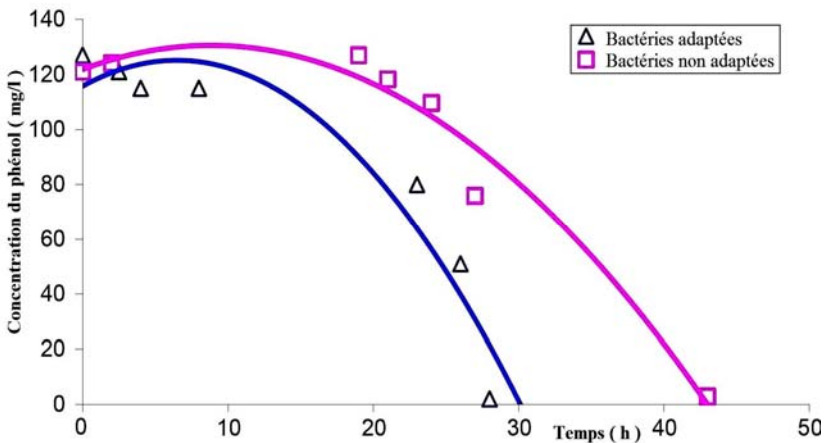


Fig. 1: Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones libres non adaptées et adaptées à phénol 100 mg/l

3.2 Effet de l'adaptation des bactéries au phénol sur la cinétique de croissance

L'amélioration de la capacité des microorganismes adaptés au phénol à le biodégrader se manifeste par l'amélioration de la cinétique de croissance des cellules bactériennes (Fi. 2), ainsi que l'augmentation du taux de croissance des bactéries libres de 0,06 à 0,10 h⁻¹.

Les cellules non adaptés prennent plus de temps à croître et à consommer (biodégrader) le phénol. Ces résultats sont conformes avec les travaux de Shimp *et al.*, [6].

3.3 Effet de la concentration sur la biodégradation du phénol

La figure 3, représente la cinétique de biodégradation de concentrations croissantes de phénol, 100, 300, 500 et 800 mg/l.

Pour la concentration de 800 mg/l, cette souche bactérienne a dégradé 85 % de phénol en 240 h.

Aux des concentrations inférieures à 800 mg/l, la biodégradation du phénol est de 100 % pour une durée de temps de 28 h, 51 h, 96 h respectivement pour les concentrations de 100, 300 et 500 mg/l.

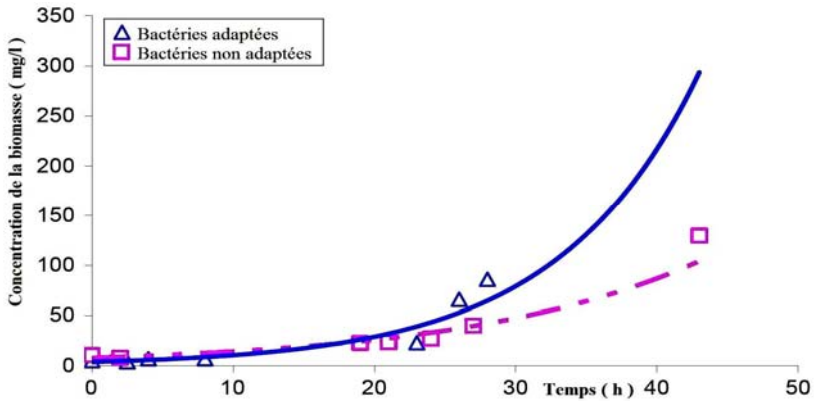


Fig. 2: Cinétiques de croissance des bactéries autochtones libres non adaptées et adaptées à phénol 100 mg/l

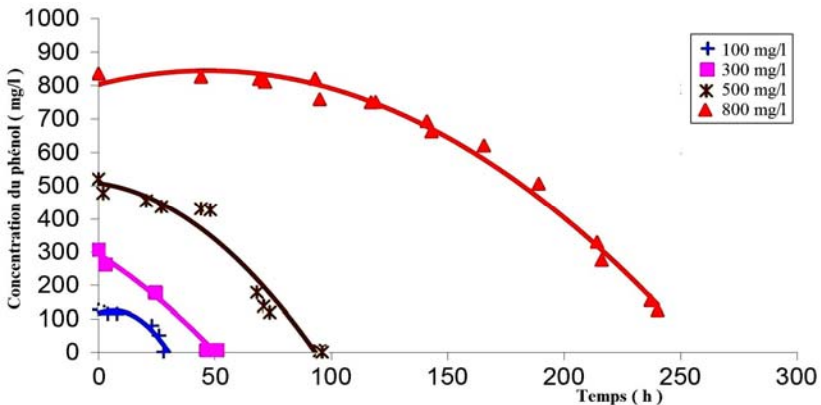


Fig. 3: Influence des concentrations initiales sur la cinétique de biodégradation

Pour déterminer l'influence de la concentration en phénol sur la vitesse spécifique de biodégradation dont le graphe est reporté sur la figure 4, la pente des courbes de biodégradation de la figure 3 pour chaque concentration en phénol a été calculée.

La vitesse de biodégradation maximale a été observée pour une concentration en phénol de 100 mg/l.

Les concentrations supérieures à cette valeur ont des vitesses de biodégradation moins importantes. La vitesse spécifique de biodégradation commence à diminuer, et cela est dû à l'inhibition de cette souche qui ne tolère pas la toxicité du phénol.

La concentration initiale en phénol influence considérablement la vitesse de biodégradation par les microorganismes. [2, 5]

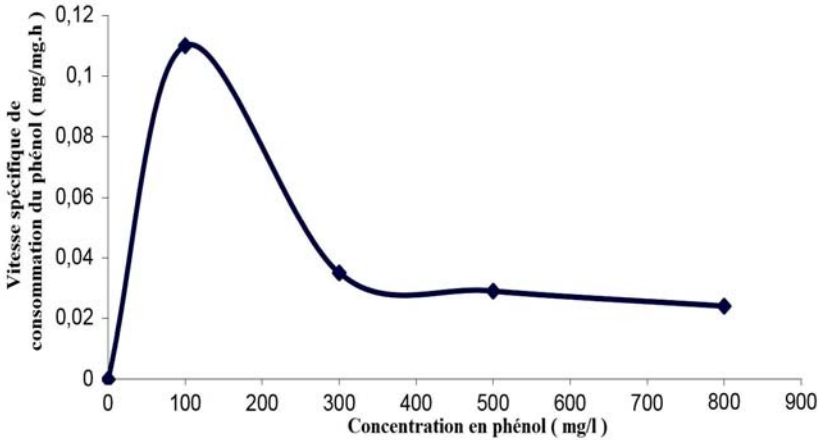


Fig. 4: Influence des concentrations initiales sur la vitesse de biodégradation

3.4 Effet de la concentration sur la cinétique de croissance

Les cinétiques de croissance bactérienne pour les différentes concentrations initiales en phénol sont représentées dans la figure 5. Il a été remarqué que pour la concentration de 100 mg/l, la croissance est très rapide avec une phase de latence très courte contrairement aux concentrations supérieures à cette valeur.

La variation du taux de croissance bactérien pour les différentes concentrations du phénol, nous indique que l'inhibition de cette souche bactérienne par le substrat commence à partir des concentrations de 100 mg/l de phénol, qui lui correspond un taux de croissance maximal de $0,11 \text{ h}^{-1}$. Cette valeur n'est pas très loin de celle obtenue par Reardon *et al.*, qui ont identifié une valeur du taux de croissance pour *Pseudomonas putida F1* de $0,11 \text{ h}^{-1}$ [7].

Dans notre cas, les valeurs du taux de croissance diminuent à partir de cette valeur jusqu'à atteindre la valeur de $0,018 \text{ h}^{-1}$ pour la concentration de 800 mg/l, (Fig. 6).

L'influence de la concentration initiale du phénol sur la durée de la phase de latence (temps déterminé à partir de l'intersection de la droite correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques) avec la droite horizontale passant par la concentration initiale, X_0) [8], a été étudié à partir de la figure 7.

L'augmentation de la concentration initiale en phénol provoque l'augmentation de la phase de latence entre 100 et 800 mg/l (Fig. 7). Car l'élévation de la concentration du substrat, oblige les cellules à s'adapter à des concentrations supérieures de ce dernier, ce qui provoque l'allongement du temps de la phase de latence.

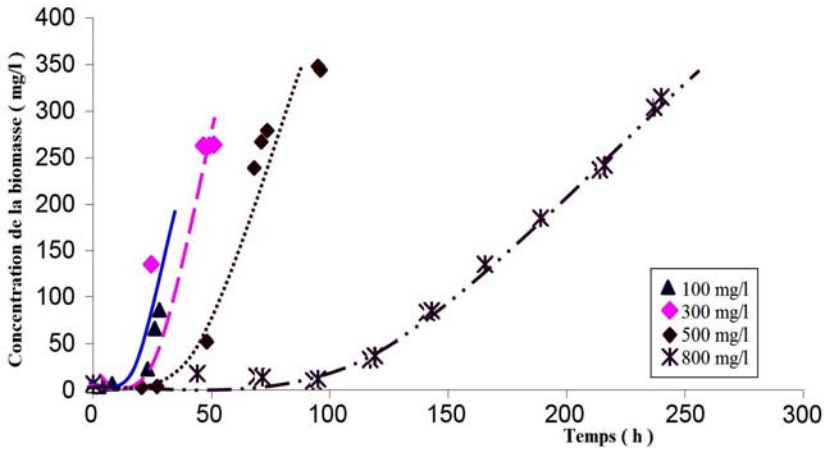


Fig. 5: Influence des concentrations initiales sur la cinétique de croissance

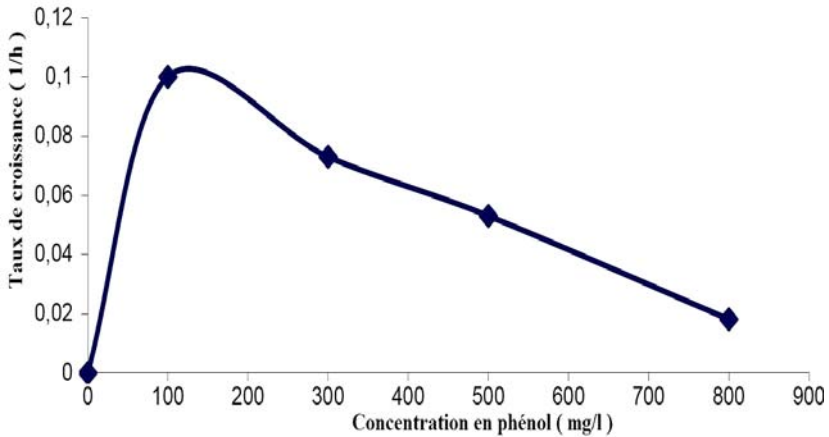


Fig. 6: Taux de croissance des cellules libres à différentes concentrations initiales en phénol

C'est ce qui a été observé par Saravanan *et al.*, [2] pour la biodégradation du phénol en culture mixte.

Alors que Monteiro *et al.*, [4] en biodégradant le phénol par *Pseudomonas putida* en culture libre en batch, ont observé que la durée de la phase de latence croît linéairement avec la concentration du phénol entre une concentration comprise entre 5 et 100 mg/l, contrairement à Dapaals *et al.*, (cités par la même source [4]), qui eux en utilisant la même souche bactérienne, ont constaté que la durée de latence croît exponentiellement avec la concentration du phénol dans l'intervalle (60 - 600 mg/l) et c'est ce qui correspond le plus à nos données expérimentales.

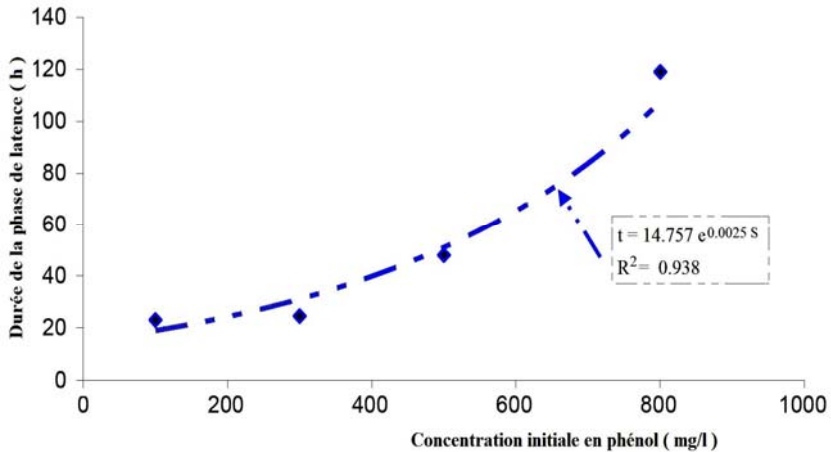


Fig. 7: Durée de la phase de latence en fonction de la concentration initiale en phénol

4. CONCLUSION

Une souche bactérienne autochtone isolée à partir des eaux résiduaires usées de l'oued El Harrach a été utilisée pour la biodégradation d'une concentration variant de 100 à 800 mg/l de phénol. Ce travail a permis de déterminer les constantes biocinétiques de cette souche nouvellement utilisée à cet effet.

Il a été constaté au cours de ces expérimentations que:

- L'adaptation améliore considérablement la cinétique de croissance bactérienne et par conséquent, celle de biodégradation du phénol dans un réacteur batch.

- La vitesse de biodégradation du phénol augmente avec l'augmentation de la concentration pour une gamme de concentrations allant jusqu'à 100 mg/l où elle atteint une vitesse maximale de 0.11 mg/mg.h. L'inhibition par le substrat se manifeste pour les cellules librement suspendues à partir de 100 mg/l, concentration à partir de laquelle il y a diminution de la vitesse de biodégradation.

- Le taux de croissance des cellules qui a atteint un maximum de 0.10 h à la concentration de 100 mg/l diminue avec l'augmentation de la concentration jusqu'à atteindre 0.018 h⁻¹ pour la concentration de 800 mg/l.

- L'augmentation de la concentration initiale en phénol provoque l'augmentation exponentielle de la phase de latence dans l'intervalle 100 et 800 mg/l, ce qui influence la cinétique de croissance bactérienne et celle de la biodégradation

REFERENCES

- [1] F. Amrouche, '*Biodégradation du Phénol par Immobilisation de Bactéries*', Mémoire de Magister, ENP, El Harrach, Alger, 2008.
- [2] P. Saravanan, K. Pakshirajan and P. Saha, '*Growth Kinetics of an Indigenous Mixed Microbial Consortium during Phenol Degradation in a Batch Reactor*', Journal of Bioresource Technology, Vol. 99, N°1, pp. 205 - 209, 2008.
- [3] A. Nuhoglu and B. Yalcin, '*Modelling of Phenol Removal in a Batch Reactor*', Journal of Process Biochemistry, Vol. 40, N°3-4, pp. 1233 - 1239, 2005.

- [4] A.A.M.G. Monteiro, R.A.R. Boaventura and A.E. Rodrigues, '*Phenol Biodegradation by Pseudomonas putida DSM 548 in a Batch Reactor*', *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 6, N°1, pp. 45 - 49, 2000.
- [5] M. Abouseoud et R. Maachi, '*Biodégradation du Phénol par des Cellules de Pseudomonas sp Libres et Immobilisées dans l'Alginate de Calcium*', *ACPE3*, pp. 324 – 334, 2001.
- [6] R.J. Shimp and F.K. Pfaender, '*Effect of Adaptation to Phenol on Biodegradation of Monosubstituted Phenols by Aquatic Microbial Communities*', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, N°7, pp. 1496 - 1499, 1987.
- [7] K.F. Reardon, D.C. Mosteller and J.D. Rogers, '*Biodegradation Kinetics of Benzene, Toluene and Phenol and Mixed Substrates for Pseudomonas putida F1*', *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 69, N°4, pp. 385-400, 2000.
- [8] J.C. Augustin, '*Modélisation de la Dynamique de Croissance des Populations de Listeria Monocytogenes dans les Aliments*', Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard, Lyon I, France, 1999.