

Sélection d'un champignon filamenteux pour l'épuration des eaux usées: le phénol comme inhibiteur modèle de discrimination entre *Aspergillus niger* et *A. oryzae*

Lacina COULIBALY^{1*}, Germain GOURÈNE¹ & Spiros N. AGATHOS²

¹Laboratoire d'Environnement et de Biologie Aquatique, UFR-Sciences et Gestion de l'Environnement, 02 BP 801 Abidjan 02, Université d'Abobo-Adjamé; Côte d'Ivoire.

²Unité de Génie Biologique, Département de Chimie Appliquée et Bio-industrie, Faculté d'Ingénierie Biologique, Agronomique et Environnementale; Croix du Sud 2 Boîte 19 Université Catholique de Louvain 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

*Auteur pour les correspondances : (E-mail : coulacina2003@yahoo.fr)

Reçu le 10-07-2006, accepté le 15-02-2008.

Résumé

Le choix d'un microorganisme pour épurer les eaux usées est difficile, car celui-ci doit conserver ses activités métaboliques en situation de stress. La discrimination entre *Aspergillus niger* et *A. oryzae*, a été effectuée en utilisant le test de respirométrie et le phénol comme inhibiteur modèle. Ensuite, la dégradation du phénol seul et en présence de glucose par *A. niger* a été conduite en milieu aérobie non renouvelé.

A. niger dégrade le phénol et le catéchol sans adaptation préalable à ces substrats. Son exposition préalable au phénol augmente sa vitesse de respiration nette en présence de celui-ci et du catéchol. Par contre, son adaptation préalable au catéchol entraîne l'inhibition de sa respiration. Relativement à *A. oryzae*, celui-ci ne respire, en présence du phénol et du catéchol, que lorsqu'il est exposé préalablement à ces substrats. Cependant sa vitesse de respiration nette, en présence du phénol, reste inférieure à celle de *A. niger*.

En présence du phénol, comme substrat unique, *A. niger* le dégrade au bout de 96 h, contre 118 h lorsqu'il y a du glucose dans le milieu de culture. *A. niger* résiste au phénol par rapport à *A. oryzae*. Il peut donc être utilisé en épuration des eaux usées.

Mots clés : *Aspergillus*, biodégradation, phénol, catéchol, respiration, eaux usées

Abstract

Selection of a filamentous fungi for wastewater treatment: Using phenol as a model inhibitory substrate of discrimination between Aspergillus niger and A. oryzae

Making the choice of a microorganism for wastewater treatment is difficult, since this organism must conserve its metabolic activity under stress condition. Discrimination between *Aspergillus niger* and *A. oryzae* was done using phenol as model inhibitory substrate and the respirometry test. Thereafter, aerobic stirred batch reactor was used to follow phenol degradation by *A. niger*, when it was used individually or in the presence of glucose.

A. niger biomass not previously exposed to phenol and catechol degrades these compounds. However, its exposure to phenol increased the degradation of this compound and catechol. But, its exposure to catechol inhibits its respiration in the presence of this substrate and phenol comparing to its exposure to phenol. Concerning *A. oryzae*, this fungus degrades phenol and catechol only when it underwent a preliminary exposure. However, its respiration rates in the presence of phenol and catechol are inferior to *A. niger* biomass adapted to phenol.

A. niger degraded phenol within 96 h when it was the unique substrate, and this was accomplished after 118 h in the presence of glucose. In addition, this fungus supports phenol stress in the growth medium than *A. oryzae*. Consequently, it can be used to treat wastewaters.

Key words: *Aspergillus*, biodegradation, phenol, catechol, respirometry, wastewater

1. Introduction

La pollution des eaux provoque un déséquilibre du milieu environnemental et peut entraîner, chez l'homme, des problèmes de santé et de mortalité. Ces problèmes ont entraîné dans les pays occidentaux, une prise de conscience qui a abouti au développement de procédés d'épuration des eaux résiduaires urbaines (ERU). Cependant, dans les pays en développement, où la pollution aquatique est importante, ces filières de traitement des ERU n'existent pas ou lorsqu'elles existent, elles sont constituées de technologies importées souvent non adaptées aux réalités desdits pays (Coulibaly, 2002). Cette situation entraîne des dysfonctionnements, lesquels peuvent s'expliquer en partie par l'introduction incontrôlée dans les ERU de polluants inhibiteurs de métabolisme bactérien (Paxéus et Schroder, 1996). En effet, les inhibiteurs organiques les plus présents sont les détergents, le phénol et ses dérivés (Galil *et al.*, 1998; Ledent *et al.*, 1999). Le traitement des ERU par les méthodes physico-chimiques ou biologiques classiques est très onéreux. Pour remédier à cela, l'augmentation de la capacité d'autoépuration dans les réseaux d'égouts par l'ajout de microorganismes représente une alternative (Coulibaly *et al.*, 2003). Cependant, ce choix est confronté aux polluants inhibiteurs (minéraux, organiques) de métabolisme microbien présents dans les ERU. Néanmoins, leur action peut être levée par l'ajout de microorganismes pouvant les transformer en composés moins toxiques (Borja *et al.*, 1992). L'étape la plus importante de la bioaugmentation est le choix d'un microorganisme ou d'un consortium d'organismes qui devra conserver ses activités métaboliques, même dans les situations hostiles (Coulibaly, 2002). Les différentes approches de choix de ces microorganismes sont leur isolement dans les matrices polluées, leur transformation génétique, leur adaptation et enfin le choix de microorganismes susceptible de dégrader de nombreux inhibiteurs ainsi que du polluant d'intérêt (Yeom *et al.*, 1997; Arai *et al.*, 2000; Heinaru *et al.*, 2000). Parmi toutes ces démarches, celle se rapportant au choix d'un microorganisme ayant de nombreuses potentialités épuratrice est relativement la plus aisée à mettre en œuvre. Cependant, il faut tester la capacité de biodégradation des inhibiteurs potentiels par ledit microorganisme. Ces tests se déroulent généralement sur des eaux synthétiques afin de maîtriser tous les paramètres (Mensah & Foster, 2003).

Les tests utilisés pour évaluer la biodégradation des polluants organiques sont au nombre de six dont celui de la respiration des microorganismes en présence du polluant étudié [OECD (1981) cité par Grady, (1985)]. En effet, la consommation d'oxygène en présence du polluant organique traduit l'utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électron et démontre ainsi sa biodégradation (Goudar et Strevett, 1998). Lorsque le test de respirométrie est négatif, il faut acclimater (ou adapter) le microorganisme au polluant afin qu'il développe si possible la machinerie enzymatique nécessaire à la dégradation dudit polluant (Grady, 1985; Arai *et al.*, 1998). Cette acclimatation consiste à exposer le (s) microorganisme (s) à ce polluant.

Coulibaly *et al.* (2003) ont montré que les champignons avaient de nombreuses potentialités pour la dégradation de nombreux polluants organiques et inorganiques. Cependant, leur utilisation en bioaugmentation pour la dégradation des inhibiteurs ou transformer les biopolymères est rare (Hodgson *et al.*, 1998; Coulibaly *et al.*, 2002; Coulibaly & Agathos, 2003). Les espèces d'*Aspergillus*, notamment *A. niger* et *A. oryzae* sont beaucoup utilisés en fermentation industrielle et la biomasse résiduelle est stockée dans les décharges. L'utilisation de celle-ci en épuration des eaux permet de les valoriser (Coulibaly *et al.* 2002). Cependant, ces champignons doivent supporter les stress de certains polluants organiques (phénol, détergent).

L'objectif de cette étude est d'utiliser le test de respirométrie en présence d'un inhibiteur modèle (phénol) pour choisir entre *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae* le champignon susceptible d'être utilisé pour épurer les ERU. Le phénol a été choisi comme modèle d'inhibiteur d'activité microbienne des ERU à cause de sa grande toxicité sur les bactéries indigènes des stations d'épuration par rapport aux autres inhibiteurs organiques. Le champignon susceptible de supporter le milieu contenant le phénol et capable de le dégrader sera considéré comme le plus performant à être utilisé pour l'épuration des ERU.

2. Matériel et méthodes

2.1. Eaux usées synthétiques, champignon et récolte des spores

Deux types d'eaux usées synthétiques ont été utilisés pour simuler la dégradation du phénol lorsqu'il est l'unique substrat organique (eau A) et

lorsqu'il se trouve en présence de glucose (eau B). La composition de l'eau synthétique A est en mg. l⁻¹ (KH₂PO₄, 700; K₂HPO₄, 1400; (NH₄)₂SO₄, 195; CaCl₂, 50; MgSO₄, 7; H₂O, 12,5; MnSO₄, 5; FeCl₃, 5; ZnSO₄.7H₂O, 5; C₆H₆O, 500). Celle de l'eau B a la même composition minérale et en phénol que l'eau A, mais contient en plus 8,7 g. l⁻¹ de glucose. Elles sont entièrement stérilisées à l'autoclave.

Les champignons filamenteux utilisés sont *Aspergillus niger* MUCL 28817 respectivement obtenus à la collection de champignon de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (MUCL) et *Aspergillus oryzae* VTT-D 85248 et celle de Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus (VTT) de Finland. Ils ont été cultivés dans des flacons de culture cellulaire de 250 ml (surface de culture 75 cm²) (Nunc, Roskilde, Danemark) à 28°C sur un milieu solide de composé de bouillon de soja digéré «TSA Difco» (Detroit, MI., USA) (composition en g. l⁻¹: Bacto tryptone, 17; Bacto soytone, 3; Bacto dextrose, 5; NaCl, 5; K₂HPO₄, 2,5; Agar, 15). Après 7 jours de culture à 28°C, les flacons de culture ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Dix (10) millilitres de solution de préculture (contenant 0.1% de Tween 80) précédemment stérilisée à l'autoclave et revenue à 20°C ont été ajoutés dans les flacons. Ensuite, les flacons ont été fermés puis vigoureusement agités à la main pour récolter les spores.

2.2. Milieux non renouvelés pour la dégradation du phénol

Une préculture de *A. niger* a été effectuée dans le milieu de Garcia *et al.* (1997) (composition en en g. l⁻¹: glucose, 40; peptone de viande, 5; peptone de caséine, 5). Préalablement, 2 ml du milieu de récolte de spores ont été portés en condition stérile dans un flacon à baffles (250 ml) contenant 100 ml de milieu de préculture stérile. Les flacons ont été agités à 150 rotations par minute sur une table agitante orbitale Appliteck Scientific Instrument (Deinze, Belgique) à 20°C. La biomasse de préculture de 72 h a été récupérée par filtration sur du papier Whatman N°4 et lavée avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, la biomasse a été mise en suspension dans 250 ml d'eau distillée stérile et 5 ml de cette liqueur mixte ont été portés dans 50 ml d'eau A et B contenus dans des flacons de 250 ml. Ces flacons ont été ensuite agités dans les mêmes conditions que précédemment.

Biomasse pour le test de respirométrie

Pour le test de respirométrie, trois types de biomasse ont été utilisés. Il s'agit des biomasses préalablement adaptées au catéchole, au phénol et de biomasse témoin. Pour les biomasses préalablement adaptées au phénol et au catéchol, des précultures de 72 h (phase exponentielle de croissance) de *A. niger* et de *A. oryzae* sont effectuées dans le milieu de Garcia *et al.* (1997) (cf. supra). Après 72 h, 1 ml de solution concentrée (10 g. l⁻¹) de phénol ou de catéchol a été ajouté dans la préculture pour l'adaptation de la biomasse. L'incubation de *A. niger* et de *A. oryzae* a été poursuivie pendant 48 h. Pour la biomasse témoin, la procédure est identique sauf que 1 ml d'eau distillée a été ajouté à la place du phénol ou du catéchol dans les cultures. Les biomasses fongiques ont été récupérées après la période d'adaptation par filtration sur du papier Whatman N°4 et lavées à l'eau distillée stérile. Les différentes biomasses obtenues ont été suspendues dans des flacons contenant 100 ml d'eau distillée stérile.

Croissance de la biomasse.

La biomasse du champignon a été déterminée par poids sec (Garcia *et al.*, 1997). Les 55 ml de volume (V) d'un flacon de culture de milieu non renouvelé ont été *entièrement récupérés sur un filtre Whatman N°4 pesé à vide (M₁)*. *L'ensemble (filtre et biomasse) a été séché à l'étuve (Beckso, Bruxelles, Belgique) à 105°C pendant 2 h, puis refroidi à température ambiante dans un dessiccateur pour la détermination de sa masse (M₂)*. *La concentration de biomasse sèche de champignon a été obtenue suivant la relation (1) :*

$$[\text{Biomasse}] \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = \frac{M_2 - M_1}{V} \quad (1)$$

Respiration de *A. niger* et de *A. oryzae*.

Pour la mesure de la respiration, 700 µl de liqueur mixte de *A. niger* ou de *A. oryzae* ont été portés dans une cellule d'électrode de Clark (Rank Brothers Bottisham, Cambridge, Angleterre). Ensuite, 400 µl de solution de phénol (10 g. l⁻¹) ou de catéchol (10 g. l⁻¹) ont été ajoutés dans la cellule qui était aussitôt couverte afin d'empêcher sa réaération. Enfin, la consommation d'oxygène dissous a été enregistrée à l'aide d'un potentiomètre papier enregistreur (Houston Instrument, Gistel, Belgique). Pour la respiration

endogène, le polluant a été remplacé par de l'eau distillée stérile. Les vitesses de respiration de *A. niger* et de *A. oryzae* en présence du phénol et du catéchol ont été déterminées à l'aide de l'électrode de Clark reliée à un potentiomètre à papier enregistreur (Houston Instrument, Gistel, Belgique). Ce dernier a permis l'enregistrement du profil de consommation d'oxygène.

La respiration endogène de la biomasse désigne sa respiration en présence d'eau, alors que sa respiration exogène concerne la respiration de la biomasse en présence d'un substrat (phénol ou catéchol).

Vitesse de la respiration nette. La vitesse de la respiration nette de la biomasse d'un champignon en présence d'un substrat (phénol ou catéchol) a été déterminée par la relation (2).

$$V = \frac{O_2(s) - O_2(eau)}{\Delta t [biomasse]} \quad (2)$$

Avec: : Oxygène consommé en présence du phénol ou du catéchol

$O_2(eau)$: Oxygène consommé en présence d'eau

Δt : temps de l'expérience

$[biomasse]$: Concentration de biomasse dans la cellule

Le Phénol

Le phénol a été déterminé par spectrophotométrie avec le réactif de Folin-Ciocalteu. En effet, 200 μ l d'échantillon ont été introduits dans un tube à essai. Puis 400 μ l de solution de carbonate de sodium (200g. l⁻¹) et 100 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma, St. Louis, MO, USA, F-9252) ont été ajoutés dans le même tube. On a laissé la réaction se dérouler pendant 10 min et 4 ml d'eau distillée ont été ajoutés dans le tube. Le milieu a ensuite été vigoureusement agité et l'absorbance a été lue à 620 nm au spectrophotomètre (Beckman Série DU 640, Fullerton, USA). Un témoin a été réalisé de la même manière que précédemment, sauf que le volume de l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée. Une courbe d'étalonnage a été réalisée afin de convertir les absorbances en concentration de phénol.

Métabolites du phénol

Les métabolites ont été déterminés par chromatographie en phase liquide (HPLC) sur

les filtrats des cultures, après extraction de ceux-ci à l'éther selon Garcia *et al.* (2000). Les métabolites ont été analysés sur une colonne HPLC Alltima C₁₈ (5 μ m ; 4.6x250 mm) à phase inversée (Alltech, Deerfield, IL, USA). La phase mobile était constituée d'un mélange d'acétonitrile, d'eau et d'acide orthophosphorique (V:V:V) (60:39.5:0.5). Le débit de la pompe a été réglé à 1 ml min⁻¹. Les métabolites ont été détectés à 276 nm au moyen d'un spectromètre UV Pharmacia LKD (Roosendal, Pays-Bas) équipé d'une lampe au Deutérium et relié à un intégrateur Intersmat (Courtry, France).

Demande chimique en oxygène (DCO) des effluents et Equivalent DCO du phénol des effluents

La DCO représente la quantité d'oxygène qu'il faut fournir à un échantillon pour que toute la matière oxydable (notamment le carbone organique) soit minéralisée en composés ultimes par voie chimique. Elle a été mesurée à l'aide d'un kit à DCO Merck (Darmstadt, Germany, 1. 14555) sur les filtrats des réacteurs, le jour même de l'échantillonnage.

L'équivalent DCO du phénol (C₆H₆O) correspond à la concentration d'oxygène nécessaire à la combustion totale d'un gramme de phénol. Il a été calculé à partir de l'équation d'oxydation du phénol et correspond à 2,38 g d'oxygène.

Analyse statistique

Une analyse de variance à un facteur a été effectuée afin d'apprécier les différences entre les activités métaboliques des biomasses de *A. niger* et *A. oryzae* préalablement adapté ou non au phénol ou au catéchol. C'est le test de Newman-Keuls qui a été appliqué. Il y a une différence significative lorsque p est inférieur à 0,05.

Les points représentés pour chaque paramètre sur les graphiques sont la moyenne de triplicatas.

3. Résultats

Les vitesses de respiration nette des différentes biomasses exposées au phénol et au catéchol sont présentées dans la figure 1. L'exposition de *A. niger* au phénol (Figure 1A) lui permet de respirer à la fois en présence de ce substrat et du catéchol. Cependant, la vitesse de respiration nette de *A. niger* exposé au phénol, en présence de celui-ci est supérieure à sa vitesse de respiration nette en présence du catéchol. Par ailleurs, l'exposition de *A. niger* au catéchol

(premier métabolite de la dégradation du phénol par de nombreux microorganismes) inhibe sa respiration en présence de ce substrat et du phénol (Figure 1A). En effet, on obtient des vitesses de respiration nette négatives. Par contre, la respiration est moins inhibée par le phénol par rapport au catéchol. Une respiration de la biomasse témoin en présence du phénol et du catéchol est également notée (Figure 1A). Cependant, les vitesses de respiration nette de cette biomasse en présence de ces substrats sont inférieures à celles de la biomasse exposée au phénol. La figure 1B présente les vitesses de respiration nette de la biomasse témoin de *A. oryzae* ainsi que celles exposées au phénol et au catéchol. La biomasse témoin de *A. oryzae* est inhibée (vitesses de respirations nettes négatives)

par le phénol et le catéchol. Par ailleurs, cette inhibition est plus prononcée en présence de catéchol que de phénol. Cependant, en exposant *A. oryzae* au phénol, sa biomasse respire uniquement qu'en présence de ce substrat. Par contre, l'exposition de la biomasse de *A. oryzae* au catéchol lui permet de respirer à la fois en présence de celui-ci et du phénol. Mais, la vitesse de respiration nette de cette biomasse en présence de catéchol est supérieure à celle en présence du phénol (Figure 1B). En comparant les profils de respiration nette en présence de phénol et de catéchol des biomasses de *A. oryzae* adaptées à ces deux composés et ceux du témoin, il ressort qu'il faut procéder à une exposition de ce champignon au phénol ou au catéchol avant qu'il ne puisse les dégrader.

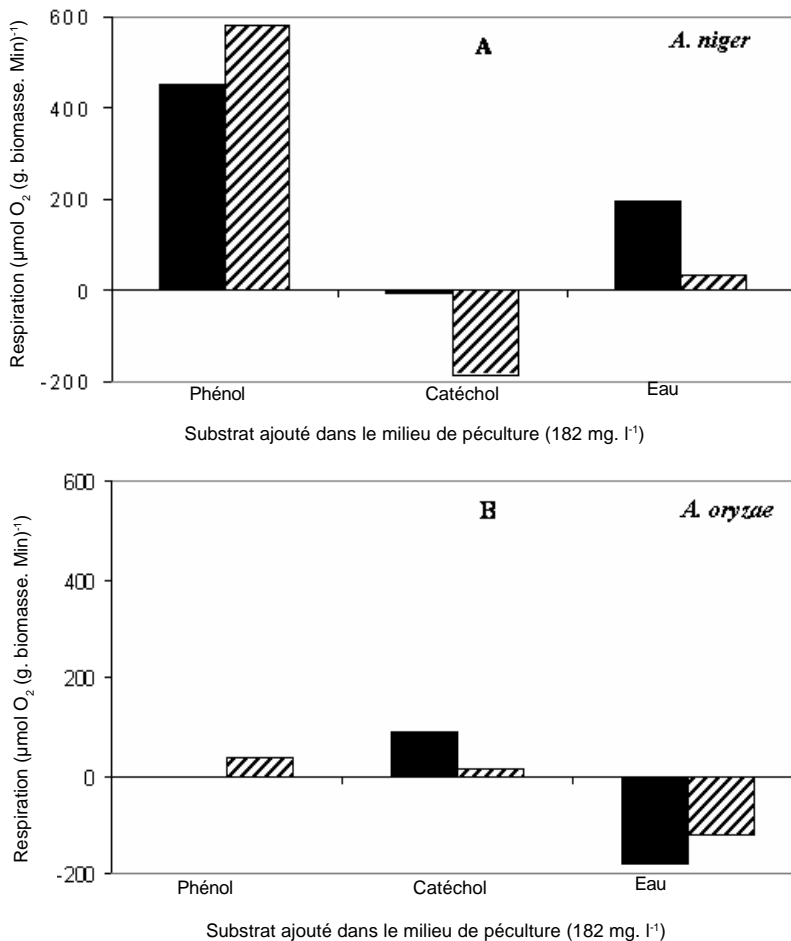


Figure 1. Influence des conditions de préculture de la biomasse de *A. niger* (A) et *A. oryzae* (B) sur leur respiration en présence de phénol (■) et de cathécol (▨).

Une analyse de variance des vitesses de respiration nette des biomasses de *A. niger* (témoin, adaptées au phénol, adaptées au catéchol) avec celles de *A. oryzae* (témoin, adaptées au phénol, adaptées au catéchol) donne pour toutes les conditions de culture des différences très significatives ($p < 0.005$). Par ailleurs, comme *A. niger* dégrade le phénol sans une adaptation préalable, ce champignon apparaît donc comme ayant une bonne capacité à supporter le stress du phénol par rapport à *A. oryzae*.

Les résultats de la dégradation du phénol par *A. niger* dans les eaux A et B en milieu non renouvelé

sont présentés dans la figure 2A. Une dégradation rapide du phénol dans l'eau A par rapport à l'eau B est enregistrée. En effet, après 96 h d'incubation de *A. niger*, le phénol est totalement dégradé dans l'eau A. Cependant, dans l'eau B, sa dégradation complète ne survient qu'après 118 h. La dégradation du phénol dans l'eau A confirme les résultats de la respiration nette de la biomasse de *A. niger* en présence de ce polluant. Dans l'eau B, du catéchol (métabolite de dégradation du phénol) a furtivement été détecté après 48 h d'incubation. Alors que dans l'eau A, aucun métabolite de dégradation du phénol n'a pu être observé (Figure 2A).

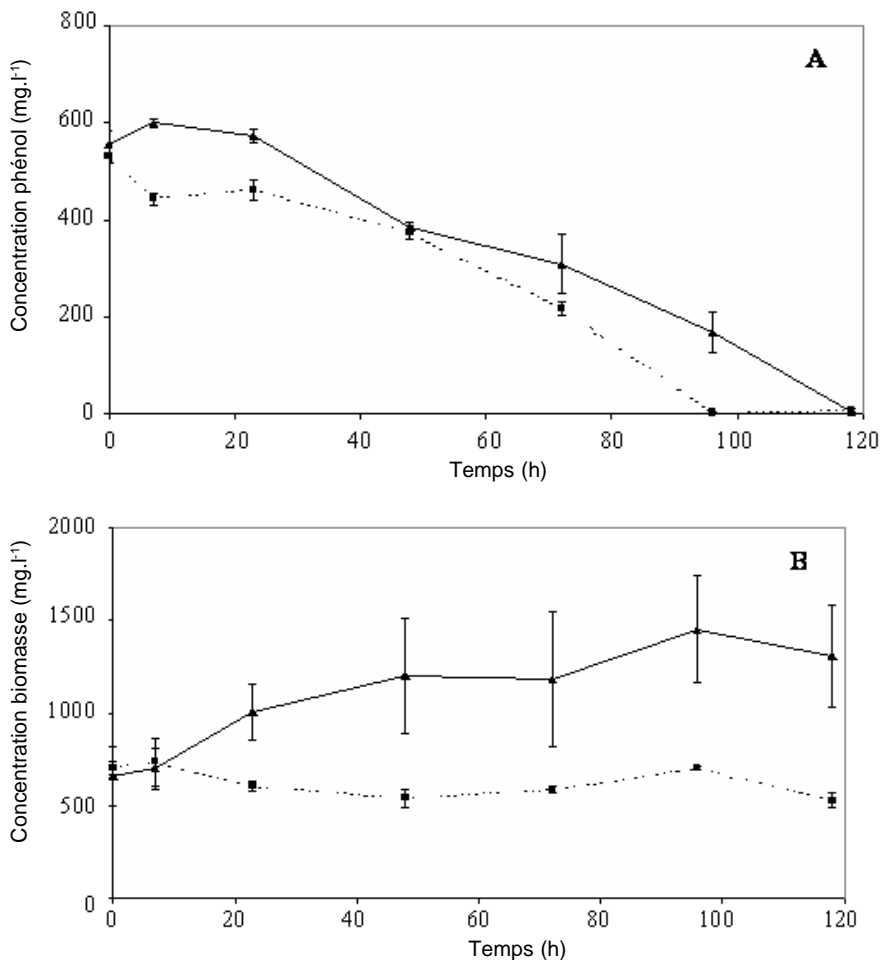


Figure 2. Influence du milieu de culture (eau A : phénol ; eau B : phénol + glucose) sur la dégradation du phénol et de l'évolution de la biomasse de *A. niger*. Evolution du phénol et de la biomasse dans l'eau A (■) et dans l'eau B (▲).

A : Dégradation du phénol

B : Evolution de la biomasse

La figure 2B présente les profils des biomasses du champignon dans les eaux A et B. Il n'y a pas de production de biomasse dans l'eau A contrairement à l'eau B, où l'on observe une croissance.

Le tableau 1 montre une diminution de 5 602 mg O₂. l⁻¹ de la DCO du glucose en 72 h, pour une dégradation en équivalent DCO de phénol de 589

mg O₂. l⁻¹. Par ailleurs, la diminution du phénol dans l'eau B est inférieure à celle de l'eau A. En utilisant le coefficient de conversion de la DCO en biomasse ($Y_{x/s} = 0,26 \text{ g biomasse (g DCO)}^{-1}$) de Garcia *et al.*^{x/s} (2000), la production théorique de biomasse pour 5 602 mg. l⁻¹ de DCO enlevée est de 1 456 mg. l⁻¹. Cette biomasse est largement supérieure aux 524 mg. l⁻¹ de biomasse accumulée dans le milieu B.

Tableau 1. Cinétique de dégradation du glucose par *A. niger* en présence de phénol (eau A).

Temps (h)	DCO totale	Phénol	Equivalent DCO du phénol	DCO glucose
	(mg O ₂ . l ⁻¹)	(mg. l ⁻¹)	(mg O ₂ .l ⁻¹)	(mg O ₂ .l ⁻¹)
	[1]		[2]	([1]-[2])
0	9218 ± 1 4	557 ± 30	1327	7891
23	7517 ± 24	575 ± 7	1430	6147
48	5111 ± 55	383 ± 14	913	4197
72	3027 ± 60	309 ± 12	738	2289
118	1055 ± 24	5 ± 0.4	11.9	1043

4. Discussion

Concernant la vitesse de respiration nette de la biomasse de *A. niger* exposée au phénol, la grande vitesse obtenue pourrait s'expliquer par une induction enzymatique de phénol hydroxylase (EC 1. 14. 13. 7), catéchol 1,2-dioxygénase (EC 1. 13. 1. 1), catéchol 2,3-dioxygénase qui sont impliqués dans la dégradation du phénol (Grady, 1985). En effet, le phénol hydroxylase est à la base de l'hydroxylation du cycle benzénique du phénol, tandis que le catéchol 1,2-dioxygénase procède à l'ouverture de ce cycle (Ali *et al.*, 1998; Arai *et al.*, 2000; Heinaru *et al.*, 2000; Ridder *et al.*, 2000). Quant à la vitesse de respiration nette élevée en présence du phénol de la biomasse de *A. niger* exposée à ce substrat par rapport à celle exposée au catéchol, celle-ci pourrait s'expliquer par une induction plus importante en phénol hydroxylase (EC 1. 14. 13. 7) lors de son exposition au phénol par rapport au catéchol. En effet, Arai *et al.* (2000) ont observé un arrangement et une régulation du gène impliqué dans la dégradation chez *Comamonas testosteroni*. L'existence de respiration nette négative de la biomasse de *A. niger* exposée au catéchol exprime une inhibition du système respiratoire du champignon (Vankova *et al.*, 2000) qui pourrait

résulter d'une répression de la synthèse du phénol hydroxylase. Quant aux vitesses de respiration nette positives de la biomasse témoin de *A. niger* en présence de phénol et du catéchol, elles suggèrent que ce champignon dispose d'enzymes susceptibles de dégrader ces composés sans exposition préalable à ces substrats.

Concernant les vitesses de respiration nette des biomasses de *A. oryzae* (témoin et adaptée), celles-ci suggèrent que l'adaptation de la biomasse au catéchol aurait induit une activité plus importante de catéchol 1,2-dioxygénase (EC 1. 13. 1. 1) ou catéchol 2,3-dioxygénase. Quant à la vitesse de respiration nette négative de la biomasse témoin de *A. oryzae*, celle-ci pourrait s'expliquer par une inhibition de sa chaîne respiratoire. Par ailleurs, l'observation du catéchol dans l'eau B pourrait se justifier par le fait que le phénol soit dégradé en cométabolisme.

Concernant la dégradation du phénol dans l'eau A, l'absence de production de biomasse observée pourrait s'expliquer par le fait que la concentration de phénol utilisée ne constitue pas une source d'énergie suffisante à *A. niger* pour observer une croissance. Le phénol utilisé dans ce contexte, servirait à la maintenance énergétique du

champignon. Cependant, dans le milieu B, la croissance de la biomasse observée pourrait être due à la consommation du glucose par *A. niger*. La différence entre la production théorique de biomasse et les résultats expérimentaux pourrait s'expliquer d'une part par la composition des deux eaux et d'autre part par, par une inhibition du phénol hydrolase de *A. niger* (Leonard & Lindley, 1999). En effet, l'expérience de Garcia *et al.* (2000) a été effectuée sur une eau usée de production d'huile d'olive qui contient des polyphénols avec un rapport ($\frac{DCO\ Totale}{phénol\ totaux}$) de 69,2, tandis que la présente expérience a été effectuée avec une eau synthétique dont le rapport ($\frac{DCO\ Totale}{phénol\ totaux}$) est de 16,5. Le rapport ($\frac{DCO\ Totale}{phénol\ totaux}$) élevé pour l'eau usée de production d'huile d'olive (DCO constituée d'hydrate de carbone) (Garcia *et al.*, 2000) est un indice de la présence d'hydrate de carbone qui est beaucoup utilisé par *A. niger* en présence de phénol. En outre, la capacité des champignons à utiliser le phénol et ses dérivés en présence de co-substrat a été démontrée sur les effluents industriels et est utilisée pour faire baisser la toxicité de ceux-ci dans les procédés conventionnels de traitement des ERU (Borja *et al.*, 1996, 1997; Goudar *et al.*, 2000).

5. Conclusion

Les tests de respiration en présence de phénol et de catéchol ont montré qu'il n'est pas nécessaire d'exposer *A. niger* au phénol et au catéchol pour qu'il dégrade ces substrats. Cependant, l'exposition de la biomasse de *A. niger* au phénol augmente sa vitesse de respiration nette en présence du phénol et du catéchol. Quant à la biomasse de *A. oryzae*, celle-ci ne peut respirer en présence du phénol ou du catéchol que lorsqu'elle a subi une exposition préalable. En outre, *A. niger* respire plus vite en présence de phénol et de catéchol par rapport à *A. oryzae*. Le test de dégradation du phénol en eau synthétique a confirmé cette capacité de *A. niger*. En effet, ce champignon dégrade totalement 500 mg l⁻¹ de phénol en 96 h dans le milieu A. Cette même concentration de phénol est dégradée au bout de 118 h en présence de glucose. Cependant, la dégradation du phénol seul (eau A) n'a pas engendré de croissance mesurable de la biomasse de *A. niger* par rapport à la dégradation du phénol en

cométabolisme (eau B). Au total, *A. niger* apparaît comme un bon candidat pour la bioaugmentation des ERU.

Remerciements

Nous remercions le Ministère de la Recherche Scientifique et de l'Innovation Technologique de Côte d'Ivoire pour la bourse de recherche, tous les chercheurs l'Unité de Génie Biologique de l'Université Catholique de Louvain, à Louvain-la-Neuve en Belgique ainsi que ceux du Laboratoire d'Environnement et de Biologie Aquatique de l'UFR des Sciences et Gestion de l'Environnement, Université d'Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire, pour leurs critiques.

Références citées

- Ali S., Fernandez-Lafuente R., & Cowan D. A., 1998. Meta-pathway degradation of phenolics by thermophilic *Bacilli*. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 462-468.
- Arai H., Akahira S., Ohishi T., Maeda M., & Kudo T., 1998. Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiol.* **144**, 2895-2903.
- Arai H., Ohishi T., Chang M. Y., & Kudo T., 2000. Arrangement and regulation of the genes for meta-pathway enzymes required for degradation of phenol in *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiol.* **146**, 1707-1715.
- Borja R., Martin A., Maestro R., Alba J., & Fiestas J. A., 1992. Enhancement of the anaerobic digestion of olive mill wastewater by the removal of phenolic inhibitors. *Process Biochem.* **27**, 231-237.
- Borja R., Banks C. J., Maestro-Duran R., & Alba J., 1996. The effects of the most important phenolic constituents of olive mill wastewater on batch anaerobic methanogenesis. *Environ. Technol.* **17**, 167-174.
- Borja R., Alba J., & Banks C. J., 1997. Impact of the main phenolic compounds of olive mill wastewater (OMW) on the kinetics of acetoclastic methanogenesis. *Process Biochem.* **32**, 121-133.
- Coulibaly L. (2002) Bioconversion de macromolécules dans un réacteur stimulant un écoulement piston en régime transitoire: Cas de

- la bioremediation d'eaux uses synthétiques par *Aspergillus niger*. Thèse de doctorat, Université Catholique de Louvain, Louvain la Neuve, Belgique. 174p.
- Coulibaly L., Naveau H., & Agathos S. N., 2002. A tanks-in-series bioreactor to simulate macromolecular-laden wastewater pretreatment under sewer conditions by *Aspergillus niger*. *Wat. Res.* **36**, 3941- 3948.
- Coulibaly L., & Agathos S. N., 2003. Transformation kinetics of mixed polymeric substrates under transitory conditions by *Aspergillus niger*. *African J. Biotechnol.* **2**, 438-443.
- Coulibaly L., Gourène G., & Agathos S. N., 2003. Utilization of funguses for biotreatment of raw wastewaters. A review. *African J. Biotechnol.* **2**, 620-630.
- Galil N. I., Schwartz-Mittelmann A., & Saroussi-Zohar O., 1998. Biomass deflocculation and process disturbances exerted by phenol induced transient load conditions. *Wat. Sci. Technol.* **38**, 105-112.
- Garcia I. G., Venceslada J. L. B., Pena P. R. J., & Gomez E. R., 1997. Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Wat. Res.* **31**, 2005-2011.
- Garcia I. G., Pena P. R. J., Venceslada J. L. B., Martin A. M., Santos M. A. M., & Gomez E. R., 2000. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochem.* **35**, 751-758.
- Goudar C. T., & Strevett K. A., 1998. Comparison of relative rates of BTEX biodegradation using respirometry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 11-18.
- Goudar C. T., Ganji S. H., Pujar B. G., & Strevett K. A., 2000. Substrate inhibition kinetics of phenol biodegradation. *Wat. Environ. Res.* **72**, 50-55.
- Grady C. P. L. Jr., 1985. Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 660-674.
- Heinaru E., Truu J., Stottmeister U., & Heinaru A., 2000. Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31**, 195-205.
- Hodgson J., Laugero C., Leduc R., Asther M., & Guiot S. R., 1998. Fungal pretreatment by *Phanerochaete chrysosporium* to reduce the inhibition of methanogenesis by dehydroabietic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 538-544.
- Ledent P., Michels H., Blackman G., Naveau H., & Agathos S.N., 1999. Reversal of the Inhibitory Effect of Surfactants upon Germination and Growth of a Consortium of Different Strains of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 370-374.
- Leonard D., & Lindley N. D., 1999. Growth of *Ralstonia eutropha* on inhibitory concentrations of phenol: diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylase activity. *Enzyme Microbial Technol.* **25**, 271-277
- Mensah K. A., & Foster C. F., 2003. An examination of the effects of detergents on anaerobic digestion. *Bioresource Technol.* **90**, 133-138.
- Paxéus N., & Schroder H. F., 1996. Screening for non-regulated organic compounds in municipal wastewater in Goteborg, Sweden. *Wat. Sci. Technol.* **33**, 9-15
- Ridder L., Mulholland A. J., Rietjens I. M. C. M., & Vervoort J., 2000. A quantum mechanical/molecular mechanical study of the hydroxylation of phenol and halogenated derivatives by phenol hydroxylase. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8728-8738.
- Vankova S., Reznickova I., & Hoffmann J., 2000. Respirometric observation of inhibitory effects of xenobiotics on aerobic respiration of activated sludge. *Chemicke Listy.* **94**, 48-53.
- Yeom S. H., Kim S. H., Yoo Y. J., & Yoo I. S., 1997. Microbial adaptation in the degradation of phenol by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234. *Korean J. Chem. Engng.* **14**, 37-40.