République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Yahia Fares de Médéa

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Mémoire de Master

Étudié par : Hanane Mellat & Lamia Zerkaoui

Licences en Génie des Procédés: Université Y. F., Médéa.

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Pollution Chimique et Gestion Environnementale

Thème

OXYDATION DU 2-NITROPHENOL PAR COUPLAGE DE PROCEDE FENTON ET ENZIMATIQUE.

Soutenu devant le jury :

Dr. Mahmoud ABOUSEOUD	Professeur, UYFM	**Président**
Dr. Afaf AHMADI	Maitre-Assistant (B), UYFM	**Examinateur**
Mr. Ahmed AZIZI	Maitre-Assistant (A), UATL	**Rapporteur de mémoire**

Remerciements

*Avant tout, l'ouvrage dédié à **ALLAH**, notre créateur et maitre de l'univers de toutes ses bontés, de nous avoir envoyé le prophète **MOHAMED** qui est notre premier éducateur puis de nous avoir donné tout, du courage pour finir ce travail de recherche.*

*Tout d'abord nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à **Mr Ahmed AZIZI** notre promoteur de recherche qui n'a jamais cessé de nous prodiguer conseils et encouragements et aussi pour avoir assuré la direction de notre thèse.*

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au laboratoire de chimie 2 du Hall Technologique de l'université de Médéa. Nous tenons donc à remercier l'ensemble du personnel nous ayant aidé et soutenu pendant la mise en œuvre de nos travaux.

*Ce travail n'aurait pu aboutir ni même voir le jour sans le soutien et l'appui de nos familles, **à nos chers parents** nous ne saurons exprimer notre profonde reconnaissance envers leur compréhension et leur patience dans les moments les plus difficiles.*

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

HANANE & LAMIA



DEDICASE

D'abord et avant tout je dédie ce modeste travail à ***mes parents*** *qui n'ont pas cessés de m'aides par tous les moyens. Je leur souhaite une longue vie, je les remercie du fond du cœur pour leurs encouragements et ses conseils. Mille merci, et je leurs souhaite la santé et le bonheur.*

Á mes frères *: Bachir, Mahfoud, Cherif, Mohamed et Nabil*

Á mes sœurs *: Fadhila, Salima et Naima*

Á mes neveux *: Ilham et Houda*

Á toute les familles *: MELLAT et SOUALHI*

Á mes chères amie *: Siham, Salima, Wissam, Dalila, Asmaa et ma binôme Lamia ZERKAOUI*

Á mon promoteur *Mr Azizi Ahmed*

Sans oublier toutes la promotion de ***Master pollution chimique et gestion environnementale*** *qui ont passé avec moi de bons moments*

À tous ceux qui me sont proches et qui me sont chers.

HANANE

DEDICASE

D'abord et avant tout je dédie ce modeste travail à ***mes parents*** *qui n'ont pas cessés de m'aides par tous les moyens. Je leur souhaite une longue vie, je les remercie du fond du cœur pour leurs encouragements et ses conseils. Mille merci, et je leurs souhaite la santé et le bonheur.*

Á mesfrères*: Ahmed, Miloud et Abd El Hak*

Á mes sœurs *: Fatima et Kheira*

Á mes neveux *: Abd el ghafour et Abd erraouf,*

Á toute les familles *: ZERKAOUI et BEN AMOUR*

Á mes chères amie *: Houda, Maliana, Salima, Chahrazed, Fatima, Khadidja, Asma, Wissam, Sihem, ma binôme Hanane mellat*

Á mon promoteur *Mr Azizi Ahmed*

Sans oublier toutes la promotion de ***Master pollution chimique et gestion environnementale*** *qui ont passé avec moi de bons moments*

À tous ceux qui me sont proches et qui me sont chers.

LAMIA

تفكيك 2-نيتروفينول بعملية كيميائية وانزيمية

ملخص. يؤكسد 2 نيتروفينول بطريقتين : كيميائية فنتون و انزيمية ، تم خلالهما تقييم وجود وتركيز المواد السامة الناتجة ، وقت المعالجة و مردود التفاعل، كل الطرق السابقة لها حدود والتخلص منها قدم دراسة جدوى الربط بين طريقتين من أجل أن يكون طريقة مثالية. تم إجراء أكسدة 2 نيتروفينول بواسطة عملية فنتون بواسطة تركيزين مختلفين لكبريتات الحديد 5 و 320 ملغم / لتر، وأعطت المردودين التاليين 55 و72 ٪ على التوالي في ظرف 180 دقيقة. خلال أكسدة 2 نيتروفينول هذه العملية ولدت مواد سامة مثل الهيدروكينون، الكاتيكول والبنزوكينون .

تمت أكسدة 2 نيتروفينول أيضا بواسطة انزيم حر و مثبت و قد أعطت المردودين التاليين 63 و73٪ في ظرف 150 دقيقة.

قد بدأ دمج العمليتين بواسطة عملية فنتون وتليها عملية الأنزيمية لإزالة المواد السامة الناتجة عن عملية فنتون وزيادة معدل التخلص من 2 نيتروفينول .

هناك أربعة احتمالات دمج بين العمليتين السابقتين : اثنتين عملية فنتون بحيث يكون تركيز كبريتات الحديد 320 ملغم / لتر مع انزيم حر أو مثبت و اثنتين عملية فنتون بحيث يكون تركيز كبريتات الحديد 5 ملغم / لتر مع انزيم حر أو مثبت.

تم تقييم الاربع عمليات من خلال تركيز المواد السامة : 2 نيتروفينول، الهيدروكينون، الكاتيكول والبنزوكينون، قيم DBO_5 و قيم المواد العالقة. كانت العملية التي أعطت النتائج الأفضل : هي فنتون (320 ملغم / لتر) مع الإنزيم المثبت بمعدل تخلص من 2 نيتروفينول وصل إلى 97 % مع فترة أكسدة دامت 105 دقيقة .التراكيز النهائية للهيدروكينون، الكاتيكول والبنزوكينون 102,3،28,1 و 28,1 ملغم / لتر على التوالي مع DBO_5 يساوي 10 ملغم / لترو قيمة المواد العالقة يساوي 493.8 ملغم / لتر عند درجة حرارة 40 درجة مئوية، ودرجة حموضة 7 .

الكلمات المفتاحية : 2 نيتروفينول ، عملية فنتون، انزيم حر،انزيم مثبت.

DEGRADATION DE 2-NITROPHENOL PAR PROCEDE COUPLE CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE

RESUME. L'oxydation de 2-Nitrophénol par deux procédés chimique : Fenton et enzymatique, la peroxydase libre et immobilisée, a été évalué la présence et la concentration de produits toxique générés, temps de traitement et le rendement de dégradation. Chaque procédés précédentes comporte des limitations et afin d'éliminés une étudié de faisabilité de couplage entre ces deux procédés a été effectué afin d'avoir un procédé intégrale.La dégradation de 2-nitrophénol par le procédé Fenton a été effectué pour deux concentration différentes en sulfates de fer 5 et 320 mg/L qui donne des rendement 55et 72% pour un temps de traitement 180 minutes respectivement. Ce procédé génère des produits toxiques lors de l'oxydation de 2-nitrophénol comme l'hydroquinone, catéchol et le Benzoquinone.
Le 2-nitrophénol a été traité aussi par deux forme de peroxydase libre et immobilisée qui donnent des rendements d'ordre 63 et 73% pour un temps de traitements égale150 minutes respectivement.
Le couplage des deux procédés a été initié par le procédé Fenton et suivi par le procédé enzymatique afin d'éliminer les produits toxique généré par le procédé fenton et d'augmenter le taux d'élimination de 2-nitrophénol.
Quatre probabilité de couplage entre les deux procédés sont été évalué : procédé Fenton ($[FeSO_4]$= 320mg L^{-1}) –Peroxydase libre ou immobilisée et procédé Fenton ($[FeSO_4]$= 5 mg L^{-1}) –Peroxydase libre ou immobilisée. La validation de quatre procédés a été effectué par la concentration de produits toxiques : 2-Nitrophénol, hydroquinone, catéchol et le benzoquinone, les valeurs de DBO_5 et l'MES. Le procédé couplé le plus performant a été Fenton (320 mg L^{-1}) et l'enzyme immobilisée tel que le rendement d'élimination de 2-Nitrophénol a été attient 97% pendant 105 minutes de traitement. Les concentrations finales de l'hydroquinone, catéchol et le benzoquinone ont été 102,3, 28,1 et 3,8 mg/L respectivement avec un DBO_5=10 mg/L et un MES=493,8 mg/L sous une température= 40°C et un pH=7.
Mots clés : 2-Nitrophénol, Fenton, Peroxydase libre, Peroxydase immobilisée.

DEGRADATION OF 2-NITROPHENOL BY COUPLE PROCESS CHEMICAL AND ENZYMATICPROCESS

ABSTRACT. Oxidation of 2-nitrophenol by two process chemical: Fenton and enzymatic processes, free and immobilized peroxidase, was evaluated the presence and the concentration of toxic generated products, processing time and performance degradation. Each preceding methods has limitations and to disposed feasibility study to coupling between the two methods was made in order to have a full method. Degradation of 2-nitrophenol by the Fenton processwasperformed for twodifferent concentrations of iron sulfates 5 and 320 mg/L, which gives yield 55 and 72% for a treatment time of 180 minutes respectively. This processgeneratestoxicproductsduring the oxidation of 2-nitrophenol such as hydroquinone, catechol and benzoquinone.
2-nitrophenol was treated as two by free and immobilized peroxidase which give yields of order 63 and 73% for a time treatmentequal of 150 minutes respectively.
The coupling of the two processes was initiated by the Fenton process and followed by the enzymatic process to remove toxic products generated by the Fenton process and increase the elimination rate of 2-nitrophenol.
Four probability of coupling between the two processes were evaluated: Fenton process ([$FeSO_4$] = 320mg L^{-1}) -Peroxydase free or immobilized and Fenton process ([$FeSO_4$] = 5 mg L^{-1})-free or immobilizedPeroxydase. Validating four process was performed by the concentration of toxic products: 2-Nitrophenol, hydroquinone, catechol and benzoquinone, values of BOD5 and suspendedmatter. The most efficient coupled process was Fenton (320 mg L^{-1}) and the immobilized enzyme such as the removal efficiency of 2-Nitrophenol was attain 97% for 105 minutes of treatment. The final concentrations of hydroquinone, catechol and benzoquinone were 102.3, 28.1 and 3.8 mg/ L respectively with a BOD5 = 10 mg/L and suspendedmatter = 493.8 mg/L undertemperature= 40 °C and a pH = 7.
KEYWORDS: 2-Nitrophenol, Fenton, Free peroxidase, Immobilized Peroxidase.

SOMMAIRE

SOMMAIRE i
LISTE DES ABVERIATIONS.....ii
LISTE DES FIGURES. iii
LISTE DES TABLEAUX.....iv
Introduction général.....1

Chapitre I : **SYNTHHSE BIBLIOGRAPHIQUES**

I.1. La Nitration des phénols. 2
I.2. Les Nitrophénols 4
I.3. Le 2-Nitrophénol 4
I.3.1. Utilisation 5
I.3.2. Toxicité 5
I.3.3. Normes de rejet de 2-Nitrophénol 5

I.4. Les processus d'oxydation avancée(POA**)** 6

I.4.1. Procédé Photo-Fenton 6

I.4.2.Procédé UV / Fe^{3+-} Oxalate / H_2O_2 7
I.4.3.H_2O_2/UV..... 7
I.4.4.Ozonation.....8
I.4.5.O_3 / UV 8
I.4.6.Procédé Fenton.....8
I.5.Influence des paramètres opératoires sur l'oxydation Fenton 10
I.5.1.Concentration de fer et source de fer.....10
I.5.2.Concentration d'oxydant 10
I.5. 3.Température 11
I.5.4. Effet de l'oxygène dissous 11
I.5.5. Inconvénients du système Fenton 11
I.6. Les peroxydases 12

I.6.1. Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique 13
I.6.2.Biodégradation des composés phénoliques par les peroxydases 13

Chapitre II : MATERIELS & METHODES

II.1.Matériels et réactifs 15
II.1.1.Equipements 15
II.1.2.Verreries 15
II.1.3.Réactifs 15
II.2. Préparations des échantillons 16
II.3.Préparation des solutions tampons.....16
II.4.La courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol 17
II.5. Méthode d'extraction et purification de peroxydase de navet blanc 18
II.5.1. Mesure d'activité enzymatique d'enzyme libre 20
II. 5.2. Méthode d'encapsulation de la peroxydase 21
II.6. Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol 23
II.6.1. Méthode de couplage Fenton et la peroxydase 23
II.6.2.Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol par la peroxydase libre et immobilisée.....23
II.6.3.Méthode de couplage Fenton et la peroxydase.....23

Chapitre III : RESULTATS & DESCUSSION

III.1. Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé Fenton.....24
III.1.1. Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton... 24
III.1.2.Ordre de la cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton....25
III.1.3.Suivi de l'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton 29
III.2.Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé enzymatique.....30
III.3. Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé couplé Fenton/peroxydase 31
III.3.1 .Validation des procédés couplés en terme de MES et DBO5..... 34
CONCLUSION GENERALE..... 35
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

Abréviation et Symboles	Signification	Unité
AE	Activité Enzymatique.	UI/ml
C_o	Concentration initiale.	mg/l
C_t	Concentration un l'instant (t).	mg/l
DBO	Demande Biologique d'Oxygène.	mg d'O_2/l
DO	Densité Optique.	---------
EEB	Extrait Enzymatique Brut.	---------
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié.	---------
POA	Procédés d'Oxydation Avancés.	---------
T	Température.	°C
t	Temps.	min
R	Rendement	%
2-NP	2-Nitrophénol.	---------
λ_{max}	Longueur d'onde à DO maximal d'une substance.	nm

LISTE DES FIGURES

	Titres	N° de pages
Figure. I.1	Structure de 2-Nitrophénol.	3
Figure. I.2	Nitration de phénol.	5
Figure. I.3	structure du groupe hème de fer dans la peroxydase de raifort.	13
Figure. II.1	Courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol.	17
Figure. II.2	Protocole d'extraction et de purification de la peroxydase.	19
Figure. II.3	Protocole d'Immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de sodium.	22
Figure.III.1	Rendement de dégradation du 2-Nitrophénol par le procédé Fenton.	25
Figure.III.2	Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton.	27
Figure.III.3	Application du modèle cinétique pseudo-premier ordre d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton.	27
Figure.III.4	Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton.	28
Figure.III.5	Application du modèle cinétique pseudo-premier ordre d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton.	28
Figure.III.6	Produits final de réaction Fenton lors de l'oxydation de 2-Nitrophénol.	29
Figure.III.7	Variation de rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase immobilisée.	30
Figure.III.8	Variation de rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase libre.	31
Figure.III.9	Performance de quatre procédé de couplés Fenton-Peroxydase.	33

LISTE DES TABLEAUX

	Titres	N° de pages
Tableau I.1	Les effets de 2-Nitrophénol sur la santé.	5
Tableau II.1	Les conditions de couplage	24
Tableau III.1	produits générés aux cours de traitement de 2-Nitrophénol par les quatre procédés couplés.	32
Tableau III.2	Qualités de l'eau traitée par les quatre procédés.	33

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'industrialisation intensive qui a vu le jour au cours du dernier siècle a causé l'apparition dans l'environnement de polluants émergents réfractaires. Ces substances dites biorécalcitrantes peuvent entraîner une contamination chez les êtres vivants. De plus, certains de ces composés sont reconnus pour causer des effets cancérigènes et mutagènes, ou peuvent interférer avec le système hormonal des êtres vivants (perturbateurs endocriniens). Au nombre de ces polluants couramment décelés dans les rejets industriels et urbains, se trouvent des composés phénoliques comme le 2-Nitrophénol lesquels ce composé est à l'origine de nombreuses perturbations de la faune aquatique et constituent un risque pour la santé humaine. Ce contaminant échappe pour la plupart au traitement classique des eaux usées. Dans l'optique de limiter l'arrivée de ce type de contaminant réfractaire dans l'environnement, des stratégies de traitement comporte une efficacité limité en terme de régénération des produits toxiques comme le procédé Fenton ou un rendement dégradation moyen comme les procédés enzymatiques de sources non microbiennes. Une nouvelle stratégie a été évalué le couplage entre deux procédés différentes Fenton et la peroxydase (enzyme) afin d'avoir un procédé intégrale protégé l'environnement.

Par conséquent, ce travail intitulé : ***Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé chimique et enzymatique*** est subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre, présente une mise au point bibliographique. Après un rappel sur les 2-Nitrophénol, nous présentons les différents procédés d'oxydation avancée de cet effluent et le procédé enzymatique effectué par la peroxydase.

Le deuxième chapitre reforme les méthodes et les matériels utilisés pour réaliser ce travail.

Le troisième chapitre rassemble les résultats avec leurs discussions.

Le mémoire clôturé par une conclusion générale.

Chapitre I:
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. La Nitration des phénols

La nitration est l'une des réactions chimiques organiques le plus tôt connues. On lui mentionne dans les écritures des alchimistes. Dès dans la première moitié du XVIII^{ème} siècle, Glauber a obtenu l'acide picrique par l'action sur la laine et le klaxon avec de l'acide nitrique.

Actuellement la nitration est l'une des réactions directes le plus largement appliquées de substitution. C'est dû à plusieurs facteurs. Ses produits peuvent aisément être séparés de l'acide épuisé, et il y a un large éventail de possibilités dans l'utilisation pratique des dérivés nitrés ,comme intermédiaires et produits finaux .La présence d'un groupe nitro dans le produit commençant a permis pour obtenir un certain nombre d'intermédiaires organiques de base telles que l'aniline et la benzidine. Des colorants avec plus d'un groupe nitro, tel que l'acide picrique ont été obtenus. On l'a constaté que des dérivés nitrés nitratés plus supérieurs et des esters d'acide nitrique ont les propriétés explosives et sont d'importance pratique. Quelques dérivés nitrés sont employés dans les parfums. Des propriétés médicinales ont été découvertes en certains dérivés nitrés, par exemple chloramphénicol. *(Tadeusz et al.1964).*

La nitration peut être effectuée directement par l'introduction du groupe nitro au lieu de l'atome d'hydrogène ou en l'ajoutant à un lien double, ou bien indirectement, en présentant dans un composé par groupe qui peut aisément être substitué par le groupe nitro.

Les agents de nitration suivants le plus souvent sont employés pour l'introduction directe du groupe nitro :

- Acide nitrique concentré ;
- Des mélanges de l'acide nitrique concentré et l'acide sulfurique concentré ;
- Nitrates d'alcali en présence d'acide sulfurique ;
- Acide nitrique dilué ;
- Dioxyde d'azote ;
- Une solution de dioxyde d'azote en acide sulfurique ;
- Dioxyde d'azote en présence des catalyseurs.

Sans compter que ces méthodes directes de présenter les groupes nitro, on connaît plusieurs méthodes indirectes qui consistent en introduction d'un groupe qui peut aisément être substitué par un groupe nitro. Dans un de ces derniers qui est très utilisé dans la nitration des phénols, un composé est sulfonaté et plus tard, par la réaction de l'acide nitrique, le groupe de sulpho est remplacé par le groupe nitro. *(Tadeusz et al. 1964).*

La nitration des phénols suivre la méthode classique d'acide nitrique en présence de l'acide sulfurique qui donne complexe contenant un mélange d'ortho et para-nitrophénols et les phénols dinitratés *(Zheng et al. 2006).* La nitration regioselective du phénol pour fournir ortho- et Para-nitrophénol comme cas particuliers a été étudiée par de divers agents de nitration dans différentes conditions *(Ouertani et al. 1982 ; Milczak et al. 2001)*.

La nitration des dérivés de benzène avec l'électron donnant le substituant mène à la substitution à l'o et aux p-positions selon une distribution statistique. *(March et al.1992).*

L'utilisation des réactifs soutenus et des catalyseurs sont connus pour favoriser la substitution de Para. *(Smith, K. et autres ;1992).*

L'o-nitrophénol est un produit de départ important utilisé dans des synthèses multiples d'étape des composés précieux.

La nitration des phénols suit la méthode classique d'acide nitrique en présence de l'acide sulfurique qui donne complexe contenant un mélange d'ortho et para-nitrophénols et les phénols dénitratés (Figure I.1) **(**Ouertani et al. 1982**).**

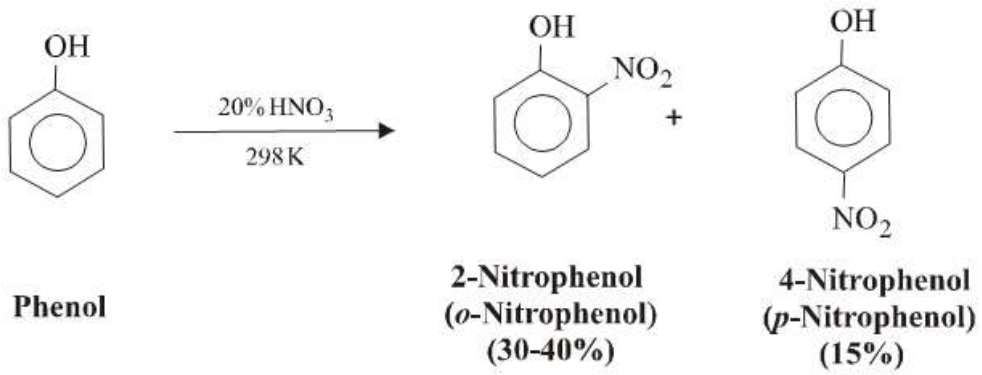


Figure I.1. Nitration de phénol.

I.2. Les nitrophénols

Les nitrophénols sont des composés nitro-aromatiques nocifs. Ils peuvent être des intermédiaires environnementaux de transformation des herbicides phénoliques. L'exposition aux nitrophénols peut causer des effets néfastes aux algues et aux organismes aquatiques.

La biodégradation de ces composés n'empêche pas leur accumulation dans le sol et les eaux souterraines pendant les mois d'hiver, qui peuvent endommager le développement des plantes pendant le printemps. Une voie alternative de transformation des nitrophénols dissouts dans les eaux de surface est représentée par les processus photochimiques, parmi eux la photolyse. *(Albinet et al. 2010)*.

La présence des nitrophénols dans l'environnement a été reconnue depuis qu'ils ont été la première fois détectés par Nojima et autres (1975) en eau de pluie. Cependant, l'information concernant l'occurrence des nitrophénols est demeurée rare jusqu'à ce que leurs propriétés phytotoxiques aient été découvertes.

Les nitrophénols ont gagné plus d'attention et ont été analysés dans le ciel *(Belloliet et al. 1999;Herterich et Herrmann .1990)*, pluie *(Leuenberger et al. 1988 ; Levsen et al. 1990)*, l'eau *(Geissler et Scholer.1994)*, brouillard *(Herterich. 1991; Richartz et al. 1990)* et neige *(Kawamura et Kaplan. 1986)*.

Les isomères de nitrophénol : m-nitrophénol, o-nitrophénol et p-nitrophénol coexistent habituellement dans les échantillons biologiques et environnementaux, qui sont les composés organiques importants et souples dans des applications industrielles, agricoles. Cependant, leur toxicité et propagation de potentiel par l'environnement par l'intermédiaire de la lixiviation et de l'infiltration, particulièrement pour l'o-nitrophénol et le p-nitrophénol, les font à considérer comme déchets dangereux et polluants toxiques *(E PA .1980)*.

I.3. Le 2-Nitrophénol

Le 2-Nitrophénol (2-NP) aussi appelé 2-Hidroxynitrobenzène est un composé phénolique qui comporte un groupe nitro à l'opposé du groupe hydroxyle sur le cycle benzylique. Sa formule moléculaire est $C_6H_5NO_3$.

Le 2-Nitrophénol est un solide très stable d'odeur caractéristique. Il apparait sous forme de cristaux jaunes pâles.

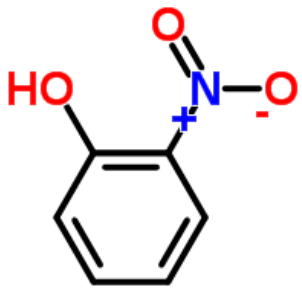


Figure .I.2 : Structure de 2-Nitrophénol.

I.3.1. Utilisation

Le 2-Nitrophénol est principalement utilisé en tant qu'intermédiaire pour la production des colorants, des fongicides, des pesticides, des explosifs, des Préservatifs de bois et des traitements de cuir. De petites quantités sont utilisées comme un indicateur acido-basique. (Ö. Aktas¸ F. çeçen, 2010).

I.3.2. Toxicité

L'agence américaine pour la protection de l'environnement et l'union européenne ont inclus 11 phénols dans leur liste de polluants prioritaires parmi eux, cinq (5) chlorophénols et quatre (04) nitrophénols Parmi les nitrophénols le 2-Nitrophénol *(Mahugo -Santana et al. 2009).*

Les effets de 2-Nitrophénol sur la santé sont résumés dans le tableau I.1 suivant :

Tableau I.1. Les voies d'exposition possibles par le 2-NP et leurs conséquences sur la santé

Voies d'exposition probables	Conséquences
Contact avec les yeux	-Provoque des brûlures aux yeux. -La blessure peut être permanente.
Contact avec la peau	-Brûlure de la peau. -La blessure peut être permanente. - Nocif si absorbé.
Inhalation	- Nocif si inhalé.
Ingestion	-Nocif si avalé.

I.3.3. Normes de rejet de 2-Nitrophénol

Les phénols (nitrophénols, phénol, chloronitrophénol…) sont considérés comme des polluants à traiter en priorité à cause de leurs toxicités avérées même à faibles concentrations. A cause de cette toxicité différents phénols ont été classés comme polluants prioritaires par US EPA (United States of Environnemental protection Agency) *(Busca et al .2008; Namane, 2006).*

De même que l'union européenne a limité la concentration maximale tolérée pour les eaux de consommation à 0,5 µg.L^{-1} (0,5 ppb). (Décret exécutif No 89-3 du 03/01/89) *(Busca et al.2008 ,Namane ,2006).*

L'agence de protection de l'environnement à établie une norme de purification de l'eau de moins de une partie par billion (1 ppb) de phénols dans les eaux de surface *(Busc et al 1978, Romanovskaya et al 2009)*, tandis que les limites des phénols pour les émissions des eaux usées sont de 0,5mg.L^{-1} (0,5 ppm) *(Busc et al. 2009).*

L'Algérie tolère une concentration maximale des phénols de 0,3 mg. L^{-1} pour les rejets industriels (Décret exécutif No 06-141 du 19/04/2006) *(Jora. 2006).*

Les nitrophénols ne peuvent pas être effectivement traités par des technologies traditionnelles telles que la dégradation biologique, le Traitement physico-chimique (coagulation-floculation), filtration ou adsorption classique. La photochimie directe n'est pas efficace non plus ; tandis que l'ozonolyse est tout à fait lente *(Beltran, Gomez-Serrano et Duran .1992).* En revanche, les processus avancés d'oxydation (AOP) comme : le procédé Fenton et aussi les enzymes comme : la peroxydase, se sont avérés capables dégrader efficacement le 2-NP.

I.4. Les processus d'oxydation avancée(POA)

Les processus d'oxydation avancée sont des procédés de traitement d'eau ayant connu une évolution rapide au cours des vingt dernières années. Elles ont pour but la minéralisation totale de polluants en CO_2, H_2O et composés inorganiques.

Les POA peuvent être regroupés selon la nature de la phase (homogène ou hétérogène) ou selon la méthode employée pour produire les radicaux hydroxyles : chimique, photochimique, électrochimique, sonochimique etc. L'efficacité de ces procédés dépend de nombreux paramètres tels que la concentration en oxydant, l'intensité de la lumière UV, le pH, la température, etc. La composition du milieu doit également être prise en compte, l'efficacité de l'oxydation pouvant être réduite en

raison de la consommation des •OH par des composés organiques et/ou inorganiques *(Staehelin, 1982).*

Les techniques d'oxydation fréquemment citées dans la littérature sont les suivantes :

I.4.1. Procédé Photo-Fenton

Le procédé Fenton est aujourd'hui moins étudié que le procédé Photo Fenton, qui a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années ***(Pichat, 1997)***. La réaction de base de cette variante du procédé Fenton est toujours la réaction (Eq.I.1). Mais en présence d'un rayonnement UV (G>300 nm), l'efficacité du procédé de Fenton est grandement améliorée. En présence d'un rayonnement UV, l'hydrolyse de complexes formés par Fe^{3+} entraîne la régénération de Fe^{2+} consommés par la réaction (Eq.I.1) et produit des radicaux hydroxyles additionnels selon (Eq.I.2) :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH \qquad (Eq.I.1)$$

$$Fe(OH)^{2+} \rightarrow h\upsilon\ Fe^{2+} + \bullet OH \qquad (Eq.I.2)$$

I.4.2. Procédé UV / Fe^{3+}– Oxalate / H_2O_2

C'est une amélioration assez récente apportée au procédé Photo Fenton. Des études ont montré que ce procédé était plus efficace que le Photo Fenton traditionnel ***(Safarzadeh-Amiri et al.1996)*** **.** Il est fondé sur la série de réactions suivantes :

$$(Fe^{III}(C_2O_4)_3)^{3-} + h\upsilon \rightarrow (Fe^{II}(C_2O_4)_2)^{2-} + C_2O_4^{\bullet -} \qquad (Eq.I.3)$$

$$C_2O_4^{\bullet -} + (Fe^{III}(C_2O_4)_3)^{3-} \rightarrow (Fe^{II}(C_2O_4)_2)^{2-} + C_2O_4^{2-} + 2\ CO_2 \qquad (Eq.1.4)$$

$$C_2O_4^{\bullet -} + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet -} + 2\ CO_2 \qquad (Eq.1.5)$$

L'irradiation du complexe Fe^{3+}–Oxalate produit du dioxyde de carbone et des ions ferreux Fe^{2+} qui, combinés à du peroxyde d'hydrogène, procurent une source continue de réactif de Fenton. Il a été montré que pour la dégradation d'hydrocarbures, l'énergie consommée par ce procédé était égale à 20% de celle requise par le procédé Photo Fenton.

I.4.3. H_2O_2/UV

Le peroxyde d'hydrogène est introduit dans l'effluent à traiter. Le mélange subit ensuite une irradiation UV. Les longueurs d'onde choisies sont généralement dans le domaine de l'UVC (=254nm) ***(Mazellier, Rachel, Mambo, 2004)*****.** ou de l'UVA (=365 nm) ***(Muruganandham, Swaminathan, 2004)*****.** Certains auteurs ont aussi utilisé une

lampe à vapeur de mercure moyenne pression présentant des raies d'émissions en UVA, B et C *(Malik, Sanyal, 2004)*. Le rayonnement UV provoque le clivage homolytique de la molécule d'H_2O_2:

$$H_2O_2 + h\upsilon \rightarrow 2\ {}^{\bullet}OH \qquad (Eq.I.6)$$

La vitesse de décomposition photolytique du peroxyde d'hydrogène augmente en conditions basiques mais en fonction du polluant à traiter, des auteurs ont prouvé que la décomposition pouvait être plus rapide en conditions acides *(Legrini, Oliveros et al.)*. Le procédé est donc très dépendant du pH.

I.4.4. Ozonation

L'ozone se décompose rapidement dans l'eau en une suite de réactions aboutissant à la formation d'espèces radicalaires très réactives : •OH (radical hydroxyle), $O_2^{\bullet-}$ (radical superoxyde), $HO_2^{\bullet}$ (radical hydroperoxyle), etc. Cependant, les radicaux hydroxyles sont les plus intéressants pour l'oxydation de polluants, la réactivité de $O_2^{\bullet-}$ et de $HO_2^{\bullet}$ avec des composés organiques étant moins importante *(Hoigne, Bader, 1987)*. Dans l'eau, l'ozone moléculaire est instable. Outre son fort pouvoir d'oxydation induisant des réactions avec de nombreux substrats organiques ou minéraux, l'ozone peut se décomposer en espèces radicalaires sous l'effet des ions hydroxydes.

I.4.5. O_3 / UV

Le procédé O_3/UV, un peu plus complexe que les précédents, produit des radicaux hydroxyles par plusieurs voies réactionnelles. Les réactions initiales généralement citées sont les suivantes:

$$O_3 + h\upsilon \rightarrow O^{\bullet} + O_2 \qquad (Eq.I.7)$$

$$O^{\bullet} + H_2O \rightarrow H_2O_2 \qquad (Eq.I.8)$$

$$H_2O_2 + h\upsilon \rightarrow 2\ {}^{\bullet}OH \qquad (Eq.I.9)$$

Ce schéma réactionnel permet de comprendre que le système O_3 / UV peut être assimilé à un couplage des procédés d'oxydation O_3 et H_2O_2 / UV. La production de radicaux hydroxyles dépend donc à la fois de la décomposition de l'ozone dans l'eau et de celle de H_2O_2 sous l'effet du rayonnement UV.*(Alaounia, 2009)*

I.4.6. Procédé Fenton

Comme les radicaux hydroxyles sont des espèces hautement réactives, qui peuvent oxyder instantanément la plupart des composés organiques, de nombreuses études se sont focalisées sur son rôle d'oxydant dans l'environnement. Il a par exemple été démontré récemment que le radical •OH était l'oxydant clé des hydrocarbures dans le troposphère .de même que lors de l'application de certaines techniques de traitement des eaux, notamment par ozonolyse. Cependant, les sources naturelles de production, ainsi que les facteurs qui peuvent affecter la vitesse de formation des •OH, sont encore mal connus.

La réaction de Fenton est basée sur la production des radicaux hydroxyles à partir de la décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par des sels ferreux.

$$Fe\ (II) + H_2O_2 \rightarrow Fe\ (III) + HO^- + \bullet OH \qquad (Eq.I.10)$$

En 1894 Henry J. Fenton remarque qu'il est possible d'activer H_2O_2 avec les sels de Fe(II) et de cette manière d'oxyder l'acide tartrique ***(Fenton, 2004)***.Ce n'est que plus tard, en 1934, que Haber et Weiss émettent l'hypothèse que le radical hydroxyle est responsable de cette oxydation ***(Haber, Weiss et al. 1934)***. Par la suite, le mécanisme dans lequel la formation de HO• est l'étape clé et que l'on nomme aujourd'hui le Fenton « classique » est développé et approfondi ***(Walling ,1989)***.

Au cours des dernières décennies, l'importance de la réaction de Fenton pour les réactions dans l'environnement, dans les systèmes biologiques et pour le traitement des déchets est de plus en plus reconnu ***(Pignatello, Oliveros et al. 2007)***.

L'utilisation de H_2O_2 et des sels de fer a plusieurs avantages : comparé à d'autres oxydants, H_2O_2 est relativement peu coûteux, assez facile à gérer et ne pollue pas l'environnement puisque H_2O_2 se décompose en eau et O_2.

Les sels de fer sont également bon marché et ne constituent pas un problème pour l'environnement. Avec un pourcentage de 4,7%, le fer est le quatrième élément le plus abondant dans l'écorce terrestre ***(Faust, 1993)***. Il constitue un élément indispensable au fonctionnement du corps humain (synthèse de l'hémoglobine du sang). Les besoins journaliers en fer sont estimés à environ 10 mg/jour, selon l'âge et le sexe. Aucune toxicité n'a été observée chez l'homme, et ce même à des doses élevées (5 mg/l), (*Ganz, 2003*)**.**

L'oxydation homogène avec le réactif de Fenton se produit en présence d'ions ferreux (ou ferrique) et du peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire d'une réaction en chaîne qui amène à la formation des radicaux hydroxyles. Il s'agit d'une réaction d'oxydation

catalytique car le fer agit comme catalyseur. L'efficacité du procédé homogène est étroitement liée au pH de la solution, dont les valeurs optimales sont comprises entre 2 et 4, ainsi qu'aux proportions relatives de peroxyde d'hydrogène et de catalyseur par rapport à la DCO de la solution à traiter. La possibilité d'adapter les concentrations de catalyseur et d'oxydant par rapport à la charge en polluants rend ce procédé tout aussi bien adapté au traitement des effluents issus de l'industrie pharmaceutique ou des hôpitaux qu'à l'élimination de médicaments sous la forme de micropolluants des eaux de surface. L'oxydation Fenton peut être aussi une étape efficace de prétraitement en transformant les polluants en sous-produits facilement biodégradables et en réduisant la toxicité globale, améliorant ainsi l'efficacité du traitement biologique ultérieur *(Kulik et al. 2008)*.

I.5. Influence des paramètres opératoires sur l'oxydation Fenton

La nécessité d'acidifier le milieu est souvent mentionnée comme un des principaux inconvénients de la réaction de Fenton. Cela signifie non seulement des coûts supplémentaires, provenant de la consommation de réactifs pour l'acidification et la neutralisation ultérieure, mais aussi une augmentation de la charge en sels de l'eau traitée.

De nombreux travaux sur les procédés Fenton ont montré que le pH doit être compris entre 2 et 4 pour une dégradation optimale des polluants organiques. Pour comprendre ces observations, il faut examiner les diagrammes de spéciation des espèces ferreuses et ferriques. En solution aqueuse, le fer forme des complexes aqueux de la forme $[Fe(OH)_x(H_2O)_{6-x}]^{(2-x)+}$ ou $^{(3-x)+}$ dont la concentration relative dépend du pH. Par souci de simplification, les molécules d'eau associées aux espèces ne seront pas représentées. Par ailleurs, en augmentant le pH, le fer dissous a tendance à précipiter.

I.5.1. Concentration de fer et source de fer

En conditions Fenton standards, c'est-à-dire pour une valeur de pH autour de 3 et une concentration en fer dissous inférieure ou égale à 1 mM, les études démontrent que l'augmentation de la concentration en fer conduit toujours à une augmentation de la vitesse de réaction *(Sarria et al. 2003)*.Cependant, cette augmentation n'est pas toujours proportionnelle, et la vitesse finit par se stabiliser aux concentrations élevées. Les réactions de Fenton homogènes se produisent entre le peroxyde d'hydrogène et Fe^{2+} ou Fe^{3+} et conduisent à la production de radicaux hydroxyles hautement réactifs qui attaquent et détruisent les molécules organiques. Cependant

les valeurs très différentes des constantes associées suggèrent que les vitesses de dégradation des polluants doivent dépendre de la nature du fer introduit.

I.5.2. Concentration d'oxydant

L'influence de la concentration d'oxydant sur la cinétique a été étudiée par plusieurs auteurs et leurs conclusions peuvent se résumer par le fait qu'il existe une plage de concentrations optimales pour le peroxyde d'hydrogène : une concentration trop faible conduit à une réduction de la vitesse de réaction, une concentration trop élevée conduit les radicaux hydroxyles à réagir préférentiellement avec H_2O_2 plutôt qu'avec le polluant. La connaissance de la quantité de consommée de H_2O_2 doit permettre de prévoir l'évolution de la réaction Fenton *(Gernjak et al. 2006 ; Bacardit et al. 2007)*, et une addition contrôlée de peroxyde d'hydrogène pourrait conduire au degré de minéralisation désiré. L'optimisation de la quantité de peroxyde vis-à-vis de la stœchiométrie théoriquement nécessaire pour la minéralisation du polluant dépend fortement de ce substrat et de sa concentration.

I.5.3. Température

La température améliore la vitesse des réactions impliquées dans le mécanisme d'oxydation Fenton (selon la loi d'Arrhénius), mais elle favorise aussi la décomposition de H_2O_2 en oxygène et eau, en particulier au-delà de 60°C. Il n'y a pas de consensus sur l'effet de la température (valeur optimale ou valeur la plus haute préférable), mais en général des températures supérieures à 60°C ne sont pas utilisées *(Khamaruddin et al. 2011)*.

I.5.4. Effet de l'oxygène dissous

L'oxygène dissous provoque une oxydation directe de Fe(II) :

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \qquad (Eq.I.11)$$

En oxydation Fenton, l'effet net de l'oxygène dissous peut être positif ou négatif selon les conditions opératoires utilisées, mais généralement il ne modifie que peu le plateau de minéralisation atteint *(Haddou et al. 2010)*.

Par ailleurs, certaines réactions, notamment celles mettant en jeu les radicaux $HO_2^{\bullet}$ et $O_2^{\bullet-}$ produisent de l'oxygène moléculaire avec des constantes de vitesse non négligeables (entre 105 et 1010 $mol^{-1}.L.s^{-1}$) et il est donc difficile de travailler en l'absence totale d'oxygène dissous *(Flotron, 2004)*.températures supérieures à 60°C ne sont pas utilisées *(Khamaruddin et al. 2011)*.

I.5.5. Inconvénients du système Fenton

La réaction de Fenton présente un certain nombre d'inconvénients :

- absence de régénération du Fe^{2+} (catalyse très lente en présence de l'excès de H_2O_2 par la réaction :

$$Fe^{3+}+H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+}+H^{+}+HO_2^{\bullet} \qquad (Eq.I.12)$$

D'où son ajout continu en cours de traitement ;

- la nécessité d'opérer dans un milieu à pH avoisinant 3. C'est une technique très limitée par la gamme de pH ;
- l'usage de doses élevées de réactifs pour oxyder certaines classes de composés organiques ;
- la production des boues d'hydroxydes ferriques $Fe(OH)_3$.
- la consommation des radicaux $^{\bullet}OH$ par les réactions parasites
- Génère des produits très toxique par apport le substrat à traiter (phénol) tel que l'hydroquinone, benzoquinone et le catéchol.

Un pH de 3 et un excès de peroxyde d'hydrogène par rapport au Fe^{2+} doivent être requis pour optimiser le procédé Fenton.

I.6. Les peroxydases

Les peroxydases sont des protéines à hème, capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques, en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hydroperoxyde organique comme accepteur d'électron *(Delannoy et al. 2004)*.

Les peroxydases (numéro EC 1.11.1.X) regroupent une grande famille d'enzymes. Elles appartiennent à la famille des oxydoréductases, en accord avec la nomenclature officielle. Ce sont des enzymes ubiquitaires retrouvées dans les plantes, les animaux et les microorganismes *(Colonna et al. 1999)*.Les peroxydases de plantes ont été regroupées avec les peroxydases des bactéries et des champignons en une seule superfamille *(Welinder ,1992)*. Dans cette superfamille, toutes les peroxydases sont composées de protéines qui présentent toutes une structure tridimensionnelle similaire *(Smulevich et al. 2006)*. Elles réduisent toutes l'eau oxygénée (H_2O_2) en H_2O, mais oxydent des substrats très différents.

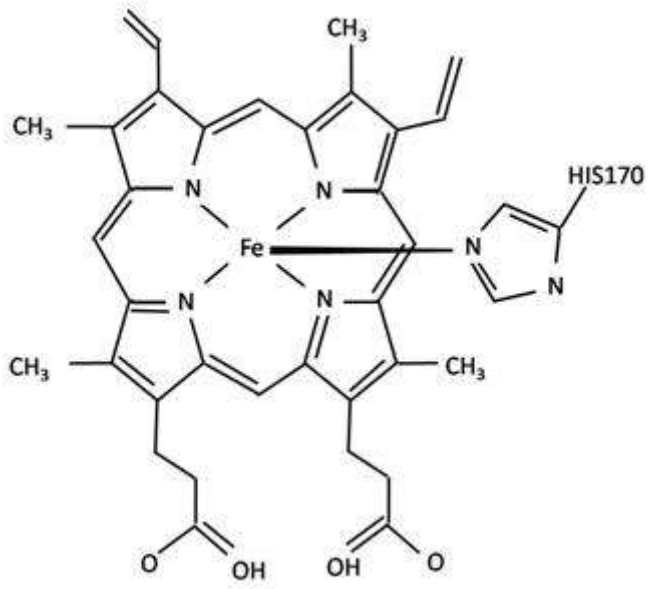


Figure.1.3 : structure du groupe hème de fer dans la peroxydase de raifort.

I.6.1. Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique

Les peroxydases sont des enzymes non michaéliennes *(Dunford,1999)*. L'action de ces enzymes nécessite la présence à la fois d'un composé phénolique et de l'eau oxygénée (H_2O_2). Cependant cette dernière peut être générée par les peroxydases par oxydation des acides carboxyliques. La catalyse déclenchée par l'H_2O_2 permet la formation d'enzymes transitoires. En réagissant avec un donneur d'hydrogène, les composés transitoires donnent naissance à des radicaux libres qui peuvent former des polymères en réagissant entre eux.

I.6.2. Biodégradation des composés phénoliques par les peroxydases

Il est bien connu que certains composés phénoliques sont toxiques et difficilement biodégradables. Cependant depuis les travaux pionniers de Klibanov et al. (1980), plusieurs études ont montré que les peroxydases pures ou brutes de sources végétales sont capables de dégrader plusieurs composés phénoliques les plus récalcitrants tels que le naphtol *(Ashraf et Husain, 2010)*; le crésol, le 2,4-dichlorophénol et le 4,4'-isopropylidènediphenol communément appelé bisphénol A *(Caza et al. 1999)*, le pentachlorophénol*(Zhang et Nicell,2000)*et les amines aromatiques *(Nicell et al.1993)***.** La majorité de ces composés ont été dégradés avec la peroxydase de raifort (HRP).Cette dégradation commence par une oxydation catalytique des composés phénoliques par ces enzymes en présence de H_2O_2 pour former des radicaux libres. Les radicaux libres subissent des réactions de polymérisation non enzymatiques pour

donner des polymères insolubles dans l'eau *(Dunford ,1999 ; Tonegawa et al. 2003)* qui seront ensuite éliminés par des techniques physiques telles que la filtration, la sédimentation ou la centrifugation. La polymérisation des radicaux libres est fonction de la nature chimique du radical, de son environnement et de l'isoenzyme de la peroxydase utilisée *(Henriksen et al. 1999)*.Le temps nécessaire pour une élimination quasi-totale du phénol dépend lui aussi de la concentration initiale en phénol *(Oueslati et al. 1998)*. Cependant, durant la catalyse, ces enzymes peuvent s'inactiver. Cette inactivation pourrait être due à la formation de radicaux libres présents lors de la réaction enzymatique. Ces radicaux adsorbés sur le site actif des enzymes peuvent bloquer ainsi l'oxydation des substrats *(Bratkovskaja et al. 2004)*.Cependant, l'inactivation des enzymes peut être évitée en utilisant des additifs tels que le borate, le polyéthylène glycol (PEG), la gélatine, etc. *(Akhtar et Husain, 2006; Quintanilla-Guerrero et al. 2008)*.

Chapitre II :
MATERIELS & METHODES

CHAPITRE II. MATERIELS & METHODES

II.1. Matériels et réactifs

II.1.1. Equipements

- Agitateur.
- Balance.
- Centrifugeuse.
- Chronomètre.
- Étuve.
- Hotte.
- Mixeur.
- Seringue 20G.
- Spectrophotomètre UV-Vis.
- pH-mètre.

II.1.2. Verreries :

- les verreries classiques sont utilisées dans notre étude.

II.1.3. Réactifs

Les expériences menées dans le cadre de cette recherche, dans diverses conditions ont nécessité les produits de qualités analytiques suivantes :

- Acétone, C_3H_6O, 100%,
- Acide citrique, $C_6H_7O_8$, 99%,
- Alginate de sodium, ($C_6H_7NaO_6$), 99%,
- 4-Aminoantypiryne, $C_{11}H_{13}N_3O$, 98%,
- Chlorure de calcium, $CaCl_2$, 99,5%,
- Ferricyanure de potassium, $K_3Fe(CN)_6$, 99%,
- Hydroxyde de potassium, KOH, 85%,
- 2-Nitrophénol, $C_6H_5NO_3$, 98%,
- Phénol, C_6H_6, 99 %,

- Peroxyde d'hydrogène, H_2O_2, 10%,
- Phosphate monopotassique, KH_2PO_4, 98%,
- Phosphate de sodium disoudique, Na_2HPO_4, 98%,
- Sulfate ferreux, $FeSO_4$, 85%,

II.2..Préparations des échantillons

Le 2 Nitrophénol utilisé est fourni par Aldrich, sa pureté est de 98 %. C'est un composé aromatique. Il a été choisi comme polluant organique modèle conserve une structure relativement simple.

Les solutions de 2-Nitrophénol modèles sont préparées en dissolvant le 2-Nitrophénol correspondant avec l'eau distillé. Elles avaient des concentrations comprises entre 20 et 120 mg/l. Elles sont conservées à l'obscurité afin de les protéger de la lumière.

II.3.Préparation des solutions tampons

Les solutions tampons sont été préparées par dissolution des réactifs appropriés dans l'eau distillée sous agitation magnétique.
Les solutions tampons utilisées sont :

- Solution tampon pH 3,0 préparée par Phosphate de sodium disoudique 0,5M et Acide citrique 0,5M.
- Solution tampon pH 7,0 préparée par phosphate monopotassique (0,01M).

En ajustant les solutions en utilisant la solution de KOH (0,2N) et HCl (0,2 N),
Le pH de solution a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre de type « HANNA instrument » équipé d'une électrode de verre combiné. Le pH-mètre a été étalonné avec des solutions tampons standards (pH = 3) et (pH=7).

II.4. La courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol

La concentration du 2-Nitrophénol est déterminée par la courbe d'étalonnage à pH=7 à partir des concentrations de 2-Nitrophénol entre 20 et 120 mg/l avec un pas de 20 mg/l.
Méthode du dosage :

- ✓ Prendre 2.4 ml de solution du 2-Nitrophénol de concentration entre 20-140 mg/l, y ajouter 0.3ml de 4-aminoantipyrine (20.8mM) et 0.3ml de Ferricyanure de potassium (83.4mM) ;

- ✓ Compléter le volume jusqu'à trait jauger par une solution tampon pH=7 pour déterminer les densités optiques des solutions du 2-Nitrophénol à λmax = 527 nm, nous avons utilisé le spectrophotomètre UV-visible.

Les valeurs de DO initiales et finales sont utilisées pour calculer le rendement de dégradation du 2-Nitrophénol selon la relation suivante :

$$R\% = (DO_{initial} - DO_{final})/DO_{initial} \qquad (Eq.II.1)$$

Tel que :

R (%) : le rendement de dégradation de 2-Nitrophénol,

$DO_{initial}$: densité optique initial de dégradation de 2-Nitrophénol

DO_{final} : densité optique final de dégradation de 2-Nitrophénol.

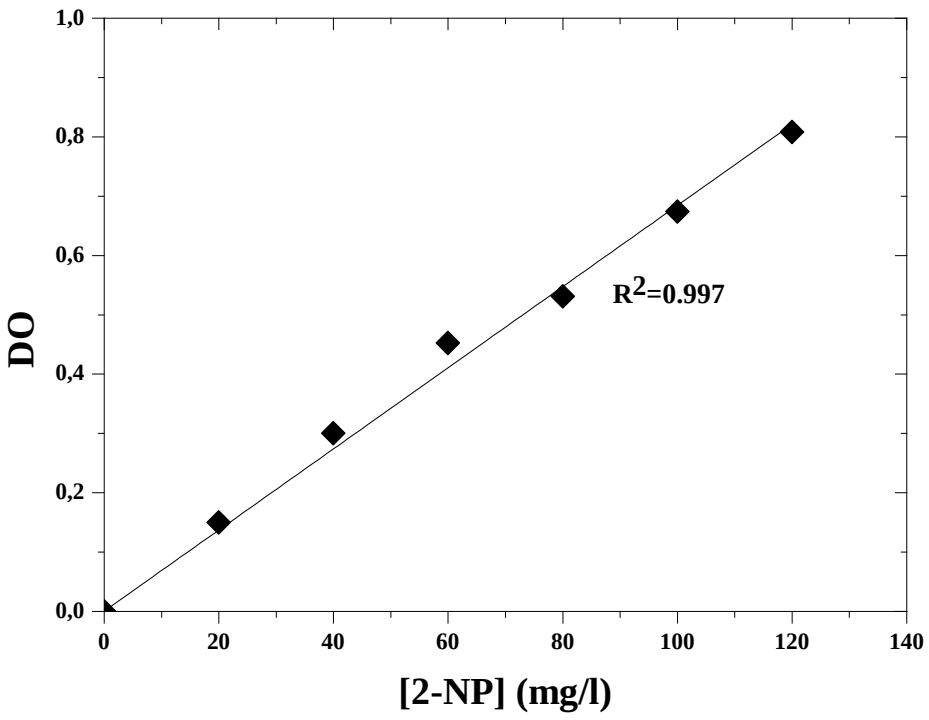


Figure. II.1. Courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol. (λmax = 527 nm)

II.5. Méthode d'extraction et purification de peroxydase de navet blanc

La procédure d'extraction et de la purification de la peroxydase de navet blanc est comme suivant :

- Mettre 500 g de navet dans un mixeur après l'avoir éplucher avec 1000 ml de l'eau distillée. Filtrer avec la gaze, on obtient un extrait brut extrêmement efficace qui peut être dilué avant utilisation.
- Placer un erlenmeyer contenant 500 mL de l'extrait brut et un bécher contenant 500 mL de l'acétone au congélateur. Préparer de la glace pilée dans un cristallisoir
- Après 15min au congélateur, faire sortir l'extrait brut et le disposer sous l'agitation dans la glace pilée puis verser de l'acétone sortie du congélateur dans l'extrait brut, goutte à goutte.
- Laisser le mélange (l'extrait brut-l'acétone) dans le frigo (4°C) pendant 2 heures ; il se forme un précipité pour le récupérer, centrifuger à 3000 rpm pendant 15min.
- Dissoudre le culot dans 25 ml de tampon pH=7, la solution obtenue est de l'extrait enzymatique partiellement purifiée (EEPP).
- Répartir la solution en aliquotes dans des tubes à hémolyse et les placer au congélateur (4C°). *(Azizi et al.2014).*



1-Prendre 500 g de navet après avoir les éplucher.



2-Le navet pesé et coupé en petits morceaux.



3-Broyage des morceaux du navet dans un mixeur avec 1000 ml d'eau distillé.



4-Filtration de mélange obtenu avec une gaze.



5-obtention d'un extrait enzymatique brut (EBB) conservé à basse température.



6-Addition de l'acétone à l'extrait brute.



7-Après 2heurs dans le réfrigérateur : Il se forme un précipité.



8-Centrifugation du mélange.



9-Dissolution de culot dans 25ml de tampon pH 7.0 : (EEPP).

Figure II.2. Protocole d'extraction et de purification de la peroxydase.

II.5.1. Mesure d'activité enzymatique d'enzyme libre

Les peroxydases catalysent l'oxydation de nombreux substrats aux dépens de H_2O_2 selon l'équation totale :

$$2\ H_2O_2 + \text{phénol} + \text{4-Aminoantipyrine} \rightarrow \text{Quinoneimine} + 4H_2O \qquad (Eq.II.2)$$

La réaction s'effectue entre un substrat (phénol), sous substrat H_2O_2 et 4-AAP qui joue le rôle d'un chromogène. Le changement de la couleur au cours de la réaction (Eq II.2) est converti à l'activité enzymatique de la biodégradation du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme. Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme en micromole du peroxyde d'hydrogène par minute à 25 C°.

Méthode du dosage

Dans une fiole de 50 ml introduire :

- 1 ml de phénol, 0.1M ;
- 1 ml de H_2O_2, 0.1M ;
- 1 ml de 4-aminoantipiryne (0.01M).

Compléter le volume jusqu'à trait jauger par une solution tampon pH=7 (phosphate monopotassique, 0.01M).

- Placer 4 ml de mélange précédemment dans un tube à essai.
- Ajouter 0.2 ml de l'EEPP ou de l'EEB, agiter par retournement entre le pouce et l'index.
- Placer rapidement le mélange réactionnel dans la cuve de spectrophotométrie.
- Lancer la cinétique par mesure de la densité optique avec un pas de 10 seconds.
- On mesure l'activité enzymatique de la peroxydase par la consommation de peroxyde d'hydrogène à 517 nm.

Tracer l'allure DO = f (temps) qui a la pente égal à $\Delta DO/\Delta t$

La formule pour calculer l'activité enzymatique est :

$$AE(U/ml) = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times \frac{V_r}{V_e} \times \frac{1000}{7425}. \qquad (Eq.II.3)$$

Avec :

V_e : Volume de l'extrait enzymatique, 0.2ml

V_r : Volume réactionnel, 4.2mL

II.5.2. Méthode d'immobilisation de la peroxydase

- Dans un bécher, dissoudre 0,15 g d'alginate de sodium dans 10 mL de la peroxydase partiellement purifiée sous forme libre.
- Laisser le mélange peroxydase et alginate de sodium sous l'agitation pendant 1- 1,5 heure jusqu'à l'obtention d'un mélange visqueux homogène.
- Laisser le mélange repose 20 min pour éviter les bulles d'air qui peuvent causer la flottation des billes à la surface de la solution de $CaCl_2$ (Garder la solution de $CaCl_2$ dans le réfrigérateur avant faire l'encapsulation de l'EEPP par l'alginate de sodium).
- Préparer les billes de la peroxydase immobilisée, en faisant verser le mélange obtenu goutte à goutte à l'aide d'une seringue, dans un 50 ml de solution de $CaCl_2$ de concentration de 0,05 M sous l'agitation.
- Laisser les billes sous l'agitation dans la solution de $CaCl_2$ pendant 1 heure.
- Rincer les billes avec l'eau distillée et les conserver dans une solution tampon de pH=7 dans un réfrigérateur de température 4C°. *(Azizi et al.2014).*



1-Pesée 0 ,15 g de l'alginate de sodium.



2-Mettre 10 ml de l'enzyme.



3- Laisser le mélange sous l'agitation pendant 1- heure.



4-Préparation des billes dans une solution $CaCl_2$.



5-Conservation des billes dans une solution tampon pH 7.

Figure II.3. Protocole d'immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de sodium.

II.6. Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol

II.6.1. Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol par le procédé Fenton

La réaction se déroule dans un réacteur batch fermé sous les conditions optimales suivantes **:** pH=3, température 40 C°, avec 1 ml de 2-Nitrophénol (100 mg/l) ; 1 ml H_2O_2 (9 mM) ; 1 ml de $FeSO_4$ (320 mg/L et de 5 mg/L).

II.6.2. Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol par la peroxydase libre et immobilisée

Les expériences effectuées dans un réacteur batch fermé sous une température de 40 °C, pH=7. Chaque réacteur comporte 0.2 ml de l'enzyme libre(ou 20 billes de l'enzyme immobilisé) de concentration 7 U /ml, y ajouter 2.8 ml de solution tampon pH=7, 1ml de peroxyde d'hydrogène de concentration 24 mM (13 mM pour l'enzyme immobilisé) et 1ml du 2-Nitrophénol de concentration 80mg/l pour l'enzyme libre et 45 mg L^{-1} pour l'enzyme immobilisée.

II.6.3.Méthode de couplage Fenton et la peroxydase

Le 2-Nitrophénol a été prétraité par le procédé Fenton suivi par la peroxydase libre ou immobilisée suivants la cinétique d'élimination de 2-Nitrophénol par l'enzyme libre ou immobilisée. Le point de couplage ciblé vis-à-vis la concentration finale de 2-Nitrophénol en sort de l'étape de prétraitement. Le passage de procédé fenton au procédés enzymatiques initié par la neutralisation de milieu, ajustement de la concentration de peroxyde d'hydrogène et l'ajout de l'enzyme.

Le couplage des deux procédés peut être la solution. Quatre probabilité de couplage peut être réalisée qui seront testé par la suite :

(1) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase immobilisée,

(2) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase libre,

(3) : Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase immobilisée,

(4) : Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase libre. (Voir le tableau II.1).

Tableau II.1. Les conditions optimales de couplage

	(1)	(2)	(3)	(4)
pH	3	3	3	3
[$FeSO_4$] (mg/l)	320	320	5	5
[H_2O_2] (mg/l)	9	9	9	9
[2-Np] (mg/l)	100	100	100	100
Température °C	40	40	40	40
Le point de coulage (min)	40	75	180	180
[KOH] (mg/l)	0,1	0,1	0,4	0,4
[H_2O_2] (mg/l)	35.04	19.22	36.48	20.04
V_e	-------	0,2	-------	0,2
NB	20	-------	20	-------
[Enzyme] (U/ml)	7	7	7	7
Le volume (ml)	7,1	7,3	7,4	7,6

Chapitre III :

RESULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE III. RESULTATS & DISCUSSION

Ce chapitre rassemble les résultats avec leurs discussions ou il a subdivisé en trois grande sous titres : dégradation de 2-Nitrophénol par le procédé fenton, la dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase libre et immobilisée et la dégradation de 2-Nitrophénol par quatre procédés couplés. L'excusions des réactions de chaque procédé seul ont été effectué sous des conditions optimales trouvés dans des travails ultérieurs.

III.1. Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé Fenton

Le 2-Nitrophénol à éliminer par oxydation en utilisant deux procédés d'oxydation : réaction Fenton et l'enzyme comme indiqué par la suite :

III.1.1.Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton

La réaction fenton a été réalisé soit dans les conditions optimales avec [$FeSO_4$]=320 mg/L, soit avec une [$FeSO_4$]= 5 mg/L afin de suivre les règles environnementales. La variation de rendement d'élimination de 2-Nitrophénol dans les deux conditions représentées dans les figures suivante :

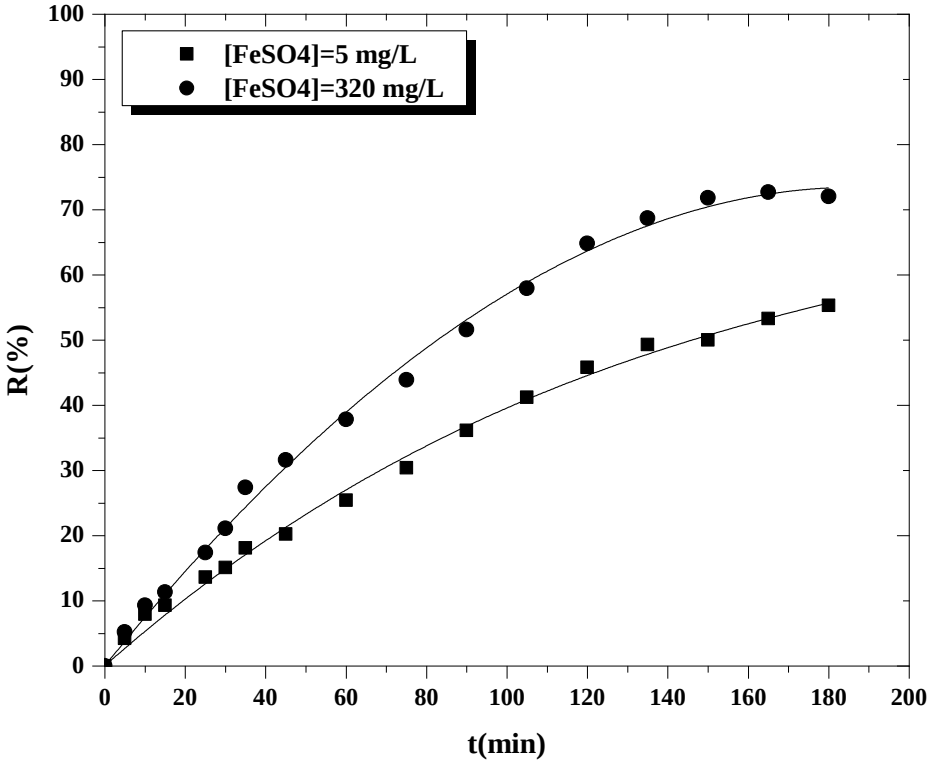


Figure.III.1. Rendement de dégradation du 2-Nitrophénol par le procédé Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2] $_0$**= 9 mM, **[2-Np] $_0$**=100 mg/L, **Temps de contact maximal**=180 min.

La dégradation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton a été effectuée pour deux concentrations différentes en sulfates de fer 5 et 320 mg/ L qui donne des rendements 55,3 et 72 % respectivement comme indique la figure III.1.

III.1.2.Ordre de la cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton

La cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par les radicaux libres est en principe d'ordre =2 :

1 pour la concentration de 2-Nitrophénol et 1 pour la concentration d'OH•.

La vitesse de disparition de 2-Nitrophénol s'écrit par la relation (III.1) :

$$\frac{-d[2-NP]}{dt} = k.\,[2\text{-NP}].\,[OH^{\bullet}] \qquad \textit{(Eq. III.1)}$$

Où k est la constante de vitesse.
L'étape qui s'exprime par l'équation :

$$Fe\ (II) + H_2O_2 \rightarrow Fe\ (III) + HO^- + OH^{\bullet} \qquad (Eq.III.2)$$

Génère des radicaux libres, au même temps, se déroule très lentement ce qui vérifie que ces radicaux libres sont formés lentement et consommés rapidement .Cette information permet de considérer [OH·] ≈ constante, donc l'équation *(Eq.III.1)* s'écrit :

$$\frac{-d[2-NP]}{dt} = k_{app}.\ [2\text{-}NP] \qquad (Eq.III.3)$$

Où $K_{app} = k.\ [OH^{\bullet}]$. La dernière formule confirme que la réaction est de pseudo-premier ordre.
L'intégration d'équation *(Eq.III.3)* conduit à :

$$-\mathrm{Ln}\frac{[2-\mathrm{NP}]t}{[2-\mathrm{NP}]0} = k_{app}.t \qquad (Eq.III.4)$$

Cette équation donc permettre de vérifier si la réaction d'oxydation Fenton de 2-Nitrophénol dans notre expériences obéi au cinétique pseudo-premier ordre et comme on peut tracé l'allure exponentiel $\frac{[2-\mathrm{NP}]t}{[2-\mathrm{NP}]0} = f(exp(-K_{app}))$. Les deux présentations graphiques permettant de réduire le K_{app} (voir les figures III.3 et III.5).

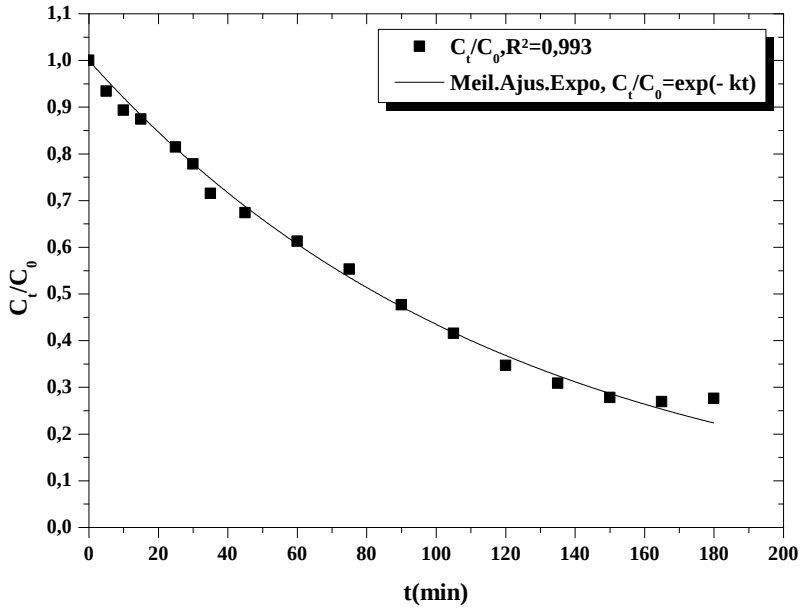


Figure III.2. Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2]$_0$**= 9 mM, **[$FeSO_4$]$_0$**=320 mg/l, **[2-Np]$_0$**=100 mg/l.

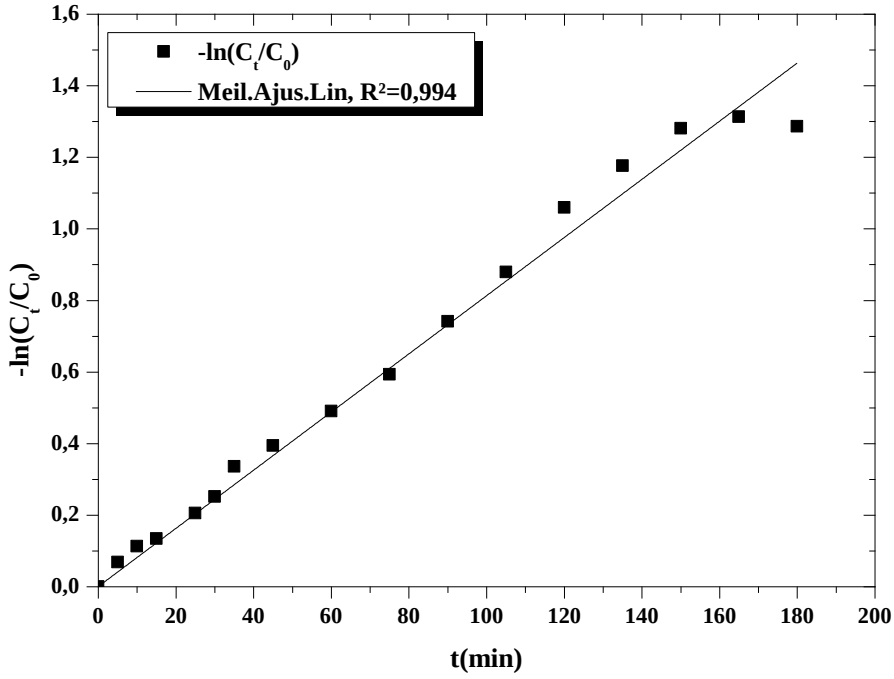


Figure .III.3. Application du modèle cinétique pseudo-premier ordre d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2]$_0$**= 9 mM, **[$FeSO_4$]$_0$**=320 mg/l, **[2-Np]$_0$**=100 mg/l.

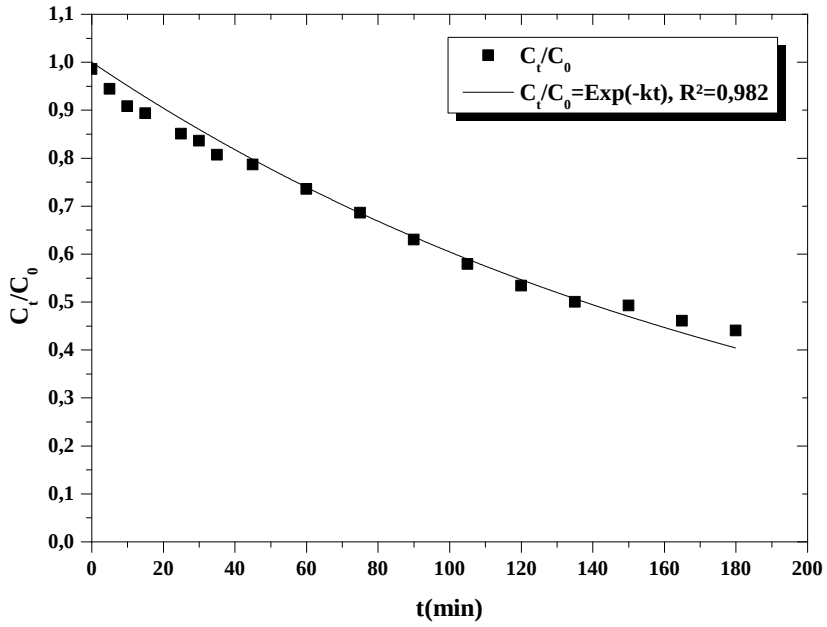


Figure.III.4. Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2] $_0$**= 9 mM, **[$FeSO_4$]$_0$**=5 mg/l, **[2-Np]$_0$**=100 mg/l.

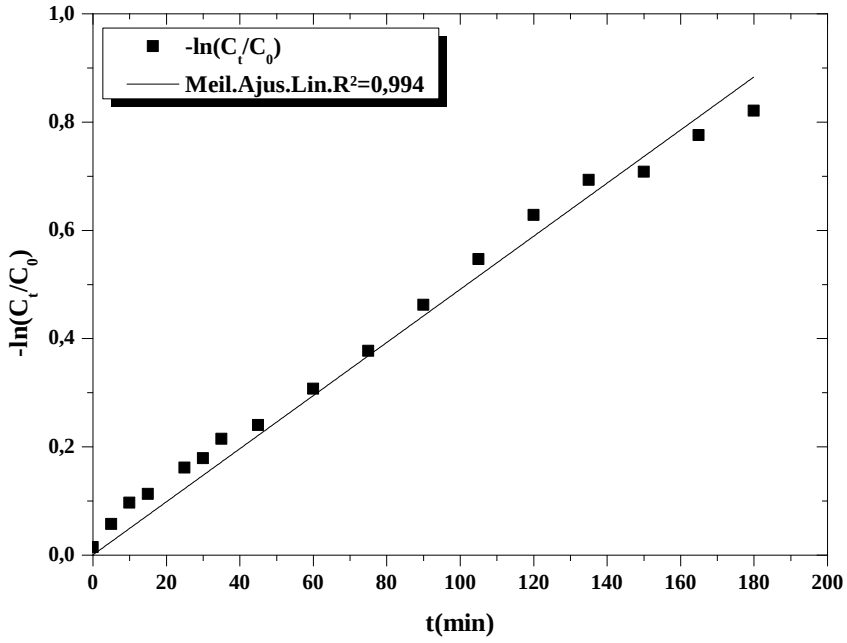


Figure .III.5. Application du modèle cinétique pseudo-premier ordre d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2] $_0$**= 9 mM, **[$FeSO_4$]$_0$**=5 mg/l, **[2-Np]$_0$**=100 mg/l.

D'après les figures III.2 et III.4 la réaction l'oxydation Fenton de 2-Nitrophénol est suivi le modèle cinétique pseudo-premier ordre avec des coefficients de corrélations atteints 0.99 avec des constantes de vitesse de 0,0083 et 0,0050 s^{-1} pour les deux conditions expérimentales ([FeSO4]= 320 et 5 mg/L) respectivement.
Donc, vis-à-vis les résultats obtenus la réduction de la concentration de sulfate de fer a été augmenté la vitesse d'oxydation de 2-Nitrophénol et en même temps réduire le rendement.

III.1.3.Suivi de l'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton

L'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton génère à la fin des produits toxiques au substrat lui-même comme le benzoquinone, l'hydroquinone et le catéchol. Par conséquent, cette méthode de traitement présente un inconvénient qui peut être éliminé avec l'addition d'autre réaction (voir la figure III.6).

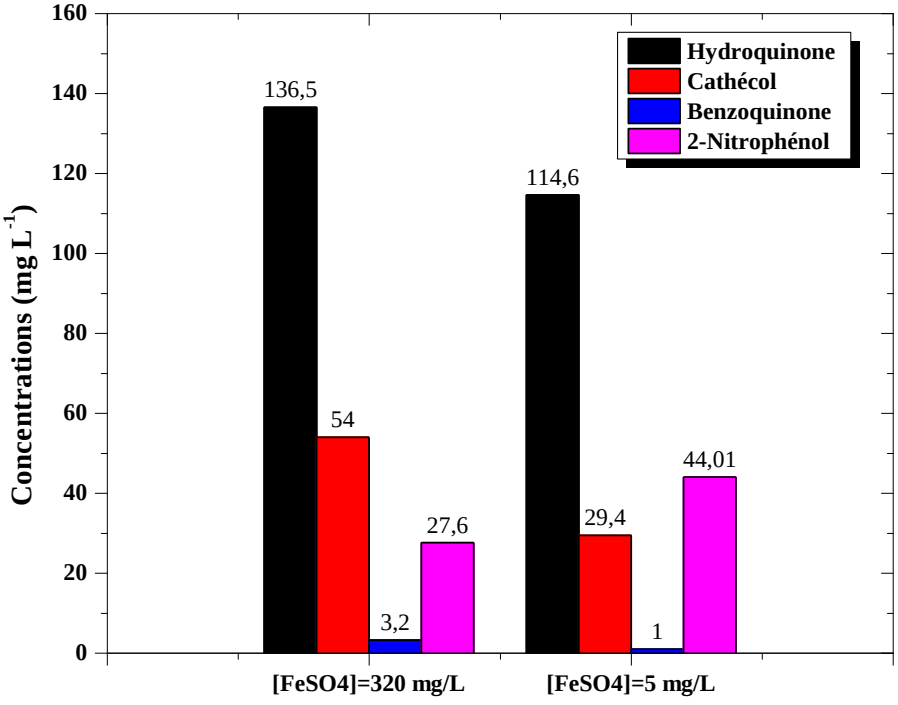


Figure.III.6. Produits final de réaction Fenton lors de l'oxydation de 2-Nitrophénol.

Comme indique la figure III.6, l'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton généré l'hydroquinone, catéchol et le benzoquinone. Ces produits toxiques apparaître

avec des concentrations de l'ordre de milligramme par litre (entre 1 et 136 mg L^{-1}) et en même temps l'oxydation de 2-Nitrophénol n'a été pas totale tel que les concentrations restantes de 2-Nitrophénol ont été 27 et 44 mg L^{-1} avec les concentrations de sulfates de fer utilisés sont 320 et 5 mg L^{-1} respectivement.

III.2.Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé enzymatique

La peroxydase a été extrait puis partiellement purifié par l'acétone afin d'obtenir une activité souhaitable de l'ordre de 7 unités/mL. Une étape de dilution est probable pour ciblé cette valeur. L'enzyme a été utilisé dans notre expérience devrait être de deux forme libre et immobilisée par l'alginate de sodium. Le raison de choix de ces deux types est d'avoir le meilleur choix puisque chaque forme d'enzyme comporte des avantages et des inconvénients. Pour avoir le meilleur choix des expériences ont été effectué dans des conditions optimales pour éliminer le 2-Nitrophénol par l'enzyme libre et immobilisée (voir les figures III.7 et III.8).

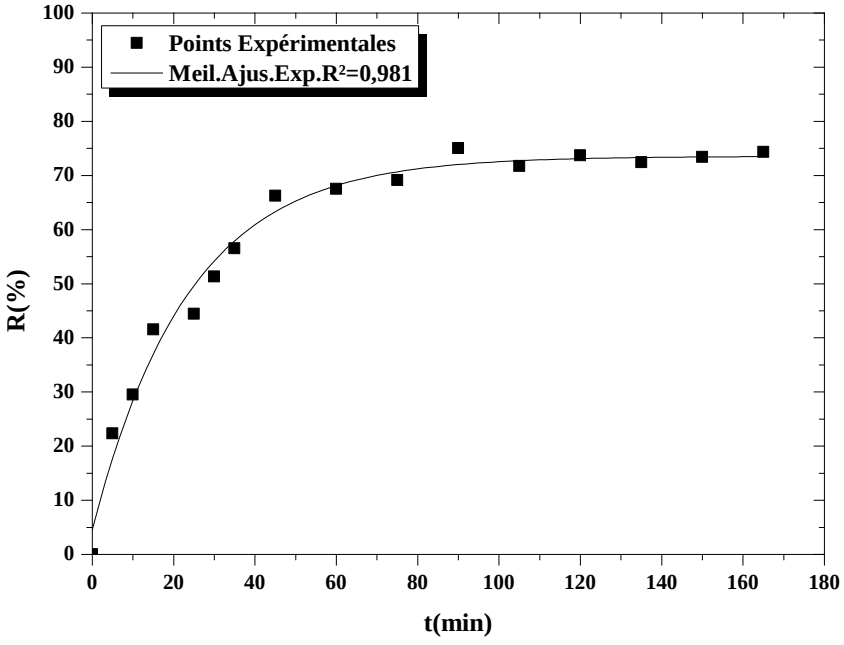


Figure.III.7. Variation de rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase immobilisée, **T**=40 °C, **pH**= 7, **$[H_2O_2]_0$**=13 mM, **$[Enzyme]_0$**= 7 U/ml, **NB**=*20 billes,* **$[2\text{-}Np]_0$**=45 mg/L, **Temps de contact maximal**=165 min.

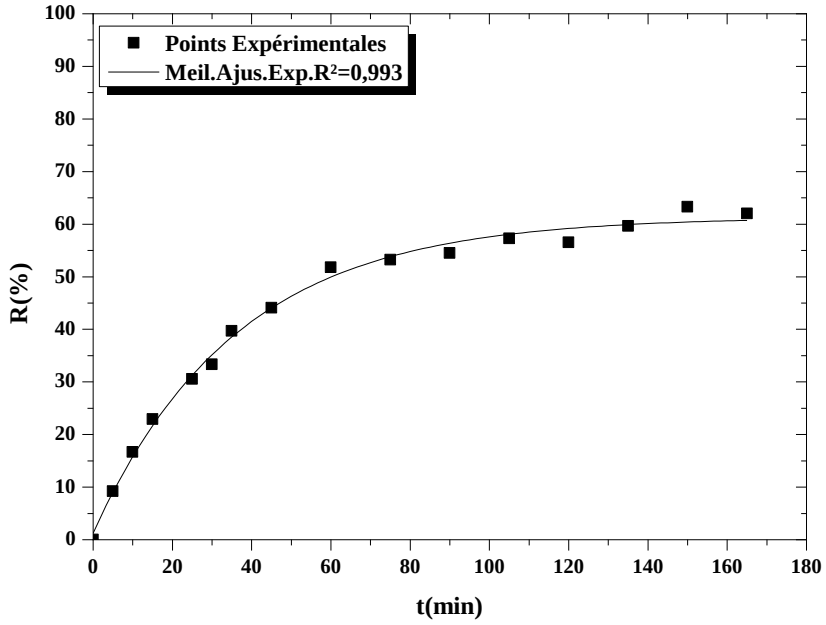


Figure.III.8. Variation de rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase libre, **T**=40 °C, **pH**= 7, **$[H_2O_2]_0$**=24 mM, **$[Enzyme]_0$**= 7 U/ml,**$[2\text{-}Np]_0$**=80 mg/L, **Temps de contact maximal**=165 min.

D'après les figures III.7 et III.8 cités au paravent, le rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par l'enzyme immobilisée et libre a été le 74 et 62% tel que les expériences ont été réalisés dans conditions optimales ou la concentration de 2-Nitrophénol traité par l'enzyme libre (80 mg L^{-1}) est presque deux fois qu'il traité par l'enzyme immobilisée.

III.3.Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé couplé Fenton/peroxydase

Notre objectif est d'aboutir un procédé intégrale en terme de rendement maximale (100 %), un temps de traitement minimale avec des produits finale de traitement propres pour l'environnement. Le couplage des deux procédés peut être la solution. Quatre probabilité de couplage peut être réalisée qui seront testé par la suite :

(1) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase immobilisée,
(2) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase libre,
(3) : Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase immobilisée,
(4) : Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase libre.

L'étape de prétraitement de chaque procédés précédentes ont été effectué par la réaction Fenton pendant : 40, 75, 180 et 180 minutes respectivement suivi par une étape de traitement pendant 165 minutes pour chaque procédé avec la peroxydase.
Les rendements maximales ont été atteint 97, 94, 74 et 69% par les procédé couplés précédentes pendant les temps suivantes : 105(1H 25min), 120(2H), 245(≈4H) et 245(≈4H) minutes respectivement (voir le tableau III.1).

Tableau III.1. Suivi des produits générés aux cours de traitement de 2-Nitrophénol par les quatre procédés couplés.

			(1)	(2)	(3)	(4)	$C_{critiques}$ (mg/L)
Hydroquinone	**Fenton**	C(mg/L)	136,5	136,5	114,6	114,6	0.1 OJAR. 2006
	Couplage	C(mg/L)	102,3	114,2	96,3	107,2	
	R (%)	---	25,072	16,361	16,007	6,451	
Catéchol	**Fenton**	C(mg/L)	54,0	54,0	29,4	29,4	---
	Couplage	C(mg/L)	28,1	42,3	21,1	23,2	
	R (%)	---	48,04	21,68	28,13	21,09	
Benzoquinone	**Fenton**	C(mg/L)	3,2	3,2	1,0	1,0	<3 (OHS 2009)
	Couplage	C(mg/L)	3,8	3,8	1,1	1,1	
	R (%)	---	---	---	---	---	
2-Np	**Fenton**	C(mg/L)	98,5	98,5	98,5	98,5	0,1 mg/L (IRIS 2002)
	Couplage	C(mg/L)	2,9	5,8	25,7	30,7	
	R (%)	---	97,03	94,07	73,89	68,84	

Donc d'après le tableau III.1, le procédé couplé (1) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase immobilisée présente une performance élevée par apport de chaque procédé seul et par apport aux autre procédé couplé en terme de rendement et le temps de traitement. Il reste juste de vérifié la présence et la concentration des produits toxiques générés par la réaction Fenton qui ils peuvent être oxydés par la peroxydase sauf le benzoquinone (ce n'est le substrat de la peroxydase). Ce dernier produits peut été généré par les deux procédés Fenton et la peroxydase qu'il doive être éliminé par des autres procédés appropriés (voir la figure III.9).

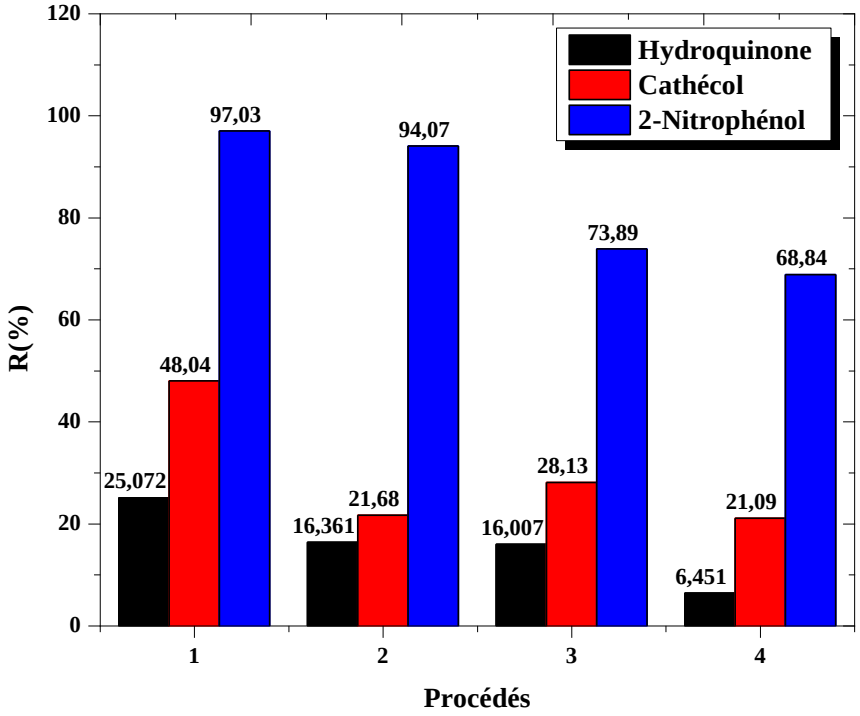


Figure.III.9. Performance de quatre procédé de couplés Fenton-Peroxydase.**1 :** Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase immobilisée, **2 :** Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase libre, **3 :** Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase immobilisée, **4 :** Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase libre.

D'après le tableau III.1 et la figure III.9, le procédé couplé (1) reste le meilleur procédé en terme de rendement d'élimination des produits toxiques générés hydroquinone, catéchol et le 2-Nitrophénol qui atteints 25, 48 et 97% respectivement.

III.3.1.Validation des procédés couplés en terme de MES et DBO5

Des autres tests de contrôle de qualités ont été réalisé comme le MES et le DBO_5, les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III .2. Qualités de l'eau traitée par les quatre procédés

	(1)	(2)	(3)	(4)	Normes	Réfs
MES (mg/L)	493,8	468,7	37,7	3	40	*OJAR. 2006*
DBO5(mg/L)	10	20	20	30	40	*OJAR. 2006*
pH	7	7	7	7	7	*OJAR. 2006*
[Fer] (mg/L)	320	320	5	5	5	*OJAR. 2006*

D’après le tableau III.2, Le procédé couplé (1) comporte une concentration élevé en matière en suspension qui correspondant quantité de fer utilisée (320 mg/L), et un DBO5 inférieur à la valeur critique. Donc le procédé 1 reste le meilleur permet les autres procédés.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le 2-Nitrophénol aqueux a été traité par deux procédés chimique et enzymatique. Les deux procédés ont été réalisés dans les conditions optimales trouvés dans des travaux antérieurs. La dégradation de ce polluant par le procédé Fenton a été effectuée pour deux concentrations de sulfates de fer 5 et 320 mg/L qui donne des rendements 55 et 72% pour un temps de traitement égale 180 minutes respectivement. Ce procédé a été génère des produits toxiques comme l'hydroquinone, catéchol et le Benzoquinone.

Le 2-Nitrophénol a été traité aussi par deux formes de peroxydase : libre et immobilisée. Les rendements trouvés par ces deux formes sont 63 et 73% pour un temps de traitements égale 150 minutes respectivement.

Le couplage des deux procédés a été initié par le procédé Fenton et suivi par le procédé enzymatique afin d'éliminer les produits toxique généré par le procédé fenton et au même temps d'augmenter le taux d'élimination de 2-Nitrophénol.

Quatre probabilité de couplage entre les deux procédés ont été évalué : procédé Fenton ([$FeSO_4$]= 320mg L^{-1}) –Peroxydase libre ou immobilisée et procédé Fenton ([$FeSO_4$]= 5 mg L^{-1}) –Peroxydase libre ou immobilisée.

La validation de quatre procédé a été effectué suivant la concentration de produits toxiques : 2-Nitrophénol, hydroquinone, catéchol et le benzoquinone, les valeurs de DBO_5 et l'MES. Le procédé couplé le plus performant a été Fenton (320 mg L^{-1}) et l'enzyme immobilisée tel que le rendement d'élimination de 2-Nitrophénol a été attient 97% pendant 105 minutes de traitement. Les concentrations finales de l'hydroquinone, catéchol et le benzoquinone ont été 102,3 , 28,1 et 3,8 mg/L respectivement avec un DBO_5= 10 mg/L et un MES= 493,8 mg/L sous une température= 40°C et un pH=7.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Akhtar. S,and Husain .Q. Potential applications of immobilized bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. Chemosphere 65: 1228-1235. 2006.

2. Albinet. C.T, Boucard.G, Bouquet.C.A, & Audiffren.M. Increased heart rate variability and executive performance after aerobic training in the elderly. European Journal of Applied Physiology. 109(4), 617-624.2010

3. Ashraf .H,and Husain. Q .Use of DEAE cellulose adsorbed and crosslinked white radish (Raphanus sativus) peroxidase for the removal of alpha-naphthol in batch and continuous process. International biodeterioration and biodegradation 64:27-31. 2010.

4. Faust .B.C, Zepp .R.G. Photochemistry of aqueous iron(III)-polycarboxylate complexes: roles in the chemistry of atmospheric and surface waters; Environ. Sci. Technol., 27, 1993, 2517-2522.

5. Belloli. R, Barletta.B, Bolzacchini. E, Meinardi.S, Orlandi. M, Rindone. B. Determination of toxic nitrophenols in the atmosphere by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 846, 277–281. 1999.

6. Beltran.F J,V.Gomez-Serrano and A.Duran.1992.

7. Bratkovskaja .I, Vidziunaite R., Kulys J. Oxidation of phenolic compounds by peroxidase in the presence of soluble polymers. Biochemistry (Moscow) 69:985–992. 2004.

8. Busc .G, Berardinell. S, Resini. C, Arrighi. L, 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. Journal of Hazardous Materials 160, 265-288.

9. Walling .C. J.. Intermediates in the reaction of Fenton type reagents, Acc. Chem. Res, 1998, 31, 155-157.

10. Caza. N, Bewtra J.K., Biswas N. and Taylor K.E. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. Water Research 33: 3012-3018. 1999.

11. Colonna .S, Gaggero N., Richelmi C. and Pasta P. Recentbio technological developments in the use of peroxidise. TIBTECH. 17:163-168. 1999.

12. Delannoy .E, Marmey P., Pennel C. and Nicole M. Les peroxydases végétales de classe III. Acta botanicagallica 151: 353-380. 2004.

13. Dunford H.B. Heme peroxidases. Wiley-VCH (H: Brian Dunford Ed.), New York. 507 pages. 1999.

14. F. Haber, J.J. Weiss. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts; proceeding of the Royal Society London, 147, 1934, 332-351.

15. Flotron .V. La réaction de Fenton comme procédé de réhabilitation dans le traitement des eaux : application à la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux et les boues résiduaires. Thèse de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon. 2004.

16. Geissler. A, Scholer, H.F. Gaschromato graphic determination of phenol, methylphenols, chlorophenols, nitrophenols and nitroquinones in water. Water Research 28, 2047–2053. 1994.

17. Gernjak. W, Fuerhacker M., Fernández-Ibañez P., Blanco J., Malato S. Solar photo-Fenton treatment - Process parameters and process control. Appl. Catal. B 64: 121-130. 2006.

18.**GuidoBusca,SilviaBerardinelli, CarloResini, Laura Arrighi** .Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments Materials, Volume, 30 December 2008, Pages 265–288.

19.Haddou M. Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène: procédés Fenton, photo-Fenton et photocatalyse. Thèse de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. 2010.

20.Henriksen,.A., Welinder K.G. and Gajhede M. Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9-A resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH. Journal of Biological Chemistry 273: 2241-2248. 1998.

21.Herterich. R. Gas chromatographic determination of nitrophenols in atmospheric liquid water and airborne particulates. Journal of Chromatography 549, 313–324. 1991.

22. Pignatello .J. J. Pignatello, E. Oliveros, A. MacKay. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry, Crit. Rev. Envi. Sci. Technol. 36, 2006, 1-84; Erratum, 37, 2007, 273-275.

23. Staehelin. J ,and Hoigné. J. Decomposition of ozone in water: rate of initiation by hydroxide ion and hydrogen peroxide, Environ. Sci. And Techn., 16, 1982, 676-680.

24.Kawamura.K, Kaplan, I.R. Biogenic and anthropogenic organic compounds in rain and snow samples collected in southern California. Atmospheric Environment 20, 115–124. 1986.

25.Khamaruddin P.F., Bustam M.A., Omar A.A. Using Fenton's Reagents for the Degradation of Diisopropanolamine: Effect of Temperature and pH. International Conference on Environment and Industrial Innovation IPCBEE 12: 12-17. 2011.

26.Kulik N., Trapido M., Goi A., Veressinina Y., Munter R. Combined chemical treatment of pharmaceutical effluents from medical ointment production. Chemosphere 70: 1525–1531. 2008.

27.Leuenberger, C., Ligocki, M.P., Pankow, J.F. Trace organic compounds in rain. 4. Identities, concentrations, and scavenging mechanisms for phenols in urban air and rain. Environmental Science and Technology 19, 1053–1058. 1985.

28.Mahugo-Santana,C,Sosa-Ferrera,Z,Torres-Padron.E,Juan.Rodriguez. J, S. Molecules, 14, doi:10.3390/molecules14010298, p298-320, 2009.

29.Ouertani M., Giraro P., and Kagan H. B. Selective nitration of phenols catalyzed by lanthanum (III) nitrate. TetrahedronLett. 23, 4315-4318. **.** 1982.

30.Oueslati M.A., Haddad M. et Blake G. Elimination du phénol par deux plantes aquatiques : Juncusfontanesii(Gay) et Lemna minor L. Revue des Sciences de l'eau 4 :555-568. 1998.

31. Aktas.Ö, çeçen. F. Adsorption and cometabolic bioregeneration in activated carbon treatment of 2-nitrophenol, Journal of Hazardous Materials 177 (2010) 956-961.

32.Sarria V., Kenfack S., Guillod O., Pulgarin C. An innovative coupled solar-biological system at field pilot scale for the treatment of biorecalcitrant pollutants. J. Photochem Photobiol. A 159: 89-99. 2003.

33.Smulevich G., Jakopitsch C., Droghetti E. and Obinger C. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). Journal of InorganicBiochemistry 100: 568-585. 2006.

34. Ganz.T, Hepcidin. A key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation, Blood, 102, 2003, 783-788.

35.Tadeusz Urbanski, Pwn-PolishScientific Publishers Warszawa, 1964.

36.Tonegawa M., Dec J. and Bollag J.M. Use of additives to enhance the removal of phenols from water treated with horseradish and hydrogen peroxide. Journal of Environmental Quality 32:1222–1227. 2003.

37.Welinder K.G. Super family of plant, fungal and bacterial peroxidases. Current Opinion in Structural Biology 2: 388-393. 1992.

38.Zhang G. and Nicell J.A. Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide, Water Research 34:1629– 1637. 2000.

Références bibliographiques

Remerciements

*Avant tout, l'ouvrage dédié à **ALLAH**, notre créateur et maitre de l'univers de toutes ses bontés, de nous avoir envoyé le prophète **MOHAMED** qui est notre premier éducateur puis de nous avoir donné tout, du courage pour finir ce travail de recherche.*

*Tout d'abord nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à **Mr Ahmed AZIZI** notre promoteur de recherche qui n'a jamais cessé de nous prodiguer conseils et encouragements et aussi pour avoir assuré la direction de notre thèse.*

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au laboratoire de chimie 2 du Hall Technologique de l'université de Médéa. Nous tenons donc à remercier l'ensemble du personnel nous ayant aidé et soutenu pendant la mise en œuvre de nos travaux.

*Ce travail n'aurait pu aboutir ni même voir le jour sans le soutien et l'appui de nos familles, **à nos chers parents** nous ne saurons exprimer notre profonde reconnaissance envers leur compréhension et leur patience dans les moments les plus difficiles.*

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

HANANE & LAMIA



DEDICASE

D'abord et avant tout je dédie ce modeste travail à ***mes parents*** *qui n'ont pas cessés de m'aides par tous les moyens. Je leur souhaite une longue vie, je les remercie du fond du cœur pour leurs encouragements et ses conseils. Mille merci, et je leurs souhaite la santé et le bonheur.*

Á mes frères *: Bachir, Mahfoud, Cherif, Mohamed et Nabil*

Á mes sœurs *: Fadhila, Salima et Naima*

Á mes neveux *: Ilham et Houda*

Á toute les familles *: MELLAT et SOUALHI*

Á mes chères amie *: Siham, Salima, Wissam, Dalila, Asmaa et ma binôme Lamia ZERKAOUI*

Á mon promoteur *Mr Azizi Ahmed*

Sans oublier toutes la promotion de ***Master pollution chimique et gestion environnementale*** *qui ont passé avec moi de bons moments*

À tous ceux qui me sont proches et qui me sont chers.

HANANE



DEDICASE

D'abord et avant tout je dédie ce modeste travail à ***mes parents*** *qui n'ont pas cessés de m'aides par tous les moyens. Je leur souhaite une longue vie, je les remercie du fond du cœur pour leurs encouragements et ses conseils. Mille merci, et je leurs souhaite la santé et le bonheur.*

Á mesfrères*: Ahmed, Miloud et Abd El Hak*

Á mes sœurs *: Fatima et Kheira*

Á mes neveux *: Abd el ghafour et Abd erraouf,*

Á toute les familles *: ZERKAOUI et BEN AMOUR*

Á mes chères amie *: Houda, Maliana, Salima, Chahrazed, Fatima, Khadidja, Asma, Wissam, Sihem, ma binôme Hanane mellat*

Á mon promoteur *Mr Azizi Ahmed*

Sans oublier toutes la promotion de ***Master pollution chimique et gestion environnementale*** *qui ont passé avec moi de bons moments*

À tous ceux qui me sont proches et qui me sont chers.

LAMIA

تفكيك 2-نيتروفينول بعملية كيميائية وانزيمية

ملخص. يؤكسد 2 نيتروفينول بطريقتين : كيميائية فنتون و انزيمية ، تم خلالهما تقييم وجود وتركيز المواد السامة الناتجة ، وقت المعالجة و مردود التفاعل، كل الطرق السابقة لها حدود والتخلص منها قدم دراسة جدوى الربط بين طريقتين من أجل أن يكون طريقة مثالية. تم إجراء أكسدة 2 نيتروفينول بواسطة عملية فنتون بواسطة تركيزين مختلفين لكبريتات الحديد 5 و 320 ملغم / لتر، وأعطت المردودين التاليين 55 و72 ٪ على التوالي في ظرف 180 دقيقة. خلال أكسدة 2 نيتروفينول هذه العملية ولدت مواد سامة مثل الهيدروكينون، الكاتيكول والبنزوكينون .

تمت أكسدة 2 نيتروفينول أيضا بواسطة انزيم حر و مثبت و قد أعطت المردودين التاليين 63 و73٪ في ظرف 150 دقيقة.

قد بدأ دمج العمليتين بواسطة عملية فنتون وتليها عملية الأنزيمية لإزالة المواد السامة الناتجة عن عملية فنتون وزيادة معدل التخلص من 2 نيتروفينول .

هناك أربعة احتمالات دمج بين العمليتين السابقتين : اثنتين عملية فنتون بحيث يكون تركيز كبريتات الحديد 320 ملغم / لتر مع انزيم حر أو مثبت و اثنتين عملية فنتون بحيث يكون تركيز كبريتات الحديد 5 ملغم / لتر مع انزيم حر أو مثبت.

تم تقييم الاربع عمليات من خلال تركيز المواد السامة : 2 نيتروفينول، الهيدروكينون، الكاتيكول والبنزوكينون، قيم DBO_5 و قيم المواد العالقة. كانت العملية التي أعطت النتائج الأفضل : هي فنتون (320 ملغم / لتر) مع الإنزيم المثبت بمعدل تخلص من 2 نيتروفينول وصل إلى 97 % مع فترة أكسدة دامت 105 دقيقة .التراكيز النهائية للهيدروكينون، الكاتيكول والبنزوكينون 102,3،28,1 و 28,1 ملغم / لتر على التوالي مع DBO_5 يساوي 10 ملغم / لترو قيمة المواد العالقة يساوي 493.8 ملغم / لتر عند درجة حرارة 40 درجة مئوية، ودرجة حموضة 7 .

الكلمات المفتاحية : 2 نيتروفينول ، عملية فنتون، انزيم حر،انزيم مثبت.

DEGRADATION DE 2-NITROPHENOL PAR PROCEDE COUPLE CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE

RESUME. L'oxydation de 2-Nitrophénol par deux procédés chimique : Fenton et enzymatique, la peroxydase libre et immobilisée, a été évalué la présence et la concentration de produits toxique générés, temps de traitement et le rendement de dégradation. Chaque procédés précédentes comporte des limitations et afin d'éliminés une étudié de faisabilité de couplage entre ces deux procédés a été effectué afin d'avoir un procédé intégrale.La dégradation de 2-nitrophénol par le procédé Fenton a été effectué pour deux concentration différentes en sulfates de fer 5 et 320 mg/L qui donne des rendement 55et 72% pour un temps de traitement 180 minutes respectivement. Ce procédé génère des produits toxiques lors de l'oxydation de 2-nitrophénol comme l'hydroquinone, catéchol et le Benzoquinone.
Le 2-nitrophénol a été traité aussi par deux forme de peroxydase libre et immobilisée qui donnent des rendements d'ordre 63 et 73% pour un temps de traitements égale150 minutes respectivement.
Le couplage des deux procédés a été initié par le procédé Fenton et suivi par le procédé enzymatique afin d'éliminer les produits toxique généré par le procédé fenton et d'augmenter le taux d'élimination de 2-nitrophénol.
Quatre probabilité de couplage entre les deux procédés sont été évalué : procédé Fenton ($[FeSO_4]$= 320mg L^{-1}) –Peroxydase libre ou immobilisée et procédé Fenton ($[FeSO_4]$= 5 mg L^{-1}) –Peroxydase libre ou immobilisée. La validation de quatre procédés a été effectué par la concentration de produits toxiques : 2-Nitrophénol, hydroquinone, catéchol et le benzoquinone, les valeurs de DBO_5 et l'MES. Le procédé couplé le plus performant a été Fenton (320 mg L^{-1}) et l'enzyme immobilisée tel que le rendement d'élimination de 2-Nitrophénol a été attient 97% pendant 105 minutes de traitement. Les concentrations finales de l'hydroquinone, catéchol et le benzoquinone ont été 102,3, 28,1 et 3,8 mg/L respectivement avec un DBO_5=10 mg/L et un MES=493,8 mg/L sous une température= 40°C et un pH=7.
Mots clés : 2-Nitrophénol, Fenton, Peroxydase libre, Peroxydase immobilisée.

DEGRADATION OF 2-NITROPHENOL BY COUPLE PROCESS CHEMICAL AND ENZYMATICPROCESS

ABSTRACT. Oxidation of 2-nitrophenol by two process chemical: Fenton and enzymatic processes, free and immobilized peroxidase, was evaluated the presence and the concentration of toxic generated products, processing time and performance degradation. Each preceding methods has limitations and to disposed feasibility study to coupling between the two methods was made in order to have a full method. Degradation of 2-nitrophenol by the Fenton processwasperformed for twodifferent concentrations of iron sulfates 5 and 320 mg/L, which gives yield 55 and 72% for a treatment time of 180 minutes respectively. This processgeneratestoxicproductsduring the oxidation of 2-nitrophenol such as hydroquinone, catechol and benzoquinone.
2-nitrophenol was treated as two by free and immobilized peroxidase which give yields of order 63 and 73% for a time treatmentequal of 150 minutes respectively.
The coupling of the two processes was initiated by the Fenton process and followed by the enzymatic process to remove toxic products generated by the Fenton process and increase the elimination rate of 2-nitrophenol.
Four probability of coupling between the two processes were evaluated: Fenton process ([$FeSO_4$] = 320mg L^{-1}) -Peroxydase free or immobilized and Fenton process ([$FeSO_4$] = 5 mg L^{-1})-free or immobilizedPeroxydase. Validating four process was performed by the concentration of toxic products: 2-Nitrophenol, hydroquinone, catechol and benzoquinone, values of BOD5 and suspendedmatter. The most efficient coupled process was Fenton (320 mg L^{-1}) and the immobilized enzyme such as the removal efficiency of 2-Nitrophenol was attain 97% for 105 minutes of treatment. The final concentrations of hydroquinone, catechol and benzoquinone were 102.3, 28.1 and 3.8 mg/ L respectively with a BOD5 = 10 mg/L and suspendedmatter = 493.8 mg/L undertemperature= 40 °C and a pH = 7.
KEYWORDS: 2-Nitrophenol, Fenton, Free peroxidase, Immobilized Peroxidase.

SOMMAIRE

SOMMAIRE i
LISTE DES ABVERIATIONS.....ii
LISTE DES FIGURES. iii
LISTE DES TABLEAUX.....iv
Introduction général.....1

Chapitre I : **SYNTHHSE BIBLIOGRAPHIQUES**

I.1. La Nitration des phénols. 2
I.2. Les Nitrophénols 4
I.3. Le 2-Nitrophénol 4
I.3.1. Utilisation 5
I.3.2. Toxicité 5
I.3.3. Normes de rejet de 2-Nitrophénol 5

I.4. Les processus d'oxydation avancée(POA**)** 6

I.4.1. Procédé Photo-Fenton 6

I.4.2.Procédé UV / Fe^{3+-} Oxalate / H_2O_2 7
I.4.3.H_2O_2/UV..... 7
I.4.4.Ozonation.....8
I.4.5.O_3 / UV 8
I.4.6.Procédé Fenton.....8
I.5.Influence des paramètres opératoires sur l'oxydation Fenton 10
I.5.1.Concentration de fer et source de fer.....10
I.5.2.Concentration d'oxydant 10
I.5. 3.Température 11
I.5.4. Effet de l'oxygène dissous 11
I.5.5. Inconvénients du système Fenton 11
I.6. Les peroxydases 12

I.6.1. Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique 13
I.6.2.Biodégradation des composés phénoliques par les peroxydases 13

Chapitre II : MATERIELS & METHODES

II.1.Matériels et réactifs 15
II.1.1.Equipements 15
II.1.2.Verreries 15
II.1.3.Réactifs 15
II.2. Préparations des échantillons 16
II.3.Préparation des solutions tampons.....16
II.4.La courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol 17
II.5. Méthode d'extraction et purification de peroxydase de navet blanc 18
II.5.1. Mesure d'activité enzymatique d'enzyme libre 20
II. 5.2. Méthode d'encapsulation de la peroxydase 21
II.6. Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol 23
II.6.1. Méthode de couplage Fenton et la peroxydase 23
II.6.2.Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol par la peroxydase libre et immobilisée.....23
II.6.3.Méthode de couplage Fenton et la peroxydase.....23

Chapitre III : RESULTATS & DESCUSSION

III.1. Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé Fenton.....24
III.1.1. Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton... 24
III.1.2.Ordre de la cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton....25
III.1.3.Suivi de l'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton 29
III.2.Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé enzymatique.....30
III.3. Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé couplé Fenton/peroxydase 31
III.3.1 .Validation des procédés couplés en terme de MES et DBO5..... 34
CONCLUSION GENERALE..... 35
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

Abréviation et Symboles	Signification	Unité
AE	Activité Enzymatique.	UI/ml
C_o	Concentration initiale.	mg/l
C_t	Concentration un l'instant (t).	mg/l
DBO	Demande Biologique d'Oxygène.	mg d'O_2/l
DO	Densité Optique.	---------
EEB	Extrait Enzymatique Brut.	---------
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié.	---------
POA	Procédés d'Oxydation Avancés.	---------
T	Température.	°C
t	Temps.	min
R	Rendement	%
2-NP	2-Nitrophénol.	---------
λ_{max}	Longueur d'onde à DO maximal d'une substance.	nm

LISTE DES FIGURES

	Titres	N° de pages
Figure. I.1	Structure de 2-Nitrophénol.	3
Figure. I.2	Nitration de phénol.	5
Figure. I.3	structure du groupe hème de fer dans la peroxydase de raifort.	13
Figure. II.1	Courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol.	17
Figure. II.2	Protocole d'extraction et de purification de la peroxydase.	19
Figure. II.3	Protocole d'Immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de sodium.	22
Figure.III.1	Rendement de dégradation du 2-Nitrophénol par le procédé Fenton.	25
Figure.III.2	Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton.	27
Figure.III.3	Application du modèle cinétique pseudo-premier ordre d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton.	27
Figure.III.4	Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton.	28
Figure.III.5	Application du modèle cinétique pseudo-premier ordre d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton.	28
Figure.III.6	Produits final de réaction Fenton lors de l'oxydation de 2-Nitrophénol.	29
Figure.III.7	Variation de rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase immobilisée.	30
Figure.III.8	Variation de rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase libre.	31
Figure.III.9	Performance de quatre procédé de couplés Fenton-Peroxydase.	33

LISTE DES TABLEAUX

	Titres	N° de pages
Tableau I.1	Les effets de 2-Nitrophénol sur la santé.	5
Tableau II.1	Les conditions de couplage	24
Tableau III.1	produits générés aux cours de traitement de 2-Nitrophénol par les quatre procédés couplés.	32
Tableau III.2	Qualités de l'eau traitée par les quatre procédés.	33

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'industrialisation intensive qui a vu le jour au cours du dernier siècle a causé l'apparition dans l'environnement de polluants émergents réfractaires. Ces substances dites biorécalcitrantes peuvent entraîner une contamination chez les êtres vivants. De plus, certains de ces composés sont reconnus pour causer des effets cancérigènes et mutagènes, ou peuvent interférer avec le système hormonal des êtres vivants (perturbateurs endocriniens). Au nombre de ces polluants couramment décelés dans les rejets industriels et urbains, se trouvent des composés phénoliques comme le 2-Nitrophénol lesquels ce composé est à l'origine de nombreuses perturbations de la faune aquatique et constituent un risque pour la santé humaine. Ce contaminant échappe pour la plupart au traitement classique des eaux usées. Dans l'optique de limiter l'arrivée de ce type de contaminant réfractaire dans l'environnement, des stratégies de traitement comporte une efficacité limité en terme de régénération des produits toxiques comme le procédé Fenton ou un rendement dégradation moyen comme les procédés enzymatiques de sources non microbiennes. Une nouvelle stratégie a été évalué le couplage entre deux procédés différentes Fenton et la peroxydase (enzyme) afin d'avoir un procédé intégrale protégé l'environnement.

Par conséquent, ce travail intitulé : ***Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé chimique et enzymatique*** est subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre, présente une mise au point bibliographique. Après un rappel sur les 2-Nitrophénol, nous présentons les différents procédés d'oxydation avancée de cet effluent et le procédé enzymatique effectué par la peroxydase.

Le deuxième chapitre reforme les méthodes et les matériels utilisés pour réaliser ce travail.

Le troisième chapitre rassemble les résultats avec leurs discussions.

Le mémoire clôturé par une conclusion générale.

Chapitre I:
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. La Nitration des phénols

La nitration est l'une des réactions chimiques organiques le plus tôt connues. On lui mentionne dans les écritures des alchimistes. Dès dans la première moitié du XVIII^{ème} siècle, Glauber a obtenu l'acide picrique par l'action sur la laine et le klaxon avec de l'acide nitrique.

Actuellement la nitration est l'une des réactions directes le plus largement appliquées de substitution. C'est dû à plusieurs facteurs. Ses produits peuvent aisément être séparés de l'acide épuisé, et il y a un large éventail de possibilités dans l'utilisation pratique des dérivés nitrés ,comme intermédiaires et produits finaux .La présence d'un groupe nitro dans le produit commençant a permis pour obtenir un certain nombre d'intermédiaires organiques de base telles que l'aniline et la benzidine. Des colorants avec plus d'un groupe nitro, tel que l'acide picrique ont été obtenus. On l'a constaté que des dérivés nitrés nitratés plus supérieurs et des esters d'acide nitrique ont les propriétés explosives et sont d'importance pratique. Quelques dérivés nitrés sont employés dans les parfums. Des propriétés médicinales ont été découvertes en certains dérivés nitrés, par exemple chloramphénicol. *(Tadeusz et al.1964).*

La nitration peut être effectuée directement par l'introduction du groupe nitro au lieu de l'atome d'hydrogène ou en l'ajoutant à un lien double, ou bien indirectement, en présentant dans un composé par groupe qui peut aisément être substitué par le groupe nitro.

Les agents de nitration suivants le plus souvent sont employés pour l'introduction directe du groupe nitro :

- Acide nitrique concentré ;
- Des mélanges de l'acide nitrique concentré et l'acide sulfurique concentré ;
- Nitrates d'alcali en présence d'acide sulfurique ;
- Acide nitrique dilué ;
- Dioxyde d'azote ;
- Une solution de dioxyde d'azote en acide sulfurique ;
- Dioxyde d'azote en présence des catalyseurs.

Sans compter que ces méthodes directes de présenter les groupes nitro, on connaît plusieurs méthodes indirectes qui consistent en introduction d'un groupe qui peut aisément être substitué par un groupe nitro. Dans un de ces derniers qui est très utilisé dans la nitration des phénols, un composé est sulfonaté et plus tard, par la réaction de l'acide nitrique, le groupe de sulpho est remplacé par le groupe nitro. *(Tadeusz et al. 1964).*

La nitration des phénols suivre la méthode classique d'acide nitrique en présence de l'acide sulfurique qui donne complexe contenant un mélange d'ortho et para-nitrophénols et les phénols dinitratés *(Zheng et al. 2006).* La nitration regioselective du phénol pour fournir ortho- et Para-nitrophénol comme cas particuliers a été étudiée par de divers agents de nitration dans différentes conditions *(Ouertani et al. 1982 ; Milczak et al. 2001)*.

La nitration des dérivés de benzène avec l'électron donnant le substituant mène à la substitution à l'o et aux p-positions selon une distribution statistique. *(March et al.1992).*

L'utilisation des réactifs soutenus et des catalyseurs sont connus pour favoriser la substitution de Para. *(Smith, K. et autres ;1992).*

L'o-nitrophénol est un produit de départ important utilisé dans des synthèses multiples d'étape des composés précieux.

La nitration des phénols suit la méthode classique d'acide nitrique en présence de l'acide sulfurique qui donne complexe contenant un mélange d'ortho et para-nitrophénols et les phénols dénitratés (Figure I.1) **(**Ouertani et al. 1982**).**

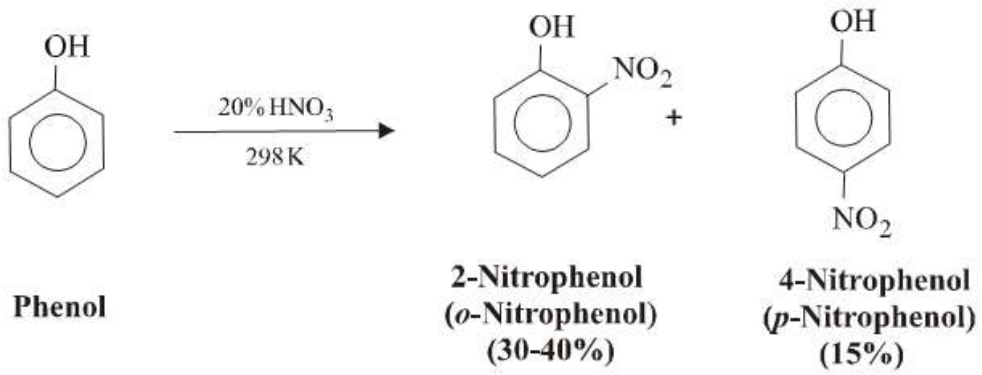


Figure I.1. Nitration de phénol.

I.2. Les nitrophénols

Les nitrophénols sont des composés nitro-aromatiques nocifs. Ils peuvent être des intermédiaires environnementaux de transformation des herbicides phénoliques. L'exposition aux nitrophénols peut causer des effets néfastes aux algues et aux organismes aquatiques.

La biodégradation de ces composés n'empêche pas leur accumulation dans le sol et les eaux souterraines pendant les mois d'hiver, qui peuvent endommager le développement des plantes pendant le printemps. Une voie alternative de transformation des nitrophénols dissouts dans les eaux de surface est représentée par les processus photochimiques, parmi eux la photolyse. *(Albinet et al. 2010)*.

La présence des nitrophénols dans l'environnement a été reconnue depuis qu'ils ont été la première fois détectés par Nojima et autres (1975) en eau de pluie. Cependant, l'information concernant l'occurrence des nitrophénols est demeurée rare jusqu'à ce que leurs propriétés phytotoxiques aient été découvertes.

Les nitrophénols ont gagné plus d'attention et ont été analysés dans le ciel *(Belloliet et al. 1999;Herterich et Herrmann .1990)*, pluie *(Leuenberger et al. 1988 ; Levsen et al. 1990)*, l'eau *(Geissler et Scholer.1994)*, brouillard *(Herterich. 1991; Richartz et al. 1990)* et neige *(Kawamura et Kaplan. 1986)*.

Les isomères de nitrophénol : m-nitrophénol, o-nitrophénol et p-nitrophénol coexistent habituellement dans les échantillons biologiques et environnementaux, qui sont les composés organiques importants et souples dans des applications industrielles, agricoles. Cependant, leur toxicité et propagation de potentiel par l'environnement par l'intermédiaire de la lixiviation et de l'infiltration, particulièrement pour l'o-nitrophénol et le p-nitrophénol, les font à considérer comme déchets dangereux et polluants toxiques *(E PA .1980)*.

I.3. Le 2-Nitrophénol

Le 2-Nitrophénol (2-NP) aussi appelé 2-Hidroxynitrobenzène est un composé phénolique qui comporte un groupe nitro à l'opposé du groupe hydroxyle sur le cycle benzylique. Sa formule moléculaire est $C_6H_5NO_3$.

Le 2-Nitrophénol est un solide très stable d'odeur caractéristique. Il apparait sous forme de cristaux jaunes pâles.

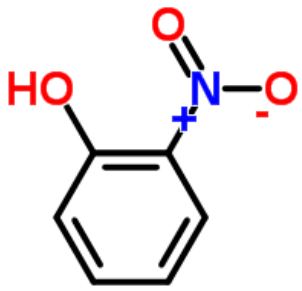


Figure .I.2 : Structure de 2-Nitrophénol.

I.3.1. Utilisation

Le 2-Nitrophénol est principalement utilisé en tant qu'intermédiaire pour la production des colorants, des fongicides, des pesticides, des explosifs, des Préservatifs de bois et des traitements de cuir. De petites quantités sont utilisées comme un indicateur acido-basique. (Ö. Aktas¸ F. çeçen, 2010).

I.3.2. Toxicité

L'agence américaine pour la protection de l'environnement et l'union européenne ont inclus 11 phénols dans leur liste de polluants prioritaires parmi eux, cinq (5) chlorophénols et quatre (04) nitrophénols Parmi les nitrophénols le 2-Nitrophénol *(Mahugo -Santana et al. 2009).*

Les effets de 2-Nitrophénol sur la santé sont résumés dans le tableau I.1 suivant :

Tableau I.1. Les voies d'exposition possibles par le 2-NP et leurs conséquences sur la santé

Voies d'exposition probables	Conséquences
Contact avec les yeux	-Provoque des brûlures aux yeux. -La blessure peut être permanente.
Contact avec la peau	-Brûlure de la peau. -La blessure peut être permanente. - Nocif si absorbé.
Inhalation	- Nocif si inhalé.
Ingestion	-Nocif si avalé.

I.3.3. Normes de rejet de 2-Nitrophénol

Les phénols (nitrophénols, phénol, chloronitrophénol…) sont considérés comme des polluants à traiter en priorité à cause de leurs toxicités avérées même à faibles concentrations. A cause de cette toxicité différents phénols ont été classés comme polluants prioritaires par US EPA (United States of Environnemental protection Agency) *(Busca et al .2008; Namane, 2006).*

De même que l'union européenne a limité la concentration maximale tolérée pour les eaux de consommation à 0,5 µg.L^{-1} (0,5 ppb). (Décret exécutif No 89-3 du 03/01/89) *(Busca et al.2008 ,Namane ,2006).*

L'agence de protection de l'environnement à établie une norme de purification de l'eau de moins de une partie par billion (1 ppb) de phénols dans les eaux de surface *(Busc et al 1978, Romanovskaya et al 2009)*, tandis que les limites des phénols pour les émissions des eaux usées sont de 0,5mg.L^{-1} (0,5 ppm) *(Busc et al. 2009).*

L'Algérie tolère une concentration maximale des phénols de 0,3 mg. L^{-1} pour les rejets industriels (Décret exécutif No 06-141 du 19/04/2006) *(Jora. 2006).*

Les nitrophénols ne peuvent pas être effectivement traités par des technologies traditionnelles telles que la dégradation biologique, le Traitement physico-chimique (coagulation-floculation), filtration ou adsorption classique. La photochimie directe n'est pas efficace non plus ; tandis que l'ozonolyse est tout à fait lente *(Beltran, Gomez-Serrano et Duran .1992).* En revanche, les processus avancés d'oxydation (AOP) comme : le procédé Fenton et aussi les enzymes comme : la peroxydase, se sont avérés capables dégrader efficacement le 2-NP.

I.4. Les processus d'oxydation avancée(POA)

Les processus d'oxydation avancée sont des procédés de traitement d'eau ayant connu une évolution rapide au cours des vingt dernières années. Elles ont pour but la minéralisation totale de polluants en CO_2, H_2O et composés inorganiques.

Les POA peuvent être regroupés selon la nature de la phase (homogène ou hétérogène) ou selon la méthode employée pour produire les radicaux hydroxyles : chimique, photochimique, électrochimique, sonochimique etc. L'efficacité de ces procédés dépend de nombreux paramètres tels que la concentration en oxydant, l'intensité de la lumière UV, le pH, la température, etc. La composition du milieu doit également être prise en compte, l'efficacité de l'oxydation pouvant être réduite en

raison de la consommation des •OH par des composés organiques et/ou inorganiques *(Staehelin, 1982).*

Les techniques d'oxydation fréquemment citées dans la littérature sont les suivantes :

I.4.1. Procédé Photo-Fenton

Le procédé Fenton est aujourd'hui moins étudié que le procédé Photo Fenton, qui a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années ***(Pichat, 1997)***. La réaction de base de cette variante du procédé Fenton est toujours la réaction (Eq.I.1). Mais en présence d'un rayonnement UV (G>300 nm), l'efficacité du procédé de Fenton est grandement améliorée. En présence d'un rayonnement UV, l'hydrolyse de complexes formés par Fe^{3+} entraîne la régénération de Fe^{2+} consommés par la réaction (Eq.I.1) et produit des radicaux hydroxyles additionnels selon (Eq.I.2) :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH \qquad (Eq.I.1)$$

$$Fe(OH)^{2+} \rightarrow h\upsilon\ Fe^{2+} + \bullet OH \qquad (Eq.I.2)$$

I.4.2. Procédé UV / Fe^{3+}– Oxalate / H_2O_2

C'est une amélioration assez récente apportée au procédé Photo Fenton. Des études ont montré que ce procédé était plus efficace que le Photo Fenton traditionnel ***(Safarzadeh-Amiri et al.1996)*** **.** Il est fondé sur la série de réactions suivantes :

$$(Fe^{III}(C_2O_4)_3)^{3-} + h\upsilon \rightarrow (Fe^{II}(C_2O_4)_2)^{2-} + C_2O_4^{\bullet -} \qquad (Eq.I.3)$$

$$C_2O_4^{\bullet -} + (Fe^{III}(C_2O_4)_3)^{3-} \rightarrow (Fe^{II}(C_2O_4)_2)^{2-} + C_2O_4^{2-} + 2\ CO_2 \qquad (Eq.1.4)$$

$$C_2O_4^{\bullet -} + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet -} + 2\ CO_2 \qquad (Eq.1.5)$$

L'irradiation du complexe Fe^{3+}–Oxalate produit du dioxyde de carbone et des ions ferreux Fe^{2+} qui, combinés à du peroxyde d'hydrogène, procurent une source continue de réactif de Fenton. Il a été montré que pour la dégradation d'hydrocarbures, l'énergie consommée par ce procédé était égale à 20% de celle requise par le procédé Photo Fenton.

I.4.3. H_2O_2/UV

Le peroxyde d'hydrogène est introduit dans l'effluent à traiter. Le mélange subit ensuite une irradiation UV. Les longueurs d'onde choisies sont généralement dans le domaine de l'UVC (=254nm) ***(Mazellier, Rachel, Mambo, 2004)*****.** ou de l'UVA (=365 nm) ***(Muruganandham, Swaminathan, 2004)*****.** Certains auteurs ont aussi utilisé une

lampe à vapeur de mercure moyenne pression présentant des raies d'émissions en UVA, B et C *(Malik, Sanyal, 2004)*. Le rayonnement UV provoque le clivage homolytique de la molécule d'H_2O_2:

$$H_2O_2 + h\upsilon \rightarrow 2\ {}^{\bullet}OH \qquad (Eq.I.6)$$

La vitesse de décomposition photolytique du peroxyde d'hydrogène augmente en conditions basiques mais en fonction du polluant à traiter, des auteurs ont prouvé que la décomposition pouvait être plus rapide en conditions acides *(Legrini, Oliveros et al.)*. Le procédé est donc très dépendant du pH.

I.4.4. Ozonation

L'ozone se décompose rapidement dans l'eau en une suite de réactions aboutissant à la formation d'espèces radicalaires très réactives : •OH (radical hydroxyle), $O_2^{\bullet-}$ (radical superoxyde), $HO_2^{\bullet}$ (radical hydroperoxyle), etc. Cependant, les radicaux hydroxyles sont les plus intéressants pour l'oxydation de polluants, la réactivité de $O_2^{\bullet-}$ et de $HO_2^{\bullet}$ avec des composés organiques étant moins importante *(Hoigne, Bader, 1987)*. Dans l'eau, l'ozone moléculaire est instable. Outre son fort pouvoir d'oxydation induisant des réactions avec de nombreux substrats organiques ou minéraux, l'ozone peut se décomposer en espèces radicalaires sous l'effet des ions hydroxydes.

I.4.5. O_3 / UV

Le procédé O_3/UV, un peu plus complexe que les précédents, produit des radicaux hydroxyles par plusieurs voies réactionnelles. Les réactions initiales généralement citées sont les suivantes:

$$O_3 + h\upsilon \rightarrow O^{\bullet} + O_2 \qquad (Eq.I.7)$$

$$O^{\bullet} + H_2O \rightarrow H_2O_2 \qquad (Eq.I.8)$$

$$H_2O_2 + h\upsilon \rightarrow 2\ {}^{\bullet}OH \qquad (Eq.I.9)$$

Ce schéma réactionnel permet de comprendre que le système O_3 / UV peut être assimilé à un couplage des procédés d'oxydation O_3 et H_2O_2 / UV. La production de radicaux hydroxyles dépend donc à la fois de la décomposition de l'ozone dans l'eau et de celle de H_2O_2 sous l'effet du rayonnement UV.*(Alaounia, 2009)*

I.4.6. Procédé Fenton

Comme les radicaux hydroxyles sont des espèces hautement réactives, qui peuvent oxyder instantanément la plupart des composés organiques, de nombreuses études se sont focalisées sur son rôle d'oxydant dans l'environnement. Il a par exemple été démontré récemment que le radical •OH était l'oxydant clé des hydrocarbures dans le troposphère .de même que lors de l'application de certaines techniques de traitement des eaux, notamment par ozonolyse. Cependant, les sources naturelles de production, ainsi que les facteurs qui peuvent affecter la vitesse de formation des •OH, sont encore mal connus.

La réaction de Fenton est basée sur la production des radicaux hydroxyles à partir de la décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par des sels ferreux.

$$Fe\ (II) + H_2O_2 \rightarrow Fe\ (III) + HO^- + \bullet OH \qquad (Eq.I.10)$$

En 1894 Henry J. Fenton remarque qu'il est possible d'activer H_2O_2 avec les sels de Fe(II) et de cette manière d'oxyder l'acide tartrique ***(Fenton, 2004)***.Ce n'est que plus tard, en 1934, que Haber et Weiss émettent l'hypothèse que le radical hydroxyle est responsable de cette oxydation ***(Haber, Weiss et al. 1934)***. Par la suite, le mécanisme dans lequel la formation de HO• est l'étape clé et que l'on nomme aujourd'hui le Fenton « classique » est développé et approfondi ***(Walling ,1989)***.

Au cours des dernières décennies, l'importance de la réaction de Fenton pour les réactions dans l'environnement, dans les systèmes biologiques et pour le traitement des déchets est de plus en plus reconnu ***(Pignatello, Oliveros et al. 2007)***.

L'utilisation de H_2O_2 et des sels de fer a plusieurs avantages : comparé à d'autres oxydants, H_2O_2 est relativement peu coûteux, assez facile à gérer et ne pollue pas l'environnement puisque H_2O_2 se décompose en eau et O_2.

Les sels de fer sont également bon marché et ne constituent pas un problème pour l'environnement. Avec un pourcentage de 4,7%, le fer est le quatrième élément le plus abondant dans l'écorce terrestre ***(Faust, 1993)***. Il constitue un élément indispensable au fonctionnement du corps humain (synthèse de l'hémoglobine du sang). Les besoins journaliers en fer sont estimés à environ 10 mg/jour, selon l'âge et le sexe. Aucune toxicité n'a été observée chez l'homme, et ce même à des doses élevées (5 mg/l), (*Ganz, 2003*)**.**

L'oxydation homogène avec le réactif de Fenton se produit en présence d'ions ferreux (ou ferrique) et du peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire d'une réaction en chaîne qui amène à la formation des radicaux hydroxyles. Il s'agit d'une réaction d'oxydation

catalytique car le fer agit comme catalyseur. L'efficacité du procédé homogène est étroitement liée au pH de la solution, dont les valeurs optimales sont comprises entre 2 et 4, ainsi qu'aux proportions relatives de peroxyde d'hydrogène et de catalyseur par rapport à la DCO de la solution à traiter. La possibilité d'adapter les concentrations de catalyseur et d'oxydant par rapport à la charge en polluants rend ce procédé tout aussi bien adapté au traitement des effluents issus de l'industrie pharmaceutique ou des hôpitaux qu'à l'élimination de médicaments sous la forme de micropolluants des eaux de surface. L'oxydation Fenton peut être aussi une étape efficace de prétraitement en transformant les polluants en sous-produits facilement biodégradables et en réduisant la toxicité globale, améliorant ainsi l'efficacité du traitement biologique ultérieur *(Kulik et al. 2008)*.

I.5. Influence des paramètres opératoires sur l'oxydation Fenton

La nécessité d'acidifier le milieu est souvent mentionnée comme un des principaux inconvénients de la réaction de Fenton. Cela signifie non seulement des coûts supplémentaires, provenant de la consommation de réactifs pour l'acidification et la neutralisation ultérieure, mais aussi une augmentation de la charge en sels de l'eau traitée.

De nombreux travaux sur les procédés Fenton ont montré que le pH doit être compris entre 2 et 4 pour une dégradation optimale des polluants organiques. Pour comprendre ces observations, il faut examiner les diagrammes de spéciation des espèces ferreuses et ferriques. En solution aqueuse, le fer forme des complexes aqueux de la forme $[Fe(OH)_x(H_2O)_{6-x}]^{(2-x)+}$ ou $^{(3-x)+}$ dont la concentration relative dépend du pH. Par souci de simplification, les molécules d'eau associées aux espèces ne seront pas représentées. Par ailleurs, en augmentant le pH, le fer dissous a tendance à précipiter.

I.5.1. Concentration de fer et source de fer

En conditions Fenton standards, c'est-à-dire pour une valeur de pH autour de 3 et une concentration en fer dissous inférieure ou égale à 1 mM, les études démontrent que l'augmentation de la concentration en fer conduit toujours à une augmentation de la vitesse de réaction *(Sarria et al. 2003)*.Cependant, cette augmentation n'est pas toujours proportionnelle, et la vitesse finit par se stabiliser aux concentrations élevées. Les réactions de Fenton homogènes se produisent entre le peroxyde d'hydrogène et Fe^{2+} ou Fe^{3+} et conduisent à la production de radicaux hydroxyles hautement réactifs qui attaquent et détruisent les molécules organiques. Cependant

les valeurs très différentes des constantes associées suggèrent que les vitesses de dégradation des polluants doivent dépendre de la nature du fer introduit.

I.5.2. Concentration d'oxydant

L'influence de la concentration d'oxydant sur la cinétique a été étudiée par plusieurs auteurs et leurs conclusions peuvent se résumer par le fait qu'il existe une plage de concentrations optimales pour le peroxyde d'hydrogène : une concentration trop faible conduit à une réduction de la vitesse de réaction, une concentration trop élevée conduit les radicaux hydroxyles à réagir préférentiellement avec H_2O_2 plutôt qu'avec le polluant. La connaissance de la quantité de consommée de H_2O_2 doit permettre de prévoir l'évolution de la réaction Fenton *(Gernjak et al. 2006 ; Bacardit et al. 2007)*, et une addition contrôlée de peroxyde d'hydrogène pourrait conduire au degré de minéralisation désiré. L'optimisation de la quantité de peroxyde vis-à-vis de la stœchiométrie théoriquement nécessaire pour la minéralisation du polluant dépend fortement de ce substrat et de sa concentration.

I.5.3. Température

La température améliore la vitesse des réactions impliquées dans le mécanisme d'oxydation Fenton (selon la loi d'Arrhénius), mais elle favorise aussi la décomposition de H_2O_2 en oxygène et eau, en particulier au-delà de 60°C. Il n'y a pas de consensus sur l'effet de la température (valeur optimale ou valeur la plus haute préférable), mais en général des températures supérieures à 60°C ne sont pas utilisées *(Khamaruddin et al. 2011)*.

I.5.4. Effet de l'oxygène dissous

L'oxygène dissous provoque une oxydation directe de Fe(II) :

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \qquad (Eq.I.11)$$

En oxydation Fenton, l'effet net de l'oxygène dissous peut être positif ou négatif selon les conditions opératoires utilisées, mais généralement il ne modifie que peu le plateau de minéralisation atteint *(Haddou et al. 2010)*.

Par ailleurs, certaines réactions, notamment celles mettant en jeu les radicaux $HO_2^{\bullet}$ et $O_2^{\bullet-}$ produisent de l'oxygène moléculaire avec des constantes de vitesse non négligeables (entre 105 et 1010 $mol^{-1}.L.s^{-1}$) et il est donc difficile de travailler en l'absence totale d'oxygène dissous *(Flotron, 2004)*.températures supérieures à 60°C ne sont pas utilisées *(Khamaruddin et al. 2011)*.

I.5.5. Inconvénients du système Fenton

La réaction de Fenton présente un certain nombre d'inconvénients :

- absence de régénération du Fe^{2+} (catalyse très lente en présence de l'excès de H_2O_2 par la réaction :

$$Fe^{3+}+H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+}+H^{+}+HO_2^{\bullet} \qquad (Eq.I.12)$$

D'où son ajout continu en cours de traitement ;

- la nécessité d'opérer dans un milieu à pH avoisinant 3. C'est une technique très limitée par la gamme de pH ;
- l'usage de doses élevées de réactifs pour oxyder certaines classes de composés organiques ;
- la production des boues d'hydroxydes ferriques $Fe(OH)_3$.
- la consommation des radicaux $^{\bullet}OH$ par les réactions parasites
- Génère des produits très toxique par apport le substrat à traiter (phénol) tel que l'hydroquinone, benzoquinone et le catéchol.

Un pH de 3 et un excès de peroxyde d'hydrogène par rapport au Fe^{2+} doivent être requis pour optimiser le procédé Fenton.

I.6. Les peroxydases

Les peroxydases sont des protéines à hème, capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques, en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hydroperoxyde organique comme accepteur d'électron *(Delannoy et al. 2004)*.

Les peroxydases (numéro EC 1.11.1.X) regroupent une grande famille d'enzymes. Elles appartiennent à la famille des oxydoréductases, en accord avec la nomenclature officielle. Ce sont des enzymes ubiquitaires retrouvées dans les plantes, les animaux et les microorganismes *(Colonna et al. 1999)*.Les peroxydases de plantes ont été regroupées avec les peroxydases des bactéries et des champignons en une seule superfamille *(Welinder ,1992)*. Dans cette superfamille, toutes les peroxydases sont composées de protéines qui présentent toutes une structure tridimensionnelle similaire *(Smulevich et al. 2006)*. Elles réduisent toutes l'eau oxygénée (H_2O_2) en H_2O, mais oxydent des substrats très différents.

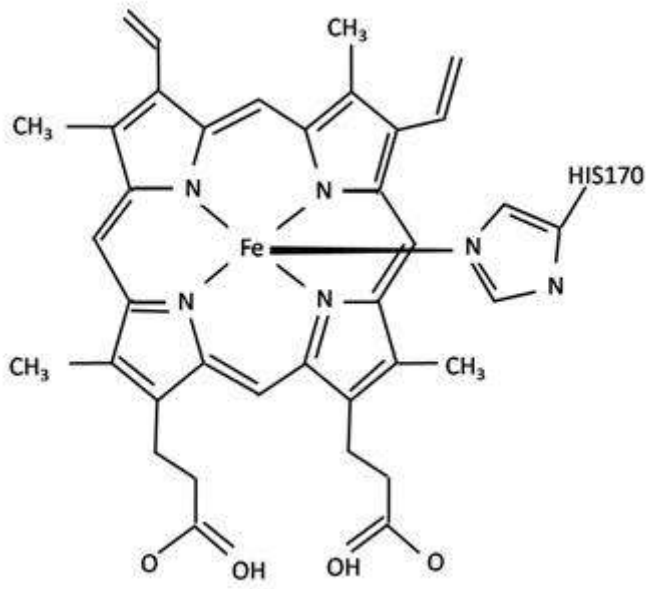


Figure.1.3 : structure du groupe hème de fer dans la peroxydase de raifort.

I.6.1. Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique

Les peroxydases sont des enzymes non michaéliennes *(Dunford,1999)*. L'action de ces enzymes nécessite la présence à la fois d'un composé phénolique et de l'eau oxygénée (H_2O_2). Cependant cette dernière peut être générée par les peroxydases par oxydation des acides carboxyliques. La catalyse déclenchée par l'H_2O_2 permet la formation d'enzymes transitoires. En réagissant avec un donneur d'hydrogène, les composés transitoires donnent naissance à des radicaux libres qui peuvent former des polymères en réagissant entre eux.

I.6.2. Biodégradation des composés phénoliques par les peroxydases

Il est bien connu que certains composés phénoliques sont toxiques et difficilement biodégradables. Cependant depuis les travaux pionniers de Klibanov et al. (1980), plusieurs études ont montré que les peroxydases pures ou brutes de sources végétales sont capables de dégrader plusieurs composés phénoliques les plus récalcitrants tels que le naphtol *(Ashraf et Husain, 2010)*; le crésol, le 2,4-dichlorophénol et le 4,4'-isopropylidènediphenol communément appelé bisphénol A *(Caza et al. 1999)*, le pentachlorophénol*(Zhang et Nicell,2000)*et les amines aromatiques *(Nicell et al.1993)***.** La majorité de ces composés ont été dégradés avec la peroxydase de raifort (HRP).Cette dégradation commence par une oxydation catalytique des composés phénoliques par ces enzymes en présence de H_2O_2 pour former des radicaux libres. Les radicaux libres subissent des réactions de polymérisation non enzymatiques pour

donner des polymères insolubles dans l'eau *(Dunford ,1999 ; Tonegawa et al. 2003)* qui seront ensuite éliminés par des techniques physiques telles que la filtration, la sédimentation ou la centrifugation. La polymérisation des radicaux libres est fonction de la nature chimique du radical, de son environnement et de l'isoenzyme de la peroxydase utilisée *(Henriksen et al. 1999)*.Le temps nécessaire pour une élimination quasi-totale du phénol dépend lui aussi de la concentration initiale en phénol *(Oueslati et al. 1998)*. Cependant, durant la catalyse, ces enzymes peuvent s'inactiver. Cette inactivation pourrait être due à la formation de radicaux libres présents lors de la réaction enzymatique. Ces radicaux adsorbés sur le site actif des enzymes peuvent bloquer ainsi l'oxydation des substrats *(Bratkovskaja et al. 2004)*.Cependant, l'inactivation des enzymes peut être évitée en utilisant des additifs tels que le borate, le polyéthylène glycol (PEG), la gélatine, etc. *(Akhtar et Husain, 2006; Quintanilla-Guerrero et al. 2008)*.

Chapitre II :
MATERIELS & METHODES

CHAPITRE II. MATERIELS & METHODES

II.1. Matériels et réactifs

II.1.1. Equipements

- Agitateur.
- Balance.
- Centrifugeuse.
- Chronomètre.
- Étuve.
- Hotte.
- Mixeur.
- Seringue 20G.
- Spectrophotomètre UV-Vis.
- pH-mètre.

II.1.2. Verreries :

- les verreries classiques sont utilisées dans notre étude.

II.1.3. Réactifs

Les expériences menées dans le cadre de cette recherche, dans diverses conditions ont nécessité les produits de qualités analytiques suivantes :

- Acétone, C_3H_6O, 100%,
- Acide citrique, $C_6H_7O_8$, 99%,
- Alginate de sodium, ($C_6H_7NaO_6$), 99%,
- 4-Aminoantypiryne, $C_{11}H_{13}N_3O$, 98%,
- Chlorure de calcium, $CaCl_2$, 99,5%,
- Ferricyanure de potassium, $K_3Fe(CN)_6$, 99%,
- Hydroxyde de potassium, KOH, 85%,
- 2-Nitrophénol, $C_6H_5NO_3$, 98%,
- Phénol, C_6H_6, 99 %,

- Peroxyde d'hydrogène, H_2O_2, 10%,
- Phosphate monopotassique, KH_2PO_4, 98%,
- Phosphate de sodium disoudique, Na_2HPO_4, 98%,
- Sulfate ferreux, $FeSO_4$, 85%,

II.2..Préparations des échantillons

Le 2 Nitrophénol utilisé est fourni par Aldrich, sa pureté est de 98 %. C'est un composé aromatique. Il a été choisi comme polluant organique modèle conserve une structure relativement simple.

Les solutions de 2-Nitrophénol modèles sont préparées en dissolvant le 2-Nitrophénol correspondant avec l'eau distillé. Elles avaient des concentrations comprises entre 20 et 120 mg/l. Elles sont conservées à l'obscurité afin de les protéger de la lumière.

II.3.Préparation des solutions tampons

Les solutions tampons sont été préparées par dissolution des réactifs appropriés dans l'eau distillée sous agitation magnétique.
Les solutions tampons utilisées sont :

- Solution tampon pH 3,0 préparée par Phosphate de sodium disoudique 0,5M et Acide citrique 0,5M.
- Solution tampon pH 7,0 préparée par phosphate monopotassique (0,01M).

En ajustant les solutions en utilisant la solution de KOH (0,2N) et HCl (0,2 N),
Le pH de solution a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre de type « HANNA instrument » équipé d'une électrode de verre combiné. Le pH-mètre a été étalonné avec des solutions tampons standards (pH = 3) et (pH=7).

II.4. La courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol

La concentration du 2-Nitrophénol est déterminée par la courbe d'étalonnage à pH=7 à partir des concentrations de 2-Nitrophénol entre 20 et 120 mg/l avec un pas de 20 mg/l.
Méthode du dosage :

- ✓ Prendre 2.4 ml de solution du 2-Nitrophénol de concentration entre 20-140 mg/l, y ajouter 0.3ml de 4-aminoantipyrine (20.8mM) et 0.3ml de Ferricyanure de potassium (83.4mM) ;

- ✓ Compléter le volume jusqu'à trait jauger par une solution tampon pH=7 pour déterminer les densités optiques des solutions du 2-Nitrophénol à λmax = 527 nm, nous avons utilisé le spectrophotomètre UV-visible.

Les valeurs de DO initiales et finales sont utilisées pour calculer le rendement de dégradation du 2-Nitrophénol selon la relation suivante :

$$R\% = (DO_{initial} - DO_{final})/DO_{initial} \qquad (Eq.II.1)$$

Tel que :

R (%) : le rendement de dégradation de 2-Nitrophénol,

$DO_{initial}$: densité optique initial de dégradation de 2-Nitrophénol

DO_{final} : densité optique final de dégradation de 2-Nitrophénol.

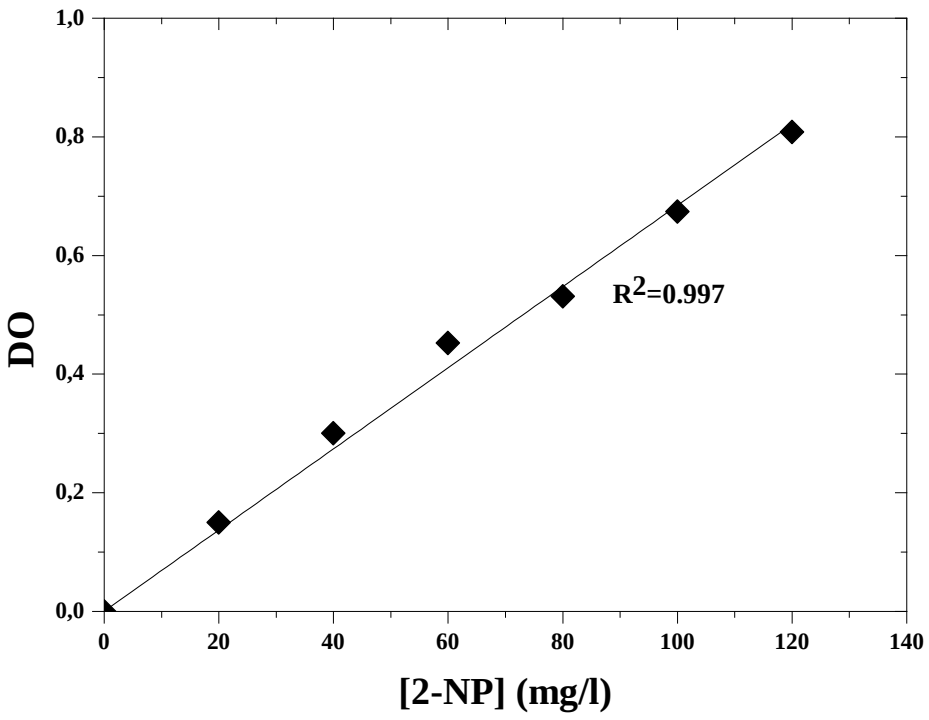


Figure. II.1. Courbe d'étalonnage de 2-Nitrophénol. (λmax = 527 nm)

II.5. Méthode d'extraction et purification de peroxydase de navet blanc

La procédure d'extraction et de la purification de la peroxydase de navet blanc est comme suivant :

- Mettre 500 g de navet dans un mixeur après l'avoir éplucher avec 1000 ml de l'eau distillée. Filtrer avec la gaze, on obtient un extrait brut extrêmement efficace qui peut être dilué avant utilisation.
- Placer un erlenmeyer contenant 500 mL de l'extrait brut et un bécher contenant 500 mL de l'acétone au congélateur. Préparer de la glace pilée dans un cristallisoir
- Après 15min au congélateur, faire sortir l'extrait brut et le disposer sous l'agitation dans la glace pilée puis verser de l'acétone sortie du congélateur dans l'extrait brut, goutte à goutte.
- Laisser le mélange (l'extrait brut-l'acétone) dans le frigo (4°C) pendant 2 heures ; il se forme un précipité pour le récupérer, centrifuger à 3000 rpm pendant 15min.
- Dissoudre le culot dans 25 ml de tampon pH=7, la solution obtenue est de l'extrait enzymatique partiellement purifiée (EEPP).
- Répartir la solution en aliquotes dans des tubes à hémolyse et les placer au congélateur (4C°). *(Azizi et al.2014).*



1-Prendre 500 g de navet après avoir les éplucher.



2-Le navet pesé et coupé en petits morceaux.



3-Broyage des morceaux du navet dans un mixeur avec 1000 ml d'eau distillé.



4-Filtration de mélange obtenu avec une gaze.



5-obtention d'un extrait enzymatique brut (EBB) conservé à basse température.



6-Addition de l'acétone à l'extrait brute.



7-Après 2heurs dans le réfrigérateur : Il se forme un précipité.



8-Centrifugation du mélange.



9-Dissolution de culot dans 25ml de tampon pH 7.0 : (EEPP).

Figure II.2. Protocole d'extraction et de purification de la peroxydase.

II.5.1. Mesure d'activité enzymatique d'enzyme libre

Les peroxydases catalysent l'oxydation de nombreux substrats aux dépens de H_2O_2 selon l'équation totale :

$$2\ H_2O_2 + \text{phénol} + \text{4-Aminoantipyrine} \rightarrow \text{Quinoneimine} + 4H_2O \qquad (Eq.II.2)$$

La réaction s'effectue entre un substrat (phénol), sous substrat H_2O_2 et 4-AAP qui joue le rôle d'un chromogène. Le changement de la couleur au cours de la réaction (Eq II.2) est converti à l'activité enzymatique de la biodégradation du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme. Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme en micromole du peroxyde d'hydrogène par minute à 25 C°.

Méthode du dosage

Dans une fiole de 50 ml introduire :

- 1 ml de phénol, 0.1M ;
- 1 ml de H_2O_2, 0.1M ;
- 1 ml de 4-aminoantipiryne (0.01M).

Compléter le volume jusqu'à trait jauger par une solution tampon pH=7 (phosphate monopotassique, 0.01M).

- Placer 4 ml de mélange précédemment dans un tube à essai.
- Ajouter 0.2 ml de l'EEPP ou de l'EEB, agiter par retournement entre le pouce et l'index.
- Placer rapidement le mélange réactionnel dans la cuve de spectrophotométrie.
- Lancer la cinétique par mesure de la densité optique avec un pas de 10 seconds.
- On mesure l'activité enzymatique de la peroxydase par la consommation de peroxyde d'hydrogène à 517 nm.

Tracer l'allure DO = f (temps) qui a la pente égal à $\Delta DO/\Delta t$

La formule pour calculer l'activité enzymatique est :

$$AE(U/ml) = \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times \frac{V_r}{V_e} \times \frac{1000}{7425}. \qquad (Eq.II.3)$$

Avec :

V_e : Volume de l'extrait enzymatique, 0.2ml

V_r : Volume réactionnel, 4.2mL

II.5.2. Méthode d'immobilisation de la peroxydase

- Dans un bécher, dissoudre 0,15 g d'alginate de sodium dans 10 mL de la peroxydase partiellement purifiée sous forme libre.
- Laisser le mélange peroxydase et alginate de sodium sous l'agitation pendant 1- 1,5 heure jusqu'à l'obtention d'un mélange visqueux homogène.
- Laisser le mélange repose 20 min pour éviter les bulles d'air qui peuvent causer la flottation des billes à la surface de la solution de $CaCl_2$ (Garder la solution de $CaCl_2$ dans le réfrigérateur avant faire l'encapsulation de l'EEPP par l'alginate de sodium).
- Préparer les billes de la peroxydase immobilisée, en faisant verser le mélange obtenu goutte à goutte à l'aide d'une seringue, dans un 50 ml de solution de $CaCl_2$ de concentration de 0,05 M sous l'agitation.
- Laisser les billes sous l'agitation dans la solution de $CaCl_2$ pendant 1 heure.
- Rincer les billes avec l'eau distillée et les conserver dans une solution tampon de pH=7 dans un réfrigérateur de température 4C°. *(Azizi et al.2014).*



1-Pesée 0 ,15 g de l'alginate de sodium.



2-Mettre 10 ml de l'enzyme.



3- Laisser le mélange sous l'agitation pendant 1- heure.



4-Préparation des billes dans une solution $CaCl_2$.



5-Conservation des billes dans une solution tampon pH 7.

Figure II.3. Protocole d'immobilisation de la peroxydase dans l'alginate de sodium.

II.6. Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol

II.6.1. Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol par le procédé Fenton

La réaction se déroule dans un réacteur batch fermé sous les conditions optimales suivantes **:** pH=3, température 40 C°, avec 1 ml de 2-Nitrophénol (100 mg/l) ; 1 ml H_2O_2 (9 mM) ; 1 ml de $FeSO_4$ (320 mg/L et de 5 mg/L).

II.6.2. Cinétique de dégradation du 2-Nitrophénol par la peroxydase libre et immobilisée

Les expériences effectuées dans un réacteur batch fermé sous une température de 40 °C, pH=7. Chaque réacteur comporte 0.2 ml de l'enzyme libre(ou 20 billes de l'enzyme immobilisé) de concentration 7 U /ml, y ajouter 2.8 ml de solution tampon pH=7, 1ml de peroxyde d'hydrogène de concentration 24 mM (13 mM pour l'enzyme immobilisé) et 1ml du 2-Nitrophénol de concentration 80mg/l pour l'enzyme libre et 45 mg L^{-1} pour l'enzyme immobilisée.

II.6.3.Méthode de couplage Fenton et la peroxydase

Le 2-Nitrophénol a été prétraité par le procédé Fenton suivi par la peroxydase libre ou immobilisée suivants la cinétique d'élimination de 2-Nitrophénol par l'enzyme libre ou immobilisée. Le point de couplage ciblé vis-à-vis la concentration finale de 2-Nitrophénol en sort de l'étape de prétraitement. Le passage de procédé fenton au procédés enzymatiques initié par la neutralisation de milieu, ajustement de la concentration de peroxyde d'hydrogène et l'ajout de l'enzyme.

Le couplage des deux procédés peut être la solution. Quatre probabilité de couplage peut être réalisée qui seront testé par la suite :

(1) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase immobilisée,

(2) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase libre,

(3) : Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase immobilisée,

(4) : Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase libre. (Voir le tableau II.1).

Tableau II.1. Les conditions optimales de couplage

	(1)	(2)	(3)	(4)
pH	3	3	3	3
[$FeSO_4$] (mg/l)	320	320	5	5
[H_2O_2] (mg/l)	9	9	9	9
[2-Np] (mg/l)	100	100	100	100
Température °C	40	40	40	40
Le point de coulage (min)	40	75	180	180
[KOH] (mg/l)	0,1	0,1	0,4	0,4
[H_2O_2] (mg/l)	35.04	19.22	36.48	20.04
V_e	-------	0,2	-------	0,2
NB	20	-------	20	-------
[Enzyme] (U/ml)	7	7	7	7
Le volume (ml)	7,1	7,3	7,4	7,6

Chapitre III :

RESULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE III. RESULTATS & DISCUSSION

Ce chapitre rassemble les résultats avec leurs discussions ou il a subdivisé en trois grande sous titres : dégradation de 2-Nitrophénol par le procédé fenton, la dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase libre et immobilisée et la dégradation de 2-Nitrophénol par quatre procédés couplés. L'excusions des réactions de chaque procédé seul ont été effectué sous des conditions optimales trouvés dans des travails ultérieurs.

III.1. Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé Fenton

Le 2-Nitrophénol à éliminer par oxydation en utilisant deux procédés d'oxydation : réaction Fenton et l'enzyme comme indiqué par la suite :

III.1.1.Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton

La réaction fenton a été réalisé soit dans les conditions optimales avec [$FeSO_4$]=320 mg/L, soit avec une [$FeSO_4$]= 5 mg/L afin de suivre les règles environnementales. La variation de rendement d'élimination de 2-Nitrophénol dans les deux conditions représentées dans les figures suivante :

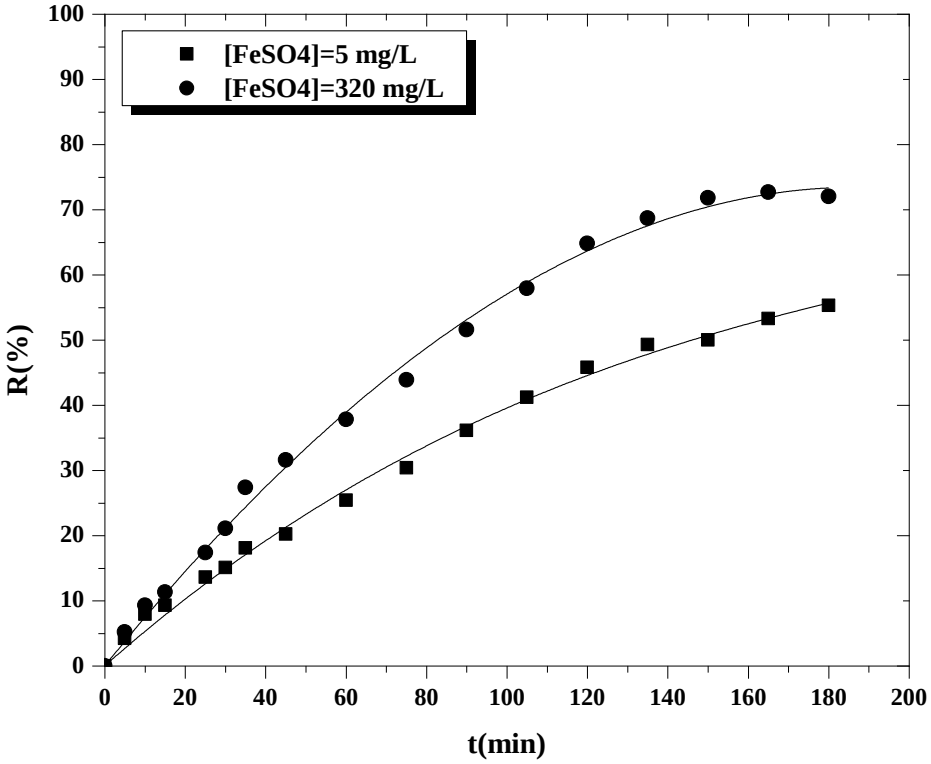


Figure.III.1. Rendement de dégradation du 2-Nitrophénol par le procédé Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2] $_0$**= 9 mM, **[2-Np] $_0$**=100 mg/L, **Temps de contact maximal**=180 min.

La dégradation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton a été effectuée pour deux concentrations différentes en sulfates de fer 5 et 320 mg/ L qui donne des rendements 55,3 et 72 % respectivement comme indique la figure III.1.

III.1.2.Ordre de la cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton

La cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par les radicaux libres est en principe d'ordre =2 :

1 pour la concentration de 2-Nitrophénol et 1 pour la concentration d'OH•.

La vitesse de disparition de 2-Nitrophénol s'écrit par la relation (III.1) :

$$\frac{-d[2-NP]}{dt} = k.\,[2\text{-NP}].\,[OH^{\bullet}] \qquad \textit{(Eq. III.1)}$$

Où k est la constante de vitesse.
L'étape qui s'exprime par l'équation :

$$Fe\ (II) + H_2O_2 \rightarrow Fe\ (III) + HO^- + OH^{\bullet} \qquad (Eq.III.2)$$

Génère des radicaux libres, au même temps, se déroule très lentement ce qui vérifie que ces radicaux libres sont formés lentement et consommés rapidement .Cette information permet de considérer [OH·] ≈ constante, donc l'équation *(Eq.III.1)* s'écrit :

$$\frac{-d[2-NP]}{dt} = k_{app}.\ [2\text{-}NP] \qquad (Eq.III.3)$$

Où $K_{app} = k.\ [OH^{\bullet}]$. La dernière formule confirme que la réaction est de pseudo-premier ordre.
L'intégration d'équation *(Eq.III.3)* conduit à :

$$-\mathrm{Ln}\frac{[2-\mathrm{NP}]t}{[2-\mathrm{NP}]0} = k_{app}.t \qquad (Eq.III.4)$$

Cette équation donc permettre de vérifier si la réaction d'oxydation Fenton de 2-Nitrophénol dans notre expériences obéi au cinétique pseudo-premier ordre et comme on peut tracé l'allure exponentiel $\frac{[2-\mathrm{NP}]t}{[2-\mathrm{NP}]0} = f(exp(-K_{app}))$. Les deux présentations graphiques permettant de réduire le K_{app} (voir les figures III.3 et III.5).

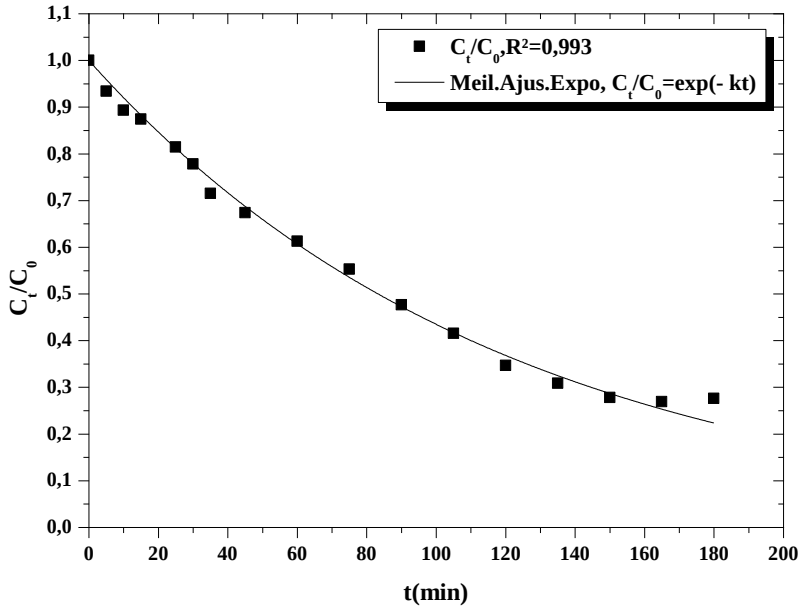


Figure III.2. Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2]$_0$**= 9 mM, **[$FeSO_4$]$_0$**=320 mg/l, **[2-Np]$_0$**=100 mg/l.

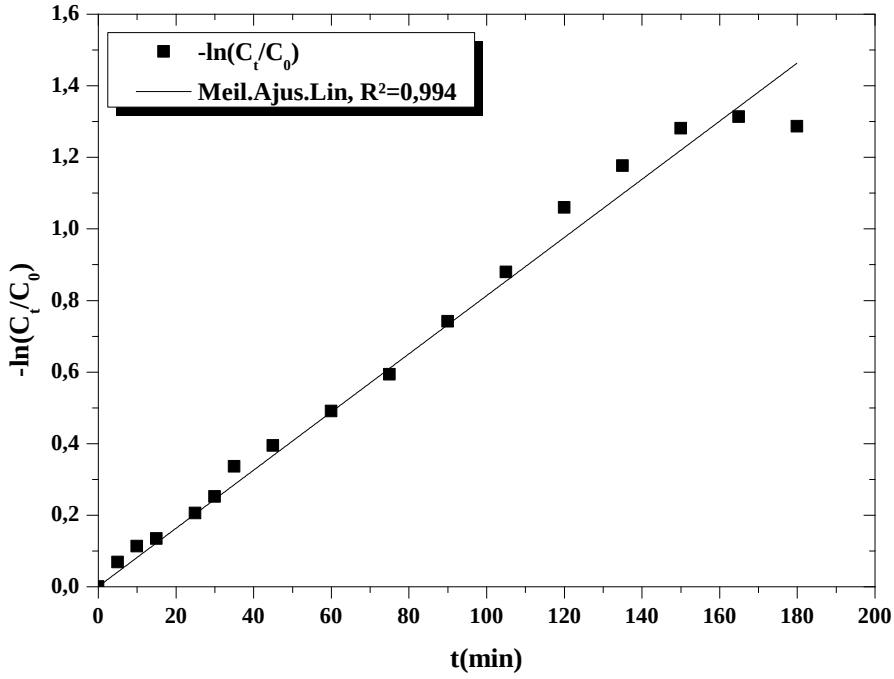


Figure .III.3. Application du modèle cinétique pseudo-premier ordre d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2]$_0$**= 9 mM, **[$FeSO_4$]$_0$**=320 mg/l, **[2-Np]$_0$**=100 mg/l.

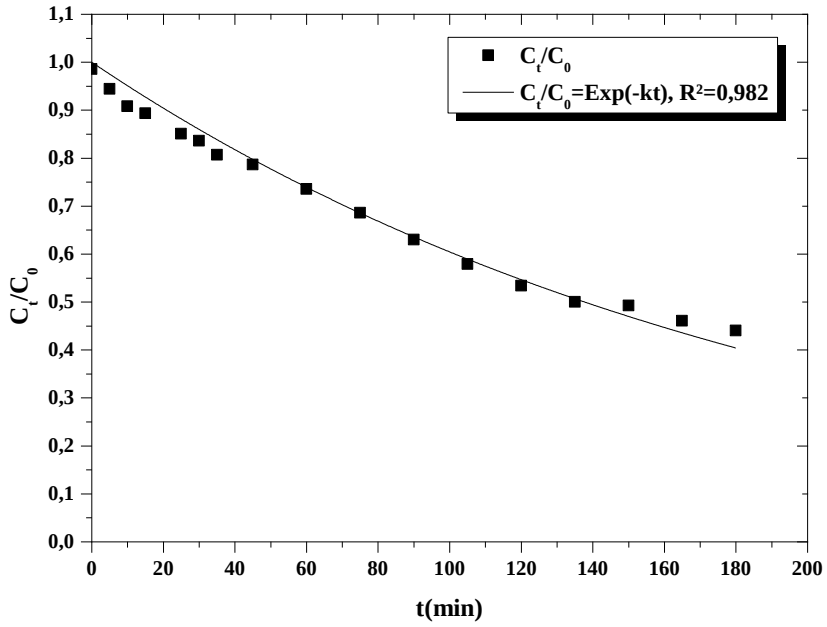


Figure.III.4. Cinétique d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2] $_0$**= 9 mM, **[$FeSO_4$]$_0$**=5 mg/l, **[2-Np]$_0$**=100 mg/l.

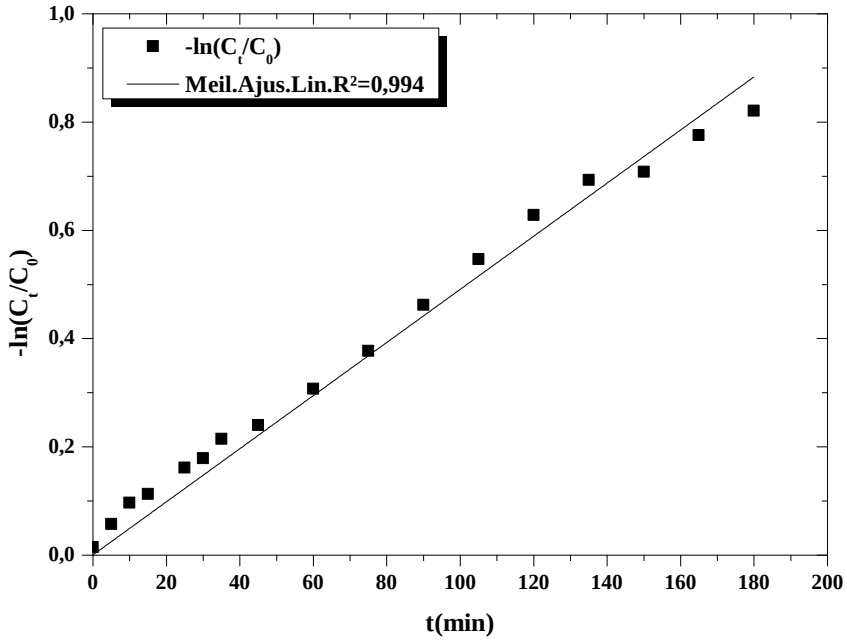


Figure .III.5. Application du modèle cinétique pseudo-premier ordre d'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton, **T**=40 °C, **pH**= 3, **[H_2O_2] $_0$**= 9 mM, **[$FeSO_4$]$_0$**=5 mg/l, **[2-Np]$_0$**=100 mg/l.

D'après les figures III.2 et III.4 la réaction l'oxydation Fenton de 2-Nitrophénol est suivi le modèle cinétique pseudo-premier ordre avec des coefficients de corrélations atteints 0.99 avec des constantes de vitesse de 0,0083 et 0,0050 s^{-1} pour les deux conditions expérimentales ([FeSO4]= 320 et 5 mg/L) respectivement.
Donc, vis-à-vis les résultats obtenus la réduction de la concentration de sulfate de fer a été augmenté la vitesse d'oxydation de 2-Nitrophénol et en même temps réduire le rendement.

III.1.3.Suivi de l'oxydation de 2-Nitrophénol par le procédé Fenton

L'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton génère à la fin des produits toxiques au substrat lui-même comme le benzoquinone, l'hydroquinone et le catéchol. Par conséquent, cette méthode de traitement présente un inconvénient qui peut être éliminé avec l'addition d'autre réaction (voir la figure III.6).

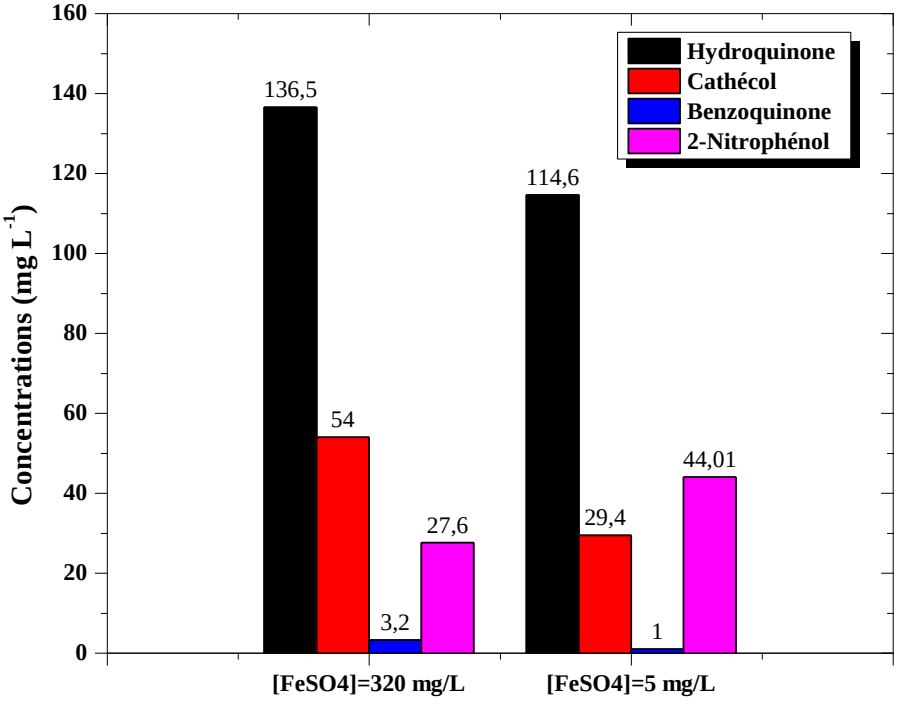


Figure.III.6. Produits final de réaction Fenton lors de l'oxydation de 2-Nitrophénol.

Comme indique la figure III.6, l'oxydation de 2-Nitrophénol par la réaction Fenton généré l'hydroquinone, catéchol et le benzoquinone. Ces produits toxiques apparaître

avec des concentrations de l'ordre de milligramme par litre (entre 1 et 136 mg L^{-1}) et en même temps l'oxydation de 2-Nitrophénol n'a été pas totale tel que les concentrations restantes de 2-Nitrophénol ont été 27 et 44 mg L^{-1} avec les concentrations de sulfates de fer utilisés sont 320 et 5 mg L^{-1} respectivement.

III.2.Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé enzymatique

La peroxydase a été extrait puis partiellement purifié par l'acétone afin d'obtenir une activité souhaitable de l'ordre de 7 unités/mL. Une étape de dilution est probable pour ciblé cette valeur. L'enzyme a été utilisé dans notre expérience devrait être de deux forme libre et immobilisée par l'alginate de sodium. Le raison de choix de ces deux types est d'avoir le meilleur choix puisque chaque forme d'enzyme comporte des avantages et des inconvénients. Pour avoir le meilleur choix des expériences ont été effectué dans des conditions optimales pour éliminer le 2-Nitrophénol par l'enzyme libre et immobilisée (voir les figures III.7 et III.8).

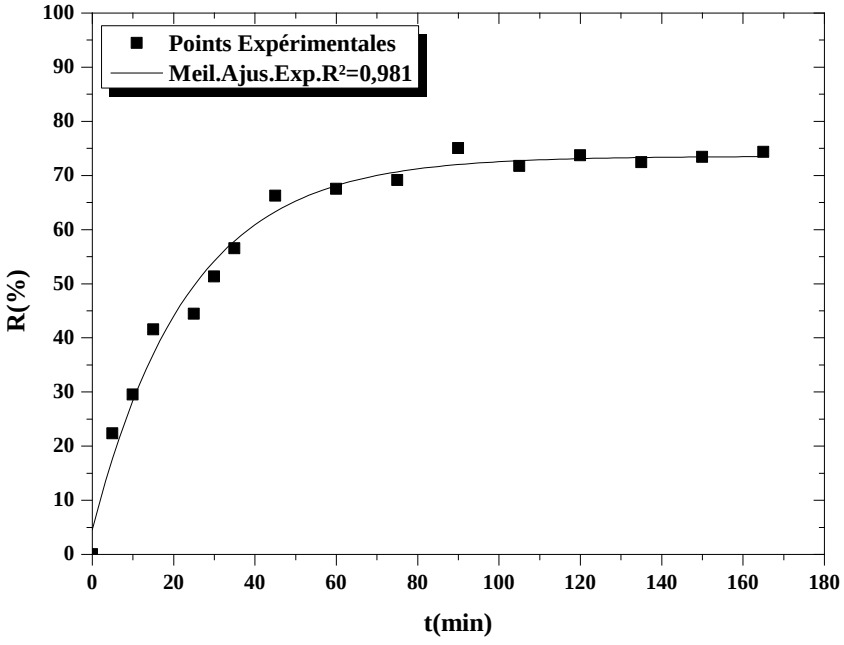


Figure.III.7. Variation de rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase immobilisée, **T**=40 °C, **pH**= 7, **$[H_2O_2]_0$**=13 mM, **$[Enzyme]_0$**= 7 U/ml, **NB**=*20 billes,* **$[2\text{-}Np]_0$**=45 mg/L, **Temps de contact maximal**=165 min.

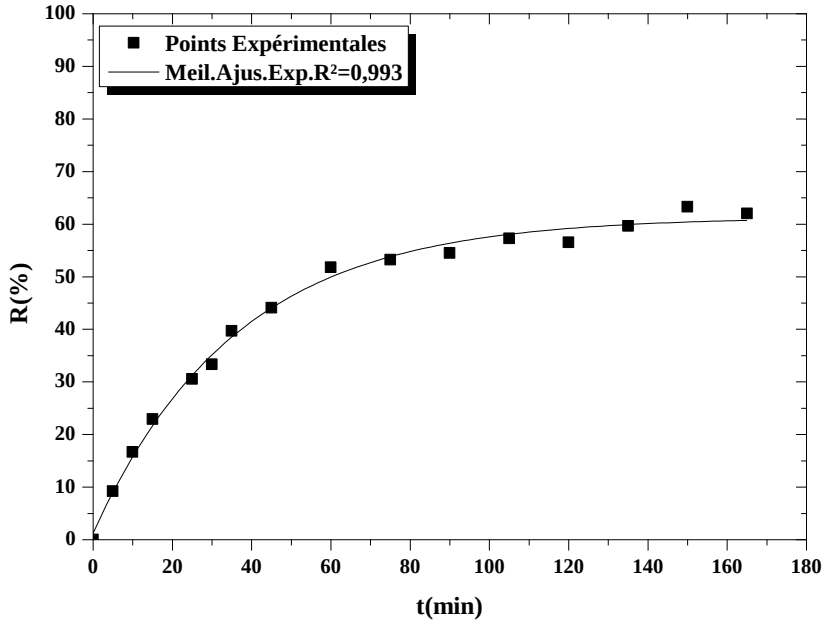


Figure.III.8. Variation de rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par la peroxydase libre, **T**=40 °C, **pH**= 7, **$[H_2O_2]_0$**=24 mM, **$[Enzyme]_0$**= 7 U/ml,**$[2\text{-}Np]_0$**=80 mg/L, **Temps de contact maximal**=165 min.

D'après les figures III.7 et III.8 cités au paravent, le rendement de dégradation de 2-Nitrophénol par l'enzyme immobilisée et libre a été le 74 et 62% tel que les expériences ont été réalisés dans conditions optimales ou la concentration de 2-Nitrophénol traité par l'enzyme libre (80 mg L^{-1}) est presque deux fois qu'il traité par l'enzyme immobilisée.

III.3.Dégradation de 2-Nitrophénol par procédé couplé Fenton/peroxydase

Notre objectif est d'aboutir un procédé intégrale en terme de rendement maximale (100 %), un temps de traitement minimale avec des produits finale de traitement propres pour l'environnement. Le couplage des deux procédés peut être la solution. Quatre probabilité de couplage peut être réalisée qui seront testé par la suite :

(1) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase immobilisée,
(2) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase libre,
(3) : Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase immobilisée,
(4) : Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase libre.

L'étape de prétraitement de chaque procédés précédentes ont été effectué par la réaction Fenton pendant : 40, 75, 180 et 180 minutes respectivement suivi par une étape de traitement pendant 165 minutes pour chaque procédé avec la peroxydase.
Les rendements maximales ont été atteint 97, 94, 74 et 69% par les procédé couplés précédentes pendant les temps suivantes : 105(1H 25min), 120(2H), 245(≈4H) et 245(≈4H) minutes respectivement (voir le tableau III.1).

Tableau III.1. Suivi des produits générés aux cours de traitement de 2-Nitrophénol par les quatre procédés couplés.

			(1)	(2)	(3)	(4)	$C_{critiques}$ (mg/L)
Hydroquinone	**Fenton**	C(mg/L)	136,5	136,5	114,6	114,6	0.1 OJAR. 2006
	Couplage	C(mg/L)	102,3	114,2	96,3	107,2	
	R (%)	---	25,072	16,361	16,007	6,451	
Catéchol	**Fenton**	C(mg/L)	54,0	54,0	29,4	29,4	---
	Couplage	C(mg/L)	28,1	42,3	21,1	23,2	
	R (%)	---	48,04	21,68	28,13	21,09	
Benzoquinone	**Fenton**	C(mg/L)	3,2	3,2	1,0	1,0	<3 (OHS 2009)
	Couplage	C(mg/L)	3,8	3,8	1,1	1,1	
	R (%)	---	---	---	---	---	
2-Np	**Fenton**	C(mg/L)	98,5	98,5	98,5	98,5	0,1 mg/L (IRIS 2002)
	Couplage	C(mg/L)	2,9	5,8	25,7	30,7	
	R (%)	---	97,03	94,07	73,89	68,84	

Donc d'après le tableau III.1, le procédé couplé (1) : Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase immobilisée présente une performance élevée par apport de chaque procédé seul et par apport aux autre procédé couplé en terme de rendement et le temps de traitement. Il reste juste de vérifié la présence et la concentration des produits toxiques générés par la réaction Fenton qui ils peuvent être oxydés par la peroxydase sauf le benzoquinone (ce n'est le substrat de la peroxydase). Ce dernier produits peut été généré par les deux procédés Fenton et la peroxydase qu'il doive être éliminé par des autres procédés appropriés (voir la figure III.9).

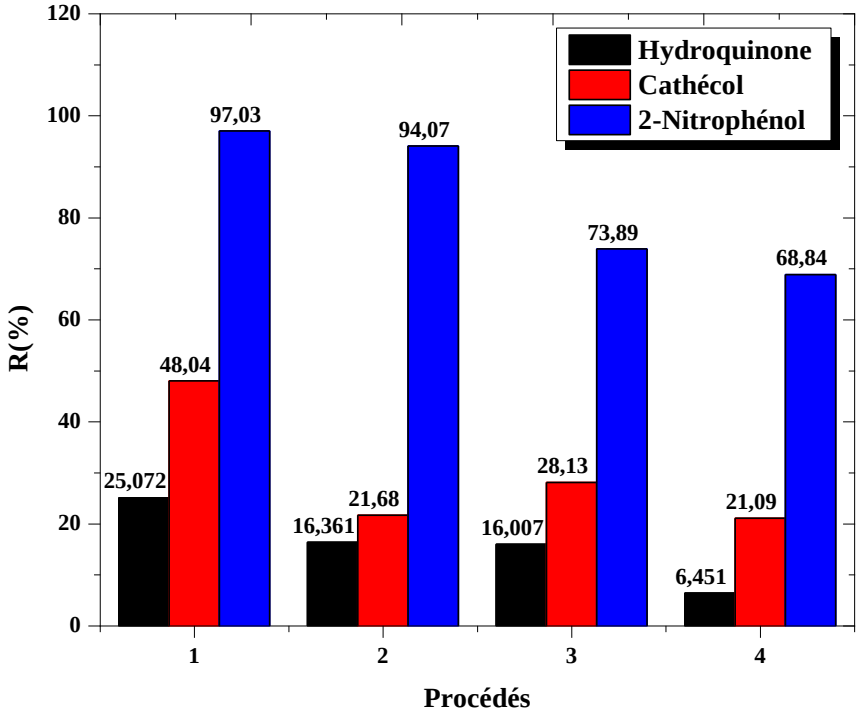


Figure.III.9. Performance de quatre procédé de couplés Fenton-Peroxydase.**1 :** Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase immobilisée, **2 :** Fenton ([FeSO4]= 320 mg/l)/Peroxydase libre, **3 :** Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase immobilisée, **4 :** Fenton ([FeSO4]=5 mg/l)/Peroxydase libre.

D'après le tableau III.1 et la figure III.9, le procédé couplé (1) reste le meilleur procédé en terme de rendement d'élimination des produits toxiques générés hydroquinone, catéchol et le 2-Nitrophénol qui atteints 25, 48 et 97% respectivement.

III.3.1.Validation des procédés couplés en terme de MES et DBO5

Des autres tests de contrôle de qualités ont été réalisé comme le MES et le DBO_5, les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III .2. Qualités de l'eau traitée par les quatre procédés

	(1)	(2)	(3)	(4)	Normes	Réfs
MES (mg/L)	493,8	468,7	37,7	3	40	*OJAR. 2006*
DBO5(mg/L)	10	20	20	30	40	*OJAR. 2006*
pH	7	7	7	7	7	*OJAR. 2006*
[Fer] (mg/L)	320	320	5	5	5	*OJAR. 2006*

D’après le tableau III.2, Le procédé couplé (1) comporte une concentration élevé en matière en suspension qui correspondant quantité de fer utilisée (320 mg/L), et un DBO5 inférieur à la valeur critique. Donc le procédé 1 reste le meilleur permet les autres procédés.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le 2-Nitrophénol aqueux a été traité par deux procédés chimique et enzymatique. Les deux procédés ont été réalisés dans les conditions optimales trouvés dans des travaux antérieurs. La dégradation de ce polluant par le procédé Fenton a été effectuée pour deux concentrations de sulfates de fer 5 et 320 mg/L qui donne des rendements 55 et 72% pour un temps de traitement égale 180 minutes respectivement. Ce procédé a été génère des produits toxiques comme l'hydroquinone, catéchol et le Benzoquinone.

Le 2-Nitrophénol a été traité aussi par deux formes de peroxydase : libre et immobilisée. Les rendements trouvés par ces deux formes sont 63 et 73% pour un temps de traitements égale 150 minutes respectivement.

Le couplage des deux procédés a été initié par le procédé Fenton et suivi par le procédé enzymatique afin d'éliminer les produits toxique généré par le procédé fenton et au même temps d'augmenter le taux d'élimination de 2-Nitrophénol.

Quatre probabilité de couplage entre les deux procédés ont été évalué : procédé Fenton ([$FeSO_4$]= 320mg L^{-1}) –Peroxydase libre ou immobilisée et procédé Fenton ([$FeSO_4$]= 5 mg L^{-1}) –Peroxydase libre ou immobilisée.

La validation de quatre procédé a été effectué suivant la concentration de produits toxiques : 2-Nitrophénol, hydroquinone, catéchol et le benzoquinone, les valeurs de DBO_5 et l'MES. Le procédé couplé le plus performant a été Fenton (320 mg L^{-1}) et l'enzyme immobilisée tel que le rendement d'élimination de 2-Nitrophénol a été attient 97% pendant 105 minutes de traitement. Les concentrations finales de l'hydroquinone, catéchol et le benzoquinone ont été 102,3 , 28,1 et 3,8 mg/L respectivement avec un DBO_5= 10 mg/L et un MES= 493,8 mg/L sous une température= 40°C et un pH=7.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Akhtar. S,and Husain .Q. Potential applications of immobilized bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. Chemosphere 65: 1228-1235. 2006.

2. Albinet. C.T, Boucard.G, Bouquet.C.A, & Audiffren.M. Increased heart rate variability and executive performance after aerobic training in the elderly. European Journal of Applied Physiology. 109(4), 617-624.2010

3. Ashraf .H,and Husain. Q .Use of DEAE cellulose adsorbed and crosslinked white radish (Raphanus sativus) peroxidase for the removal of alpha-naphthol in batch and continuous process. International biodeterioration and biodegradation 64:27-31. 2010.

4. Faust .B.C, Zepp .R.G. Photochemistry of aqueous iron(III)-polycarboxylate complexes: roles in the chemistry of atmospheric and surface waters; Environ. Sci. Technol., 27, 1993, 2517-2522.

5. Belloli. R, Barletta.B, Bolzacchini. E, Meinardi.S, Orlandi. M, Rindone. B. Determination of toxic nitrophenols in the atmosphere by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 846, 277–281. 1999.

6. Beltran.F J,V.Gomez-Serrano and A.Duran.1992.

7. Bratkovskaja .I, Vidziunaite R., Kulys J. Oxidation of phenolic compounds by peroxidase in the presence of soluble polymers. Biochemistry (Moscow) 69:985–992. 2004.

8. Busc .G, Berardinell. S, Resini. C, Arrighi. L, 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. Journal of Hazardous Materials 160, 265-288.

9. Walling .C. J.. Intermediates in the reaction of Fenton type reagents, Acc. Chem. Res, 1998, 31, 155-157.

10. Caza. N, Bewtra J.K., Biswas N. and Taylor K.E. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. Water Research 33: 3012-3018. 1999.

11. Colonna .S, Gaggero N., Richelmi C. and Pasta P. Recentbio technological developments in the use of peroxidise. TIBTECH. 17:163-168. 1999.

12. Delannoy .E, Marmey P., Pennel C. and Nicole M. Les peroxydases végétales de classe III. Acta botanicagallica 151: 353-380. 2004.

13. Dunford H.B. Heme peroxidases. Wiley-VCH (H: Brian Dunford Ed.), New York. 507 pages. 1999.

14. F. Haber, J.J. Weiss. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts; proceeding of the Royal Society London, 147, 1934, 332-351.

15. Flotron .V. La réaction de Fenton comme procédé de réhabilitation dans le traitement des eaux : application à la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux et les boues résiduaires. Thèse de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon. 2004.

16. Geissler. A, Scholer, H.F. Gaschromato graphic determination of phenol, methylphenols, chlorophenols, nitrophenols and nitroquinones in water. Water Research 28, 2047–2053. 1994.

17. Gernjak. W, Fuerhacker M., Fernández-Ibañez P., Blanco J., Malato S. Solar photo-Fenton treatment - Process parameters and process control. Appl. Catal. B 64: 121-130. 2006.

18.**GuidoBusca,SilviaBerardinelli, CarloResini, Laura Arrighi** .Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments Materials, Volume, 30 December 2008, Pages 265–288.

19.Haddou M. Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène: procédés Fenton, photo-Fenton et photocatalyse. Thèse de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. 2010.

20.Henriksen,.A., Welinder K.G. and Gajhede M. Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9-A resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH. Journal of Biological Chemistry 273: 2241-2248. 1998.

21.Herterich. R. Gas chromatographic determination of nitrophenols in atmospheric liquid water and airborne particulates. Journal of Chromatography 549, 313–324. 1991.

22. Pignatello .J. J. Pignatello, E. Oliveros, A. MacKay. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry, Crit. Rev. Envi. Sci. Technol. 36, 2006, 1-84; Erratum, 37, 2007, 273-275.

23. Staehelin. J ,and Hoigné. J. Decomposition of ozone in water: rate of initiation by hydroxide ion and hydrogen peroxide, Environ. Sci. And Techn., 16, 1982, 676-680.

24.Kawamura.K, Kaplan, I.R. Biogenic and anthropogenic organic compounds in rain and snow samples collected in southern California. Atmospheric Environment 20, 115–124. 1986.

25.Khamaruddin P.F., Bustam M.A., Omar A.A. Using Fenton's Reagents for the Degradation of Diisopropanolamine: Effect of Temperature and pH. International Conference on Environment and Industrial Innovation IPCBEE 12: 12-17. 2011.

26.Kulik N., Trapido M., Goi A., Veressinina Y., Munter R. Combined chemical treatment of pharmaceutical effluents from medical ointment production. Chemosphere 70: 1525–1531. 2008.

27.Leuenberger, C., Ligocki, M.P., Pankow, J.F. Trace organic compounds in rain. 4. Identities, concentrations, and scavenging mechanisms for phenols in urban air and rain. Environmental Science and Technology 19, 1053–1058. 1985.

28.Mahugo-Santana,C,Sosa-Ferrera,Z,Torres-Padron.E,Juan.Rodriguez. J, S. Molecules, 14, doi:10.3390/molecules14010298, p298-320, 2009.

29.Ouertani M., Giraro P., and Kagan H. B. Selective nitration of phenols catalyzed by lanthanum (III) nitrate. TetrahedronLett. 23, 4315-4318. **.** 1982.

30.Oueslati M.A., Haddad M. et Blake G. Elimination du phénol par deux plantes aquatiques : Juncusfontanesii(Gay) et Lemna minor L. Revue des Sciences de l'eau 4 :555-568. 1998.

31. Aktas.Ö, çeçen. F. Adsorption and cometabolic bioregeneration in activated carbon treatment of 2-nitrophenol, Journal of Hazardous Materials 177 (2010) 956-961.

32.Sarria V., Kenfack S., Guillod O., Pulgarin C. An innovative coupled solar-biological system at field pilot scale for the treatment of biorecalcitrant pollutants. J. Photochem Photobiol. A 159: 89-99. 2003.

33.Smulevich G., Jakopitsch C., Droghetti E. and Obinger C. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). Journal of InorganicBiochemistry 100: 568-585. 2006.

34. Ganz.T, Hepcidin. A key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation, Blood, 102, 2003, 783-788.

35.Tadeusz Urbanski, Pwn-PolishScientific Publishers Warszawa, 1964.

36.Tonegawa M., Dec J. and Bollag J.M. Use of additives to enhance the removal of phenols from water treated with horseradish and hydrogen peroxide. Journal of Environmental Quality 32:1222–1227. 2003.

37.Welinder K.G. Super family of plant, fungal and bacterial peroxidases. Current Opinion in Structural Biology 2: 388-393. 1992.

38.Zhang G. and Nicell J.A. Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide, Water Research 34:1629– 1637. 2000.

Références bibliographiques