الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة يحي فارس بالمدية
Université Yahia Farés de Médéa

كلية التكنولوجيا
Faculté de la Technologie

قسم هندسة الطرائق والبيئة
Département de Génie des Procédés et Environnement

Laboratoire de Biomatériaux et Phénomènes de Transport

Thèse de Doctorat en Sciences

Étudié par : Ahmed AZIZI

Thème

ELIMINATION DU PHÉNOL PAR UN PROCÉDÉ HYBRIDE FENTON/ PEROXYDASE

Soutenu devant le jury :

Fouad KRIKA	MCA, UMSBYJ	**Examinateur**
Hakima CHERIFI	MCA, UYFM	**Examinateur**
Noureddine HADIDI	MCA, UYFM	**Président**
Mahmoud ABOUSEOUD	Professeur, UYFM	**Directeur de thèse**

Année universitaire 2017-2018

ELIMINATION DE PHÉNOL PAR UN PROCÉDÉ HYBRIDE FENTON/ PEROXYDASE

RÉSUMÉ. Un procédé hybride Fenton/Enzyme a été réalisé en deux étapes pour l'élimination du phénol soluble dans l'eau usée synthétique et industrielle. Le procédé a été initié par une étape de prétraitement avec la réaction Fenton suivi par une polymérisation enzymatique.

Une solution de phénol (100 mg L^{-1}) a été traitée en batch par le procédé Fenton pendant une durée de 120 minutes pour une conversion maximale de 59% sous les conditions optimales de pH 3 et de température 40 °C, à des concentrations initiales en $[H_2O_2]$=2,6 mM et $[FeSO_4]$= 5 mg L^{-1}. Cette réaction a généré plusieurs sous-produits tels que les benzène-diols (hydroquinone et catéchol), le benzoquinone, et les acides formique et oxalique. Par la suite, le traitement enzymatique du phénol résiduel, l'hydroquinone et le catéchol, a été effectué sous les conditions optimales par la peroxydase libre (pH=7, T=40 °C, $[H_2O_2]$=24 mM, AE= 7 U mL^{-1}) et immobilisée (pH=7, T=40 °C, $[H_2O_2]$=10.6 mM, AE= 5 U mL^{-1}), pendant des durées de 60 et 165 minutes respectivement. Par le procédé couplé: Fenton/Peroxydase soluble la concentration du phénol résiduel était de 3 mg L^{-1}, alors qu'elle était de l'ordre de 0.33 mg L^{-1} à l'issue du procédé Fenton/Peroxydase immobilisée pour une durée de traitement globale de 4.5 heures. Le benzoquinone généré (16,9 mg L^{-1}) par le procédé couplé Fenton/Peroxydase immobilisée a été éliminé en totalité (99,8%) par précipitation-coagulation par le chitosane (4 g L^{-1}).

Enfin, un effluent pharmaceutique contenant une concentration initiale en phénol de l'ordre de 56 mgL^{-1} a été éliminé en quasi-totalité (99.6%) après 4 heures de traitement par le procédé Fenton/Peroxydase immibilisée. Les valeurs de DBO_5, DCO et indice de phénol ont été réduites de 66.7, 72.7 et 93.4% respectivement. Les concentrations résiduelles des sous-produits de dégradation restants après le traitement du phénol étaient en conformité avec les normes environnementales des rejets industriels.

MOTS-CLÉS. Phénol; Fenton; Enzyme ; Peroxydase; Couplage.

PHENOL REMOVAL BY HYBRID PROCESS FENTON / PEROXIDASE

ABSTRACT. A hybrid process Fenton/Enzyme was carried out in two steps for the removal of phenol in synthetic and industrial wastewater. The process was initiated by a pretreatment step with Fenton reaction followed by enzymatic polymerization.

A concentration of 100 mg L^{-1} of the phenol was pretreated for 120 minutes for a maximum conversion of 59% under optimal conditions of pH 3 and temperature 40 °C and initial concentrations of [H_2O_2]= 2.6 mM and [$FeSO_4$]=5 mg L^{-1}. The reaction generated many by-products such as benzenediols (hydroquinone and catechol), benzoquinone, formic and oxalic acid. Thereafter, enzymatic treatment of residual phenol, hydroquinone and catechol was carried out under optimal conditions with free (pH=7, T= 40 °C, [H_2O_2]=24 mM, AE = 7 U mL^{-1}) and immobilized peroxidase (pH=7, T= 40 °C, [H_2O_2]=10.6 mM, AE= 5 U mL^{-1}) during 60 and 165 minutes respectively. Residual phenol concentrations obtained by the coupled process: Fenton/soluble peroxidase was about 3 mg L^{-1} while with Fenton/ immobilized peroxidase process it was 0.33 mg L^{-1} for an overall process duration of 4.5 hours. The generated benzoquinone (16.9 mg L^{-1}) by the hybrid process Fenton/immobilized peroxidase was completely eliminated (99.8%) by chitosan precipitation-coagulation (4 g L^{-1}).

At last, a pharmaceutical effluent containing a concentration of 56 mg L^{-1} of phenol was completely eliminated (99.6%) after 4 hours by Fenton/immobilized peroxidase process. Values of BOD_5, COD and phenol index were reduced by a percentage of 66.7, 72.7 and 93.4%, respectively. The residual hydroquinone, catechol and benzoquinone after treatment were in agreement with environmental standards.

KEY WORDS. Phenol; Fenton; Enzyme ; Peroxidase; Coupling.

ازالة الفينـــــول بواسطة عملية هــجينـــة فنتون/بيروكسيداز

ملخص. تم إجراء طريقة الهجينة فنتون/البيروكسيداز على مرحلتين لإزالة الفينول في مياه الصرف اصطناعية والصناعية. شرعت العملية بتفاعل فنتون تليها البلمرة الأنزيمية.

محلول من الفينول ذو تركيز 100 مغ/ل تمت معالجته لمدة 120 دقيقة ليكون مردود المعالجة الاقصى 59 % في الشـــروط المثلى (pH= 3 ، درجة الحرارة =40 درجة مئوية)، من أجل تركيز ماء الأوكسجين=2.6 ملمول /ل، الحديدوز 5 مغ/ل) .هذا التفاعل انتج موادا ثانوية مثل هدروكينون، كتكول، حمض النمل و الأكساليك. معالجة الفينول المتبقي، هدروكينون، كتكول تمت في الشروط المثلى بالانزيم الحر بيروكسيداز (pH=3، درجة الحرارة =40 درجة مئوية، النشاط الانزيمي= 7 وحدات/ل، تركيز ماء الأوكسجين=24ميلي مول /ل) ، والانزيم المثبت (pH=3، درجة الحرارة =40 درجة مئوية، النشاط الانزيمي= 5 وحدات /ل، تركيز ماء الأوكسجين=10.6 ميليمول/ل) بعد 60 و 165 دقيقة على الترتيب.

التراكيز المتبقية من الطريقة الهجينة فنتون/بروكسيداز حر 3 مغ/ل والطريقة الهجينة فنتون/بروكسيداز مثبت هي 0.33 مع/ل في زمن قدره 4.5 ساعة. البنزوكينون الناتج (16.9 مع/ل) من طرف الطريقة الهجينة فنتون/بروكسيداز المثبت تمت ازالته كليا (99.8%)بطريقة الترسيب وتخثر بواسطة الكيتوزان (4مغ/ل).

أخيرا، تمت معالجة مياه الصرف الصيدلانية تحتوي على 56 مغ/ل من الفنول تمت ازالتها شبه نهائيا(99,6%) في ظرف 4 ساعات من المعالجة بواسطة عملية فنتون/بروكسيداز مثبت من اجل مردود يقدر ب 99.6%. و كان انخفاض قيم BOD_5 ، COD ومؤشر الفينول كالتالي:66.7، 72.7 و 93.4% على الترتيب. كما كانت تراكيز الهدروكينون، الكاتكول و البنزوكينون المتبقية موافقة للمعايير البيئية.

الكـــلمات الـرئيسيـــة. الفينـول؛ فنتـون؛ الانـزيـم؛ البيروكسيـدانز؛ اقـتران.

Remerciements

Dieu "اللّٰه" merci pour nous avoir donné la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.

Tout d'abord nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à Mr ***Mahmoud ABOUSEOUD*** *notre promoteur de recherche qui n'a jamais cessé de nous prodiguer conseils, pour avoir dirigé ce travail et pour sons aides pendant toute la durée de réalisation de ce travail.*

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux membres ***du jury*** *:*

Mr Noureddine HADIDI, Mme Hakima CHERIFI et Mr Fouad KRIKA d'avoir accepté de juger ce travail.

Notre profond remerciement à Mr Fouad ZOUMBIA, Master-Ingénieur au ***laboratoire*** *physicochimique de complexe Antibiotical (SAIDAL) de Médéa.*

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dr. Ahmed AZIZI

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah "اللـــــــــه", j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:

À la mémoire de mon grand-père,

À mon petit-fils Saif Al Islam.

Dr. Ahmed AZIZI

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES i

ABRÉVIATIONS & NOMENCLAUTRES iv

LISTE DES FIGURES xi

LISTE DES TABLEAUX xiii

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES 4

1.1 PHÉNOL 4
1.1.1 Définition 4
1.1.2 Propriétés physico-chimiques 5
1.1.3 Propriétés chimiques 6
1.1.3.1 Propriétés acido-basiques 6
1.1.3.2 Substitutions électrophiles 6
1.1.3.3 Réaction d'halogénation 8
1.1.3.4 Substitutions électrophiles communes à tous les aromatiques 8
1.1.3.5 Réaction d'amination 9
1.1.4 Utilisation du phénol 9
1.1.5 Sources de pollution par les composés phénoliques 9
1.1.6 Toxicité des composés phénoliques 10
1.1.7 Différentes voies de dégradation des composés phénoliques 11
1.1.7.1 Élimination par voie chimique 11
1.1.7.2 Élimination par procédé physique 12
1.1.7.3 Élimination par voie biologique 12
1.2 ÉLIMINATION DU PHÉNOL PAR LE PROCÉDÉ FENTON 14
1.2.1 Mécanisme d'oxydation du phénol par la réaction Fenton 15
1.2.2 Produits générés lors d'oxydation du phénol par la réaction Fenton 16
1.2.2.1 Catéchol 16
1.2.2.1 Hydroquinone 16
1.2.2.3 Benzoquinone 17
1.2.3 Cinétique de dégradation du phénol par la réaction Fenton 18
1.2.4 Facteurs influençant l'efficacité de la réaction Fenton 19
1.2.4.1 Influence de la concentration du catalyseur (Fe^{2+}) 19
1.2.4.2 Effet de la concentration des réactifs 19
1.2.4.3 Effet de pH 20
1.2.4.4 Effet de la température 20
1.2.5 Les réactions parasites pouvant affecter le réactif de Fenton 21
1.2.6 Inconvénients de la réaction Fenton 22
1.3 TRAITEMENT ENZYMATIQUE DU PHÉNOL 23
1.3.1 La peroxydase 24
1.3.2 Facteurs affectant la médiation de la peroxydase lors de l'élimination des composés phénoliques 25

1.3.2.1 Effet de pH 25
1.3.2.2 Effet de peroxyde d'hydrogène 26
1.3.2.3 Effet de l'ajout d'additifs 27
1.3.2.4 Effet de la force ionique de la solution 28
1.3.2.5 Effet de la température 29
1.3.2.6 Effet de la concentration d'enzyme 29
1.3.3 Cinétique enzymatique 29
1.3.4 Immobilisation des enzymes 30
1.3.4.1 Méthodes d'immobilisation 30
1.3.4.2 Supports d'immobilisation 32
1.3.4.3 Facteurs influençant la performance des enzymes immobilisées 33
1.3.4.4 Choix de la méthode d'immobilisation 34
1.3.4.5 Propriétés des enzymes immobilisées 35
1.3.4.6 Effet de l'immobilisation des enzymes sur la cinétique 35
1.3.4.7 L'alginate de calcium, support de choix 36
1.4 COUPLAGES DE POA AVEC LES TRAITEMENTS BIOLOGIQUES POUR LA DÉCONTAMINATION DES EAUX USÉES 37
1.4.1 Procédés couplés POA/Biologique pour l'élimination du phénol 39
1.4.2 Synergie Fenton/Enzymatique. Intérêt du couplage 42

CHAPITRE 2. PRODUITS, MATERIELS & METHODES 44

2.1. PRODUITS CHIMIQUES 44
2.2. MATÉRIEL ANALYTIQUE 44
2.2.1. Spectrophotométrie UV-visible 44
2.2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance 44
2.2.3. Appareil de mesure de DOB_5 45
2.2.4. Microscope Électronique à Balayage 45
2.2.5. Autres équipements 45
2.3. MÉTHODES ANALYTIQUES 45
2.3.1 Préparations des échantillons 45
2.3.2 Matières En Suspension (MES) 46
2.3.3 Mesure de la matière organique d'une solution 46
2.3.3.1 Demande Chimique en Oxygène (DCO) 46
2.3.3.2 Demande Biochimique en Oxygène (DBO) 46
2.3.4 Mesure de l'activité enzymatique de l'enzyme libre 46
2.3.5 Dosage de protéines totales par la méthode de Bradford 47
2.3.6 Dosage de l'activité enzymatique de l'enzyme immobilisée 47
2.3.7 Dosage du phénol 47
2.3.8 Mesure de l'indice de phénol 48
2.4 PROTOCOLES EXPÉRIMENTALES 48
2.4.1 Source d'enzyme 48
2.4.2 Extraction et purification de peroxydase 48
2.4.3 Inclusion de la peroxydase dans l'alginate de calcium 50
2.4.4 Optimisation de la dégradation du phénol par le procédé Fenton et par l'enzyme peroxydase (libre et immobilisée) 51
2.4.5 Procédés de couplage Fenton-Enzymatique (peroxydase libre /immobilisée) 54

CHAPITRE 3. RESULTATS & DISCUSSION 55

3.1 ÉLIMINATION DU PHÉNOL PAR LE PROCÉDÉ FENTON 55

3.1.1 Effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène 56
3.1.2 Effet de concentration des ions ferreux 56
3.1.3 Effet de temps de contacts 58
3.1.4 Modèle cinétique de la dégradation du phénol par le procédé Fenton 59
3.2 ÉLIMINATION ENZYMATIQUE DU PHÉNOL CATALYSÉE PAR LA PEROXYDASE SOLUBLE 62
3.2.1 Effet de pH 62
3.2.2 Effet de la température 63
3.2.3 Effet de la concentration du phénol 64
3.2.3.1 Relation entre la concentration de phénol la vitesse initiale et le taux de conversion 64
3.2.3.2 Modèle cinétique de dégradation du phénol par la peroxydase soluble 66
3.2.4 Effet de la concentration initial de H_2O_2 68
3.2.5 Effet de l'activité enzymatique 69
3.2 Effet de temps de contacts 69
3.3 ÉLIMINATION ENZYMATIQUE DU PHÉNOL CATALYSÉE PAR LA PEROXYDASE IMMOBILISEE 71
3.3.1 Effet de l'activité enzymatique par bille 71
3.3.2 Effet du pH 71
3.3.3 Effet de l'activité d'enzymatique 72
3.3.4 Effet de la concentration du peroxyde d'hydrogène 73
3.3.4.1 Concentration optimale en peroxyde d'hydrogène 73
3.3.4.2 Cinétique de la dégradation du phénol en fonction de la variation de $[H_2O_2]$ 74
3.3.5 Effet de la concentration de phénol 76
3.3.5.1 Concentration optimale de phénol 76
3.3.5.2 Effet de la concentration du phénol sur la vitesse initiale et le taux de conversion du phénol 77
3.3.5.3 Modèle cinétique de la dégradation du phénol par la peroxydase immobilisé 78
3.3.6 Effet de temps de contacts 80
3.4 COMPARAISON ENTRE LES TROIS PROCÉDÉS: LA PEROXYDASE SOLUBLE, LA PEROXYDASE IMMOBILISÉE ET LE PROCÉDÉ FENTON 81
3.5 ÉLIMINATION DU PHÉNOL PAR COUPLAGE DES PROCÉDÉS FENTON ET ENZYMATIQUE 82
3.5.1 Cinétique d'oxydation du phénol par le procédé Fenton 82
3.5.2 Élimination du benzoquinone par le chitosane 83
3.5.2.1 Caractéristique de chitosane 83
3.5.2.2 Réactions des quinones avec le chitosane 84
3.5.2.3 Effet de concentration du chitosane sur l'élimination du benzoquinone 85
3.5.3 Cinétique d'oxydation des composés phénoliques par le procédé couplé Fenton /Peroxydase immobilisée 86
3.6 APPLICATION DU PROCÉDÉ COUPLÉ FENTON/PEROXYDASE IMMOBILISÉE POUR LE TRAITEMENT D'UN EFFLUENT PHARMACEUTIQUE CONTENANT LE PHÉNOL 89

CONCLUSION GENERALE 91
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 93
ANNEXES
TRAVAUX SCIENTIFIQUES

LISTE DES ABRÉVIATIONS & NOMENCLATURES

Abréviation	***Signification***
4-AAP	4-Aminoantipyrine
A	Absorbance
AE	Activité Enzymatique
AS	Activité Spécifique
DBO_5	Demande Biochimique en Oxygène est mesurée au bout de 5 jours, à 20 °C
DCO	Demande Chimique en oxygène
DO	Densité Optique
E	Enzyme
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié
ETSC	Expertise Toxicologique des Substances Chimiques
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase
IRIS	Institut National de Recherche et de Sécurité
JORA	Journal Officiel de la Republique Algérienne
MES	Matières En Suspension
P	Produit
PNB	Peroxydase de Navet Blanc
R	Rendement
R^2	Coefficient de corrélation
S	Substrat
T	Titre de l'échantillon
UV	Rayonnement Ultraviolet

Nomenclature et Symboles

Lecture	***Désignation***	***Unité***
[ ]	Concentration molaire ou massique	*(mol L^{-1})* ou *(mg L^{-1})*
$[ ]_0$	Concentration initiale molaire ou massique	*(mol L^{-1})* ou *(mg L^{-1})*
AE	Activité Enzymatique	*(U L^{-1})*
A_f	Absorbance final de solution aqueuse	*(-)*
A_i	Absorbance initial de solution aqueuse	*(-)*
AS	Activité Spécifique.	*(U mg^{-1})*
E	Enzyme	*(-)*
k_1, k_2, k_{-1}	Constantes de vitesses	*mn*
K_m	Constante de Michaelis–Menten	*(unité de concentration)*
P	Produit	*(-)*
pH	potentiel d'Hydrogène	*(-)*
pKa	Constante d'acidité	*(-)*
POA	Procédé d'Oxydation Avancée	*(-)*
R	Rendement de dégradation	*(%)*
R^2	Coefficient de corrélation	*(-)*
rpm	rotation par minute	*(tr mn^{-1})*
S	Substrat	*(-)*
T	Température	*(°C)*
v_0	Vitesse initiale	*(mM mn^{-1})*
v_{max}	Vitesse maximale de la réaction enzymatique	*(mg $L^{-1}min^{-1}$)*

Lettres Grecques

Lecture	**Désignation**	**Unité**
ζ	Coefficient d'extinction molaire	$(Lmol^{-1})$
λ	Longueur d'onde	*(nm)*

Indices

Lecture	**Désignation**
0	Initiale
C	Critique
F	Final
I	Initial
M	Michaelis
Max	Maximal
Opt	Optimal
t	totale

LISTE DES FIGURES

Numéros	Titres des figures	Pages
1.1	Phénol	4
1.2	Propriétés acido-basique du phénol	6
1.3	Nitration du phénol	7
1.4	Alkylation de Friedel et Crafts	7
1.5	Halogénation du phénol	8
1.6	Substitutions électrophiles du phénol,	8
1.7	Réaction d'amination du phénol	9
1.8	Biodégradation du phénol par *Thauera aromatica*	14
1.9	Mécanisme d'oxydation du phénol par le réactif de Fenton	16
1.10	Polymérisation enzymatique des composés générés par la réaction Fenton.	23
1.11	Structure 3D de la peroxydase de raifort	24
1.12	Structure moléculaire du site actif dans l'enzyme d'HRP	24
1.13	Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes	32
1.14	Structure de l'alginate de calcium	36
1.15	Stratégie de sélection de procédé de traitement d'eaux usées industrielles toxiques et/ou non-biodégradable	40
2.1	Réaction de dosage colorimétrique du phénol	47
2.2	Procédure d'extraction et de la purification de la peroxydase.	49
2.3	Extrait enzymatique partiellement purifié	49
2.4	Étape d'immobilisation de la peroxydase avec d'alginate de calcium dans une solution de $CaCl_2$	50
2.5	Organigramme de réalisation des essaies de la dégradation de phénol par les procédés individuels Fenton et enzymatique.	53
2.6	Représentation schématique du procédé couplé Fenton/Enzyme pour la dégradation du phénol	54
3.1	Effet de $[H_2O_2]$ sur le rendement de dégradation du phénol par le procédé Fenton	56
3.2	Effet de $[Fe^{2+}]$ sur le rendement de dégradation du phénol par le procédé Fenton	58
3.3	Suivi de dégradation du phénol par le procédé Fenton en fonction du temps	58
3.4	Cinétique d'oxydation du phénol par le procédé de Fenton sous les conditions optimales à différentes concentrations initiales en phénol.	59
3.5	Évolution temporelle du rendement de la dégradation du phénol par le procédé de Fenton sous les conditions optimales à différentes concentrations initiales en phénol.	60
3.6	Cinétique de la dégradation du phénol en fonction du temps de réaction	61
3.7	Rendement de dégradation enzymatique du phénol en fonction du pH par la peroxydase soluble	62
3.8	Rendement de dégradation enzymatique du phénol en fonction de la température par la peroxydase soluble	63
3.9	Rendement de dégradation enzymatique du phénol par la peroxydase soluble en fonction de la concentration initiale de phénol	64
3.10	Évolution temporelle du rendement de la biodégradation du phénol	65
3.11	Représentation graphique de Lineweaver-Burk pour la réaction de dégradation du	66

	phénol par la peroxydase libre	
3.12	Rendement de dégradation enzymatique du phénol par la peroxydase soluble en fonction de rapport [H_2O_2]/[Phénol]	67
3.13	Rendement de dégradation enzymatique du phénol par la peroxydase soluble en fonction de l'activité enzymatique	68
3.14	Cinétique d'oxydation du phénol parla peroxydase soluble sous les conditions optimales	69
3.15	Effet de l'activité enzymatique de l'enzyme libre sur l'activité de l'enzyme immobilisée et sur l'activité perdue.	70
3.16	Influence du pH sur l'élimination du phénol par la PNB immobilisée	71
3.17	Influence de l'activité enzymatique totale sur le rendement d'élimination du phénol par la PNB immobilisée	72
3.18	Effet de la concentration en peroxyde d'hydrogène sur le rendement de la dégradation du phénol par la peroxydase immobilisée	73
3.19	Présentation de la vitesse de la réaction d'oxydation du phénol par la peroxydase immobilisée en fonction de la concentration de H_2O_2	74
3.20	Linéarisation de Lineweaver-Burk de réaction d'oxydation du phénol par la peroxydase immobilisée	75
3.21	Effet de la concentration de phénol sur le rendement de la biodégradation du phénol	76
3.22	Influence de la concentration du phénol sur le rendement et la vitesse initiale de dégradation de phénol par la peroxydase immobilisée	77
3.23	Présentation de Michaelis-Menten	78
3.24	Représentation graphique de Lineweaver-Burk des données cinétiques de la dégradation du phénol par la peroxydase immobilisée	79
3.25	Cinétique de dégradation du phénol par la peroxydase immobilisée	80
3.26	Cinétique de traitement du phénol par le procédé Fenton	81
3.27	Composition final du mélange après traitement par le procédé Fenton	83
3.28	Structure de la molécule de chitosane	83
3.29	Mécanisme réactionnel d'oxydation des composés phénoliques par la tyrosinase en présence de chitosane	84
3.30	Élimination de p-benzoquinone par le chitosane	85
3.31	Cinétique d'oxydation du phénol par la peroxydase incluse dans l'alginate de calcium	86
3.32	Composition du mélange réactionnel traité par le procédé couplé Fenton/Peroxydase immobilisée.	87

LISTE DES TABLEAUX

Numéros	Titre des tableaux	Pages
1.1	Propretés physico-chimiques du phénol	5
1.2	Quelques supports d'immobilisation des enzymes	33
1.3	Facteurs influencent la performance des enzymes immobilisées	34
1.4	Comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation des enzymes	34
2.1	Configuration de l'HPLC	45
2.2	Résultats de la purification partielle de l'EEB	50
2.3	Intervalles d'optimisation des paramètres opératoires de la dégradation du phénol par le procédé Fenton.	52
2.4	Intervalles d'optimisation des paramètres opératoires de la biodégradation du phénol par la peroxydase libre.	52
2.5	Intervalles d'optimisation des paramètres opératoires de la biodégradation du phénol par la peroxydase immobilisée.	52
3.1	Résultats de l'élimination de phénol par la peroxydase soluble, la peroxydase immobilisée et le procédé Fenton.	81
3.2	Caractéristiques physico-chimiques de l'effluent pharmaceutique traité par le procédé couplé Fenton/peroxydase immobilisée.	90

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La production de déchets dangereux provenant des industries est devenue un grave problème à travers le monde. Sous la pression des réglementations environnementales strictes, les industriels sont obligés de prendre des mesures pour limiter la quantité et la toxicité des effluents industriels.

Ces déchets sont générés par de nombreuses industries (papier, plastiques, teintures et résines, pétrochimie, pharmacie, …etc.*(Kujawski et al., 2004; Rubalcaba et al. ,2007)*. Il est nécessaire de procéder à un traitement en aval avant de rejeter les effluents (liquides, solides et gazeux) dans l'environnement afin de limiter leurs effets polluants. Les phénols sont employés dans l'industrie comme antioxydants, intermédiaires de synthèse, désinfectants, agents de tannage, révélateurs photographiques et additifs des lubrifiants et des essences. Ils sont largement utilisés en photographie, dans les industries du pétrole, des peintures, des explosifs, du caoutchouc, des matières plastiques et dans les industries pharmaceutique et agroalimentaire. Les trois principales applications des phénols se situent dans la fabrication des résines phénoliques, du bisphénol A et du caprolactame *(Rappoport, 2003 ; Cordova Villegas et al., 2016)*.

Différentes technologies pour l'élimination des phénols sont utilisées. Les techniques de séparation telles que la distillation *(Galceran et Santos, 1988)*, l'extraction liquide-liquide *(Palmaa et al.,2007)*, adsorption *(Anisuzzamanet al., 2014 ; Girodsa et al., 2009*, *JieRen et al., 2013* ;*Jia-Qian Jiang et Ashekuzzaman, 2012)*, Pervaporation *(Busca et al., 2008)* ont été soigneusement étudiées. D'autres techniques destructives ou réactives telles que l'oxydation thermique, l'oxydation catalytique etphotocatalytique ont aussi été testées*(Mohsina et Khalil-ur-Rehman, 2009; Bansal et Kanwar, 2013)*. Les techniques biologiques ont également été pris en considération vu leur simplicité et leur efficacité *(Mohsina et Khalil-ur-Rehman, 2009; Bansal et Kanwar, 2013)*. Toutefois, ces technologies présentent quelques inconvénients qui ont fait limiter leur utilisation *(Busca et al., 2008)*.

Le procédé Fenton est un processus d'oxydation avancée qui a été largement utilisé pour l'élimination des phénols à partir des eaux usées *(Bautista et al., 2008; Babuponnusami et Muthukumar, 2014)*. L'ion ferreux et le peroxyde d'hydrogène réagissent ensemble pour produire des radicaux hydroxyles qui, à leur tour, réagissent avec les polluants à oxyder. L'efficacité du processus de Fenton dépend de la concentration des réactifs, du pH de et de la température du milieu réactionnel *(Babuponnusami et Muthukumar, 2014; Kos et al., 2010)*.Ce procédé présenteplusieurs avantages tels que la non specificité vis-à-vis du substrat

organique, un rendement et une vitesse d'élimination élevés même à des concentrations élevées sous des conditions facilement maitrisables.

Néanmoins, la réaction de Fenton peut générer lors de l'oxydation de phénol des composés aromatiques tels que l'hydroquinone, le catéchol et le benzoquinone, présentant des niveaux de toxicité beaucoup plus élevés que le phénol lui-même *(Zazo et al., 2009)*.

Par ailleurs, le traitement enzymatique est apparu ces dernières années comme une alternative intéressante aux procédés classiques vu certains avantages qu'il possède. En effet, les réactions enzymatiques sont des réactions rapides qui peuvent être menées en milieu aqueux sous des conditions modérées de température et de pH, avec une consommation minimale en substrats, d'où une efficacité technico-économique élevée *(Mohsina et Khalilur, 2009)*. Dans le cas du phénol, il pourra être polymérisé en o-o'-biphenyl par oxydoréduction enzymatique par plusieurs types d'enzymes, notamment la peroxydase *(Gaspar et al., 1982)*. De la même manière, vu que la peroxydase est une enzyme non spécifique, ellea la capacité de catalyser l'oxydation de l'hydroquinone en p-benzoquinone *(Manjeet et Mani, 1985; Noritomi et al., 1988)* et du catéchol en semiquinone*(Mason et al.,1961;Kalyanaraman et Sealy 1982; Ferrari et Laurenti, 1993)* ou en o-benzoquinone *(Sadler et Ross, 1988;Luigi et al.,2010)* respectivement. Les composés polymériques générés par la réaction d'oxydation enzymatique des phénols, pourront, par la suite, être facilement éliminés par les méthodes physiques simples telles que la précipitation et la filtration. D'autres sous-produits sont, en général, moins toxiques que le composé phénolique.

En analysant les mécanismes de dégradation du phénol par les deux procédés, Fenton et enzymatique, une certaine synergie pourra émerger d'où l'on pourra envisager la conception d'un couplage séquentiel (Fenton-Enzymatique). En effet, les produits de dégradation issus du procédé Fenton pourront être éliminés, partiellement ou totalement, par le procédé enzymatique.

L'objectif de la présente étude est donc d'étudier l'élimination du phénol comme composé modèle par couplage des procédés, Fenton et enzymatique, en visant comme critères d'optimisation : un temps de traitement court, un taux de conversion maximal et la minimisation dessous-produits toxiques.

Pour cela, l'étude a été structurée en trois chapitres :

- ***Le premier chapitre*** comporte une étude bibliographique sur les différents aspects du sujet notamment sur : *les phénols et leurs propriétés, usage et toxicité - L'état de l'art sur les différentes méthodes de traitement des solutions phénoliques. Le focus sera mis sur les procédés Fenton et enzymatique ;*

- ***Le deuxième chapitre*** est consacré à l'étude expérimentale et comporte *: une présentation du matériel, des protocoles expérimentaux et des méthodes analytiques utilisés dans la réalisation de cette étude. Les essais porteront en premier lieu sur la dégradation du phénol par les deux procédés Fenton et enzymatique pris individuellement sous différentes conditions opératoires.* L'objectif est de déterminer les conditions optimales et d'étudier les cinétiques des deux procédés. Par la suite, une étude sera consacrée pour le couplage séquentiel des deux procédés Fenton-Enzymatique dans le but de démontrer son efficacité et les avantages du point de vue qualitatif et quantitatif.

  Une dernière partie a porté sur l'application du procédé hybride pour le traitement d'un effluent industriel contenant le phénol.
- ***Le troisième chapitre*** porte sur la présentation et la discussion des résultats des essais expérimentaux.

Enfin, une **conclusion générale** incluant des perspectives de l'étude clôtureront ce travail.

CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

1.1.2 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques du phénol sont résumées dans le tableau 1.1.

Tableau1.1. Propretés physico-chimiques du phénol *(ATSDR, 2008 ; ETSC, 2008 ; INRS, 1997)*

Propriétés	**Valeurs**
Masse molaire (g mol^{-1})	94,11
Densité (kg m^{-3})	620
Aspect /Odeur	Cristaux incolores à jaunes ou roses. Clair. Odeur caractéristique.
Spécificités	• Conservation en récipient hermétique • Sensible à la lumière, hygroscopique • En cas de fort échauffement, possibilité de formation de mélanges explosibles avec l'air. • Matériaux non appropriés : aluminium, cuivre, zinc, caoutchouc, matières plastiques distinctes, différents alliages • Réactions exothermiques avec : aluminium (chaleur), aldéhydes, halogènes, hydrogène peroxyde/composés du fer (III), oxydant, acides forts, bases fortes, aldéhyde formique. • Danger d'explosion avec: nitrites, nitrates, sels d'oxacides halogénés, peroxydes.
Pression de vapeur (Pa) à 25 °C	47
Concentration de vapeur saturante à 25 °C	1,78 g m^{-3} 465 en ppm
Densité de la phase vapeur (par rapport à l'air)	3,24
Solubilité dans l'eau à 20 °C (g L^{-1})	87
Solubilité dans l'alcool, l'acétone, l'éther, la glycérine et le chlorure de méthylène	Très soluble
Température de fusion (°C)	41
Température d'ébullition (°C)	182
Température d'auto-inflammation (°C)	715
Point éclair (°C)	79
Limites d'explosivité (% dans l'air)	Inférieure (LIE)..... 1,7 Supérieure (LSE) 8,6

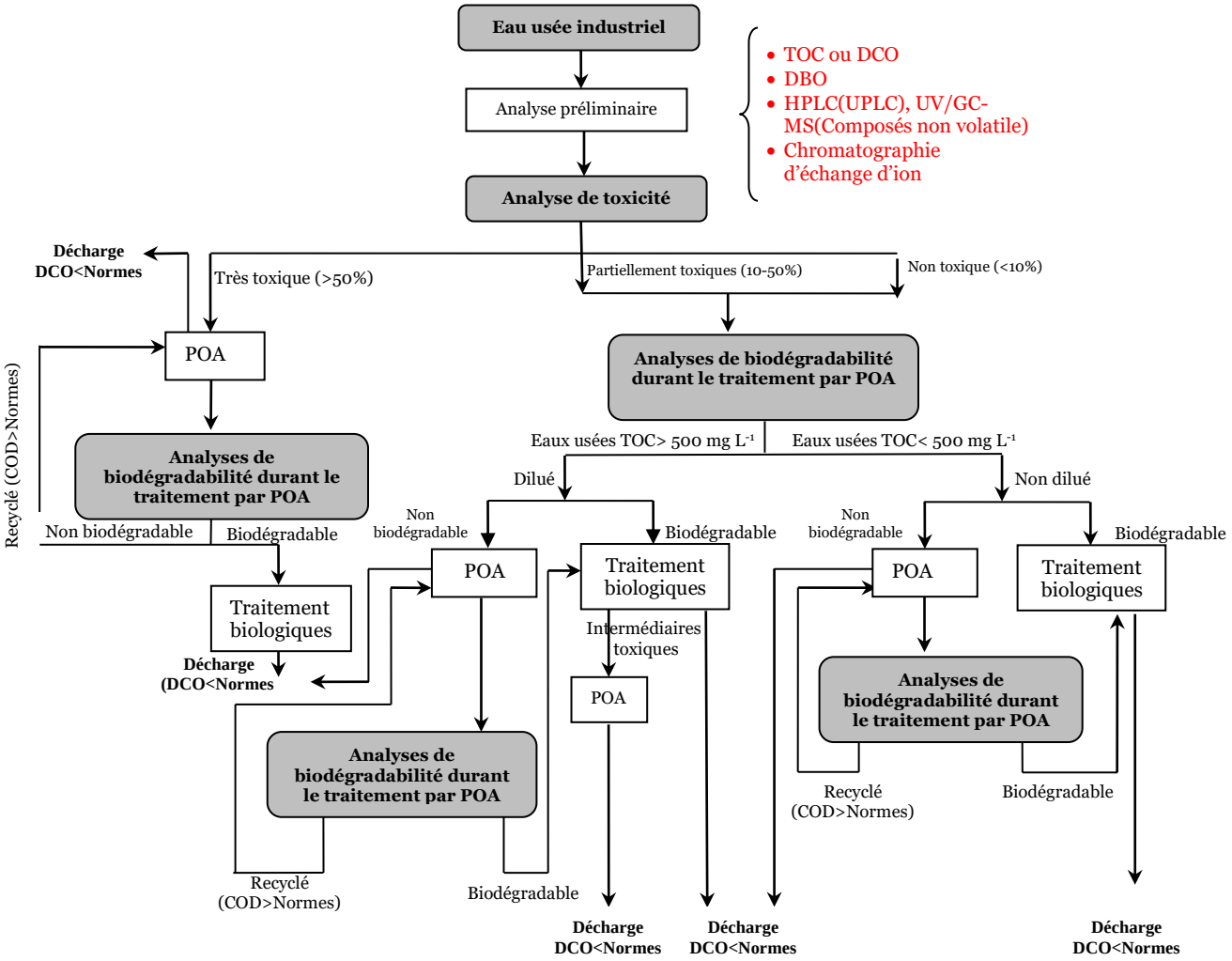


Fig.1.15. Stratégie de sélection de procédé de traitement d'eaux usées industrielles toxiques et/ou non-biodégradable *(Oller et al., 2011)*.

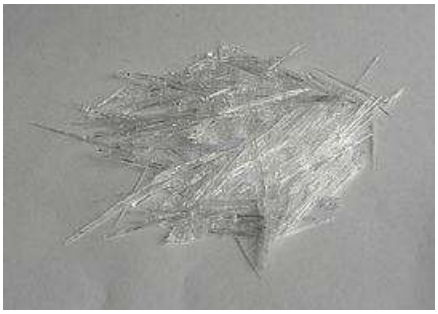
CHAPITRE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUES

1.1 PHÉNOL

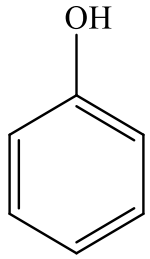
1.1.1 Définition

Le phénol de formule brute C_6H_6O, est un hydrocarbure oxygéné qui a été d'abord extrait du goudron de houille en 1834 par le chimiste allemand Rung *(Busca et al., 2008)*. Il compte parmi les constituants de la grande famille des composés organiques aromatiques *(Horch et al., 1994)*.

À l'état pur, c'est un solide à température ambiante, hygroscopique et d'odeur âcre et douce âtre. Il porte les noms de: acide phénique, acide carbolique et hydroxybenzène *(INRS, 1997)*. Il est de la famille des alcools aromatiques. Il est présent dans de nombreux végétaux. Sa structure moléculaire est simple (figure 1.1). Bien qu'il ait une fonction alcool, le phénol à des propriétés uniques et n'est pas classé comme un alcool. Sa structure est celle d'un groupement hydroxyle -OH lié à un atome de carbone du cycle benzénique *(Bonnard et al.,2011)*.



(a)



(b)

Fig.1.1. Phénol

(a) Aspect, (b) Structure de la molécule.

1.1.3 Propriétés chimiques

1.1.3.1 Propriétés acido-basiques

Le phénol réagit vivement avec des oxydants puissants comme les peroxydes. Vers 800 °C et en présence de zinc, la molécule du phénol se réduit en benzène. À haute température, le phénol pur se décompose entièrement en oxyde de carbone, carbone et hydrogène. À chaud, le phénol liquide attaque certains métaux, tels que le plomb, le zinc, l'aluminium. Il réagit aussi avec certains plastiques, comme le polyéthylène *(Bonnard et al., 2011)*. Les phénols sont plus acides que les alcools. En effet, l'ion phénolate est stabilisé par résonance et est plus stable qu'un ion alcoolate, comme indiqué sur la figure 1.2. Lors de la prise du proton du groupement hydroxyle (˙OH), le doublet électronique est partagé entre quatre carbones. La charge est ainsi délocalisée sur autant de carbones et l'ion est beaucoup plus stable que sur un alcool où la charge négative serait trop importante et s'approprierait le proton laissé immédiatement après.

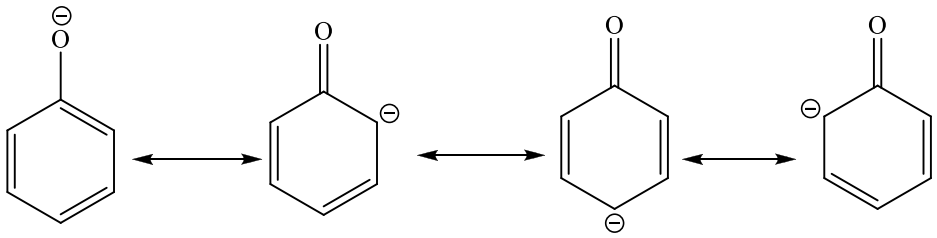


Fig. 1.2. Propriétés acido-basique du phénol *(Jourdan, 2004).*

Cet acide est toutefois un acide relativement faible; en conséquence, sa base conjuguée, l'ion phénolate, est une base très forte. Le pK_a du couple phénol/phénolate est 9,9 à 25 °C*(Jourdan, 2004).*

1.1.3.2 Substitutions électrophiles

Le groupement -OH a un effet « *activant* » qui facilite les substitutions électrophiles. Le remplacement (*substitution*) d'un atome d'hydrogène H du cycle benzénique par un autre atome ou groupe d'atomes se porte préférentiellement sur les positions 2, 4 et 6 (par rapport au groupe -OH) de ce cycle *(Rappoport, 2003)*:

Parmi les réactions de substitution on pourra compter :

1. La nitration. Le rendement est faible car OH est très activant, si on a 3eq de HNO_3, on forme le trinitrophénol (acide picrique). Avec HNO_3 concentré, on a une oxydation en parabenzoquinone (figure 1.3) ;

2. L'alkylation de Friedel et Crafts (figure 1.4) ;
3. Acylation. Ce type de réaction permet de synthétiser une cétone ou un aldéhyde…etc.

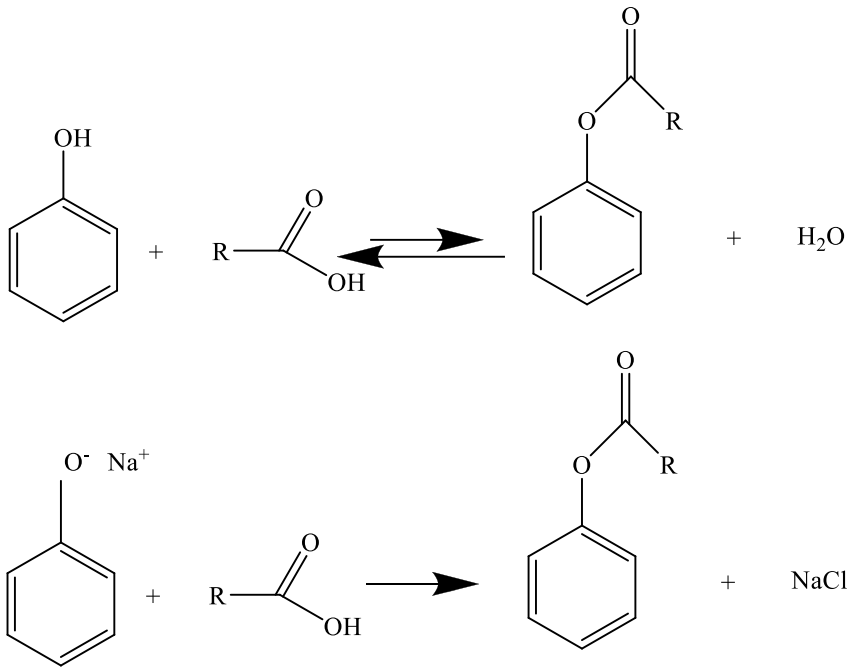


Fig.1.3. Nitration du phénol *(Rappoport, 2003)*.

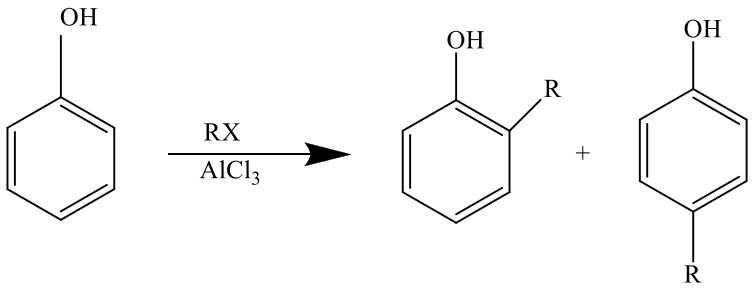


Fig.1.4. Alkylation de Friedel et Crafts *(Rappoport, 2003)*.

1.1.3.3 Réaction d'halogénation

Cette réaction est due au groupement hydroxyle. On utilise du pentachlorure de phosphore qui réagit avec l'alcool du phénol. On forme le chlorobenzène avec libération de HCl et de $POCl_3$(voir la figure 1.5).

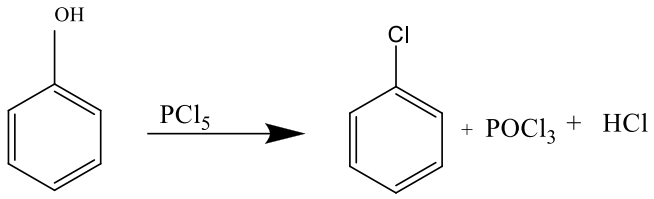


Fig.1.5. Halogénation du phénol, *(Rappoport, 2003)*.

1.1.3.4 Substitutions électrophiles communes à tous les aromatiques

. Cl est mésomère donneur et oriente aussi en ortho/para En présence de chauffage la chloration se fait sur toutes les positions. Le phénol en présence de Br_2 et d'eau ne fixe qu'en ortho et para formant un tribromophénol *(Budavari et al., 1989; Rappoport, 2003)*.

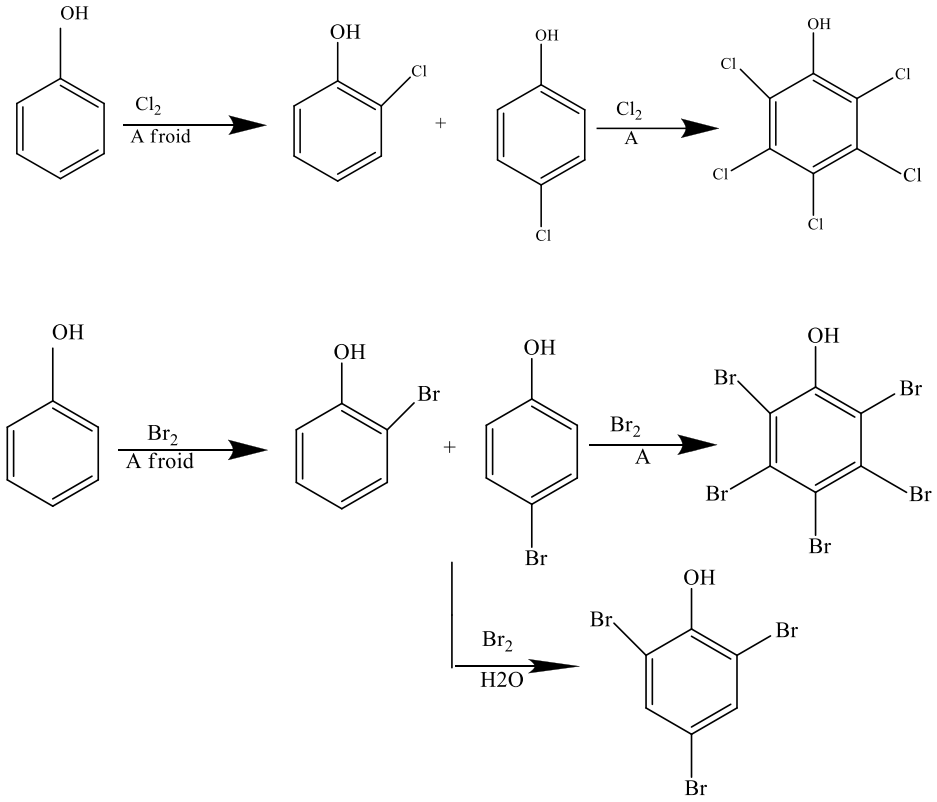


Fig.1.6. Substitutions électrophiles du phénol, *(Budavari et al., 1989; Rappoport, 2003)*.

1.1.3.5 Réaction d'amination (réaction de Bücherer)

On fait réagir l'ammoniaque et le phénol, en présence de chaleur et du sulfite de sodium, on forme l'aniline avec libération d'eau. La réaction inverse est possible avec de la chaleur et du sulfite d'amminium. On peut faire réagir des naphtols (alpha position 1 ou méta position 2) au lieu du phénol *(Budavari et al., 1989; Rappoport, 2003)*.

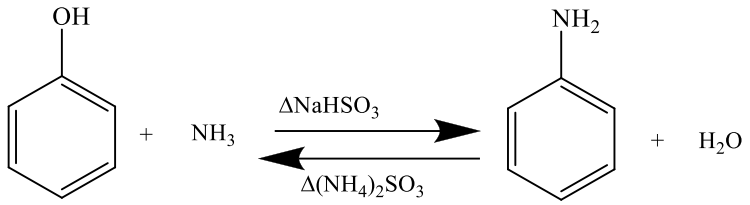


Fig.1.7. Réaction d'amination du phénol, *(Budavari et al., 1989; Rappoport, 2003).*

1.1.4 Utilisation du phénol

Le phénol est utilisé en synthèse organique. Il est à la base de la production d'un grand nombre de produits comme : des alkylphénols ; des diphénols ; des chlorophénols tels que le pentachlorophénol utilisé dans le traitement du bois ; des nitrophénols; des aminophénols tels que le paraminophénol intermédiaire dans l'industrie pharmaceutique *(Pichard,2005)*; et l'aniline qui est intermédiaire important dans l'industrie des colorants azoiques*(Busca et al., 2008).*

Le bisphénol A utilisé dans la production des polycarbonates ; des résines époxydes et des polysulfonates et le caprolactame pour produire du nylon 6. Le phénol rentre aussi dans la fabrication de colorants; produits pharmaceutiques; pesticides; parfums; lubrifiants et solvants; peintures; d'adhésifs; d'explosifs; de textile; des matériaux isolants.

Le phénol sert aussi de désinfectant ; d'anesthésiant et d'antiseptique généraux et on le trouve dans un certain nombre de produits de consommation dans le domaine de l'hygiène et de l'entretien *(Busca et al., 2008)*.

1.1.5 Sources de pollution par les composés phénoliques

Les composés phénoliques se retrouvent dans plusieurs types d'effluents surtout dans les effluents issus des industries pharmaceutiques, de matières plastiques *(ATSDR, 2008)*, de fibres synthétiques (polyamides, etc.), raffinage du pétrole, détergents, pesticides et insecticides (chlorophénols, etc.), de colorants et textiles *(Burton et al., 1998; Peralta-Zamora et al. 2003; Svobodova et al., 2008)*. Ils se trouvent aussi en abondance dans les résidus de l'industrie de l'huile d'olive *(Adhoum et Monser, 2004; Azabou et al., 2007; Casa et al., 2003; D'Annibale et al., 2000; De La Rubia et al., 2008; Iamarino et al., 2009; Jaouani et al., 2006; Roig et al., 2006; SciolietVollaro, 1997; Toscano et al., 2003)* ainsi que des usines de production d'acier, de charbon et de résine *(Staples et al., 1998)*. On les trouve également dans des effluents issus de papeteries *(Camarero et al., 2007; Minussi et al., 2007;*

Sponza et al. 2003), des effluents domestiques, des effluents d'origine agricole ou même dans des fumées issues de la combustion du bois *(Cohen et al., 2009)*.

Les concentrations en composés phénoliques dans les effluents industriels peuvent varier de quelques microgrammes à quelques grammes par litre d'effluents selon leur origine. On retrouve ainsi les effluents issus des industries de production d'huile d'olive (Jusqu'à 5000 mgL^{-1} selon *Iamarino et al. (2009)*, dans les effluents des cokéfactions (de 28 à 3900 mgL^{-1}), des industries pétrochimiques (de 9 à 1220 $mg\ L^{-1}$), des industries pharmaceutiques, de matières plastiques, de bois, de peinture et de papier *(Busca et al., 2008)* (de 0,1 à 1600 $mg\ L^{-1}$) et les effluents issus des raffineries (de 6 à 500 mgL^{-1}).

1.1.6 Toxicité des composés phénoliques

La plupart des composés phénoliques sont extrêmement toxiques pour les organismes vivants même à une faible concentration (0,1 ng L^{-1}) *(Brauschet Rand, 2011; Gomez et al., 2006)*. Ils présentent des effets phytotoxique, antimicrobien, cancérigène et mutagène *(Bisson et al., 2005; Casa et al., 2003; D'annibale et al., 2004 ; Bonnard et al.,2011; Sponza, 2003)*.

Iamarino et Gianfreda (2009) ont mis en évidence la phytotoxicité de composés phénoliques présents dans les effluents issus de la production d'huile d'olive sur la germination de *Le pidium Sativum* et *Lycopersicon Esculentum*. La phytotoxicité de ces effluents a été aussi observée sur la germination du blé dur par *Casa et al.(2003)*.

Pour l'homme, l'intoxication peut avoir lieu par les trois voies : cutanée, respiratoire et digestive et peut même entrainer la mort en fonction de la concentration, du temps de contact et de la voie de contamination *(ATSDR, 2008)*. L'intoxication chronique se caractérise par des troubles digestifs (vomissements, difficulté à avaler, diarrhée, anorexie, hyper-salivation), des troubles nerveux (maux de tête, vertiges, troubles mentaux), des troubles cutanés, une perte du poids et une atteinte cardio-vasculaire. Dans les cas d'intoxications sévères, on note une atteinte hépatique et rénale, se traduisant par des changements de la coloration des urines *(ATSDR, 2008; Bisson et al., 2005; INRS, 1997)*.

Parmi les différents composés phénoliques toxiques, le bisphénol A, présent dans plus de 99% des produits domestiques à base de polycarbonate (et/ou) de résine époxy. Sa toxicité vis-à-vis de la vie aquatique a été reportée par *Staples et al. (1998)*.

Pour limiter les risques liés à la présence de composés phénoliques, le Ministère du Travail français a fixé à 19 $mg.m^{-3}$, la valeur limite qui peut être admise dans l'air des locaux de travail *(Bonnard et al.,2011)*. Pour l'eau potable destinée à la consommation humaine, la quantité de phénols admise doit être inférieure à 0,5 ngL^{-1}*(Legifrance, 1989)*. Pour les déchets industriels, les rejets liquides doivent également respecter une valeur limite de l'indice de

phénol de 0,3 *mg* L^{-1} si les rejets totaux dépassent 3 gj^{-1}. Dans le cas contraire, la concentration limite est portée à 1 *mg* L^{-1} *(Legifrance, 2003)*.

1.1.7 Différentes voies de dégradation des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont éliminés des effluents par des procédés de séparation (voie physique) ou par des procédés visant leur dégradation (voies chimique ou biologique) *(Busca et al., 2008).* La réaction de dégradation des composés phénoliques par voie biologique peut impliquer soit des micro-organismes (cellules vivantes), soit des enzymes *(Cordova Villegas et al., 2016)*.

1.1.7.1 Élimination par voie chimique

Il est possible d'envisager l'oxydation directe des composés phénoliques par l'oxygène dissout sous des conditions extrêmes de température (> 200°C), de pression (> 3 MPa) et si possible en présence de catalyseurs généralement des métaux de transition tels le cuivre ou le fer. Cependant, cette voie est coûteuse en énergie et nécessite des équipements adaptés. De plus l'oxydation n'est jamais *(Busca et al., 2008)*.

Afin de réduire la température et la pression de réaction, on a recours à l'utilisation d'oxydants chimiques plus puissants que l'O_2, à savoir, l'ozone (O_3) dont le potentiel de réduction est élevé (E° = 2,07 V) ou le peroxyde d'hydrogène (E° = 1,78 V). Dans ce cas, la dégradation des composés phénoliques peut être améliorée par la mise en œuvre de procédés d'oxydation photocatalytiques en présence de TiO_2 *(Morawski et al.,2004; Negishi et al., 2008)* ou *électrochimiques* dont le procédé *électro-Fenton* utilisant du chlore et l'hypochlorite de sodium *(Guohua, 2004)*.

On retrouve également dans la littérature des expériences mettant en jeu des procédés hybrides utilisant l'ozone couplé à un réacteur biologique *(Kunz et al., 2001)*, à l'action des ultra-violets *(Tawabini et Zubair, 2011)*, à l'utilisation de gel adsorbants de silice, de zéolite ou de charbon actif *(Sano et al., 2007 ; Charinpanitkul et al., 2010)*. L'oxydation du phénol en présence de peroxyde d'hydrogène suivi d'une filtration sur membrane céramique pour séparer des polymères de la réaction a été aussi présenté comme une alternative intéressante *(Chen et al., 2009)*.

Malgré tous les avantages que présentent les procédés oxydatifs, la voie chimique peuvent parfois engendrer des produits secondaires plus toxiques que le phénol. Par exemple, l'utilisation du chlore pour dégrader du phénol est effective mais susceptible de conduire à la formation de chlorophénols hautement toxiques *(Throop, 1975)*.

1.1.7.2 Élimination par procédé physique

Les composés phénoliques peuvent être éliminés des effluents liquides par adsorption, absorption, filtration membranaire, pervaporation ou encore par distillation avec entrainement à la vapeur *(Busca et al., 2008)*.

Parmi ces différentes méthodes physiques, la séparation par adsorption sur charbon actif est la plus utilisée du fait de sa simplicité de conception et de mise en œuvre. Toutefois, cette méthode est peu sélective. Elle permet l'élimination non seulement des matières organiques mais aussi des matières inorganiques. Son efficacité dépend du type de polluants et de la structure du charbon actif, notamment de sa porosité. Le charbon actif est obtenu à partir de matériaux amorphes à base de charbon suite à la mise en œuvre de réactions de carbonisation (800 °C) et d'activation (800-1000 °C), la porosité du matériau et donc sa capacité d'adsorption étant améliorées par une augmentation de la température de traitement *(Rageul, 1991; Zumriye et Yener 2001)*. La quantité de polluant adsorbé est fonction de la concentration en polluant (d'autant plus grande que cette concentration est élevée), elle augmente avec l'augmentation du temps de contact, la diminution du pH et de la température *(Busca et al.,2008; Kennedy et al., 2007)*. L'adsorption sur charbon actif peut être mise en œuvre en lit fixe ou en lit fluidisé *(Charinpanitkul et al., 2010; Yahia, 2009)*.

Cependant, malgré les avantages liés à la simplicité de la mise en œuvre de la méthode, cette technique de dépollution reste coûteuse. En effet après utilisation, les charbons ne peuvent pas être rejetés dans l'environnement, ils doivent être régénérés par voie thermique à de très hautes températures *(Busca et al., 2008)*.

1.1.7.3 Élimination par voie biologique (microorganismes)

Des champignons, certaines bactéries et levures sont capables de métaboliser des composés phénoliques *(Galindez-Mayer et al., 2008; Stoilova et al., 2006 et 2007)*.

Parmi les micro-organismes les plus intéressants, on retrouve les moisissures *(Pleurotusos treatus, Aspergillus awamori, Neurospora cassa)* et les levures *(Yarrowiali polytica)(Luke et Burton, 2001;Martirani et al., 1996;Scioli et Vollaro1997;Stoilova et al., 2006 et 2007)*.

Neurospora crassa, champignon filamenteux capable de produire des oxydoréductases (une laccase et une polyphénol-oxydase), enzymes pouvant catalyser l'oxydation de plusieurs composés organiques, a été utilisé avec succès par *Luke et Burton (2001)* pour traiter un effluent contenant du p-crésol et du phénol).

Des champignons macroscopiques de pourriture blanche ont été utilisés en batch et en lit fixe pour la dégradation du phénol et du 2,4,6-trichlorophénol (concentration initiale de 800 et 85 $mg\ L^{-1}$ respectivement) *(Ehlers et Rose, 2005)*.

Les micro-organismes ne présentent pas la même affinité vis-à-vis de tous les substrats. *Stoilova et al. (2006)* ont montré que les capacités de dégradation du mycélium d'*Aspergillus Awamori* variaient selon la nature du composé phénolique. Ce champignon est capable de dégrader à 100%, une solution à 1 $g\ L^{-1}$de catéchol en 3 jours ou éliminer totalement le phénol contenu dans une solution (0,6 $g\ L^{-1}$). Cependant, le rendement d'élimination ne dépasse pas 60% si la concentration était de 1 $g\ L^{-1}$ de phénol. L'augmentation de la concentration en phénol entraine une diminution de la vitesse de dégradation suite à une inhibition par les produits de dégradation ou par excès de substrat.

En conclusion, la méthode de dégradation des composés phénoliques par voie biologique est intéressante en raison de la production continue des enzymes oxydatives accompagnant la production de biomasse *(Luke et Burton 2001).* Ces enzymes jouent le rôle de catalyseurs efficaces menant la réaction de dégradation vers une minéralisation totale ou partielle du phénol, figure 1.8. Cependant, cette voie biologique présente certaines limites telles que :

- La durée longue du procédé (quelques jours), et la limitation par un arrêt lorsque la phase stationnaire est atteinte.
- L'adaptation des microrganismes au phénol comme substrat à des concentrations parfois élevées *(Capasso et al., 1995 ; El Hajouji et al., 2007)* pouvant provoquer l'inhibition de la croissance, d'où une utilisation des microorganismes limitée au traitement d'effluents dilués *(Borja et al., 1997)*.
- La nécessité de présence de milieu nutritif optimal contenant de l'azote, et des éléments minéraux, nécessaires à la croissance des microorganismes.
- Les effluents industriels doivent subir un prétraitement avant de procéder au traitement biologique, vu que certains composés peuvent interférer avec la dégradation du phénol.

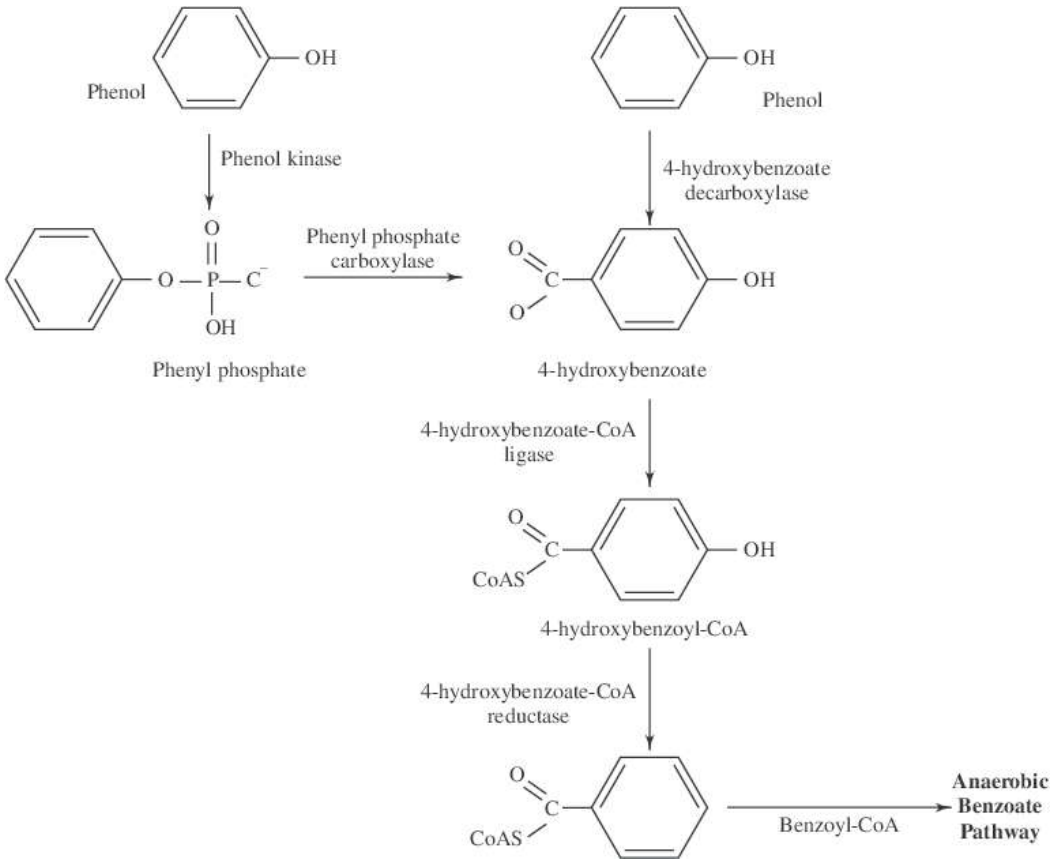


Fig. 1.8. Biodégradation du phénol par *Thauera aromatica* *(Lack et Fuches, 1994)*.

1.2 ÉLIMINATION DU PHÉNOL PAR LE PROCÉDÉ FENTON

En 1876, H. J. H. Fenton décrit la formation d'un composé coloré obtenu après avoir mélangé de l'acide tartrique avec du peroxyde d'hydrogène et du fer ferreux en faible concentration. Cette coloration était due à un complexe entre le fer et un produit d'oxydation de l'acide tartrique. En 1894, Fenton établit la formule moléculaire de ce produit d'oxydation *(Fenton, 1894)*. Il en a déduit sa structure deux années plus tard. Toutefois, Fenton ne fut pas en mesure de proposer d'étapes réactionnelles. Ses travaux étant antérieurs à la découverte des électrons comme entités chimiques qui eut lieu vers 1904. Quarante ans plus tard (et cinq ans après la mort de Fenton), des expériences réalisées par Haber et Weiss (1934) ont établi que l'espèce oxydante à pH < 3 était le radical hydroxyle *(Haber et Weiss, 1934)*. En 1979, la présence du radical hydroxyle a été directement observée par spectroscopie de résonance de spin électronique *(Lai et Pipette, 1979)*. *Barb et al. (1949 et 1952)* ont publié une série d'articles sur la décomposition de H_2O_2 en révisant et développant le mécanisme original proposé par Haber et Weiss. Ils ont montré que le réactif de Fenton génère aussi d'autres espèces oxydantes de la famille de l'oxygène telles que $HO_2^{\bullet}$ et $O_2^{-\bullet}$ qui sont moins réactives

que le radical •OH. En milieu neutre, d'autres études ont rapporté la formation de l'ion ferryle FeO_2^+ comme espèce oxydante *(Bray et Gorin, 1932; Lopez-Cueto et al., 2004)*. En fait, l'existence de l'une ou l'autre de ces deux espèces oxydantes a été jusqu'à nos jours très controversée, même si l'hypothèse de la formation de •OH est la plus communément admise.

La réaction de Fenton (réaction 1.2) en solution aqueuse est basée sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène (agent oxydant, E_0 = 1,77 V) *(Venkatadri et Peters, 1993)* en présence d'ions ferreux pour produire un radical hydroxyle •OH, ce dernier constituant l'espèce oxydante prédominante ($E°_{(•OH/H2O)}$=2,81 V/ESH (électrode standard à hydrogène, à 25 °C et en milieu acide), alors que pour H_2O_2/H_2O, E° = 1,76 V, pour $HO•_2/H_2O_2$, E° = 1,44 V et pour Fe^{3+}/Fe^{2+}, E° = 0,77 V, dans les mêmes conditions).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH \quad + OH^{\bullet} \qquad (k = 51-76 mol^{-1} L s^{-1}) \qquad (Eq.1.2)$$

En effet, la réaction de Fenton constitue un système assez complexe. De nombreuses réactions parasites accompagnent cette réaction selon le milieu et les conditions opératoires.

Des variantes du système Fenton existent dans lesquelles l'ion ferreux est remplacé par d'autres métaux à de faibles états d'oxydation (i.e. réducteurs), tels que Mn^{2+}, Cu^{2+}ou Ti^{3+} *(Wardman et Candeias, 1996; Croft et al., 1992)*. Dans certains cas, un effet de synergie a peut-être mis en évidence, en particulier pour le cuivre et le manganèse *(Gallard, 1998)*. De même, des oxydants autres que H_2O_2 peuvent être mis en œuvre, comme par exemple l'acide hypochloreux HOCl *(Wardman et Candeias, 1996)*. Aussi est-il possible d'écrire la réaction de Fenton dans le cas général de la manière suivante :

Métal réduit + Oxydant →Métal oxydé + Oxydant plus puissant *(Eq.1.3)*

1.2.1 Mécanisme d'oxydation du phénol par la réaction Fenton

Un ensemble des composés organiques peuvent générée lors de l'oxydation du phénol par la réaction Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2 à pH3) correspond principalement à des composés cycliques et des acides organiques à courte chaîne. Les composés cycliques plus importants étaient le catéchol, l'hydroquinone et le p-benzoquinone. Ainsi que, cette réaction génère des acides organiques comme l'acide maléique, l'acide acétique, l'acide oxalique, l'acide formique et avec des quantités plus faibles d'acide muconique, l'acide fumarique et les acides maloniques

(Ibtihage, 2009). Deux sortes de réactions envisagées, désirer et parasite comme indiquer dans la figure 1.9.

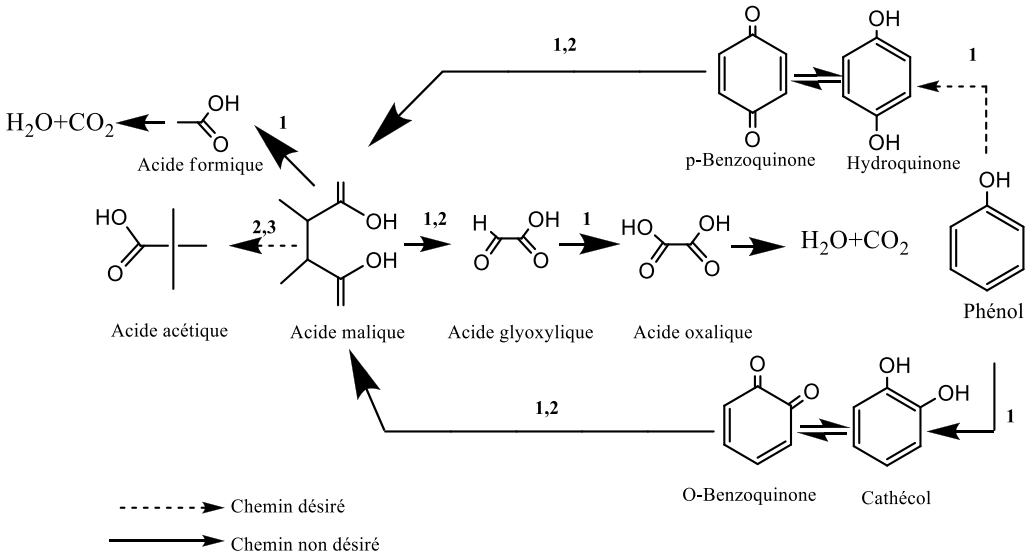


Fig.1.9. Mécanisme d'oxydation du phénol par le réactif de Fenton, *(Ibtihage, 2009)*.

1.2.2 Produits générés lors d'oxydation du phénol par la réaction Fenton

Les produits générés par la réaction Fenton lors d'oxydation de phénol sont: le catéchol, hydroquinone et le benzoquinone.

1.2.2.1 Catéchol

Le pyrocatéchol est le benzène-1,2-diol, connu aussi sous le nom de catéchol (avec risque de confusion avec la catéchine). C'est l'isomère *ortho* du benzènediol, portant deux fonctions hydroxyles OH (un diphénol) de formule brute $C_6H_6O_2$ utilisé dans de nombreuses synthèses organiques. Les catéchols sont des motifs que l'on retrouve même dans certaines molécules naturelles synthétisées par les organismes vivants. Par exemple, certaines protéines aux propriétés adhésives présentes dans les moules marines sont très riches en motifs catéchols et leur permet d'adhérer sur un grand nombre de support *(Flickinger, 1976)*.

1.2.2.2 Hydroquinone

L'hydroquinone, aussi appelée benzène-1,4-diol, est un composé organique aromatique apparenté au phénol, de formule suivante $C_6H_4(OH)_2$ et qui se présente sous forme de poudre

solide dans les conditions normales de pression et de température. Sa structure comporte deux groupes hydroxyles liés à un noyau benzénique en position *para(Flickinger 1976)*.

L'hydroquinone est un agent réducteur. Ce dérivé de glucide freine également la synthèse de la mélanine par inhibition de la formation de l'enzyme tyrosinase.

L'hydroquinone en solution aqueuse a de nombreuses utilisations principalement en raison de son action comme agent réducteur. C'est l'un des composants majeurs dans le développement photographique où, en présence de Metol (ou 4-(méthylamino)phénol), elle réduit les sels d'argent exposés, invisibles, en argent métallique.

En médecine humaine, l'hydroquinone a été utilisée en application sur la peau pour en réduire la charge pigmentaire brune. Du fait d'utilisations abusives, l'hydroquinone n'est maintenant disponible que sous forme de préparation magistrale prescrite par le dermatologue.

En synthèse des polymères, l'hydroquinone sert d'inhibiteur afin de prévenir une polymérisation prématurée du monomère, due par exemple au dioxygène de l'air (c'est un biradical) qui peut amorcer la polymérisation.

Dans une perspective écologique, comme tous les produits de développement, l'hydroquinone est une substance dangereuse pour les écosystèmes et notamment pour les eaux car elle est peu biodégradable et en partie toxique pour les poissons. Une fois utilisé, comme les huiles ou les piles usagées, ce produit doit être déposé dans une décharge spécialisée pour ne pas polluer l'environnement. Le révélateur peut faire l'objet d'un traitement thermique dans une installation chimique appropriée *(Flickinger, 1976)*.

1.2.2.3 Benzoquinone

Le benzoquinone répertorie deux isomères : ortho (1-2) et para (1-4)-Benzoquinone. Le 1,2-benzoquinone est relativement instable : elle se décompose dans l'eau ainsi que lorsqu'elle est chauffée au-dessus de 60 °C.

La 1,4-benzoquinone ou cyclohexa-2,5-diène-1,4-dione est une cétone de formule brute $C_6H_4O_2$. C'est un des deux isomères de la quinone, l'autre étant la 1,2-benzoquinone. Ce composé non aromatique est le dérivé oxydé de l'hydroquinone (benzène-1,4-diol). Cette molécule présente les propriétés d'une cétone et d'un alcène. Cette molécule est utilisée en synthèse organique comme accepteur de proton et comme agent oxydant. Elle peut aussi être utilisée comme diénophile dans les réactions de Diels-Alder. Elle est utilisée comme intermédiaire pour la synthèse des substances suivantes :1,4-Naphtoquinone, obtenue par oxydation du naphtalène en présence de trioxyde de chrome ; 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, un agent oxydant et déshydrogénant ; Ubiquinone-1, Chloro-p-benzoquinone, Chloranile, 1,4-$C_6Cl_4O_2$, un puissant oxydant et déshydrogénant *(Allan et al.,1993)*.

1.2.3 Cinétique de dégradation du phénol par la réaction Fenton

Sur le plan cinétique, la vitesse de réaction du radical hydroxyle sur les composés organiques obéit à une loi cinétique d'ordre 2: ordre 1 par rapport à la concentration en composé organique et ordre 1 par rapport à la concentration en •OH. Aussi peut-on écrire la vitesse de disparition d'un substrat organique RH de la manière suivante ($k_{\bullet OH}$ étant la constante de vitesse de la réaction entre RH et •OH), *(Chu et al., (2005) ; Ibtihage, (2009) ; Lai, (1979)) :*

$$\frac{d[RH]}{dt} = k_{\bullet OH}[^{\bullet}OH][RH] \qquad (Eq.1.4)$$

La réaction 1.11, qui génère le radical hydroxyle, est l'étape limitant dans l'oxydation de la plupart des composés organiques puisque cette réaction est relativement lente (55-76 $mol^{-1}Ls^{-1}$) par rapport à la consommation des radicaux hydroxyles par les composés organiques et par les intermédiaires et sous-produits d'oxydations formées, un processus extrêmement rapide avec des constantes de vitesse de l'ordre de 10^7 à 10^{10} $mol^{-1}L\ s^{-1}$.

Les radicaux hydroxyles étant lentement générés et rapidement consommés, il en résulte que la concentration en radicaux hydroxyles est maintenue dans la solution à une concentration quasi-stationnaire (vitesse de consommation = vitesse de formation). On peut donc écrire :

$$[^{\bullet}OH] \approx ctedonc : k_{\bullet OH}[^{\bullet}OH] = cte = k_{app}$$

La concentration en radicaux hydroxyles étant constante, la vitesse d'oxydation du composé organique peut être décrite par une loi cinétique apparente d'ordre 1 par rapport à la concentration en composé organique :

$$d\frac{[RH]}{dt} = k_{app} \bullet [RH] \qquad (Eq.1.5)$$

Avec $K_{app}=k_{\bullet OH}[^{\bullet}OH]$

Il s'ensuit que la cinétique de dégradation du substrat organique peut être décrite par l'équation ci-dessous :

$$Ln\left(\frac{[RH]}{[RH]_0}\right) = -k_{app}t \qquad (Eq.1.6)$$

Le suivi de la disparition du substrat en fonction du temps permet donc d'estimer de manière expérimentale la constante cinétique du pseudo-premier ordre, k_{app}.

1.2.4 Facteurs influençant l'efficacité de la réaction Fenton

1.2.4.1 Influence de la concentration du catalyseur (Fe^{2+})

Il a été montré dans de nombreuses études *(Brillas et al., 2004 ; Diagne, 2006)*, qu'une forte concentration de catalyseur (Fe^{2+}) dans la solution n'est pas en faveur d'un meilleur taux de minéralisation. L'influence d'une forte concentration de fer comme catalyseur a pour conséquence une diminution de l'efficacité due à la réaction parasite (Eq. 1.7) entre $^{\bullet}OH$ et Fe^{2+} *(Oturan, 2004).*

$$Fe^{2+} + {}^{\bullet}OH \rightarrow Fe^{3+} + OH \qquad (Eq.1.7)$$

Habituellement, le taux de dégradation augmente avec une augmentation de la concentration d'ion ferreux *(Lin et Lo, 1997)*. Cependant, l'ampleur de l'augmentation est parfois observée comme étant marginale au-dessus d'une certaine concentration d'ion ferreux telle que rapportée par Lin et al. *(Lin et al., 1999)*, Kang et Hwang *(Kang et Hwang, 2000)* et Rivas et al. *(Rivas et al., 2001)*. En outre, une augmentation énorme des ions ferreux entraînera une augmentation de la quantité inutilisée de sels de fer, ce qui contribuera à une augmentation de la teneur totale en solides dissous du flux d'écoulement et ce n'est pas autorisé. Ainsi, des études en échelle de laboratoire sont nécessaires pour établir le chargement optimal des ions ferreux pour minéraliser les matières organiques.

1.2.4.2 Effet de la concentration des réactifs – Rapport $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$

Une augmentation de la concentration en fer va accélérer la cinétique d'oxydation sans toutefois influencer le rendement de celle-ci. Au contraire, une élévation de la quantité de peroxyde d'hydrogène additionnée entraîne un accroissement de l'efficacité de dégradation sans influence notable sur la cinétique *(Neyens et Baeyens, 2003)*. Une dégradation optimale avec une cinétique rapide peut donc être obtenue en augmentant la concentration des deux réactifs. Toutefois travailler en présence d'un très grand excès de réactifs peut devenir un facteur limitant, le fer ferreux et le peroxyde d'hydrogène pouvant se comporter comme des pièges à radicaux.

D'après *Lin et Lo (1997); Kang et Hwang (2000)* et *Eisenhauer (1964)* la concentration du peroxyde d'hydrogène joue un rôle crucial dans le rendement de dégradation des composés

phénoliques. Cependant d'après *Li et Lo (1997)* la quantité excessive en peroxyde d'hydrogène n'a été pas recommandée. *Ito et al. (1998)* présentèrent un autre effet négatif du peroxyde d'hydrogène est le balayage des radicaux hydroxylés générés, qui se produisent à de grandes quantités de peroxyde d'hydrogène. Ainsi, le dosage du peroxyde d'hydrogène devrait être ajusté de telle sorte que l'intégralité de la quantité soit utilisée et ceci peut être décidé en fonction des études à l'échelle du laboratoire.

Nesheiwat et Swanson (2000) eurent conclu que l'utilisation efficace du peroxyde d'hydrogène diminue en raison de la décomposition accélérée du peroxyde d'hydrogène dans l'eau et l'oxygène.

1.2.4.3 Effet de pH

La réaction de Fenton se déroule de façon optimale à un pH compris entre 2,5 et 4 *(Gallard et al., 1998)*.

En effet, en dessous du pH 2,5 trois mécanismes vont diminuer l'efficacité de la réaction :

- la formation de complexe ferreux ;
- l'inhibition de la réaction entre Fe^{2+} et H_2O_2 (réaction de fenton) *(Sanz et al., 2003)* ;
- l'accroissement à faible pH du rôle de piégeur de radicaux du peroxyde d'hydrogène.

Pour des valeurs de pH plus élevées (>4), les ions ferriques précipitent sous forme d'hydroxyde de fer $Fe(OH)_3$. Ce précipité étant très stable (K_s= 10^{-38}), la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} devient très lente et la régénération de Fe^{2+}, comme initiateur de production de radicaux $^{\bullet}OH$, devient l'étape cinétiquement limitant du procédé.

Rivas et al. (2001); Eisenhauer (1964), Babuponnusami et al. (2011) ont été trouvé que le pH optimal pour la réaction de Fenton était d'environ 3, quel que soit le substrat cible.

1.2.4.4 Effet de la température

Peu de travaux ont été menés afin d'évaluer l'influence de la température sur la réaction de Fenton. Toutefois, l'absence d'influence de ce paramètre a été notée lors de l'oxydation de l'acide p-hydrobenzoïque (gamme de 11 à 41°C). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'étape d'initiation du mécanisme radicalaire ne nécessite qu'une faible énergie d'activation *(Rivas et al., 2001)*.

Des études limitées sont disponibles pour illustrer l'effet de la température sur le taux de dégradation. En outre, les conditions ambiantes peuvent être utilisées en toute sécurité avec une bonne efficacité. En fait, *Lin et Lo (1997)* ont signalé une température optimale de 30 °C, alors que Rivas et al. *(Rivas et al., 2001)* a rapporté que l'efficacité de la dégradation n'est pas affectée même si la température augmente de 10 à 40 °C. Si la température de réaction devrait

augmenter au-delà de 40 °C en raison de la nature exothermique, le refroidissement est recommandé.

1.2.5 Les réactions parasites pouvant affecter le réactif de Fenton

En dehors de ces paramètres qui exercent une forte influence sur la réaction de Fenton donc sur les procédés Fenton, il existe de nombreuses réactions dites parasites qui affectent soit la concentration des réactifs (H_2O_2, Fe^{2+}) ou les radicaux hydroxyles en solution. C'est un ensemble de réactions qui entre en compétition avec la réaction de Fenton pour la défavoriser.
Comme l'oxydation de la matière organique est limitée par la vitesse de formation des radicaux $^{\bullet}OH$, toute autre réaction autre que la réaction de Fenton qui consommerait le Fe^{2+}, le H_2O_2, affectent dans le sens négatif le processus de dégradation.
Principalement, ce sont les réactions de piégeage des radicaux hydroxyles par les réactifs (en excès); le fer ferreux ou le peroxyde d'hydrogène (réactions 1.8 et 1.9).

$$^{\bullet}OH + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{-} \qquad k = 4\times10^{8}\ M^{-1}s^{-1} \qquad (Eq.1.8)$$

$$^{\bullet}OH + H_2O_2 \longrightarrow HO^{\bullet}_2 + H_2O \qquad k = 3\times10^{7}\ M^{-1}s^{-1} \qquad (Eq.1.9)$$

En dehors de ces deux réactions, il peut s'agir aussi de réactions de combinaison entre les radicaux hydroxyles eux-mêmes (dans le cas des fortes concentrations initiales du réactif de Fenton) donnant du peroxyde d'hydrogène. Da Pozzo et al. *(Da Pozzo et al., 2005)* ajoutent cette réaction comme facteur limitant du système.
Elle a une constante cinétique de $k = 3{,}3\times10^{9}\ M^{-1}s^{-1}$. Cette valeur se situe dans le même ordre de grandeur que celles des réactions des $^{\bullet}OH$ sur les composés organiques.

$$^{\bullet}OH + {}^{\bullet}OH \rightarrow H_2O_2 \qquad (Eq.1.10)$$

La constante cinétique de la réaction des $^{\bullet}OH$ sur le Fe^{2+} a été étudiée par plusieurs auteurs.
Le tableau 2.5 donne des valeurs des constantes cinétiques obtenues sous différentes conditions expérimentales. Elles sont de l'ordre de 10^8 $M^{-1}s^{-1}$. Les radicaux hydroxyles réagissent sur les ions ferreux pour donner des ions ferriques. En dehors de ces réactions, les radicaux hydroxyles peuvent aussi réagir avec les ions carbonates, chlorures, sulfates, phosphates pouvant se trouver en milieu aqueux, mais aussi avec les radicaux hydroperoxyle. Toutes ces réactions réduisent leur capacité d'oxydation vis-à-vis des composés organiques *(Chu et al., 2005)*. Dans la réaction de Fenton, la diminution très rapide du Fe^{2+} peut

interrompre la production des radicaux hydroxyles. En effet la constante cinétique de réaction entre le Fe^{2+} et les radicaux $^{\bullet}OH$ ($3{,}2\times10^{8}$ $M^{-1}s^{-1}$) est 10 fois supérieure à celle entre le H_2O_2 et $^{\bullet}OH$ les ($2{,}7\times10^{7}$ $M^{-1}s^{-1}$). Ainsi, la régénération continuelle du Fe^{2+} est nécessaire pour une production des $^{\bullet}OH$. Cependant, l'excès de Fe^{2+} par rapport au H_2O_2 entraîne sa précipitation sous forme de $Fe(OH)_3$.

1.2.6 Inconvénients de la réaction Fenton

La réaction de Fenton présente un certain nombre d'inconvénients *(Cordova Villegas et al., 2016; Jie He et al., 2016)*:

a. La nécessité de l'apport en continu du Fe^{2+} (catalyse très lente en présence de l'excès de H_2O_2 par la réaction) :

$$Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + H^{+} + HO_2^{\bullet} \qquad (Eq.1.11)$$

b. La nécessité d'opérer dans un milieu à pH avoisinant 3. C'est une technique très limitée par la gamme de pH ;

c. L'usage de doses élevées de réactifs pour oxyder certaines classes de composés organiques ;

d. La production des boues d'hydroxydes ferriques $Fe(OH)_3$.

e. La consommation des radicaux $^{\bullet}OH$ par les réactions parasites génère des produits très toxique par rapport au substrat à traiter (phénol) elle-même comme l'hydroquinone, benzoquinone et le catéchol.

f. Un pH3 et un rapport élevé de H_2O_2/ Fe^{2+}sont requis pour mener le procédé Fenton avec le minimum de réactions parasites.

Ces inconvénients font que depuis plusieurs années de nombreuses études s'intéressent au couplage de cette réaction à d'autres techniques, par exemple: Fenton-Électrochimie (Électro-Fenton), Fenton-Photochimie (Photo-Fenton : H_2O_2/Fe^{2+}/UV)*(Oller et al., 2011 ; Jie He et al., 2016)* et Fenton-Biologique*(Zimbron et Reardon, 2011)*, dans le but de traiter efficacement la pollution organique en milieu aqueux, en se basant sur la complémentarité cinétique et mécanistique des deux procédés *(Oller et al., 2011)*.

1.3 TRAITEMENT ENZYMATIQUE DU PHÉNOL

L'utilisation des enzymes est une alternative intéressante pour le traitement de la pollution phénolique *(Capasso et al., 1995; El Hajjouji, 2007)*. La catalyse enzymatique présente des avantages par rapport à la catalyse chimique en raison des excellentes propriétés sélectivité et de la spécificité des enzymes *(Mateo et al., 2007)*. Ce choix a été encore motivé par les récents progrès en biotechnologie qui permettent la production d'enzymes en grande quantité et à moindre coût *(Karam et Nicell, 1997)*. Par ailleurs, les avantages multiples que présente la technique d'immobilisation des enzymes a permis leur mise en œuvre rentable et efficace lors du traitement des effluents à l'échelle industrielle (*Duran et Esposito 2000; Karam et Nicell, 1997)*.

En effet, la peroxydase, une oxydoréductase puissante et abondante, figure parmi les enzymes les plus utilisées pouvant catalyser la réaction d'oxydoréduction de composés organiques, notamment les phénols et leurs dérivés, en présence d'agents oxydants tels que les peroxydes. Le phénol est ainsi polymérisé en o, o'-biphénol*(Gaspar et al., 1982)*. De la même manière, l'hydroquinone est transformée en p-benzoquinone *(Manjeet et Mani, 1985; Noritomi et al., 1988)* et le catéchol en semiquinone *(Mason et al.,1961; Kalyanaraman et Sealy, 1982; Ferrari et Laurenti,1993)* ou l'o-benzoquinone *(Sadler et al., 1988; Luigi et al., 2010)*, respectivement comme indiqué par les réactions illustrées sur la figure 1.10:

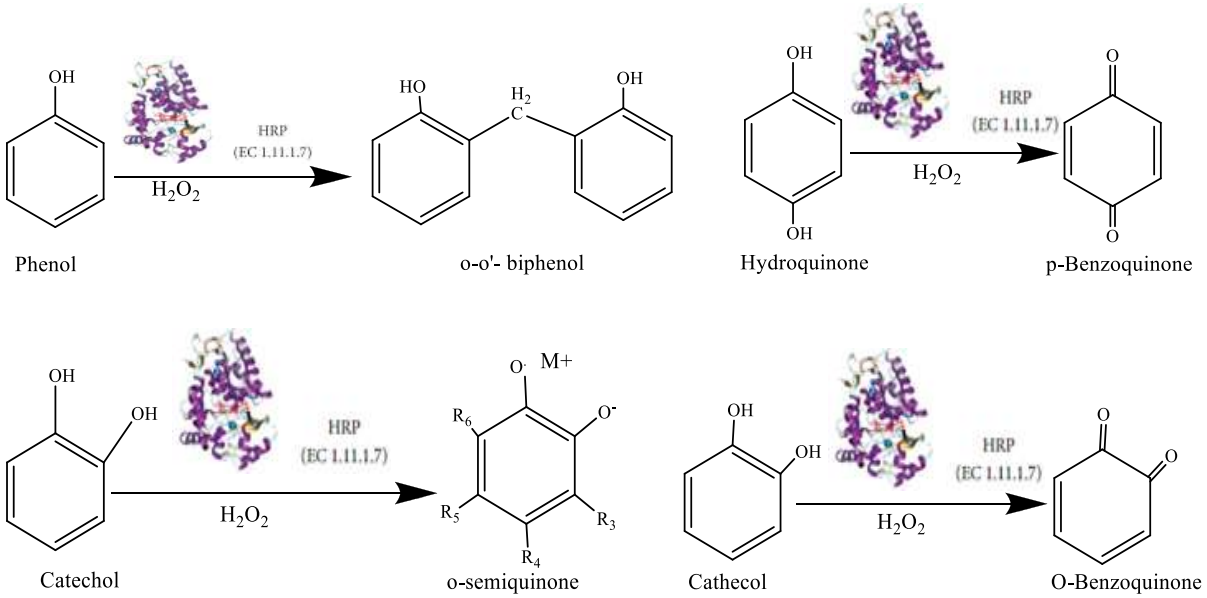


Fig.1.10. Polymérisation enzymatique des composés générés par la réaction Fenton.

1.3.1 La peroxydase

Les peroxydases sont des oxydoréductases produites par un certain nombre de microorganismes et de plantes. Ils catalysent une variété de réactions, mais ils exigent tous la présence de peroxydes tels que le peroxyde d'hydrogène pour les activer (H_2O_2). Le peroxyde d'hydrogène oxyde d'abord l'enzyme qui, à son tour, oxyde le substrat. Les peroxydases qui ont été utilisées pour le traitement à l'échelle de laboratoire des contaminants aromatiques aqueux *(Gaspar et al., 1982)*. Ce sont des protéines d'hème et contiennent du fer (III) protoporphyrine IX en tant que groupe prosthétique. Ils ont un poids moléculaire allant de 30 à 150 kDa. Le terme peroxydase représente un groupe d'enzymes spécifiques, tels que *NADH peroxydase* (EC 1.11.1.1), *la glutathion peroxydase* (EC1.11.1.9) et *l'iode peroxydase* (EC 1.11.1.8), ainsi que d'une variété d'enzymes non spécifiques qui sont tout simplement connu sous le nom peroxydases *(Neelam et Shamsher, 2013)*.

Les peroxydases sont abondantes dans la nature. On pourra les trouver dans le règne animal ou végétal, comme on peut les trouver dans les différentes espèces de microorganismes *(Shannon et Bartha, 1988)*.

La peroxydase extraite à partir les racines de raifort (Horse Radish Peroxidase ou HRP) (*Amoracia rusticana*) et classée parmi le groupe des peroxydases de ferriprotoporphyrine a été étudiée et utilisée d'une manière exhaustive. HRP est constituée de 208 résidus d'acides aminés, un groupe prothétique, deux ions calcium par molécule et un hème ferrique (fer protoporphyrinetype IX). L'hème ferrique constitue le site actif responsable de l'oxydation des molécules de substrat *(Shannon et Bartha, 1988)*, voir les figures 1.11 et 1.12.

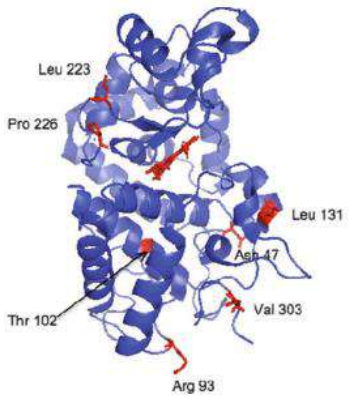


Fig. 1.11. Structure 3D de la peroxydase de raifort *(Morawski et al.,2000).*

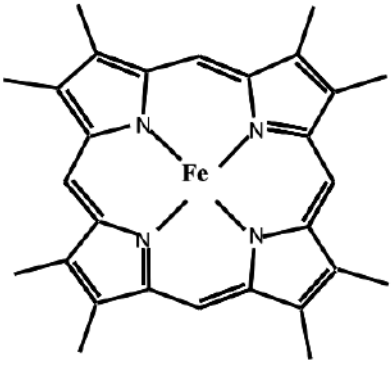


Fig.1.12. Structure moléculaire du site actif dans l'enzyme d'HRP *(Shannon et Bartha, 1988).*

Il existe différents types de peroxydases susceptibles d'être utilisées pour l'oxydation des composés phénoliques parmi lesquelles on trouve la peroxydase de raifort, horseradish peroxydase (HRP), est la Lignine-peroxydase (Lip) *(Duran et Esposito, 2000; Karam et Nicell, 1997)*. La peroxydase de raifort (EC.1.11.1.7) est la plus utilisée pour le traitement des effluents *(Cheng et al., 2006; Cooper et Nicell, 1996; Gomez, 2006; Qingguo et Walter, 2005; Wagner et Nicell; Yu et al., 1994)* vu son activité sur une large gamme de pH et de températures *(Cheng et al., 2006; Karam et Nicell, 1997)* ainsi que sur les dérivés de type chlorophénols et méthylphénols *(Wagner et Nicell, 2001)*. *La lignine peroxydase* (EC.1.11.1.14) est quant à elle, utilisée pour la dégradation des composés généralement présents dans les effluents issus des industries de fabrication de l'huile et de papier (i.e. le catéchol, le 4-chlorocatechol, le 4.5- dichlorocatechol et le 4- méthyl catéchol… etc) *(Cohen et al., 2009)*.L'activité de la peroxydase de raifort est liée en premier lieu à la concentration du substrat phénolique ainsi qu'à la dose de peroxyde d'hydrogène *(Cheng et al., 2006; Gomez et al., 2006; Qingguo et Walter, 2005)*.

1.3.2 Facteurs affectant la médiation de la peroxydase lors de l'élimination des composés phénoliques

Il existe de nombreux facteurs qui influent sur l'élimination des composés phénoliques dans les réactions catalysées par la peroxydase. Ceux-ci comprennent le pH, la température, la concentration d'enzyme, la concentration de substrat de la solution et la force ionique de la solution.

1.3.2.1 Effet de pH

Le pH de la solution est un facteur important pour les réactions enzymatiques *(Wu et al., 1997)*. De nombreux chercheurs ont rapporté les effets du pH sur l'efficacité catalytiques des systèmes enzymatiques *(Aitken et al., 1989; Dec et Bollag, 1990; Nakamoto et Machida, 1992; Nicell et al., 1993a; Wu et al., 1993; Bewtra et al,. 1995; Wright et Nicell, 1999; Duarte-Vázquez et al. 2003; Xu 2002)*. *Dec et Bollag (1990)* ont rapporté que le pH affecte à la fois l'enzyme et le substrat au cours de l'oxydation catalysée par l'HRP de 4-chlorophénol et le 2,4-dichlorophénol (2,4-DCP). *Klibanov et al. (1983)* ont rapporté un pH optimal de 9,0 pour traiter les phénols issus de l'industrie du charbon à l'aide de HRP.

Le pH optimal pour l'élimination de 2,4-dichlorophénol a été observé à 6,5 lors de l'utilisation de HRP *(Bewtra et al., 1995)* et de 8,2 avec la peroxydase de soja *(Kennedy et al., 2002)*.

La peroxydase de navet *(Turnip peroxidase)* a été aussi utilisée avec succès pour éliminer les composés phénoliques tels que le phénol, le 2-chlorophénol, 3-chlorophénol, le o-crésol, le m-

crésol, le 2,4-DCP et le bisphénol-A *(Duarte-Vazquez et al., 2003)*. Plus de 85% des dérivés de phénol ont été éliminés pour des valeurs de pH variant entre 4 et 8. Cette gamme est indépendante de la nature du composé phénolique *(Budavari, 1989; Nicell et al.,1992).* Néanmoins, certains cas ont été détectés où la valeur optimale du pH pouvait atteindre 9, tel que le cas de dégradation du phénol parla peroxydase de *Coprinus cinereus* purifiée *(Masuda et al., 2002)*.

1.3.2.2 Effet de peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène **(**H_2O_2) est un co-substrat essentiel pour l'oxydation de phénols avec la médiation de l'HRP. L'activité des peroxydases est largement déterminée par le rapport des concentrations molaires de H_2O_2 au substrat et les conditions de réaction. À titre d'exemple, l'efficacité maximale d'élimination de l'o-chlorophénol (1 mM) est atteinte pour une concentration de H_2O_2 supérieure à 1 mM (*Klibanov et al., 1980)*. L'oxydation enzymatique par la HRP pour d'autres produits aromatiques, a été réalisée avec un rapport molaire optimal [H_2O_2]: [substrat] de 1:1 *(Nicell et al., 1992)*. Le même rapport a été obtenu avec la peroxydase de Soja *(Bassi et al., 2004 ; Miland et al.,1996)*. De leur part, *Caza et al. (1999)* ont étudié l'efficacité d'élimination des composés phénoliques existantes dans l'eau usée synthétique utilisant la peroxydase de soja (SBP) avec un rapport molaire optimal [H_2O_2]/ [Substrats] de 0.6 pour des concentrations de l'ordre de 3- 70 mM de chlorophenol, alors que le rapport optimal obtenu dans le cas du phénol et du bisphénol était de 1.2. Ils ont également signalé l'inactivation du SBP pour des rapports plus élevés de [H_2O_2]/[Substrats].

Avec la peroxydase extraite de navet blanc, *Duarte-Vazquez et al. (2003)* ont rapporté l'élimination maximale de composés phénoliques à un rapport molaire [H_2O_2]/[Composé phénolique] de 1,6. Les concentrations supérieures à 1,2 mM en H_2O_2 peuvent provoquer une inhibition de l'enzyme par oxydation irréversible du groupe Ferrihème. Cette inactivation est due à la formation de sous-produits qui qui bloquent les sites actifs de la peroxydase *(Nicell et al.,1995 ; Flock et al., 1999 ; Kennedy et al., 2002)*.

Le rapport de la concentration de H_2O_2 à l'activité de HRP a été également étudié dans le cas de l'oxydation du phénol pour des concentrations en substrat allant de 1 à 10 mM. Le rapport optimal [H_2O_2] /[HRP] a été observé entre 10 et 25 *µmol/unité* d'activité.

La transformation enzymatique du phénol, o-chlorophénol, trichloro-2,4,6 phénol et pentachlorophénol a été efficacement menée en présence de HRP sous des conditions similaires dans une gamme de pH de 6,0 à 7,0, pour un rapport molaire [H_2O_2]/[Phénol]de 1: 1, et une durée d'incubation de 1 à 3 heures *(Davidenko et al., 2004)*.

1.3.2.3 Effet de l'ajout d'additifs

Le processus de traitement enzymatique souffre occasionnellement de l'inactivation au cours de la réaction et nécessite l'ajout ou l'élimination de certains composés pouvant affecter la réaction enzymatique *(Klibanov et al., 1983; Nakamoto et Machida, 1992; Baynton et al., 1994; Caza et al., 1999; Ibrahim et al., 2001)*. L'inactivation partielle ou totale de l'enzyme pendant la réaction de polymérisation a pour conséquence la perte d'efficacité et un surplus du coût d'exploitation. Vu que des quantités importantes en enzyme seront nécessaires pour faire face aux phénomènes d'inactivation dues à la présence de certains composés dans le milieu réactionnel *(Karam et Nickell, 1997; Cooper et Nicell, 1996)*.

Klibanov et al. (1983) ont émis l'hypothèse que le mécanisme principal d'inactivation a été causée par l'adsorption des produits de polymérisation sut les sites actifs de l'enzyme empêchant le substrat d'accéder au site actif de l'enzyme. *Nakamoto et Machida (1992)* ont également postulé que cette interaction modifie la configuration géométrique de l'enzyme. *Wagner et Nicell (2001a)* ont également signalé inactivation de HRP due à des produits de réaction et à la concentration en excès de H_2O_2. De nombreux chercheurs ont conclu qu'une combinaison de ces mécanismes entraîne l'élimination de la capacité catalytique de HRP pendant la réaction.

Ce phénomène pourrait être diminué en stabilisant l'enzyme par l'ajout d'additifs hydrophiles tels que le borate, la gélatine ou le polyethylène glycol (PEG), étant donné que ces additifs semblent avoir une plus grande affinité pour les groupes hydroxyle des produits polymériques *(Wu et al., 1994; Zhang et Nicell, 2000; Kinsley et Nicell, 2000)*.

Nakamoto et Machida (1992) ont obtenu une réduction du phénomène d'inhibition en utilisant la gélatine qui peut être l'additif de choix vu qu'elle est moins dépendante du pH en la comparant avec le PEG.

Wu et al. (1993) ont évalué l'élimination du phénol par l'HRP à de faibles concentrations (de 50 à 1500 mg L^{-1}) et indiqué que la quantité d'enzyme nécessaire a été réduite de 15 à 75 fois à l'aide de la gélatine et du PEG. Il a été également démontré que le PEG réduit la quantité d'enzyme nécessaire pour atteindre un taux de dégradation du phénol de 97 à 99% dans les eaux usées *(Cooper et Nickell 1996)*. Une augmentation du rendement d'élimination du 2, 4-dichlorophénol allant de 10 à 50 fois a été signalée en présence de PEG-3350 ou le PEG-8000, respectivement *(Kennedy et al., 2002)*.

Le chitosane a été aussi introduit d'une manière efficace *(Sun et al., 1992)* pour faire une liaison covalente avec les quinones, qui ont été identifiés comme étant un sous-produit inhibiteur de la réaction de l'enzyme HRP lors de l'oxydation des phénols.

1.3.2.4 Effet de la force ionique de la solution

L'effet de la force ionique reste un aspect peu étudié *(Huang et al., 2005)*. Une variété de solutions tampons ayant des forces ioniques différentes ont été utilisées dans la réaction de polymérisation du phénol par l'HRP. À titre d'exemple, *Kazunga et al. (1999)* ont utilisé de tampon phosphate (pH 6,0- 67 mM), tandis que *Zhang et Nicell (2002)* ont utilisé le solution tampon de phosphate de sodium monobasique et dibasique 0,1- (pH6,0 – 0,1 mM). *Wu et al., (1993)* ont démontré un effet protecteur de la solution tampon de borate pour augmenter l'élimination du phénol.

Huang et al., (2005) ont étudié l'effet d'ions dans le milieu réactionnel sur la précipitation de produits de la réaction d'oxydation du phénol catalysée par l'enzyme. Ils ont observé que la quantité de produit précipité a augmenté de façon significative lors de l'ajout de chaque sel, ce qui indique que certains produits dissous deviennent plus précipitables lorsque les concentrations des ions augmentent. La quantité de produit précipité a augmenté deux fois de plus avec une concentration de sel de 10 mM (chlorure de sodium et chlorure de potassium) par rapport à celle obtenue en absence du sel. Cependant, aucune autre amélioration n'a été observée pour des concentrations plus élevées en sel.

La présence de certains constituants dans les eaux usées lors de la polymérisation enzymatique du phénol a été étudiée par *Wagner et Nicell (2002)*. Il a été constaté une inhibition de la transformation du phénol en présence de fortes doses (supérieures à 0.05 M) de sulfures, cyanures, chlorure de sodium, de chlorure de calcium, chlorure de magnésium, chlorure d'ammonium et de sulfate d'ammonium. L'augmentation de la concentration de H_2O_2 réduit l'inhibition par les sulfures, mais pas par les cyanures.

1.3.2.5 Effet de la température

Ce paramètre influence à la fois la vitesse enzymatique, la stabilité de l'enzyme (l'inhibition ou la dénaturation) et celle du peroxyde d'hydrogène (*Mohsina et Khalil-ur-Rehman, 2009)*. D'après la littérature *(Mohsina et Khalil-ur-Rehman, 2009 ; Zhang et al., 2007; Jean Karam et James Nicell, 1997)*, les meilleur pourcentage d'élimination des composés phénoliques (phénol, pentachclorophénol, ...etc.) par la peroxydase d'HRP soluble ou immobilisée correspond aux températures entre 30 et 45 °C.

1.3.2.6 Effet de la concentration d'enzyme

Le pourcentage de conversion des phénols est proprement proportionnel avec la concentration initiale d'enzyme et ce dernier est proprement proportionnel avec la dose initiale traité en phénols *(Alemzadeh et Nejati, 2009)*. Cette relation a été démontré par plusieurs auteurs tels

que *Alemzadeh et Nejati, (2009); Zhang et al., (2007) et Gomez et al.,(2006)* lors l'utilisation d'enzyme d'HRP.

1.3.3 Cinétique enzymatique

Les cinétiques de réactions enzymatiques peuvent être exprimées par le modèle de Michaelis-Menten:

$$E + S \leftrightarrow ES \qquad (Eq.1.12)$$

$$ES \leftrightarrow E + P \qquad (Eq.1.13)$$

Où E est l'enzyme, S est un substrat, ES est le complexe enzyme-substratet P est le produit de réaction.

L'enzyme réagit avec le substrat pour former un complexe réversible enzyme-substrat dans la première étape. Le complexe produite alors se décompose pour produire l'enzyme libre et le produit P dans une seconde étape *(Lehninger et al., 1993)*.

L'équation de Michaelis-Menten est la forme algébrique simple et idéalisée d'une hyperbole rectangulaire qui affiche la saturation. Pour les réactions enzymatiques à substrat unique, la vitesse de la réaction enzymatique selon le l'équation de Michaelis-Menten est donnée comme suit :

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \qquad (Eq.1.14)$$

Où v_o est la vitesse initiale (d[P]/dt et –d[S]/dt), v_{max} est la vitesse maximale de réaction, K_M est la constante de Michaelis-Menten, et S est la concentration du substrat. Ainsi, la constante K_M est la concentration du substrat à laquelle la vitesse initiale est la moitié de sa valeur maximale.

1.3.4 Immobilisation des enzymes

L'immobilisation des enzymes est leur fixation ou rétention dans une matrice poreuse dans le but de conserver leur activité et de pouvoir les réutiliser *(Sumitra Datta et al., 2013 ; Guisan, 2013)*. En effet, le cout et l'efficacité du procédé enzymatique est étroitement lié à la stabilité et à la récupérabilité de l'enzyme vu que son cout est parfois élevé et qu'il sera difficile ainsi d'envisager une mise en œuvre à l'échelle industrielle *(Andriola Silva Brun-Graeppi, 2011)*.

L'immobilisation permet la mise en œuvre en continu d'un procédé, économique, automatisable ainsi que la récupération du produit avec une grande pureté *(D'Souza, 1998)*.

1.3.4.1 Méthodes d'immobilisation

Les enzymes peuvent être immobilisées soit par rétention physique, soit par liaison chimique. On peut aussi combiner les deux méthodes pour assurer une meilleure fixation de l'enzyme. La rétention physique exploite la grande différence de taille entre l'enzyme et le substrat, d'où l'idée de créer une barrière semi-perméable pour retenir l'enzyme. Elle peut être un réseau, une capsule ou une membrane *(Zaborsky, 1974)*. La liaison chimique entre l'enzyme et le support se réalise soit par simple interaction ionique (adsorption), soit par création d'une vraie liaison covalente (fixation covalente sur support activé et coréticulation).

L'immobilisation chimique présente souvent l'avantage de stabiliser la protéine et de permettre une utilisation prolongée *(We et al., 1974)*. Le choix d'une technique d'immobilisation dépend de l'application finale donnée à l'enzyme.

Les principales méthodes d'immobilisation sont *(Guisan, 2013)* :

a) L'adsorption physique. Elle se réalise sur des supports inertes (verres, cellulose, charbon actif). La fixation se fait par interaction des groupes fonctionnels de l'enzyme et du support (liaison hydrogène, forces de Van der Waals, interaction ionique...). Cette adsorption exige des conditions de pH et de force ionique très précises. La moindre variation d'un de ces paramètres provoque une désorption, ce qui présente l'inconvénient majeur de cette technique.

b) La fixation sur résines échangeuses d'ions. Les enzymes sont porteuses de charges. Elles peuvent donc se lier avec des échangeurs d'ions par liaison électrostatique. Il existe différents types d'échangeurs cationiques *(Ex. Carboxyméthyl Cellulose)* et anioniques *(Ex. Diéthylaminoéthyl Cellulose)*. Cette fixation est réversible, les conditions opératoires, principalement pH et force ionique, ne doivent pas varier sous peine de désorption.

c) L'inclusion dans un gel. L'enzyme est emprisonnée à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme et permet la diffusion du substrat.

d) La liaison covalente avec le support. Cette immobilisation est réalisée par l'intermédiaire de liaisons irréversibles et covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupes réactifs du support. Ces groupes, en général insuffisamment réactifs, nécessiteront une activation préalable. A priori, il faut activer soit l'enzyme, soit le support. Pour des raisons qui tiennent à la difficulté de maintenir l'activité de l'enzyme (l'activation des

groupes fonctionnels de l'enzyme peut conduire à la dénaturation de l'enzyme) et aussi à la faible réactivité chimique des acides aminés (amine primaire, acide carboxylique, parfois thiol, phénol, hydroxyle), on choisit généralement d'activer le support.

e) La réticulation et la co-réticulation. Le procédé consiste à associer l'enzyme et une protéine de charge à l'aide d'un agent bi ou multifonctionnel. Le complexe formé possède une masse moléculaire élevée et est insoluble. Le plus souvent, la protéine de charge est l'albumine du sérum bovin et l'agent réticulant le glutaraldéhyde ou sa forme polymérisée *(Richards et Knowles, 1968)*. La forme polymérisée résulte d'une condensation aldolique avec perte d'eau. Cet agent bi fonctionnel possède à ses extrémités deux groupements aldéhyde capables de réagir avec les fonctions amine des protéines.

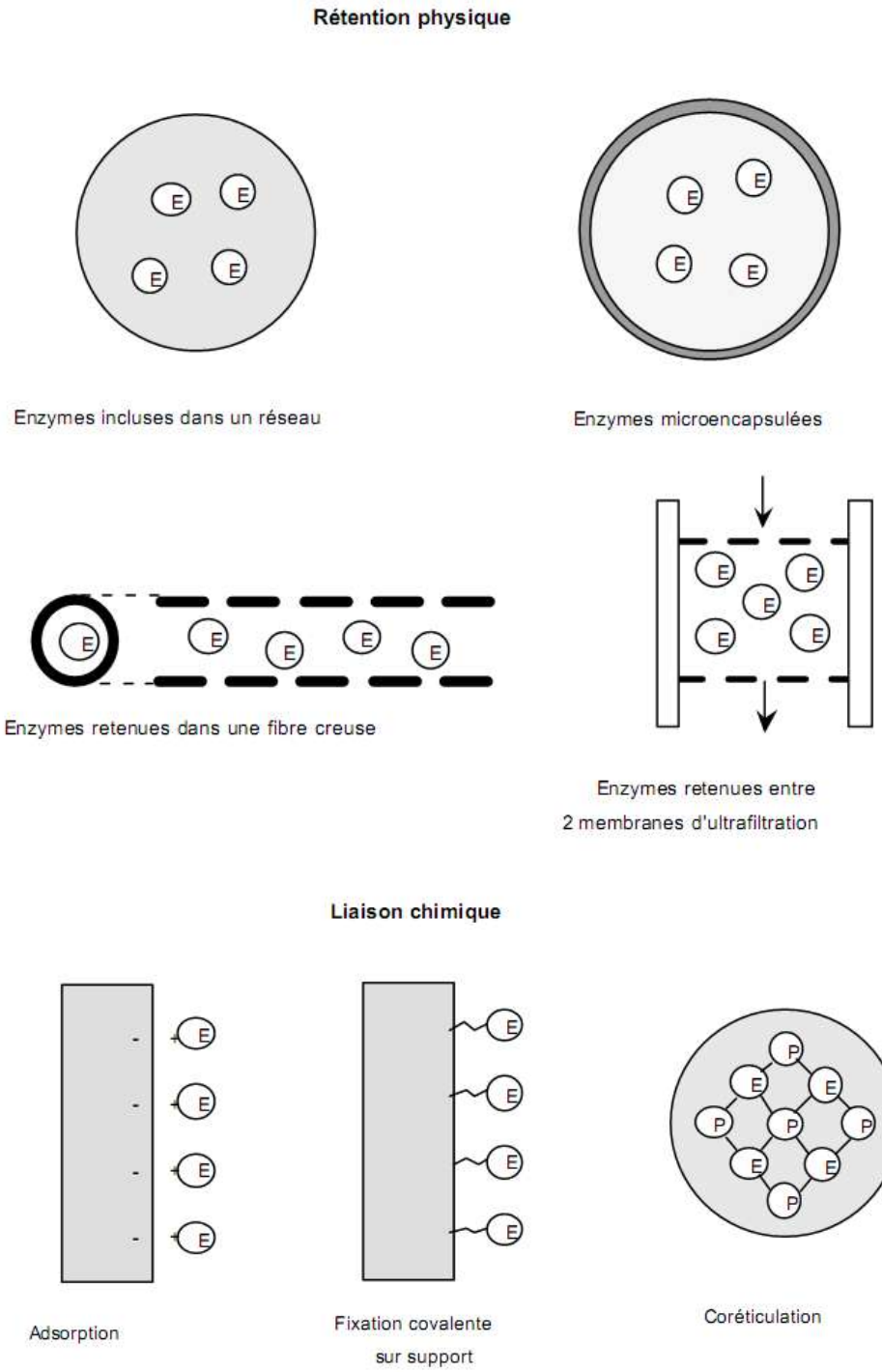


Fig. 1.13. Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes *(Zaborsky, 1974; Richards et Knowles, 1968 ;Weetal., 1974).*

1.3.4.2 Supports d'immobilisation

Des polymères et des matières inorganiques inertes sont habituellement utilisés comme matrices de support. En plus d'être disponible et économiquement abordable, une matrice

idéale doit englober des caractéristiques spécifiques comme l'inertie, la stabilité mécanique, la stabilité chimique, la régénérabilité, la faible toxicité, la capacité à augmenter la spécificité d'enzyme/activité et de réduire les problèmes d'inhibition *(Singh, 2009)*.

Plusieurs critères interviennent dans le choix de support d'immobilisation *(Mateo et al., 2007)*:

- La nature de l'enzyme.
- Le domaine d'application de l'enzyme.
- Le coût du support.
- La compatibilité et la stabilité du support vis-à-vis l'enzyme.

Les supports d'immobilisation peuvent être classés selon leur nature en deux grandes catégories (voir le tableau 1.2).

Tableau 1.2. Quelques supports d'immobilisation des enzymes *(Mateo et al., 2007)***.**

Supports organiques	**Supports inorganiques**
Polymères naturels • Polysaccharides : cellulose, dextrines, agar, agarose, chitine, alginate. • Protéines : collagène, albumine. • Charbon actif. *Polymères synthétiques* • Polystyrène • Autres polymères : polyacrylate polyméthacrylates, polyacrylamide, polyamides, vinyle, et allyle-polymères	*Minéraux naturels* : silice, bentonite *Matériaux traités* : verre (poreux et non poreux), métaux, Oxydes métalliques

1.3.4.3 Facteurs influençant la performance des enzymes immobilisées

Divers facteurs influençant la performance des enzymes immobilisées (tableau 1.3).

Table 1.3. Facteurs influencent la performance des enzymes immobilisées *(Cao, 2006)*.

Facteurs	Conséquences d'immobilisation
• Partition hydrophobe • Microenvironnement de support • Attachement multipoint de support • Empêchement de la désactivation d'enzyme • Contraintes de diffusion • Présence de substrats ou d'inhibiteurs • Post de traitements physiques • Différentes formes de liaison • Activité et la stabilité peuvent être affectées • Structure physique du support tel que la taille des pores • La nature physique du support	• Amélioration de la vitesse de réaction de substrat hydrophobe. • La nature hydrophobe de support stabilise l'enzyme. • Amélioration de la stabilité thermique de l'enzyme. • Espacement et outil pour des différents types d'enzymes à immobilisées. • L'activité enzymatique diminue et la stabilité augmente. • La rétention d'activité plus élevé. • L'amélioration de la performance d'enzyme. • L'activité et la stabilité peuvent être affectées. • La rétention d'activité enzymatique était souvent dépendue de la taille de pores de support. • Porté dont les pores de grande taille causer une limitation de la diffusion, et conduisant une meilleure rétention de l'activité enzymatique.

1.3.4.4 Choix de la méthode d'immobilisation

Le tableau 1.4 suivant représente une brève comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation des enzymes:

Tableau 1.4. Comparaison entre les différentes techniques d'immobilisation des enzymes *(Chaplin 2014)*.

Caractéristiques	Adsorption	Liaisons covalentes	Inclusion	Encapsulation
Réalisation	Facile	Difficile	Difficile	Facile
Coût	Faible	Élevé	Moyen	Élevé
Énergie de liaison	Variable	Forte	Faible	Forte
Fuite d'enzyme	Oui	Non	Oui	Non
Utilisation	Large	Sélectif	Large	Très large
Problèmes d'exécution	Élevés	Faibles	Élevés	Élevés
Effets de matrice	Oui	Oui	Oui	Non
Importantes barrières diffusionnelles	Non	Non	Oui	Oui
Protection microbienne	Non	Non	Oui	Oui

D'après le tableau 1.4, nous pouvons opter pour l'utilisation d'une méthode d'immobilisation ou une autre, et cela suivant les caractéristiques techniques et économiques qui nous intéressent. Beaucoup de facteurs doivent être pris en considération dans le choix de la méthode d'immobilisation. Parmi ceux-ci, on peut citer :

- *La nature chimique de la réaction catalysée ;*
- *Le coût et la stabilité des réactifs et du biocatalyseur mis en jeu ;*
- *L'influence des traitements nécessaires à l'immobilisation sur l'activité et la stabilité de l'enzyme ;*
- *Le rendement et le degré de pureté voulus.*

Donc, il faut trouver un compromis entre toutes ces contraintes. Nous pouvons dire que l'immobilisation par inclusion apparaît comme une solution convenable par son coût, sa stabilité ainsi que sa facilité de réalisation c'est ce qui fait qu'elle est communément utilisée.

1.3.4.5 Propriétés des enzymes immobilisées

L'immobilisation des enzymes conduit souvent à un changement de leurs propriétés cinétiques. Une des propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation est l'amélioration de la stabilité dans le temps et de la résistance vis-à-vis de la dénaturation. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend beaucoup du microenvironnement imposé par le support. Ainsi, les enzymes fixées par liaison sulfamide sont moins stables que celles fixées par liaison azo *(Fabiano, 2002).*

1.3.4.6 Effet de l'immobilisation des enzymes sur la cinétique

Les propriétés cinétiques d'une enzyme immobilisée ne sont pas parfaitement corrélées à celles de l'enzyme libre *(Guisan, 2013).* La diminution du transfert de masse du substrat dans le support résultant de l'immobilisation, augmente la valeur du K_M de l'enzyme. Il s'ensuit que le domaine correspondant à la cinétique de premier ordre de l'enzyme vis-à-vis du substrat est plus étendu.

De plus, l'orientation stérique de l'enzyme fait que le site actif ne peut être que partiellement accessible, voire inaccessible au substrat : en d'autres terme, l'enzyme est maintenue dans une conformation telle que la fonction catalytique est partiellement ou totalement bloquée.

Enfin, le microenvironnement de l'enzyme, tel qu'il est déterminé par le support lui-même, a une influence importante sur les paramètres cinétiques. Une explication de ce type de comportement serait une inactivation du support lui-même avec le site actif *(Cao, 2006).*

Toutes les enzymes ont un pH optimum auquel elles présentent une vitesse de réaction maximale. Quand l'enzyme est immobilisée, le pH optimum peut se décaler suivant la nature et la charge positive ou négative du support. Par exemple, un support chargé négativement peut entrainer un pH de la couche enzymatique plus faible que celui du pH du milieu. En conséquence, on observe un décalage du pH optimum vers une zone plus alcaline pour compenser l'augmentation locale de la concentration en protons. On constate que l'effet est contraire pour un support chargé positivement *(D'Souza, 1998)*.

1.3.4.7 L'Alginate de calcium, support de choix

L'alginate est un polysaccharide présent chez les algues brunes ou *Phaeophyceae*, sous forme d'un mélange de sel (sodium, potassium, calcium, magnésium) et d'acide alginique. L'acide alginique est un polymère constitué de résidus d'acides uroniques : acides á-L-guluronique(G) et â-D-mannuronique(M). Puisque c'est le composant squelettique des algues, il a la propriété d'être mécaniquement stable tout en étant flexible *(Alloue et al., 2008)*.

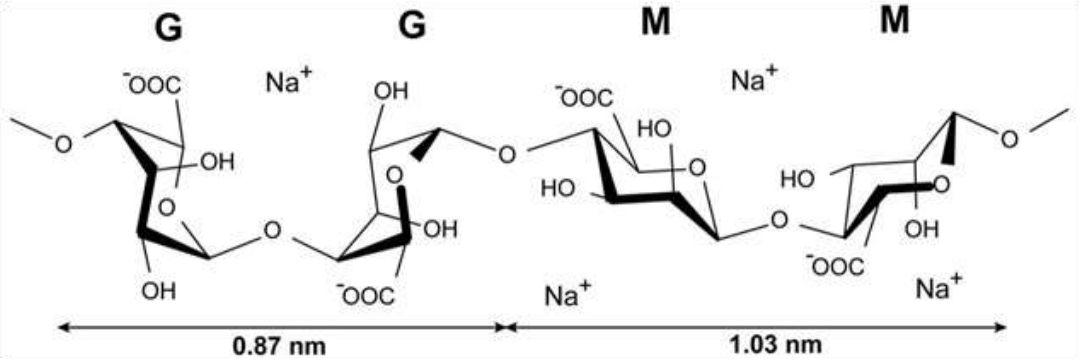


Fig.1.14. Structure de l'alginate de calcium *(Alloue et al., 2008)*.

L'alginate est l'un des polymères le plus fréquemment utilisé pour l'immobilisation par inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non-toxicité, sa biodégradabilité, sa simplicité de mise en œuvre et son abondance dans la nature d'où son faible coût d'élaboration *(Levic et al.,2013)*.

1.4 COUPLAGES DE POA AVEC LES TRAITEMENTS BIOLOGIQUES POUR LA DÉCONTAMINATION DES EAUX USÉES

Les principales voies d'élimination naturelle des composés toxiques dans les eaux usées sont la biodégradation et la photodégradation *(Zimbron et Reardon, 2011)*. La photodégradation, qui est un mécanisme important pour l'élimination des hydrocarbures aromatiques, des hydrocarbures aromatiques chlorés, des phénols chlorés, et de nombreux pesticides, peut être effectuée par photolyse directe ou indirecte *(Ito et al., 1998)*.

La dégradation biologique d'une substance chimique se réfère à l'élimination des polluants par l'activité métabolique des organismes vivants, généralement des micro-organismes (bactéries et champignons) du sol ou de l'eau, par le biais d'enzymes spécifiques qui catalysent leurs transformations partielles ou leur minéralisation totale sous des conditions modérées de température et de pH en présence de certains éléments nutritifs. Néanmoins, les procédés biologiques classiques ne donnent pas toujours des résultats satisfaisants, en particulier pour le traitement des eaux usées industrielles, puisque la plupart des substances organiques produites par l'industrie chimique sont toxiques ou résistantes au traitement biologique *(Steber et Wierich, 1986; Bowers et al., 1989; Adams et al., 1996; Pulgarín et Kiwi, 1996; García et al., 2001; Muñoz et Guieysee, 2006; Lapertot et al., 2006)*. La transformation biologique peut également être réalisée en présence d'enzymes, à la place des cellules de microorganismes, dans des conditions plus pratiques visant à convertir les molécules du polluant en composés moins toxiques pendant une durée plus courte en comparaison avec la conversion par les microorganismes. Cependant, la réaction enzymatique est limitée par le rendement et par sa finalité vue que les enzymes catalysent une réaction spécifique et qu'il est impossible d'atteindre une minéralisation totale du composé *(Torres et Ayala, 2010)*.

Par conséquent, une option possible et plus efficace pour ces eaux usées biologiquement persistantes est l'utilisation des technologies avancées basées sur l'oxydation chimique, tels que les procédés d'oxydation avancée (POA). Largement reconnues comme traitements très efficaces pour les eaux usées contenant des composés récalcitrants. Ces processus oxydent les polluants organiques en présence de certains composés chimiques par voie oxydative ou radicalaire *(Balcioglu et al., 2001; Bhatkhande et al., 2002; Neyens et Baeyens,2003; Gonze et al., 2003; Sarria et al., 2004; García-Montaño et al., 2006a)*. Les POA sont des procédés possédant l'avantage d'être très réactifs et non sélectifs *(Gogate et Pandit2004a,b; Pera-Titus et al.,2004; Devipriyas et Yesodharan, 2005; Pignatello et al., 2006; Comninellis et al., 2008; Shannon et al., 2008)*.

L'oxydation chimique pour la minéralisation complète est généralement coûteuse parce que les intermédiaires d'oxydation formés pendant le traitement ont tendance à être de plus en plus résistants à la dégradation chimique complète. En outre, ils ont tous consommateurs d'énergie (rayonnement, électrique, etc.) et de réactifs chimiques (catalyseurs et oxydants) qui augmentent avec la durée du traitement *(Munoz et al., 2005)*.

Une alternative techniquement intéressante et économiquement attractive est de faire de procéder par un traitement limité par ces procédés d'oxydation chimique pour convertir les composés organiques initialement persistants en intermédiaires plus biodégradables et passer par la suite au traitement par oxydation biologique sous des conditions plus douces et moins onéreuses. Dans cette optique, plusieurs tentatives de couplage sont été étudiés, tels que les couplages : Électro/Fenton, Photo/Fenton et Fenton/Biologique *(Kearney et al., 1988; Haberl et al., 1991; Heinzle et al., 1992; Hu et Yu, 1994; Kiwi et al., 1994; Reyes et al., 1998; Mantzavinos et al., 1999; Pulgarín et al., 1999; Parra et al., 2000; Beltrán-Heredia et al., 2001; Sarria et al. 2003a)*. D'autres recherches plus récentes ont prouvé que certains couplages de procédés chimiques-physiques pouvait améliorer la dégradation d'un contaminant persistant (Photo/Fenton, O_3/UV, H_2O_2/UV, TiO_2/UV, etc.) *(Liu et al., 2007; Comninellis et al., 2008; Klavarioti et al., 2009)*.

Le pourcentage de la minéralisation devrait être minime au cours de la phase de prétraitement afin d'éviter des dépenses inutiles de produits chimiques et de l'énergie, réduisant ainsi les coûts d'exploitation. C'est important vu, par exemple, que l'énergie électrique représente environ 60% du coût total d'exploitation de réacteurs photocatalytiques *(Bandara et al., 1997)*. Cependant, si le temps de prétraitement est trop court, les intermédiaires réactionnels générés pourraient encore être structurellement très similaires aux composés de départ, peu biodégradables et/ou toxiques.

Des exemples expérimentaux de traitement séquentiel par l'oxydation chimique et biologique depuis 2000 à ce jour ont été examinés *(Xiaodong Xu et al., 1995 ; Scott et Ollis, 1995 et 1997; Jeworski Henzle, 2000; Sarria et al., 2002; Mantzavinos Psillakis, 2004; Tabrizi et Mehrvar, 2005; Augugliaro et al., 2006; Ikehata et Gamal El-Din, 2006; Gaya et Abdullah, 2008)*.

D'un autre côté, Lorsque l'oxydation chimique préliminaire est appliquée dans une ligne de combinaison de traitements, son effet est parfois écologiquement non significatif ou même nocif même si elle est conceptuellement avantageuse du point de vue technico-économique.

Il y a plusieurs raisons à cela, les plus communs sont :

• formation de sous-produits stables, qui sont moins biodégradables que les molécules initiales.

• Le manque de la sélectivité pour une attaque préférentielle sur les fractions les plus biorésistantes des eaux usées lors de prétraitement chimique.

• Mauvaise sélection des conditions de traitement. Par exemple, la peroxydation excessive peut conduire à la production d'un effluent un peu métabolisé par les micro-organismes.

• Utilisation excessive de l'oxydant et/ou du catalyseur d'oxydation. Des composés tels que l'ozone et le peroxyde d'hydrogène (connu aussi comme biocide), des métaux, des oxydes métalliques et des sels métalliques (catalyseurs dans de nombreux procédés), qui sont normalement toxiques pour les micro-organismes.

1.4.1 Procédés couplés POA/Biologique pour l'élimination du phénol

La sélection de la meilleure option de traitement spécifique des eaux usées industrielles est une tâche très complexe. Le choix d'un ou plusieurs processus à combiner dans une certaine situation dépend des normes de qualité à respecter ainsi que de l'efficacité et le cout global du traitement. Par conséquent, les principaux facteurs qui doivent être considérés dans la décision sur les technologies de traitement à appliquer sont les suivants :

• *La qualité de l'eau usée d'origine.*

• *L'efficacité d'élimination des principaux contaminants par les différents procédés à couplés.*

•*La flexibilité de traitement*

• *La capacité de traitement.*

• *Le rendement économique.*

• *Évaluation du cycle de vie pour déterminer la compatibilité environnementale de la technologie de traitement de l'eau usée.*

• *Possibilité de recyclage de l'eau traitée.*

• *L'aspect synergétique entre procédés à coupler du point de vue mécanistique et compatibilité des conditions opératoires (voir la figure 1.15).*

La mesure de l'efficacité de processus combiné dépend de la finalité du traitement, mais nécessite normalement l'optimisation indépendante de chacune des étapes (chimique et biologique). Par exemple, l'étendue de la minéralisation des composés organiques peut être une mesure de l'efficacité si l'eau très pure est nécessaire ou un effluent avec une limite spécifiée de carbone organique dissous. Le but principal des autres traitements peut être la réduction de la toxicité ou l'élimination d'un polluant spécifique.

La détermination de l'objectif est une étape essentielle dans les études de combinaison, car il permet de définir l'efficacité de processus, de fournir une base pour comparer les différentes conditions de fonctionnement et pour optimiser le processus.

Le calcul de rendement d'élimination de chaque procédé individuel biologique et chimique est important pour déterminer les conditions de fonctionnement optimales pour le processus combiné *(Scott et Ollis, 1997)*. Cette tâche implique une connaissance approfondie des deux processus.

Par conséquent, plusieurs paramètres d'analyse doivent être surveillés au cours de chaque étape de la chaîne de traitement. Les paramètres chimiques mesurés sont la demande biologique (DBO_5) et chimique (DCO) en oxygène, la concentration de polluants spécifiques qui pourraient être présents dans l'eau usée (par des méthodes chromatographiques telles que l' HPLC, UV-vis), et l'analyse complète des hétéroatomes libérés (Cl, N, P ...) comme les espèces inorganiques (Cl^-, NO^{3-}, PO_4^{3-} ...) dans les milieux de contaminants complètement dégradées au cours du traitement par les POAs (utilisant la chromatographie ionique ou des tests commerciaux conçus pour chaque ions spécifique) *(Oller et al., 2011)*.

Concernant les essais biologiques, il est très important d'effectuer des analyses de toxicité (avec des organismes comme *Vibriofischeri, Daphnia* et les boues activées par le dosage respirométrique, etc.) et des tests de biodégradabilité (par des boues activées) afin d'assurer les conditions de passage entre les deux procédés de traitement POAs/Procédés biologiques. D'autres paramètres analytiques peuvent être déterminés afin de contrôler la performance du procédé de traitement biologique comme : les matières en suspension, les matières volatiles, le carbone organique total, la demande chimique en oxygène, le pH et l'oxygène dissous dans l'effluent, etc. La mesure d'anions et de cations présents dans les milieux biologiques est également essentielle, car, d'une part, les nutriments sont essentiels pour les populations de micro-organismes dans les boues activées, et d'autre part, le suivi des espèces d'azote fournit beaucoup d'informations liées à la nitrification et la dénitrification du milieu.

Cette série de paramètres analytiques satisfaites le besoin de l'ingénierie pour la conception d'une stratégie de couplage. Une meilleure compréhension des processus sous-jacents est demandée des méthodes d'analyse supplémentaires peuvent être appliquées, pour permettre

l'identification des produits intermédiaires inconnus de la dégradation de produits cible. Ces études impliquent un effort considérable, des équipements analytiques sophistiquées comme les méthodes chromatographies et la spectrométrie de masse *(Malato et al., 2009)*.

En général, les tests de toxicité ne nécessitent pas un fort investissement dans l'équipement ou la formation trop spécialisée dans leur traitement. Mais, il est aussi très important de mentionner qu'avant l'application de ces analyses de toxicité, aucune substance toxique qui pourrait être présente lors du prétraitement chimique (ozone, le peroxyde d'hydrogène, de grandes quantités de catalyseurs, etc.) doit être éliminée. Le pH de l'eau doit aussi à son tour être conservé entre 6,5 et 7,5. En effet, la plupart des POA font abaisser le pH en raison de la génération d'acides inorganiques. D'autres parts, un certain pH doit être maintenu afin de maximiser leur efficacité de traitement (par exemple, pH autour de 3 pour Fenton ou le pH d'environ 9 pour l'ozone), ce qui nécessite la neutralisation de l'effluent avant de faire les tests de toxicité, de la biodégradabilité, et dans l'étape finale de procéder au traitement biologique.

Les analyses de toxicité pendant le traitement des eaux usées par les POAs fournissent des informations précieuses sur les échantillons parmi lesquels le pourcentage d'inhibition pouvant altérer le procédé biologique par exemple. En outre, des études de toxicité peuvent également démontrer comment l'application des POA réduit la toxicité des eaux usées permettant son élimination en toute sécurité *(Oller et al., 2011).*

En général, la majorité des études sur des essais biologiques conventionnels, tels que la demande biologique en oxygène ($DBO_x/COD_{rendement}$) pour déterminer le progrès du rendement de biodégradation après le prétraitement d'une eau usée biorécalcitrants par les POA *(Chamarro et al., 2001 ; Ho Suh et Mohseni, 2004; Bacardit et al., 2006; Méndez-Arriaga et al., 2008).*

1.4.2 Synergie Fenton/Enzymatique. Intérêt du couplage

Le procédé Fenton est un processus d'oxydation avancée qui a été largement utilisé pour l'élimination des phénols à partir des eaux usées *(Laura et al., 2016a et b; Babuponnusami et Muthukumar, 2014)*. Comme déjà mentionné, l'efficacité du procédé de Fenton dépend de la concentration des réactifs, du pH de et de la température du milieu réactionnel *(Babuponnusami et Muthukumar, 2014; Kos et al., 2010).*

Néanmoins, la réaction de Fenton peut générer lors de l'oxydation de phénol des composés aromatiques tels que l'hydroquinone, le catéchol et le benzoquinone, présentant des niveaux de toxicité beaucoup plus élevés que le phénol lui-même *(Zazo et al., 2009)*.

Par ailleurs, le traitement enzymatique est apparu ces dernières années comme une alternative intéressante aux procédés classiques vu certains avantages qu'il possède. En effet, les

réactions enzymatiques sont des réactions rapides qui peuvent être menées en milieu aqueux sous des conditions modérées de température et de pH, avec une consommation minimale en substrats, d'où une efficacité technico-économique élevée *(Casella et al., 2010)*. Dans le cas du phénol, il pourra être polymérisé en o-o'-biphenyl par oxydoréduction enzymatique par plusieurs types d'enzymes, notamment la peroxydase *(Gaspar et al., 1982)*. De la même manière, vu que la peroxydase est une enzyme non spécifique, elle a la capacité de catalyser l'oxydation de l'hydroquinone en p-benzoquinone *(Manjeet et Mani, 1985; Noritomi et al., 1988)* et du catéchol en semiquinone *(Mason et al.,1961; Kalyanaraman et Sealy, 1982; Ferrari et Laurenti, 1993)* ou en o-benzoquinone *(Sadler et Ross, 1988; Luigi et al., 2010)* respectivement. Les composés polymériques générés par la réaction d'oxydation enzymatique des phénols, pourront, par la suite, être facilement éliminés par les méthodes physiques simples telles que la précipitation et la filtration. D'autres sous-produits sont, en général, moins toxiques que le composé phénolique.

Une complémentarité entre les deux procédés, Fenton et enzymatique, pourra émerger suite à la conception d'un couplage séquentiel (Fenton/Enzymatique). En effet, les produits de dégradation issus du procédé Fenton pourront être éliminés, partiellement ou totalement, par le procédé enzymatique.

CHAPITRE 2. MATERIELS & METHODES

CHAPITRE 2. PRODUITS, MATERIELS & METHODES

2.1 PRODUITS CHIMIQUES

Les produits chimiques utilisés durant cette étude sont de qualité analytique, sans purification préalable. Les solutions ont été préparées avec de l'eau distillée ou avec les solutions tampons. Les réactifs utilisés dans cette étude sont: 4-Aminoantypiryne, ($C_{11}H_{13}N_3O$,99%); Acétone ultrapure (C_3H_6O, 99%); Alginate de sodium ($C_6H_7NaO_6$); Polyéthylène glycol (4000 g $mole^{-1}$, 99%) ; Chlorure de Calcium($CaCl_2$, 99,5%); Ferricyanure de potassium($K_3Fe(CN)_6$, 99%); Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2, 30%); Phénol(C_6H_6, 99 %); Phosphate monopotassique (KH_2PO_4,99%); Acide citrique(99%); Acide formique(98%) ; Hydroquinone(98%); p-Benzoquinone(98%); Catéchol(98%); Chitosane(98%); KOH(99%); HCl (97%) ; Acide citrique (99%); Phosphate de sodium disodique (99 %).

2.2 MATÉRIEL ANALYTIQUE

2.2.1 Spectrophotométrie UV-visible

Le spectrophotomètre UV-visible utilisé est de marque Perkin Elmer de modèle Lambda 25, commandé par un ordinateur DEEL et équipé d'une imprimante HP. Cuvettes en quartz d'un volume de 3,5 mL avec une épaisseur de 1,0 cm.

2.2.2 Chromatographie en phase liquide à haute performance

Les sous-produits de dégradation du phénol (hydroquinone, p-benzoquinone, catéchol, acide citrique et acide formique) ont été quantifiées en utilisant un appareil de chromatographie liquide (HPLC)de type Perkin Elmer de séries 200, muni d'une pompe extensible de solvant unique (isocratique) et d'un mélange de deux solvants (binaires) ou d'un mélange de quatre solvants (quaternaire). Les spécifications techniques du détecteur PDA (Photo Diode Array) sont : une marge longueur d'onde qu'il comprise entre 190 à 700 nm avec une lampe de deutérium comme source de lumière (190-360) nm et le tungstène (360-700) nm. L'injection est automatique programmée du 0,1 à 1,0 µL avec un écart de 0,1 µL ou bien du 1 à 2,5mL avec un écart de 1 µL. L'appareil est connecté à une cuve portant 100 postes pour les vials, où les standards et les échantillons sont placés. Ce HPLC équipé d'une colonne en phase inverse Waters Symétrie C_{18}.La méthode d'analyse est détaillée dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1. Configuration de l'HPLC.

Méthode	**Composés**
Gradient de solvants *temps : composition* *volumique (Organique/Aqueux)*	0 min : 0/100 5 min : 0/100 10 min : 10/90 25 min : 40/60
Temps de rétention (min)	Acide Oxalique : 2,4 Acide Formique : 2,7 Acide Fumarique : 5,7 Hydroquinone : 6,7 P-benzoquinone : 11,8 Catéchol : 12,1 Phénol : 16,2 H_2O_2 :1,6
Durée : $t_{analyse}$ +$t_{équil}$ (min)	25 + 12
$V_{injecté}$(µL)	10
Température de la colonne (°C)	35
Débit ($mLmin^{-1}$)	1
Longueur d'onde (nm)	210 254

2.2.3. Appareil de mesure de DBO_5

La demande biologique d'oxygène a été mesurée à l'aide d'un appareil de type Oxitop Box qui contient 12 flacons pour placer les échantillons.

2.2.4 Microscope Électronique à Balayage. Marque FEI Quanta 200, sans analyseur (Les résultats sont présents dans l'annexe 5).

2.2.5 Autres équipements

Centrifugeuses de marque cover unlock 422;

Agitateur vortex de marque Heidolph N° 54119;

Bain marie de marque Memmer twnb 7-45;

pH-mètre de type HANNA instrument équipé d'une électrode de verre combiné ;

Agitateurs magnétiques Micro V (0-1100 rpm, modèle 4805-00) et VWR Mag ;

Agitateurs (100-1500 rpm, modèle 82026-764) de VWR International Inc. (Mississauga, ON).

Agitateurs magnétiques Micro V (0-1100 rpm, modèle 4805-00) et VWR Mag

Agitateurs (100-1500 rpm, modèle 82026-764) VWR International Inc.

2.3. MÉTHODES ANALYTIQUES

2.3.1 Préparations des échantillons

Les solutions phénoliques modèles sont préparées en dissolvant le phénol correspondant avec l'eau distillé. Les concentrations sont comprises entre 20 et 140 mg L^{-1}. Elles sont

conservées à l'obscurité afin de les protéger de la lumière et d'éviter tout vieillissement des constituants de l'échantillon.

2.3.2 Matière en Suspension (MES)

La MES représente l'ensemble des matières solides et colloïdales floculées, organiques ou minérales, contenues dans une eau et pouvant être retenues par filtration ou centrifugation.

2.3.3 Mesure de la matière organique d'une solution

2.3.3.1 Demande Chimique en Oxygène (DCO)

Cette mesure permet la quantification de l'ensemble des composés organiques, présents sous forme solide, colloïdale ou dissoute ainsi que celle des minéraux oxydables. Lorsque l'ensemble des composés est pris en considération, on parle de DCO totale (DCOT) et lorsque seuls les composés solubles sont analysés, il s'agit de la DCO soluble (DCOS). La différence entre ces deux mesures constitue la DCO particulaire (DCOP).

2.3.3.2 Demande Biochimique en Oxygène (DBO)

La DBO permet de quantifier la matière organique, dissoute ou particulaire, pouvant être consommée par la biomasse dans un échantillon. Le résultat sera obtenu au bout d'une durée de 5 jours(DBO_5).

2.3.4 Mesure de l'activité enzymatique de l'enzyme libre

L'activité de la peroxydase a été mesurée à la température ambiante en utilisant le phénol, le 4-aminoantipyrine (4-AAP) et du peroxyde d'hydrogène comme substrats. Le mélange réactionnel de 50 mL contenait : 1mL d'une solution de phénol 0.1mM, 1 mL d'une solution 0,01 mM de 4-AAP, 1 mL de solution de $H_2O_2$0.1mM. Le reste du volume à compléter par le tampon pH 7.0 de phosphate de potassium. La réaction qui permettra la mesure de l'activité enzymatique est réalisée dans un tube qui comporte 4 mL de ce mélange réactionnel et 0.2 mL de la solution d'enzyme. Le volume total du mélange d'essai était donc de 4.2 mL. La concentration de l'enzyme actif est proportionnelle à la vitesse de développement de la couleur mesurée à 517 nm, pendant une période de temps pendant laquelle la concentration de substrat n'est pas significativement réduite *(Sadasivam et Manickan, 2004)*. Le taux de développement de la couleur au cours de cette période a été converti en activité en utilisant un coefficient d'extinction de 7425 $M^{-1}cm^{-1}$ à base de peroxyde d'hydrogène (voir l'annexe A.1.2). Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui transforme une micromole de peroxyde d'hydrogène par minute à la température ambiante (Cette méthode est détaillée dans l'annexe A.1.3).

2.3.5 Dosage de protéines totales par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines Bradford (1976), (voir l'annexe A.1.4).

2.3.6 Dosage de l'activité enzymatique de l'enzyme immobilisée

L'activité enzymatique *(AE)* de l'enzyme incluse*(i)* dans l'alginate de calcium a été calculée par l'équation 2.1 suivante :

$$AE_i = AE_l \cdot V_l \frac{\left[AE_r \cdot V_r + AE_{CaCl2} \cdot V_{CaCl2} + AE_{sc} \cdot V_{sc}\right]}{N} \qquad (Eq.2.1)$$

Où les abréviations AE, V, N signifient l'activité enzymatique $(U\ mL^{-1})$, le volume de l'enzyme libre (mL) et le nombre de billes immobilisées respectivement. Les indices *i, l, sc, r* sont relatifs à : l'enzyme immobilisée, l'enzyme libre, la solution de conservation et la solution de rinçage respectivement *(Azizi, 2014).*

2.3.7 Dosage du phénol

Les différents échantillons du phénol prélevés au cours du traitement par la peroxydase libre ou immobilisée ont été analysés par une méthode colorimétrique qui est celle de la condensation en milieu basique du phénol et de l'ion phénate du4-AAP en présence d'un oxydant l'hexacyanoferrate(III) de potassium (*Dannis, 1951)* comme indiqué par la figure 2.1.

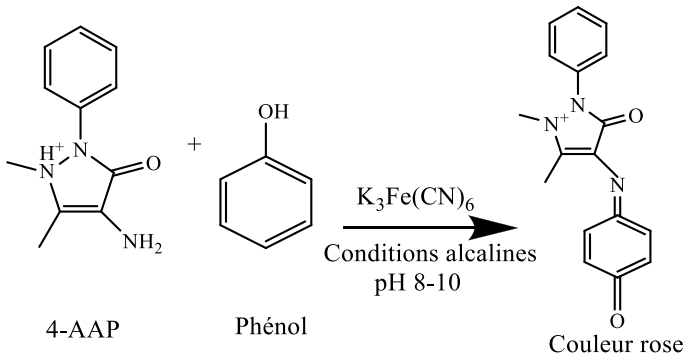


Fig.2.1. Réaction de dosage colorimétrique du phénol (*Steevensz, 2008).*

La concentration du phénol peut être déterminée à partir de la courbe d'étalonnage donnant la densité optique à 510 nm en fonction de la concentration, construite à partir d'une série des concentrations du phénol entre 20 et 140 mg L^{-1}. La méthode de dosage de phénol et la courbe d'étalonnage sont illustrées dans l'annexe 2 (Figure A.2.4).

2.3.8 Mesure de l'indice de phénol

Le phénol réagit avec le 4-AAP à un pH10 en présence d'hexacyanoferrate(III) de potassium en formant un complexe coloré avec le 4-AAP. Ce complexe coloré est extrait de la phase aqueuse avec du chloroforme et l'absorbance est mesurée à 460 nm. L'indice phénol est exprimé en milligrammes de phénol par litre. Le mode opératoire et la courbe d'étalonnage en fonction de l'absorbance en fonction de l'indice de phénol est située dans l'annexe 2 (Figure A.2.2).

2.4 PROTOCOLES EXPÉRIMENTALES

2.4.1 Source d'enzyme

L'enzyme a été extraite à partir de la plante de navet demi-long blanc de Croissy appelé « *Brassica rapa* ». Cette source obtenu localement est disponible presque toute l'année, à bas prix et contient une activité peroxydasique parmi les plus élevées chez les plantes *(Ahmedi et al.2015)*.

2.4.2 Extraction et purification de peroxydase

La procédure d'extraction et de la purification de la peroxydase de navet blanc est résumée dans l'organigramme présenté sur les figures 2.2 et 2.3 suivantes :

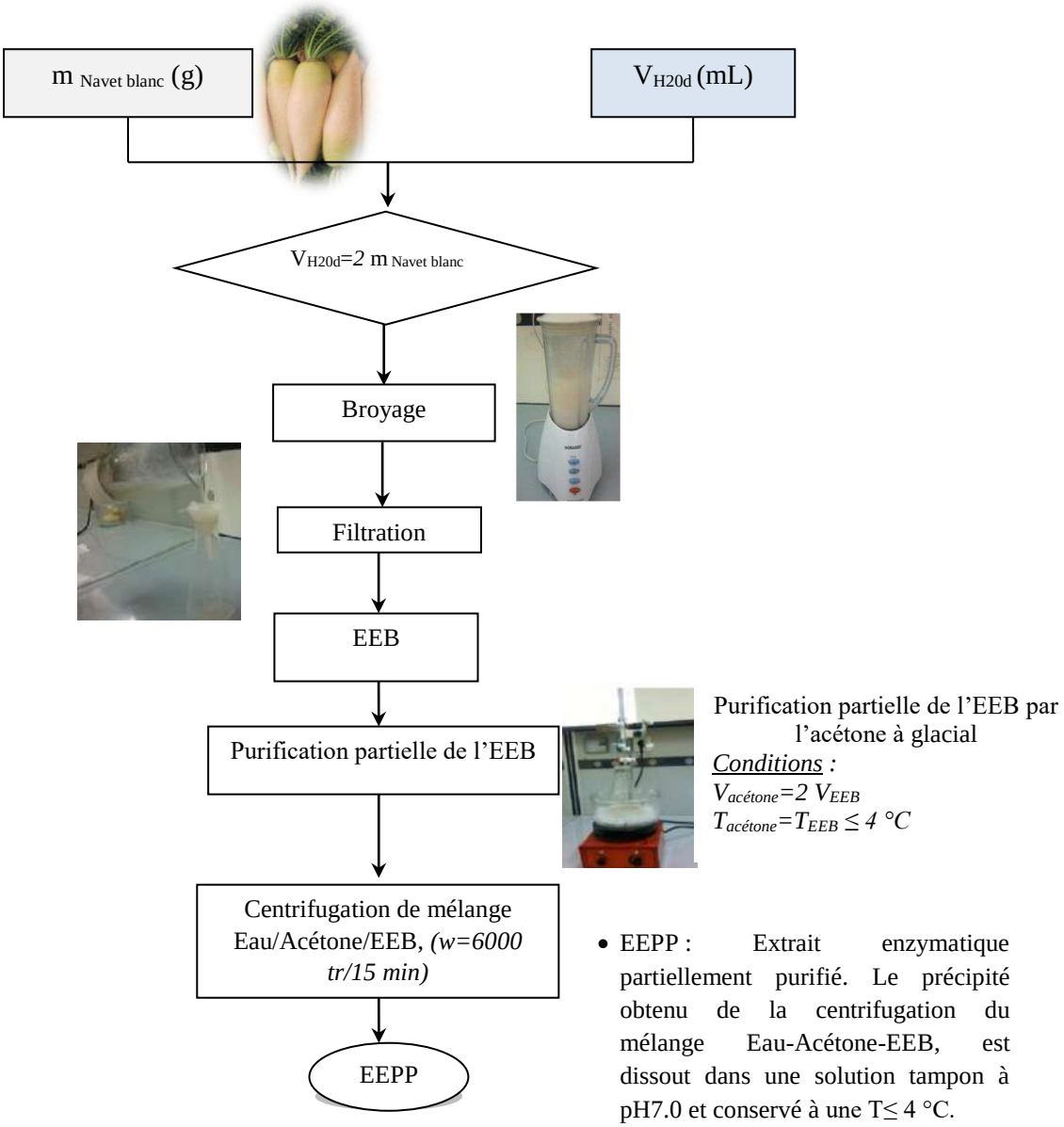


Fig.2.2. Procédure d'extraction et de la purification de la peroxydase.

L'aspect de l'EEPP du Navet blanc est présenté sur la figure 2.3.



(a) (b)

Fig. 2.3. Extrait enzymatique partiellement purifié(EEPP).

(a) Conservation d'EEPP dans une solution tampon pH 7, (b) : Culot de centrifugation(EEPP).

Les caractéristiques de l'opération de purification partielle de l'extrait enzymatique brute(EEB) par précipitation à l'acétone sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Tableau.2.2. Résultats de la purification partielle de l'EEB.

EE	**$V_{Extrait}$** *(mL)*	**[Protéique]** *($mgmL^{-1}$)*	**AE** *($U\ mL^{-1}$)*	**AS** *($U\ mg^{-1}$)*	**AE_{totale}** *(U)*	**Enrichissement**	**R** *(%)*
EEB	200	2.96	2.23	0.753	446	---	---
EEPP	25	20.42	10.22	0.5	255.5	0.664	57.28

EE : Extrait enzymatique; AE : Activité Enzymatique ; AS : Activité Spécifique, R : Rendement de purification. (25 °C; rapport acétone EEB 1:1).

2.4.3 Inclusion de la peroxydase dans l'alginate de calcium

La méthode consiste à mélanger une quantité de 0,15 g d'alginate de sodium avec 10 mL de l'EEPP. Ce mélange est gardé sous agitation pendant 1heure jusqu'à l'obtention d'un mélange visqueux homogène qui sera laissé au repos pendant 20 minutes pour empêcher les bulles d'air qui peuvent causer la flottation des billes à la surface de la solution froide de chlorure de calcium. Les billes de la peroxydase se préparent en faisant verser le mélange obtenu goutte à goutte à l'aide d'une seringue 20G dans un volume de 50 mL de solution de $CaCl_2$(0,05 M) maintenue sous agitation modérée. Les billes sont instantanément formées dans la solution de $CaCl_2$. Elles sont gardées encore sous agitation dans la même solution pendant 1 heure pour améliorer leur rigidité. Enfin, ces billes seront rincées avec de l'eau distillée avant de les conserver dans une solution tampon de pH7.0 dans un réfrigérateur sous une température de 4 °C (voir la figure 2.3).



(a) *(b)* *(c)* *(d)*

Fig. 2.4. Étape d'immobilisation de la peroxydase avec d'alginate de calcium dans une solution de $CaCl_2$(0.05M).***(a)*** *Mélange de l'enzyme et alginate de calcium,* ***(b)****Dispositif expérimental d'encapsulation,* ***(c)*** *billes d'alginate de calcium,* ***(d)*** *Conservation des billes dans une tampon de pH 7.0.*

2.4.4 Optimisation de la dégradation du phénol par le procédé Fenton et par l'enzyme peroxydase (libre et immobilisée)

La méthode d'optimisation du procédé d'élimination du phénol consiste à varier un seul paramètre opératoire à la fois au-cours d'une expérience. Les paramètres à optimiser sont : le pH, la température, les concentrations initiales: du phénol, d'H_2O_2, des ions ferreux (cas Fenton) et l'activité enzymatique (cas traitement enzymatique). Le temps de contact sera aussi pris en considération. Le choix du paramètre optimum basé sur deux critères intrinsèques: la vitesse initiale de la réaction et le rendement de dégradation. Les intervalles de variation des paramètres testés, les volumes opérés, les moyens utilisés pour varier ces paramètres ainsi que l'organigramme de réalisation des essais de la dégradation du phénol par les deux procédés sont regroupés dans les tableaux 2.3 à 2.5 et la figure 2.5:

2.4.5 Procédés de couplage Fenton/Enzymatique (peroxydase libre /immobilisée)

Cette partie sera consacrée à la démonstration de la faisabilité du procédé couplé (Fenton/Enzyme) en se basant sur l'existence d'une certaine synergie ou complémentarité du point de vue qualitatif entre les deux procédés tel que présenté dans le chapitre 1(section 1.5). Par ailleurs, les résultats obtenus à partir de l'étude de la dégradation du phénol par les traitements individuels seront exploités dans le but de déterminer les conditions optimales sous-lesquelles le couplage est le plus efficace. Le procédé sera également testé sur un échantillon d'effluent de l'industrie pharmaceutique obtenu à partir du complexe d'antibiotiques de Médéa.

Pour se faire, la réaction d'oxydation de Fenton mise en œuvre dans une première étape pour oxyder le phénol sera suivie par une réaction de polymérisation avec la peroxydase libre ou immobilisée. Ainsi, outre que le phénol, les composés aromatiques issus de la réaction de Fenton, tels que le catéchol, l'hydroquinone ou les polymères insolubles générer par cette réaction. Une étape de filtration a été nécessaire afin de retenir les composés polymérisés. Par ailleurs, le benzoquinone généré a été éliminé par un système de coagulation-précipitation à l'aide de chitosane juste après la deuxième étape. Néanmoins, en raison d'une préoccupation sociale et politique plus élevée sur le risque environnemental, d'autres paramètres seront pris en considération afin de parvenir à un effluent respectueux à l'environnement à travers l'évolution de la concentration de phénol résiduel, la demande chimique en oxygène (DCO), demande biologique en oxygène mesurée au bout de cinq jours de réaction de processus (DBO_5) et l'indice de phénol. Le procédé est schématisé sur la figure 2.6.

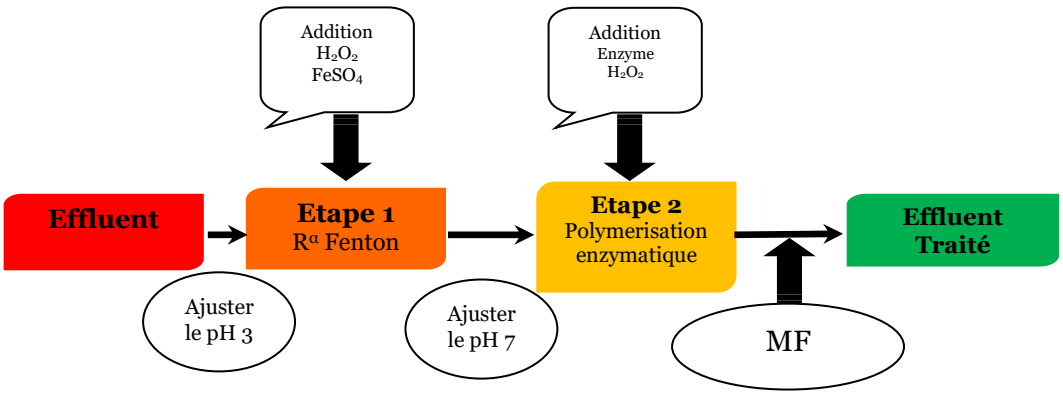


Fig.2.6. Représentation schématique du procédé couplé Fenton/Enzyme pour la dégradation du phénol

Tableau 2.3. Intervalles d'optimisation des paramètres opératoires de la dégradation du phénol par le procédé Fenton.

Paramètres	**Valeur initiale**	**Quantités (**mL)	**Domaines d'études**
pH	3	3	3.0
T (°C)	40	---	40
H_2O_2*(mM)*	---	1	1 – 15
Phénol (mg L^{-1}*)*	100	1	20 - 140
FeSO4 (mg L^{-1}*)*	23	1	1 - 720

Tableau 2.4. Intervalles d'optimisation des paramètres opératoires de la biodégradation du phénol par la peroxydase libre.

Paramètres	**Valeur initial**	**Quantités (mL)**	**Domaine d'étude**
pH	7	2.8	2-10
T (°C)	40	---	20-80
H_2O_2 *(mM)*	13	1	4-24
Phénol (mg L^{-1}*)*	45	1	20 – 140
AE_{total}*(U)*	2.53	---	1.0-7.0

Tableau 2.5. Intervalles d'optimisation des paramètres opératoires de la biodégradation du phénol par la peroxydase immobilisée.

Paramètres	**Moyens**	**Valeur initiale**	**Quantités (mL)**	**Domaine d'étude**
pH	pH mètre	7	2.8	2-10
T (°C)	Bain marie	40	---	---
H_2O_2 *(mM)*	Fiole jaugé	13	1	1 - 15
Phénol (mg L^{-1}*)*	Fiole jaugé	45	1	20 - 140
Nombre de billes	---	10	---	5 - 40
AE_{total}*(U)*	UV-vis	2.5	---	1.3- 5.3

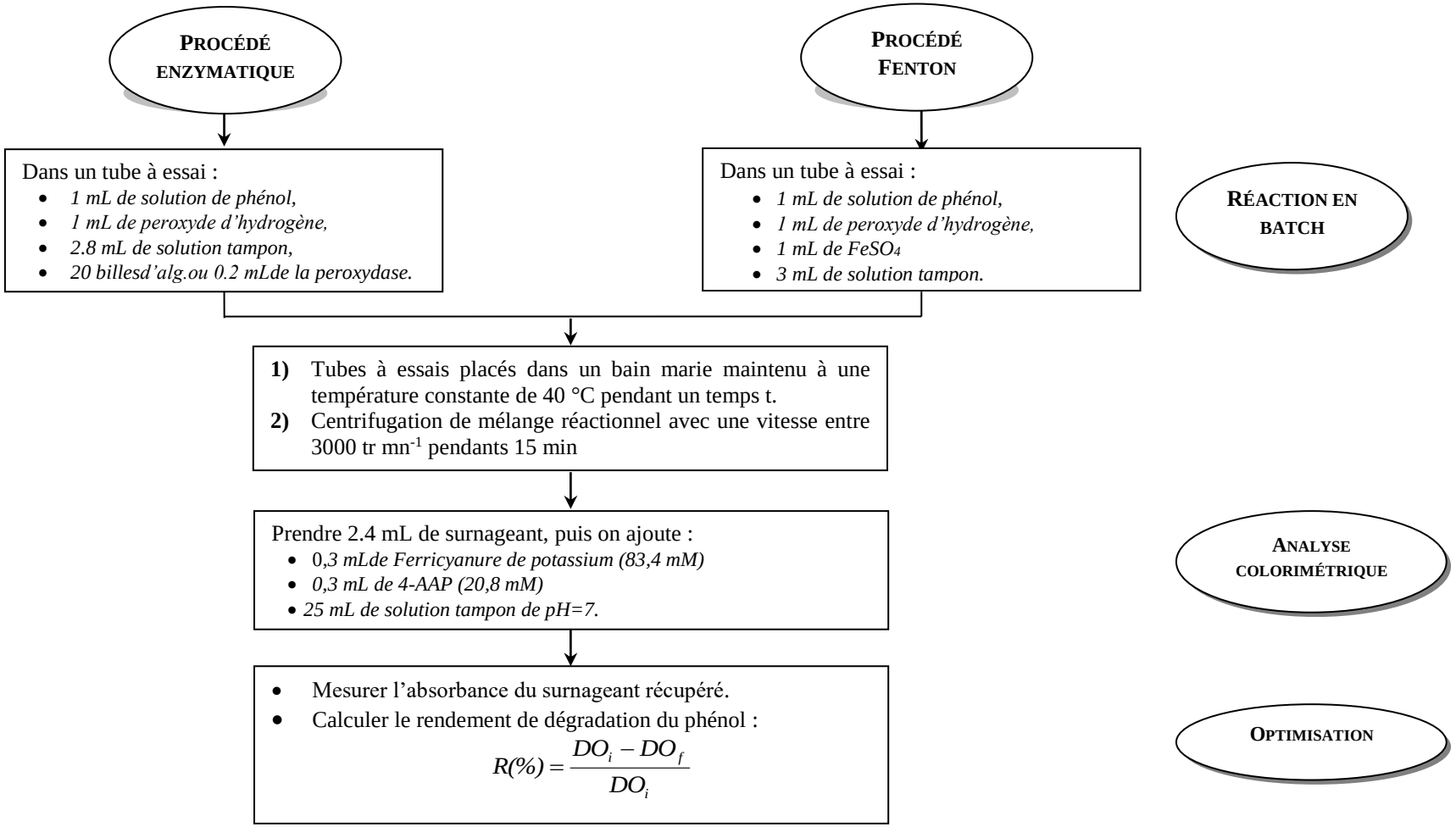


Fig.2.5. Organigramme de réalisation des essaies de la dégradation de phénol par les procédés individuels Fenton et enzymatique.

CHAPITRE 3. RESULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE 3. RÉSULTATS & DISCUSSION

3.1 ÉLIMINATION DU PHÉNOL PAR LE PROCÉDÉ FENTON

3.1.1 Effet de la concentration de peroxyde d'hydrogène

Des essaie expérimentaux ont été réalisés afin de déterminer la valeur optimale de la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène donnant la conversion maximale du phénol. Par conséquent, le rapport molaire $[H_2O_2]$/[Phénol] a été varié dans le mélange réactionnel entre 0,9 à 10. Les essais ont été réalisés à un pH, une température et une dose de $[Fe^{+2}]$ constantes, durant plus de deux heures de réaction. L'effet de la variation de la concentration d'H_2O_2 est d'un intérêt particulier, étant donné que le rapport molaire $[H_2O_2]$/[Phénol] détermine la conversion finale du phénol. Les résultats sont présentés par la figure 3.1.

Pour des concentrations faibles en H_2O_2, la conversion du phénol est faible puis augmente avec la dose de peroxyde sous les conditions données. Toutefois, la concentration des composés phénoliques obtenus au cours de la réaction diminue. Ce phénomène peut être attribué à la nature non-sélective de $OH^{\bullet}$. La perte des composés phénoliques est dû au fait que des radicaux hydroxyles réagissent avec ces produits chimiques et génère d'autres produits d'oxydation. La concentration de H_2O_2 dans la réaction Fenton dépend de la concentration initiale de polluant, la réponse du polluant à l'oxydation est l'objectif poursuivi en termes de réduction de la charge de contaminants *(Bautista et al., 2008)*.

Le taux de conversion maximal du phénol a été 52% correspondant à un rapport molaire $[H_2O_2]$/[Phénol] = 2.6 :1.1.

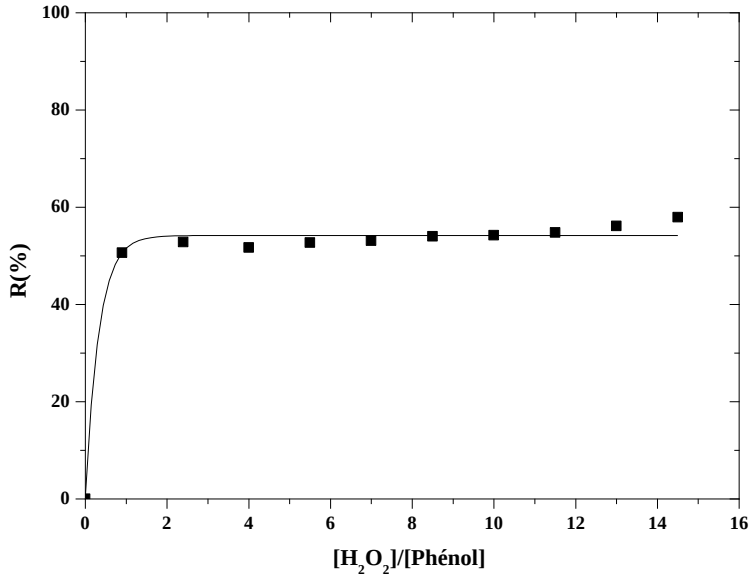


Fig. 3.1. Effet de [H_2O_2] sur le rendement de dégradation du phénol par le procédé Fenton *(pH= 3, T= 40 °C, [Phénol]=100 mg L^{-1}, [$FeSO_4$] =23 mg L^{-1}, temps de contact= 2 heures).*

3.1.2 Effet de la concentration des ions ferreux

Le rendement global de la réaction Fenton est déterminé par les conditions de réactifs et les caractéristiques de la réaction *(Neyens et Baeyens 2003)*. Les relations mutuelles entre pH, [Fe^{2+}], [H_2O_2] et [phénol] ont des effets significatifs sur la génération des radicaux hydroxyles. Pour déterminer l'effet de [Fe^{2+}] sur la conversion du phénol, les rapports molaires de [Fe^{2+}]/[Phénol] dans le mélange de réaction Fenton ont été variés entre 0,1 et 11,7. Les réactions ont été réalisées à pH 3 et une température 40 °C et pour la concentration initiale de peroxyde d'hydrogène optimale précédemment déterminée (2.6 mM) sur une durée de traitement de 2 heures.

Les résultats présentés par la figure 3.2 indique que la quantité maximale de produit phénolique dégradé reste presque constante à partir d'un rapport [Fe^{+2}]/[Phénol] de 0.4. Ce phénomène peut être expliqué par la nature de la réaction de Fenton. En effet, la réaction de Fenton commence par la production d'$OH^{\bullet}$ à partir de la réaction entre l'ion ferreux et la peroxyde d'hydrogène (équation 3.1).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-} (chaine \quad d'initiation) \qquad (Eq.3.1)$$

$$OH^{\bullet} + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} (Chaine \quad de \quad terminaison) \qquad (Eq.3.2)$$

$$RH + OH^{\bullet} \rightarrow H_2O + R^{\bullet} \qquad (oxydation\ \ sup plémantaire) \qquad (Eq.3.3)$$

Alors que les composés aromatiques (RH) en concurrence avec l'ion ferreux pour OH• (Équations 3.2 et 3.3), la présence de RH influe sur le comportement de l'ion ferreux *(Neyens et Baeyens 2003)*. Par contre, pour les concentrations élevées en Fe^{+2}, agissant comme catalyseur *(Yoon et al., 2001)*, la conversion du phénol diminue.

La décomposition de H_2O_2 et la génération de OH• sont faible (Équation 3.4) où [Fe^{+2}] est faible. À cette situation, OH• réagit plus fortement avec H_2O_2 et $HO_2^{\bullet}$ génères (Équation3.4).

Cet additionnement supplémentaire de $HO_2^{\bullet}$ participe à des réactions radicalaires en chaîne en réduisant l'ion ferrique en ion de fer (voir l'équation 3.5) *(Neyens et Baeyens 2003)*. Dans l'équation 3.5, H_2O_2 agit comme source de OH•. Celles-ci pourraient être les raisons possibles de la mauvaise efficacité de la conversion du composé phénolique lorsque le rapport molaire [Fe^{+2}] /[Phénol] < 0.4.

$$OH^{\bullet} + H_2O_2 \rightarrow H_2O + HO_2^{\bullet} \qquad (Eq.3.4)$$

$$Fe^{3+} + H_2O^{\bullet} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 + H^{+} \qquad (Eq.3.5)$$

Lorsque la dose de Fe^{+2} est suffisante, la réaction schématisée par l'équation 3.4 domine celle schématisée par l'équation 3.5 *(Yoon et al., 2001)*. La présence de RH empêche la réaction entre OH• et l'ion ferreux (Équation 3.5), qui est une autre voie d'épuisement de •OH *(Neyens et Baeyens, 2003)*. Par conséquent, une grande quantité de OH• reste disponible pour la conversion du phénol et des composés générés. Par conséquent, le rapport molaire [Fe^{+2}]/[Phénol]= 2.1 : 1.1≈ 2, correspond à celui donnant le taux maximal de conversion du phénol (59%). Cependant, la valeur optimale de la concentration des ions ferreux (120 mg L^{-1}) est supérieure aux valeurs limites décrit par les législations algériennes de rejet des ions ferreux dans l'eau usée (5 mg L^{-1}), (*OJAR, 2006)*. Par conséquent, la concentration qui sera utilisée dans la suite de cette étude est 5 mg L^{-1} correspondant au taux de conversion de 50% et un rapport molaire [Fe^{2+}] /[Phénol]=0.1 :1.1=0.09.

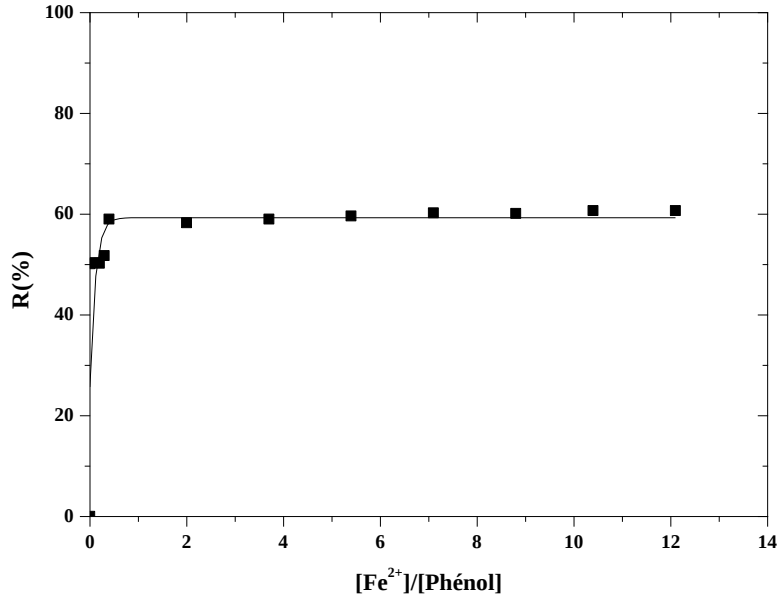


Fig. 3.2. Effet de [Fe^{2+}] sur le rendement de dégradation du phénol par le procédé Fenton
(pH= 3, T=40 °C, [Phénol]=100 mg L^{-1}, [H_2O_2] =2.6 mM, temps de contacts= 2 heures).

3.1.3 Effet de temps de contact

La cinétique de dégradation du phénol illustrée sur la figure 3.3, peut être divisée en deux parties : pour un temps de traitement au-dessous de 75 minutes, l'allure prend une forme d'une droite où le taux de dégradation de phénol atteint le 45%. Au-delà de 75 minutes, la réaction devient de plus en plus lente avec un rendement qui devient constant, prenant la valeur moyenne de 54% à partir de 120 minutes.

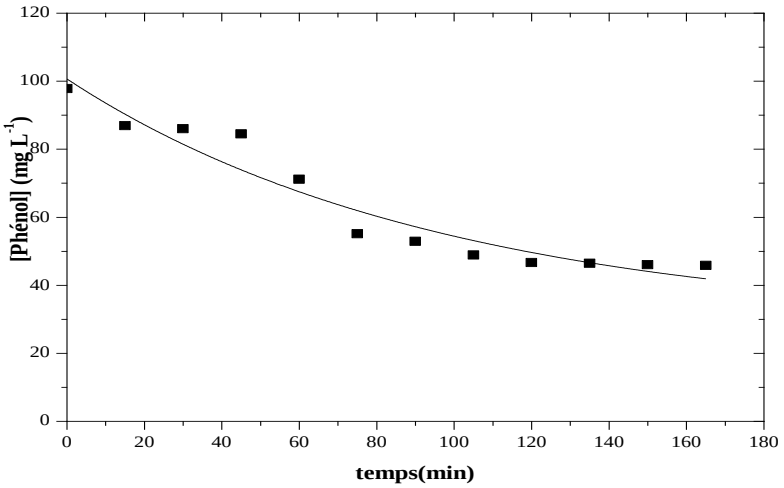


Fig. 3.3. Suivi de dégradation du phénol par le procédé Fenton en fonction du temps
(pH= 3, T= 40 °C, [Phénol]=100 mg L^{-1}, [H_2O_2] =2.6 mM, [$FeSO_4$]=5 mg L^{-1}).

3.1.4 Modélisation de la cinétique d'élimination du phénol par le procédé Fenton

La dégradation du phénol par le procédé Fenton a été réalisée avec un rapport molaire $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$= 0,081, correspondant à la concentration de Fe^{2+}égale à 5 mg L^{-1}. La cinétique d'oxydation du phénol est représentée sur la figure 3.4. La dégradation atteint son maximum après environ 8-10 minutes. Elles atteignent un palier correspondant à un taux d'abattement du phénol de 25, 28, 30, 33, 46 et 49% pour les concentrations initiales en phénol de 40, 60, 80, 100, 120 et 140 mg L^{-1} respectivement. De ce fait, on déduit que le peroxyde d'hydrogène est totalement consommé avant l'oxydation totale du phénol par le réactif de Fenton. On note que la vitesse d'oxydation du phénol par le réactif de Fenton est très rapide. Elle s'arrête pratiquement après 30 minutes de réaction. Cela est dû à la rapidité de la réaction de décomposition du H_2O_2 et à la forte réactivité du radical hydroxyle de la réaction (Eq.3.5). Par ailleurs, il a été démontré que la présence de fortes concentrations de composés organiques dans le mélange réactionnel augmente la vitesse de décomposition du peroxyde d'hydrogène *(El Hayek et al.,1995)*.

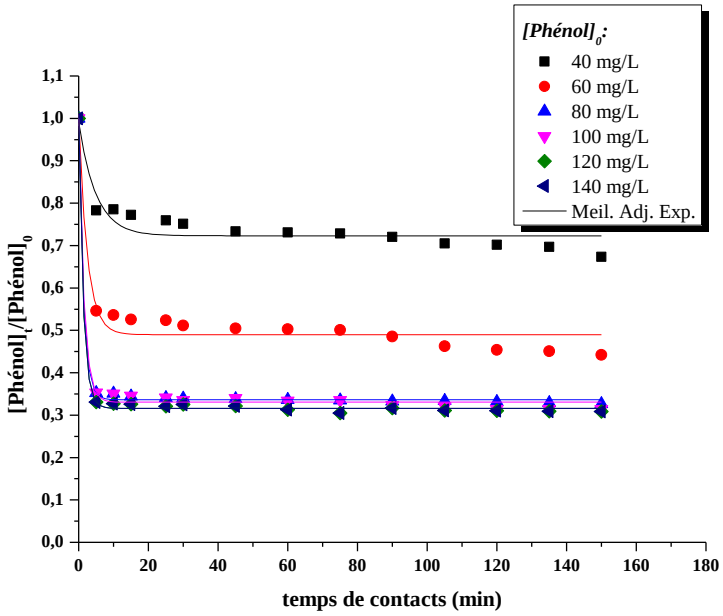


Fig. 3.4. Cinétique d'oxydation du phénol par le procédé de Fenton sous les conditions optimales à différentes concentrations initiales en phénol.
(pH= 3, T= 40 °C, $[H_2O_2]$ =2.6 mM, $[FeSO_4]$=5 mg L^{-1}).

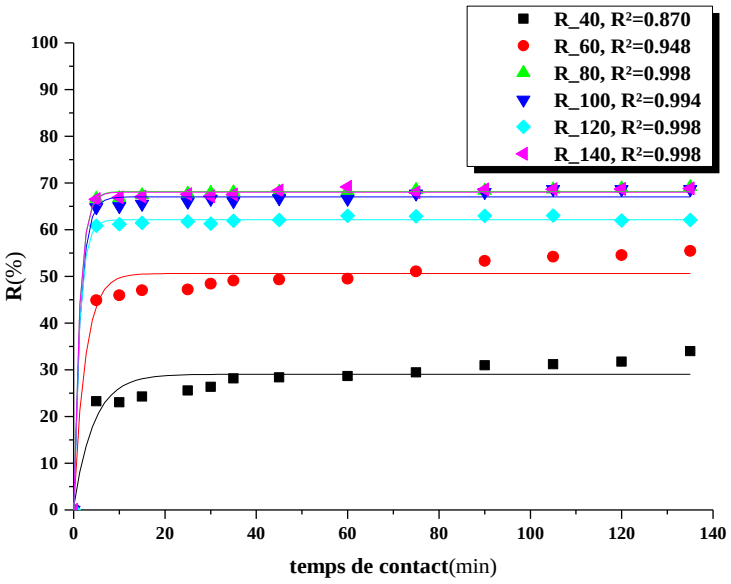


Fig. 3.5. Évolution temporelle du rendement de la dégradation du phénol par le procédé de Fenton sous les conditions optimales à différentes concentrations initiales en phénol. *(pH= 3, T= 40 °C, [H_2O_2] =2.6 mM, [$FeSO_4$]=5 mg L^{-1}).*

Les vitesses initiales de disparition du phénol à différents rapports de [H_2O_2]/[Phénol] sont représentées sur la figure 3.4.

Le radical hydroxyle $HO^{\bullet}$ généré par la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les ions de fer ferreux conduisant à une oxydation du phénol. La dégradation du phénol par $HO^{\bullet}$ est typiquement décrite comme une réaction de second ordre *(Zazo et al., 2009),* l'équation de vitesse de dégradation est donnée par:

$$v = \frac{d[Phénol]}{dt} = -k[Phénol][HO^{\bullet}] \qquad (Eq.3.6)$$

La détermination de la constante de vitesse *'k'* permet de donner un ordre de grandeur de la vitesse. On peut montrer expérimentalement que la vitesse d'une réaction s'écrit comme suit :

$$[Phénol]_t = [Phénol]_0 \, exp(-k_{app} t) \qquad (Eq.3.7)$$

Où :

k : constante cinétique de la réaction, *minute*$^{-1}$

k_{app}: constante cinétique apparente de la réaction, *minute*$^{-1}$

t : temps de traitement, *minute*

$[Phénol]_t$: Concentration du phénol à l'instant *t*, *mol* L^{-1}

$[Phénol]_0$: Concentration du phénol à l'instant *0*, *mol* L^{-1}

En traçant la courbe $[Phénol]_t/[Phénol]_0$ en fonction du temps de traitement, on obtient le tracé illustré sur la figure 3.5, qui concorde bien avec le modèle exponentiel *(Origin Pro V.9.1)* et l'on obtient le paramètre k_{app}.

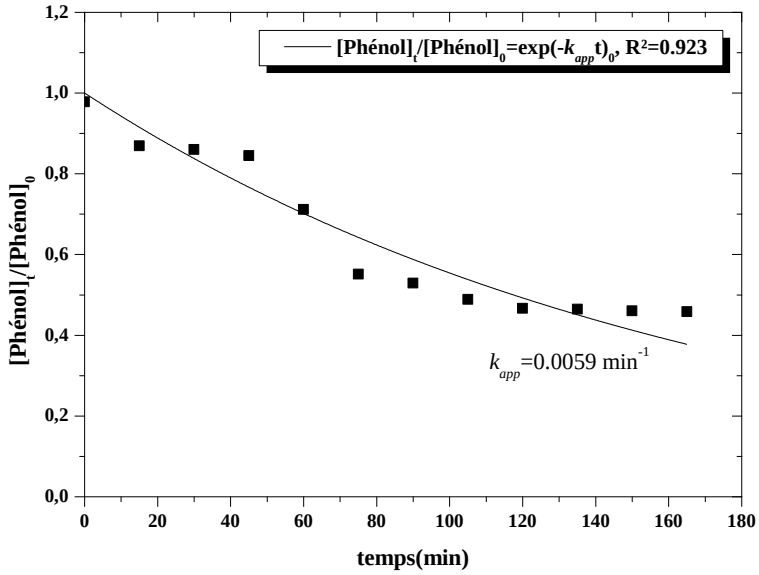


Fig. 3.6. Cinétique de la dégradation du phénol en fonction du temps de réaction *(pH= 3, T=40 °C, [Phénol]=100 mg* L^{-1}*,* $[H_2O_2]$ *=2.6 mM,* $[FeSO_4]$ *=5 mg* L^{-1}*).*

La cinétique de dégradation du phénol représentée par la figure 3.5 révèle que la réaction de dégradation est d'ordre1 avec une constante de vitesse égale à 0,0059 min^{-1}.

3.2 ÉLIMINATION ENZYMATIQUE DU PHÉNOL CATALYSÉE PAR LA PEROXYDASE SOLUBLE

La deuxième partie de ce chapitre consacré l'étude d'élimination du phénol aqueux, catalysée par la peroxydase soluble. Les effets de plusieurs facteurs principaux, tels que le pH, la température, le rapport molaire du phénol et de peroxyde d'hydrogène, l'activité enzymatique et le temps de la réaction ont été examinés en détail. La cinétique de polymérisation du phénol sera simulée par le modèle de Michaelis-Menten.

3.2.1 Effet de pH

Les enzymes sont des protéines constituées de polyacides aminés. Le pH peut influencer leur structure et par conséquent, influencer leur activité. De nombreuses enzymes ont l'activité la plus élevée à pH neutre. Les enzymes perdent habituellement leur activité à des valeurs de pH extrêmes, en raison de la modification de leurs structures *(Zhang Tong et al., 1997)*. Comme l'activité de la peroxydase à un pH inférieur à 4 et au-dessus de 11est très faible, l'intervalle de pH2 à pH10 a été choisi dans la présente étude. L'activité de l'enzyme soluble préparé (2,3 U mL^{-1}) était mesurée dans des différents tampons de pH (2,0 à 10,0). La molarité de chaque tampon est de 0,01 mol L^{-1}. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 3.6.

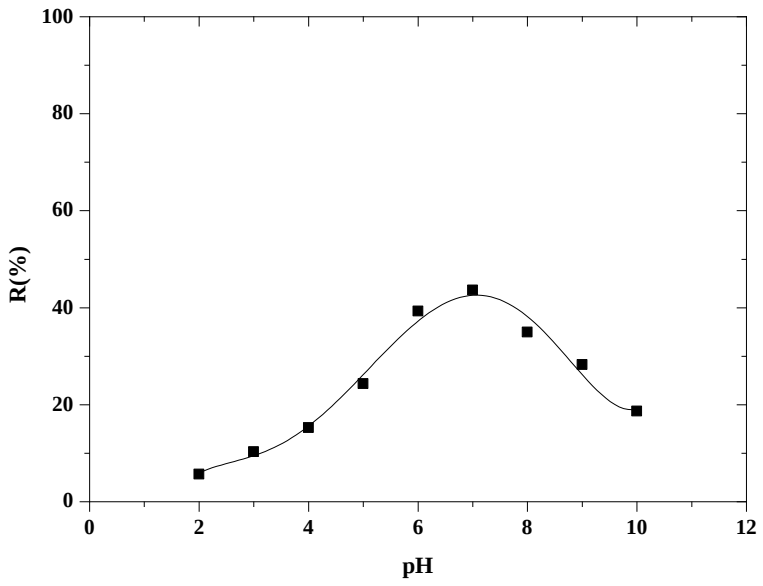


Fig. 3.7. Rendement de dégradation enzymatique du phénol en fonction du pH par la peroxydase soluble.*(T= 25 °C, [Phénol]=60 mg L^{-1}, [H_2O_2] =2 mM, AE=2,3 UI mL^{-1}, temps de contact= 2 heures).*

On constate globalement qu'aux pH « acides », entre 2 et 5, le rendement de dégradation est limité, alors que dans la zone de neutralité (pH=6-8) l'activité enzymatique est maximale et le rendement atteint 43.6% à pH 7. Dans l'intervalle « basique », pH allant de 8 à 10, le rendement a diminué suite à une altération de la structure de l'enzyme *(Klibanov 1983; de cet Bollag,1990; Bewtra et al., 1995; Wright et Nicell,1999; Duarte-Vazquez et al., 2003).* Le pH neutre (7.0) sera donc choisi comme valeur optimale pour le reste de l'étude. Ce résultat est en bon accord avec celui obtenu par *Duarte-Vazquez et al., (2003)* avec la peroxydase denavet. Cependant, une valeur de pH optimal de 5.0 a été obtenue dans une autre étude *(Yasha et Qayyum,2006)*.

3.2.2 Effet de la température

En général, comme pour la majorité des enzymes, l'activité de la peroxydase augmente avec l'augmentation de la température, en raison de l'action de la température sur toutes réactions biochimiques et chimiques jusqu'à la température physiologique (37 à 40°C). Au-dessus de cette température, l'enzyme se dénature, jusqu'à la dégradation totale de sa structure pour des températures au-delà de 80°C *(Seyhan et al., 2002).* Les résultats donnant le rendement de dégradation du phénol en présence de la peroxydase de navet blanc à différentes températures, allant de 20 à 80 °C, sont représentés sur la figure 3.8.

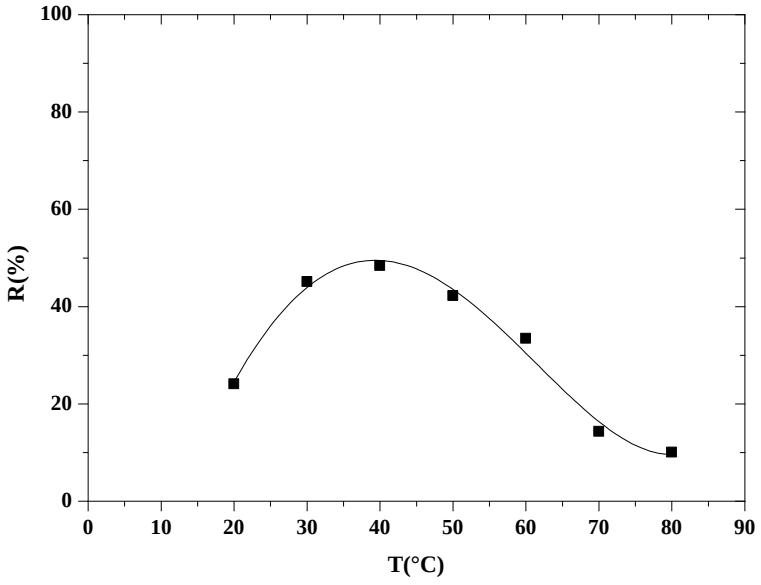


Fig. 3.8. Rendement de dégradation enzymatique du phénol en fonction de la température par la peroxydase soluble
(pH=7, [Phénol]=60 mg L^{-1}, [H_2O_2]=2 mM, AE=2,3 UI mL^{-1}, temps de contact= 2 heures).

On constate que l'augmentation de la température entre 20 et 40 °C induit une augmentation de la capacité de dégradation de phénol. Un rendement maximal de 48% est obtenu à 40°C. Au-delà de cette température, le rendement diminue et ne dépasse pas 10% pour une température extrême de 80°C. Un résultat similaire a été obtenu (*Seyhan et al., 2002)* avec la peroxydase de noix comme biocatalyseur, alors que *Kulshrestha et al.(2006)* ont réalisé avec la peroxydase de navet la conversion maximale du phénol à une température30 °C.

3.2.3 Effet de la concentration initiale du phénol

La figure 3.9 montre l'effet de la concentration initiale de phénol (de 20 à 140 mg L^{-1}) sur le taux d'élimination de ce dernier. Les essais ont été réalisés à une température de 40 °C, une activité enzymatique de 2,3 unités L^{-1}, une concentration initiale de H_2O_2 égale 2 mM et une durée de réaction de 180 minutes. Les résultats relatifs à l'effet de concentration de phénol sont représentés sur la figure 3.9. Le rapport molaire optimal [H_2O_2] /[Phénol] trouvé a été 2.4 (2: 0,85) qu'il correspondant au taux d'élimination maximal de 39%.

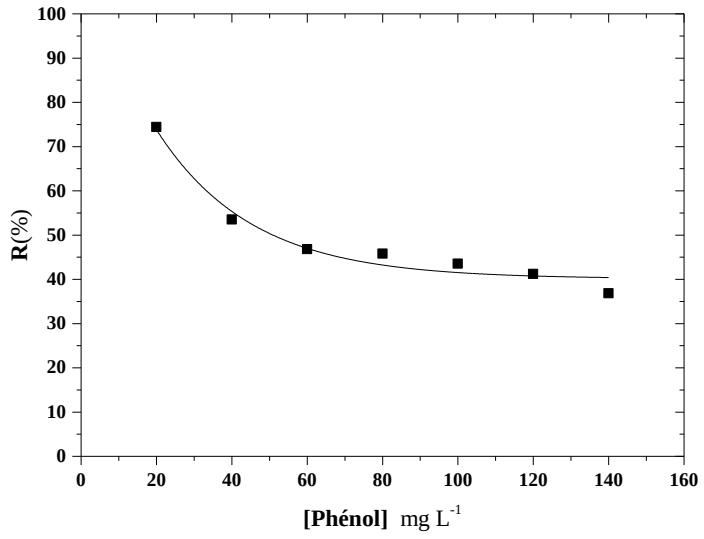


Fig. 3.9. Rendement de dégradation enzymatique du phénol par la peroxydase soluble en fonction de la concentration initiale de phénol *(pH=7, T= 40 °C, [H_2O_2] =2 mM, AE=2,3 UI mL^{-1}, temps de contact=2 heures).*

3.2.3.1 Relation entre la concentration de phénol la vitesse initiale et le taux de conversion

La figure 3.10 indique l'évolution temporelle de rendement d'élimination pour différentes concentrations initiales en phénol, les autres paramètres étant fixés.

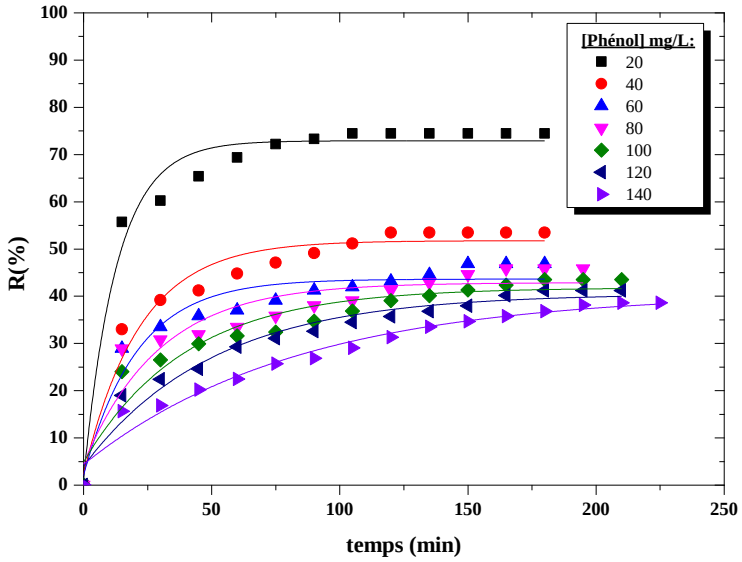


Fig. 3.10. Évolution temporelle du rendement de la biodégradation du phénol (*pH=7, T= 40 °C, [H_2O_2]=2 mM, AE=2,3 UI mL^{-1}*).

Les vitesses initiales (maximales) v_0 de dégradation du phénol seront ainsi estimées à partir des tangentes des tracés [Phénol]= f(temps) à *t=0*. Ainsi, les valeurs des vitesses initiales et des rendements en fonction des concentrations initiales en phénol pourront être conjointement illustrées sur la figure 3.11.

D'après les résultats consignés dans la figure 3.11, nous remarquons que l'évolution de la vitesse initiale est inversement proportionnelle à celle du rendement. Les deux courbes v_0= *f([Phénol]) et R= f([Phénol])* coïncident en un point de cordonnées *(v_0, R, $[Phénol]_0$) = (0.04,37,50)*. À partir de ce point, la vitesse initiale augmente et le rendement correspondant décroit jusqu'au point de coordonnées *(v_0, R, $[Phénol]_0$) = (0.03,39, 80).* Ce point présente la concentration initiale optimale en phénol qui permet de réaliser le procédé enzymatique avec la vitesse maximale (37.17 $\mu M\ mn^{-1}$) et un rendement maximal de (93 %). Cette concentration en phénol *(80 mg L^{-1})* sera fixée comme valeur optimal pour le reste de travail.

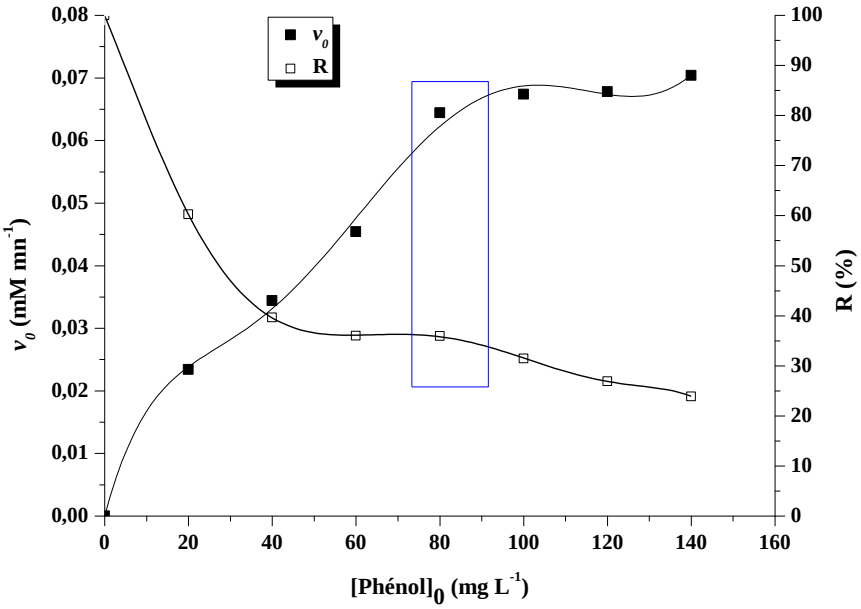


Fig. 3.11. Effet de la concentration initiale du phénol sur la vitesse initiale et sur le rendement de dégradation *(pH=7, T= 40 °C, [H_2O_2] =2 mM, AE=2,3 UI mL^{-1}).*

3.2.3.2 Modèle cinétique de dégradation du phénol par la peroxydase soluble

La cinétique de dégradation du phénol par la peroxydase soluble peut être modélisée par les équations classiques de biocatalyse enzymatique, notamment celle du modèle de Michaelis-Menten.

L'équation de Michaelis-Menten *(Cornish-Bowden et al., 2004)* est la suivante :

$$v_i = \frac{v_{max} \bullet [Phénol]}{K_M + [Phénol]} \qquad (Eq.3.8)$$

Avec :

v_i : vitesse initiale (c'est-à-dire en absence de produit) de la réaction enzymatique pour une concentration de phénol [Phénol], cette vitesse à la dimension d'une concentration par unité de temps (par exemple en *µmol/min*) ;

v_{max} : vitesse initiale maximale, mesurée pour une concentration saturante de phénol, dans la même unité que v_i (par exemple en *µmol/min*) ;

[Phénol] : concentration en phénol (en *mol/L*) ;

K_M : constante de Michaelis spécifique de l'enzyme(en *mol/L*).

La détermination des paramètres cinétiques est possible grâce à la méthode de linéarisation de Lineweaver-Burk *(Cornish-Bowden et al., 2004)* dans laquelle on représente $(1/v_0)$ en fonction de$1/[Phénol]$ (voir la figure 3.13).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{max}[Phénol]_0} + \frac{1}{v_{max}} \qquad (Eq.3.9)$$

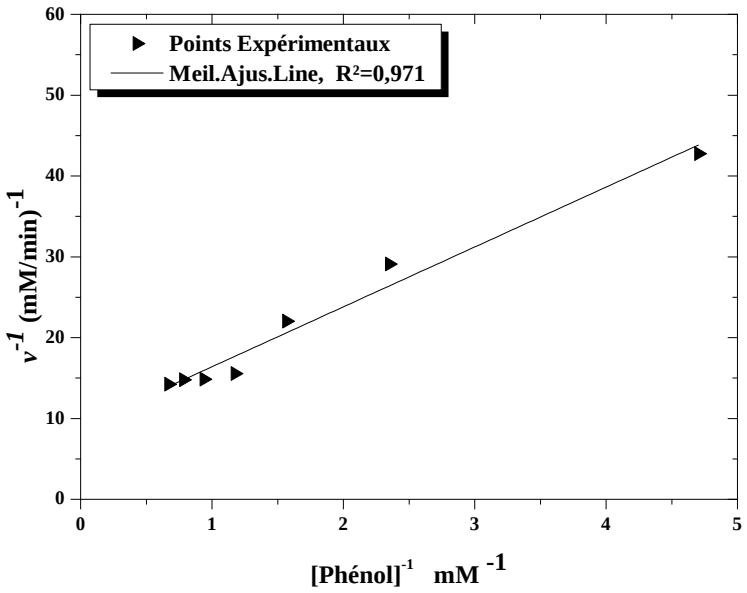


Fig. 3.12. Représentation graphique de Lineweaver-Burk pour la réaction de dégradation du phénol par la peroxydase libre (*pH=7, T= 40 °C, [H_2O_2] =2 mM, AE=2,3 UI mL^{-1}).*

Cette représentation permet donc de déterminer graphiquement les valeurs de K_M *(0.826mM)* et de v_0 *(0.00372 mM mn^{-1})* qui correspondent à l'ordonnée à l'origine et au rapport (K_M/v_{max}), *(pente de la droite)*, respectivement.

D'où l'équation 3.9 devient :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{0.826}{0.00317[Phénol]_0} + \frac{[Phénol]_0}{0,00317[Phénol]_0} \qquad (Eq.3.10)$$

3.2.4 Effet de la concentration initiale de H_2O_2 ; rapport [H_2O_2]/[Phénol]

Des essais en batch ont été réalisés sous conditions constantes de pH(7), température (40 °C) et une concentration initiale optimale de phénol (0.85 mM) avec une activité de 2,3 unités mL^{-1} en enzyme. La réaction d'oxydation est effectuée pendant 2 heures en variant la

concentration initiale en peroxyde d'hydrogène de manière à obtenir des rapports molaires variant entre 4.1 à 23.5. La figure 3.13 montre les résultats obtenus dans cette série d'expériences, où la conversion maximale a été rapportée en fonction du rapport molaire [H_2O_2]/[Phénol]. La variation de l'efficacité d'élimination du phénol était liée à la variation des concentrations de peroxyde d'hydrogène. Le rendement de dégradation augmente avec la concentration en H_2O_2 jusqu'à atteindre 68% pour un rapport [H_2O_2]/[Phénol] = 14,11.
La conversion de phénol a été constante (76%) lorsqu'elle atteint le point optimal en peroxyde d'hydrogène (20 mM) correspond au rapport molaire [H_2O_2]/[Phénol] =23,5.

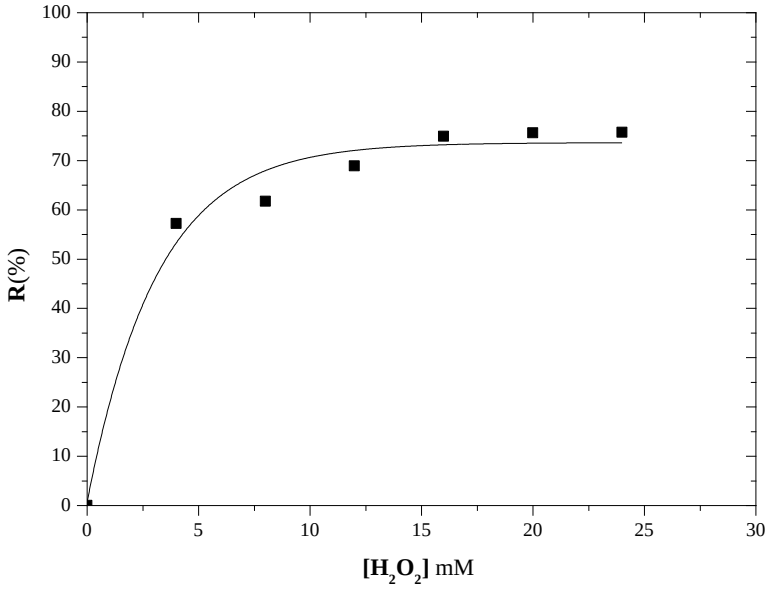


Fig. 3.13. Rendement de dégradation enzymatique du phénol par la peroxydase soluble en fonction de rapport [H_2O_2]/[Phénol].*(pH=7, T=40 °C, AE=2,3 UI mL^{-1}, temps de contacts= 2 heures).*

3.2.5 Effet de l'activité enzymatique

Étant donné que la conversion de phénol est dépendante de l'activité du biocatalyseur ajouté, l'effet de la concentration de l'enzyme sur l'élimination de phénol a été étudiée en variant la quantité d'enzyme à mettre dans le milieu de façon à obtenir une activité entre 1 à 7 UI mL^{-1}, pour une concentration de phénol 80 mg L^{-1}, 20 mM de peroxyde d'hydrogène, un temps de contact= 2 heures, une température de 40 °C et un pH=7. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 3.14 dans la représentation ci-dessous.

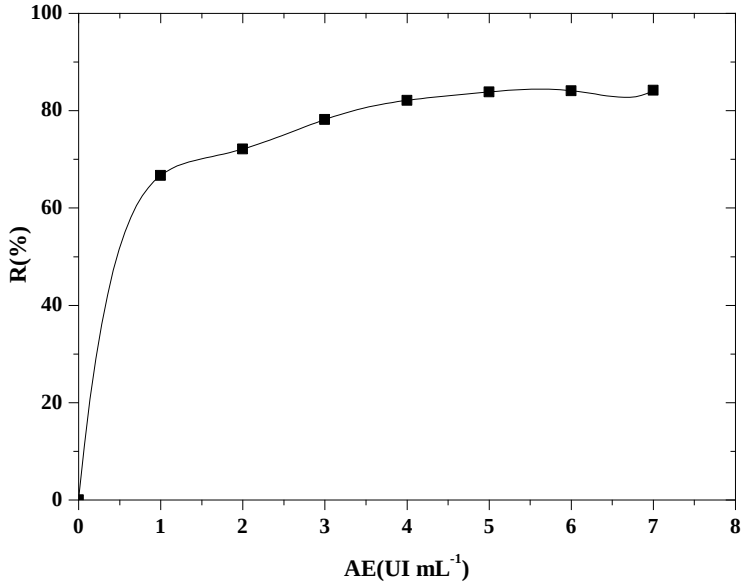


Fig. 3.14. Rendement de dégradation enzymatique du phénol par la peroxydase soluble en fonction de l'activité enzymatique *(pH=7, T= 20 °C, [Phénol]=80 mg L^{-1}, $[H_2O_2]$=20mM, temps de contacts= 2 heures).*

Nous remarquons donc une augmentation du rendement en fonction de l'augmentation de l'activité enzymatique totale. Ce résultat est évident puisque la disponibilité des sites enzymatiques induit l'attraction avec les molécules de substrat et par la suite le nombre de molécules converties par unité de temps sera élevé. La saturation est atteinte à partir d'une activité de l'ordre de 4 U mL^{-1}. Néanmoins, prenant en compte les phénomènes d'inhibition partielle accidentelle ou la perte de l'enzyme, une valeur optimale de 7 U mL^{-1}, a été fixée. Ce qui correspond à un rendement d'élimination de 84%.

3.2 Effet de temps de contact

Une série d'expériences a été réalisée afin d'évaluer le temps de contact optimal requis pour l'élimination maximale du phénol. Les paramètres ont été maintenus à leurs valeurs optimales : température (40 °C), phénol (80 mg L^{-1}), peroxyde d'hydrogène (20 mM), solution tampons de phosphate de sodium (0.01 M, pH 7), une concentration en enzyme de 7 unités mL^{-1}. Toutes les 15 minutes, un échantillon de 2.4 mL de surnageant a été prélevé, après une étape de centrifugation, et analysé par spectrométrie UV-vis pour déterminer la concentration en phénol résiduel suite au test AAP-Ferrocyanure (annexe **A.1.3**).

D'après la figure 3.15, le rendement de la biodégradation du phénol par la peroxydase libre augmente avec le temps de contact jusqu'à l'obtention d'un palier. Le maximum du

rendement de biodégradation est obtenu pour un temps de contact de 180 minutes. Au-delà de cette durée, le rendement demeure constant (93%).La cinétique d'élimination de 80 mg L^{-1} en phénol s'est déroulée en trois phases :

- Phase 1.*"Phase exponentielle"*. Une disparition rapide du phénol, où le rendement du processus a atteint 63% au bout des premières 15 min.
- Phase2.*"Phase de ralentissement"*. Entre la $15^{ième}$ et $90^{ième}$minute de traitement, le rendement était entre 62 et 80%, correspondant à des concentrations résiduelles en phénol entre 31 et 16 mg L^{-1} respectivement.
- Phase3.*"Phase stationnaire"*. Cette phase apparaît après la $90^{ième}$ minute de traitement où le rendement maximal a atteint 93%.

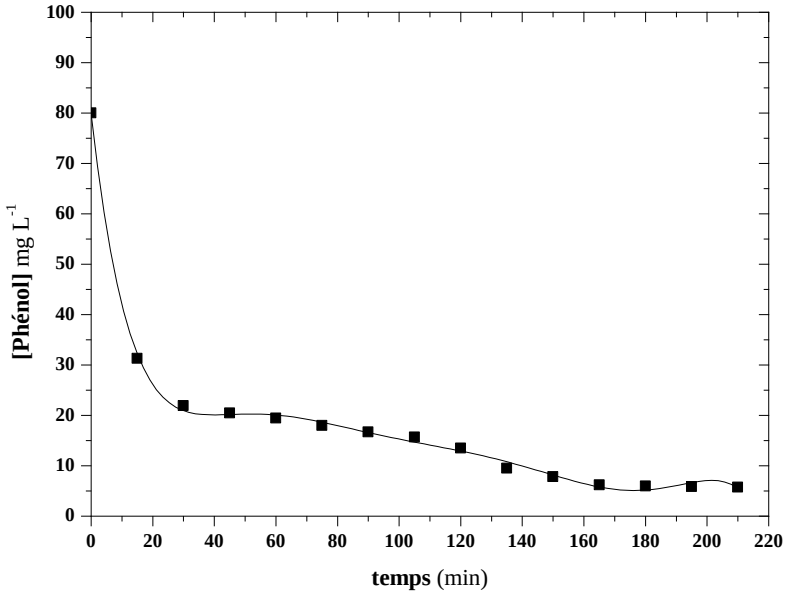


Fig. 3.15. Cinétique d'oxydation du phénol parla peroxydase soluble sous les conditions optimales. (*T= 40 °C, pH=7, [Phénol]=80 mg L^{-1}, [H_2O_2] =20mM, pH=7, AE=7 UI mL^{-1})*

3.3 ÉLIMINATION ENZYMATIQUE DU PHÉNOL CATALYSÉE PAR LA PEROXYDASE IMMOBILISÉE

3.3.1 Effet de l'activité enzymatique par bille/capacité d'immobilisation du support

La méthode consiste à faire varier l'activité de l'enzyme soluble (charge d'enzyme) qui doit être encapsulée dans une concentration fixée d'alginate de sodium (0.15 g d'alginate pour10 mL de solution enzymatique).

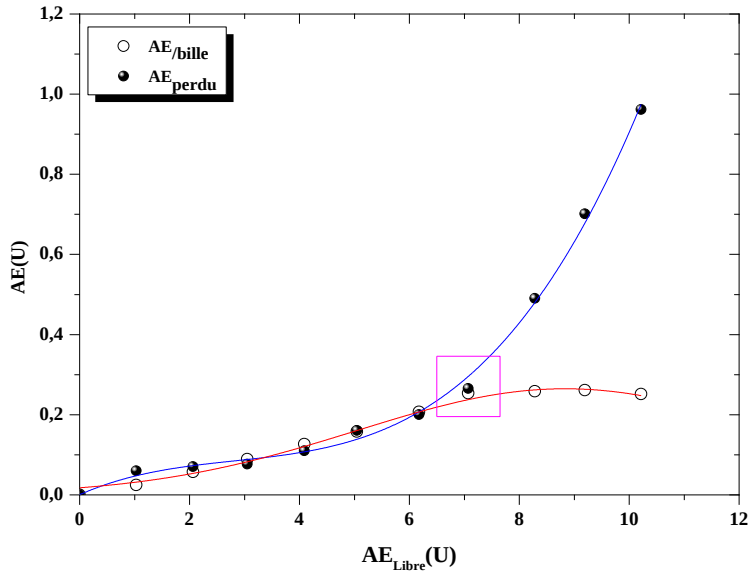


Fig.3.16. Effet de l'activité enzymatique de l'enzyme libre sur l'activité de l'enzyme immobilisée et sur l'activité perdue.
(T=40 °C, pH=7, [Phénol]=45 mg L^{-1}, [H_2O_2]=13 mM, temps de contact = 2 heures).

Sur la figure 3.16 sont illustrés les résultats donnant le taux immobilisé et le taux de fuite, exprimés en activités, à partir d'une solution enzymatique de peroxydase libre ayant une activité donnée. Pour une charge enzymatique équivalente à une activité de 1UI jusqu'à 7UI, le taux de piégeage est égal au taux de fuite. Au-delà de 7UI, le taux de fuite augmente d'une manière exponentiellement en fonction de l'augmentation de l'activité en enzyme libre. Le taux maximal qui pourra être fixé ou immobilisé sera donc égal à 0.25UI sous les conditions données. C'est cette valeur qui sera fixée pour la suite de notre travail et elle sera considérée comme une valeur optimale.

3.3.2 Effet du pH

Le pH est un paramètre essentiel à prendre en compte dans les processus de la dégradation enzymatique du phénol. Ce paramètre agit à la fois sur l'enzyme et sur l'état d'ionisation du phénol *(Alemzadeh et Nejati, 2009)*. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.17.

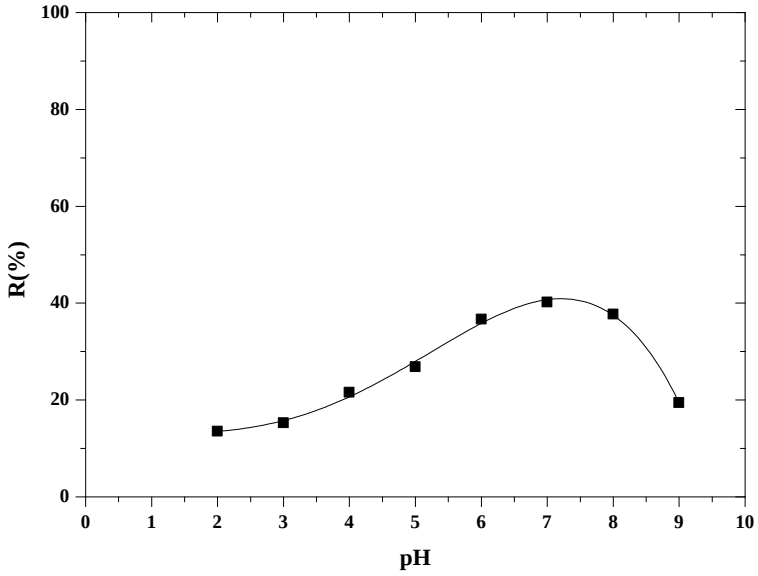


Fig. 3.17. Influence du pH sur l'élimination du phénol par la PNB immobilisée (*T=40 °C,[Phénol]=45mg L^{-1}, [H_2O_2] =13 mM, AE=2.5 UI,temps de contact= 2 heures).*

D'après la figure 3.17, nous constatons que le meilleur rendement de biodégradation est obtenu à pH neutre (pH7.0) avec un taux d'abattement de l'ordre de 40%. Ce résultat peut être comparé avec celui obtenu avec la peroxydase de l'HRP immobilisée dans l'alginate de calcium *(Alemzadeh et Nejati, 2009).Yasha et Qayyum(2006)* ont également trouvé un pH optimal égale 5.0 lors de la dégradation du phénol par la peroxydase de navet blanc *(Brassica rapa)* immobilisée dans l'alginate de calcium. Alors que *Sareeta Nahakpam et al. (2008)* ont trouvé un pH optimal 6.0 pour la peroxydase de riz *(Oryzasativa L.)* sous forme libre et immobilisée dans l'alginate de calcium.

3.3.3 Effet de l'activité d'enzymatique

D'après les résultats consignés sur la figure 3.18, nous remarquons une augmentation de rendement en fonction de l'augmentation de l'activité enzymatique. Ce résultat est évident puisque la disponibilité des sites enzymatiques induit l'attraction avec les molécules de substrat et par la suite le nombre de molécules converties par unité de temps sera élevé *(Gómez et al., 2006)*. Le meilleur taux de conversion de phénol est de 63.7% est obtenu avec une faible fuite en enzyme par les billes de l'alginate (0.16 unités) pour une activité enzymatique totale égale à 5,0 unités (20 billes).

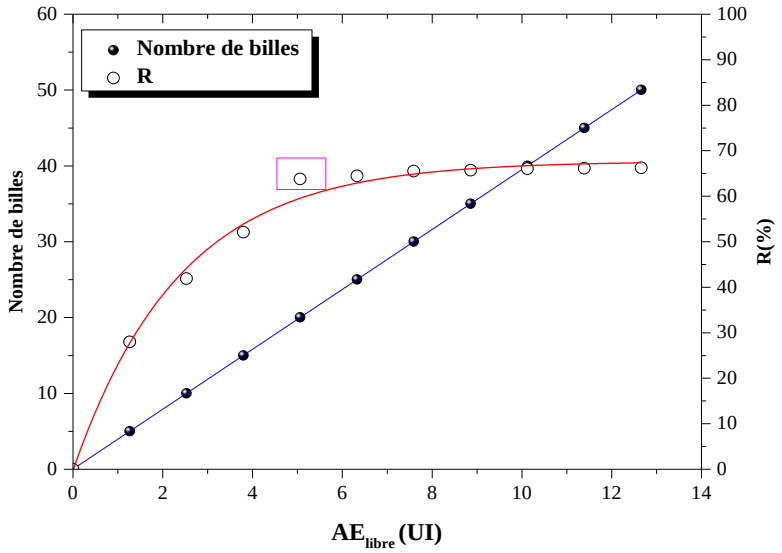


Fig.3.18. Influence de l'activité enzymatique totale sur le rendement d'élimination du phénol par la PNB immobilisée (*T=40 °C, pH= 7, [Phénol]=45 mg L^{-1}, [H_2O_2] =13 mM, temps de contact= 2 heures).*

3.3.4 Effet de la concentration du peroxyde d'hydrogène

3.3.4.1 Concentration optimale en peroxyde d'hydrogène

Le rapport optimal de [H_2O_2]/[Phénol] a été déterminée pour une solution contenant une concentration de 0.5 mM (45 mg L^{-1}) en phénol dans des essais en batch, isotherme (40 °C) et non agités où la concentration de peroxyde d'hydrogène a été variée entre 1,0 à 15.4 mM. La réaction s'est déroulée dans une solution tampon (pH 7.0 ; 0.01 M), une activité enzymatique 7 UI mL^{-1} et durant 2 heures. Les résultats obtenus sont indiqués sur la figure 3.19.

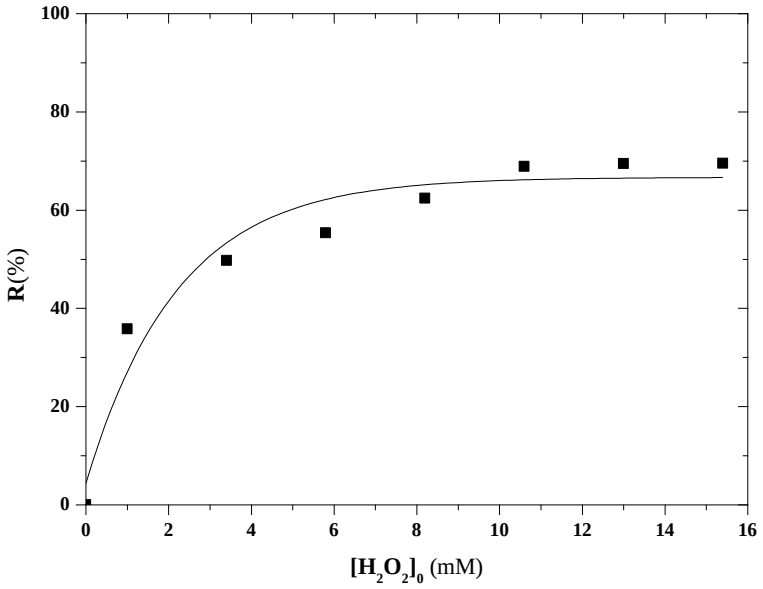


Fig.3.19. Effet de la concentration en peroxyde d'hydrogène sur le rendement de la dégradation du phénol par la peroxydase immobilisée *(T=40 °C, pH= 7, [Phénol]=45 mg L^{-1}, AE=5 U mL^{-1}, temps de contact= 2heures).*

D'après les résultats indiqués sur la figure 3.19, nous remarquons que le rendement de biodégradation du phénol augment avec la concentration de la peroxyde d'hydrogène et atteint une valeur maximale de 69% correspondant à une concentration optimale de H_2O_2 égale à 10.6mM ou un rapport molaire [H_2O_2]/[Phénol] de 21.

Des recherches antérieures *(Wu et al., 1993 ; Al-Kassim et al., 1993 et 1994)* ont été effectué sur le traitement enzymatique par l'HRP des eaux usées synthétique contenant le phénol ou la concentration varie entre 1 à 10 mM. Ces études montres que le rapport molaire [H_2O_2]/[Phénol] varie entre 1.1 jusqu'à 1.5. Dans le même essors des études de *Wu 1993 et al.(1993)* ont montré que l'augmentation du [H_2O_2]/[Phénol] au-delà de la plage optimale mènera à inactivation des enzymes, résulte une baisse des rendements d'élimination de phénol.

3.3.4.2 Cinétique de la dégradation du phénol en fonction de la variation de [H_2O_2]

La détermination de profil cinétique de la réaction d'oxydation du phénol par la peroxydase immobilisée a été réalisé sous les conditions suivantes: pH=7, T=40 °C, [Phénol]=45 *mg L^{-1}*, AE= 5 *unités mL^{-1}*. Les vitesses de réaction initiales (v_0) ont été déterminées à partir des pentes des courbes de consommation de H_2O_2 en fonction du temps, pour un intervalle de concentrations initiales en peroxyde entre 1 à 15.4 mM. La vitesse initiale (v_0) en fonction des concentrations de H_2O_2comparée à la cinétique Michaelienne est représentée sur la figure 3.20(*Sigma Plot 12,5*).

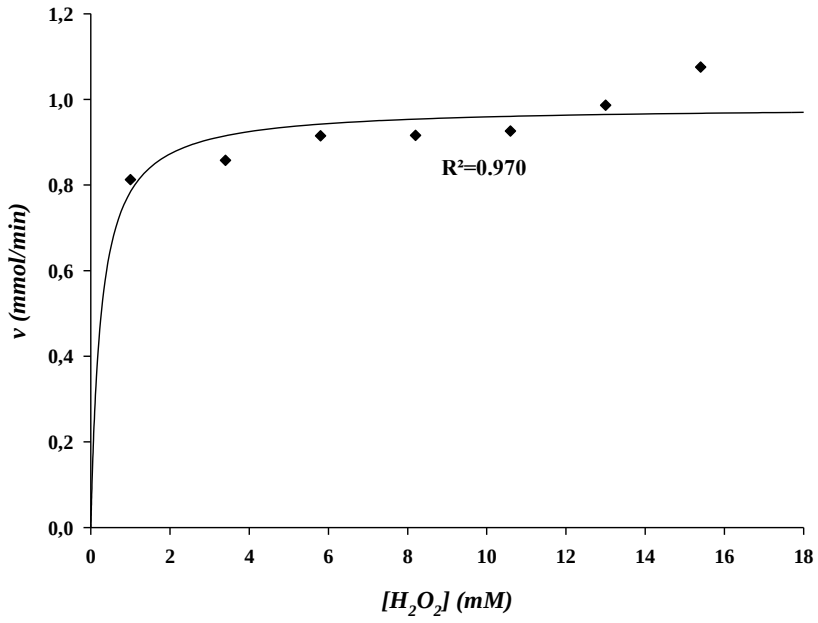


Fig.3.20. Présentation de la vitesse de la réaction d'oxydation du phénol par la peroxydase immobilisée en fonction de la concentration de H_2O_2*(T=40 °C, pH= 7, [Phénol]=45 mg L^{-1}).*

D'après la figure 3.20, la variation de la vitesse initiale en fonction de la variation de [H_2O_2] suit la loi de Michaelis-Menten avec un coefficient de corrélation de l'ordre de 0.970. La linéarisation des données de vitesse en fonction de la concentration de peroxyde par la méthode de Lineweaver et Burck permet d'obtenir les constantes du modèle. Ainsi, si on représente *($1/v_0$)* en fonction de (*$1/[H_2O_2]$*), (voir la figure 3.21), on obtient les valeurs suivantes: $v_{max=}$ 0,9493 mM mn^{-1}et K_M=0,1885 mM (*Sigma Plot 12.5*).

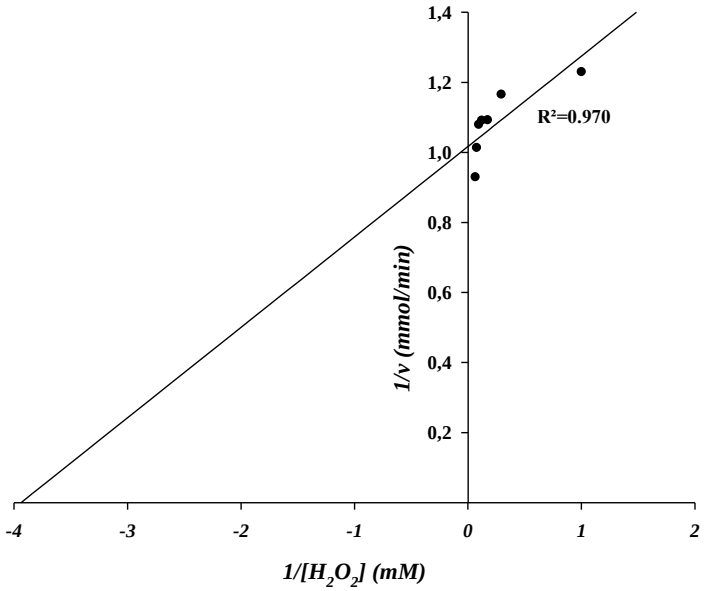


Fig.3.21. Linéarisation de Lineweaver-Burk de réaction d'oxydation du phénol par la peroxydase immobilisée *(T=40 °C, pH= 7, [Phénol]=45 mg L^{-1}).*

L'équation 3.9 devient :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{0{,}1885}{0.9493[H_2O_2]_0} + \frac{[H_2O_2]_0}{0{,}9493[H_2O_2]_0} \qquad (Eq.3.11)$$

3.3.5 Effet de la concentration de phénol

3.3.5.1 Concentration optimale de phénol

Cette partie vise à tester l'effet de la concentration initiale de phénol sous les conditions optimales précédentes.Le résultats sont représentés sur la figure 3.22. Nous pouvons voir que la dégradation de phénol par la peroxydase de navet blanc augmenté avec l' augmentation de la concentration initiale de phénol dans la gamme de concentration variée entre 20 et 140 mg L^{-1} pour une activité enzymatique 5 unités mL^{-1} et une concentration de peroxyde d'hydrogène 10.6 mM.

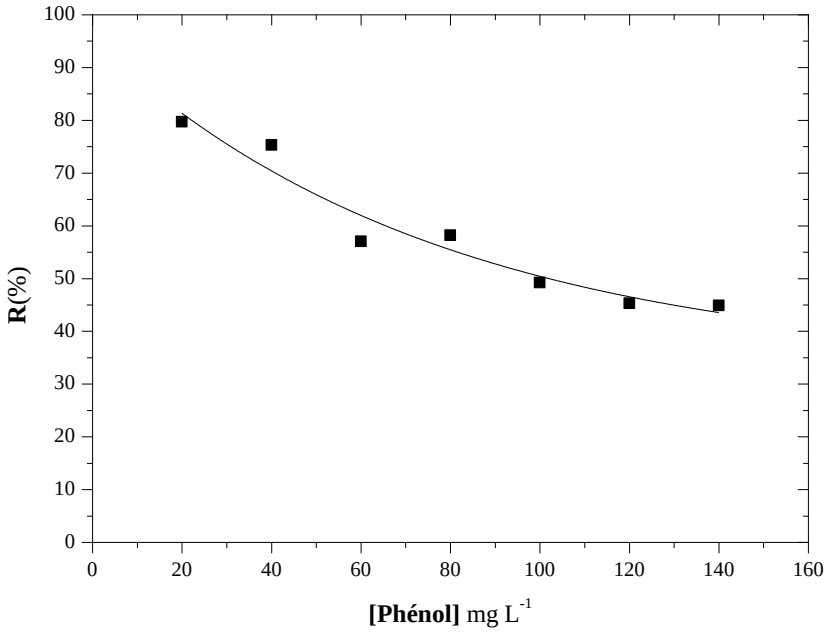


Fig.3.22. Effet de la concentration de phénol sur le rendement de la biodégradation du phénol (*T=40 °C, pH= 7, [H_2O_2] =10.6mM, temps de contact= 2 heures).*

3.3.5.2 Effet de la concentration du phénol sur la vitesse initiale et sur le taux de conversion du phénol

L'effet de la concentration du phénol sur la vitesse initiale et sur le taux de conversion du phénol est récapitulé sur la figure 3.23. Le rendement a diminué de plus de 10% lorsque la concentration initiale du phénol augmente de 20 à 80 mg L^{-1}. Par contre, la vitesse a augmenté et l'allure est parabolique. Une valeur de la concentration en phénol de 40 mg L^{-1}, correspondant au rendement environ 42% et une vitesse égale 0.35 mM min^{-1}, sera prise comme valeur optimale vu que l'objectif est que le traitement enzymatique suivra le traitement par le procédé Fenton.

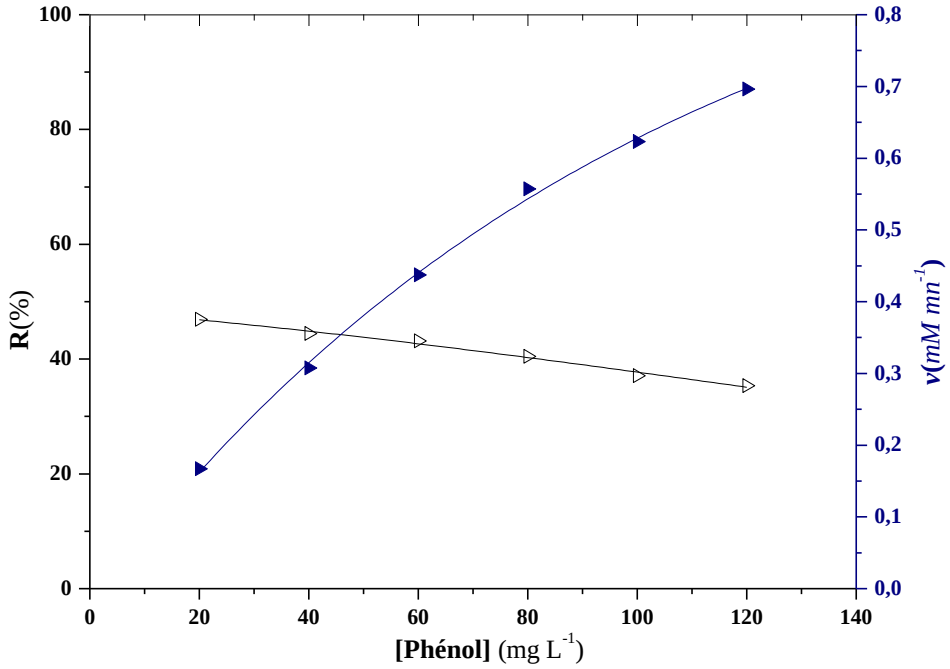


Fig.3.23. Influence de la concentration du phénol sur le rendement et la vitesse initiale de dégradation de phénol par la peroxydase immobilisée *(T=40 °C, pH= 7,[H_2O_2] =10.6mM).*

3.3.5.3 Modèle cinétique de la dégradation du phénol par la peroxydase immobilisée

Des essais en batch ont été réalisés afin de traiter une solution de phénol de concentration initiale comprise entre 20 et 140 mg L^{-1}sous les conditions suivantes: une solution tampon à pH 7,0 (0.01 M), une température de 40 °C, une concentration de 13 mM en H_2O_2 et 5 UI mL^{-1}de peroxydase immobilisée. Dans les effluents industriels, la concentration du phénol est susceptible de varier fortement. Il est donc nécessaire d'étudier son influence sur la vitesse et sur le rendement de dégradation. Les conditions optimales déterminées précédemment, ont été appliquées pour l'oxydation du phénol. La figure 3.24 montre l'évolution du rendement et la vitesse de dégradation de phénol en fonction de la concentration.

L'efficacité élevée de ce procédé a été signalée pour les concentrations initiales faibles en phénol. Pour une concentration 40 g L^{-1} le rendement de l'ordre de 75.3% parait acceptable pour une vitesse initiale estimée à 2,5E-05 *mM* min^{-1}. Ainsi, la concentration 40 g L^{-1} peut être considérée comme optimale pour une durée de contact de 165 minutes (voir la figure 3.24). Les résultats indiquent, par ailleurs, que la cinétique d'oxydation du phénol par la peroxydase immobilisée obéit à la loi de Michaelis-Menten avec un coefficient de corrélation de l'ordre de 0.945(*Sigma Plot 12,5*).

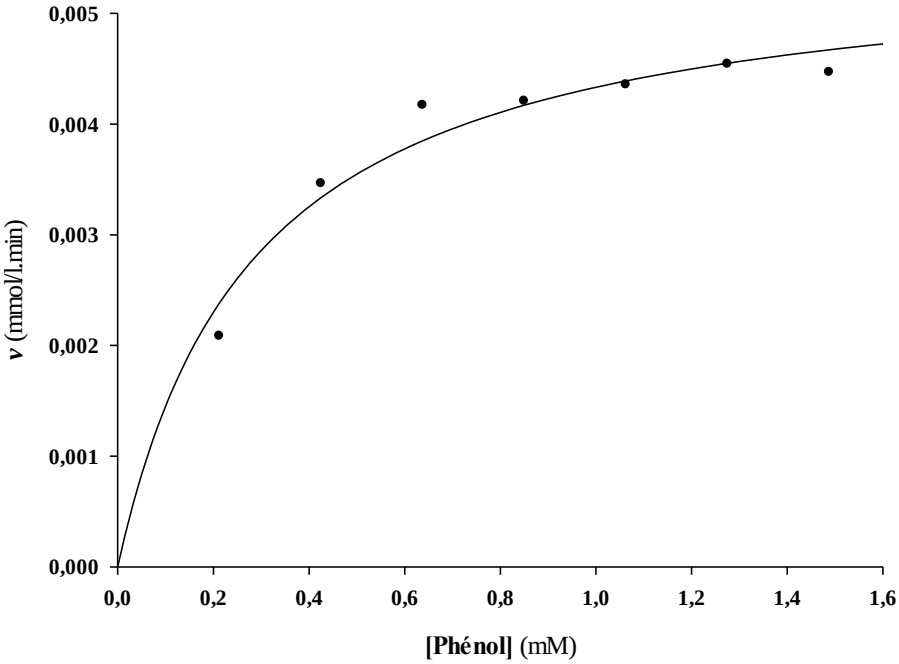


Fig. 3.24. Présentation de Michaelis-Menten *(T=40 °C, pH= 7, [H_2O_2] =10.6mM, AE= 7 UI mL^{-1}).*

Malgré que l'allure de la courbe s'approche de celle d'une cinétique de Michaelis-Menten, le palier n'a pas été atteint vu le choix de la gamme de concentrations. Néanmoins, à l'aide de la linéarisation de Lineweaver-Burk, les paramètres cinétiques du modèle pourront être estimés. Les résultats sont illustrés sur la figure 3.25.

La vitesse maximale v_{max} sera égale à 5,561E-3 $mM\ min^{-1}$ et la constante K_M=0,2835mM.

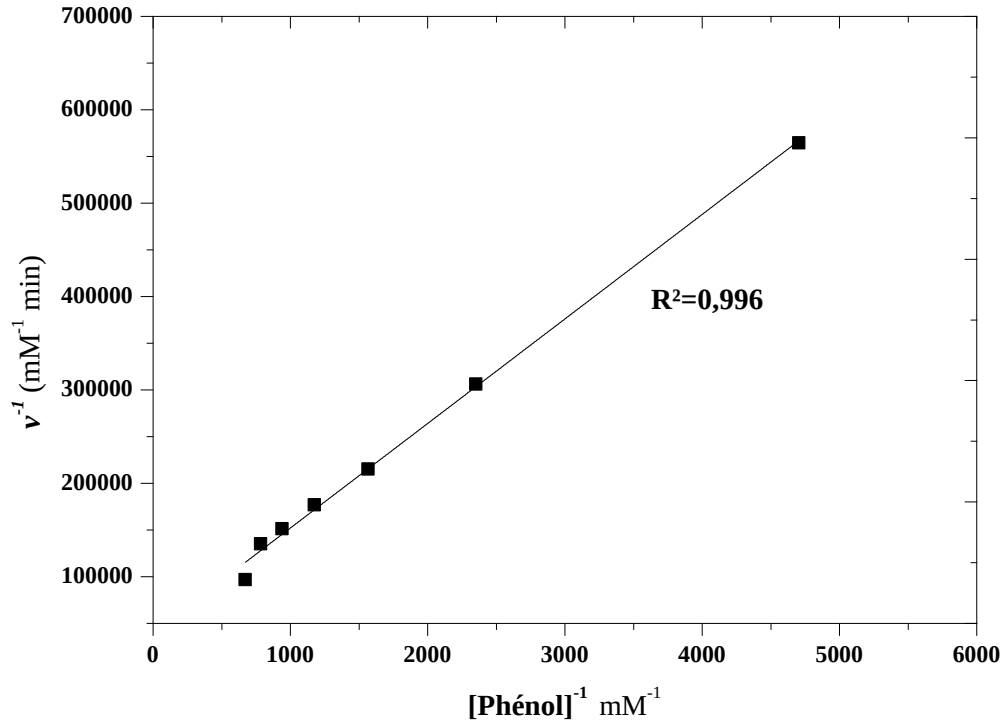


Fig. 3.25. Représentation graphique de Lineweaver-Burk des données cinétiques de la dégradation du phénol par la peroxydase immobilisée *(T=40 °C, pH= 7, [H_2O_2] =10.6 mM).*

3.3.6 Effet de temps de contact

Des échantillons ont été prélevés à des différents moments, allant de 0 jusqu'à 180 minutes avec un pas de 15 minutes, dans une réaction par lots, afin de tester l'effet de la concentration initiale de phénol (20-140 mg L^{-1}) et le temps de contact sur le rendement de dégradation du phénol. Le résultat est montré sur la figure 3.26. Selon le résultat ci-dessus, la réaction a été très rapide dans la phase initiale durant une demi-heure, et la réaction a atteint l'équilibre pratiquement après 150 minutes. Ceci est probablement dû à la perdre partielle de l'activité enzymatique (*Zhang et Nicell, 2000)*.

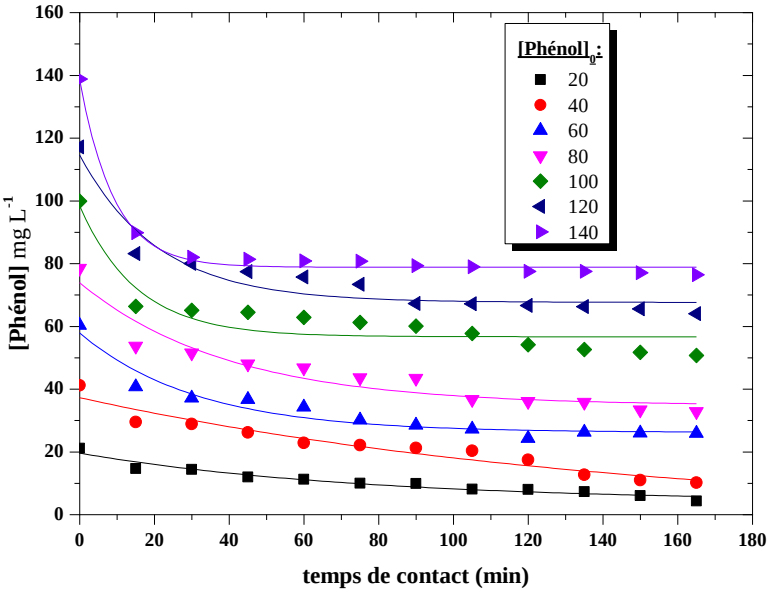


Fig.3.26. Cinétique de dégradation du phénol par la peroxydase immobilisée *(pH=7, T= 40 °C, $[H_2O_2]$ =9 mM, AE= 5 UI mL^{-1}, $[H_2O_2]$=10.6 mM).*

3.4 Comparaison entre les trois procédés : la peroxydase soluble, la peroxydase immobilisée et le procédé Fenton

Le récapitulatif des résultats de l'étude de la dégradation du phénol par les trois procédés : la peroxydase libre, la peroxydase immobilisée et le procédé Fenton, est présenté dans le tableau 3.1. La comparaison est basée sur plusieurs critères quantitatifs: la concentration initiale du phénol à traiter, la consommation des réactifs (peroxyde d'hydrogène, le sulfate ferreux et l'enzyme) ainsi que le temps de traitement et le taux de conversion du phénol.

Tableau 3.1. Résultats de l'élimination de phénol par la peroxydase soluble, la peroxydase immobilisée et le procédé Fenton.

Paramètres	PNB soluble	PNB immobilisée	Procédé Fenton
pH	7.0	8.0	3
T*(°C)*	40	40	40
v_0 ($\mu M mn^{-1}$)	37.17	5,56	6.27
[Phénol]*($mg\ L^{-1}$)*	80	45	100
$[H_2O_2]$*(mM)*	20	10.6	2.6
$[H_2O_2]$/[Phénol]*(mM/mM)*	23.5	21	2.4
$[Fe^{2+}]$ *($mg\ L^{-1}$)*	---	---	5
Activité Enzymatique*($UI\ mL^{-1}$)*	7	5	---
Temps de contact*(min)*	180	135	120

D'autres critères qualitatifs relatifs à la composition du mélange issu de chacun des traitements étudiés ont aussi été pris en compte. En effet, comme présenté dans le chapitre 1 et illustré sur la figure 1.12 les sous- produits issus de la dégradation du phénol par le procédé Fenton (l'hydroquinone, catéchol et le p-benzoquinone) peuvent être plus toxiques que le phénol. Ce résultat a été confirmé par les analyses par HPLC. D'un autre côté, certains de ces sous-produits peuvent servir de substrats qui seront transformés par la peroxydase libre ou immobilisée, en produits moins nocifs. D'où l'on pourra envisager un couplage séquentiel des deux procédés, Fenton et enzymatique. Ce couplage sera mené sous les conditions optimales déjà mentionnées pour chacun des procédés.

3.5 ÉLIMINATION DU PHÉNOL PAR COUPLAGE DES PROCÉDÉS FENTON ET ENZYMATIQUE

Le traitement d'une concentration de 100 mg L^{-1} en phénol a été effectué par le procédé Fenton (120 minutes) suivi par un traitement enzymatique avec l'enzyme libre (180 minutes) ou immobilisée (135 minutes). À l'issue du procédé Fenton, le pH sera réajusté et la concentration de phénol qui sera initialement en aval du procédé enzymatique sera extrapolée à partir des figures 3.27 à 3.33.

3.5.1 Cinétique d'oxydation du phénol par le procédé Fenton

Dans la première étape, la réaction Fenton a été effectuée sous les conditions optimales : pH3,0 et une température de 40 °C. Pour une concentration initiale en phénol de 100 mg L^{-1} (1,1 mM), le rapport cinétique optimal des réactifs sera donc Phénol: Fe^{+2}:H_2O_2 de 1:12:8.5 pour une durée de contact de120 minutes. La cinétique d'oxydation a été analysée en déterminant les concentrations de phénol et les composés générés à des intervalles de temps différents. D'après l'analyse effectué par HPLC, environ 54% de phénol initial a été converti en un mélange composés principalement par le catéchol (36,63 mg L^{-1}), l'hydroquinone (26,4 mg L^{-1}) et le benzoquinone (8,54 mg L^{-1}), tandis que l'acide oxalique (4,41 mg L^{-1}) et de l'acide formique (12,43 mg L^{-1}) ont été détectés à des concentrations plus faibles (voir les figure 3.27 et 3.28).

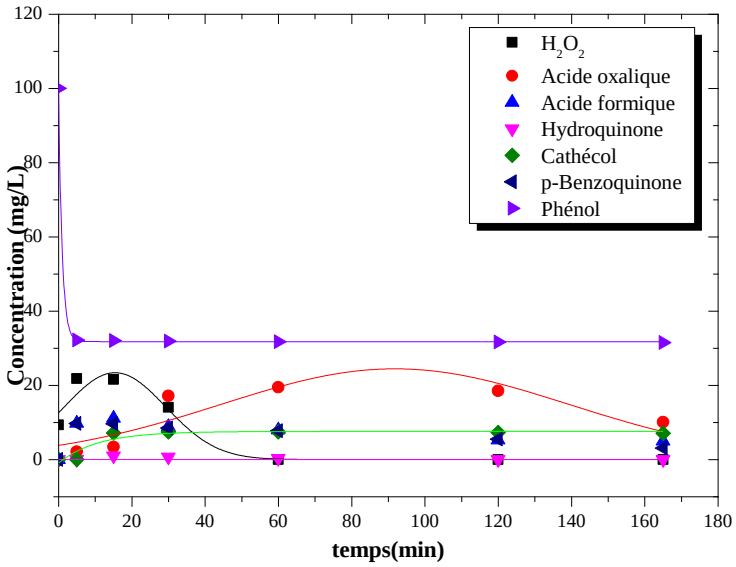


Fig.3.27. Cinétique de traitement du phénol par le procédé Fenton *(pH= 3, T= 40 °C, [Phénol]=100 mg L^{-1}, [H_2O_2] =2.6 mM, [$FeSO_4$]=5 mg L^{-1}).*

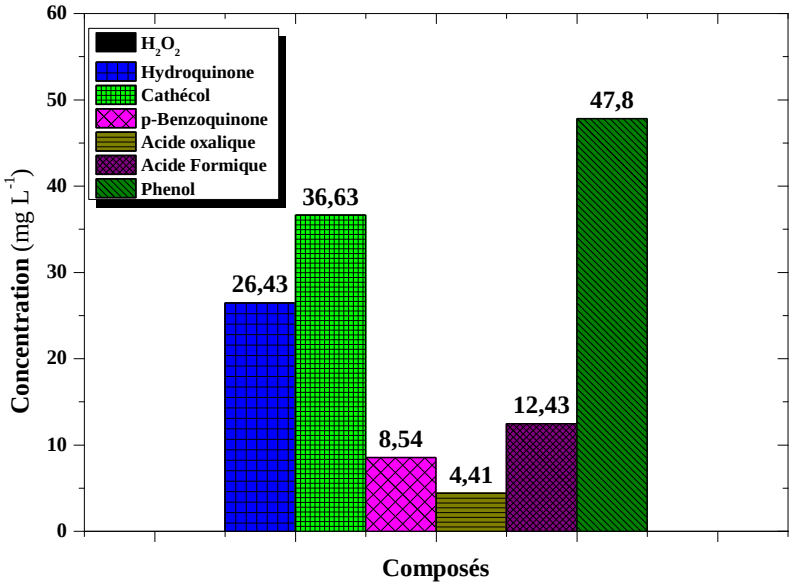


Fig.3.28. Composition final du mélange après traitement par le procédé Fenton *(pH= 3, T= 40 °C, [Phénol]=100 mg L^{-1}, [H_2O_2] =2.6 mM, [$FeSO_4$]=5 mg L^{-1}, temps du contact= 120 min).*

3.5.2 Élimination du benzoquinone par le chitosane

3.5.2.1 Caractéristique de chitosane

Le chitosane, polymère naturel de la glucosamine, est un composé provenant de la chitine *(Wada et al., 1993)*. La chitine, un polysaccharide à chaîne droite constitué de β-1, 4-lié aurési

du N-acétyle-D-glucosamine, est une composante qui se trouve en abondance dans les coques des crustacés *(Takahashi et al., 2005)*. Le chitosane présente des caractéristiques intéressantes telles que la biocompatibilité, la biodégradabilité et la non toxicité *(Alves et Mano, 2008)*. Il a un certain nombre d'applications dans le domaine de traitement des eaux usées en tant que biosorbant *(Wada et al., 1993; Takahashi et al., 2005; Alves et Mano, 2008)*. La figure 3.29 représente une molécule typique de chitosane.

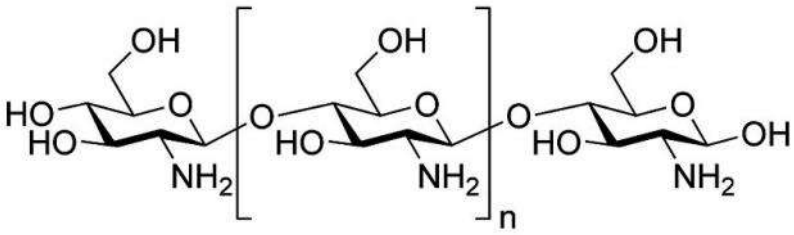


Fig.3.29. Structure de la molécule de chitosane *(Takahashi et al., 2005).*

*Wada et al.(1995)*ont démontré que les quinones dans les eaux usées peuvent subir une condensation nucléophile avec du chitosane. Dans ce procédé, la paire d'électrons célibataires de l'azote dans un groupe amino de chitosane peut facilement attaquer la quinone et former une double liaison CN. Le chitosane n'est pas soluble dans l'eau *(Alves et Mano, 2008)*, par conséquent, l'efficacité d'élimination de quinone dépend principalement de sa surface spécifique *(Sun et Payne, 1996)*. Le chitosane traité à l'acide est plus efficace pour l'élimination de la quinone *(Wada et al., 1995 ; Sun et Payne, 1996)*.

3.5.2.2 Réactions des quinones avec le chitosane

Afin d'apporter encore plus de propriétés à ce polymère naturel, quelques auteurs ont tenté de fonctionnaliser le chitosane par voie enzymatique. La plupart des études concernent la modification enzymatique du chitosane en utilisant des composés phénoliques. Ce sont, en fait, des méthodes chimio-enzymatiques qui sont utilisées pour fixer des composés phénoliques sur le chitosane. Le principe consiste à oxyder enzymatiquement certains phénols par une tyrosinase ou une peroxydase et ce sont les intermédiaires quinoniques ou semi quinoniques qui vont réagir avec le chitosane au niveau de la fonction amine primaire. Ainsi, les produits issus des réactions catalysées par la tyrosinase sont des o-quinones qui sont électrophiles et capables de réagir avec les groupements nucléophiles. Ces quinones peuvent subir au moins deux types de réactions avec les groupements amines en donnant soit des bases de Schiff, soit des adduits de type Michaélien (figure 3.30). Par exemple, *Yamada et al. (2000)* ont modifié avec succès le chitosane par oxydation tyrosinasique de la 3,4-

dihydroxyphényl éthylamine (dopamine) dans des solutions semi-diluées de ce polymère, ce qui a conduit à la formation d'un gel doté de nouvelles propriétés mécaniques. Dans une étude similaire, *Kumar et al. (1999)* ont fonctionnalisé le chitosane par oxydation enzymatique de l'acide chlorogénique avec une tyrosinase, ce qui a conduit à des dérivés du chitosane, solubles en milieu basique contrairement au chitosane natif. Ces auteurs, dans d'autres travaux, ont aussi montré que le chitosane modifié par le p-crésol oxydé par la tyrosinase fongique pouvait former des solutions hautement visqueuses susceptibles d'être converties en gels biodégradables *(Kumar et al., 2000)*.

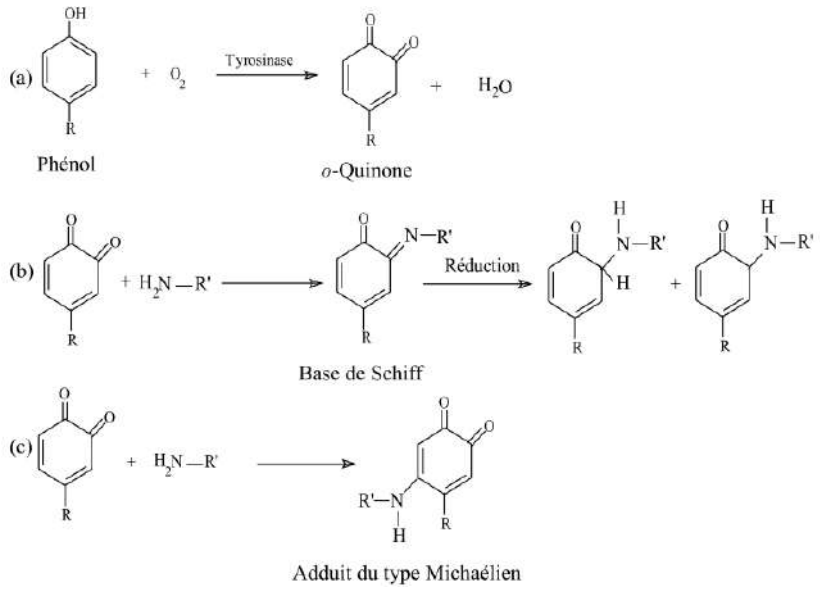


Fig. 3.30. Mécanisme réactionnel d'oxydation des composés phénoliques par la tyrosinase en présence de chitosane: **(a)** réaction catalysée par l'enzyme; **(b)** réaction chimique quinone-amine donnant une base de Schiff ; **(c)** réaction chimique quinone-amine donnant un adduit de type michaélien *(Kumar et al., 1999)*.

3.5.2.3 Effet de la concentration du chitosane sur l'élimination du benzoquinone

Le benzoquinone, le catéchol et l'hydroquinone ont été identifiés dans des produits d'oxydation du phénol par le procédé Fenton. À la fois, le benzoquinone est également généré à partir l'oxydation enzymatique de l'hydroquinone. Ce polluant prioritaire n'est pas un substrat de la peroxydase. Cependant, des additifs tels que le chitosane ont été utilisés avec succès pour éliminer le benzoquinone *(Wada et al., 1995)* au-cours de l'oxydation et la polymérisation du phénol par procédé couplé Fenton/tyrosinase immobilisée. Par conséquent, des essais en discontinu ont été mis en place pour déterminer la quantité nécessaire de chitosane pour éliminer le benzoquinone généré. Le chitosane réagit avec la quinone en formant une liaison carbone-azote. L'azote des groupes amino du chitosane se condense avec un atome de carbone de molécules carbonyle de quinone *(Wada et al., 1995)*. L'efficacité

d'élimination de quinone dépendra de la surface spécifique du chitosane *(Sun et Payne, 1996)*, sachant que le chitosane est insoluble en solution aqueuse à pH≥ 6*(Alves et Mano, 2008; Wada et al., 1995; Sun et Payne, 1996)*. Les quinones traitées peuvent ainsi être facilement séparées par précipitation.

D'après la figure 3.31 une concentration de 4 g L^{-1} a pu faire éliminer 99,8% de benzoquinone généré par les deux procédés Fenton et enzymatique à partir d'une solution contenant initialement 16,9 mg L^{-1}. Au-delà de cette concentration de 4 g L^{-1} l'ajout du chitosane n'a aucune influence sur le taux d'élimination de benzoquinone. C'est cette valeur qui sera considérée comme une valeur optimale.

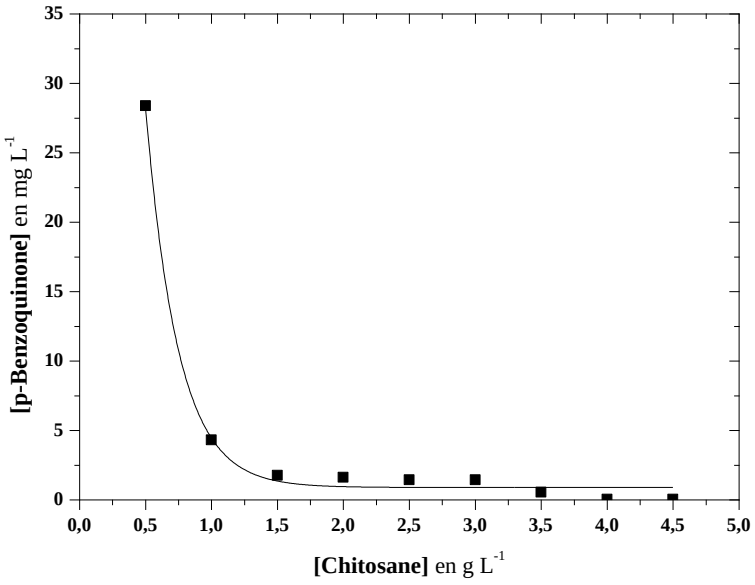


Fig.3.31. Élimination de p-benzoquinone par le chitosane
pH=7, T= 40 °C, [Phénol]=40 mg L^{-1}, [H_2O_2] =9 mM, temps du contact= 165 min.

3.5.3 Cinétique d'oxydation des composés phénoliques par le procédé couplé Fenton/Peroxydase immobilisée

Le temps de traitement de l'effluent présente une importance capitale dans la conception du procédé de traitement. Il détermine le volume et aura un impact direct sur l'efficacité et sur la rentabilité du traitement *(Wu et al., 1993)*. Par conséquent, il est important de déterminer le temps minimum nécessaire pour atteindre une conversion spécifiée (Par exemple, ≥ 95%) de ces substrats choisis. Suite au traitement par le procédé Fenton, la conversion du phénol résiduel et des produits générés est réalisée en batch par la peroxydase immobilisée en présence de peroxyde d'hydrogène (10.6 mM), peroxydase immobilisée (5 unités mL^{-1}) sous

après ajustement du pH à la valeur 7.0 et en maintenant la température à 40 °C. D'après les analyses colorimétriques et par HPLC, la concentration de phénol à l'entrée du batch enzymatique est de l'ordre de 35 mg L^{-1}. Des échantillons ont été prélevés à divers intervalles de temps micro-filtrée et analysés par HPLC (voir la figure 3.32).

Un taux de conversion supérieur à 80% a été réalisé durant les deux premières heures de traitement enzymatique pour les quatre substrats: phénol, H_2O_2, hydroquinone et le catéchol, mais une durée de réaction de 165 minutes est nécessaire pour obtenir la conversion de 99% de phénol. La concentration du phénol restant a été de l'ordre de 0.33 mg L^{-1} (voir la figure 3.33). L'acide oxalique et acide formique ont été détectés à la sortie de procédé Fenton à de faibles concentrations (4,4 et 12,4 mg L^{-1}), et sont encore plus faibles à l'issue du traitement enzymatique (1,71 et 0 mg L^{-1}). Des échantillons prélevés périodiquement pour tester l'activité de la peroxydase durant le temps ont montré que de faibles niveaux d'inactivation de l'enzyme se sont produits au cours de la période de réaction de trois heures. Ce qui présente un résultat positif pour la durabilité du processus.

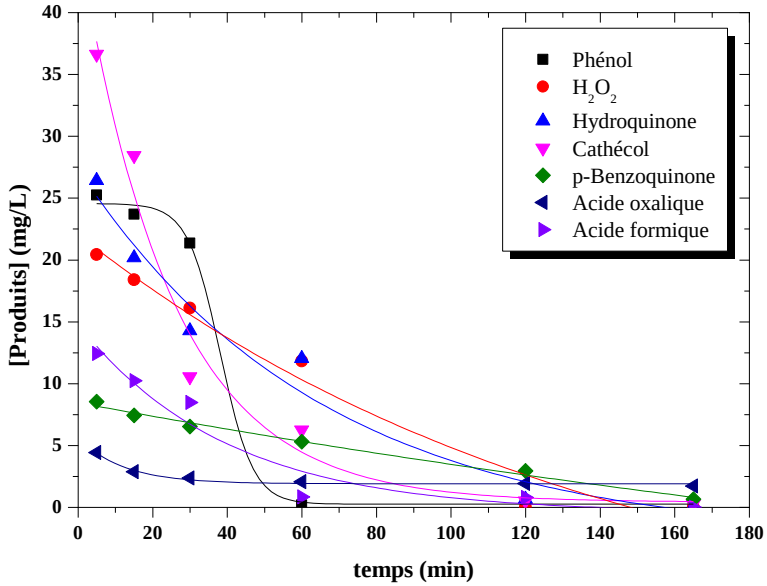


Fig.3.32. Cinétique d'oxydation du phénol par la peroxydase incluse dans l'alginate de calcium

Conditions de procédé Fenton *:pH= 3, T= 40 °C, [Phénol]=100 mg* L^{-1}*, [*H_2O_2*] =2.6 mM, [*$FeSO_4$*]=5 mg* L^{-1}*; temps du contact= 120 min*

Conditions de la peroxydase immobilisée *: pH=7, T= 40 °C, [Phénol]=40 mg* L^{-1}*, [*H_2O_2*] =9 mM, AE= 5 UImL*$^{-1}$*, [*H_2O_2*]/[phénol]=18.4, , temps du contact= 165 min.*

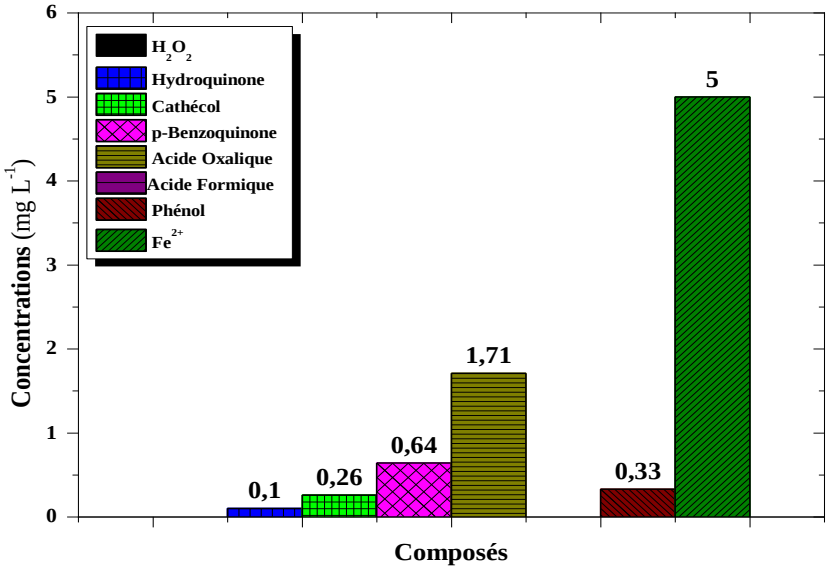


Fig.3.33. Composition du mélange réactionnel traité par le procédé couplé Fenton/Peroxydase immobilisée.

Conditions de procédé Fenton *:pH= 3, T= 40 °C, [Phénol]=100 mg* L^{-1}*,* $[H_2O_2]$ *=2.6 mM,* $[FeSO_4]$*=5 mg* L^{-1}*; temps du contact= 120 min*

Conditions de la peroxydase immobilisée *: pH=7, T= 40 °C, [Phénol]=40 mg* L^{-1}*,* $[H_2O_2]$ *=9 mM, AE= 5 UI* mL^{-1}*,* $[H_2O_2]/[phénol]=18.4$*, , temps du contact= 165 min.*

Nos résultats confirment la faisabilité du couplage séquentiel des deux procédés, chimique (Réaction Fenton) et enzymatique (Peroxydase), pour l'élimination du phénol à partir d'une phase aqueuse. Le processus réalisé en deux étapes, où la réaction Fenton est effectuée dans la première étape et la polymérisation enzymatique dans la seconde. L'élimination du phénol a été quasi-totale (99,7%).

Durant l'étape I, une élimination par voie chimique de 60% du phénol initial (100 mg L^{-1}) a été réalisée par le procédé Fenton pendant 120 minutes sous un pH (3), température (40 °C). Avec une consommation minimale de H_2O_2 (2.6 mM) et une dose de fer (5 mg/L) répondant aux normes environnementales. Cette étape a permis de réduire le phénol dans le milieu à la valeur optimale nécessaire pour conduire le deuxième procédé enzymatique. Par ailleurs, Les sous-produits générés par la réaction Fenton le phénol comme l'hydroquinone, catéchol et le benzoquinone ont subi une transformation et une réduction maximale par le traitement enzymatique.

En deuxième étape, une intégration de la peroxydase immobilisée a permis de traiter le phénol restant, l'hydroquinone et le catéchol après ajustement du pH du milieu réactionnel à pH 8.0 et pour une dose de peroxyde d'hydrogène à la valeur optimale (10,6 mM) vis-à-vis de

l'enzyme immobilisée. Enfin, un traitement en ligne par précipitation-coagulation à l'aide de chitosane (4 g L^{-1}) était nécessaire pour la réduction de la concentration de benzoquinone qui ne pouvait pas être transformé par voie enzymatique. La durée de cette deuxième étape était de 165 minutes.

Les résultats ont montré les aspects qualitatifs et quantitatifs de la synergie entre les deux procédés en termes de rendement, durée de traitement, économie de réactifs et normes de rejet. Les deux procédés sont aussi classés parmi les plus rentables et répondant aux critères de la chimie verte.

3.6 Application du procédé couplé Fenton/ peroxydase immobilisée pour le traitement d'un effluent pharmaceutique contenant le phénol

Le phénol rentre dans plusieurs formulations pharmaceutiques telles que celle de la Cobamine (médicament antianémique) synthétisées au niveau du complexe Antibiotical de Médéa. Il est composé par le Cyanocobalamine ou la vitamine B_{12} (1000 µg mL^{-1}) et le phénol (4 mg mL^{-1}). Leur dosage en phénol consiste à préparer dans une fiole de jaugé de 100 mL une solution (effluent) composé par 60 mg de phénol, 15 mL de méthanol et le reste au tri de jaugé est compléter par de l'eau distillé. Un volume de 1 µL de cette solution est utilisé alors que le reste est rejeté, ce qui entraine la présence de fortes doses de phénol dans les effluents. La méthode de l'élimination de phénol par le procédé couplé Fenton et la peroxydase encapsulée dans l'alginate de calcium a été testée sur un volume de 50 mL de cet effluent sous les conditions optimisées.

Les caractéristiques de l'effluent pharmaceutique traité sous les conditions optimales par le procédé couplé Fenton et la peroxydase immobilisée suivi par un précipitation-coagulation de benzoquinone en utilisant le chitosane a été résumé dans le tableau 3.2 et la figure 3.35 ci-dessous. Une concentration initiale de 77 mg L^{-1} en phénol a été éliminée en quasi-totalité pendant une durée totale 330 minutes avec un pourcentage de 99.6%. Les paramètres résiduaires de l'eau traitée : DBO_5, DCO et l'indice de phénol ont été réduits de 66.7, 72.7 et 93.4% respectivement. À la fin du procédé, la MES est de l'ordre de 20 mg L^{-1} et le rapport massique DBO_5/DCO égal à 0.2. Des concentrations résiduelles minimes d'hydroquinone, de catéchol et de benzoquinone de l'ordre de 1, 3.5 0.1 mg L^{-1}respectivement, ont été détectées. L'effluent traité répond donc aux normes algériennes pour le rejet des eaux industrielles. Le

procédé couplé pourra être efficace, à l'échelle industrielle, pour le traitement des effluents contenant les composés phénoliques.

Tableau 3.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'effluent pharmaceutique traité par le procédé couplé Fenton/peroxydase immobilisée.

Produits/Paramètres	**Unités**	**Couplage**		**Valeurs Limites**	**Références**
		Avant	**Après**		
Phénol	*mg* L^{-1}	77	0,39	1	*JORA, 2009*
DBO_5	*mg* L^{-1}	15	5	35	*JORA, 2009*
DCO	*mg* L^{-1}	44	12	120	*JORA, 2009*
DBO_5/DCO	---	0,34	0,42	0.2	*JORA, 2009*
Indice de phénol	*mg* L^{-1}	4,27	0,28	0.3	*JORA, 2009*
pH	---	5.45	7.05	6,5 - 8,5	*JORA, 2009*
Hydroquinone	*mg* L^{-1}	0	1,49	1	---
Catéchol	*mg* L^{-1}	0	1,93	3.5	---
p-Benzoquinone	*mg* L^{-1}	0	0	0.1	*JORA, 2009*
Acide oxalique	*mg* L^{-1}	0	14,75	---	---
Acide formique	*mg* L^{-1}	0	0	---	---
MES	*mg* L^{-1}	0	20	---	*JORA, 2009*

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de cette étude était de démontrer la faisabilité d'une solution innovante destinée au traitement des effluents chargés de polluants de type phénolique. Il s'agit du couplage séquentiel de deux procédés, chimique (réaction Fenton) et enzymatique (la peroxydase). L'idée était d'exploiter les avantages de l'un des procédés pour surmonter les difficultés et les inconvénients qualitatifs et quantitatifs générés par le deuxième. Une étape de prétraitement par la réaction d'oxydation avancée, Fenton, a été suivie d'une étape de polymérisation enzymatique par la peroxydase (libre ou immobilisée) du reste de phénol et de composés aromatiques générés.

L'étude a été entamée par l'optimisation des procédés Fenton et Enzymatique pris individuellement, en choisissant les conditions favorables dans le but d'atteindre l'efficacité maximale. Les principaux paramètres d'optimisation étaient le pH, la concentration de fer ferreux, la concentration de peroxyde d'hydrogène, l'activité enzymatique le temps de réaction. La réaction Fenton a été optimisé dans les conditions suivantes : **pH 3.0**, une température **40 °C**, **[Phénol]: [H_2O_2]: [Fe^{2+}]= 1.1: 2.6: 0,09** et un temps de contact de **165 minutes.** Environ **59%** du phénol initial a été converti en produits de dimérisation oxydative (acide citrique et acide formique) et des produits d'hydroxylation (phénol, catéchol, hydroquinone et le benzoquinone).

Dans une étude analogue, des solutions contenant différentes concentrations de phénol a été traitées par un oxydation enzymatique en utilisant, la peroxydase de navet blanc sous forme soluble et immobilisée dans l'alginate de calcium. Le taux de conversion du phénol variait suivant le rapport optimal **[Phénol]: [H_2O_2]** et l'activité enzymatique de l'enzyme libre ou immobilisée. **Le pH** et la température ont été maintenus constants. Les résultats ont permis, par ailleurs, de suivre les cinétiques de dégradation et déterminer les temps de contact optimaux dans le but d'éliminer le maximum de phénol.

Le couplage Fenton-Enzyme a été initié par une étape de prétraitement d'une concentration de **donnée** de phénol par la réaction Fenton, suivi par un traitement enzymatique avec la peroxydase libre ou incluse dans l'alginate de calcium. La réaction de Fenton a été menée pendant une durée contrôlée de façon qu'après ajustement du pH, la concentration de phénol traitée doit être à sa valeur optimale pour subir une dégradation efficace par la peroxydase

libre ou immobilisée. Le procédé hybride a permis d'atteindre un taux d'élimination du phénol supérieur à 95%, de réduire la dose de Fer, catalyseur du procédé Fenton et de réduire les concentrations de la majorité des sous-produits qui en sont issus au-dessous des normes de rejets industriels. Le benzoquinone généré (**16,9 mg L^{-1}**) par le procédé Fenton et qui n'a pu être oxydé par la peroxydase immobilisée a été éliminé par adsorption sur chitosane.

Le procédé couplé Fenton-Peroxydase immobilisée a été appliqué pour le traitement d'un effluent pharmaceutique contenant le phénol sous les conditions optimales prédéterminées. Les concentrations de l'hydroquinone, de catéchol et de benzoquinone restants après traitement ainsi que les paramètres environnementaux tels que la DBO_5, DCO et l'indice de phénol ont été réduits au-dessous des valeurs maximales admissibles. Les résultats obtenus sont encourageants en vue du développement du sujet sur divers axes, tels que:

1. Améliorer le support d'inclusion de l'enzyme. Réoptimiser le support d'inclusion de l'enzyme par l'utilisation des plans d'expériences ou bien tester l'efficacité d'autres supports (chitosane, pectine, acrylamide ...ect) afin d'augmenter le nombre de réutilisations de l'enzyme ainsi sa stabilité.
2. Tester le procédé couplé sur d'autres composés phénoliques individuellement ou en mélanges.
3. Essais de mise en œuvre de procédé continu.
4. Mise à l'échelle au niveau du laboratoire dans des réacteurs agités.
5. Étudier la possibilité de génération in-situ du peroxyde d'hydrogène par voie enzymatique ou électrochimique.
6. Voir les possibilités de valorisation de substances polymériques issus du traitement par couplage Fenton-Enzyme.
7. Tester l'efficacité de peroxydases provenant d'autres sources.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adams C.D., Scanlon P.A. and Secrist N.D. (1994)**. Oxidation and biodegradability enhancement of 1,4-Dioxane using hydrogen peroxide and ozone, Environ Sci.Technol (28):1812–8.
2. **Adams C.D., Spitzer S. and Cowan R.M. (1996).** Biodegradation of non-ionic surfactants and effects of oxidative pre-treatment, J Environ Eng (122):477–83.
3. **Adhoum N. and Monser L. (2004).** Decolourization and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater by electrocoagulation, Chemical Engineering and Processing 43(10): 1281-1287.
4. **Aitken M.D. (1989).** Stability testing of ligninase and Mn peroxidase from Phanerochaete chrysosporium, Biotechnology and Bioengineering (34):1251-1260.
5. **Aitken M.D., Massey J.I., Chen T. and Heck P. E. (1994)**. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. Water Research, 28(9):1879-1889.
6. **Alemzadeh I. and Nejati S. (2009).** Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase, Journal of Hazardous Materials (166): 1082–1086.
7. **Allan R.E. et al.(1994).** Patty's industrial hygiene and toxicology: toxicology. Vol. 2, part A, 4th ed. New York; Toronto : Wiley.
8. **Alves N.M. and Mano J.F. (2008)**. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications, Int. J. Biol. Macromol.(43) : 401–414.
9. **Amanda K. Andriola, Silva Brun-Graeppi, Richard C., Bessodes M., Scherman D., Merten O-W. (2011).**Review- Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers.Journal of Controlled Release (149) : 209–224.
10. **ATSDR (2008).** Toxicological Profile for Phenol. Services U.D.o.H.a. H. USA,US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
11. **Augugliaro V., Litter M., Palmisano L. and Soria J. (2006).** The combination of heterogeneous photocatalysis with chemical and physical operations: a tool for improving the photoprocess performance. J Photochem Photobiol(7):127–44.
12. **Azabou S., Najjar W., Gargoubi A., Ghorbel A. and Sayadi S. (2007).** Catalytic wetperoxide photo-oxidation of phenolic olive oil mill wastewater contaminants: Part II. Degradation and detoxification of low-molecular mass phenolic compounds in model and real effluent. Applied Catalysis B: Environmental 77(1-2): 166-174.
13. **Azizi A., Abouseoud M. and Ahmadi A. (2014).** Phenol removal by soluble and alginate entrapped turnip peroxidase, J Biochem Tech 5(4):795-800 .
14. **Babuponnusami A. and Muthukumar K. (2011).** Degradation of phenol in aqueous solution by Fenton, sono-Fenton, Sono-photo-Fenton methods, Clean-Soil Air Water (39): 142–147.
15. **Bacardit J., Hultgren A., Garcia-Molina V. and Esplugas S. (2006).**Biodegradability enhancement of wastewater containing 4-chlorophenol by means of photo-Fenton. J AdvOxidTechnol (9):27–34.
16. **Balcioglu I.A., Arslan I. and Sacan M.T. (2001).**Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of two commercial reactive dyes. Environ Technol (22):813–22.
17. **Bandara J., Pulgarin C., Péringer P. and Kiwi J. (1997).**Chemical photoactivated coupling of biological homogeneous degradation of p-nitrotoluene sulfonic acid in a flow reactor.J Photochem Photobiol A (111):253–63.
18. **Barb W.G., Baxendale J.H., George P. and Hargrave K.R. (1949).**Reaction of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide. Nature (163): 692-694.
19. **Barb W.G., Baxendale J.H., George P. and Hargrave K.R. (1951)**. Reaction of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide part II - the ferric ion reaction, Trans. Faraday Soc. (47): 591-616.
20. **Bassi A., Geng Z. and Gijzen M. (2004).**Enzymatic removal of phenol and chlorophenols using soybean seed hulls. Engineering in Life Science (4):125-130.
21. **Baynton K. J., Bewtra J. K., Biswas N. and Taylor K. E. (1993).**Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. Biochimica et BiophysicaActa(1206):272-278.
22. **Beeta Saha, Keith. E. Taylor, Nihar Biswas and Bewtra J. K. (2008).** Laccase-catalyzed Removal of Diphenylamine from Synthetic Wastewater. Water EnvironmentResearch, 80 (11): 2118-2124.
23. **Beltrán-Heredia J., Torregrosa J., García J., Domínguez J.R. and Tierno J.C. (2001)**. Degradation of olive mill wastewater by the combination of Fenton's reagent and ozonation processes with an aerobic biological treatment. Water SciTechnol (44):103–8.

24. **Bewtra J.K., Biswas, N., Henderson, W.D. and Nicell J.A. (1995).**Recent advances in treatment of selected hazardous wastes. Water Quality Research Journal of Canada 30(1): 115-125.
25. **Bhatkhande D.S., Pangarkar V.G. and Beenackers A.A.C.M. (2002).**Photocatalytic degradation for environmental applications: areview. J ChemTechnolBiotechnol (77):102–16.
26. **Bisson M., Diderich R., Lacroix G., Lefevre J. P., Leveque S., Magaud H. and Villey C. (2005**). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : phénol, INERIS.
27. **Bollag J. M., Chu H. L., Rao M. A. and Gianfreda L. (2003).**Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. Journal of EnvironmentQuality (32): 63-69.
28. **Bonnard N., Brondeau M.-T., Jargot D., Lafon D., Miraval S. and Schneider O. (2011)**, Fiche Toxicologique du phénol.Services Techniques et Médicaux de l'INRS.
29. **Borja R., Alba J. et Banks C. J. (1997)**. Impact of the main phenolic compounds of olive mill wastewater (OMW) on the kinetics of acetoclastic methanogenesis. Process Biochemistry 32(2): 121-133.
30. **Bowers A.R., Cho S.H. and Singh A. (1991).**Chemical oxidation of aromatic compounds: comparison of H_2O_2, $KMnO_4$ and O_3 for toxicity reduction and improvements in biodegradability. In: Eckenfelder WW, Bowers AR, Roth JA, editors. Chemical oxidation technologies for the nineties. Lancaster, PA: Technomic Publication Company : 11–25.
31. **Bowers A.R., Gaddipati P., Eckenfelder Jr W.W. and Monsen R.M. (1989).**Treatment of toxic or refractory wastewater with hydrogen peroxide. Water SciTechnol (21):477–86.
32. **Bradford M. M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.Analytical Biochemistry (72): 248-254.
33. **Bradfored M.M. (1976).**A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.Analytical biochemistry (72): 248-254
34. **Brausch J. M. and Rand G. M. (2011).** A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. Chemosphere 82(11): 1518-1532.
35. **Bray W.G. and Gorin M. (1932)**. Ferryl ion, a compound of tetravalent iron. J. Am. Chem. Soc. (54): 2124-2125.
36. **Brillas E. Boye, B., Sirès I., Garrido J.A., Rodriguez R.M., Arias C. and Cabot P-L.(2004)**, Electrochemical destruction of chlorophenoxy herbicides by anodic oxidation and electro-fenton using a boron-bored diamond electrode, Electrochim. Acta.(49): 4487-4496.
37. **Budavari S., O'Neil M. J., Smith A. and Heckelman P.E. (1989).** Phenol. The Merck Index, 11th ed. Rahway, NJ: Merck and Co., Inc., 1150.
38. **Busca G., Berardinelli S., Resini C. and Arrighi L. (2008)**. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. Journal of Hazardous Materials 160(2-3): 265-288.
39. **Camarero S., Ibarra D., Martinez A. T., Romero J., Gutierrez A. and del Rio J. C.(2007)**. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. Enzyme and MicrobialTechnology 40(5): 1264-1271.
40. **Cao L. (2006).**Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects , in Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG. doi: 10.1002/3527607668.ch1.
41. **Capasso R., Evidente A., Schivo I., Orru G., Marciallis M. A., Cristinzo G. and Appl J. (1995).** Antibacterial polyphenols from olive mill waste waters. Journal of Applied Bacteriology (79): 393-398.
42. **Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S. R., GiovannozziSermanni G. and Lo Cascio B. (2003)**. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (Triticum durum Desf.) germinability. Chemosphere 50(8): 959-966.
43. **Casella L., Monzani E. and Nicolis S. (2010).**Chapter 6-Potential Applications of Peroxidases in the Fine Chemical Industries_E. Torres and M. Ayala (eds.). BiocatalysisBased on HemePeroxidases. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
44. **Caza N., Bewtra J. K., Biswas N. and Taylor K. E. (1999).** Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase, Waster Research(33): 3012-3018.
45. **Chamarro E., Marco A. and Esplugas S. (2001).**Use of Fenton reagent to improve organic chemicalbiodegradability. Water Res (35):1047–51.
46. **Chaplin M.F. and BuckeC. (1990).** Enzyme technology. New York: Cambridge

University Press.

47. **Charinpanitkul T., Limsuwan P., Chalotorn C., Sano N., Yamamoto T., Tongpram P.,Wongsarivej P., Soottitantawat A. and Tanthapanichakoon W. (2010)**. Synergetic removal of aqueous phenol by ozone and activated carbon within three-phase fluidized-bed reactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 16(1): 91-95.
48. **Chen R., Jiang H., Jin W. and Xu N. (2009)**. Model Study on a Submerged Catalysis/Membrane Filtration System for Phenol Hydroxylation Catalyzed by TS-1.Chinese Journal of Chemical Engineering 17(4): 648-653.
49. **Cheng J., Ming Yu S. and Zuo P. (2006).** Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. Water Research 40(2): 283-290.
50. **Chu W., Kwan C.Y. and Chan K.H. (2005)**. A study of kinetic modelling and reaction pathway of 2,4-dichlorophenol transformation by photo-Fenton-like oxidation, J. Hazrd. mat.(121): 119-126.
51. **Cohen S., Belinky P. A., Hadar Y. and Dosoretz C. G. (2009).** Characterization of catechol derivative removal by lignin peroxidase in aqueous mixture. Bioresource Technology 100(7): 2247-2253.
52. **Comninellis C., Kapalka A., Malato S., Parsons S.A., Poulios I. and Mantzavinos D.(2008).** Perspective.Advanced Oxidation Processes for water treatment: advances and trends for R&D.J Chem Technol Biotechnol (83):769–76.
53. **Cooper V. A. and Nicell J. A. (1996).** Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. Water Research 30(4): 954-964.
54. **Cornish-Bowden A., Jamin M. and Saks V. (2004).**Cinétique enzymatique**.** Portland Press, Ltd. London.
55. **Croft S., Gilbert B.C., Lindsay Smith J.R. and Whitwood A.C. (1992).** An E.S.R. investigation of the reactive intermediate generated in the reaction between Fe(II) and H_2O_2 in aqueous solution. Direct evidence for the formation of the hydroxyl radical, Free Rad. Res. Comms. 17 (1): 21-39
56. **D'Annibale A., Stazi S. R., Vinciguerra V. and GiovannozziSermanni G. (2000).**Oxirane-immobilized Lentinulaedodes laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. Journal of Biotechnology 77(2-3): 265-273.
57. **D'Souza S.F. (1998)**. Immobilized enzymes in bioprocess. CurrSci (77):69–79.
58. **Da Pozzo, P., Ferrantelli, C. and Petrucci. E.(2005)**. Oxidation efficiency in the electro-Fenton process, J. Appl. Electrochem. (35): 391–398
59. **D'Annibale A., Casa R., Pieruccetti F., Ricci M. and Marabottini R. (2004)**. Lentinulaedodes removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durumwheat (TriticumdurumDesf.) germinability. Chemosphere 54(7): 887-894.
60. **Davidenko T. I., Oseychuk O. V., Sevastyanov O. V. and Romanovskaya I. I. (2004).**Peroxidase oxidation of phenol. AppliedBiochemistry and microbiology (40):542-546.
61. **De La Rubia T., Lucas M. and Martínez J. (2008)**. Controversial role of fungal laccases in decreasing the antibacterial effect of olive mill waste-waters. Bioresource Technology 99(5): 1018-1025.
62. **De Laat J., Le G.T. and Legube B. (2004)**. A comparative study of the effects of chloride, sulfate and nitrate ions on the rates of decomposition of H_2O_2 and organic compounds by Fe(II)/H_2O_2 and Fe(III)/H_2O_2, Chemosphere (55): 715-723.
63. **Dec J. and Bollag J. M. (1990).**Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions, Archives of Environment Contamination and Toxicology (19): 543-550.
64. **Devipriyas S. and Yesodharan S.(2005).** Photocatalytic degradation of pesticide contaminants in water. Sol Energy Mater Sol Cells (86):309–48.
65. **Diagne M. (2006).** Etude de dégradation par oxydation avancée électrochimique et photochimique de pesticides organophosphorés : Application à la dégradation du parathion méthyle et de l'acéphate en milieu aqueux, Thèse de doctorat de l'université de Marne la Vallée.
66. **Duarte-Vazquez M. A., Garcia-Almendarez B., Regalado, C. and Whitaker J. R. (2001).**Purification and properties of a neutral peroxidase isozyme from turnip (*Brassica napus L.* var. purple top white globe) roots.Journal of Agricultural and Food Chemistry, (49):4450–4456.
67. **Duarte-Vazquez M. A., Whitaker J. R., Rojo-Dominguez A., Garcia-Almendarez B. E. and Regalado C. (2003).** Isolation and thermal characterization of an acidic isoperoxidase from turnip roots.Journal of Agricultural and Food Chemistry (51):5096–5102.
68. **Duarte-Vazquez M.A., Ortega-Tovar M. A., Garcia-Almendarez B. E. and Regalado C. (2002).**Removal of aqueous phenolic compounds from a model system by oxidative polymerization with turnip (Brassica napus L var purple top white globe) peroxidase. Journal

of Chemical Technology and Biotechnology(78):42-47.

69. **Duran N. and Esposito E. (2000)**. Potential applications of oxidative enzymes and phenol oxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. Applied Catalysis B: Environmental 28(2): 83-99.

70. **Eckstein T. (1994).**Sequential advanced oxidation–biodegradation of simple aqueous solutions of aromatic compounds. PhD thesis, University of North Carolina at Chapel Hill.

71. **Eduardo Torres and Marcela Ayala (2010).** Biocatalysis Based on Heme Peroxidases, Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

72. **Ehlers G. A. and Rose P. D. (2005).**Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation. BioresourceTechnology 96(11): 1264-1275.

73. **Eisenhauer H.R. (1964).** Oxidation of phenolic wastes, J. Water Pollut. Control Fed. (36): 1116–1128.

74. **El Hajjouji H., Fakharedine N., Ait Baddi G., Winterton P., Bailly J. R., Revel J. C. and Hafidi M. (2007)**. Treatment of olive mill waste-water by aerobic biodegradation: An analytical study using gel permeation chromatography, ultraviolet-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. Bioresource Technology 98(18): 3513-3520.

75. **ETSC (2008)**. Seuils de toxicité aiguë-phénol, Expertise Toxicologique des Substances Chimiques.

76. **Fabiano Silvia (2002).** Immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur : le PEDT. Thèse Doctorat en chimie-Biochimie

77. **Fenton H. J. H. (1894**). Oxidation of tartaric acid in the presence of ion, J. Chem. Soc. (65): 899-810.

78. **Flickinger C.W. (1976).** The benzenediols: catechol, resorcinol and hydroquinone- a review of the industrial toxicology and current industrial exposure limits». American Industrial Hygiene Association Journal 37(10): 596-606.

79. **Flock C., Bassi A. and Gijzen M. (1999).**Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls. Journal of Chemical Technology Biotechnology (74):303–309.

80. **Galindez-Mayer J., Ramon-Gallegos J., Ruiz-Ordaz N., Juarez-Ramirez C., Salmeron-Alcocer A. and Poggi-Varaldo H. M. (2008).** Phenol and 4-chlorophenol biodegradation by yeast Candida tropicalis in a fluidized bed reactor. Biochemical Engineering Journal 38(2): 147-157.

81. **Gallard H. (1998)**. Modélisation cinétique de la décomposition de H_2O_2 et de composés organiques en milieu aqueux par les procédés d'oxydation H_2O_2/Fe(II) et H_2O_2/Fe(III). Thèse de l'Université de Poitiers.

82. **García M.T., Ribosa I., Guindulain T., Sánchez-Leal J. and Vives-Rego J. (2001).**Fate and effect of monoalkyl quaternary ammonium surfactants in the aquatic environment. Environ Pollut(111):169–75.

83. **García-Montaño J, Ruiz N, Muñoz I, Doménech X, García-Hortal JA and Torrades F (2006a)**. Environmental assessment of different photo-Fenton approaches for commercial reactive dye removal. J Hazard Mater (A138):218–25.

84. **Gaspar T., Penel C., Thorpe T. and Greppin H. (1982).** Peroxidases 1970-1980. University of Geneva. GenevaBotanical Center.

85. **Gaya U.I. and Abdullah A.H. (2008).**Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants over titanium dioxide: a review of fundamentals, progress and problems. J PhotochemPhotobiol C (9):1-12.

86. **Gilabert M. A., Fenoll L. G., Garcia-Molina F., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J., Garcia-Cánovas F. and Rodriguez-Lopez J. N. (2004).**Stereospecificity of horseradish peroxidase. Biological Chemistry (385):1177-1184.

87. **Gogate P.R., Pandit A.B**. **(2004b).** A review of imperative technologies for wastewater treatment II:hybrid methods. Adv. Environ. Res. (8):553–97.

88. **Gogate P.R., Pandit A.B. (2004a).**A review of imperative technologies for wastewater treatment I:oxidations technologies at ambient conditions. Adv.Environ. Res.(8):501–51.

89. **Gomez J. L., Bodalo A., Gomez E., Bastida J., Hidalgo A. M. et Gomez M. (2006).**Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal. Enzyme and Microbial Technology 39(5): 1016-1022.

90. **Gonze E., Commenges N., Gonthier Y., Bernis A. (2003).**High frequency ultrasound as a pre- or post-oxidation for paper mill wastewaters and landfill leachate treatment. J Chem Eng (92):215–25.

91. **Guisan J. M. (2013).** Immobilization of Enzymes and Cells.Third Edition. Humana Press. Springer Science+Business Media New York.

92. **Guohua C. (2004).** Electrochemical technologies in wastewater treatment. Separation and

Purification Technology 38(1): 11-41.

93. **Haber F. and Weiss J. (1934).**The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, Proc. Roy. Soc. A. (147): 332-351

94. **Haberl R., Urban W., Gehringer P. and Szinovatz W. (1991).** Treatment of pulp-bleaching effluents by activated sludge, precipitation, ozonation and irradiation. Water SciTechnol(24):229–39.

95. **Heinzle E., Geiger F., Fahmy M. and Kut O.M. (1992).** Integrated ozonation–biotreatment of pulp bleaching effluents containing chlorinated phenolic compounds. Biotechnol Progr (8):67–77.

96. **Ho Suh J. and Mohseni M. (2004).** A study on the relationship between biodegradability enhancement and oxidation of 1,4-dioxane using ozone and hydrogen peroxide. Water Res (38):2596–604.

97. **Horch R., Spilker G. and Stark G.B. (1994).** Phenol burns and intoxications, 20(1):45-50.

98. **Hu S.T. and Yu Y.H.(1994).** Preozonation of chlorophenolic wastewater for subsequent biological treatment. Ozone Sci Eng (16):13–28.

99. **Huang Q. and Selig H. (2002).** Peroxidase-catalyzed oxidative coupling of phenols in the presence of geosorbents: Rates of non-extractable product formation. Environmental Science and Technology 35 (4): 596-602.

100. **Huang Q. and Weber W. J. Jr (2005 a).**Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: Efficacy, products, and pathways. Environmental Science and Technology (39):6029-6036.

101. **Huang Q., Tang J. and Weber Jr. W.J. (2005 b).**Precipitaition of enzyme-catalyzed phenol oxidative coupling products: Background ion and pH effects. Water Research(39):3021–3027.

102. **Iamarino G., Rao M. A. and Gianfreda L. (2009).** Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. Chemosphere 74(2): 216-223.

103. **Ibrahim H.R., Thomas U. and Pellegrini A. (2001).** A helix-loop peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. Journal of BiologicalChemistry (276): 43767-43774.

104. **Ibtihage F. (2009).** Oxidation of Phenolic Wastewater by Fenton's Reagent. Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering(2):35-42.

105. **Ikehata K. and Gamal El-Din M. (2006)**. Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and Fenton-type advanced oxidation processes: a review.J Environ Eng Sci (5):81-135.

106. **INRS (1997).** Phénol-Fiche Toxicologique N°15, Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS): 4.

107. **ISO 6439 (1990)**. Qualité de l'eau–Détermination de l'indice phénol–Méthode spectrométrique à l'amino-4 antipyrine après distillation.

108. **Ito K., Jian W., Nishijima W., Baes A.U., Shoto E. and Okada M. (1998).** Comparison of ozonation and AOPs combined with biodegradation for removal of THM precursors in treated sewage effluents, Water Sci. Technol. (38): 179–186.

109. **Jaouani A., Tabka M. G. and Penninckx M. J. (2006)**. Lignin modifying enzymes of Coriolopsis polyzona and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation. Chemosphere 62(9): 1421-1430.

110. **Jeworski M. and Henzle E. (2000).** Combined chemical–biological treatment of wastewater containing refractory pollutants. BiotechnolAnnu. Rev.(6):163–96.

111. **Jones B.M., Sakaji R.H. and Daughton C.G. (1985).**Effects of ozonation and ultraviolet irradiation on biodegradability of oil shale wastewater organic solutes. Water Res(19):1421–8.

112. **JORA (2009).**Journal Officiel de la Republique Algérienne N°36, P 18.

113. **Jourdan J.(2004).**Hanbook of Chemistry and Physics**.** There edition, Editor-in-chief: Lide D.R, CRC Press, Boca Raton, Florida, New York, Washington D.C.

114. **Kalyanaraman B. and Sealy R. C. (1982)**. Electron spin resonance-Spin stabilization in enzymatic systems: Detection of semiquinones produced during peroxidatic oxidation of catechols and catecholamines. Biochem. Biophys. Res. Commun.(106): 1119- 1125.

115. **Kang Y.W. and Hwang K.Y. (2000).** Effects of reaction conditions on the oxidation efficiencyin the Fenton process, Water Res. (34): 2786–2790.

116. **Karam J. and Nicell J. A. (1997)**. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment, Journal of Chemical Technology and Biotechnology (69): 141-153.

117. **Kawaguti H.Y., Manrich E. and Sato H.H. (2006).** Production of isomaltulose using Erwinia sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. Biochem Eng J (29):270–277

118. **Kazunga C., Aitken M. D. and Gold A. (1999).**Primary product of the horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of pentachlorophenol.Environmental Science and Technology, (33):1408-1410.

119. **Kearney P.C., Muldoon M.T., Somich C.J., Ruth J.M. and Voaden D.J.(1988).**Biodegradation of ozonated atrazine as a wastewater disposal system. J Agr Food Chem (36):1301–6.

120. **Kennedy K., Alemany K. and Warith M. (2002).**Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorophenol.Waster SA(28):149-158

121. **Kennedy L. J., Vijaya J. J., Kayalvizhi K. and Sekaran G. (2007)**. Adsorption of phenol from aqueous solutions using mesoporous carbon prepared by two-stage process, Chemical Engineering Journal 132(1-3): 279-287.

122. **Kinsley C. (1998).** Soybean peroxidase-catalyzed treatment of phenol in the presence of polyethylene glycol.Master'sThesis, McGill University, Montreal.

123. **Kinsley C. and Nicell J.A. (2000).**Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol.BioresourceTechnology 73(2): 139-146.

124. **Kiwi J., Pulgarín C. and Péringer P. (1994).**Effect of Fenton and Photo-Fenton reactions on the degradation and biodegradability of 2 and 4-nitrophenols in water treatment. Appl. Catal. B Environ (3):335–50.

125. **Klavarioti M., Mantzavinos D. and Kassinos D. (2009)**. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. Environ Int (35):402–17.

126. **Klibanov A. M., Tu, T. M. and Scott K. P. (1983).** Peroxidase catalyzed removal of phenols fkom coal-conversion wastewaters.Science (221):259-261.

127. **Koyama O, Kamayat Y and Nakamura K.(1994)**. Degradation of chlorinated aromatics by Fenton oxidation and methanogenic digester sludge. Water Res (28):895–9.

128. **Kumar G., Bristow J. F., Smith P. J. and Payne G. F. (1999).** Enzymatic grafiting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. Biotechnology and Bioengineering (63): 154–165.

129. **Kumar G., Bristow J.F., Smith J.P. and Payne G.F. (2000).** Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan, Polymer (41): 2157-2168.

130. **Kunz A., Reginatto V. and Duran N. (2001)**, Combined treatment of textile effluent using the sequence Phanerochaete chrysosporium-ozone. Chemosphere 44(2): 281-287.

131. **Lai C.S. and Piette L.H. (1979)**. Further evidence for OH radical production in Fenton's reagent, Tetrahedron Lett. (9): 775-778.

132. **Lapertot M., Pulgarín C., Fernández-Ibañez P., Maldonado M.I., Pérez-Estrada L.and Oller I. (2006).**Enhancing biodegradability of priority substances (pesticides) by solar photo-Fenton. Water Res(40):1086–94.

133. **Laura G. Cordova Villegas & Neda Mashhadi & Miao Chen 2 & Debjani Mukherjee & Keith E. Taylor** & **Nihar Biswas (2016a)**.A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater.Curr Pollution Rep (2):157 – 167

134. **Laura G. Cordova Villegas, Neda Mashhadi, Miao Chen, Debjani Mukherjee, Keith E. Taylor Nihar Biswas(2016b).** A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater. Curr Pollution Rep (2):157–167.

135. **Le T.G., De Laat J. and Legube B. (2004)**. Effects of chloride and sulfate on the rate of oxidation of ferrous ion by H_2O_2. Wat. Res.(38): 2383-2394.

136. **Lee S.H. and Carberry J.B. (1992).** Biodegradation of PCP enhanced by chemical oxidation pre-treatment.Water Environ Res (64):682–90.

137. **Legifrance (1989),** Décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles. Site "http://www.legifrance.gouv.fr/" consulté le 27 Mars 2017.

138. **Legifrance (2003)**. Arrêté du 12 mars 2003 relatif à l'industrie du verre et de la fibre minérale (JO n° 155 du 6 juillet 2003) version consolidée au 24 janvier 2008. Site "http://www.legifrance.gouv.fr/" consulté le 27 Mars 2017.

139. **Lehninger A.L., Nelson D. L. and Cox M.M. (1993).** Principles of Biochemistry, Ed 3. New York: Worth Publishers.

140. **Lin S.H. and Lo C.C. (1997).** Fenton process for treatment of desizing wastewater, Water Res. (31): 2050–2056.

141. **Lin S.H., Lin C.M. and Leu H.G. (1999).** Operating characteristics and kinetics studies of surfactant wastewater treatment by Fenton oxidation, Water Res. (33):1735–1741.

142. **Liu R., Chiu H.M., Shiau C-S, Yeh R.Y-L and Hung Y-T.(2007).** Degradation and sludge production of textile dyes by Fenton and photo-Fenton processes. DyesPigm(73):1–6.

143. **Lofrano G., Rizzo L., Grassi M. and Belgiorno V.(2009).** Advanced oxidation of catechol: a comparison among photocatalysis, Fenton and photo-Fenton processes,

Desalination (249): 878–883.
144. **Lopez-Cueto G., Ostra M.,Ubide C. and Zuriarrain J. (2004)**. Fen determinations, Anal. Chim. Acta.(515): 109-116.
145. **Luke A. K. and Burton S. G. (2001)**. A novel application for Neurospora crassa: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols. Enzyme and Microbial Technology 29(6-7): 348-356.
146. **Malato S., Fernández-Ibañez P., Maldonado M.I., Blanco J. and Gernjak W.(2009).** Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. CatalToday (147):1-59.
147. **Manjeet S. and Mani T. (1985).** Biocatalytic oxidation of hydroquinone to p-benzoquinone in a water-organic solvent two-phase system. BiotechnologyLetters (7- 9): 663-664.
148. **Mantha R., Taylor K. E., Bewtra, J. K. and Biswas N. (2002**). A continuous system for Fe reduction of nitrobenzene in synthetic wastewater, Environ. Sci. Technol(35) 3231–3236.
149. **Mantzavinos D. and Psillakis E.(2004).** Review. Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. ChemTechnolBiotechnol (79):431–54.
150. **Mantzavinos D., Sahibzada M., Livingston A.G., Metcalfe I.S. and Hellgardt K.(1999)**. Wastewater treatment: wet air oxidation as a precursor to biological treatment. CatalToday (53):96-106.
151. **Martirani L., Giardina P., Marzullo L. and Sannia G. (1996)**. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus Pleurotus ostreatus. Water Research 30(8): 1914-1918.
152. **Mason H. S., Spencer E. and Yamazaki I. (1961).** Identification by electron spin resonance spectroscopy of the primary product of tyrosinase catalyzed catechol oxidation. Biochem. Biophys. Res. Commun. (4) : 236-238.
153. **Masuda, M., Sakurai A. and Sakakibara M. (2002).**Effect of temperature and pH on phenol removal using purified Coprinus cinereus peroxidase.World journal of Microbiology and Biotechnology (18):739-743.
154. **Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M. and Fernandez-Lafuente R. (2007).**Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme and MicrobialTechnology 40(6): 1451-1463.
155. **Mathieu J.M. (2002).**Phénol. Acétone. alpha-Méthylstyrène, Technique d'ingénieur, j6490.
156. **Méndez-Arriaga F, Esplugas S and Jiménez J.(2008**). Photocatalytic degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs with TiO2 and simulated solar irradiation. Water Res (42):585–94.
157. **Miller R.M., Singer G.M., Rosen J.D. and Bartha R.(1988)**. Sequential degradation of chlorophenols by photolytic and microbial treatment. Environ SciTechnol(22):1215–9.
158. **Minussi R. C., Pastore G. M. and Duran N. (2007)**. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. Bioresource Technology 98(1): 158-164.
159. **Mohsina H. and Khalil-ur-Rehman (2009).** Review- Potential applications of peroxidases, Food Chemistry (115) :1177–1186.
160. **Morawski A. W., Janus M., Tryba B., Inagaki M. and Kaucki K. (2004)**. TiO2-anatase modified by carbon as the photocatalyst under visible light. Comptes Rendus Chimie 9(5-6): 800-805.
161. **Morawski B., Lin Z. and Cirino P (2000).** Functional expression of horseradish peroxidase in Saccharomyces cerevisiae and Pichia pastoris. Protein Eng (13):377–384.
162. **Muñoz I., Rieradevall J., Torrades F., Peral J. and Doménech X.(2005)**. Environmental assessment of different solar driven advanced oxidation processes. Sol Energy (79):369–75.
163. **Muñoz R. and Guieysee B.(2006).** Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. Water Res (40):2799–815.
164. **Najafzadeh K. (2011).** a-Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. J Mol Catal B-Enzym (74):1–5.
165. **Nakamoto S. and Machida N. (1992).**Phenol removal from aqueous solution by peroxidase-catalyzed reaction using additives.Water Research(26):49–54.
166. **Neelam B. and Shamsher S. K. (2013).** Peroxidase(s) in Environment Protection. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal, Article ID 714639, 9 pages.
167. **Negishi N., He F., Matsuzawa S., Takeuchi K. and Ohno K. (2008).** Wave-guide type photoreactor for water purification. Comptes Rendus Chimie 9(5-6): 822-828.
168. **Nemerow N. L. (1978).** Industrial Water Pollution, Origin, Characteristics and Treatment. Addison-Wesley publishing company, Inc. Massachusetts, USA Philippens, 310-333.

169. **Nesheiwat F.K. and Swanson A.G. (2000).** Clean contaminated sites using Fenton's reagent, Chem. Eng. Prog. (96): 61–66.
170. **Neyens E and Baeyens J.(2003)**. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. J Hazard Mater (98):33–50.
171. **Nicell J. A., Bewtra J. K., Biswas N., St. Pierre C. and Taylor K.E. (1993a).** Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds form aqueous solution. Canadian Journal of Civil Engineering(20):725-735.
172. **Nicell J.A., Saadi K.W. and Buchanan I.D. (1995**).Phenol polymerization by horseradish peroxidase enzyme and an additive.Bioresource Technology (54):5-16.
173. **Nicell, J. A., Bewtra, J. K., C.C. St. Pierre, N. Biswas and K.E. Taylor (1992).** Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from wastewater.Water Science and Technology (25):157-164.
174. **Noritomi H., Iwamoto K. and Seno M. (1988).** Peroxidase oxidations of hydroquinone and p-cresol in AOT reversed micelles. Colloid Polym.Sci. (266):753-758.
175. **Oller I., Malato S., J.A. and Sánchez-Pérez (2011).**Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination—A review.Science of the Total Environment (409): 4141–4166.
176. **Oturan M.A., Aaron J.J., Oturan N. and Pinson J. (2004)**. Degradation of chlorophenoxyacid herbicide in aqueous media using a novel electrochemical method. Pestic. Sci. (55): 558-562
177. **Parra S., Sarria V., Malato S., Péringer P. and Pulgarín C. (2000).**Photochemical vs. Coupled photochemical–biological flow system for the treatment of two biorecalcitrant herbicides: metobromuron and isoproturon. Appl. Catal. B Environ (27):153–68.
178. **Peralta-Zamora P., Pereira C. M., Tiburtius E. R. L., Moraes S. G., Rosa M. A., Minussi R. C. and Duran N. (2003)**. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. Applied Catalysis B: Environmental 42(2): 131-144.
179. **Pera-Titus M., García-Molina V., Baños M.A., Giménez J. and Espulgas S.(2004).**Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. ApplCatal B Environ (47):219–56.
180. **Pichard A.(2005).** Phénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. INERIS–DRC-01-25590-01DR021. N°2-1.
181. **Pignatello JJ., Oliveros E. and MacKay A. (2006)**. Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the Fenton reaction and related chemistry. Crit Rev Env Sci Technol (36):1-84.
182. **Pulgarín C. and Kiwi J.(1996).** Overview on photocatalytic and electrocatalytic pretreatment of industrial non-biodegradable pollutants and pesticides. Chimia(50):50–5.
183. **Pulgarín C., Invernizzi M., Parra S., Sarria V., Polaina R. and Péringer P.(1999).** Strategy for the coupling of photochemical and biological flow reactions useful in mineralization of biocalcitrant industrial pollutants. CatalToday (54):341–52.
184. **Qingguo H. and Walter J. W. (2005).** Transformation and removal of Bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: efficacy, products, and pathway. Environ. Sci. Technol. 39(16): 6029-6036.
185. **Rageul P. (1991).**Étude de l'adsorption du phénol sur charbons actifs a partir de la phase aqueuse. Polymères-Interfaces-Etats Amorphes. Montpellier, Université des Sciences et Techniques du Longuedoc-Montpellier II: 1-47.
186. **Randtke D. J. (1988).** Organic contaminant removal by coagulation and related process combinations. J. Am. Water Works Assoc. (80): 40-56.
187. **Rappoport Z. (2003).** The chemistry of phenols, John Wiley & Sons, Ltd
188. **Reyes J., Dezotti M., Esposito E., Billasenor J., Mansilla H. and Durnan N. (1998)**. Biomass photochemistry—XXII: combined photochemical and biological process for treatment of Kraft El effluent. Appl.Catal.B Environ (15):211–9.
189. **Richards F. M. and Knowles J. R. (1968).**Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent.J. Mol. Biol. (37): 231-233.
190. **Rivas F.J., Beltran F.J., Frades J., Buxeda P. (2001).** Oxidation of p-hydroxybenzoic acid by Fenton's reagent, Water Res. (35) 387–396.
191. **Rivas F.J., Beltran F.J., Frades J., Buxeda P. (2001).** Oxidation of p-hydroxybenzoic acid by Fenton's reagent, Water Res. (35): 387–396.
192. **Rivas J.F., Beltran J.F, Gimeno O. and Frades J. (2001)**.Treatment of olive oil mill wastewater by Fenton's reagent. J. Agric. Food Chem.(49): 1873-1880.
193. **Roig A., Cayuela M. L. and Sanchez-Monedero M. A. (2006)**. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Waste Management 26(9): 960-969.
194. **Rosa Pia Ferrari and Enzo Laurenti (1993).** Oxidation of catechols and catecholamines by horseradish peroxidase and lactoperoxidase: ESR spin stabilization approach combined

with optical methods. Specrtochimico Arm. 49 A(9):1261-1267.

195. **Sadler A., Subrahmanyam V. V. and Ross D. (1988).** Oxidation of Catechol by Horseradish Peroxidase and Human Leukocyte Peroxidase: Reactions of o-Benzoquinone and o-Benzosemiquinone. Toxicology and appliedpharmacology (93): 62-71.

196. **Sanz J, Lombrana J.I, De Louis A.M, Ortueta M and Varona F. (2003)**. Microwave and Fenton's reagent oxidation of wastewater. Environ. Chem. Lett. 1, 45.

197. **Sareeta N., Puneeta S., and Kavita S. (2008).**Effect of calcium on immobilization of rice (*Oryza sativa L.*) Peroxidase for Bioassays in Sodium Alginate and Agarose Gel.Biotechnology and Bioprocess Engineering (13): 632-638.

198. **Sarria V., Deront M., Péringer P., Pulgarin C.(2003).**Degradation of a biorecalcitrant dye precursor present in industrial wastewaters by a new integrated iron (III) photoassisted-biological treatment. ApplCatal B Environ (40):231–46.

199. **Sarria V., Parra S., Adler N., Péringer P. and Pulgarín C. (2002).**Recent developments in the coupling of photoassisted and aerobic biological processes for the treatment of biorecalcitrant compounds. Catal. Today (76):301–15.

200. **Sarria V., Péringer P., Cáceres J., Blanco J., Malato S. and Pulgarín C. (2004).** Solar degradation of 5-amino-6-methyl-2-benzimidazolone by TiO_2 and iron (III) catalyst with H_2O_2 and O_2 as electron acceptors. Sol Energy (29):853–60.

201. **Schmitt R. (1885**). Beitrag zu Kenntniss der Kolbe'schen Salicylsäure-Synthese, in Advanced Synthesis & Catalysis 31 (2): 397–411.

202. **Scioli C. and Vollaro L. (1997)**. The use of Yarrowia lipolytica to reduce pollution in olive mill wastewaters. Water Research 31(10): 2520-2524.

203. **Scott J.P. and Ollis D.F.(1997)**. Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: II. Recent illustrations and experiences. Journal AdvOxid Tech(2):374–81.

204. **Scott JP. and Ollis DF.(1995).** Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: review and recommendations. Environ Prog(14):88-103.

205. **Seyhan F., Tijskens L.M.M. and Evranuz O. (2002).** Modelling temperature and pH dependence of lipase and peroxidase activity in Turkish hazelnuts. Journal of Food Engineering (52):387–395

206. **Shannon M. J. R. and Bartha R. (1988**). Immobilization of leachable. toxic soil pollutants by using oxidative enzymes.EnvironmentalMicrobiology (54):1719-1723

207. **Shannon M.A., Bohn P.W., Elimelech M., Georgiadis J.G., Mariñas B.J. and Mayes A.M. (2008).**Science and technology for water purification in the coming decades. Nature (452): 301–10.

208. **Singh B.D. (2009).** Biotechnology expanding horizons. Edition: 4th. Kalyani, India Soleimani M, Khani A, A - Z Books, New Delhi, Delhi, India.

209. **Sponza D. T. (2003)**. Application of toxicity tests into discharges of the pulp-paper industry in Turkey. Ecotoxicology and Environmental Safety 54(1): 74-86.

210. **Staples C. A., Dome P. B., Klecka G. M., Oblock S. T. and Harris L. R. (1998)**. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. Chemosphere 36(10): 2149-2173.

211. **Steber J. and Wierich P. (1986).** Properties of hydroxyethano diphosphonate affecting environmental fate: degradability, sludge adsorption, mobility in soils, and bioconcentration. Chemosphere (15):929–45.

212. **Steevensz A., Al-Ansari M. M., Taylor K. E., Bewtra J. K. and B. Nihar (2009)**. Comparison of soybean peroxidase with laccase in the removal of phenol from synthetic and refinery wastewater samples, Journal of Chemical Technology and Biotechnology (84): 761–769.

213. **Steva Levic, Verica Djordjevic, Nevenka Rajic, Milan Milivojevic, Branko Bugarski, Viktor Nedovic (2013).** Entrapment of ethyl vanillin in calcium alginate and calcium alginate/poly(vinyl alcohol) beads. Chemical Papers 67 (2): 221–228 .

214. **Stoilova I., Krastanov A., Stanchev V., Daniel D., Gerginova M. and Alexieva Z. (2006),** Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by Aspergillus awamori cells. Enzyme and Microbial Technology 39(5): 1036-1041.

215. **Stoilova I., Krastanov A., Yanakieva I., Kratchanova M. and Yemendjiev H. (2007).**Biodegradation of mixed phenolic compounds by Aspergillus awamori NRRL 3112. International Biodeterioration & Biodegradation 60(4): 342-346.

216. **Sumitra Datta, L. ReneChristena, Yamuna Rani SriramuluRajaram (2013).**Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. 3 Biotech (3):1–9.

217. **Sun W. Q., Payne G. F., Moas M. L., Chu J. H. and Wallace K. K. (1992).**Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols form wastewater. Biotechnology

Progress(8):179-186.

218. **Sun W-Q. and Payne G. F. (1996).** Tyrosinase-containing chitosan gels: A combined catalyst and sorbent for selective phenol removal, Biotechnol. Bioeng (51): 79-86.

219. **Svobodova K., Majcherczyk A., Novotny C. and Kues U. (2008).**Implication of mycelium associated laccase from Irpex lacteus in the decolorization of synthetic dyes. Bioresource Technology 99(3): 463-471.

220. **Tabrizi GB and Mehrvar M.(2005).** Integration of advanced oxidation technologies and biologicalprocesses: recent developments, trends and advances. J Environ Sci.Health A(39):3029–81.

221. **Takahashi T., Imai M. and Suzuki I. (2005).**High-potential molecular properties of chitosan reaction conditions for removing p-quinone from aqueous phase, Biochem. Eng. J.(25) :7-13.

222. **Tawabini B. and Zubair A. (2011)**. Bromate control in phenol-contaminated water treated by UV and ozone processes. Desalination 267(1): 16-19.

223. **Throop W. M. (1975).** Alternative methods of phenol wastewater control. Journal of Hazardous Materials 1(4): 319-329.

224. **Toscano G., Colarieti M. L. and Greco G. (2003)**. Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. Enzyme and Microbial Technology 33(1): 47-54.

225. **Venkatadri R. and Peters R.W. (1993)**. Chemical oxidation technologies: Ultraviolet light/hydrogenperoxide, Fenton'sreagent and titaniumdioxide-assistedphotocatalysis, Hazard. Waste Hazard. Mater.(10):107-131.

226. **Wada S., Ichikawa H. and Tatsumi K. (1995**). Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by combination treatment with tyrosinase and a coagulant. Biotechnol. Bioeng. (45) : 304-309.

227. **Wada S., Ichikawa, H. and Tatsumi K. (1993).** Removal of phenols from wastewater by soluble immobilized tyrosinase. Biotechnol. Bioeng.(42) :854-858.

228. **Wagner M. and Nicell J. A. (2001).** Treatment of a foul condensate from kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. Water Research 35(2): 485-495.

229. **Wagner M. and Nicell J. A. (2002).**Detoxification of phenolic solution with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide.Water Research (36):4041-4052.

230. **Wang Y.T. 1992.** Effect of chemical oxidation on anaerobic biodegradation of model phenolic compounds. Water Environ Res.(64):268–73.

231. **Wardman P. and Candeias L.P. (1996).** Fenton Centennial Symposium. Fenton chemistry: An introduction. Radiation Research (145): 523-531.

232. **Weetall H. H. (1974).**Immobilized enzymes: Analytical applications. Anal. Chem.46(7): 602A-615A.

233. **Wright H. and Nicell J. A. (1999).**Characterization of soybean peroxidase for wastewater treatment.BioresourceTechnology, 70(1) : 69-79.

234. **Wu Y., Bewtra J.K., Biswas N. and Taylor K.E. (1994).**Effect of H_2O_2 addition mode and enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol.Canadian Journal of Chemical Engineering (72):881-886.

235. **Wu Y., Taylor K.E., Bewtra J. K. and Biswas N. (1993).**Optimization of the reaction conditions for enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol.Water Research (27):1701–1706.

236. **Wu Y., Taylor K.E., Biswas N.and Bewtra J. K. (1999**). Kinetic model-aided reactor design for peroxidase-catalyzed removal of phenol in the presence of polyethylene glycol." Journal of Chemical Technology and Biotechnology(74):519-526.

237. **Wu Y., Taylor, K. E., Biswas, N. and Bewtra, J. K. (1997).** Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. Water Research (31):2699-2704.

238. **Xu F. (2002).**Horseradish peroxidase mediated sorption and binding of phenol, O-cresol, 2,4-dichlorophenol and 1-naphthol to two surface soils.Kansas State University Ph.D., Dissertation.

239. **Yahia A. A. 2009**. Adsorption kinetics and performance of packed bed adsorber for phenol removal using activated carbon from dates' stones. Journal of Hazardous Materials 170(2-3): 763-770.

240. **Yamada K., Chen T., Kumar G., Vesnovsky O., Topoleski L.D.T. and Payne G.F. (2000).**Chitosan based water-resistant adhesive. Analogy to mussel glue. Biomacromolecules (1): 252-258.

241. **Yasha K. and Qayyum H. (2006)**. Bioaffinity-based an inexpensive and high yield procedure for the immobilization of turnip (*Brassica rapa*) peroxidase, Biomolecular Engineering (23):291–297.

242. **Yu J., Taylor K. E., Zou H., Biswas N. and Bewtra J. K. (1994**). Phenol conversion and

DimericIntermediates in Horseradish Peroxidase-Catalyzed Phenol removal from Water. Environnemental Science and Technology 28(12): 2154-2160.

243. Zaborsky O. (1974). Immobilized enzymes. Ohio, CRC Press.

244. Zazo J.A., Casas J.A., Mohedano A.F. and Rodriguez J.J. (2009). Semi continuous Fenton oxidation of phenol in aqueous solution. A kinetic study. Water research (43):4063–4069.

245. Zhang G. and Nicell J.A. (2002). Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide.Water Research 34(5) : 1629-1637.

246. Zhang Peng Ye, Song Chen and Weijing Wang (2007). Removal of pentachlorophenol by immobilized horseradish peroxidase.International Biodeterioration andBiodegradation 59(4): 307-314

247. Zhang Tong, Zhao Qing xiang, Huang Hui and Li Qin and Zhang Yi(1997). Removal oftoxic phenol and 4-chlorophenol from waste water by horseradish peroxidase. Chemosphere 34(4):893-903.

248. Zimbron J. A. and Reardon K. F.(2011). Continuous combined Fenton's oxidation and biodegradation for the treatment of pentachlorophenol-contaminated water. Water research (45): 5705-5714

249. Zumriye A. and Yener J. (2001). A comparative adsorption/biosorption study of mono-chlorinated phenols onto various sorbents. Waste Manage (21): 695-702.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1. MÉTHODES ANALYTIQUES

A.1.1 Méthode de préparation des solutions tampons

Les solutions tampons qu'ils sont utilisées dans biodégradation du phénol par la peroxydase immobilisée sont été préparées par dissolution des réactifs appropriés dans l'eau distillée sous agitation magnétique. Ces différentes solutions tampons utilisées sont :

- Solution tampon pH 2.0 préparée par chlorure de potassium 0,01M.
- Solution tampon pH 3.0 ; 4.0 et 5.0 préparée par biphthalate de potassium 0,01M.
- Solution tampon pH 6.0 et 7.0 préparée par phosphate monopotassique 0,01M.
- Solution tampon pH 8.0 ; 9.0 et 10.0 préparée par chlorure de potassium 0,01M et l'acide borique 0.01M.

En ajustant le pH des solutions en utilisant les solutions de KOH 0.2 N et HCl 0.2 N,

D'autre part, l'ajustement de pH de l'effluent phénolique synthétique ou industriel lors des traitements par le procédé Fenton a été réalisé par des solutions préparées par l'acide citrique 0,50 M et une base conjuguée de phosphate de sodium disodique(Na_2HPO_4) 0,50 M. Les solutions tampons de pH 3.0 et pH 7.0 sont préparées par dilution dans une fiole de 200 mL des volumes bien définis de la solution d'acide citrique et de phosphate de sodium disodique comme indiqué sur le tableau A.1.

Tableau A.1. Mode de préparation des solutions tampons à partir l'acide citrique et le phosphate de sodium disodique.

pH	V(Na_2HPO_4)mL	V(Acide citrique)mL
3	16 ,44	31,78
7	65,88	7,06

A.1.2 Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène

- Prendre 8 tubes a essaies, dans chaque un introduire :
  - 1 mL de phénol (0,01 M).
  - 1 mLde 4-AAP (0,001M).
  - 1 mLde H_2O_2 (0-0,14 mM).
  - 2 mLde l'eau distillée.
- Au temps t_0, le chronomètre est déclenché immédiatement après l'injection de 0,2 mL d'EEPP dans le tube qui contient le mélange réactionnel.

- Verser le contenu du tube dans la cuve est prendre la valeur de la densité optique après la stabilisation. La même opération est répétée pour les diverses concentrations étudiées après un rinçage soigneux de la cuve. Le coefficient d'extinction molaire ξ trouvé est de l'ordre de 7425 $L\ mol^{-1}$.

A.1.3 Méthode de dosage du phénol

Les différents échantillons du phénol prélevés au cours du traitement par peroxydase libre ou immobilisée dans l'alginate de calcium ont été analysés par la méthode colorimétrique suite à la formation d'un chromogène par condensation en milieu basique de l'ion phénate avec l'4-APP en présence de l'hexacyanoferrate (III) de potassium (voir l'équation 2.4).

Les étapes sont comme suivies :

- Déterminer la longueur d'onde maximale de l'absorption du phénol ;
- Après une durée de déroulement des réactions enzymatiques en présence des différents paramètres qui sont optimisés, les milieux réactionnels sont centrifugés à 3000 rpm pendants 15 min pour éliminer le produit précipité au cours de la réaction et récupérer le surnageant.
- Ajouter 0,3 mL du ferricyanure de potassium (83,4 mM) et 0,3 mL de 4-AAP (20,8 mM) sur 2,4 mL du surnageant.
- Diluer ce mélange a 25 mL par la solution tampon au pH optimal.
- Noter les absorbances de surnageant récupéré.

Les valeurs des absorbances initiales et finales sont utilisées pour calculer le rendement de biodégradation du phénol selon la relation suivante :

$$R(\%) = \frac{DO_i - DO_f}{DO_i} \qquad (Eq.A.1)$$

Avec :

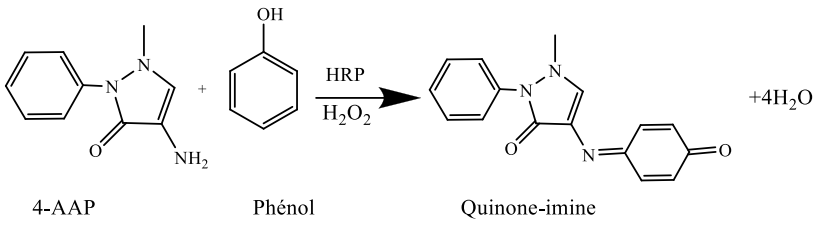
R : Rendement de la biodégradation du phénol, *%*.

DO_i : Absorbance initial de la solution aqueuse, *sans unité*.

DO_f : Absorbance final de la solution aqueuse, *sans unité*.

La concentration du phénol peut être déterminée par la courbe d'étalonnage à pH 7, construite à partir d'une série des concentrations du phénol entre 20 et 140 mg/L. La courbe d'étalonnage ainsi obtenue est donnée sur la figure A.2.4.

La réaction mise en jeu lors de dosage de phénol par 4-AAP d'écrire par l'équation suivante :



(Eq.A.2)

A.1.4 Méthode de mesure de l'activité enzymatique

Dans une fiole de 50 mL on introduire : *1mL de phénol (0.1M), 1mL de H_2O_2 (0.1M) et 1mL de 4-AAP(0.01 M).*

- le volume compléter jusqu'à trait jauger à l'aide d'une solution tampon pH 7.0.
- Placer 4 mL de mélange dans un tube à essai.
- Ajouter 0.2 mL de l'EEPP (et/ou) de l'EEB, agiter rapidement et placer le mélange réactionnel dans la cuve du spectrophotomètre.
- Lancer la cinétique en mesurant de la densité optique avec un pas de 10 secondes.
- On mesure l'activité enzymatique de la peroxydase suivant la consommation de peroxyde d'hydrogène à 517 nm, tel que :

La vitesse initiale est mesurée par le rapport de l'absorbance sur le temps $\Delta a_{[517\ nm]}/\Delta t$ (min), le trajet optique de la cuve L=1 cm, le coefficient d'absorbance molaire $\xi_{[517\ nm]}$=*7425 M^{-1} cm^{-1}*.

La formule de calcul de l'activité enzymatique est comme suivie :

$$AE(UmL^{-1}) = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V_r}{V_e} \times \frac{1000}{7425} \qquad (Eq.A.3)$$

Avec V_e : Volume de l'extrait enzymatique (*mL*) et V_r : Volume réactionnel (*mL*).

A.1.5 Dosage de protéines totales par la méthode de Bradford

Cette méthode s'articule sur la loi de Beer-Lambert pour déterminer une concentration inconnue d'une solution protéique. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité des protéines en solution.

Dans la première étape. On trace la courbe d'étalonnage A= f ([Protéine]) comme suit :

Prendre 5 tubes à essaies, y introduire : 0,1mL de l'albumine à différentes concentrations de 0 à 100 mg L^{-1} avec un pas de 25 mg L^{-1}, ajouter 0.25 mL de NaOH (1 M) et 5 mL du réactif de Bradford. Agiter puis laisser les tubes 10 minute pour développer la coloration. Chaque concentration correspond à une absorbance qui se traduit sur la courbe d'étalonnage *absorbance=f ([Albumine])* située dans l'annexe A.2.3.

Dans la deuxième étape

Introduire dans un tube a essaie: 0,1 mL d'EEPP ;0,25 mL d'NaOH (1M) et 5 mL du réactif de Bradford. L'absorbance est mesurée à 595 nm après 10 min pour la coloration rose à développer. La concentration en protéine (mg L^{-1}) dans l'EE est déterminée par la projection de la densité optique de l'EE sur la courbe d'étalonnage de l'albumine située dans la figure précédente (l'annexe A.2.3)

A.1.6 Méthode de mesure de l'indice de phénol

Utilisation d'une cellule de 2 cm. Dans une éprouvette de 250 mL, introduire respectivement de 1 à 6 mL avec un pas de 1 mL de la solution fille de phénol (7.5) et porter à 250 mL. Ces solutions étalons correspondent respectivement à 0; 0,04; 0,08; 0,12; 0,20 et 0,24 mg L^{-1} phénol.

Le dosage s'effectue comme suit:

- Verser au moyen d'une éprouvette 250mL d'échantillon dans une ampoule à décanter de 1 litre.
- Ajouter 10 mL de solution tampon.
- Ajuster le pH à 10 avec NaOH, si nécessaire.
- Ajouter 1.5 mL de 4AAP, mélanger immédiatement.
- Ajouter 5 mL de solution d'hexacyanoferrate (III) de potassium, mélanger pendant 1 min en retournant l'ampoule à décanter de façon à obtenir une solution homogène.
- Laisser la coloration se développer pendant 2minutes.
- Ajouter 25 mL de chloroforme. Agiter vigoureusement l'ampoule pendant 1 minute et laisser les phases se séparer.
- Filtrer l'extrait au chloroforme à travers un entonnoir contenant un filtre et un peu de Na_2SO_4.
- Si l'extrait est trouble.
- Mesurer l'absorbance de la phase organique à 460 nm dans une cellule de 2 cm ou de 1cm.

Si le résultat ne se situe pas dans le domaine de la droite d'étalonnage, diluer l'échantillon et recommencer l'extraction.

ANNEXE 2 : COURBES D'ÉTALONNAGES

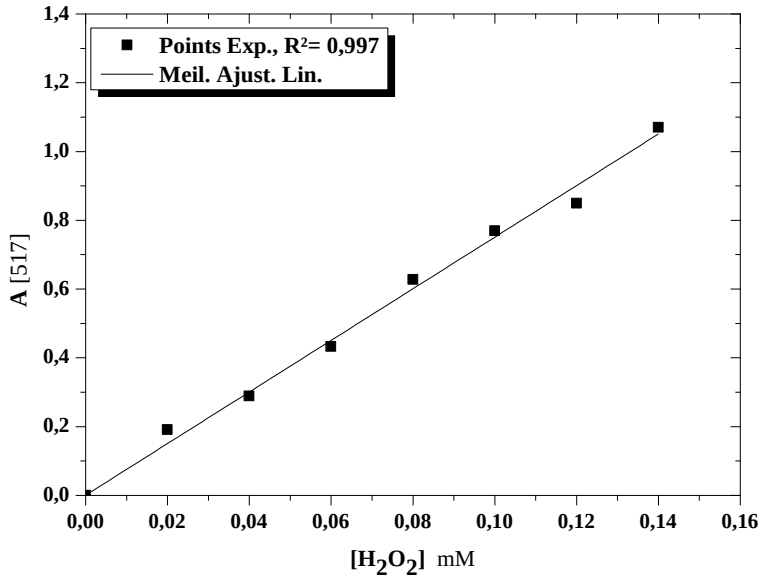


Fig. A.2.1. Courbe d'étalonnage de peroxyde d'hydrogène, $\xi(\Delta DO/\Delta[H_2O_2])=7425\ mM^{-1}$.

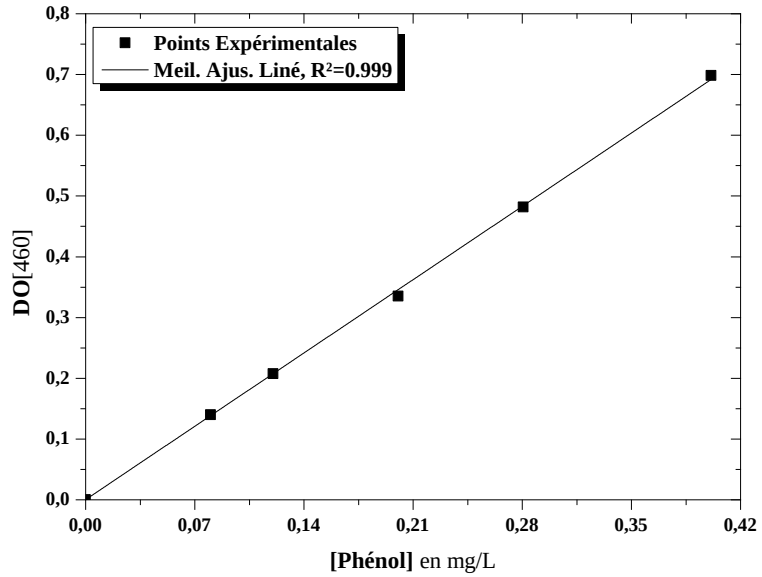


Fig. A.2.2. Courbe d'étalonnage de l'indice de phénol, $\Delta DO/\Delta[Phénol]= 1.723$.

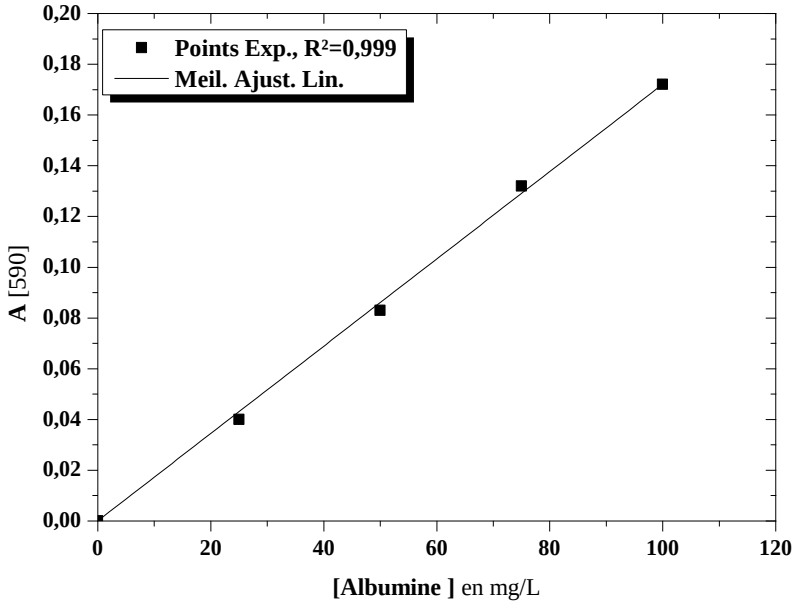


Fig. A.2.3. Courbe d'étalonnage de l'albumine, avec une pente égale=0,001 Lmg^{-1}.

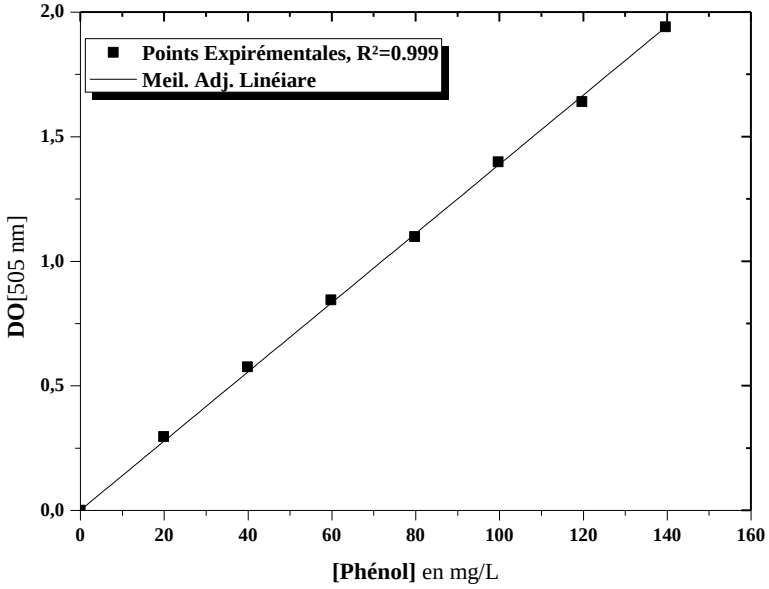


Fig. A.2.4. Courbes d'étalonnage du phénol, avec une pente égal=0,0139, a pH=7, T≈ 25 °C.

ANNEXE 3. STABILITÉ DES BILLES D'ALGINATE DE CALCIUM

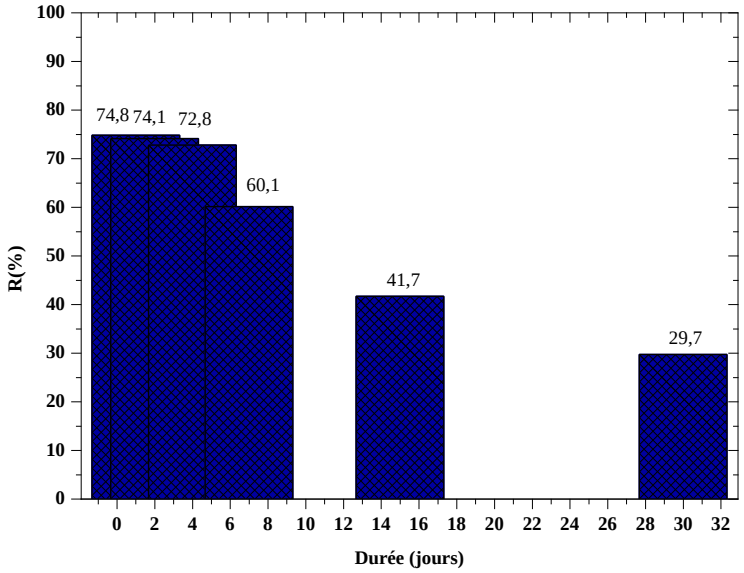


Figure A.3. Stabilité des billes d'alginate de calcium.

ANNEXE 3. MÉTHODE DE CALCUL DE CONCENTRATION DES ÉCHANTILLONS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

Les concentrations de phénol, peroxyde d'hydrogène, hydroquinone, catéchol, benzoquinone, acide citrique et l'acide formique ont été déterminé directement par la formule suivante :

$$T(\%) = \frac{A_{Ech}}{A_{Stand}} \times \frac{C_{stand}}{C_{Ech}} \times Purté \qquad (Eq.A.4)$$

Où:

T: Titre de l'échantillon en %.

A_{Ech}: Aire de l'échantillon

A_{Stand}: Aire du standard

C_{Stand}: Concentration de la solution standard ($mg\ mL^{-1}$)

C_{Ech}: Concentration de standard ($mg\ mL^{-1}$)

La pureté de produits en %.

ANNEXE 4. SPECTRES DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE

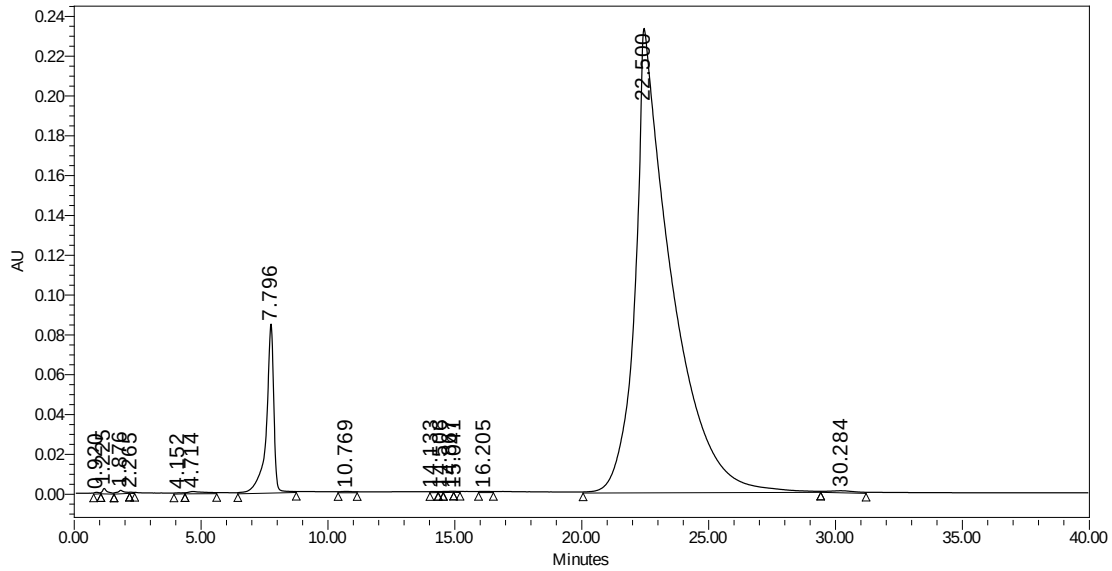
A.4.1 SPECTRE DE STANDARDS

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	STD Benzoquinon	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	Phenol MSS
Vial:	14	Acq. Method Set:	Phenol Ms
Injection #:	1	Processing Method	FD2
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	9/24/2014 12:02:58 AM CET		
Date Processed:	9/25/2014 2:44:07 PM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	0.920	2634	0.01	329
2	1.225	23227	0.09	2199
3	1.876	14625	0.06	1170
4	2.265	594	0.00	101
5	4.152	801	0.00	60
6	4.714	18668	0.08	621
7	7.796	1681177	6.80	84366

Reported by User: System
Report Method: Default Individual Report
Report Method ID: 1006

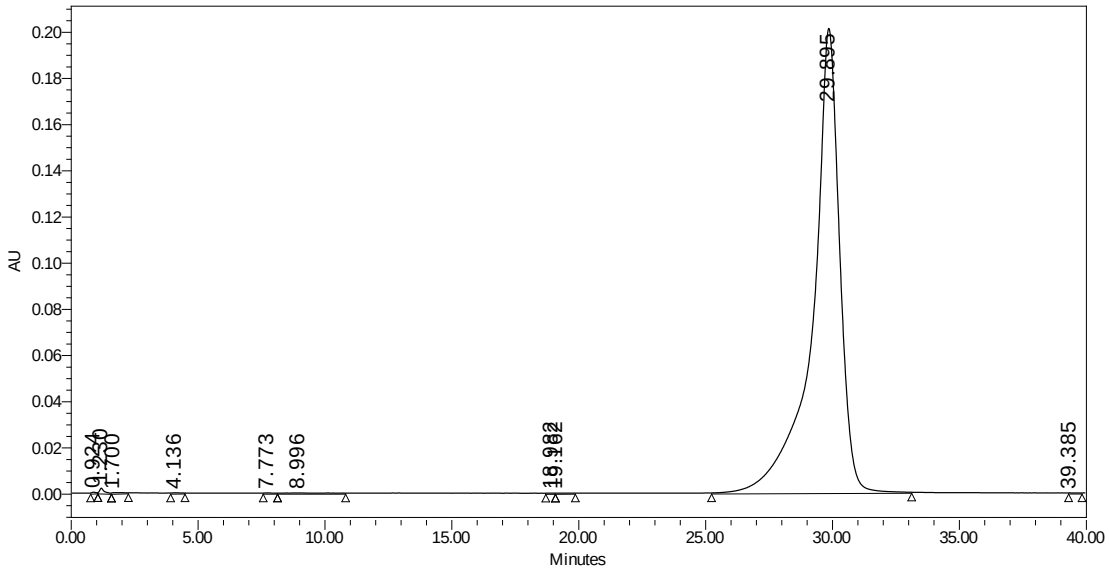
Project Name: Physico chimie\Fouad\ph\230914
Date Printed:
9/25/2014
2:44:18 PM Africa/Algiers

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	STD Phenol	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	Phenol MSS
Vial:	13	Acq. Method Set:	Phenol Ms
Injection #:	1	Processing Method	FD2
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	9/23/2014 11:22:13 PM CET		
Date Processed:	9/25/2014 2:45:38 PM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	0.924	2421	0.02	300
2	1.230	22235	0.15	2074
3	1.700	4017	0.03	178
4	4.136	1917	0.01	108
5	7.773	1214	0.01	88
6	8.996	4021	0.03	51
7	18.982	288	0.00	22

Reported by User: System
Report Method: Default Individual Report
Report Method ID: 1006

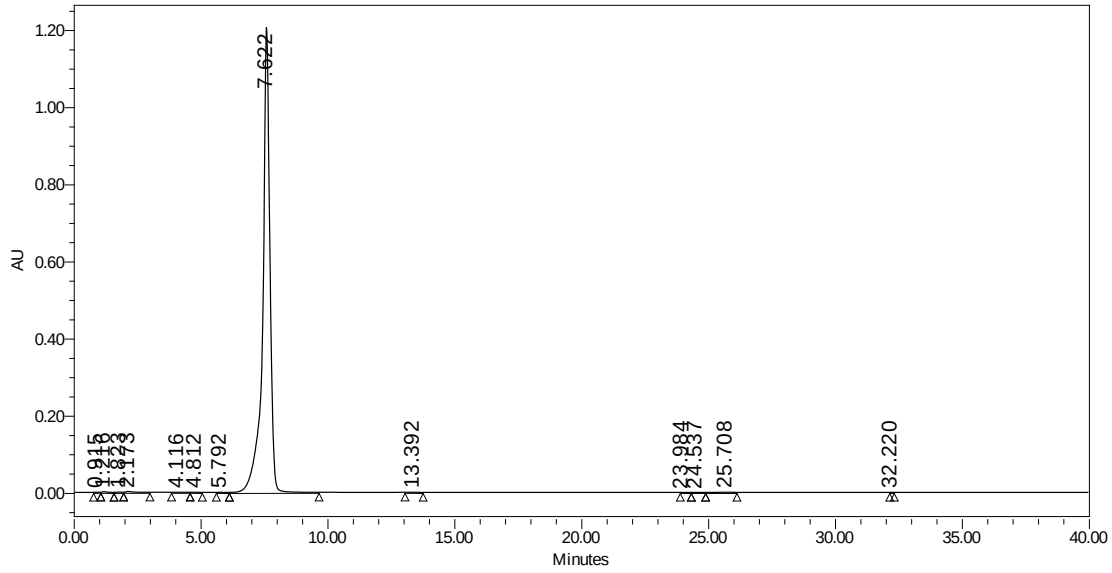
Project Name: Physico chimie\Fouad\ph\230914
Date Printed:
9/25/2014
2:45:46 PM Africa/Algiers

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	STD Hydroquinone	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	Phenol MSS
Vial:	12	Acq. Method Set:	Phenol Ms
Injection #:	1	Processing Method	FD2
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	9/23/2014 10:41:31 PM CET		
Date Processed:	9/25/2014 2:47:52 PM CET		



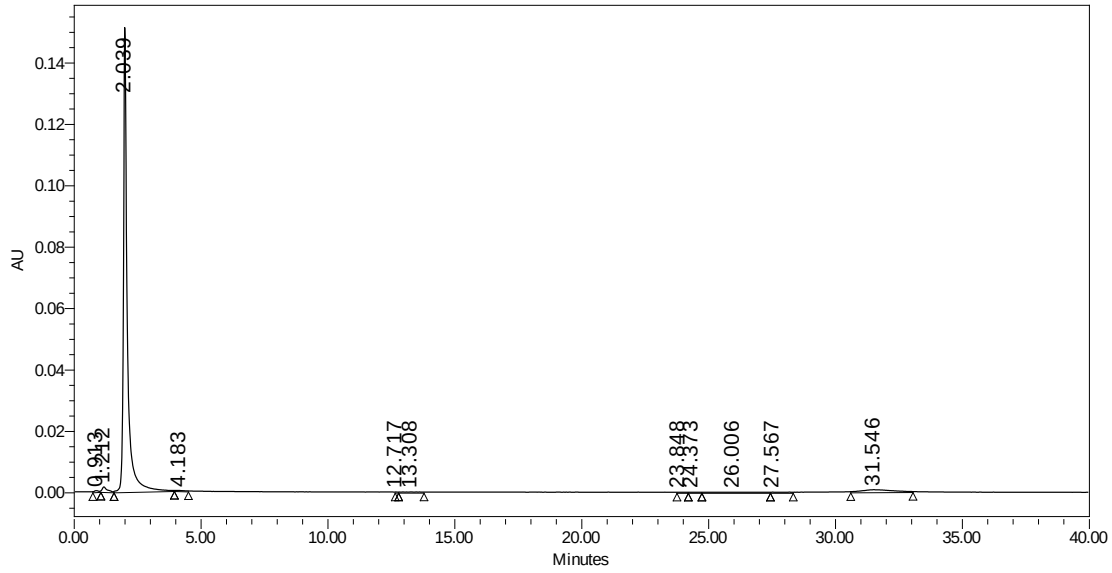
	RT	Area	% Area	Height
1	0.915	2238	0.01	282
2	1.216	18214	0.08	1678
3	1.823	5190	0.02	579
4	2.173	29654	0.12	2049
5	4.116	2312	0.01	113
6	4.812	1356	0.01	124
7	5.792	881	0.00	74

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	STD Acide formique	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	Phenol MSS
Vial:	11	Acq. Method Set:	Phenol Ms
Injection #:	1	Processing Method	FD2
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	9/23/2014 10:00:47 PM CET		
Date Processed:	9/25/2014 2:50:19 PM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	0.913	2310	0.14	280
2	1.212	17816	1.08	1488
3	2.039	1571165	95.66	151260
4	4.183	1428	0.09	83
5	12.717	88	0.01	22
6	13.308	854	0.05	25
7	23.848	325	0.02	22

Reported by User: System
Report Method: Default Individual Report
Report Method ID: 1006

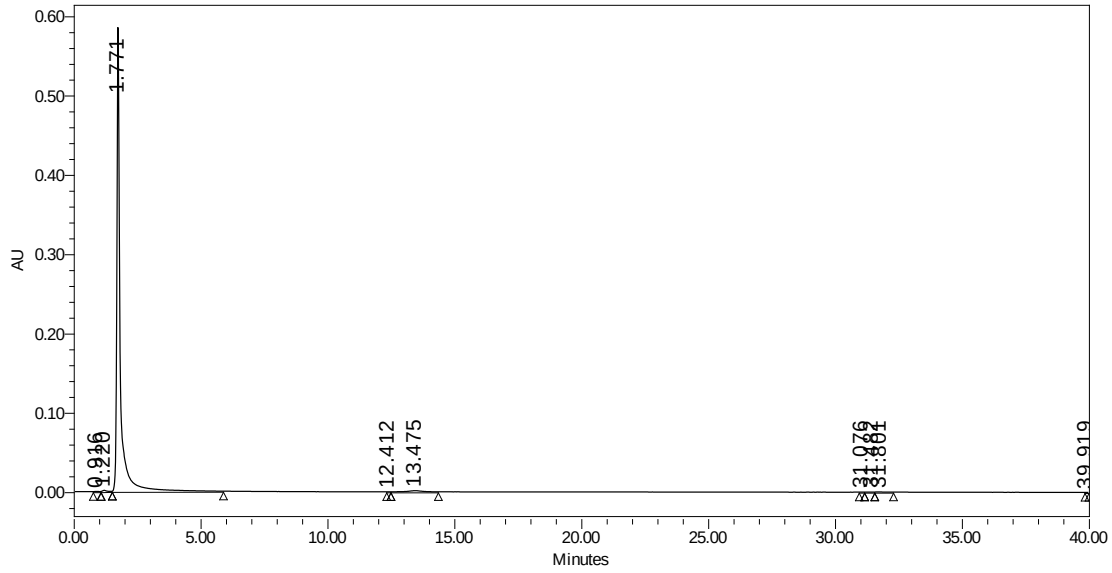
Project Name: Physico chimie\Fouad\ph\230914
Date Printed:
9/25/2014
2:50:29 PM Africa/Algiers

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	STD Acide oxalique	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	Phenol MSS
Vial:	10	Acq. Method Set:	Phenol Ms
Injection #:	1	Processing Method	FD2
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	9/23/2014 9:20:02 PM CET		
Date Processed:	9/25/2014 2:51:38 PM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	0.916	2132	0.04	260
2	1.220	14088	0.26	1525
3	1.771	5381755	98.77	582322
4	12.412	66	0.00	11
5	13.475	48689	0.89	1362
6	31.076	80	0.00	12
7	31.482	359	0.01	20

Reported by User: System
Report Method: Default Individual Report
Report Method ID: 1006

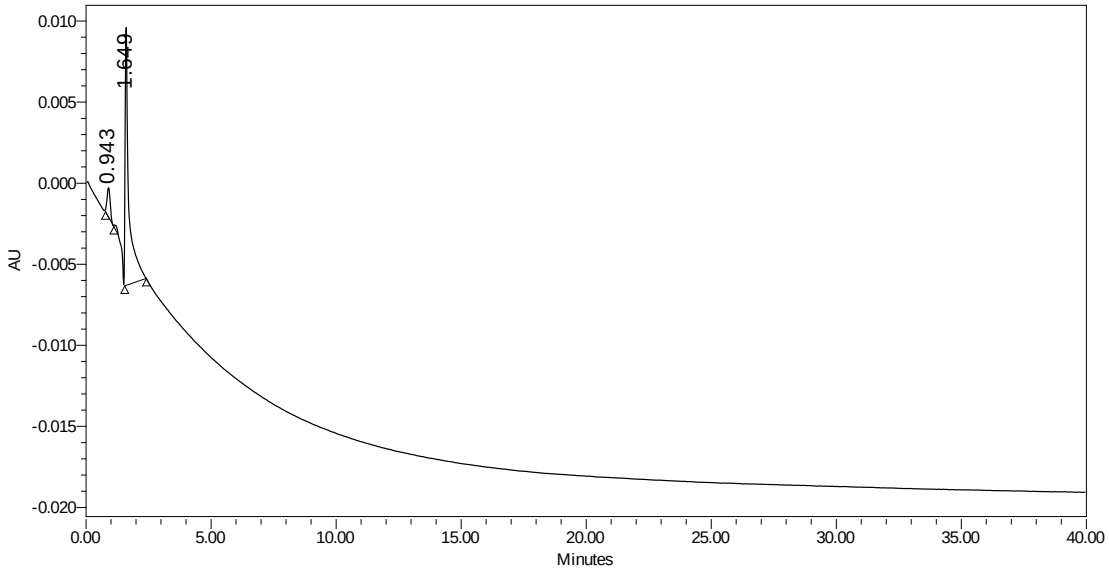
Project Name: Physico chimie\Fouad\ph\230914
Date Printed:
9/25/2014
2:51:50 PM Africa/Algiers

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	STD H2O2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	Phenol MSS
Vial:	1	Acq. Method Set:	Phenol Ms
Injection #:	1	Processing Method	h2o2
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 246nm
Date Acquired:	9/23/2014 3:13:22 PM CET		
Date Processed:	9/25/2014 3:05:49 PM CET		



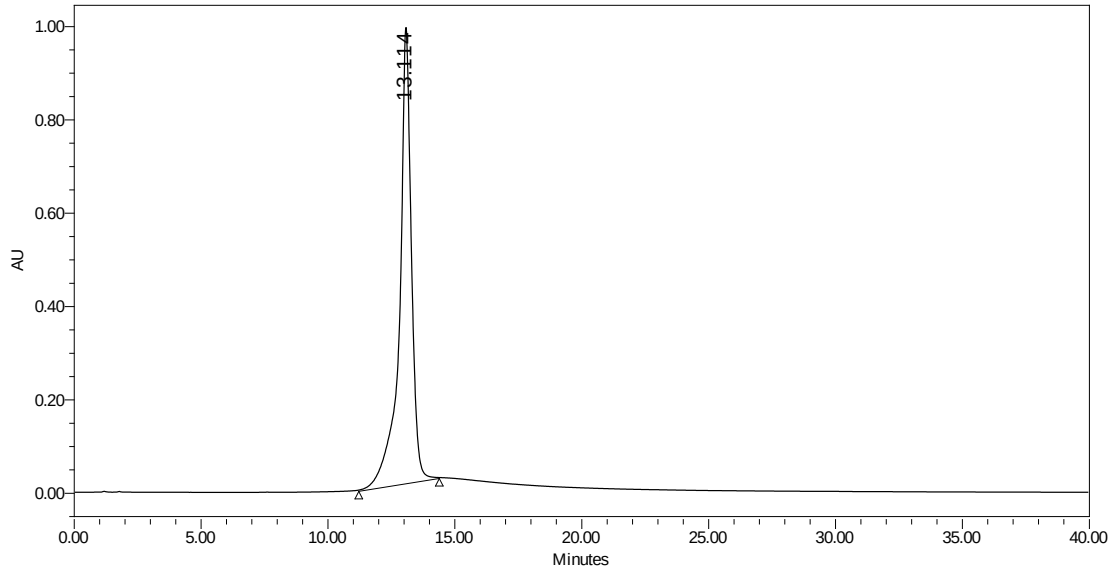
	RT	Area	% Area	Height
1	0.943	16732	9.35	1857
2	1.649	162316	90.65	15720

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	STD Cathecol	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	Phenol MSS
Vial:	9	Acq. Method Set:	Phenol Ms
Injection #:	1	Processing Method	cat210
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	9/23/2014 8:39:17 PM CET		
Date Processed:	9/25/2014 2:53:47 PM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	13.114	31321070	100.00	975197

Reported by User: System
Report Method: Default Individual Report
Report Method ID: 1006

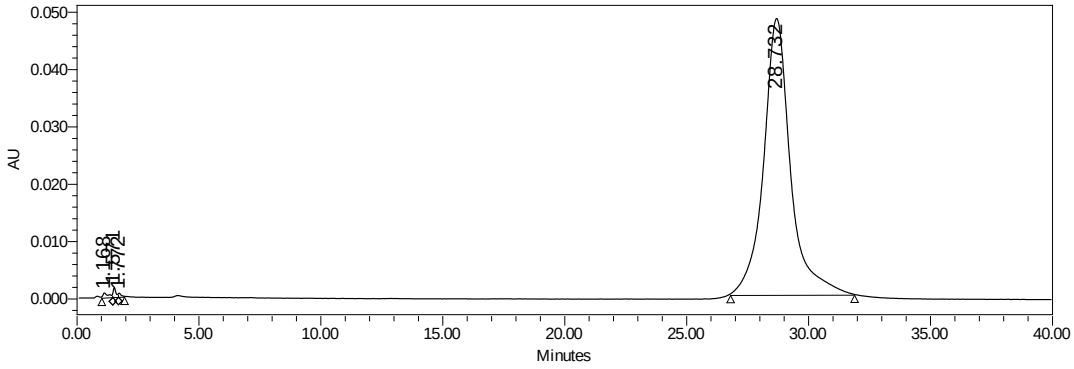
Project Name: Physico chimie\Fouad\ph\230914
Date Printed:
9/25/2014
3:09:05 PM Africa/Algiers

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Solution blanc enzyme me	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	9	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	BLANC ENZ 210nm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	8/2/2014 3:43:17 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:28:25 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	1.168	9334	0.25	710
2	1.571	11589	0.31	1638
3	1.772	4156	0.11	552
4	28.732	3661175	99.32	48116

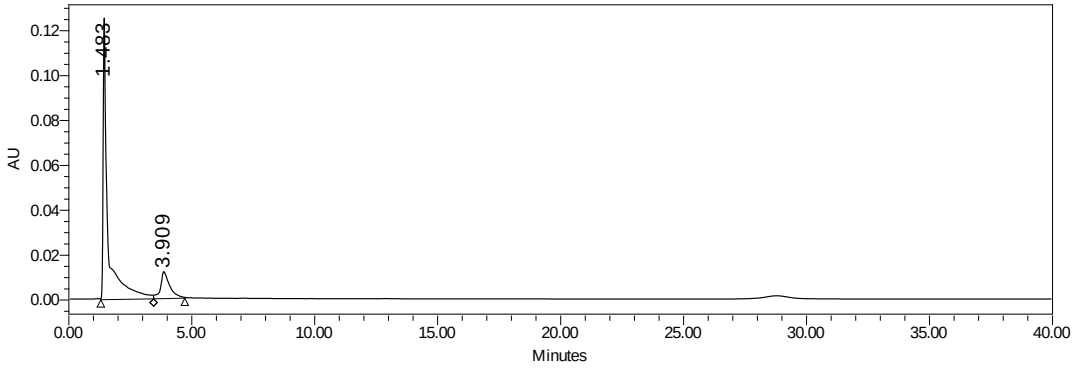
A.4.2 SPECTRES DE L'EFFLUENT SYNTHÉTIQUES ET INDUSTRIEL TRAITÉ PAR LE PROCÉDÉ FENTON

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Solution traitement fenton	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	11	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT FEN
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 246nm
Date Acquired:	8/2/2014 5:04:43 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:12:09 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	1.483	1596761	85.02	124377
2	3.909	281313	14.98	11606

Reported by User: System
Report Method: Default Individual Report
Report Method ID: 1006

Project Name: Physico chimie\Fouad\ph
Date Printed:
8/3/2014
10:49:51 AM Africa/Algiers

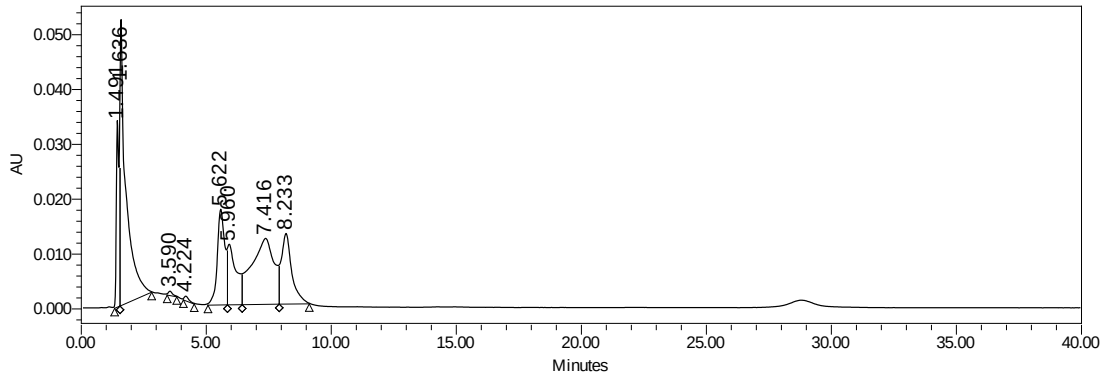
A.4.3 SPECTRES DE L'EFFLUENT PHÉNOLIQUE RETRAITÉ PAR LE PROCÉDÉ FENTON SUIVI PAR UN TRAITEMENT AVEC LA PEROXYDASE SOLUBLE

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol traitement enzyme me	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	13	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT ENZ FEN
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 246nm
Date Acquired:	8/2/2014 6:26:13 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:11:28 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	1.491	204111	7.18	33870
2	1.636	894550	31.48	51714
3	3.590	6333	0.22	654
4	4.224	8322	0.29	746
5	5.622	343619	12.09	17260
6	5.960	271615	9.56	10856
7	7.416	735590	25.89	11826
8	8.233	377100	13.27	12681

Reported by User: System
Report Method: Default Individual Report
Report Method ID: 1006

Project Name: Physico chimie\Fouad\ph
Date Printed:
8/3/2014
10:50:11 AM Africa/Algier

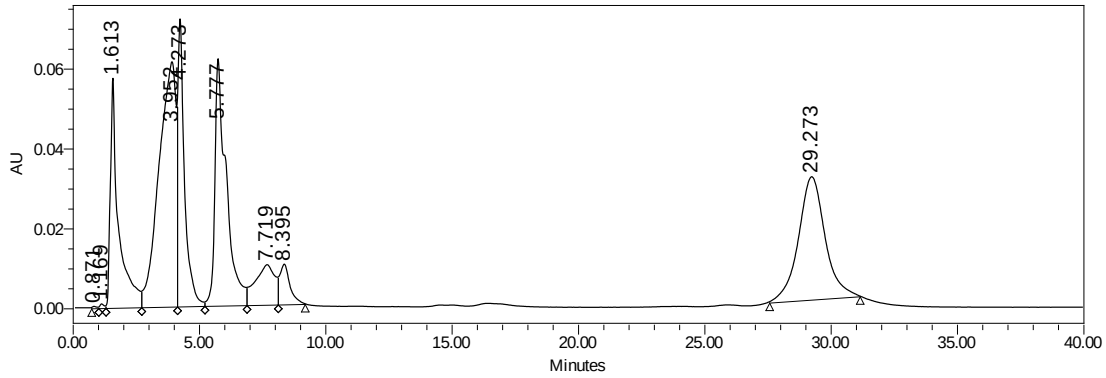
A.4.4 SPECTRES DE L'EFFLUENT PHÉNOLIQUE RETRAITÉ PAR LE PROCÉDÉ FENTON SUIVI PAR UN TRAITEMENT AVEC LA PEROXYDASE IMMOBILISÉE

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol trait enzy me fenton 120min	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	18	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT 120MIN 210nm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	8/2/2014 9:49:56 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:36:51 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	0.871	2913	0.03	306
2	1.169	8853	0.09	896
3	1.613	1271399	12.22	57301
4	3.952	2759043	26.53	61180
5	4.273	1394105	13.40	71933
6	5.777	1928852	18.54	61750
7	7.719	524112	5.04	9881
8	8.395	288476	2.77	9917
9	29.273	2223813	21.38	30615

Reported by User: System
Report Method: Default Individual Report
Report Method ID: 1006

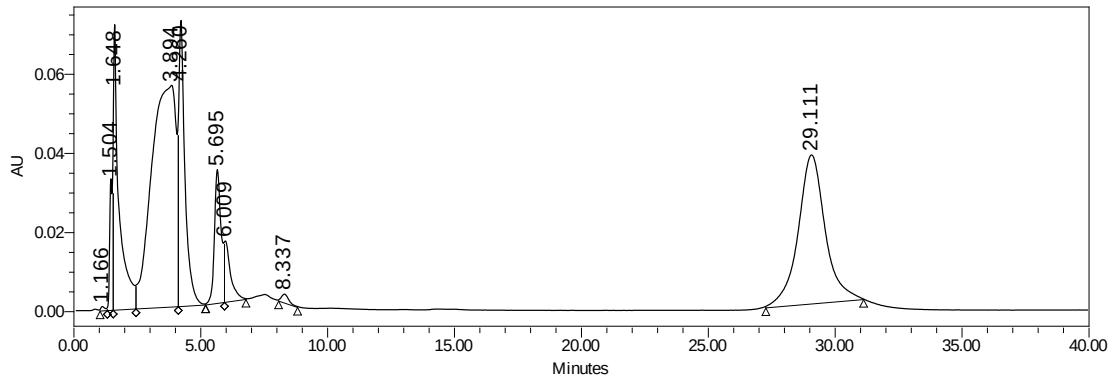
Project Name: Physico chimie\Fouad\ph
Date Printed:
8/3/2014
10:45:40 AM Africa/Algiers

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol trait enzyme me fenton	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	15	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT 15MIN 210nm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	8/2/2014 7:47:40 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:32:09 AM CET		



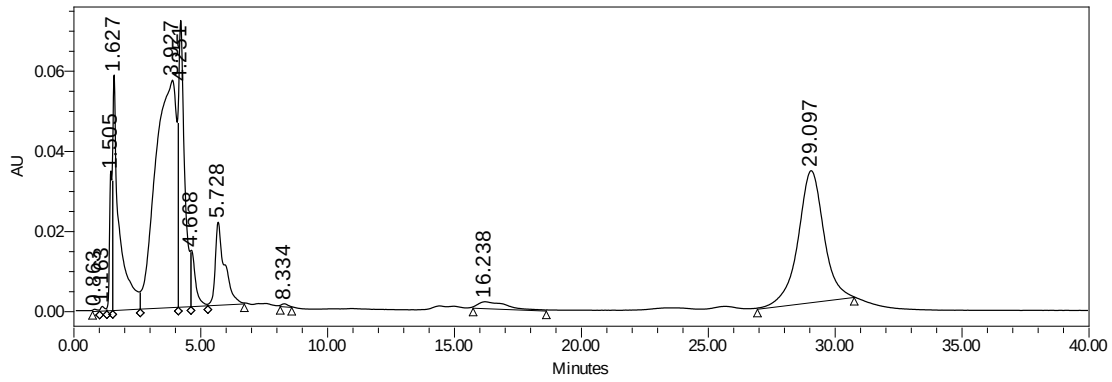
	RT	Area	% Area	Height
1	1.166	7608	0.08	829
2	1.504	202331	2.03	32894
3	1.648	1165104	11.68	71661
4	3.894	3661393	36.71	55771
5	4.260	1302173	13.06	72109
6	5.695	585553	5.87	33531
7	6.009	279558	2.80	15224
8	8.337	38468	0.39	2072
9	29.111	2730516	27.38	37390

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol trait enzyme me fenton 5min	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	14	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT 5MIN 210nm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	8/2/2014 7:06:58 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:31:45 AM CET		



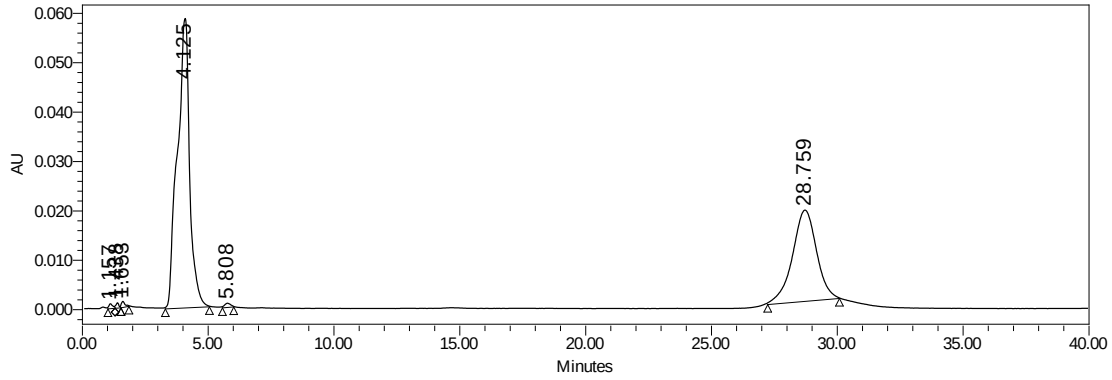
	RT	Area	% Area	Height
1	0.863	2381	0.03	271
2	1.163	8101	0.09	888
3	1.505	192161	2.21	34583
4	1.627	1055148	12.11	58635
5	3.927	3150790	36.17	56505
6	4.251	1214930	13.95	71225
7	4.668	193780	2.22	13789
8	5.728	509686	5.85	20485
9	8.334	7833	0.09	533
10	16.238	101982	1.17	1482
11	29.097	2273340	26.10	32657

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol couplage enzyme me fenton	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	10	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	COUP 210nm
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChB
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChB 210nm
Date Acquired:	8/2/2014 4:23:58 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:28:46 AM CET		



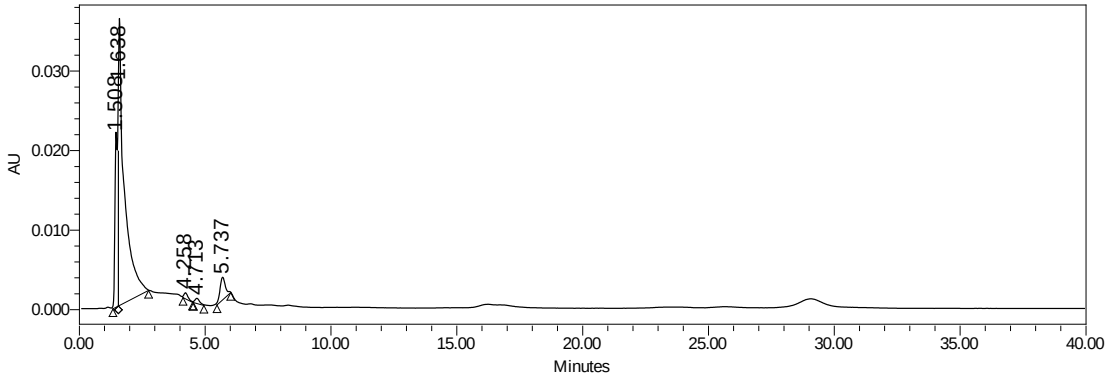
	RT	Area	% Area	Height
1	1.157	6675	0.21	779
2	1.438	6199	0.19	877
3	1.653	7945	0.25	992
4	4.125	1959406	61.60	58429
5	5.808	8670	0.27	632
6	28.759	1191701	37.47	18242

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol trait enzyme me fenton 5min	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	14	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT 5MIN
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 246nm
Date Acquired:	8/2/2014 7:06:58 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:11:12 AM CET		



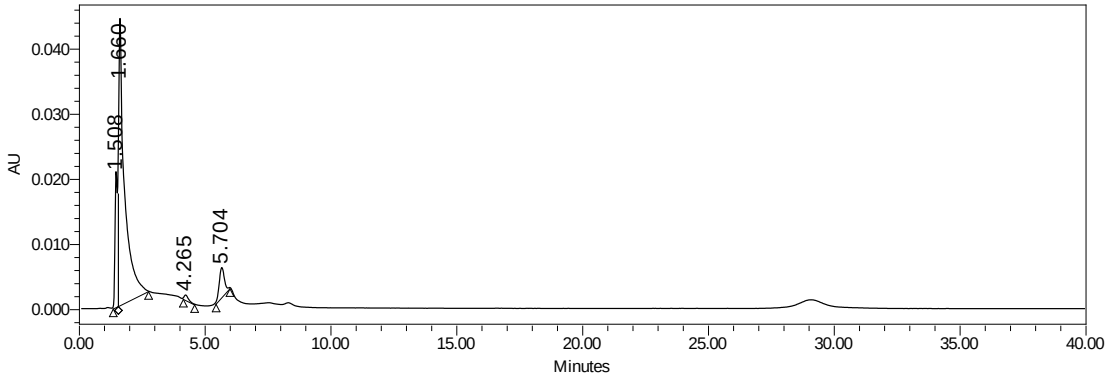
	RT	Area	% Area	Height
1	1.508	126548	15.85	21889
2	1.638	623833	78.13	35859
3	4.258	7144	0.89	694
4	4.713	6273	0.79	563
5	5.737	34643	4.34	2592

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol trait enzyme me fenton	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	15	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT 15MIN
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 246nm
Date Acquired:	8/2/2014 7:47:40 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:10:58 AM CET		



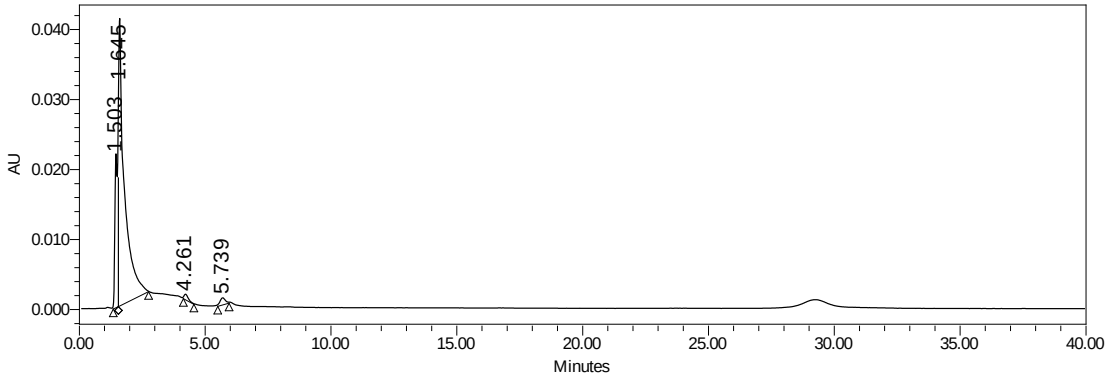
	RT	Area	% Area	Height
1	1.508	114180	12.38	20747
2	1.660	741732	80.42	43990
3	4.265	8548	0.93	772
4	5.704	57863	6.27	4307

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol trait enzyme me fenton	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	16	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT 30MIN
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 246nm
Date Acquired:	8/2/2014 8:28:25 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:10:43 AM CET		



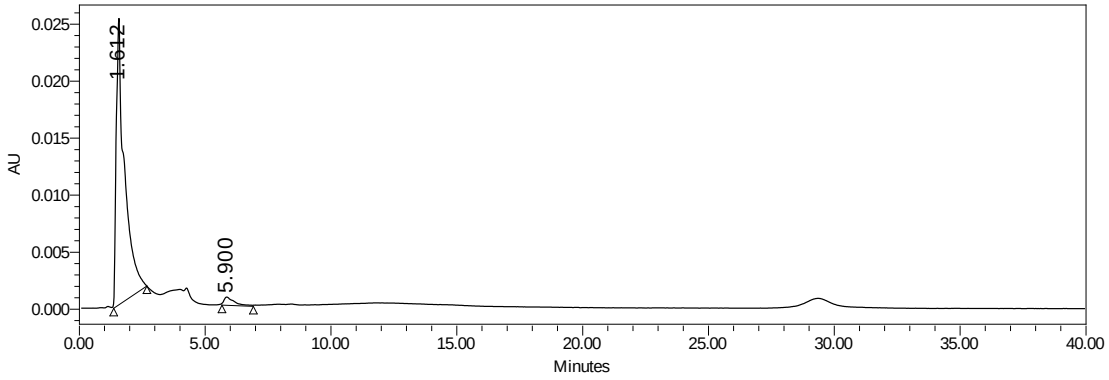
	RT	Area	% Area	Height
1	1.503	127500	15.04	21669
2	1.645	702093	82.82	40848
3	4.261	7814	0.92	731
4	5.739	10345	1.22	818

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol trait enzyme me fenton	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	17	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT 60MIN
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 246nm
Date Acquired:	8/2/2014 9:09:10 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:10:25 AM CET		



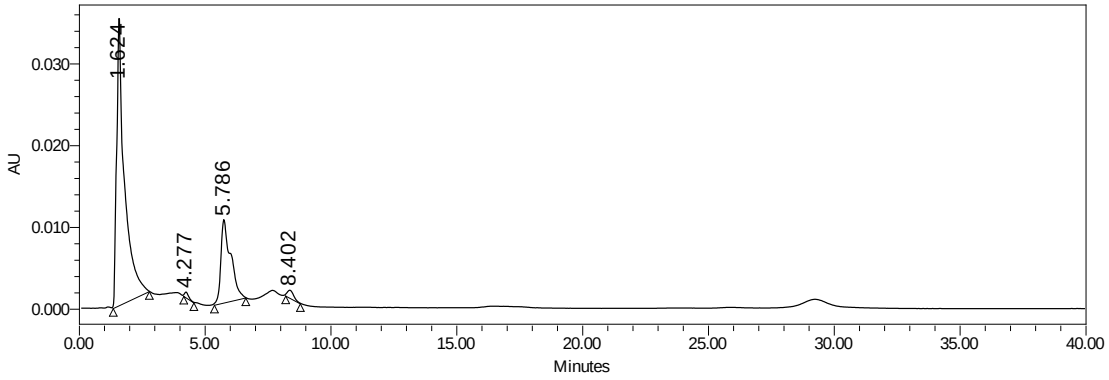
	RT	Area	% Area	Height
1	1.612	564205	97.44	24951
2	5.900	14797	2.56	635

Empower 3 SOFTWARE

Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Sol trait enzy me fenton 120min	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	ph MSS
Vial:	18	Acq. Method Set:	ph Ms
Injection #:	1	Processing Method	TRAIT 120MIN
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	40.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 246nm
Date Acquired:	8/2/2014 9:49:56 PM CET		
Date Processed:	8/3/2014 10:09:50 AM CET		



	RT	Area	% Area	Height
1	1.624	753082	72.25	35083
2	4.277	6967	0.67	648
3	5.786	266830	25.60	10045
4	8.402	15445	1.48	910

ANNEXE 5. PHOTOS PAR LE MEB DES BILLES DE LA PEROXYDASE IMMOBILISÉE PAR ALGINATE DE CALCIUM ± PEG

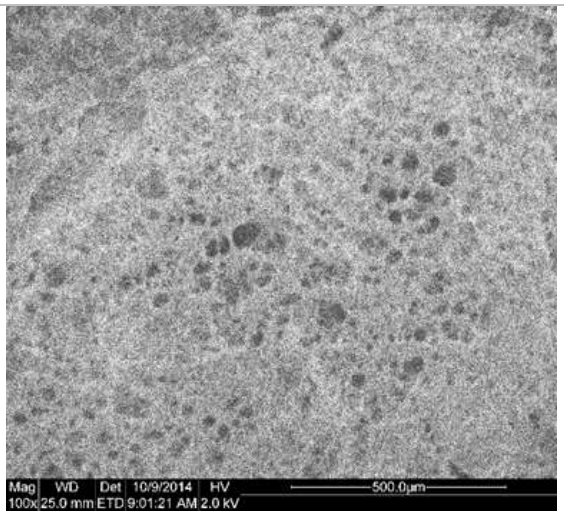


Fig. Billes d'alginate de calcium seul avant le traitement

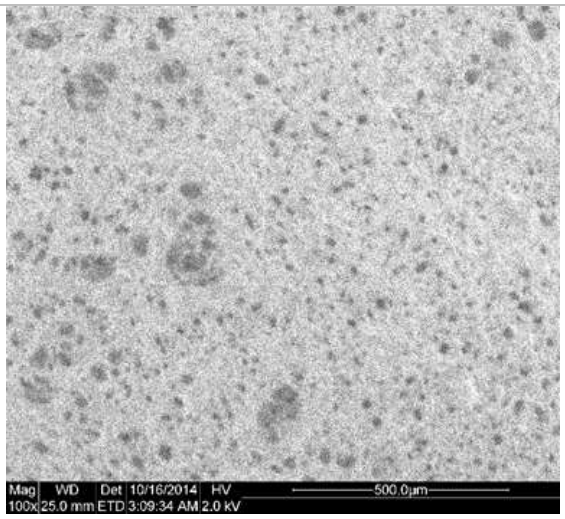


Fig. Billes d'alginate de calcium seul après le traitement

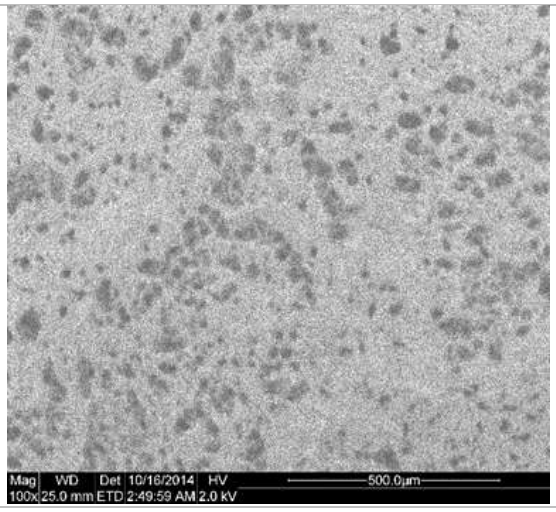


Fig. Billes d'alginate de calcium avec PEG(100 mg L^{-1}) avant le traitement

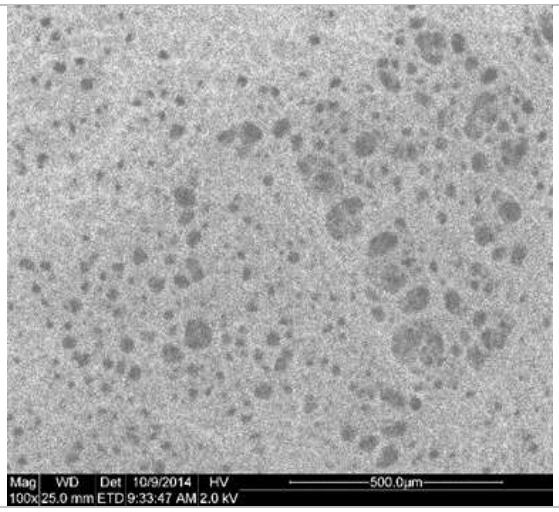


Fig. Billes d'alginate de calcium avec PEG(100 mg L^{-1}) après le traitement

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

1. PUBLICATIONS INTERNATIONALES

1.1 Ahmed AZIZI, Mahmoud ABOUSEOUD et Afaf AHMADI 2014, *Phenol removal by soluble and alginateentrapped turnip peroxidase*, Journal of Biochemical Technolgy, 5(4):795-800.

1.2 Ahmed AZIZI, Mahmoud ABOUSEOUD et Abdeltif AMRANE 2017, *Phenol Removal by a Sequential Combined Fenton-Enzymatic Process*, Nature Environment and Pollution Technology, 16(1): 321-330.

2. COMMUNICATIONS ORALES

2.1 Ahmed AZIZI et Mahmoud ABOUSEOUD, *Removal of p-Cresol from synthetic wastewater using alginate enrapped turnip peroxidase*, 1er Colloque International sur Hydrocarbures, Energies et Environnement, 23-24 Novembre 2015, Université Kasdi Merbah-Ouargla.

2.2 Ahmed AZIZI et Mahmoud ABOUSEOUD, *Phenol degrdation by chemical and enzymatic processes*. Journées Internationales de Cinétiques, Catalyse et Calorémétrie, Alger 2-4 Mai 2015.

2.3 Ahmed AZIZI et Mahmoud ABOUSEOUD, *A New hybrid Fenton-Enzymatic process for phenol degradation*, 3rd AOP' Tunisia Conference for Sustainable Water Management. Hammamet-Tunisie 2-4 November 2017.

1. POSTER

1.1 Ahmed AZIZI, Mahmoud ABOUSEOUD et Afaf AHMADI, *Biodegradation of phenol by free and immobilized Turnip Peroxidase*, 9ème Congré de Francophone de Génié des Procédés(CFGP 2014), 28-30 Avril 2014, Agadir-Marroc.

DEGRADATION DE PHENOL PAR COUPLAGE DE PROCEDE FENTON ET TRAITEMENT ENZYMATIQUE

RÉSUMÉ. Un procédé hybride Fenton/Enzyme a été réalisé en deux étapes pour l'élimination du phénol soluble dans l'eau usée synthétique et industrielle. Le procédé a été initié par une étape de prétraitement avec la réaction Fenton suivi par une polymérisation enzymatique.

Une solution de phénol (100 mg L^{-1}) a été traitée en batch par le procédé Fenton pendant une durée de 120 minutes pour une conversion maximale de 59% sous les conditions optimales de pH 3 et de température 40 °C, à des concentrations initiales en $[H_2O_2]$=2,6 mM et $[FeSO_4]$= 5 mg L^{-1}. Cette réaction a généré plusieurs sous-produits tels que les benzène-diols (hydroquinone et catéchol), le benzoquinone, et les acides formique et oxalique. Par la suite, le traitement enzymatique du phénol résiduel, l'hydroquinone et le catéchol, a été effectué sous les conditions optimales par la peroxydase libre (pH=7, T=40 °C, $[H_2O_2]$=24 mM, AE= 7 U mL^{-1}) et immobilisée (pH=7, T=40 °C, $[H_2O_2]$=10.6 mM, AE= 5 U mL^{-1}), pendant des durées de 60 et 165 minutes respectivement. Par le procédé couplé: Fenton/Peroxydase soluble la concentration du phénol résiduel était de 3 mg L^{-1}, alors qu'elle était de l'ordre de 0.33 mg L^{-1} à l'issue du procédé Fenton/Peroxydase immobilisée pour une durée de traitement globale de 4.5 heures. Le benzoquinone généré (16,9 mg L^{-1}) par le procédé couplé Fenton/Peroxydase immobilisée a été éliminé en totalité (99,8%) par précipitation-coagulation par le chitosane (4 g L^{-1}).

Enfin, un effluent pharmaceutique contenant une concentration initiale en phénol de l'ordre de 56 mg L^{-1} a été éliminé en quasi-totalité (99.6%) après 4 heures de traitement. Les valeurs de DBO_5, DCO et indice de phénol ont été réduites de 66.7, 72.7 et 93.4% respectivement. Les concentrations résiduelles des sous-produits de dégradation restants après le traitement du phénol étaient en conformité avec les normes environnementales des rejets industriels.

MOTS-CLÉS. Phénol; Fenton; Enzyme ; Peroxydase; Couplage.

PHENOL DEGRADATION BY COUPLING PROCESS FENTON AND ENZYMATIC TREATMENT

ABSTACT. A Hybrid process Fenton/Enzyme was carried out in two steps for the removal of phenol in synthetic and industrial wastewater. The process was initiated by a pretreatment step with Fenton reaction followed by enzymatic polymerization.

A concentration of 100 mg L^{-1} of the phenol was pretreated for 120 minutes for a maximum conversion of 59% under optimal conditions of pH 3 and temperature 40 °C and initial concentrations of $[H_2O_2]$= 2.6 mM and $[FeSO_4]$=5 mg L^{-1}. The reaction generated many by-products such as benzenediols (hydroquinone and catechol), benzoquinone, formic and oxalic acid. Thereafter, enzymatic treatment of residual phenol, hydroquinone and catechol was carried out under optimal conditions with free (pH=7, T= 40 °C, $[H_2O_2]$=24 mM, AE = 7 U mL^{-1}) and immobilized peroxidase (pH=7, T= 40 °C, $[H_2O_2]$=10.6 mM, AE= 5 U mL^{-1}) during 60 and 165 minutes respectively. Residual phenol concentrations obtained by the coupled process: Fenton/soluble peroxidase was about 3 mg L^{-1} while with Fenton/ immobilized peroxidase process it was 0.33 mg L^{-1} for an overall process duration of 4.5 hours. The generated benzoquinone (16.9 mg L^{-1}) by the hybrid process Fenton/immobilized peroxidase was completely eliminated (99.8%) by chitosan precipitation-coagulation (4 g L^{-1}).

At last, a pharmaceutical effluent containing a concentration of 56 mg L^{-1} of phenol was completely eliminated (99.6%) after 4 hours. Values of BOD_5, COD and phenol index were reduced by a percentage of 66.7, 72.7 and 93.4%, respectively. The residual hydroquinone, catechol and benzoquinone after treatment were in agreement with environmental standards.

INDEX ENTRIES. Phenol; Fenton; Enzyme ; Peroxidase; Coupling.

ازالة الفينـــــول بواسطة عملية هـــجينـــة فـــنتون والمـــعالجـة إنزيمية

ملخـــــص. تم إجراء طريقة الهجينة فنتون/البيروكسيداز على مرحلتين لإزالة الفينول في مياه الصرف اصطناعية والصناعية. شرعت العملية بتفاعل فنتون تليها البلمرة الأنزيميـــــة. محلول من الفينول ذو تركيز 100 مغ/ل تمت معالجته لمدة 120 دقيقة ليكون مردود المعالجة الاقصى 59 % في الشـــــروط المثلى (pH= 3 ، درجة الحرارة =40 درجة مئوية)، من أجل تركيز ماء الأوكسجين=2.6 ملمول /ل، الحديدوز 5 مغ/ل) .هذا التفاعل انتج موادا ثانوية مثل هدروكينون، كتكول، حمض النمل و الأكساليك. معالجة الفينول المتبقي، هدروكينون، كتكول تمت في الشروط المثلى بالانزيم الحر بيروكسيداز (pH=3، درجة الحرارة =40 درجة مئوية، النشاط الانزيمي= 7 وحدات/ل، تركيز ماء الأوكسجين=24ميلي مول /ل) ، والانزيم المثبت (pH=3، درجة الحرارة =40 درجة مئوية، النشاط الانزيمي= 5 وحدات /ل، تركيز ماء الأوكسجين=10.6 ميليمول/ل) بعد 60 و 165 دقيقة على الترتيب.

التراكيز المتبقية من الطريقة الهجينة فنتون/بروكسيداز حر 3 مغ/ل والطريقة الهجينة فنتون/بروكسيداز مثبت هي 0.33 مع/ل في زمن قدره 4.5 ساعة. البنزوكينون الناتج (16.9 مع/ل) من طرف الطريقة الهجينة فنتون/بروكسيداز المثبت تمت ازالته كليا (99.8%)بطريقة الترسيب وتخثر بواسطة الكيتوزان (4مغ/ل).

أخيرا، تمت معالجة مياه الصرف الصيدلانية تحتوي على 56 مغ/ل من الفنول تمت ازالتها شبه نهائيا (99,6%) في ظرف 4 ساعات من المعالجة من اجل مردود يقدر ب 99.6%. و كان انخفاض قيم BOD_5، COD ومؤشر الفينول كالتالي:66.7، 72.7 و 93.4% على الترتيب. كما كانت تراكيز الهدروكينون، الكاتكول و البنزوكينون المتبقية موافقة للمعايير البيئية.

الكـــلمات الـــرئيسيـــة . الفينـول؛ فنتـون؛ الانـزيـم؛ البيروكسيـداز؛ اقـتران.