

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Badji Mokhtar Annaba University  
Université Badji Mokhtar – Annaba  
Faculté des Sciences de l'Ingéniorat  
Département Génie des Procédés



جامعة باجي مختار – عنابة

كلية علوم الهندسة  
قسم هندسة الطرائق

## Thèse

Présentée par

Année 2022

**Imene HOCINI**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle

Spécialité : Génie des Procédés Chimiques et Biotechnologiques

*Biodégradation assistée par phytoremédiation  
des colorants textiles Marine Cibanone et Ecarlate  
Solophényl BNLE*

**DIRECTRICE DE THESE :Nabila KHELLAF**, Professeur, Université de Annaba, Algérie

DEVANT LE JURY

<b>PRÉSIDENT</b>	Med Fouzi GHORAB, Professeur	Université de Annaba
<b>RAPPORTEUR</b>	Nabil MESSIKH, Professeur	Université de Skikda
<b>EXAMINATEUR</b>	Nabil BOUGDAH, MCA	Université de Skikda
<b>INVITÉ</b>	Nadia FERTIKH, Professeur	Université de Annaba

# *Dédicaces*

*A mes très chers parents*

*A mon cher homme*

*A mes chères sœurs et mon frère*

# *Remerciements*

Premièrement, louange à « Dieu » qui m'a fourni de la patience au moment du besoin, de la force au moment de la faiblesse et de la volonté contre le désespoir ; je le remercie aussi car il m'a mise entre de bonnes mains.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à ma Directrice de thèse Mme Nabila KHELLAF, Professeur à l'Université de Annaba, d'avoir accepté d'être mon encadreur ; je lui témoigne de mes profondes reconnaissances pour le suivi constant et ses conseils importants dont j'ai pu profiter tout au long de cette période. Je la remercie aussi pour sa confiance et sa grande patience pour réaliser ce projet de thèse.

Je remercie vivement les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail et pour leur honorable présence.

Je remercie particulièrement tous les enseignants du département de Génie des Procédés qui ont contribué à ma formation et au développement de mon parcours universitaire et scientifique.

Je remercie mes chers « **Parents** » pour leur soutien moral et le courage qu'ils m'ont donné pour surmonter toutes les difficultés durant mes années d'études.

Je remercie également mon homme « **Khaled** » pour son soutien pendant la réalisation de ce projet.

Je remercie également mes chères amies « **Ikram, Hadjer & Rekia** » pour leur soutien moral pendant la réalisation de ce projet.

J'adresse aussi mes remerciements à mes collègues de la SONATRACH pour leur compréhension et leur soutien durant les périodes difficiles.

*Imene*

# *Production Scientifique*

Cette thèse a fait l'objet de communications et publications internationales de renommée établie

## **Articles publiés**

**Hocini I**, Benabbas K, Khellaf N, Djelal H, Amrane A (2019) Can duckweed be used for the biomonitoring of textile effluents. Euro-Mediterranean J Environ Integrat, 4(34).  
Doi: 10.1007/s41207-019-0126-9

**Hocini I**, Khellaf N, Benabbas K, Djelal H, Amrane A (2020) Identification of the Mechanism Involved in the Removal Potential of Textile Pollutants by the Aquatic Plant *Lemna gibba* L. J Chem Health Risks, 10(2), 145-153. Doi:10.22034/jchr.2020.1890306.1086

## **Article Soumis**

**Hocini I**, Benabbas K, Khellaf N, Djelal H, Amrane A. Activated sludge-assisted phytoremediation for dye removal. Environ Sci Pollut Res, Novembre 2021, *under review*

## **Communication Internationale**

**Hocini I**, Benabbas K, Khellaf N (2017) Tolerance to organic pollutants in the duckweed, *Lemna gibba* L.: Case study on textile dyes. Third International Symposium on Materials and Sustainable Development ISMSD 2017, November 07 & 08, 2017, Boumerdes, Algeria

# SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
LISTE DES FIGURES .....	5
LISTE DES TABLEAUX .....	8
LISTE DES ABREVIATIONS ETSYMBOLS.....	10
LISTE DES FORMULES CHIMIQUES.....	14
المخلص.....	16
RESUME.....	18
ABSTRACT .....	21
INTRODUCTION GENERALE.....	25

## *PARTIE THEORIQUE*

### **CHAPITRE I : POLLUTION DES EAUX PAR LES COMPOSES ORGANIQUES- CAS PARTICULIER DES COLORANTS TEXTILES**

I.1 Introduction .....	30
I.2 Différents types de polluants organiques.....	30
I.2.1. Pesticides et produits phytosanitaires.....	32
I.2.2. Hydrocarbures .....	32
I.2.3. Détergents .....	33
I.2.4. Produits pharmaceutiques .....	34
I.2.5. Matières colorantes.....	35
I.3. Effluents industriels et normes de rejets.....	36
I.3.1. Les effluents liquides industriels .....	36
I.3.2. Normes de rejets .....	41
I.4. Effets des polluants organiques sur l'homme, la faune et la flore - Effet sur la biodiversité.....	44
I.4.1. Toxicité et écotoxicité des polluants organiques .....	44
I.4.2. Impact des polluants organiques sur l'homme et l'environnement.....	46
I.5. Cas particulier des effluents de l'industrie textile.....	47
I.5.1. Caractéristiques des effluents industriels textiles .....	48

I.5.2. Législation sur l'environnement .....	50
I.5.3. Toxicité des effluents et des colorants textiles .....	50
I.5.4. Traitement des colorants textiles .....	56

## **CHAPITRE II : TRAITEMENT DE LA POLLUTION ORGANIQUE PAR LES BOUES ACTIVEES**

II.1 Introduction.....	64
II.2 Principe du traitement par les boues activées .....	66
II.3 Description et fonctionnement du procédé d'épuration à boues activées.....	67
II.4 Eléments nécessaires au développement des microorganismes.....	74
II.4.1 Milieu de culture .....	75
II.4.2 Le potentiel Hydrogène (pH) .....	79
II.4.3 Température .....	79
II.4.4 Toxicité .....	81
II.4.5 Eau .....	82
II.5 Composition et propriétés du floc biologique.....	83
II.5.1 La microflore .....	84
II.5.2 La microfaune .....	85
II.6 Les processus métaboliques.....	87
II.6.1 Le catabolisme .....	88
II.6.2 L'anabolisme.....	88
II.6.3 La respiration endogène.....	90

## **CHAPITRE III : LA PHYTOREMÉDIATION**

III.1 Introduction .....	92
III.2 Notions de toxicité et tolérance .....	94
III.3 Définition et principe de la phytoremédiation.....	101
III.4 Techniques et mécanismes de phytoremédiation .....	102
III.5 Espèces végétales utilisées en phytoremédiation .....	107

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

### **CHAPITRE IV: MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES**

IV.1 Introduction .....	116
-------------------------	-----

IV.2 Polluants .....	116
IV.2.1 Choix des molécules : Marine Cibanone (MC) et Ecarlate Solophényl (ES) .....	116
IV.2.2 Propriétés physicochimiques des colorants .....	117
IV.2.3 Données toxicologiques des colorants .....	118
IV.3 Boues activées .....	119
IV.3.1 Sélection des boues activées et traitement au laboratoire .....	119
IV.3.2 Milieu de culture .....	120
IV.3.3 Caractérisation des boues activées .....	120
IV.4 Lentilles d'eau .....	123
IV.4.1 Sélection de <i>L. gibba</i> .....	123
IV.4.2 Description et morphologie .....	124
IV.4.3 Conditions de culture et adaptation des plantes .....	124
IV.5 Dispositif et protocole expérimentaux .....	125
IV.5.1 Tests de toxicité .....	125
IV.5.2 Essais de phytoremédiation .....	126
IV.5.3 Essais de biodégradation assistée par phytoremédiation.....	127
IV.6 Techniques d'analyse .....	129
IV.6.1 Analyse des colorants par spectrophotométrie UV-vis .....	129
IV.6.2 Analyse de la biomasse végétale par spectroscopie Infrarouge .....	130
IV.6.3 Analyse de la biomasse végétale par microscopie électronique à balayage (MEB) couplé à une dispersion énergétique des rayons X (EDX) pour l'analyse élémentaire .....	131
IV.6.4 Analyse des produits de dégradation des colorants par LC/MS.....	132
IV.6.5 Mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) .....	132
IV.6.6 Mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO <sub>5</sub> ) .....	133
IV.6.7 Analyse des boues activées .....	133
IV.6.8 Détermination des pigments photosynthétiques.....	135

## **CHAPITRE V: ESSAIS DE PHYTOREMEDIATION DES COLORANTS MARINE**

### **CIBANONE ET ECARLATE SOLOPHENYL BNLE PAR *L. GIBBA***

V.1 Introduction .....	137
V.2 Tests de toxicité .....	138
V.2.1 Validité des tests de toxicité .....	138
V.2.2 Détermination du seuil de toxicité.....	138
V.2.3 Détermination des paramètres inhibiteurs de croissance.....	140

V.2.4 Détermination des paramètres inhibiteurs des pigments photosynthétiques .....	143
V.3 Essais de phytoremédiation .....	145
V.3.1 Détermination de la dose optimale de la plante <i>L.gibba</i> .....	145
V.3.1 Effet de la concentration initiale de MC et ES .....	147
V.3.3 Identification du mécanisme d'élimination des colorants par <i>L.gibba</i> .....	150

**CHAPITRE VI : ESSAIS DE BIODEGRADATION ASSISTEE PAR  
PHYTOREMEDIATION DES COLORANTS MARINE CIBANONE ET ECARLATE  
SOLOPHENYL BNLE**

VI.1 Introduction .....	156
VI.2 Caractérisation des boues activées .....	158
VI.2.1 Caractérisation macroscopique des boues activées .....	159
VI.2.2 Caractérisation microscopique des boues activées .....	159
VI.3 Développement microbien des boues activées avec et sans glucose.....	162
VI.4 Effet du glucose sur l'élimination des deux colorants MC et ES.....	164
VI.5 Effet du couplage des boues activées et <i>L.gibba</i> sur l'élimination de MC et ES.....	167
VI.6 Développement microbien des boues activées avec et sans <i>L.gibba</i> .....	170
VI.7 Mécanisme d'élimination des deux colorants .....	171
VI.8 Réponses de <i>L.gibba</i> au stress abiotique induit par les colorants .....	180
VI.9 Influence de la concentration initiale de MC et ES.....	182
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	186
REFERENCES BILIOGRAPHIQUES .....	192
ANNEXES .....	218

## Listes des figures

### CHAPITRE II

<b>Figure II.1.</b> Schéma de fonctionnement d'un traitement par les boues activées .....	68
<b>Figure II.2.</b> Mécanismes réactionnels de la dégradation de la pollution azotée par nitrification – dénitrification. ....	72
<b>Figure II.3.</b> Processus simplifié de déphosphatation au sein d'une bactérie en conditions anaérobie et aérobie .....	73
<b>Figure II.4.</b> Catégories de microbes basés sur des plages de températures pour la croissance .....	81
<b>Figure II.5.</b> Métabolisme d'une bactérie hétérotrophe ou autotrophe .....	89
<b>Figure II.6.</b> Dégradation de la matière organique biodégradable et dégradation de la matière azotée dans les procédés biologiques .....	90

### CHAPITRE III

<b>Figure III.1.</b> Relation entre les doses et les effets (dose-réponse) et les valeurs remarquables NOEC, LOEC et CE50 .....	100
<b>Figure III.2.</b> Principales techniques de phytoremédiation .....	106
<b>Figure III.3.</b> Plantes aquatiques les plus communes utilisées en phytoremédiation .....	110

### CHAPITRE IV

<b>Figure IV.1.</b> Structure chimique des colorants (a) ES et (b) MC .....	118
<b>Figure IV.2.</b> Photos des lentilles d'eau utilisées dans la présente étude .....	124
<b>Figure IV.3.</b> Schéma du protocole expérimental pour l'élaboration des essais de toxicité des colorants MC et ES avec <i>L.gibba</i> .....	126
<b>Figure IV.4.</b> Dispositif expérimental pour l'élaboration des essais de biodégradation, (a) Contrôle (b) Traitement avec les BA, (c) Traitement avec les BA assistée par <i>L.gibba</i> .....	128
<b>Figure IV.5.</b> Schéma du principe de la spectrophotométrie UV-vis .....	130

### CHAPITRE V

<b>Figure V.1.</b> Signes visibles de toxicité présentes par <i>L.gibba</i> après 4 jours d'exposition au colorants à des concentrations > 50 mg/L : (a) témoin à t = 0 jours, (b) témoin à t = 4 jours, (c) réduction de la biomasse, (d) chlorose, (e) dislocation des frondes, (f) nécrose .....	140
<b>Figure V.2.</b> Taux de croissance moyen de <i>L.gibba</i> avec différentes concentrations et le pourcentage d'inhibition du taux de croissance par rapport à la concentration de colorant de (a, c) MC et (b, d) ES. Les lignes en pointillés (a, b) indiquent le taux de croissance le plus faible. Chaque barre verticale représente l'écart type, n = 3 .....	142

<b>Figure V.3.</b> Taux de pigments chlorophylliens et caroténoïdes en fonction de la concentration des colorants (a) MC et (b) ES. Chaque barre verticale indique l'écart type, n = 3 .....	144
<b>Figure V.4.</b> Effet du nombre de frondes sur l'élimination des deux colorants (a) MC, (b) ES. V = 100 mL, pH <sub>initial</sub> = 6,1 ± 0,1, C <sub>colorant</sub> = 50 mg/L, T = 21 ± 1°C, Temps = 7 jours. Les barres verticales indiquent l'écart type, n = 3 .....	145
<b>Figure V.5.</b> Effet du nombre de frondes de <i>L.gibba</i> sur l'efficacité d'élimination des colorants, (a) MC et (b) ES. V = 100 mL, pH <sub>initial</sub> = 6,1 ± 0,1, C <sub>colorant</sub> = 50 mg/L, T = 21 ± 1°C, Temps = 7 jours. Les barres verticales indiquent l'écart type, n = 3 .....	147
<b>Figure V.6.</b> Élimination de (a) MC et (b) ES par <i>L.gibba</i> à différentes concentrations initiales, nombre de frondes = 20 frondes pour MC et 40 frondes pour ES, V = 100 mL, pH = 6,1 ± 0,1, T = 21 ± 1°C, Temps = 7 jours. Les barres verticales indiquent l'écart type, n = 3.....	148
<b>Figure V.7.</b> Taux de croissance moyen (AGR) de <i>L.gibba</i> avec différentes concentrations de (a) MC et (b) ES .....	150
<b>Figure V.8.</b> (A) Spectres UV-vis de (a) MC et (b) ES dilués dans l'acétone, (B) Teneur en MC et ES phytoaccumulés extraits de la biomasse de <i>Lemna</i> après traitement de 7 jours par l'acétone et (C) Pigments photosynthétiques extraits de la biomasse native (sans colorants) par l'acétone .....	151
<b>Figure V.9.</b> Spectres FT-IR du colorant (a) MC, (b) ES en phase liquide (A) avant traitement et (B) après 7 jours de traitement .....	152
<b>Figure V.10.</b> Spectres FT-IR de la biomasse de <i>Lemna</i> (a) MC et (b) ES avant traitement (A) et après 7 jours de traitement (B).....	153
<b>Figure V.11.</b> (a) Analyse visuelle de <i>L.gibba</i> avant traitement et micrographie MEB de la biomasse de <i>L.gibba</i> (b) avant la phytoaccumulation du colorant, (c) après phytoaccumulation de MC, (d) après phytoaccumulation d'ES.....	154

## CHAPITRE VI

<b>Figure VI.1.</b> Observation microscopique des communautés microbiennes, (a) <i>Epistylis sp</i> , (b) <i>Vorticella</i> à tige courte, (c) <i>Rotifera</i> , (d) <i>Euplotes sp</i> .....	161
<b>Figure VI.2.</b> Variation de la concentration et de la DCO des colorants en fonction du temps pour les traitements avec et sans glucose (a, c) MC, (b, d) ES.....	165
<b>Figure VI.3.</b> Variation de la concentration et de la DCO des solutions en fonction du temps pour les traitements (avec glucose) avec et sans <i>Lemna gibba</i> (a,c) MC, (b,d) ES.....	168
<b>Figure VI.4.</b> Spectres UV-visible et analyse FT-IR de (a, b, d) MC et (c,e) ES après biodégradation par les boues activées.....	172
<b>Figure VI.5.</b> Analyse par LC/MS des métabolites de biodégradation du MC à différents intervalles de temps .....	174
<b>Figure VI.6.</b> Représentation mécanisme de biodégradation du MC.....	175

<b>Figure VI.7.</b> (a) Indice de Fukui calculé pour MC et (b) géométrie optimale de la molécule de MC177	
<b>Figure VI.8.</b> Images SEM et analyse EDX de (a, b) <i>L.gibba</i> , (c, d) <i>L.gibba</i> après accumulation d'ES, (e, f) <i>L.gibba</i> après accumulation de MC.....	179
<b>Figure VI.9.</b> Teneur en pigments photosynthétiques de <i>L.gibba</i> pour (a) MC et (b) ES.....	182
<b>Figure VI.10.</b> Effet de la concentration initiale de(a) MC et (b) ES sur la capacité de biodégradation des colorants par les boues activées assistées par les lentilles d'eau .....	183

## Liste des tableaux

### CHAPITRE I

<b>Tableau I.1.</b> Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides industriels.....	42
<b>Tableau I.2.</b> Tolérance à certaines valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides industriels selon les catégories d'installations .....	43
<b>Tableau I.3.</b> Identification des principaux procédés d'une entreprise textile et les effluents associés	48
<b>Tableau I.4.</b> Valeurs limites des paramètres de rejets des effluents textiles.....	50

### CHAPITRE II

<b>Tableau II.1.</b> Éléments majeurs avec certaines de leurs fonctions principales et formes chimiques prédominantes utilisées par les microorganismes .....	75
<b>Tableau II.2.</b> Éléments mineurs ou les oligo-éléments avec certaines de leurs fonctions principales et formes chimiques prédominantes utilisées par les microorganismes .....	78
<b>Tableau II.3.</b> Seuil de toxicité pour certains polluants minéraux et organiques.....	82
<b>Tableau II.4.</b> Populations de boues activées.....	84

### CHAPITRE III

<b>Tableau III.1.</b> Différents types de traitements en fonction du polluant à extraire ou à traiter .....	107
<b>Tableau III.2.</b> Différentes espèces de lentilles d'eau .....	111

### CHAPITRE IV

<b>Tableau IV.1.</b> Propriétés physicochimiques des colorants ES et MC .....	117
<b>Tableau IV.2.</b> Composition du milieu de culture .....	120

### CHAPITRE V

<b>Tableau V.1.</b> Paramètres d'inhibition de croissance de <i>L.gibba</i> en présence des colorants MC et ES	143
<b>Tableau V.2.</b> Résultats de la régression linéaire teneur en pigment - concentration initiale de colorant.....	144
<b>Tableau V.3.</b> Efficacité d'élimination de MC et ES pour différentes concentrations initiales de colorant.....	149

### CHAPITRE VI

<b>Tableau VI.1.</b> Valeurs des paramètres de caractérisation des boues activées de la STEP d'Annaba	161
<b>Tableau VI.2.</b> Valeurs des matières sèches, pourcentages de développement microbien et indice de croissance des boues activées .....	163
<b>Tableau VI.3.</b> Pourcentage d'élimination et rendement de dégradation à la fin du traitement par les boues activées .....	166
<b>Tableau VI.4.</b> Estimation des valeurs de DCO, DBO <sub>5</sub> et coefficient de biodégradabilité K .....	167
<b>Tableau VI.5.</b> Pourcentage d'élimination et rendement de dégradation à la fin de traitement de biodégradation assistée par phytoremédiation des solutions glucosées .....	169
<b>Tableau VI.6.</b> Estimation des valeurs de DCO, DBO <sub>5</sub> et coefficient de biodégradabilité K .....	169
<b>Tableau VI.7.</b> Valeurs des matières sèches (MS), pourcentage de développement microbien (PDM) et indice de croissance (IC) des boues activées assistées par <i>L.gibba</i> .....	171
<b>Tableau VI.8.</b> Analyse EDX de <i>L.gibba</i> avant et après traitement des colorants par phytoremédiation	180
<b>Tableau VI.9.</b> Pourcentage d'élimination et rendement de biodégradation .....	184

## LISTES DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

**A** Absorbance ou densité optique (sans unité) de la solution

<b>ACE</b>	Acénaphène
<b>AND</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AFNOR</b>	Association Française de Normalisation
<b>ANT</b>	Anthracène
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BA</b>	Boues activées
<b>BaP</b>	Benzo(a)pyrène
<b>BbF</b>	Benzo(b)fluoranthène
<b>BkF</b>	Benzo(k)fluoranthène
<b>BPA</b>	Bisphénol A
<b>C</b>	La concentration de la substance absorbante ( $\text{mol/m}^3$ )
<b>C<sub>initial</sub></b>	Concentration initiale de colorant
<b>C<sub>final</sub></b>	Concentration finale de colorant
<b>C<sub>x + c</sub></b>	Caroténoïdes
<b>CBS</b>	Electron rétrodiffusé centré (Concentric BackScattered)
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentration efficace médiane
<b>CEE</b>	Directive européenne
<b>CI<sub>x</sub></b>	Concentration inhibant X% de la croissance d'une population d'être vivants
<b>Chl a</b>	Chlorophylles a
<b>Chl b</b>	Chlorophylles b
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentration létale
<b>CMEO</b>	Concentration minimale avec effets observables
<b>COV</b>	Composants organiques volatiles
<b>COT</b>	Carbone organique total
<b>CSEO</b>	concentration sans effet observé
<b>DBO</b>	Demande biochimique en oxygène
<b>DBO<sub>5</sub></b>	Demande biochimique en oxygène pendant 5 jours
<b>DCO</b>	Demande chimique en oxygène
<b>DCO<sub>initial</sub></b>	Demande chimique en oxygène avant le traitement biologique
<b>DCO<sub>final</sub></b>	Demande chimique en oxygène après le traitement biologique
<b>DFT</b>	Méthodes des fonctionnelles de la densité (Density Functional Theory)
<b>DL<sub>50</sub></b>	La dose létale

<b>EH</b>	Equivalent Habitant
<b>EPS</b>	Substances extracellulaires polymériques
<b>ERI</b>	Eaux résiduaires industrielles
<b>ES</b>	Ecarlate Solophényl BNLE
<b>ESI+</b>	Ioniseur positif à électrospray
<b>F</b>	Facteur de dilution
<b>Fe<sup>0</sup></b>	Fer à l'état de valence zéro
<b>FLU</b>	Fluoranthène
<b>FT-IR</b>	Spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier
<b>HAP</b>	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>I<sub>0</sub></b>	Intensité passe à travers une solution
<b>I</b>	Intensité de la lumière transmise
<b>IB</b>	Indice de boues
<b>IC</b>	Indice de croissance
<b>IM</b>	Indice de Mohlman
<b>ISO</b>	Organisation Internationale de Normalisation
<b>JORA</b>	Journal Officiel de la République Algérienne
<b>K</b>	Coefficient de biodégradabilité
<b>L</b>	La longueur du trajet optique ou épaisseur de la solution traversée (cm)
<b>LC/MS</b>	Chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse
<b>LOEC</b>	Lowest Observed Effect Concentration
<b>LiP</b>	Lignines peroxydases
<b>MC</b>	Marine Cibanone
<b>MEB-EDX</b>	Microscopie électronique à balayage couplé à une dispersion énergétique des rayons X
<b>MES</b>	Matières en suspension
<b>mgO<sub>2</sub>/L</b>	Milligramme d'oxygène par litre d'eau
<b>MMS</b>	Matières minérales
<b>MnP</b>	Manganèses peroxydases
<b>MO</b>	Matière organique
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>MS<sub>initial</sub></b>	Matières sèches mesurées avant traitement
<b>MS<sub>t</sub></b>	Matières sèches mesurées à la fin de traitement

<b>MVS</b>	Matières volatiles en suspension
<b>MVS</b>	Matières volatiles en suspension
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NAPH</b>	Naphtalène
<b>NOEC</b>	No Observed Effect Concentration
<b>OCDE</b>	Organisation Internationale de Coopération et de Développement Économique
<b>P<sub>1</sub></b>	La masse (g) de la coupelle et de l'échantillon de BA après séchage à 105 °C
<b>P<sub>2</sub></b>	La masse (g) de la coupelle vide
<b>P<sub>2</sub>'</b>	La masse (g) de la coupelle et de l'échantillon de BA après calcination à 550 °C
<b>P<sub>0</sub>'</b>	La masse (g) de la capsule pleine après séchage à 105 °C
<b>P<sub>0</sub></b>	La masse (g) de la capsule vide
<b>PDM</b>	Pourcentage de développement microbien
<b>PE %</b>	Pourcentage d'élimination
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>PHA</b>	Polymères (poly-β-alcanoates)
<b>POA</b>	Procédés d'oxydation avancée
<b>POPs</b>	Polluants organiques persistants
<b>REACH</b>	Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals
<b>RD (%)</b>	Rendement de biodégradation
<b>STEP</b>	Station d'épuration des eaux usées
<b>TEF</b>	Facteurs d'équivalence toxique (Toxic Equivalent Factor)
<b>tr/min</b>	Tour par minute
<b>TSS</b>	Matières solides totales
<b>UV-vis</b>	Spectroscopie UV-Visible
<b>V<sub>échantillon</sub></b>	Le volume de l'échantillon de boues actives (50 mL)
<b>V<sub>BL</sub></b>	Volume de sel de Mohr versé pour le blanc (mL)
<b>V<sub>e</sub></b>	Volume de sel de Mohr versé sur l'échantillon (mL)
<b>V<sub>0</sub></b>	Volume de l'essai avant dilution éventuelle (mL)
<b>W</b>	Watt
<b>λ/λ<sub>max</sub></b>	Longueur d'onde maximale
<b>λ</b>	Conductivité thermique
<b>μS/cm</b>	Micosiemens par centimètre
<b>N<sub>i</sub></b>	Coefficient stœchiométrique
<b>Mm</b>	Micromètre

$f^k_0$

Indice de Fukui

$q^N_0$

La population de charge atomique de l'atome K à l'état correspondant

## LISTES DES FORMULES CHIMIQUES

<b>As</b>	Arsenic
<b>B1</b>	Thiamine
<b>Ca/Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O</b>	Chlorure de calcium dihydrate
<b>Cd</b>	Cadmium
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chlorure
<b>Cl<sub>2</sub></b>	Dichlore
<b>Co /Co<sup>2+</sup></b>	Cobalt
<b>CO</b>	Monoxyde de carbone
<b>C=O</b>	Le groupe chromophore carbonyle
<b>CS<sub>2</sub></b>	Disulfure de carbone
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Cuivre
<b>CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O</b>	Sulfate de cuivre pentahydraté
<b>F</b>	Fluor
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Ions ferreux
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Ions ferriques
<b>FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	Sulfate de fer(II) heptahydraté
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HS<sup>-</sup></b>	Hydruure de soufre
<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	L'ion dihydrogénophosphate
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Acide sulfurique
<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfure d'hydrogène
<b>K<sup>+</sup></b>	Cation de potassium
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Nitrate de potassium
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Phosphate de potassium monobasique
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Hydrogénophosphate de potassium
<b>Mg/Mg<sup>+</sup></b>	Magnésium
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	Manganèse
<b>MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Molybdate
<b>Mo</b>	Molybdène
<b>MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O</b>	Sulfate de magnésium heptahydraté

<b>MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	Sulfate de manganèsemonohydrate
<b>Na/Na<sup>+</sup></b>	Sodium
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Azote nitreux (nitrites)
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Azote nitrique (nitrates)
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Azote organique (l'azote ammoniacal)
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>N<sub>2</sub>O</b>	Protoxyde d'azote
<b>N=N</b>	Groupe ment azoïque
<b>Ni<sup>+</sup></b>	Nickel
<b>NaOCl</b>	Hypochlorite de Sodium
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	Dithionite de sodium
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	Molybdate de sodium dihydrate
<b>NH<sub>3</sub></b>	Ammoniac
<b>NiSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	Sulfate de nickel(II) hexahydraté
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ion superoxide
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozone
<b>·OH</b>	Radical hydroxyle
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	Ion phosphate
<b>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	Ion thiosulfate
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Ion sulfate
<b>SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	Ion Trioxyde de sélénium
<b>Se</b>	Sélénium
<b>V</b>	Vanadium
<b>WO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	Ion tungstate
<b>Zn</b>	Zinc
<b>ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	Sulfate de zincheptahydrate

# التحلل البيولوجي بمساعدة المعالجة النباتية لأصبغ النسيج

## Marine Cibanone et Ecarlate Solophényl BNLE

### الملخص:

الهدف الرئيسي لمشروع أطروحتنا هو تنفيذ التحلل البيولوجي لأصبغ النسيج بمساعدة المعالجة النباتية. الملوثات المختارة لهذا الغرض هي Marine Cibanone (MC) et Ecarlate Solophényl BNLE (ES) تم الحصول عليها من مصنع صناعة النسيج بمدينة قسنطينة.

لتنفيذ الجيد لهذا المشروع قررنا في أول الأمر تطوير تجارب المعالجة النباتية لهذه الملوثات بواسطة النبات المائي *L.gibba* من أجل تحسين وإعطاء هذه العملية أفضل الشروط لإستخدامها في خطوة التحلل البيولوجي بواسطة الحمأة المنشطة بمساعدة المعالجة النباتية للطحلب البطي. حيث أن هذه العملية تسبقها خطوة التحلل البيولوجي بواسطة الحمأة المنشطة لوحدها.

أولاً، تجارب المعالجة النباتية للصبغين Marine Cibanone et Ecarlate Solophényl BNLE بواسطة *L.gibba* بدأت في أول الأمر بالتجارب الأولية المتعلقة بإختبارات السمية و التحمل للطحلب البطي *Lemna gibba* ضد صبغتي النسيج، بهدف تحديد في ظل ظروف تجريبية خاضعة للرقابة، عتبة السمية لهاتين الصبغتين من خلال مختلف الملاحظات اليومية لأعراض السمية المرئية، وكذلك حساب مختلف المعاملات المثبطة للنمو وهي: التركيز المثبط ل 50% من النمو ( $IC_{50}$ )، أدنى تركيز ذي تأثير مثبط (LOEC) والتركيز بدون تأثير ملحوظ (NOEC).

كذلك تم قياس محتوى الأصباغ الضوئية، الكلوروفيل أ (Cha) الكلوروفيل ب (Chb) و الكاروتينات ( $C_{x+c}$ ) من أجل قياس إستجابة *L.gibba* للإجهاد الناجم من كل صبغة.

نتائج هذه التجارب أوضحت أنه عند تراكيز الصبغة التي تزيد عن 50 ملغ/لتر الأعراض و الأضرار المرئية على الطحلب البطي (الإصفرار أو داء الاخضرار، تفرق السعف للنبتة المائية، و إنخفاض الكتلة الحيوية) ظهرت من اليوم الثاني من التعرض ل ES و من اليوم الثالث للتعرض ل MC. بالإضافة الى ذلك، أظهر الطحلب البطي علامات سمية أكثر عند تعرضه ل ES مقارنة بتعرضه ل MC بسبب سمية تلك الصبغة. إلا أن عند تراكيز أقل أو تساوي 50 ملغ/لتر، لم يظهر الطحلب البطي أي علامات أو أعراض سمية مرئية خلال فترة تعرض للصبغتين لمدة 4 أيام، على الرغم من هذه التراكيزات قللت بشكل معتبر من معدل نمو *L.gibba* و من مستويات الأصباغ الضوئية. وجد أيضاً، أن العلاقة بين محتوى الصبغة الضوئية و التركيز الأولي للصبغة علاقة خطية للغاية، حيث تراوحت معاملات التحديد من 0,938 الى 0,983.

أيضاً، أظهر تحديد المعاملات المثبطة للنمو، أن تركيز الصبغة الذي قلل من معدل نمو النبات بنسبة 50% ( $IC_{50}$ )، هو 36,3 ملغ/لتر ل (ES) و 26,9 ملغ/لتر ل (MC).

بالإضافة إلى ذلك، أظهرت هذه التجارب أن نباتات *L.gibba* يمكنها البقاء على قيد الحياة حتى تركيز 50 ملغ/لتر دون أي أعراض سمية، هذا التركيز المسوح به تم إختباره على أنه أقصى تركيز للصبغة في تجارب المعالجة النباتية التي سيتم تحقيقها.

إختبارات المعالجة النباتية هذه تم دراستها بهدف فحص قدرة النباتات المائية *Lemna gibba* على التخلص من الملوثين العضويين (MC) و (ES)، و كذلك لتحديد و توضيح آلية التخلص من هذه الأصباغ بواسطة النبات المائي من أجل فهم مختلف الظواهر المسؤولة عن هذه الإزالة.

أظهرت النتائج أنه في ظل الظروف المثلى لدرجة حرارة تساوي  $21 \pm 1$  درجة مئوية، فترة ضوئية تقدر ب 12 ساعة، درجة حموضة تقدر ب  $6,1 \pm 0,1$  و أقصى تركيز مسموح به للصبغة الذي يقدر 50 ملغ/لتر، أن النسبة المئوية لازالة الصبغتين تساوي 53% ل (MC) و 23% ل (ES).

تم إجراء مختلف التحليلات FT-IR, UV-Vis, و MEB على الكتلة الحيوية للنبات والسوائل قبل وبعد المعالجة النباتية، أشارت النتائج إلى أن وظائف الكحول والألكينوالفينول والحمض الأميني متورطة في التثبيت والإحتفاظ بالأصباغ داخل سطح الكتلة الحيوية دون إبراز ظاهرة التحلل النباتي.

علاوة على ذلك، أكد تحليل MEB هذه النتيجة التي توضح أن الفص البطني والجذر الرقيق لكل سعة (على عكس الفص الظهرى) يتم تلويهما عبر تفاعل مباشر مع جزيئات الصبغة مما يسمح بامتصاصها. وهكذا، سمح النبات الغازي *L.gibba* بإزالة الأصباغ العضوية من البيئات الملوثة بظاهرة التراكم النباتي التي تحدث على مرحلتين: المرحلة الأولى هي الإمتصاص الحيوي لجزيئات الصبغة على سطح الكتلة الحيوية بواسطة التجاذب الكهروستاتيكي والثاني هو تراكم الملوثين في الكتلة الحيوية لـ *L.gibba* والتي تنتقل داخل هذه الخلايا النباتية دون أي تحلل نباتي.

كما وجد أن هذه العملية البيولوجية قد تأثرت بجرعة الكتلة الحيوية النباتية والتركيز الأولي للصبغة. وفقاً للنتائج المختلفة، فإن الكمية المثلثة للنباتات هي 20 و 40 سعة بكفاءة إزالة 53 و 23% لـ (MC) و (ES) على التوالي، لدرجة حرارة تساوي  $21 \pm 1$  درجة مئوية، درجة حموضة تساوي  $6,1 \pm 0,1$  وتركيز صبغة يساوي 50 ملغ / لتر لمدة معالجة تقدر ب 7 أيام. كما وجد أن نسب الإزالة تتناقص مع زيادة التركيز الأولي للصبغتين. أفضل فعالية تحققت هي 75 و 30% تم الحصول عليها لـ 10 ملغ / لتر من (MC) و (ES) علنا التوالي. ومع ذلك، تنخفض هذه الكفاءة للتركيزات الأعلى (20-50 ملغ/لتر). في المرة الثانية، أجرينا إختبارات التحلل بيولوجي بواسطة الحمأة المنشطة لمحطة معالجة مياه الصرف الصحي لولاية عنابة بمساعدة المعالجة النباتية لعشب البطي *L.gibba* للصبغتين. لقد أجرينا معالجة وإزالة الصبغتين من خلال عملية معالجة خضراء تجمع بين النشاط الميكروبي للحمأة المنشطة و قدرة المعالجة النباتية للنباتات المائية.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المزيج بين المواد الحيوية عند وجود الملوث بتركيز 50 ملغ/لتر، يؤدي إلى إزالة الصبغة بنسبة 95% مقابل 70% لـ (MC) و (ES) على التوالي.

مؤشر التحلل البيولوجي المحسوب على أساس قياسات DCO و  $DBO_5$  يساوي 3,1 لـ (ES) و 2,0 لـ (MC)، وهذا أظهر أن الصبغة (ES) قد تم التخلص منها عن طريق ظاهرة الإمتصاص الحيوي، على غرار (MC) التي تحولت الى مركبات قابلة للتحلل.

التحليل FT-IR, UV-Vis, و LC/MC تم استخدامها كأداة لرصد مستقبلات التحلل البيولوجي و أظهرت النتائج أن التحلل البيولوجي لـ (MC) يحدث من خلال إنقسام حلقة anthraquinone و تحويل المركبات العطرية لسلسلة الهيدروكربونات الخفيفة، و قد تم تأكيد ذلك من خلال حساب مؤشر Fukui باستخدام طريقة نظرية الكثافة الوظيفية (DFT). وكذلك المنتجات الثانوية للتحلل الحيوي لـ (MC) أظهرت سمية منخفضة بالنسبة لـ *Lemna gibba* أثناء تقييم سميتها.

سلطت هذه الدراسة الضوء على التأزر بين عملية المعالجة النباتية و التحلل البيولوجي لإزالة الملوثات العضوية.

**كلمات مفتاحية:** إختبار السمية، المعالجة بالنباتات، التراكم النباتي، التحلل البيولوجي *Lemna gibba* L، الحمأة المنشطة، الملوثات العضوية، صبغة النسيج.

## ***Biodégradation assistée par phytoremédiation des colorants textiles Marine Cibanone et Ecarlate Solophényl BNLE***

### **Résumé :**

L'objectif principal de notre projet de thèse est la mise en œuvre de la biodégradation de colorants textiles assistée par la phytoremédiation. Les polluants sélectionnés à cet effet sont le Marine Cibanone (MC) et l'Ecarlate Solophényl BNLE (ES), procurés de l'industrie textile de la ville de Constantine. Pour mener à bien ce projet, nous avons décidé dans un premier temps d'élaborer des essais de phytoremédiation de ces polluants par la plante aquatique *L. gibba* afin d'optimiser ce procédé et l'utiliser dans l'étape de la biodégradation par les boues activées assistée par phytoremédiation des lentilles d'eau. Celle-ci est bien évidemment précédée de l'étape de biodégradation par les boues activées seules.

En premier temps, les expériences de phytoremédiation des deux colorants Marine Cibanone et Ecarlate Solophényl BNLE par *L. gibba* ont commencé par les essais préliminaires relatives aux tests de toxicité de tolérance des lentilles d'eau *Lemna gibba* L, pour déterminer le seuil de toxicité de ces deux colorants à partir des observations visuels des symptômes de toxicité, afin de calculer les différents paramètres inhibiteurs de croissance à savoir, la concentration inhibant 50% de la croissance ( $IC_{50}$ ), la concentration minimale ayant un effet inhibiteur LOEC (CME0) et la concentration sans effet observé NOEC (CSEO). Nous avons aussi mesuré la teneur en pigments photosynthétiques ; Chlorophylle a (Chl a), Chlorophylle b (Chl b) et Caroténoïdes (Cx+c) afin de mesurer la réponse de *L. gibba* au stress induit par chaque colorant.

Les résultats de ces expériences ont montré qu'à des concentrations de colorant supérieure à 50 mg/L, des symptômes et des dommages visibles sur la lentille d'eau (chlorose, dislocation des frondes et diminution de biomasse) sont apparus dès le deuxième jour d'exposition pour (ES) et dès le troisième jour d'exposition pour (MC). De plus, les lentilles d'eau ont présenté plus de signes de toxicité avec (ES) qu'avec (MC) en raison de la toxicité de ce colorant. Cependant, à des concentrations de colorant inférieure ou égale à 50 mg/L, la lentille d'eau n'a montré aucun signe visible de toxicité pendant un temps d'exposition de 4 jours, bien que ces concentrations aient significativement réduit le taux de croissance de *L. gibba* et ses niveaux de pigment photosynthétique. La relation entre la teneur en pigment et la concentration initiale de colorant s'est avérée très linéaire, avec des coefficients de détermination variant de 0,938 à 0,983. Aussi, la détermination des paramètres inhibiteurs de croissance, ont montré que la concentration de colorant

qui a réduit le taux de croissance de la plante de 50% (CI<sub>50</sub>) était de 36,3 mg/L pour le (ES) et de 26,9 mg/L pour le (MC).

De plus, ces expériences ont montré que les plantes de *L.gibba* peuvent survivre jusqu'à une concentration de 50 mg/L sans aucun symptôme de toxicité, cette concentration tolérée est choisie comme étant la concentration maximale de colorant à laquelle les essais de phytoremédiation seront élaborés.

Ces essais de phytoremédiation ont été étudiés dans le but d'examiner la capacité des macrophytes aquatiques *Lemna gibba*, à éliminer les deux polluants organiques, à savoir (MC) et (ES), et aussi d'identification et élucider le mécanisme d'élimination de ces colorants par cette plante aquatique afin de comprendre les différents phénomènes responsables de cette l'élimination.

Les résultats ont montré qu'aux conditions optimales de température égale à  $21 \pm 1$  °C, une photopériode de 12 h, un pH de  $6,1 \pm 0,1$  et une concentration maximale de colorant tolérée de 50 mg/L, le pourcentage d'élimination des colorants était égale à 53% pour (MC) et 23% pour (ES).

Les différentes analyses effectuées UV-vis, FT-IR, et MEB ont été menées sur la biomasse végétale et les phases liquides avant et après le traitement de phytoremédiation, les résultats ont indiqué que les fonctions alcool, alcène, phénol et amine sont impliquées dans la fixation et la rétention des colorants à l'intérieur de surface de la biomasse sans mettre en évidence de phénomène de phytodégradation.

De plus, l'analyse MEB a confirmé ce résultat montrant que le lobe ventral et la fine racine de chaque fronde (contrairement au lobe dorsal) sont colorés via une interaction directe avec les molécules de colorant permettant leur absorption. Ainsi, la plante envahissante, *L.gibba* a permis d'éliminer les colorants organiques des milieux contaminés par un phénomène de phytoaccumulation qui se déroule en deux étapes: la première étape est la biosorption des molécules de colorant à la surface de la biomasse par une attraction électrostatique et la seconde est l'accumulation des deux polluants dans la biomasse de *L.gibba* qui se transfère à l'intérieur de ces cellules végétale, sans aucune phytodégradation.

Aussi, Il a été constaté que ce processus biologique était influencé par la dose de biomasse végétale et la concentration initiale de colorant. D'après les différents résultats, la quantité optimale de plantes est de 20 et 40 frondes avec une efficacité d'élimination de 53 et 23% pour (MC) et (ES), respectivement pour une température égale à  $T = 21 \pm 1$ °C, un pH égal à  $6,1 \pm 0,1$  et une concentration des colorantes égale à 50 mg/L pour un temps de traitement de 7 jours. Aussi, on constate que les pourcentages d'élimination diminuent avec l'augmentation de la concentration initiale des deux colorantes. La meilleure efficacité atteinte est de 75 et 30% obtenue pour 10 mg/L

de (MC) et (ES), respectivement. Cependant, cette efficacité diminue pour des concentrations plus élevée (20-50 mg/L).

En deuxième temps, on a effectué les essais de biodégradation par les boues activées de la STEP d'Annaba assistée par la phytoremédiation des lentilles d'eau *L.gibba* des deux colorants. Nous avons effectué le traitement et l'élimination des deux colorants par un processus vert qui combine l'activité microbienne des boues activées avec la capacité de phytoremédiation de la plante aquatique.

Les résultats obtenus ont montré que la combinaison des deux biomatériaux lorsque le polluant était présent à une concentration de 50 mg/L, conduit à une élimination plus élevée du colorant de 95 % contre 70% pour (MC) et (ES) respectivement. L'indice de biodégradabilité calculé sur la base des mesures de DCO et DBO<sub>5</sub> était égal à 3,1 pour (ES) et à 2,0 pour (MC), ceci a montré que le colorant (ES) a été éliminé par des phénomènes de biosorption, à l'instar de (MC) qui a été transformé en composés biodégradables. L'analyse UV-visible, FTIR et LC/MS a été utilisée comme outil de surveillance des métabolites de la biodégradation et les résultats ont montré que la biodégradation du (MC) se produit par le clivage du cycle de l'anthraquinone et la transformation des composés aromatiques en chaîne hydrocarbonée légère, et cela a été confirmé par le calcul de l'indice de Fukui à l'aide de la méthode Density Functional Theory (DFT). Ainsi, les sous produits de la biodégradation de (MC) ont présenté une faible toxicité vis-à-vis de *Lemna gibba* lors de l'évaluation de leur toxicité. Cette étude a mis en évidence la synergie entre le processus de phytoremédiation et de biodégradation pour l'élimination des polluants organiques.

**Mots clés :** Test de toxicité, Phytoremédiation, Phytoaccumulation, Biodégradation, *Lemna gibba* L, Boues activées, polluants organiques, Colorant textile.

## ***Phytoremediation-assisted biodegradation of Marine Cibacron and Ecarlate Solophenyl BNLE textile dyes***

### **Abstract :**

The main objective of this thesis is the combination of two biological processes for the biodegradation of textile dyes. The pollutants selected for this purpose were Marine Cibacron (MC) and Ecarlate Solophenyl BNLE (ES), procured from the textile industry of the city of Constantine. To carry out this project, we first decided to develop phytoremediation trials of these pollutants by the aquatic plant *L.gibba* in order to optimize this process and use it in the biodegradation step by activated sludge assisted by phytoremediation of duckweed. This is obviously preceded by the step of biodegradation by activated sludge alone.

First, the phytoremediation experiments of the two dyes by *L.gibba* began with preliminary trials relating to the toxicity and tolerance tests of *Lemna gibba* L duckweed. This was done in order to determine under controlled experimental conditions, the toxicity threshold of these two dyes based on daily observation of the visual toxicity symptoms, and to calculate the different growth inhibiting parameters namely, the 50% growth inhibiting concentration (IC<sub>50</sub>), the lowest inhibitory effect concentration LOEC (LOEC) and the NOEC no observed effect concentration (NOEC). Furthermore, we measure the content of photosynthetic pigment; Chlorophyll a (Chl a), Chlorophyll b (Chl b) and Carotenoids (Cx+c) in order to measure the response of *L.gibba* to the stress induced by each dye.

The results of these experiments showed that at dye concentrations greater than 50 mg/L, symptoms and visible damage of the duckweed (chlorosis, dislocation of the fronds and reduction in biomass) appeared from the second day of exposure for (ES) and from the third day of exposure for (MC). In addition, duckweed showed more signs of toxicity with (ES) than with (MC) due to the toxicity of this dye. However, at dye concentrations less than or equal to 50 mg/L, the duckweed showed no visible signs of toxicity during the exposure time (4 days), although these concentrations significantly reduced the rate of growth of *L.gibba* and its photosynthetic pigment levels. The relationship between pigment content and initial dye concentration was found to be very linear, with coefficients of determination ranging from 0.938 to 0.983. The determination of the growth inhibitory parameters showed that the concentration of dye which reduced the growth rate of the plant by 50% (IC<sub>50</sub>) was 36.3 mg/L for the (ES) and 26.9 mg/L for (MC). Additionally, these experiments showed that *L.gibba* plants can survive up to a concentration of 50 mg/L without any symptoms of toxicity, which was chosen as the maximum dye concentration at which

phytoremediation trials will be developed. These phytoremediation tests were studied with the aim of examining the ability of aquatic macrophytes *Lemna gibba*, to eliminate the two organic pollutants, namely (MC) and (ES), and also to identify and elucidate the mechanism of elimination, of these dyes by this aquatic plant in order to understand the different phenomena responsible for this elimination.

The results showed that at a temperature equal to  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , a photoperiod of 12 h, a pH of  $6.1 \pm 0.1$  and a maximum tolerated dye concentration of 50 mg/L, the percentage dye removal was 53% for (MC) and 23% for (ES).

Various analyzes such as FT-IR, UV-vis and SEM was used on the plant biomass and the treated liquid phases before and after the phytoremediation treatment, the results indicated that the alcohol, alkene, phenol and amine functions are involved in the fixing of the dyes inside the surface of the biomass instead of phytodegradation phenomena. Moreover, SEM analysis confirmed this result showing that the ventral lobe and the thin root of each frond (unlike the dorsal lobe) were colored via a direct interaction with the dye molecules allowing their absorption. Thus, the invasive plant, *L.gibba*, made it possible to eliminate organic dyes from contaminated media by a phenomenon of phytoaccumulation which takes place in two stages. The first stage is the biosorption of dye molecules on the surface of the biomass by electrostatic attraction and the second is the accumulation of the two pollutants in the biomass of *L.gibba* which is transferred inside these plant cells, without any phytodegradation. Also, it was found that this biological process was influenced by the dose of plant biomass and the initial dye concentration. According to the different results, the optimal quantity of plants was 20 and 40 fronds with an elimination efficiency of 53 and 23% for (MC) and (ES), respectively at temperature equal to  $T = 21 \pm 1^\circ\text{C}$ , a pH equal to  $6.1 \pm 0.1$  and a dye concentration equal to 50 mg/L for a treatment time of 7 days. Also, it is found that the percentages of elimination decrease with the increase in the initial concentration of the two dyes. The best efficacy achieved was 75 and 30% obtained for 10 mg/L of (MC) and (ES), respectively. However, this efficiency decreases for higher concentrations (20-50 mg/L).

The second objective was the biodegradation tests by the activated sludge of the Annaba STEP assisted with the phytoremediation of the *L.gibba* duckweed, to investigate the synergetic effect of the microbial activity of the activated sludge with the phytoremediation capacity of the aquatic plant. The results obtained showed that the combination of the two biomaterials when the pollutant was present at a concentration of 50 mg/L, leads to a higher elimination of the dye of 95% against 70% for (MC) and (ES) respectively. The biodegradability index was calculated on the basis of COD and BOD<sub>5</sub> measurements and was equal to 3.1 for (ES) and 2.0 for (MC), this showed that the dye (ES) was eliminated by biosorption phenomena. At the opposite of (MC) that has been

transformed into biodegradable compounds. UV-visible, FTIR and LC/MS analysis was used as a tool for monitoring biodegradation metabolites and the results showed that biodegradation of (MC) occurs through the anthraquinone ring cleavage and transformation hydrocarbon light chain aromatic compounds, and this was confirmed by calculating the Fukui index using the Density Functional Theory (DFT) method.

The obtained by-products of the biodegradation of (MC) showed low toxicity towards *Lemna gibba* during the evaluation of their toxicity. This study highlighted the synergy between the process of phytoremediation and biodegradation for the removal of organic pollutants.

**Keywords :** Toxicity test, Phytoremediation, Phytoaccumulation, Biodegradation, *Lemna gibba* L, Activated sludge, Organic pollutants, Textile dyes.

## **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

L'augmentation des activités industrielles, urbaines et agricoles avec le développement démographique engendrent une pression importante sur notre environnement et sur les réserves en eau douce de la planète ce qui provoque un problème mondial dont les aspects et la portée sont évidemment différents selon le niveau de développement des pays (**Guergour 2014**). En effet, ces activités génèrent des effluents liquides non désirables voire toxiques chargés de polluants organiques et inorganiques qui se déversent dans les rivières, les mers, les nappes phréatiques et les lacs, etc...sans traitement ou à un niveau de traitement insuffisant, entraînant une menace pour la santé humaine et animale. Ce déversement entraîne une dégradation de la qualité des sources en eau particulièrement l'eau potable et met en péril le fragile équilibre naturel qui a permis à la vie de se développer sur la planète-terre (**Bengrine 2011**). Dans ce cas, il est important dans un premier temps d'évaluer les risques dus à la présence des substances chimiques nocives afin de pouvoir dans un deuxième temps éliminer le potentiel de perturbation environnementale causé par ces substances, ceci nécessite l'intégration de différentes compétences dans le domaine de l'environnement et de réaliser des travaux de recherche en sciences environnementales pour la mise en œuvre de procédés innovants pour le traitement de ces effluents chargés en polluants (**Bouyarmane 2014**).

A l'échelle mondiale, la dépollution des eaux et la valorisation des résidus industriels sont des objectifs économiques majeurs pour tous les pays qui sont concernés par la sauvegarde des ressources en eau douce, soit parce qu'ils manquent d'eau, ou bien parce qu'ils la polluent (**Bengrine 2011**). Cette disparité entre les besoins et la disponibilité de l'eau demande de la protéger pour pouvoir fournir la quantité nécessaire à la consommation domestique et industrielle. Celle-ci se fait soit par le recyclage des eaux polluées, soit par la limitation des rejets dans le milieu naturel, ce qui nécessite d'imaginer de nouveaux moyens de traitement pour augmenter la disponibilité des ressources en eaux. Malgré les efforts considérables investis dans le traitement des eaux usées, malheureusement on estime qu'encore à l'heure actuelle, une bonne quantité de rejets liquides est acheminée vers des stations d'épuration, le reste étant évacué dans le milieu naturel sans traitement, ceci s'aggrave par l'absence d'une politique législative et normative claire ou un système adéquat de traitement des effluents industriels capable de réduire la concentration des polluants rejetés dans l'environnement. Face à cette situation préoccupante, mieux produire et moins polluer sont les défis auxquels sont confrontés les industriels de tout secteur

(chimie, pétrochimie, métallurgie, agro-alimentaire, textile, papeterie, tannerie etc...). Ceci motive ces industries à chercher des investigations nouvelles pour la mise au point de procédés spécifiques de traitement de plus en plus perfectionnés pour ces polluants (**Hammami 2008**). Parmi ces polluants, on retrouve les pesticides, les hydrocarbures, les détergents, les produits pharmaceutiques et les colorants qui posent de sérieux problèmes environnementaux dont la toxicité qui est liée à la présence de longues chaînes de composés organiques partiellement biodégradables qui ne peuvent pas être traités par les méthodes traditionnelles de dépollution. C'est le cas par exemple des colorants qui sont caractérisés par de fortes colorations, de fortes variations de pH (soit basique, soit acide), et de fortes demandes chimiques et biologique en oxygène (DCO, DBO)(**Walker and Weatherley 2001**), et qui se trouvent dans les effluents de nombreuses unités industrielles, telles que les industries chimiques, agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, peinture, papeterie et du textile au cours des opérations d'impression, de teinture et de finissage. Ces colorants sont fréquemment rencontrés dans les rivières, les eaux marines, les effluents urbains et même dans les nappes phréatiques. De plus, il a été estimé que  $28.10^4$  tonnes de colorants textiles sont rejetées annuellement dans l'environnement (**Ali 2010**), ce qui engendre des problèmes d'eutrophisation et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique et par conséquent présente un danger potentiel de bioaccumulation qui peut affecter l'homme par transport à travers la chaîne alimentaire (**Chowdhury et al. 2009**). La plus grande partie de ces colorants est employée dans l'industrie textile qui utilise particulièrement des colorants azoïques et anthraquinoniques (65-75% des colorants) (**Carmen and Daniela 2012**).

Il est donc nécessaire d'éliminer ces composés indésirables avant leurs rejets dans les écosystèmes naturels ; ceci peut être assuré dans certains procédés biologiques par le clivage des groupements chromophores ou par la transformation des cycles aromatiques (**Kodam and Kolekar 2015**). Actuellement, les procédés de traitement des eaux chargées par ces colorants sont soit physicochimiques, biologiques ou la combinaison des deux. De façon générale, les traitements physicochimiques peuvent être efficaces, mais peuvent malheureusement conduire dans la plupart des cas à des produits chargés de substances chimiques vulnérables à l'environnement ; aussi, leurs coûts onéreux du fait de l'utilisation excessive de produits chimiques et des besoins énergétiques élevés limite leurs utilisations. Les traitements biologiques sont préférés aux premiers car ils sont simples, fiables, respectueux de l'environnement et sont rentables pour le traitement des eaux usées. Ces procédés biologiques reposent d'une part, sur le processus de bioremédiation, dont le

principal exemple est le traitement des eaux usées par les microorganismes (contenus dans les boues activées des STEP, par exemple) qui utilisent les polluants organiques et l'oxygène comme source d'énergie, pour survivre et épurer ces eaux avant leur rejet. D'autre part, ces méthodes reposent sur les procédés de phytoremédiation qui consistent à utiliser la capacité de plantes (plantes aquatiques par exemple) pour dépolluer les eaux usées avec un grand potentiel. Ces plantes sont susceptibles de dégrader, accumuler, restaurer ou concentrer les polluants dans leurs différentes parties (feuilles, tiges et racines).

Néanmoins, certaines études ont montré que la bioremédiation basée sur le traitement aérobie est capable de dégrader les colorants textiles, en particulier les colorants azoïques et anthraquinoniques avec un temps de traitement allant jusqu'à dix jours ; de plus, l'élimination n'est pas totale pour la plupart des colorants textiles (**Khellaf et al. 2018**). Il serait donc intéressant voire nécessaire de réduire le temps de traitement tout en améliorant l'efficacité du procédé. C'est ce qui a motivé de nombreux chercheurs à orienter leurs travaux vers le couplage des procédés qui se sont avérés très intéressants du point de vue économique et environnemental. Ce couplage se fait soit par la combinaison d'un procédé physicochimique et un procédé biologique, soit de deux procédés biologiques (bioremédiation et phytoremédiation). Ces derniers, en raison des exigences actuelles académiques et industrielles, sont de plus en plus considérés comme les thèmes de recherche les plus étudiés. Dans l'objectif de contribuer au développement de cet axe de recherche, la présente étude porte sur l'utilisation des microorganismes présents dans les boues activées de la STEP de Annaba et des plantes aquatiques de type lentilles d'eau afin d'éliminer deux colorants textiles présents en phase liquide. Il s'agit des colorants Marine Cibanone (MC) et Ecarlate Solophényl BNLE (ES) procurés par l'entreprise de textile implantée dans la ville de Constantine (Est algérien). L'espèce de lentilles d'eau sélectionnée est *L.gibba* repiquée de mares présentes dans la ville d'El-Tarf (Est algérien). Cette espèce a déjà fait l'objet de nombreux travaux de recherche de phytoremédiation et de biosorption au sein de notre établissement universitaire.

Ainsi, le présent manuscrit est composé de six chapitres : Un aperçu bibliographique constitué des premier, deuxième et troisième chapitres consacrés aux travaux de recherche sur la pollution des eaux par les composés organiques et les procédés des traitements biologiques.

- Le premier chapitre présente les différents polluants organiques et leurs effets sur l'homme, la faune et la flore ; nous expliquons aussi les différentes techniques de dépollution adaptées aux effluents chargés de colorants synthétiques ;
- Le deuxième chapitre de cette thèse décrit le traitement de la pollution organique par les boues activées, son principe et la description du principe de fonctionnement de ce procédé ;
- Enfin, le troisième chapitre présente le principe de la phytoremédiation, ses techniques et mécanismes et quelques espèces aquatiques utilisées.

La partie expérimentale du manuscrit est exposée dans les trois derniers chapitres, où nous présentons dans le quatrième chapitre le matériel et les dispositifs utilisés dans les différents protocoles, nous passons en revue aussi les différentes techniques d'analyse utilisées dans le présent travail. Les deux derniers chapitres sont consacrés aux résultats et interprétation des essais de phytoremédiation des deux colorants par la plante aquatique *L.gibba*, et des essais de la biodégradation assistée par phytoremédiation de ces polluants.

Finalement, notre thèse se termine par une conclusion générale et des perspectives dans lesquelles nous soulignons la performance des méthodes de couplages biologique *vis-à-vis* de l'élimination de certaines substances indésirables et nocives contenues dans les effluents aqueux. Les annexes, placées à la fin du manuscrit, regroupent des éléments complémentaires qui peuvent apporter un éclairage plus précis sur certains points succinctement abordés dans le texte principal.

**CHAPITRE I : *POLLUTION DES EAUX PAR LES  
COMPOSES ORGANIQUES-CAS PARTICULIER  
DES COLORANTS TEXTILES***

# **CHAPITRE I : Pollution des eaux par les composés organiques-**

## **Cas particulier des colorants textiles**

### **I.1. Introduction**

Avec le développement rapide de l'industrie moderne, la pollution de l'environnement générée par les activités anthropiques est devenue de plus en plus grave, où de nombreux déchets industriels produits accidentellement ou volontairement, ont cruellement pollué le milieu naturel et particulièrement les ressources en eaux. Ces dernières sont affectés par différents polluants organiques résultant de l'utilisation intensive de fertilisants, pesticides, produits sanitaires, produits pharmaceutiques et colorants textiles ; ces contaminants présentent en général un caractère toxique et représentent une menace perturbante *vis-à-vis* de l'homme et la biodiversité dans plusieurs pays du monde (**Khataee et al. 2012**). Aujourd'hui face à une sensibilisation mondiale, et plus particulièrement dans le cadre de la politique communautaire, les rejets sont étroitement contrôlés, contingentés et soumis à des réglementations de plus en plus sévères. Les décideurs industriels sont amenés à sélectionner des techniques d'analyse et de dépollution adéquates pour satisfaire en permanence aux évolutions réglementaires existantes et s'engager dans le cycle d'amélioration continue et de prévention de la pollution et du risque technologique ainsi que la mise au point des procédés efficaces de traitement des eaux usées et effluents industriels, qui visent à réduire le pouvoir toxique de ces polluants (**Merouani 2011, Harrlekas 2008**). Ces procédés peuvent prendre différentes formes : processus physique, thermique, chimique ou biologique, tous précédés de préférence par le tri.

Dans ce chapitre, nous présentons des généralités sur les différents types de polluants organiques et leurs effets sur l'homme, la faune et la flore, ainsi que la caractérisation des effluents industriels et normes de rejets, en définissant plus particulièrement la caractérisation des effluents de l'industrie textile (faisant partie des objectifs de cette thèse) et leurs impacts sur l'environnement et les êtres vivants. Nous passons donc en revue les différentes techniques de dépollution adaptées aux effluents chargés de colorants synthétiques en ciblant en particulier les colorants azoïques et anthraquinoniques.

### **I.2. Différents types de polluants organiques**

Les polluants organiques sont nombreux et dangereux, car ils ont un caractère cancérogène ou mutagène, d'où l'importance de les éliminer. Ils sont notamment issus des effluents

domestiques (déjections animales et humaines, graisses, détergents, produits de jardinage etc.), urbains (restes d'aliments, produits pharmaceutiques, lessives, insecticides etc.), agricoles (engrais minéraux, déjections animales, pesticides et produits phytosanitaires etc.) mais surtout des rejets industriels (hydrocarbures, matières colorantes, produits chimiques divers, etc.)(**Benhacine 2017**).

La pollution organique est évaluée et est caractérisée par : la demande chimique en oxygène (DCO), qui représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder toute la matière organique et minérales contenue dans une eau, la demande biochimique en oxygène (DBO), qui exprime la quantité d'oxygène consommée par les microorganismes du milieu pour oxyder les matières organiques biodégradables contenues dans l'eau à 20 °C et à l'obscurité, le carbone organique total (COT), qui représente la teneur en carbone lié à la matière organique, et les matières en suspension (MES) qui sont des particules minérales ou organiques qui contribuent à la turbidité de l'eau (**Hamidou 2008**).

Cette pollution peut être absorbée par le milieu récepteur tant que la limite d'auto épuration n'est pas atteinte. Au-delà de cette limite, la respiration de divers organismes aquatiques peut être compromise au profit de la dégradation de cette matière organique (**Metahri 2012**). D'après des études et des recherches réalisées, il existe trois types de pollution organique (**Salhi 2015**) :

✓ **Pollutions organiques facilement biodégradables**: Il s'agit de matières organiques provenant d'activités biologiques (matières fécales et urines, déchets d'élevage et des industries agroalimentaires, feuilles, plantes et animaux morts). La nuisance qui en résulte est due aux germes pathogènes que peut contenir ces matières organiques ou due à une forte concentration de ces déchets qui inhiberont le phénomène d'auto épuration naturelle.

✓ **Pollutions organiques difficilement biodégradables**: Elles proviennent d'activités comme la fabrication de pâte à papier, de textiles, de cuir ainsi que les détergents. Leurs nocivités résultent de leur accumulation dans l'environnement suite à la dégradation lente de ce type de pollution par le milieu naturel, ainsi que la diminution de la capacité d'oxygénation du cours d'eau qui est due à la production des mousses par différents types de détergents.

✓ **Pollutions organiques toxiques**: Elles proviennent des industries pétrochimiques et des raffineries qui rejettent dans leurs effluents des quantités importantes de phénols et d'hydrocarbures, ainsi que certains types de pesticides utilisés en agriculture. Ils sont nuisibles pour la faune aquatique et peuvent atteindre l'homme par accumulation dans la chaîne alimentaire.

Cette pollution organique provoque l'appauvrissement en oxygène des milieux aquatiques, avec des effets bien évidents sur la survie de la faune et peut provoquer l'asphyxie des espèces animales. A l'inverse des matières en suspension (MES), elles constituent une nourriture de choix pour les microorganismes de l'eau et provoquent leur prolifération. Les matières organiques se mettent alors à vider le milieu de son oxygène, ce qui s'avère fatal pour la vie aquatique (**Hberra 2014**).

### **I.2.1. Pesticides et produits phytosanitaires**

Ce sont des substances chimiques minérales ou organiques, synthétiques ou naturelles, qui sont utilisés en agriculture dans la lutte contre les ennemis des végétaux. On les trouve dans différentes familles caractéristiques à savoir : les herbicides qui sont destinés à éliminer les végétaux entrant en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance, les fongicides qui permettent quant à eux de combattre la prolifération des maladies des plantes provoquées par des champignons ou encore des bactéries, et les insecticides qui sont utilisés pour la protection des plantes contre les insectes ; ils interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction (**Dahane 2015**). Lors de l'application, les pesticides se retrouvent en partie dans l'air, l'eau et les sols où ils persistent plus ou moins longtemps selon la nature du produit et les conditions du milieu naturel, et provoquer d'importantes perturbations sur les écosystèmes et sur l'homme. Particulièrement, les pesticides peuvent contaminer tant des eaux souterraines que les eaux de surface, cette dernière peut être contaminée directement au cours d'une pulvérisation au-dessus d'un cours d'eau, d'une rivière, ou par ruissellement ou par le vent (dépôt des particules transportées en raison de la diminution de la vitesse du vent) (**Gilden et al. 2010**). Par contre les eaux souterraines (nappes phréatiques et aquifères) peuvent être affectées par le phénomène de lessivage (**El-Wakeil 2013**). Dans ce cas lorsque l'eau est contaminée, elle devient toxique pour les humains, la faune (terrestre et aquatique), les animaux domestiques et les plantes, y compris les cultures vulnérables. Cependant, il est très coûteux, de décontaminer l'eau souterraine et l'eau de surface.

### **I.2.2. Hydrocarbures**

Les hydrocarbures sont des composés d'atomes de carbone et d'hydrogène. C'est une forme d'énergie fossile (carbone), ce qui fait de lui une ressource énergétique assez importante pour l'économie des pays, notamment pour alimenter certaines industries et certains secteurs professionnels. Ils peuvent induire des pollutions accidentelles plus ou

moins massives (les marées noires) et des pollutions opérationnelles plus ou moins fréquentes (déballastages ou dégazages). Ainsi, le trafic maritime mondial représente le facteur unitaire le plus important de pollutions occasionnelles par les hydrocarbures. La protection du milieu marin et la prévention des pollutions sont des enjeux importants de l'action publique. De ce fait, les autorités s'interrogent sur le devenir de ces polluants dans l'environnement, ainsi que sur leurs toxicités au niveau des écosystèmes touchés. En effet, ces polluants produisent des stress environnementaux capables d'induire des déstabilisations importantes chez certains organismes voire leur mort en cas d'arrivages massifs, développement des maladies cardio-vasculaires et de l'asthme, renforcement de l'effet de serre, érosion des sols, et dégradation des écosystèmes (Nilles 2008).

### **I.2.3. Détergents**

Les détergents ont beaucoup attiré l'attention aux différents pays en raison de divers problèmes de pollution de l'eau qu'ils peuvent causer. Dans son sens le plus large, le mot détergent, désigne tout ce qui se comporte comme un agent de nettoyage. En conséquence, un détergent est maintenant considéré comme un agent de nettoyage qui inclut dans sa formulation un tensioactif pétrochimique ou un autre tensioactif dérivé de synthèse.

Les formulations détergentes commerciales contiennent généralement un ou plusieurs tensioactifs, ou des agents de surface, et un certain nombre d'additifs. Le tensioactif remplit au moins deux fonctions, il diminue la tension superficielle du liquide dans lequel il est dissous et forme une émulsion ou une suspension stabilisée avec les particules à éliminer. Les adjuvants retiennent les ions de l'eau dure tels que le calcium ou le magnésium et, en outre, réagissent avec l'eau pour former une solution alcaline dans laquelle les tensioactifs sont les plus efficaces en tant que nettoyeurs. En plus des tensioactifs et des adjuvants, un détergent peut également contenir des ingrédients blanchissants et éclaircissants. D'autres constituants (enzymes, inhibiteurs de corrosion, parfum, etc...) peuvent également être inclus pour fournir des propriétés supplémentaires souhaitables.

Les tensioactifs et les adjuvants de formulations de détergents ont été tous deux impliqués dans la pollution de l'eau. À la fin des années 1950 et au début des années 1960, un certain nombre de produits liés aux détergents ont causé des problèmes en milieu aqueux. Ces problèmes ont été attribués au faible taux de biodégradation des tensioactifs utilisés à cette époque ; il a été constaté que ces tensioactifs persistants interféraient avec les processus de traitement des déchets en stabilisant les petites particules dans les suspensions colloïdales et en réduisant l'activité des lits de filtres biologiques et des boues activées. En

outre, il a été généralement constaté que les eaux usées étaient recouvertes d'un énorme bouchon de mousse dans les zones de détergents intensifs. Ces problèmes ont été résolus au milieu des années 1960 en modifiant chimiquement la structure des agents de surface afin de les rendre plus facilement biodégradables, ces composés du phosphore s'hydrolysent rapidement dans l'eau pour donner des monophosphates non toxiques et ne représentent aucune menace pour la vie de l'homme et des animaux. Diverses propositions ont été faites pour limiter l'utilisation des phosphates ou les éliminer complètement des détergents, afin de contrôler l'eutrophisation. Des milliers de composés ont été criblés et testés en tant que remplacements partiels ou totaux possibles pour les adjuvants au phosphate. Il a été difficile de trouver un produit de remplacement correspondant aux qualités recherchées par les phosphates (non toxique, non corrosif, n'affecte pas les tissus, etc). Il semble que les polyphosphates continueront d'être utilisés en dépit de leurs effets sur les plantes jusqu'à l'obtention d'un nouveau substitut acceptable (Stoker and Seager 1997).

#### **I.2.4. Produits pharmaceutiques**

Les produits pharmaceutiques sont un groupe important de contaminants environnementaux émergents qui est un problème de plus en plus d'intérêt pour la communauté scientifique internationale. Ils font partie intégrante, dans bien des cas, d'une vie saine et libre de tout souci, il est cependant prouvé que la large utilisation de médicaments est à double tranchant de par leur influence sur l'environnement. Des résultats de recherche confirment, depuis le début des années 90, la présence d'un large spectre de médicaments destinés aux humains et aux animaux dans les eaux de surface, eaux souterraines, et même sporadiquement dans l'eau potable ; ils peuvent exister par plusieurs voies, soit de l'industrie chimique fine, l'industrie pharmaceutique, les établissements de soins, ou bien les élevages industriels (Dahane 2015). La présence de ces médicaments dans les milieux aquatiques a conduit les scientifiques à s'interroger sur les conséquences de ces polluants sur l'environnement et la santé humaine (Kassinis et al. 2011). Plusieurs milliers de tonnes de médicaments à usage humain ou vétérinaire sont en effet utilisés chaque année dans le monde et rejetés, en nature ou après métabolisation, dans l'environnement. La contamination environnementale par des résidus de médicaments est aujourd'hui clairement démontrée par de nombreuses études de terrain et font des rejets médicamenteux un problème environnemental émergent (Bottoni et al. 2010 ; Fenet et al. 2006 ; Kent et al. 2006). Par rapport aux nombreux

autres polluants environnementaux (pesticides, métaux lourds, hydrocarbures...), le risque sanitaire redouté est plus particulièrement lié à la spécificité des médicaments qui sont des substances présentant une forte activité biologique à de faibles concentrations ; en général, ces produits sont détectés en nanogramme et en microgramme par litre. Bien que ces concentrations puissent ne pas représenter un risque écologique, car la sensibilité de l'organisme envers ces composés reste inconnue. Il est également courant, que la présence de faibles concentrations de médicament individuel, la combinaison dont l'action thérapeutique commune pourrait induire des effets additifs ou synergique.

Si certains effets sur la faune et la flore sont aujourd'hui assez bien connus (**Pal et al. 2010**) (résistance bactérienne liée aux antibiotiques, effets perturbateurs endocriniens des hormones et molécules apparentées, génotoxicité de nombreux médicaments anticancéreux...), les conséquences sanitaires de la pollution environnementale par les rejets de médicaments présentent encore de nombreuses inconnues (**Garric and Ferrari 2005; Haguenoer 2008**) et les méthodes pour les mettre en évidence sont difficiles, non standardisées et peu développées. La complexité du problème est par ailleurs aggravée par la très grande diversité de molécules utilisées, rejetés essentiellement par voie fécale ou urinaire. Les sources de dissémination sont nombreuses, à la fois diffuses (population générale traitée à domicile) et ponctuelles (industrie pharmaceutique, établissements de soins) (**Daughton and Ternes 1999**). Dans la majorité des cas, les résidus médicamenteux sont éliminés dans les réseaux d'eaux usées urbaines pour aboutir aux stations d'épuration des eaux usées (STEP) qui, par définition, ne sont pas conçues pour éliminer les médicaments, et dont l'efficacité est extrêmement variable, entre 0% pour certains composés et plus de 90% pour d'autres molécules (**Castiglioni et al. 2006**).

### **I.2.5. Matières colorantes**

Un colorant est défini comme étant un produit capable de teindre une substance d'une manière durable. Il possède des groupements qui lui confèrent la couleur, appelés chromophores et des groupements qui permettent sa fixation, les auxochromes. Ces colorants sont largement utilisés dans les imprimeries, les produits alimentaires, cosmétiques et cliniques, mais en particulier dans les industries textiles. Ils sont de plus en plus des colorants de synthèse, en raison de leurs facilités de fabrication, leurs rapidités de production et de leurs grandes variétés de couleurs si on les compare aux colorants naturels. Ils constituent une véritable industrie et un capital de la chimie moderne, et la

diversité structurale de ces colorants dérive à la fois, de la diversité des groupements chromosphériques qui les composent (groupements azoïque, anthraquinone, triarylméthane et phtalocyanine) et de la diversité de la technologie d'application (coloration réactive, directe, disperse et de cuve) (**Benmansour et al. 2009**). Les industries textiles, et plus particulièrement les phases de teinture et d'ennoblissement, utilisent principalement des produits chimiques, nuisibles pour la santé, comme certains colorants azoïques cancérigènes, et engendrent une pollution des eaux de surface et des nappes phréatiques. L'hétérogénéité de la composition des produits utilisés pour teindre fait qu'il est extrêmement difficile d'atteindre des niveaux de dépollution satisfaisant les seuils imposés par les normes environnementales, après traitement par les techniques utilisées (**Benmansour et al. 2011**).

### **I.3. Effluents industriels et normes de rejets**

#### **I.3.1. Les effluents liquides industriels**

Au cours de ce siècle, un volume important d'effluents industriels a été déversé directement dans les cours d'eau ou dans les réseaux de collecte. Les raisons avancées tourneraient autour d'une absence ou une insuffisance d'infrastructure de traitement. Les auteurs **Corcoran et al. 2010** et **Piadeh et al. 2014** ont montré qu'à l'échelle globale, deux millions de tonnes d'effluents industriels sont déversés dans les voies navigables et environ 90% de ces eaux usées sont rejetées sans traitement dans les rivières, les lacs ou les océans dans les pays en développement.

Plusieurs industries, dans des domaines divers allant des mines aux industries chimiques en passant par les entreprises de métallurgie, rejettent des effluents plus ou moins chargés en substances minérales, organiques ou toxiques. Ces rejets sont issus des procédés d'extraction ou de transformation des matières premières en vue de fabriquer des produits industriels ou des biens de consommation. Parmi ces effluents, les rejets liquides industriels définis comme eaux usées comprennent toutes les eaux provenant de locaux utilisés à des fins commerciales ou industrielles, rejetées dans le milieu extérieur et qui sont autres que les eaux usées domestiques et les eaux pluviales (**Woodard 2001**).

De façon générale, les rejets liquides industriels se composent de l'une de ces eaux ou bien un mélange d'effluents :

✓ **Eaux de fabrication ou de procédés** : Ces eaux polluées proviennent du contact de l'eau avec les gaz, les liquides ou les solides au cours de la fabrication ou à la

transformation d'un produit, et qui sont soit continués ou discontinues. Dans l'industrie alimentaire, ces eaux représentent l'essentiel de la pollution organique dissoute (**Boeglin 1999**).

✓ **Eaux des circuits de refroidissement** : Les eaux des circuits de refroidissement, abondantes et généralement non polluées, car elles ne sont pas en contact avec les produits fabriqués, elles peuvent par contre être recyclées. Mais elles sont souvent rejetées encore chaudes (30 à 50°C), et si elles ne sont pas à une température incompatible avec un traitement physique (risque de courants de convection dans les décanteurs) ou biologique, elles peuvent être utilisées pour diluer des rejets très concentrés avant le traitement (**Vilaginés 2010**).

✓ **Eaux de lavage des sols et des machines** : Contrairement aux autres rejets, ces eaux sont les plus dangereux et les moins maîtrisables, à cause du degré de pollution et du débit des eaux de lavage très variables, particulièrement importants à la fin de la semaine et des périodes de travail au cours des nettoyages. Elles sont chargées de produits divers, matière première, liqueurs de fabrication, hydrocarbures, huile de machines, produits détergents, et des produits bactéricides. Parfois, les lavages des appareils sont faits avec des solutions très acides ou très alcalines, ce qui entraîne de fortes variations de pH (**Boeglin and Roubaty 2007**). A noter par ailleurs, les caractères parfois occasionnels de ces rejets qui peuvent correspondre, par exemple, à des fuites accidentelles de produits durant leurs manipulations ou leurs stockages (**Grosclaude 1999**).

✓ **Les mélanges d'effluents** : Les mélanges d'effluents, avant leurs traitements sont intéressants, surtout lorsqu'ils s'agissent de deux rejets de qualités complémentaires, par exemple d'un effluent acide et d'un effluent basique (**Delporte 2007**).

D'une manière générale ces effluents liquides industriels génèrent des différents polluants, constitués souvent de matières organiques, azotées ou phosphorées, des solvants, des produits chimiques divers, des métaux lourds, des hydrocarbures, des matières radioactives, des eaux chaudes, et elles peuvent également contenir des produits toxiques (**Labbari and Arjdal 2015**). Parmi ces polluants rejetés on s'intéresse beaucoup plus aux polluants organiques quand il s'agit des différents déchets provenant des industries diverses. Ces usines sont généralement installées au niveau du rivage à la fois pour se débarrasser des déchets directement et pour faire refroidir leurs machines (industrie alimentaire, industrie agricole, tannerie et textile, papeterie, industrie chimique, industrie pétrochimique etc.) (**Nabih 2013**).

Selon le dernier rapport de l'agence des nations unies chargée des questions de l'eau, l'industrie et l'activité humaine génèrent le plus d'eaux usées de composition et de concentration extrêmement variables suivant le type d'industrie. Aussi, chaque opération industrielle génère des quantités et des qualités spécifiques d'eaux usées avec des caractéristiques variables. Ces dernières sont définies par des différents paramètres qui sont utilisés pour l'estimation de la pollution industrielle et servant à caractériser de manière globale et pertinente le niveau de la pollution présente dans les effluents. Parmi ces paramètres physiques, chimiques et organoleptiques, on cite les plus importants (**More et al. 2012;Koller 2004**) :

✓ **Le potentiel d'Hydrogène (pH)** :Le potentiel d'hydrogène est la mesure de la concentration des ions  $H^+$  contenus dans l'eau ; il est mesuré à l'aide d'un pH-mètre et est donné par la formule:  $pH = - \log (H^+)$ . A une température donnée, l'intensité du caractère acide ou basique d'une solution est indiquée par l'activité de l'ion hydrogène, cette intensité varie entre 0 et 14, d'où une eau est acide lorsque son pH est inférieur à 7 et alcaline lorsque son pH est supérieur à 7, alors qu'un pH égal à 7 correspondant à la neutralité (**Gaujous 1999**).

✓ **La température** :Elle agit comme un facteur physiologique, sur le métabolisme de croissance des microorganismes vivants dans l'eau. Elle joue un rôle important dans la solubilité des sels et surtout des gaz (en particulier l'oxygène) dans l'eau, ainsi que la détermination du pH et la vitesse des réactions chimiques (**Thomas 1995**).

✓ **Turbidité** :Elle est inversement proportionnelle à la transparence de l'eau, elle traduit la présence de la matière organique ou minérale sous forme colloïdale en suspension dans les eaux usées. Elle varie suivant les matières en suspension (MES) présentes dans l'eau (**Vilaginés 2005**).

✓ **La matière en suspension (MES)** :Elles comprennent toutes les matières minérales (MMS) de type sable, ou organiques (MVS) de type mucilagineux, qui ne sont pas solubles dans l'eau. La teneur en matières en suspension est obtenue par la pesée après filtration ou centrifugation et séchage à  $105^{\circ}C$ . Elles sont exprimées en milligramme par litre (mg/L) (**Graid 1984**).Elles constituent un paramètre important qui marque bien le degré de pollution d'un effluent urbain ou même industriel. Les MES s'expriment par la relation suivante :

$$MES = 30\% MMS + 70\% MVS \quad (I.1)$$

Les matières volatiles en suspension (MVS) représentent la fraction organique de MES et sont obtenues par calcination de ces MES à 525 °C pendant 2 heures. La différence de poids entre les MES à 105 °C et les MES à 525 °C donne la « perte au feu » et correspond à la teneur en MVS en (mg/L) d'une eau. Les matières minérales (MMS) représentent le résultat d'une évaporation totale de l'eau, c'est à- dire son « extrait sec » constitué à la fois par les matières en suspension et les matières solubles telles que les chlorures, les phosphates, etc(**Duguet 2006**).

✓ **La couleur** :La couleur des effluents industriels peut être forte. Cette coloration est due à la présence des matières organiques dissoutes ou des colloïdes par des composés chimiques solubles qui sont colorés (**Thomas 1995**).

✓ **Les odeurs** :Elles proviennent généralement des substances volatiles. Un changement anormal ou une apparition d'une odeur sont la caractéristique d'une dégradation de la qualité d'eau qui est souvent le précurseur d'une pollution. Les paramètres d'odeurs disposent d'une référence de qualité pour les eaux d'alimentation et les eaux brutes, par exemple les eaux résiduaires industrielles (ERI) se caractérisant par une odeur de moisi (**Bordet 2007**).

✓ **La demande chimique en oxygène (DCO)** :La DCO représente la quantité totale de la pollution oxydable. Elle correspond à la quantité d'oxygène qu'il faut fournir, grâce à des réactifs chimiques puissants, pour oxyder les matières réductrices contenues dans une eau usée. Elle représente donc la totalité de ce qui peut être oxydé, en particulier certains sels minéraux oxydables (sulfures,...) et la majeure partie des composés organiques (hors ammoniacque)(**Rodier et al. 2009**). Elle est exprimée en mg d'oxygène par litre d'eau(mg O<sub>2</sub>/L).

✓ **La demande biochimique en oxygène (DBO)** :La DBO correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour dégrader, par oxydation les matières organiques biodégradables de l'eau usée par l'intervention des bactéries aérobies. Elle s'exprime en mg d'O<sub>2</sub>/L. Par convention la DBO<sub>5</sub>est la valeur obtenue après cinq jours d'incubation à une température de 20°C (**Bourier 2008**).

La valeur de la DCO est toujours plus élevée que celle de la DBO<sub>5</sub>(**Grosclaude 1991**) ; et on a (**Labbari and Arjdal 2015**) :

- DCO = 1,5 à 2 fois DBO<sub>5</sub> pour les eaux usées urbaines ;
- DCO = 1 à 10 fois DBO<sub>5</sub> pour l'ensemble des eaux résiduaires ;
- DCO > 2,5 fois DBO<sub>5</sub> pour les eaux usées industrielles.

La relation empirique de la matière organique (MO) en fonction de la DBO<sub>5</sub> et la DCO est donnée par l'équation suivante :

$$MO = (2 DBO_5 + DCO)/3 \quad (I.2)$$

Le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> indique le coefficient de biodégradabilité d'une eau ; il permet de définir son origine et traduit aussi l'aptitude d'un effluent à être décomposé ou oxydé par les microorganismes qui interviennent dans le processus d'épuration biologique (**Koller 2009**).

Pour qu'une pollution soit dégradable le rapport doit être inférieur à 2,5 (**Rodier et al. 2009**). En effet les effluents industriels, on pourra considérer selon le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> que l'aptitude à la biodégradation est plus au moins favorable à un traitement biologique, les règles suivantes étant généralement retenues (**Rodier et al. 2009**) :

DCO/DBO<sub>5</sub> < 3 effluent facilement biodégradable ;

3 < DCO/DBO<sub>5</sub> < 5 effluent moyennement biodégradable ;

DCO/DBO<sub>5</sub> > 5 effluent difficilement biodégradable.

✓ **L'oxygène dissous** : Est un composé essentiel de l'environnement aqueux, puisqu'il est le réactif limitant de principale voie de dégradation de la pollution organique. Le dosage de l'oxygène dissous est très important dans les études portant sur la qualité des eaux. Les substances biodégradables consomment de l'oxygène, si bien que la détermination de sa teneur constitue une mesure indirecte du degré de pollution (**Thomas 1995**).

✓ **Le phosphore** : Il se trouve dans l'eau usée sous deux formes, soit comme des sels minéraux (orthophosphates, polyphosphates) ou des composés organiques. La présence des orthophosphates dans les eaux naturelles est liée à la nature des terrains traversés, à la décomposition de la matière organique, aux engrais phosphatés industriels entraînés par lessivage ou par infiltration, et la présence des polyphosphates liées à leurs utilisations dans de nombreuses unités industrielles et industries pharmaceutiques (**Amirouche and Barkai 2007**).

✓ **L'azote** : Il se présente sous diverses formes dans les eaux usées, soit sous forme oxydée (azote nitreux NO<sub>2</sub><sup>-</sup> et nitrique NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), soit sous forme moléculaire (azote dissous N<sub>2</sub>) ou bien sous forme réduite (azote organique, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). L'azote est l'un des éléments qui favorise la prolifération d'algues et de plantes en général, par conséquent la réduction de sa teneur avant leur rejet dans les eaux est plus que nécessaire (**Amirouche and Barkai 2007**).

✓ **Les métaux lourds** : Ils se trouvent dans les eaux usées urbaines à l'état de trace, par conséquent leurs concentrations élevées sont en général révélatrices d'un rejet industriel

sans aucun doute. Leurs présences sont nuisibles pour l'activité des microorganismes et perturbent le processus d'épuration biologique (Amirouche and Barkai 2007).

### **I.3.2. Normes de rejets**

Depuis des décennies, la problématique du rejet des effluents industriels préoccupe les responsables des industries, les gouvernements, ainsi que les citoyens puisque chacune de ces parties prenantes est affectée par la gestion et par les conséquences qui en découlent. En effet, avec l'acquisition de plus en plus de connaissances en lien avec les impacts de ces rejets, les gouvernements possèdent la responsabilité d'adapter les lois et les règlements en vigueur afin d'assurer une protection du territoire. Pour les industries, la responsabilité est de se conformer à ces régulations afin d'assurer le bien-être des êtres vivants. Si ce n'est pas le cas, le voisinage de ces industries ainsi que l'ensemble des citoyens peuvent être affectés par les conséquences associées aux rejets industriels, tout en étant en mesure de s'opposer en cas de non-respect des obligations de la part des entreprises. Les effluents d'un établissement industriel algérien ne peuvent pas être rejetés sans respect du milieu naturel. En effet les valeurs limites des paramètres indicateurs de la pollution par les effluents sont mentionnées dans le Journal Officiel de la République Algérienne (JORA) et fixées par le décret exécutif (N° 06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427) définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels, qui doivent être respectées (**Tableau I.1**). Aussi pour chaque polluant, on prévoit des seuils stricts à ne pas dépasser ainsi qu'une valeur maximale cumulant l'ensemble des concentrations des composés présents.

**Tableau I.1.** Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides industriels (JORA 2006)

N°	Paramètres	Valeurs limites	Tolérances aux valeurs limites anciennes installations
1	Température (°C)	30	30
2	pH (-)	6,5 - 8,5	6,5 - 8,5
3	MES (mg/L)	35	40
4	Azote Kjeldahl (mg/L)	30	40
5	Phosphore total (mg/L)	10	15
6	DCO (mg/L)	120	130
7	DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	35	40
8	Aluminium (mg/L)	3	5
9	Substances toxiques bioaccumulables (mg/L)	0,005	0,01
10	Cyanures (mg/L)	0,1	0,15
11	Fluor et composés (mg/L)	15	20
12	Indice de phénols (mg/L)	0,3	0,5
13	Hydrocarbures totaux (mg/L)	10	15
14	Huiles et graisses (mg/L)	20	30
15	Cadmium (mg/L)	0,2	0,25
16	Cuivre total (mg/L)	0,5	1
17	Mercure totale (mg/L)	0,01	0,05
18	Plomb total (mg/L)	0,5	0,75
19	Chrome total (mg/L)	0,5	0,75
20	Etain total (mg/L)	2	2,5
21	Manganèse (mg/L)	1	1,5
22	Nickel total (mg/L)	0,5	0,75
23	Zinc total (mg/L)	3	5
24	Fer (mg/L)	3	5
25	Composés organiques chlorés (mg/L)	5	7

Les effluents doivent impérativement obéir à des normes établies par la législation en vigueur (nationale, régionale ou internationale) pour protéger les milieux récepteurs contre la pollution. Aussi, toutes les installations industrielles générant des rejets liquides doivent être conçues, construites et exploitées de manière à ce que leurs effluents liquides ne dépassent pas à la sortie de l'installation les valeurs limites des rejets définies par le présent décret. Elles doivent également être dotées d'un dispositif de traitement approprié de manière à limiter la charge de pollution rejetée (**Tableau I.2**).

**Tableau I.2.** Tolérance à certaines valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides industriels selon les catégories d'installations (**JORA 2006**)

Industrie	Catégories	Paramètres	Valeurs limites	Tolérance aux valeurs limites anciennes installations
Agro-alimentaire	Abattoirs et transformation de la viande	Quantité (m <sup>3</sup> /t)	6	8
		pH (-)	5,5 - 8,5	6 - 9
		DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	250	300
		DCO (mg/L)	800	1 000
		MES (mg/L)	200	250
	Sucrierie	Température (°C)	30	30
		pH (-)	6 - 9	6 - 9
		DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	200	400
		DCO (mg/L)	200	250
		MES (mg/L)	300	350
		Huiles et graisses (mg/L)	5	100
	Levurerie	Température (°C)	30	35
		pH (-)	5,5 - 8,5	6,5 - 8,5
		DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	100	120
		DCO (mg/L)	7 000	8 000
		MES (mg/L)	30	50
	Corps gras	Température (°C)	30	30
		pH (-)	5,5 - 8,5	6 - 9
		DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	200	250
		DCO (mg/L)	700	800
MES (mg/L)		150	200	
Industrie de l'énergie	Raffinage de pétrole	Débit d'eau (m <sup>3</sup> /j)	1	1,2
		Température (°C)	30	35
		PH (-)	5,5 - 8,5	5,5 - 8,5
		DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	25	30
		DCO (mg/L)	100	120
		MES (mg/L)	25	30
		Azote total (mg/L)	20	25
		Huiles et graisses (mg/L)	15	20
		Hydrocarbures (mg/L)	5	10
	Cokéfaction	DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	30	40
		DCO (mg/L)	120	200
		Phosphores (mg/L)	2	2
		Cyanures (mg/L)	0,1	0,1
		Composés d'Azote (mg/L)	35	40
		Indice Phénols (mg/L)	0,3	0,5
Benzène, Toluène, Xylène (mg/L)		0,08	0,1	
Hydrocarbures Aromatiques (mg/L)		0,08	0,1	

#### I.4. Effets des polluants organiques sur l'homme, la faune et la flore - Effet sur la biodiversité

La grande variété des molécules organiques et leurs multiples origines rendent la détection et l'étude de leurs impacts très difficiles et coûteux. Cependant, il est reconnu que certains de ces contaminants s'accumulent dans l'organisme de certains animaux et entrent dans la chaîne alimentaire, entraînant de nombreux dérèglements, de l'échelle de la cellule à celle de l'écosystème. Aussi certains de ces contaminants sont qualifiés de persistants, ils mettent beaucoup de temps à se dégrader et à disparaître de l'environnement, ils peuvent donc avoir des conséquences à long terme. Par contre, d'autres molécules comme les pesticides sont dégradés rapidement mais les produits de dégradation sont souvent aussi nocifs pour l'environnement.

#### **I.4.1. Toxicité et écotoxicité des polluants organiques**

La toxicologie étudie les désordres induits dans la physiologie des êtres vivants par l'exposition à des concentrations excessives de composés minéraux ou organiques. On distingue classiquement la toxicologie de l'écotoxicologie. La première étudie les effets sur la santé de l'individu humain, animal et végétal et la deuxième étudie les effets des agents polluants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes.

La pollution toxique de l'eau est due à l'introduction par l'homme dans l'environnement des substances nocives non naturelles ou originellement présentes en concentration moindre. Elle peut provenir des rejets industriels, domestiques, urbains, ou agricoles. Ces rejets peuvent être ponctuels (établissement industriel, arrivée d'un égout, ...) ou diffus (épandage de pesticides en agriculture, retombées atmosphériques, lessivage des routes, ...). Dans ce concept on peut citer quelques propriétés et données toxicologiques de certains polluants organiques (Levet 2008) :

- **Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et pyrolytiques**

Ces substances sont dangereuses, en effet leurs toxicités sont d'autant plus élevées que le poids moléculaire du HAP est important. Elles sont aussi modérément et lentement biodégradables, et font partie des polluants organiques persistants (POPs). Les HAP sont assez résistants à la biodégradation, mais sujets à la biotransformation, ou la métabolisation ce qui permet une diminution de leurs concentrations le long de la chaîne trophique. Ils sont aussi cancérogènes et provoquent des effets perturbateurs endocriniens suspectés et dangereux pour l'environnement. Leurs effets sur l'homme sont très variables selon la molécule considérée, en effet on distingue différents facteurs d'équivalence toxique (TEF) basés sur la cancérogénicité. Alors que la valeur 1 est donnée au BaP (Benzo(a)pyrène), dont le pouvoir initiateur de cancer est maximal, la valeur 0,1 au BbF (Benzo(b)

fluoranthène) et BkF (Benzo(k) fluoranthène), la valeur 0,01 au ANT (Anthracène) et FLU (Fluoranthène), et la valeur 0,001 au ACE (Acénaphthène) et NAPH (Naphtalène)(AFSSA 2003).

- **Pesticides**

Ce sont des produits destinés à lutter contre les parasites animaux, végétaux et les adventices indésirables des cultures, des plantes des voiries et les espaces de loisirs. Ils sont constitués d'une ou plusieurs substances actives associées à des agents de formulation. On peut les classer selon leurs modes d'actions : herbicides, insecticides, fongicides..., ou selon leurs compositions chimiques : carbamates (amides), organochlorés, triazines etc.

Leurs effets sur l'environnement sont dus à leurs caractères biocides ; ils peuvent être aussi toxiques pour tous les organismes vivants, en fonction de leur mode d'action, de leur persistance et de leur capacité de bioaccumulation, cette toxicité s'exprime différemment selon les espèces. Les animaux peuvent être touchés directement, notamment en bout de la chaîne trophique (biomagnification), ou par le biais de la destruction de leur habitat sous l'effet des herbicides. Ce sont aussi des substances actives qui se dégradent en de nombreux produits (métabolites) qui sont parfois plus toxiques que leurs molécules mères. On peut dire aussi que tous les pesticides sont potentiellement dangereux pour l'homme, la toxicité dépendant du mode de pénétration dans l'organisme. Dans la littérature scientifique, l'exposition à certains pesticides a été liée chez l'homme à des cancers associés à la suppression immunitaire, des réactions allergiques, des réponses auto-immunes, la suppression de la fonction immunitaire, des perturbateurs endocriniens potentiels et une plus grande sensibilité aux agents pathogènes.

- **Substances pharmaceutiques et hormones**

Ce sont des composés synthétiques d'usage très répandu créés pour avoir un effet biologique thérapeutique. En effet, ces produits ainsi que des produits de désinfection sont retrouvés dans l'environnement notamment dans les eaux suite à leurs rejets dans les stations d'épuration qui traitent de manière variable et incomplète les médicaments et leurs métabolites excrétés par l'homme, ainsi que les hormones naturelles et artificielles. Ils sont aussi présents dans les effluents d'élevage (traitements internes et externes), les déchets ménagers enfouis en décharge et contenant des médicaments et par leurs rejets dans les effluents des hôpitaux (anesthésiques, désinfectants, produits d'aide au diagnostic, anticancéreux, antibiotiques, ...).

Leurs comportements dans le milieu aquatique et leurs effets sur la santé humaine sont variables selon les propriétés chimiques des principes actifs et de leurs métabolites ; ils

sont souvent mal ou incomplètement éliminés par les stations d'épuration ce qui engendre la présence de résidus médicamenteux dans l'eau avec de très faibles doses (<100 ng/L), d'où l'impact environnemental de ces faibles doses et de leur présence simultanée sur la faune et la flore sont mal connus avec l'absence de stratégies définies. Dans ce cas, l'évaluation du risque de ces contaminants est en général faite sur la base de calculs théoriques à partir des données de contamination. Certains de ces produits, notamment les hormones, semblent être impliqués dans la perte de fertilité et le changement de sexe/ratio chez les poissons. Quant aux antibiotiques, ils pourraient contribuer aux résistances et modifications des microorganismes dans le sol voire dans les boues de stations d'épuration. De plus ces produits peuvent s'accumuler dans les graisses, ce qui pourrait engendrer des effets toxiques avec un effet à moyen ou long terme (Leszkowicz 2014).

#### **I.4.2. Impact des polluants organiques sur l'homme et l'environnement**

Notre société utilise des dizaines de milliers de produits organiques, d'origine naturelle ou synthétique. Ceux-ci, par leur écotoxicité, persistance, bioaccumulation, ou celles de leurs métabolites, dans les écosystèmes aquatiques et chez le consommateur en bout de chaîne trophique (homme, oiseau piscivore, mammifère marin,...), sont susceptibles d'entraîner des menaces pour la santé humaine et pour la biodiversité.

En effet, la pollution du milieu aquatique par les matières organiques biodégradables provoque une surconsommation d'oxygène pour son élimination, et son excès pouvant diminuer l'autoépuration de l'eau. D'autre part l'apport massif des éléments nutritifs tels que le phosphore (sous forme de phosphate), l'azote (ammonium, nitrates et azote gazeux), le carbone (gaz carbonique) et d'autres éléments minéraux, provenant essentiellement des activités humaines, de l'agriculture et de l'industrie entraînent la croissance anarchique d'algues et de plantes aquatiques, provoquant ainsi l'eutrophisation. Le milieu aquatique peut être aussi perturbé par des apports aux effets divers à savoir : l'augmentation de la turbidité de l'eau (lavage de matériaux de sablière ou de carrière, ...), modification de la salinité (eaux d'exhaure des mines de sel, ...), augmentation de la température (eaux de refroidissement des centrales nucléaires, ...). D'autre part, ces polluants organiques produisent la pollution de l'eau, qui provoque à son tour des effets très négatifs sur la santé humaine. En effet, l'absorption d'une eau polluée expose le sujet à des maladies hydriques très graves telles que le choléra qui est le plus redoutable. De plus, la poliomyélite, la typhoïde, les gastro-entérites et les diarrhées sont causées par les bactéries et les virus contenus dans l'eau polluée.

La pollution chimique a également des graves conséquences sur l'homme du fait de ses effets cumulatifs. Des substances chimiques toxiques mal éliminées par l'organisme y demeurent et ne manifestent leurs nocivités qu'après un temps assez long et de manière quasi irréversible. Le plus souvent, ces matières toxiques s'attaquent au tube digestif, provoquant des diarrhées plus ou moins graves et douloureuses. Plusieurs s'attaquent au foie, voire au système nerveux (arsenic, mercure). Les nitrates qui sont par ailleurs suspectés cancérigènes empoisonnent le sang et perturbent le système d'échange d'oxygène chez l'homme. L'humanité est donc exposée aux conséquences fâcheuses de la pollution de l'eau.

Un rapport des nations Unies (**U.N.E.S.C.O 2019**) conclut que 80 pays souffrent de pénuries ponctuelles, 28 pays souffrent de pénuries régulières, 1,5 milliards d'habitants n'ont pas accès à l'eau potable, 2 milliards d'habitants sont privés d'installations sanitaires, 1,6 million d'enfants meurent chaque année de diarrhée, due principalement à la mauvaise qualité de l'eau et au manque d'assainissement. Au vu des résultats alarmants, bon nombre d'états se sont alignés dans la politique internationale de protection de l'environnement à travers l'adhésion aux textes internationaux facilitant la mise en œuvre du droit à l'eau en adoptant au fur et à mesure leur propre droit relatif à l'eau. Parallèlement, les chercheurs se sont investis au développement des procédés de protection et de traitement de l'eau.

L'eau constitue donc une denrée rare et doit être préservée des substances toxiques portant atteinte à la santé humaine et aux écosystèmes. Elle doit être préservée de la pollution par une utilisation raisonnée et des traitements efficaces et durables de la ressource exploitée avant rejet.

### **I.5. Cas particulier des effluents de l'industrie textile**

L'industrie textile rassemble de très nombreux métiers tout au long d'une chaîne de transformation partant de matières premières fibreuses jusqu'à des produits semi-ouvrés ou entièrement manufacturés. Elle présente l'avantage de représenter une filière complète qui va de la matière brute au produit fini livrable au consommateur. Dans l'industrie textile, on peut trouver essentiellement deux types d'activité (**Tableau I.3**) :

- ✓ L'activité mécanique qui n'engendre qu'une très faible pollution (préparation de la laine, filature du coton et tissage) ;
- ✓ L'activité de la finition textile ou ennoblissement (blanchiment, teinture, impression et apprêts) (**Dulucq and Lancon 2004**).

**Tableau I.3.** Identification des principaux procédés d'une entreprise textile et les effluents associés (Amirouche and Barkai 2007)

Activité	Rejets associés
Préparation de la laine	- Rejets liquides fortement chargés en matières en suspension et matières organiques.
Filature	- Aucun rejet liquide, - Rejets gazeux constitués de poussières.
Tissage/tricotage	- Présence de poussières, - Présence d'agents d'encollage, - Faible consommation en eau.
Ennoblement/prétraitements  - Blanchiment  - Teinture  - Impression - Apprêts chimiques	- Rejets contenant des huiles, cires, soude, détergents et produits auxiliaires. - Eaux de blanchiment (69 % du volume des effluents liés à l'ennoblissement). - Constitués d'eau, de colorants non fixés, colorants utilisés souvent insolubles dans l'eau. - Colorants, liants, adjuvants et épaississant. Eaux de vidange et de nettoyage des machines (produits chimiques).

### I.5.1. Caractéristiques des effluents industriels textiles

Le caractère fondamental des industries textiles est leur très grande diversité par les fibres traitées (naturelles, artificielles, synthétiques), les procédés de teinture et les produits utilisés (colorants en particulier). Cette diversité se répercute évidemment sur la nature et la quantité des effluents rejetés pendant les diverses activités du procédé de fabrication textile. Parmi ces activités, l'ennoblissement textile utilise toute une série de composés qui ne sont pas directement biodégradables ; cette activité est responsable de rejets dans l'environnement d'une quantité considérable d'eau, d'une composition chimique hétérogène qui est caractérisée par une dilution de la pollution, due très souvent à l'utilisation massive d'eau aux rinçages, et une coloration intense. Cette coloration est en fonction du colorant employé et de sa technique d'utilisation. Dans le cas général, on définit les effluents textiles rejetés comme des polluants très variés avec une grande complexité chimique qui sont généralement biodégradables, et qui peuvent être regroupés en quatre grandes catégories :

✓ La première catégorie est constituée de polluants qui influent sur le bilan de l'oxygène de l'eau, entraînent lors de leur dégradation une baisse du taux d'oxygène en dessous du seuil requis et déclenchent un processus de putréfaction de l'eau, et agissant sur la survie des poissons et d'autres organismes aquatiques.

✓ La deuxième catégorie est constituée des matières en suspension (MES), qui représentent l'ensemble des matières solides de diverses natures, insolubles, en suspension dans les eaux usées, susceptibles d'être séparées de l'eau (par décantation ou filtration).

✓ La troisième catégorie est constituée des nutriments, qui sont des éléments minéraux (l'ammoniacque, les nitrites, l'azote Kjeldahl, et les phosphates). En excès, ces éléments nutritifs, provoquent un développement anormal de certains végétaux (algues, plantes aquatiques) dont la décomposition consomme de grandes quantités d'oxygène, conduisant au phénomène d'eutrophisation et le détriment des organismes aérobies, en particulier les poissons.

✓ La quatrième catégorie comprend les métaux lourds, qui présentent différents risques pour l'environnement et la santé (ASBL 2007).

On peut identifier aussi, les effluents textiles rejetés selon le mode d'utilisation de certains produits dans leurs différentes activités comme suite : les acides organiques et minéraux, les alcalis (soude, carbonate), les oxydants provenant du blanchiment (eau oxygénée, chlorite, ou bichromates). Aussi on a les révélateurs de certains colorants, les réducteurs (hydrosulfite et sulfite de sodium), les adjuvants (mouillants et détergents), les produits de mercerisage et d'apprêt (amidon, alginate, enzymes, etc.) et les émulsifiants (alginates) utilisés pour la préparation des pâtes d'impression.

En plus de ces produits polluants, les effluents textiles peuvent être l'objet de deux types de nuisance : une élévation de la température de l'eau car les différentes opérations de teinture s'accompagnent de déversements d'eau chaude en telle quantité que l'effluent total atteint des température supérieure à 40 °C alors que la température maximum autorisée est de 35 °C, et un pH entre 6 et 9 prescrit pour les eaux sortant des stations d'épuration correspondantes (ITMF 1991).

En conclusion, la composition chimique des effluents issus d'une unité de fabrication textile change rapidement en fonction de la demande du consommateur et de ses préférences, ainsi que suivant les restrictions imposées par les législations concernant les effluents textiles et les biens du consommateur (Benaissa 2011).

### **I.5.2. Législation sur l'environnement**

La législation sur les rejets d'eaux résiduaires devient de jour en jour, de plus en plus stricte. L'Algérie est dotée d'une réglementation 06-141 sur les rejets d'effluents textiles dans le milieu hydrique. Le **Tableau I.4** récapitule les limites réglementaires de ces rejets.

**Tableau I.4.** Valeurs limites des paramètres de rejets des effluents textiles (JORA 2006)

Paramètres	Unité	Valeurs limites	Tolérances aux valeurs limites anciennes installations
Température	°C	30	35
pH	-	6,5 - 8,5	6 - 9
DBO <sub>5</sub>	mgO <sub>2</sub> /L	150	200
DCO	"	250	300
Matières décantables	"	0,4	0,5
Matière non dissoute	"	30	40
Oxydabilité	"	100	120
Permanganate	"	20	25

Certaines substances à risques ont été réglementées par le législateur européen, et parfois par les législateurs nationaux, afin d'imposer aux professionnels des obligations visant à protéger le consommateur. Encore, il existe des réglementations sur les colorants azoïques (directive 200/61), le nickel (directive 1994/27), le cadmium (Directive 1991/338), et le mercure (directive 89/677).

Le règlement 552/2009 du 22/06/2009 est venu intégrer l'ensemble de ces textes (repris initialement dans la directive européenne 76/769/CEE) à l'annexe XVII du règlement 1907/2006 du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH). Cette annexe reprend donc l'ensemble des réglementations en termes de toxicité, parmi lesquelles on retrouve celles applicables au secteur textile-habillement. Ces textes font désormais partie intégrante du dispositif (REACH) au titre des restrictions. Toutefois, certaines substances ne font pas l'objet d'un texte précis mais peuvent avoir des effets néfastes sur la santé du consommateur ou sur l'environnement comme les colorants allergènes et cancérigènes, comme par exemple le formaldéhyde (Merzoug 2014).

### **I.5.3. Toxicité des effluents et des colorants textiles**

#### a) Toxicité des effluents textiles

Le développement industriel accéléré des techniques modernes a engendré une pollution très importante ; en effet, la grande diversité des industries textiles se répercute sur la nature et la masse de pollution rejetée, celle-ci est devenue plus massive, plus variée et plus insidieuse. Devant l'extrême diversité de ces rejets, il est évident que ces effluents déversés sans traitement approprié, entraînent des changements indésirables dans le milieu récepteur et des pollutions très néfastes (Dégrémont 1984), ainsi qu'un impact sur la qualité physico-chimique des cours d'eau et donc sur la biodiversité de leur faune et flore.

Parmi ces effluents on peut citer à titre d'exemple l'effet néfaste de quelques polluants organiques tels que les composés tensioactifs qui tendent à réduire le pouvoir d'auto

épuration des cours d'eau et met en péril la vie des microorganismes et des poissons. Aussi, les colorants solubles dans l'eau qui constituent une source de pollution spécifique ; en cas de forte coloration, les plantes ne reçoivent plus suffisamment de lumière, etc.

Dans ce sens on distingue deux types de dangers engendrés par ces effluents textiles et qui sont les suivantes :

- **Les dangers potentiels**

L'eutrophisation : Est la modification et la dégradation d'un milieu aquatique, lié en général à un apport excessif de substances nutritives, qui augmentent la production d'algues et des espèces aquatiques. Ces substances peuvent être évacuées dans le milieu naturel, telles que les phosphates, utilisés comme détergent lors du processus d'ennoblissement (**Yuseuf 2004**) ou les nitrates libérés sous l'action des microorganismes sur les colorants textiles (**Kaushik et al. 2010**). L'introduction de ces ions minéraux en quantités très importantes peut devenir toxique pour la vie piscicole, et altérer la production d'eau potable. Aussi, leurs consommations par les plantes aquatiques accélèrent la prolifération anarchique de ces plantes et conduit à l'appauvrissement en oxygène par l'inhibition de la photosynthèse dans les strates les plus profondes des cours d'eaux et des eaux stagnantes.

La sous-oxygénation : Lorsque des charges importantes de matière organique sont apportées au milieu via des rejets textiles ponctuels, les processus naturels de régulation ne peuvent plus compenser la consommation bactérienne d'oxygène. Il a été estimé que la dégradation de 7 à 8 mg de matière organique par des microorganismes suffit pour consommer l'oxygène contenu dans un litre d'eau (**Manahan 1994**).

La couleur, turbidité, odeur: l'accumulation des matières organiques dans les cours d'eaux évacuées des industries textiles induit l'apparition de mauvais goûts, prolifération bactérienne, odeurs pestilentielles et colorations anormales. **Willm et al. 1998** ont évalué qu'une coloration pouvait être perçue par l'œil humain à partir de  $5.10^{-6}$  g/L. En dehors de l'aspect inesthétique, les agents colorants ont la capacité d'interférer avec la transmission de la lumière dans l'eau, bloquant ainsi la photosynthèse des plantes aquatiques.

- **Les dangers à long terme**

La persistance : Les effluents textiles constituent des colorants organiques synthétiques qui sont des composés difficiles à être épurés par dégradation biologique naturelle (**Pagga and Brown 1986**). Cette persistance est due principalement à leur réactivité

chimique : les aromatiques sont plus persistantes que les alcanes et leurs persistances augmentent avec le nombre de substituant. Les composés saturés sont plus persistants que les insaturés et les substituant halogènes augmentent plus la persistance des colorants que les groupements alkyles.

La bioaccumulation : Si un organisme ne dispose pas de mécanismes spécifiques, soit pour empêcher la résorption d'une substance chimique, soit pour l'éliminer une fois qu'elle est absorbée, alors cette substance s'accumule et se concentre dans tout ou une partie de leur organisme (partie vivante ou inerte telle que l'écorce ou le bois de l'arbre, la coquille de la moule, la corne, etc...). Chez un même organisme, la capacité de la bioaccumulation peut fortement varier selon l'âge et l'état de santé, ou selon des facteurs externes (saison, teneur du milieu en nutriments ou co-facteur). Aussi, les espèces qui se trouvent à l'extrémité supérieure de la chaîne alimentaire, y compris l'homme, se retrouvent exposées à des teneurs en substances toxiques pouvant être jusqu'à mille fois plus élevées que les concentrations initiales dans l'eau. Certaines substances non ou peu dégradables présentes dans les rejets textiles sont persistantes dans les organismes (bio-persistance) vivants car elles ne sont pas métabolisées. Leur possibilité d'accumulation est d'autant plus importante que les organismes n'ont pas d'autres alternatives que de les éliminer ou de les stocker (**Servais 1999**). Aussi, la pollution minérale due notamment aux métaux lourds principalement émis par le secteur textile, présente un risque pour la vie aquatique et sur la santé humaine par leurs accumulations dans la chaîne alimentaire (**ASBL 2007**).

#### b) Toxicité des colorants textiles :

Les colorants textiles sont de plus en plus des colorants de synthèse, en raison de leurs facilités de fabrication, de leurs rapidités de production et de leurs grandes variétés de couleur si on les compare aux colorants naturels. Aujourd'hui, les colorants de synthèse constituent une véritable industrie et un capital de la chimie moderne, avec une diversité structurale provenant à la fois de la diversité des groupements chromophores qui les composent et de la diversité de la technologie d'application. La production mondiale de ces colorants de synthèse est évaluée à 800 000 t/an. Une bonne quantité de colorants est perdue, par manque d'affinité avec les surfaces à teindre, approximativement 140 000 t/an, sont rejetées lors des étapes de fabrication et coloration des tissus (**Ben Mansour et al. 2011**). Plus particulièrement les phases de teinture et d'ennoblissement, utilisent principalement des produits chimiques, nuisibles pour la santé humaine, comme certains colorants azoïques et anthraquinoniques cancérigènes.

Les colorants azoïques sont caractérisés par la présence au sein de la molécule d'un groupement azoïque (-N=N-) reliant deux noyaux benzéniques. Cette catégorie de colorant est actuellement la plus répandue sur le plan de l'application, puisqu'il représente plus de 50% de la production mondiale de matières colorantes. Il est estimé que 10-15% des quantités initiales sont perdues durant les procédures de teinture et sont évacuées sans traitement préalable dans les effluents (**Bauer et al. 2001**). Aussi, ces composés organiques cancérigènes sont réfractaires aux procédés de traitements habituellement mis en œuvre et sont très résistants à la biodégradation (**Pagga and Brown 1986**).

Les colorants anthraquinoniques sont d'un point de vue commercial, les plus importants, après les colorants azoïques. Leur formule générale dérivée de l'anthracène, montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyle ou amino. Ces produits sont utilisés pour la coloration des fibres polyester, acétate et triacétate de cellulose. Ils constituent en effet la classe de colorants présentant la plupart du temps les meilleures stabilités à la lumière et aux agents chimiques. La molécule de base de ce groupe de colorants est l'anthraquinone qui présente le groupe chromophore carbonyle ( $>C=O$ ) sur un noyau quinonique, qui est le chromogène (**Stolte and Vieth 2001**).

La toxicité des différents types de colorants (mortalité, effet mutagénique et cancérigène) a été étudiée par plusieurs travaux de recherche aussi bien sur des organismes aquatiques (poisson, algues, bactéries, etc...) que sur les mammifères. En outre, des recherches effectuées sur divers colorants commerciaux ont montré les effets toxiques et/ou carcinogéniques des colorants synthétiques qui sont à l'origine d'une pollution environnementale considérable et un risque très sérieux pour la santé publique (**Boulal and Bouchema 2014**). A titre d'exemples, les colorants basiques sont les plus toxiques pour les algues (**Specht and Platzek 1995**). Ce résultat a été prouvé par le test de mortalité des poissons effectués sur 3000 colorants commerciaux où il s'est avéré que les colorants basiques, et plus particulièrement ceux de la famille de triphénylméthane sont les plus toxiques. Par ailleurs, les poissons semblent être relativement sensibles aux colorants acides (**Brown and DeVito 1993**). D'autre part, la mortalité examinée avec des rats a montré que seulement 1% sur 4461 colorants commerciaux présentent des valeurs de  $DL_{50}$  au dessous du poids corporel de 250 mg/kg. Par conséquent, la chance de la mortalité humaine due à la toxicité aiguë de colorant est probablement très basse. Cependant, il faut sensibiliser l'être humain à l'utilisation de certains colorants (**Chung et al. 1981**).

On différencie la toxicité de ces colorants textiles comme suite :

- **Toxicité sur la santé humaine**

Plusieurs travaux de recherche sur les effets toxiques des colorants textiles sur la santé humaine ont été développés. Un colorant est toxique lorsqu'il possède la capacité de modifier le code génétique des cellules humaines et de déclencher potentiellement des effets cancérigènes. En effet leur teneur en groupements cancérigènes sous forme électrophile ou radicalaire tels que les groupements aromatiques, cyanurés, sel de baryum et de plomb attaque les bases pyrimidiques de l'ADN et de l'ARN et causer par conséquent, une altération du code génétique avec mutation et risque de cancer **(Boulal and Bouchema 2014)**.

Pareillement, les colorants aminés sont souvent aptes à provoquer des irritations de la peau et des dermatites. Des effets similaires avec production d'eczéma et d'ulcération ont été observés chez les ouvriers d'usine de fabrication des colorants de la série du triphénylméthane **(Abouzaid 2001)**. Des réactions allergiques, asthme quelquefois et surtout des dermatites eczémateuses ont été observés avec divers colorants aminés azoïques, anthraquinoniques, ainsi qu'avec certains colorants du groupe des naphthalènes **(Desoille et al. 1987)**. Les colorants de synthèse à base d'amines entraînent des risques cancérigènes, des tumeurs urinaires et plus spécialement les tumeurs bénignes et malignes de la vessie **(Desoille et al. 1987)**. L'utilisation des colorants à base d'arsenic tels que le vert de scheele (arsénite de cuivre), vert de schweinfurt (acéto arsénite de cuivre) provoquent des troubles digestifs (digestion pénible, nausée et diarrhée) et peuvent être à l'origine des irritations de peau, des muqueuses oculaires et pulmonaires et surtout de cancer **(Desoille et al. 1987)**. La granulomatose pulmonaire est signalée chez les femmes utilisant des laques colorées et parfumées plusieurs fois par jour pendant des années **(Desoille et al. 1987)**.

En particulier, les colorants azoïques, causent des problèmes de santé très sévères, lesquels sont caractérisés par la présence de groupe azo (-N=N-). Ils sont responsables de l'apparition d'hépatomes et d'effets cancérigènes pour l'homme et l'animal **(Robert et al. 2000; Bereket et al. 1997; Namasivayam et al. 1994)**. L'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques **(Costa and Rodrigues 1982)**. Mais la plupart de ces colorants ne sont pas initialement cancérigènes, excepté ceux à groupement amine libre **(Rosenkranz and Klopman 1990)**. Cependant, la réduction de ces colorants (rupture de la liaison azoïque) génère la formation d'amines aromatiques connues comme mutagènes et cancérigènes **(Bereket et al. 1997)**. En revanche, la toxicité de ces amines aromatiques est fortement liée à la structure spatiale de la molécule ou, en

d'autres termes, à la position des groupes aminés (**Jung et al. 1992**). Aussi la rupture des liaisons azoïques de ces colorants entraîne la formation d'amines primaires qui causent la méthémoglobinémie, caractérisée par un empêchement du transport d'oxygène dans le sang.

- **Toxicité sur les milieux aquatiques**

Dans les rivières, les rejets d'effluents des industries textiles chargés en colorants, peuvent nuire grandement aux espèces animales, végétales ainsi qu'aux divers microorganismes vivant dans ces eaux. Cette toxicité, pourrait être liée à l'augmentation de la DBO<sub>5</sub> et la DCO, et à la diminution de la capacité de réaération des cours d'eau, c'est-à-dire, la diminution de l'oxygène dissous dans ces milieux et retardant l'activité de photosynthèse (**Poots et al. 1978**). Par ailleurs, la très faible biodégradabilité de ces colorants, due à leurs poids moléculaires élevés et à leurs structures complexes, confèrent à ces composés un caractère toxique pouvant être élevé ou faible (**Rais and Rajeev 2010**). De ce fait, ils peuvent persister longtemps dans les milieux aquatiques et présentent un danger potentiel de bioaccumulation qui peut affecter les différentes êtres vivantes de la chaîne alimentaire, engendrant ainsi des perturbations importantes et non esthétique dans les différents mécanismes naturels existant dans la flore (pouvoir d'auto-épuration des cours d'eau, phénomène d'eutrophisation, inhibition de la croissance des végétaux aquatiques, ...) et dans la faune (destruction d'une catégorie de poissons, des microorganismes, ...). Dans ce cas, la dose létale (DL<sub>50</sub>) qui signifie la mort de 50% d'espèces animales testés en expérimentation, reste le meilleur paramètre pour évaluer les effets toxiques causés par ces déversements (**Kebiche 1996**). En effet, plusieurs travaux de recherche et tests expérimentaux ont mentionné que :

- ✓ Les algues peuvent être inhibés à 35% ou stimulés à 65% par les rejets d'effluents des industries textiles (**Walsh et al. 1980**).
- ✓ Le colorant « Fuchsine » inhibe la croissance des algues et des petits crustacés pour des concentrations minimales de 1 mg/L et 20 mg/L, respectivement (**Baghriche 2005**).
- ✓ Le bleu de méthylène est toxique pour les algues et les petits crustacés à partir des concentrations de 0,1 mg/L et 2 mg/L, respectivement (**Meink et al. 1977**).
- ✓ Le bleu de victoria, le violet de méthyle, le noir anthracite BT et le vert diamant, sont très toxiques pour la faune et la flore à partir de concentrations de 1mg/L (**Baghriche 2005**).
- ✓ Les colorants cationiques (ou basiques) sont généralement très toxiques et résistent à toute oxydation.

✓ D'autres études ont montré que le colorant cationique (standocryl orange) est très toxique pour les microorganismes (Milano et al. 1995).

#### **I.5.4. Traitement des colorants textiles**

Le secteur textile fait partie des branches d'activités générant la moitié des flux industriels de pollution. La plus grande part des effluents industriels est représentée par l'ennoblissement au cours duquel, des quantités plus ou moins importantes de colorants sont perdues, ce qui rend les effluents issus de ce secteur très colorés et difficiles à traiter. En effet, le traitement de ces eaux polluées par ce type de colorants nécessite des techniques de dépollution adaptées par la mise au point de méthodes de traitement et l'optimisation des procédés existants. Néanmoins, la composition très hétérogène de ces eaux polluées, conduit toujours à la conception d'une chaîne de traitement assurant l'élimination des différents polluants par étapes successives. La première étape consiste à éliminer la pollution insoluble par l'intermédiaire de prétraitements (dégrillage, dessablage, déshuilage, etc...), et la deuxième étape comprend des techniques de dépollution qui se divisent en trois types différents (Hao et al. 2000; Dos Santos et al. 2007):

✓ Physique : méthode de précipitation (coagulation, floculation, sédimentation), adsorption sur charbon actif, osmose inverse, filtration, incinération, etc.

✓ Chimique : oxydation (oxygène, ozone, NaOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), réduction (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), méthode complexométrique, résine échangeuse d'ions, etc.

✓ Biologique : traitement aérobie, traitement anaérobie, décoloration par les champignons, les algues, les levures, les bactéries, etc. Parmi ces procédés, seuls les plus couramment rencontrés seront abordés succinctement dans les paragraphes suivants.

##### a) Méthodes physiques

Le traitement des eaux usées par les méthodes physiques est souvent une étape intermédiaire suivie la plupart du temps par un traitement biologique. Dans le cas du traitement des eaux chargées de colorants, ce type de traitement ne fait que concentrer ces colorants, ce qui est considéré comme un transfert de pollution, puisque les molécules ne sont pas détruites. On distingue dans cette catégorie, les procédés suivants (Vandevivere et al. 1998; Forgacs et al. 2004) :

- **La coagulation/floculation** qui est souvent appliquée pour le traitement des eaux usées pour enlever davantage la demande chimique en oxygène (DCO) et la couleur avant un traitement biologique. Toutefois, ces deux procédés génèrent des quantités énormes de

boues à la fin de traitement, ce qui nécessite des investissements supplémentaires pour gérer ces boues en vue de les valoriser, régénérer et réutiliser (Errais 2011).

- **L'adsorption sur le charbon actif** ou sur d'autres matériaux adsorbants peut être utilisée pour éliminer plusieurs colorants des eaux usées, où le polluant est transféré de la phase fluide vers la surface du solide. Le charbon actif, est l'adsorbant le plus communément utilisé pour la réduction de la couleur à cause de sa capacité d'adsorption élevée. Toutefois, cette méthode physique ne résout pas le problème car elle ne fait que déplacer la pollution de l'état liquide à l'état solide. De plus, cette technique non destructive, nécessite des opérations postérieures onéreuses de régénération et de post-traitement des déchets solides (Bouafia 2010).

- **La filtration sur membrane** est un procédé piloté par une pression hydraulique dans lequel les polluants sont retenus par une membrane semi-perméable dont le diamètre des pores est inférieur à celui des molécules à éliminer, pour produire un perméat purifié et un concentrât qui reçoit les impuretés minérales ou organiques. Cette technique est largement utilisée dans le dessalement de l'eau de mer. Selon la qualité de l'eau désirée, on distingue, l'ultrafiltration, la microfiltration, la nanofiltration ou encore l'osmose inverse.

#### b) Méthodes biologiques

L'élimination des polluants organiques par les microorganismes constitue un moyen biologique utilisé pour l'épuration des milieux naturels. Les méthodes de traitement biologiques conventionnelles se sont montrées inefficaces pour la décoloration et la dégradation des certains colorants synthétiques qui renferment un degré très élevé des cycles aromatiques avec une stabilité très importante (Sheng and Chi 1993). Néanmoins, plusieurs aspects de la décomposition des colorants synthétiques par des microorganismes, ont été revus par certains auteurs (Forgacs et al. 2004; Fang 2004). Toutefois, certaines méthodes microbiologiques ont prouvé leurs efficacités *vis-à-vis* de la dégradation de certains colorants synthétiques. Aussi, beaucoup de recherches ont démontré la biodégradation partielle ou complète des colorants par voie biologique (Omernik 1977; Andreozzi et al. 1999). Les avantages que présente ce genre de traitement sont résumés dans le fait que les coûts de fonctionnement sont bas et que les produits finaux obtenus suite à la minéralisation complète du colorant ne sont pas toxiques.

Les procédés biologiques se partagent en plusieurs catégories qui sont les suivantes :

- **Le traitement aérobie** : Il est resté longtemps un moyen pour dégrader un grand nombre de polluants organiques. Pour cet effet, des unités biologiques constituées d'un

bassin de boues activées et de réacteurs dits à lits bactériens sont utilisés, où les polluants sont décomposés par des bactéries aérobies et d'autres microorganismes en une boue qui sédimente (dans le cas idéal, ces polluants organiques sont oxydés jusqu'au dioxyde de carbone). Après épuration, cette boue est séparée des eaux usées par sédimentation dans un décanteur, une partie est recyclée et le surplus est évacué après pressage ou centrifugation. Ce procédé est avéré efficace pour certaine catégorie de rejets textiles (**Zhenhu et al. 2010**), mais dans certains cas, elles ne sont pas suffisamment efficaces pour quelques colorants textiles, tels que les colorants azoïques (à cause des groupes sulfonés), les colorants acides et les colorants réactifs qui se sont révélés persistants et résistent à ce mode de traitement (**Cunningham et al. 1994; Lin et al 2002**). Dans ce cas, la décoloration observée n'est attribuée qu'à l'adsorption de ces polluants sur les boues activées et non à leurs dégradations. Seuls les colorants de structure chimique simple et de faible poids moléculaire et légèrement substitués, ont des taux de décoloration importants (**Sanir and Banerjee 1999**).

- **Letraitement anaérobie** : Il s'effectue en l'absence d'oxygène et forme du dioxyde de carbone, du méthane et de l'eau. Ce procédé présente une efficacité importante dans le traitement des effluents très chargés, caractérisés par une DCO relativement élevée. Il permet aussi de produire des quantités importantes en méthane qui est utilisé comme source d'énergie.

Des études ont montré aussi que les conditions de réduction dans la digestion anaérobie sont adaptées à la décoloration des colorants azoïques par clivage de la liaison azo entraînant une destruction subséquente du groupe chromophore, mais une minéralisation complète est impossible dans ce type de procédé. Aussi la dégradation des molécules initiales entraîne souvent la formation d'amines plus toxiques que la molécule initiale, qui finissent dans les sédiments aquifères peu profonds et les eaux souterraines (**Weber and Wolfe 1987; Carliell et al. 1995**).

- **La décoloration par les champignons** : La dégradation et l'oxydation des colorants synthétiques (notamment azoïques) par les champignons de putréfaction blanche impliquerait l'expression des enzymes lignolytiques extracellulaires qui sont les peroxydases, telles que les lignines peroxydases (LiP), les manganèses peroxydases (MnP) ou les phénoloxydases (la laccase). Le mécanisme commence par l'oxydation de ces enzymes durant leurs cycles catalytiques par  $H_2O_2$ , et la forme oxydée formée serait immédiatement réduite à sa forme d'origine par un substrat qui est le colorant azoïque (**Eichlerova et al. 2005; Harazono and Nakamura 2005**).

Bien que les champignons soient les premiers microorganismes identifiés capables de dégrader les colorants synthétiques et qu'ils se soient montrés efficaces dans certains cas comparés aux autres microorganismes, le traitement des rejets textiles chargés en colorants par les champignons pose beaucoup de problèmes. En effet, l'effluent textile n'est pas l'environnement adéquat pour la croissance et la conservation de la biomasse fongique (**Robinson et al. 2001**), car le traitement des colorants dans un volume d'eau important (unité de traitement biologique) étant très difficile, il est nécessaire de concentrer les colorants en réduisant la quantité d'eau (**Nigam et al. 1996**). En outre, l'activité de la lignine peroxydase, meilleure à un pH acide (pH = 4,5 à 5), exige une acidification de l'eau usée qui est généralement très alcaline. Outre un coût d'acidification élevé, cela inhibe la croissance des autres microorganismes utiles, tels que les bactéries, surtout si le traitement est réalisé avec un consortium de microorganismes (**Swam and Ramsa 1999**). Par ailleurs, d'autres polluants de l'eau usée, particulièrement les composés aromatiques, peuvent interférer avec la dégradation fongique des colorants.

**La décoloration par des algues:** L'action décolorante des algues a fait l'objet d'un nombre très limité de travaux. Une étude réalisée par **Jinqi and Houtian 1992** a montré que les espèces *Chlorella*, *Oscillatoria* et *Spirogyra* étaient capables de dégrader les colorants azoïques. Leurs actions décolorantes dérivent de l'expression d'une azo-réductase (enzyme responsable de la fission de la liaison azote= azote) aboutissant à la production des amines aromatiques correspondantes, qui sont par la suite complètement oxydées.

- **La décoloration par les levures :** Dans la littérature, les études portant sur la dégradation des colorants synthétiques (notamment azoïques) par des levures sont très limitées. Récemment, **Ramalho et al. 2002** ont testé la souche de levure *Candida zeylanoides* pour réduire des colorants azoïques modèles, et en 2004, cette même équipe a pu caractériser l'activité enzymatique responsable de la dégradation des colorants azoïques et présenter un an plus tard le système enzymatique d'azoréduction (**Ramalho 2005**).

Le nombre de travaux réalisés sur les levures reste très limité en raison de la difficulté à les manipuler et des inconvénients majeurs qu'elles procurent. En effet, outre la difficulté à les cultiver, l'efficacité des levures *vis-à-vis* des colorants est très faible (la cinétique de décoloration est lente et peut prendre plusieurs dizaines de jours) car les levures nécessitent de s'adapter, c'est à dire de s'acclimater avant d'aborder la décoloration proprement dite.

- **La décoloration par les bactéries :** De nombreuses études ont montré la capacité des bactéries à dégrader les colorants. Contrairement aux champignons et aux actinomycètes,

qui dégradent les colorants par voie extracellulaire (implication des LiP, MnP, laccases, etc...), les bactéries agiraient plutôt par voie intracellulaire. L'action décolorante dépendrait alors non seulement de l'activité enzymatique cytoplasmique mais aussi de la filtration des molécules à travers la membrane cellulaire. Dans la littérature, la dégradation complète ou minéralisation de colorants azoïques par les bactéries est décrite par la succession de deux étapes essentielles : une azoréduction anaérobie suivie d'une oxydation aérobie des amines aromatiques formées lors de l'étape précédente. L'azoréduction est décrite comme l'étape clé de la minéralisation des colorants, notamment cette étape est suffisante pour la décoloration des molécules. Certaines souches échappent cependant à cette condition d'anaérobiose et sont capables de réduire les colorants azoïques en présence d'oxygène. On distingue alors deux catégories des bactéries décolorantes selon leurs comportements *vis à vis* de l'oxygène : aérobie et anaérobie.

### c) Méthodes chimiques

Les techniques d'oxydation chimiques sont généralement appliquées pour le traitement des eaux usées chargées en constituants résistants aux méthodes de biodégradation, qui sont présentes en fortes concentrations. Ces techniques appliquées aussi en prétraitement pour transformer les polluants organiques toxiques en composés moins toxiques qui pourront par la suite subir un traitement biologique, ou ils sont utilisés en post traitement pour réduire la toxicité aquatique.

Parmi les choix basés sur l'oxydation des polluants, plusieurs possibilités s'offrent pour ce genre de situation, telles que l'incinération, l'oxydation par voie humide, ainsi que les procédés d'oxydation avancée (POA).

- **Procédés d'oxydation avancée** : Ces méthodes de traitement constituent des procédés destructifs qui ont pour but de minéraliser totalement les polluants en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et composés inorganiques. Si la charge polluante est trop élevée ou le débit trop important pour une minéralisation totale, elles visent au moins la dégradation des polluants en composés moins toxiques et si possible moins concentrés. La particularité de ce procédé tient à la génération dans le milieu aqueux d'entités très réactives et très oxydantes, les radicaux hydroxyles •OH. En effet, le radical •OH est un oxydant plus puissant que le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou l'ozone O<sub>3</sub>, et peut réagir sur les molécules organiques soit par substitution d'un atome d'hydrogène, soit par l'addition sur une double liaison éthylénique, soit encore par le transfert d'électron.

Les eaux traitées par cette technique sont décolorées, et les produits intermédiaires obtenus (amines aromatiques) sont facilement dégradés par les microorganismes (**Appleton 1996**). **Cao et al. 1998** ont appliqué cette technique sur une solution aqueuse de cinq colorants azoïques, à savoir : Acide Orange II, Acide Orange IV, Acide Orange GG, Acide Orange, Acide Red 3B et Orange I, et le taux de décoloration obtenu après quelques minutes est satisfaisant. Aussi **Hamada et al. 1998** ont proposé de traiter les colorants azoïques par hypochlorure de sodium, mais même si la molécule initiale est détruite, les halogènes sont susceptibles de former des trihalométhanes cancérigènes pour l'homme avec les sous-produits de dégradation. De plus, l'utilisation de fer à l'état de valence zéro ( $Fe^0$ ), sous forme de poudre, a été répandue dans le traitement des eaux usées colorées, vue la valeur élevée du pouvoir réducteur du  $Fe^0$  et de son bas prix ainsi que la facilité de son obtention, ce type de traitement a été appliqué sur d'autres composés organiques, particulièrement ceux contenant une forme halogène.

Comme tout procédé industriel, ces techniques offrent de nombreux avantages et certains inconvénients. En effet, ces méthodes fournissent une solution complète à l'abattement de la pollution aqueuse et ne sont pas concernées par des problématiques d'élimination de déchets secondaires ou concentrés (filtrats, adsorbats, boues biologiques, etc...). De plus, elles fonctionnent à température et pression ambiante et sont capables de traiter des débits et compositions variables. Cependant, les procédés d'oxydation avancés demandent souvent un investissement et des coûts opérationnels plus élevés que pour un traitement biologique.

Cette étude bibliographique montre que les étapes de teinture et de confection des processus de fabrication de textile sont reconnues pour générer beaucoup de déchets organiques. Ces effluents sont saturés en colorants et présentent de forts taux de DCO, ce qui pose un double problème environnemental sur le plan esthétique et toxicologique. Parmi les colorants synthétiques couramment employés, un certain nombre a été identifié avec leurs métabolites comme étant fortement cancérigènes (**Dos Santos et al. 2007**; **Robinson et al. 2001**).

D'autres techniques traditionnellement employées pour l'élimination et le traitement de ce type d'effluents sont les méthodes physiques de transfert de masse. Parmi ces méthodes on a la floculation, l'adsorption sur le charbon actif, la coagulation et la floculation. Ces procédés généralement déplacent la pollution d'une phase à une autre et créent des grandes quantités des boues. Ils ne sont pas aussi suffisamment actifs pour résoudre les problèmes liés à la coloration. En parallèle les procédés chimiques qui se base sur

l'oxydation des colorants par des agents chimiques comme les radicaux libres, en particulier du radical hydroxyle, se sont avérées peu efficaces compte tenu des normes exigées sur les rejets, malgré leurs rapidités. Aussi, ces méthodes ne sont pas universelles pour tous les colorants, elles sont très coûteuses et chargent les rejets finaux en nombreux sous-produits chimiques de réaction.

Il apparaît donc intéressant de mettre au point des traitements alternatifs, notamment par voie biologique, qui ont l'avantage d'être moins coûteux, moins polluants et plus efficaces car ils sont plus spécifiques. Les procédés biologiques les plus couramment rencontrés ont été abordés succinctement dans les paragraphes précédents. La dégradation des colorants par les plantes aquatiques et les boues activées fait l'objet de notre travail, sera abordée plus spécifiquement dans les chapitres suivants.

**CHAPITRE II : *TRAITEMENT DE LA  
POLLUTION ORGANIQUE PAR LES BOUES  
ACTIVEES***

## **CHAPITRE II : Traitement de la pollution organique par les boues activées**

### **II.1. Introduction**

Les eaux usées altérées par les activités humaines à la suite d'un usage domestique, industriel, artisanal, agricole ou autre est des milieux extrêmement complexes. Plus précisément, les eaux usées textiles présentent une quantité considérable de solides en suspension et des polluants organiques qui peuvent être biodégradables telles que les additifs, les détergents, et les colorants etc. mais qui affectent les écosystèmes, que ce soit en termes de matières en suspension totale (TSS), de demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>) ou de demande chimique en oxygène (DCO) (**Wun 2006**). Parmi ces polluants organiques, les colorants textiles engendrant de pollution qui atteint un niveau record ces dernières années en tant que l'un des produits chimiques les plus consommés avec une estimation annuelle de 28.10<sup>4</sup> tonnes de colorantes rejetés dans l'environnement (**Ogugbue and Sawidis 2011**). De ce fait, ces rejets textiles sont considérés comme pollués et doivent être traités avant toute réutilisation ou injection dans les milieux naturels récepteurs. C'est pourquoi, dans un souci de respect de ces différents milieux, des traitements d'abattement ou d'élimination de ces polluants sont effectués. Cette dépollution nécessite une succession d'étapes faisant appel à des traitements physiques, chimiques ou biologiques.

Les différents traitements physico-chimiques ont été conçus et utilisés pour lutter contre les dangers de la pollution. Cependant, ces méthodes sont très coûteuses et confrontées à des obstacles économiques et techniques, tels que les coûts d'exploitation, la production de grandes quantités de boues et la production de sous-produits dommageables (**Robinson et al. 2001**). Par contre l'utilisation des techniques biologiques pour le traitement de ces polluantes ont reçu une sensibilisation omniprésente de la communauté scientifique au cours de la dernière décennie. Comparé à d'autres méthodes, le traitement biologique présente des nombreux avantages, en termes de la rentabilité, de la bénignité environnementale, du fonctionnement simple et sans génération de boues (**Sponza and Uluköy 2005**).

Le biotraitement a été reconnu comme une étape de traitement biologique prospective dans diverses conditions, peu coûteuse et efficace pour l'élimination de la DCO (**Ghosh et al. 2017; Ito et al. 2016**) et des eaux usées contenant des constituants biodégradables avec un rapport DBO/DCO de 0,5 ou plus (**Tchobanoglous et al. 2003**).

Avec une grande flexibilité dans la conception et les conditions de fonctionnement, les techniques de biotraitement biologiques utilisent des microbes naturels pour dégrader les matières dangereuses (telles que les colorants dans des conditions aérobies ou anaérobies) en composés inoffensifs (par exemple, le dioxyde de carbone et l'eau) (**Ghosh et al. 2017**). La flexibilité de ces approches biologiques peut être comprise par le fait qu'elles peuvent être mises en œuvre *in-situ* (sur site) ou *ex-situ* (hors site) et conciliées par un consortium mixte de microorganismes (boues activées) et/ou de souches de microbes pure (bioremédiation) et même des plantes (phytoremédiation) (**Ghosh et al. 2017; Ito et al. 2016**).

Dans ce chapitre on s'intéresse au traitement biologique des polluantes organiques (particulièrement les colorants textiles) par l'utilisation de boues activées. Cet outil pourrait être une solution intéressante et durable en raison du large spectre des propriétés métaboliques des cultures mixtes. Cette technologie utilise le biote naturel et ses processus de réduction de la pollution, et elle devient encore plus intéressante si elle conduit à une destruction complète des polluants organiques en composés toxiques qui seront ensuite convertis en produits inoffensifs ou en composés susceptibles d'être traités par un autre procédé physico-chimique tel que la photocatalyse, la sonication, l'oxydation chimique etc. Les boues activées, largement utilisées comme agent de biorémédiation de la pollution, ne sont ni pathogènes ni dangereuses pour l'environnement. Les agrégats microbiens apparaissent sous forme de flocons composés de colonies (bactéries filamenteuses, protozoaires et métazoaires) piégées dans un nuage de substances extracellulaires polymériques (EPS) et d'autres constituants, à savoir des composés organiques et inorganiques et des particules adsorbées. Dans une station d'épuration (STEP), les effluents d'eaux usées constituent la principale source des communautés bactériennes (diversité, composition et dynamique) qui oxydent les polluants entraînant le retrait de la matière organique et des nutriments des eaux usées, si l'oxygène est fourni. Ce type de processus est considéré comme un écosystème complexe influencé à la fois par des paramètres biotiques et abiotiques. Même si l'on suppose que certains polluants organiques tels que les colorants textiles ne peuvent être dégradés que dans des conditions anaérobies, certaines études ont montré que certains colorants sont moins biorécalcitrants en environnement aérobie que d'autres (**Khellaf et al. 2018**), tandis que ces colorants peuvent être adsorbés/absorbés sur ou dans la biomasse biologique, plus qu'ils ne sont effectivement dégradés (**Hitz et al. 1978**). Cette bio-élimination est appelée la sorption biologique qui est considérée comme le premier mécanisme d'élimination totale ou

partielle des colorants par la biomasse biologique (**Porter and Synder 1976**). Elle dépend largement du type de colorant, c'est-à-dire de sa structure moléculaire, de son groupe colorant et de sa solubilité (**Dohanyos et al. 1978**). Dans ce chapitre, nous décrivons le principe et le fonctionnement du traitement par les boues activées et nous expliquons quelques éléments relatifs à la composition et au développement des microorganismes.

## **II.2. Principe du traitement par les boues activées**

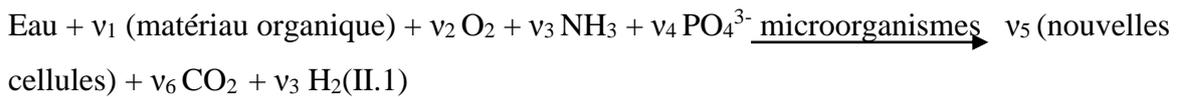
Le procédé d'épuration par les boues activées est l'une des technologies les plus couramment utilisées dans le traitement des eaux usées en raison de ses faibles coûts et de sa technologie simple. Il est largement utilisé pour réduire les concentrations de nutriments, de solides en suspension, de produits chimiques organiques de synthèse, de métaux, de nanoparticules, etc. Il consiste aussi à provoquer le développement d'une culture bactérienne dispersée sous forme de floccs dans un bassin brassé et aéré, alimenté par l'eau usée à traiter (**C.I.E.A.U 1970**).

Le traitement des polluants organiques par les boues activées se fait généralement par l'utilisation de microorganismes capables d'effectuer diverses réactions biochimiques se traduisant par la production de biomasse (corps cellulaires) et par la dégradation, ou la transformation des substances organiques en produits simples (**Degremont 1989**). Pour leurs développements (croissance et multiplication), les microorganismes ont besoin d'énergie et d'éléments nutritifs. L'énergie nécessaire est tirée du milieu, directement sous forme d'énergie lumineuse ou indirectement sous forme d'énergie chimique par la transformation des matières organiques selon les processus suivants (**Edeline 1997**) :

- ✓ Agglomération physique et floculation des matières en suspension (MES) et colloïdales pour les incorporer en un flocc ou biofilm biologique ;
- ✓ Adsorption ou absorption (la sorption biologique) des matières organiques solubles sur ou dans la biomasse de boues activées ou plus précisément sur ou dans les floccs bactériens. Cependant le processus de la sorption biologique est une voie d'élimination majeure et constitue souvent la première phase du traitement biologique et une étape importante du processus de biodégradation (**Zhao et al. 2018**);
- ✓ Élimination lente et biodégradation des matières organiques solubles par action enzymatique ;

- ✓ Transformation ou oxydation des constituants biodégradables dissous en produits finis acceptables ( $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ ), qui produit l'énergie nécessaire au fonctionnement et à la production de nouveaux matériaux cellulaires ;
- ✓ Oxydation et dégradation d'une partie des amas biologiques eux même ;
- ✓ Transformation ou élimination des éléments nutritifs, tels que l'azote et le phosphore.

Le bilan global de la métabolisation et l'oxydation biologique (aérobie) de la matière organique par les boues activées est le suivant :



Où  $v_i$  est le coefficient stœchiométrique.

Dans l'équation (II.1), l'oxygène ( $\text{O}_2$ ), l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et le phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) sont utilisés pour représenter les éléments nutritifs nécessaires à la conversion de la matière organique en produits simples.

Les microorganismes sont également utilisés pour éliminer l'azote et le phosphore dans les processus de traitement des eaux usées. Des bactéries spécifiques sont capables d'oxyder l'ammoniac (nitrification) en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), tandis que d'autres bactéries peuvent réduire l'azote oxydé en azote gazeux. Pour l'élimination du phosphore, les processus biologiques sont configurés de manière à favoriser la croissance de bactéries capables d'absorber et de stocker de grandes quantités de phosphore inorganique (Tchobanoglous et al. 2003).

### II.3. Description et fonctionnement du procédé d'épuration à boues activées

Tous les traitements des eaux usées sont basés sur le principe de l'épuration biologique. Elle consiste à reproduire et à intensifier les processus existants dans la nature : lorsque, dans un milieu naturel, il y a de la matière organique, les bactéries se chargent de la dégrader et de la réduire en éléments simples tout en augmentant leurs biomasses. Ce développement bactérien peut être naturel, ou intensifié, accéléré par des apports supplémentaires de microorganismes et/ou d'oxygène (Miquel 2003).

La terminologie utilisée pour décrire les types de processus de traitement biologiques est classé en tant que : processus de croissance attachée (biofilm), croissance en suspension des microorganismes, ou leurs combinaisons. Le succès de la conception et du fonctionnement de ces deux processus nécessite une compréhension des types de microorganismes impliqués, des réactions spécifiques qu'ils provoquent, des facteurs

environnementaux qui affectent leur performance, leurs besoins nutritionnels et leurs cinétiques de réaction (Tchobanoglous et al. 2003).

Dans cette partie on s'est concentré plus sur les processus de croissance en suspension parmi lesquels on cite le processus à boues activées (Figure II.1), qui peuvent être classés en fonction de leur activité métabolique en tant que processus aérobie ou processus anaérobie. Les processus aérobie comprennent l'utilisation d'oxygène libre ou dissous par des microorganismes aérobie pour la conversion de déchets organiques en biomasse et en CO<sub>2</sub>, cependant les processus anaérobie impliquent la dégradation des déchets organiques complexes en absence d'oxygène par des microorganismes particuliers (bactéries méthanogènes) qui conduisent, comme leur nom l'indique, à la formation du méthane, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Ces processus anaérobie sont utilisés pour le traitement des déchets basés sur le concept de récupération et d'utilisation des ressources tout en atteignant l'objectif du contrôle de la pollution, tandis que les processus aérobie sont souvent utilisés dans le traitement des eaux usées organiques pour atteindre un haut degré d'efficacité de traitement (Yeoh 1995; Seghezzi et al. 1998).

Le procédé d'épuration biologique à boues activées implique la production d'une masse activée de microorganismes capables de stabiliser un déchet dans des conditions aérobie. Il s'agit du procédé le plus fréquent pour les installations de moins de 2000 EH (Equivalent Habitant) : 46% en nombre et 69% en capacité correspondent à des boues activées à aération prolongée. Pour les installations de plus de 2000 EH, on retrouve la même domination avec environ 65% des installations qui correspondent à une capacité de 75% (Rejsek 2002).

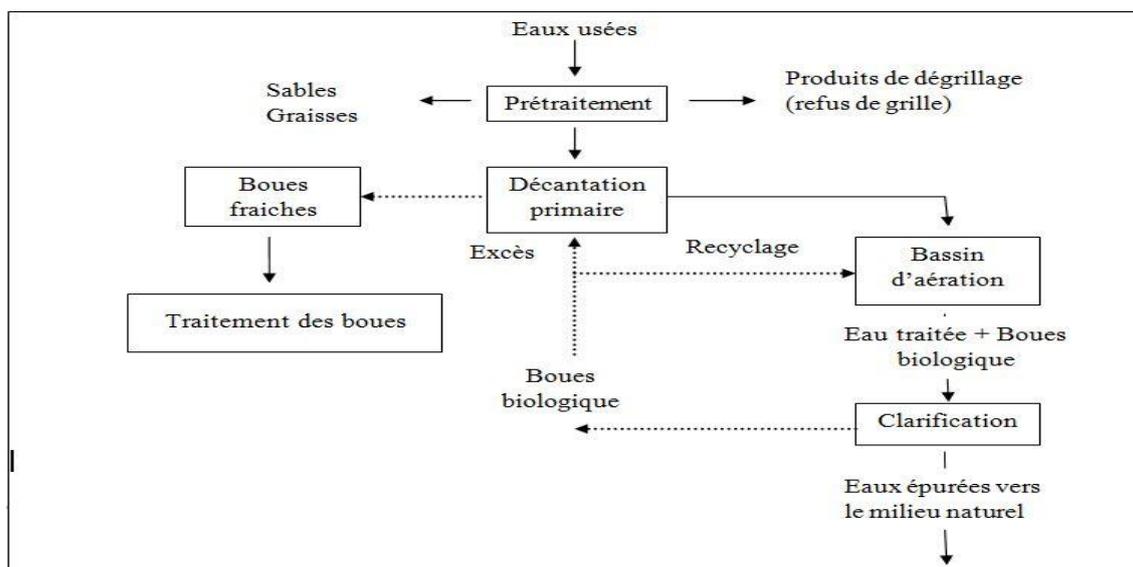


Figure II.1. Schéma de fonctionnement d'un traitement par les boues activées.

Un bassin à boues activées est un réacteur biologique, alimenté en continu par l'eau usée à traiter, dans lequel une microfaune constituée de bactéries hétérotrophes principalement, de protozoaires et de métazoaires est brassée et aérée en même temps que l'eau usée. Dans ce bassin, le brassage a pour but d'éviter les dépôts et d'homogénéiser le mélange de la biomasse (les flocons bactériens aérobies) et de l'eau usée ; pareillement l'aération a pour but de dissoudre l'oxygène dans le réacteur biologique, afin de répondre aux besoins des bactéries épuratrices aérobies. Cette aération peut se faire aussi à partir de l'oxygène de l'eau ou du gaz enrichi en oxygène par une source exogène (brassage, l'injection d'air comprimé, insufflation d'air au sein de liquide, procédé mécanique d'agitation, etc.) **(Rejsek 2002;Metahri 2012).**

Dans ce procédé, les molécules biodégradables sont mises en contact avec des amas biologiques flocculés (flocs) maintenus en suspension au sein du liquide à traiter, de façon à fournir un contact intime avec toutes les parties de l'effluent, pour assurer l'activité d'une culture bactérienne aérobie, qui se développe à partir des matières organiques biodégradables apportés par les eaux usées. Ces dernières sont d'abord hydrolysées en molécules simples, puis celles-ci sont alors utilisées par les bactéries comme source d'énergie dans des réactions biologiques pour qu'elles transforment après en corps bactériens, dont la taille varie de 50 à 200  $\mu\text{m}$ , et qui peuvent être éliminées par sédimentation ou par gravité, pour laisser un liquide relativement clair comme effluent traité. Les microorganismes de ce bassin d'aération utilisent leurs capacités auto-épuratrices pour consommer la matière organique carbonée et contribuer aussi à l'élimination de l'azote et du phosphore, dont l'activité d'épuration est améliorée dans les conditions de fonctionnement optimales **(Metahri 2012; Silva 2008; Renou 2006)**. Le rendement de l'opération de la culture bactérienne ou la transformation de la charge polluante organique en corps bactériens est d'environ 50 % puisque les boues produites ne représentent plus que la moitié de la  $\text{DBO}_5$  entrante, le reste ayant été transformé principalement en  $\text{CO}_2$  et en  $\text{H}_2\text{O}$ . Lorsque les conditions en substrat fourni par les eaux usées deviennent limitantes, cette culture peut s'auto-oxyder, entraînant une diminution de qualité de biomasse présente et une minéralisation de celle-ci **(Metahri 2012; Canler et al. 1999)**.

Après un temps de contact suffisant, l'eau traitée est envoyée dans un ouvrage simplifié appelé décanteur secondaire ou clarificateur destiné à séparer de l'eau épurée des boues, où la suspension microbienne est déposée et épaissie. Cette séparation nécessite que la

croissance bactérienne doit être de type floculé pour former des flocons de boue que l'on pourra séparer de l'eau par simple décantation au niveau de cet ouvrage. Ces boues actives déposées sont recyclées dans le bassin d'aération, pour y maintenir une concentration suffisante (2 à 5 g/L) en bactéries épuratrices et pour poursuivre la biodégradation de la matière organique influente. Une partie de ces boues est retirée quotidiennement ou périodiquement et est évacuée vers les ouvrages de traitement des boues (biomasse en excès) (**Metahri 2012; Renou 2006**).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les microorganismes et les bactéries du bassin d'aération consomment la matière organique carbonée, et contribuent aussi à l'élimination de l'azote et du phosphore présents dans les eaux usées à traiter. Cette élimination est généralement effectuée pour contrôler l'eutrophisation, car l'enrichissement excessif d'un milieu aquatique (notamment si les eaux sont stagnantes ou à circulation réduite) en éléments nutritifs ou en matières organiques, provoque un développement surabondant de biomasse végétale dont la décomposition ultérieure consomme, en partie ou en totalité, l'oxygène dissous dans l'eau et réduit la biodiversité du milieu aquatique.

Le retrait de ces deux éléments nutritifs nécessite l'ajout d'une phase anoxique au traitement aérobie, cette phase est volontairement provoquée au cours de procédés de traitement des eaux usées par les boues activées ; elle est caractérisée par l'absence d'oxygène et la présence de nitrates qui sont utilisés comme un oxydant en remplacement de l'oxygène. Ces processus sont réalisés dans le même réacteur biologique que le traitement de la pollution carbonée mais à des moments différents par l'alternance des phases aération/anoxie, en programmant les temps de marche et d'arrêt du système d'aération (réacteur biologique séquentiels) (**Tchobanoglous et al. 2003**).

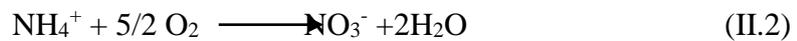
Dans les eaux usées à traiter, l'azote se trouve sous forme d'azote ammoniacal et d'azote organique. Une partie de l'azote ammoniacal (5 à 10 %) est directement assimilée par la biomasse tandis que la majeure partie peut subir, selon les conditions opératoires ou environnementales, des processus biologiques de nitrification et dénitrification. Ces processus biologiques consistent à oxyder l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) en azote nitreux ( $\text{NO}_2^-$ ) puis en azote nitrique ( $\text{NO}_3^-$ ) en milieu aérobie, ensuite à réduire les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) en azote gazeux ( $\text{N}_2$ ) en milieu anaérobie. Les différentes étapes d'élimination de l'azote sont illustrés dans la (**Figure II.2**), et qui sont les suivants (**Metahri 2012; Silva 2008; Renou 2006**) :

✓ **L'assimilation** : C'est l'utilisation d'une partie de l'azote ammoniacal et éventuellement organique pour la synthèse bactérienne. Les besoins de celles-ci sont de l'ordre de 5 % de la DBO<sub>5</sub> éliminée par la culture bactérienne.

✓ **La nitrification** : La nitrification est l'oxydation de l'azote ammoniacal en nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) puis en nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) après transformation de l'azote organique en azote ammoniacal (ammonification).

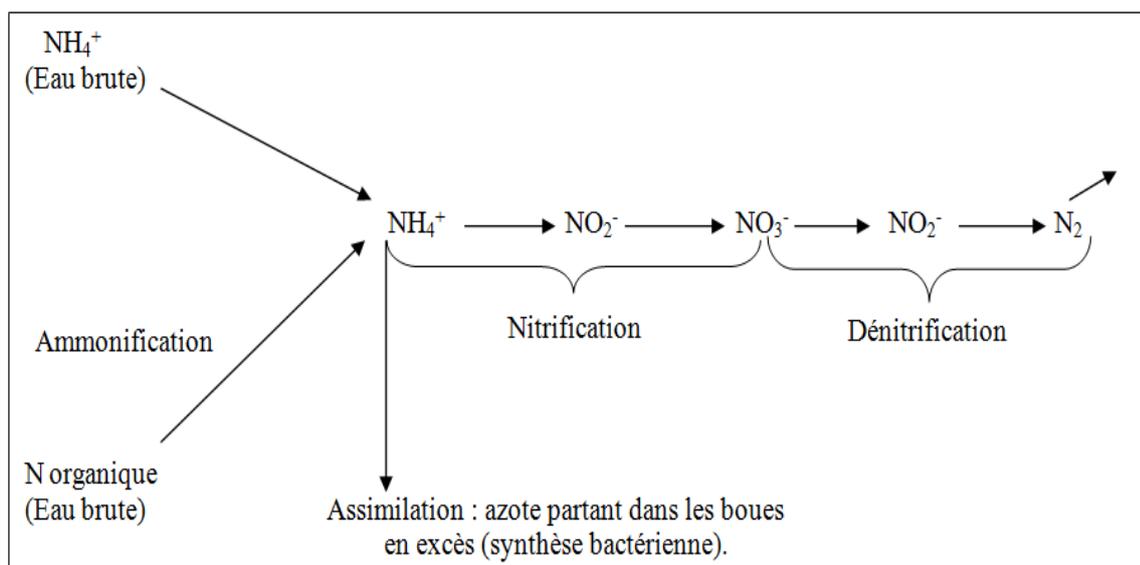
Les bactéries nitrifiantes sont classées en deux catégories : *les Nitrosomonas* qui oxydent l'ammoniac en nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) et *les Nitrobacter* qui oxydent les nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) en nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

La réaction globale simplifiée de la nitrification peut s'écrire de la façon suivante :



✓ **La dénitrification** : C'est une réduction des nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en azote gazeux (N<sub>2</sub>) qui retourne ainsi sous sa forme primitive dans l'atmosphère dans les conditions d'anoxie et avec la présence d'une source de carbone soluble biodégradable, qui peut provenir soit de l'effluent à traiter, soit d'un apport de carbone exogène, soit enfin d'une source de carbone liée aux microorganismes dénitrifiant. Cette réduction se fait par l'intermédiaire de bactéries anaérobies facultatives hétérotrophes, qui en cas de carence du milieu en oxygène, ont la propriété d'utiliser l'oxygène combiné de certains composés chimiques et notamment des nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) dissous dans l'eau pour qu'elles les réduisent en azote gazeux (N<sub>2</sub>). La dénitrification s'exprime par différentes réactions que l'on peut schématiser comme suite :





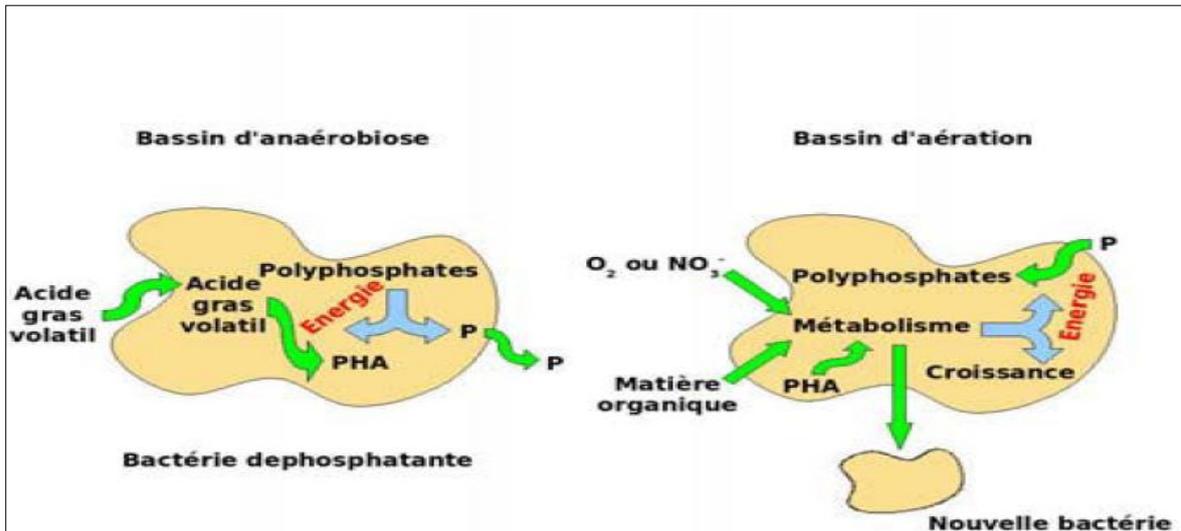
**Figure II.2.** Mécanisme réactionnels de la dégradation de la pollution azotée par nitrification – dénitrification

Le phosphore se trouve dans les eaux usées à traiter sous différentes formes : phosphore organique insolubles contenu dans le matériel cellulaire végétal ou animal, orthophosphates dissociés (sucre phosphatés, phospholipides, etc.), phosphates inorganiques condensés (pyrophosphates, tripolyphosphates, trimétaphosphates, etc.).

L'élimination du phosphore, ou "déphosphatation", peut être réalisée par des voies physico-chimiques ou biologiques. Le principe de la déphosphatation biologique repose sur l'aptitude de certains microorganismes présents dans la station d'épuration à accumuler au sein de leurs biomasses épuratrices de longues chaînes de polyphosphates ; ces derniers sont incorporés au sein de ces bactéries déphosphatantes grâce à l'alternance des phases aérobie et anaérobie, ou par combinaison des deux processus (filère combinée). Dans les deux cas, le phosphore se retrouve finalement concentré dans les boues qui sont éliminées des installations de traitement *via* leur soutirage. Les différentes étapes de la déphosphatation biologique peut être décrit, de manière simplifiée (**Figure II.3**), comme suite (**Metahri 2012; Silva 2008; Renou 2006; Déronzier and Choubert 2004**) :

✓ **La phase anaérobie** : Les bactéries déphosphatantes synthétisent des substances de réserve qui sont les polymères PHA (poly- $\beta$ -alcanoates), et qui seront par la suite stockés et incorporés dans les biomasses cellulaires. La synthèse de ces PHA est réalisée à partir du substrat facilement biodégradable (substances carbonées) des eaux usées et de l'énergie libérée par l'hydrolyse intracellulaire de polyphosphates stockés.

✓ **La phase aérobie** : Les polymères PHA et les matières organiques contenues dans les eaux usées sont oxydés par les microorganismes. La respiration produit l'énergie nécessaire aux bactéries qui régénèrent et augmentent leurs stocks de polyphosphates. Dans ce cas, l'élimination biologique du phosphore est liée à une réabsorption de phosphore plus importante que le relargage.



**Figure II.3.** Processus simplifié de déphosphatation au sein d'une bactérie en conditions anaérobies et aérobies (Bauman 2018)

L'épuration des eaux usées par les boues activées et la vie des microorganismes dépendent d'un certain nombre de points tels que l'alimentation en eau usée, l'aération, le brassage, la recirculation et l'extraction des boues. Il est donc indispensable de s'informer sur ces paramètres clés afin d'assurer un bon fonctionnement du procédé. En premier lieu, l'alimentation en eau usée fournit une nourriture adéquate aux bactéries, c'est-à-dire une eau usée biodégradable sans toxiques et non septiques (eau fermentée qui est généralement grisâtre et nauséabonde), riche en milieu nutritif vital pour la croissance et le développement des peuplements biologiques. Cette nourriture doit être arrivée en continu et avec des débits constants pour éviter les variations brutales des quantités de matières à traiter (excès de pollution ou d'eau claire), qui provoquent le mauvais fonctionnement des installations. Par conséquent, cette alimentation continue et constante en eau usée augmente en permanence le nombre de boues présentes dans le bassin d'aération. Pour cela il faut enlever et extraire les boues en excès en assurant une recirculation correcte, pour maintenir une concentration en boue constante dans le réacteur biologique. Celles-ci sont effectuées après la décantation et la séparation de ces boues de l'eau épurée dans le clarificateur. Cette décantation est liée directement à l'aptitude des bactéries à la

floculation, en effet, lorsque ces bactéries sont dans des conditions favorables, elles s'agglomèrent pour former des flocons que l'on pourra séparer de l'eau décanteur secondaire (**Degremont 1989;Metahri 2012;Silva 2008**).

En deuxième lieu, les microorganismes nécessitent beaucoup d'oxygène pour assimiler et dégrader la pollution carbonée et éventuellement pour éliminer la pollution azotée. Ils utilisent aussi l'oxygène pour leurs propres besoins (la respiration). La quantité de O<sub>2</sub> dépendra de la concentration en boue, plus les boues sont concertées et plus il faudra de l'oxygène. Ce dernier est fourni grâce à des différents dispositifs d'aération capables de diffuser de l'air au sein des bactéries. D'autre part, cette oxygénation permet aussi un brassage de la boue activée qui favorise le transport et le bon contact entre les microorganismes, la nourriture (la pollution) et l'oxygène. Le brassage efficace des boues évite également la création de dépôts et diminuerait le volume utile des ouvrages (**Edeline 1997; Renou 2006**).

#### **II.4. Eléments nécessaires au développement des microorganismes**

Le métabolisme, est l'ensemble des réactions chimiques contrôlées au sein des cellules, est un caractère essentiel de tous les êtres vivants. Le résultat ultime de cette activité métabolique est la reproduction et l'augmentation du nombre de cellules ou d'organismes individuels. Les microorganismes élaborent des éléments biosynthétiques nécessaires à leurs reproductions et à leurs métabolismes. Ceci est effectué par la disponibilité des nutriments constitutifs ou énergétiques nécessaires pour leurs développements, et qui doivent lui être apportés dans certaines conditions d'environnement d'un écosystème donné. Un certain nombre de ces conditions (physiques ou chimiques) interviennent au cours de la nutrition des écosystèmes microbiens, ils peuvent l'empêcher, l'inhiber ou la favoriser. Ces facteurs écologiques sont nombreux et agissent de façon simultanée.

**Tableau II.1.**Eléments majeurs avec certaines de leurs fonctions principales et formes chimiques prédominantes utilisées par les microorganismes

<b>Eléments</b>	<b>Forme utilisée par les microbes</b>	<b>Fonction</b>
<b>C</b>	Composé organique, CO, CO <sub>2</sub>	Principaux constituants du matériel cellulaire dans les protéines, les acides nucléiques, les lipides, les glucides et autres.
<b>O</b>	Composé organique, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, O <sub>2</sub>	
<b>H</b>	Composé organique, H <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub>	
<b>N</b>	Composé organique, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N <sub>2</sub>	
<b>S</b>	Composés organiques du soufre, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , HS <sup>-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Protéines, coenzymes.
<b>P</b>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Acides nucléiques, phospholipides, coenzymes.
<b>K</b>	K <sup>+</sup>	Cation inorganique majeur, cofacteur enzymatique.
<b>Mg</b>	Mg <sup>+</sup>	Cofacteur enzymatique lié à la paroi cellulaire, à la membrane et aux esters de phosphate, y compris les acides nucléiques et l'ATP.
<b>Ca</b>	Ca <sup>2+</sup>	Cofacteur enzymatique lié à la paroi cellulaire.
<b>Fe</b>	Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	Cytochromes, ferrédoxine, protéines Fe-S, cofacteur enzymatique.
<b>Na</b>	Na <sup>+</sup>	Impliqué dans le transport et la transduction d'énergie.
<b>Cl</b>	Cl <sup>-</sup>	Anion inorganique majeur.

#### **II.4.1. Milieu de culture**

Les microorganismes se développent, se métabolisent et se reproduisent à l'aide des nutriments disponibles dans l'environnement, et qu'ils doivent apporter dans leurs cellules par des processus de transport passifs et actifs. Presque la totalité de ces microorganismes sont hétérotrophes, c'est à dire qu'ils ont un besoin nutritif obligatoire d'une, et parfois de plusieurs, substances organiques servant de source d'énergie.

Ces besoins nutritifs comprennent les éléments chimiques nécessaires aux aspects structurels de la composition cellulaire, aux activités métaboliques et aux besoins énergétiques. Un milieu de culture est composé d'un mélange de nutriments ; les plus courants sont les composés contenant les éléments nécessaires tels que le carbone (C),

l'hydrogène (H), l'oxygène (O), et l'azote (N), en quantité importante, le soufre (S), le phosphore (P) en quantité faible et enfin des oligo-éléments (Ca, Co, Cu, K, Mg, Mn, Na, Fe et Zn) en quantité très faible, et qui sont toujours utilisés sous forme de sels minéraux. Le milieu de culture doit donc contenir tous les éléments nécessaires à la nutrition du microorganisme et de plus sous une forme utilisable par ces bactéries.

Les éléments nécessaires et les oligo-éléments sont énumérés dans les **Tableaux II.1 et II.2 (Byung 2008)** avec certaines de leurs fonctions principales et formes chimiques prédominantes utilisées par les microorganismes.

Le carbone est l'élément le plus important pour la culture bactérienne. La plus simple source inorganique de carbone est l'anhydride carbonique ou  $\text{CO}_2$  présent dans l'atmosphère. Celui-ci peut être utilisé par certaines bactéries pour la synthèse de certains métabolites essentiels, tandis que d'autres bactéries utilisent des composés organiques de substances hydrocarbonées (alcool, les protéines, les glucides, les acides aminés et les acides gras, etc.) comme source de carbone après leurs dégradations. En plus des sources de carbone, les cellules bactériennes ont besoin d'électrons ou d'atomes d'hydrogène. L'hydrogène est l'élément chimique le plus courant dans ces cellules, il est si commun dans les molécules organiques et l'eau. Leur présence dans le milieu de culture est essentiel pour la liaison hydrogène et le transfert d'électrons, ainsi que pour les réactions redox.

De même, les microorganismes nécessitent des sources d'oxygène pour leurs croissances. Parmi ces sources, les plus utilisées par les microbes sont l'oxygène atmosphérique ( $\text{O}_2$ ) libre et l'oxygène lié aux différents composés, tels que les glucides et l'eau. L'influence de l'oxygène libre est liée au caractère métabolique et énergétique des bactéries. Certaines ont obligatoirement besoin d'oxygène libre, elles sont qualifiées d'aérobies. Ces bactéries n'obtiennent leurs énergies et leurs intermédiaires que par oxydation, impliquant l'oxygène atmosphérique  $\text{O}_2$  (respiration aérobie) comme ultime accepteur d'hydrogène ou d'électrons, d'où le carbone et la source d'énergie peuvent être complètement oxydé en dioxyde de carbone et en eau. Tandis que les bactéries anaérobies ne peuvent se multiplier et survivre qu'en l'absence d'oxygène ; elles sont donc incapables de détoxifier les composés formés lors de réactions d'oxydation (comme l'eau oxygénée ou l'ion superoxyde  $\text{O}_2^-$ ). Elles utilisent des accepteurs d'hydrogène ou d'électrons autres que l'oxygène tels que les nitrates ou les sulfates (respiration anaérobie). Un processus plus courant dans le métabolisme anaérobie peut être une série d'oxydoréductions dans lesquelles, la source de carbone et d'énergie agit à la fois comme donneur d'électrons et accepteur d'électrons. Ce processus est connu sous le nom de fermentation et conduit à la formation de plusieurs

produits finaux organiques tels que les acides et les alcools, ainsi que de gaz (dioxyde de carbone et hydrogène). D'autres bactéries anaérobies facultatifs peuvent agir dans les deux sens et peuvent croître aussi bien en présence qu'en l'absence d'oxygène. On a aussi les bactéries anaérobies-aérotolérantes qui tolèrent l'oxygène mais leurs croissances sont meilleures en anaérobiose par contre les bactéries micro-aérophiles ont besoin d'oxygène, mais elles ne supportent pas une tension en oxygène équivalente à celle de l'air et elles ne peuvent se multiplier qu'en présence d'une faible tension d'oxygène.

Les microorganismes ont besoin aussi, de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. La provenance de cet azote peut se faire par fixation directe de l'azote atmosphérique ( $N_2$  gazeux) de composés azotés organiques tels que les acides aminés ou par les formes inorganiques telles que l'ammonium et le nitrate. L'ammonium peut être utilisé comme source d'énergie (donneur d'électrons) pour certains microorganismes, tandis que le nitrate peut être utilisé comme accepteur d'électrons par les dénitrifiants. Aussi, les bactéries nécessitent du soufre et du phosphore en faibles quantités. Le soufre est un composant des acides aminés soufrés, qui se lient les uns aux autres *viades* liaisons disulfures ; ces acides sont essentiels à la structure tertiaire des protéines et des vitamines telles que la thiamine (B1). La source de soufre la plus couramment utilisée est le sulfate ( $SO_4^{2-}$ ), tandis que les autres sources de soufre utilisées comprennent les composés organiques du soufre, le sulfure (tels que le disulfure de carbone  $CS_2$  et le sulfure d'hydrogène  $H_2S$ ), le soufre élémentaire et le thiosulfate ( $S_2O_3^{2-}$ ). Le sulfure et le soufre peuvent servir de donneurs d'électrons pour certains microorganismes, et le sulfate et le soufre élémentaire sont utilisés comme accepteurs d'électrons et réduits en sulfure par les sulfurogènes.

D'autre part, le phosphore est incorporé sous forme de phosphate inorganique ; il est présent dans les acides nucléiques, les phospholipides et les nucléotides (molécule organique qui est l'élément de base d'un acide nucléique, il est composé d'une base nucléique/azotée, d'un ose à cinq atomes de carbone, et enfin de un à trois groupes phosphate), y compris l'adénosine triphosphate (ATP) dont l'hydrolyse sous forme l'adénosine diphosphate (ADP), et qui sont utilisées dans de nombreuses réactions enzymatiques, permettant la récupération, l'accumulation et la distribution de l'énergie dans la bactérie.

En plus de ces éléments majeurs, d'autres éléments mineurs appelés oligo-éléments répertoriés dans le **Tableau II.2** sont nécessaires pour les enzymes spécifiques tels que le calcium, fer, magnésium, manganèse, nickel, sélénium, cuivre, cobalt, vitamines et ceux essentiels pour le métabolisme bactérien tels que le sodium, potassium, magnésium, chlore.

Le potassium est le principal cation inorganique ( $K^+$ ), tandis que le chlorure ( $Cl^-$ ) est le principal anion inorganique. Le potassium est requis comme cofacteur pour certaines enzymes, et le chlorure est impliqué dans le processus de conservation d'énergie, opéré par les halophiles qui ont besoin de fortes concentrations en sel dans leur milieu pour vivre. En plus de ces deux éléments, le sodium ( $Na^+$ ) participe à plusieurs processus de transport et de transduction d'énergie ; il joue un rôle crucial dans la croissance microbienne dans des conditions alcalines. Le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) forme des complexes avec des groupes phosphate, y compris ceux trouvés dans les acides nucléiques tels que l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'acide ribonucléique (ARN), l'adénosine triphosphate (ATP), ou les phospholipides. En outre, les ions ferreux et ferriques ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) jouent un rôle capital dans les réactions d'oxydoréduction en tant que composants de porteurs ; d'électrons tels que les protéines Fe-S et les cytochromes (coenzymes intermédiaires de la chaîne respiratoire).

Outre les exigences nutritives, le développement microbien et la croissance cellulaire est sous la dépendance de conditions physicochimiques dont la nature varie selon l'espèce.

**Tableau II.2.** Eléments mineurs ou les oligo-éléments avec certaines de leurs fonctions principales et formes chimiques prédominantes utilisées par les microorganismes

<b>Eléments</b>	<b>Forme utilisée par les microbes</b>	<b>Fonction</b>
<b>Mn</b>	$Mn^{2+}$	Superoxyde dismutase (oxydoréductases), photosystème II.
<b>Co</b>	$Co^{2+}$	Coenzyme B12.
<b>Ni</b>	$Ni^+$	Hydrogénase, uréase (enzymes catalytiques).
<b>Cu</b>	$Cu^{2+}$	Cytochrome oxydase, oxygénase.
<b>Zn</b>	$Zn^{2+}$	Alcool déshydrogénase, phosphatase alcaline, ARN et ADN polymérase.
<b>Se</b>	$SeO_3^{2-}$	Formiate déshydrogénase, glycine réductase (oxydoréductases).
<b>Mo</b>	$MoO_4^{2-}$	Nitrogénase, nitrate réductase, formiate déshydrogénase, arséniate réductase, (oxydoréductases).
<b>W</b>	$WO_4^{2-}$	Formiate déshydrogénase, aldéhyde oxydoréductase.

#### II.4.2. Le potentiel Hydrogène (pH)

Le pH est une mesure de l'acidité ou de l'alcalinité d'une substance. Il joue un rôle important au niveau de la production d'énergie par la chaîne respiratoire, de la perméabilité membranaire, de l'échange ionique, de l'activité métabolique et de la disponibilité des substrats, car l'activité des enzymes est sensible à la variation de pH (**Guiraud 2012**).

Chaque microorganisme a une gamme de pH au-dessus ou en dessous de laquelle il ne peut pas survivre, et un pH optimal auquel il se développe mieux. La plupart des bactéries et des protozoaires, y compris la plupart des agents pathogènes, sont des neutrophiles, car ils se développent et se multiplient préférentiellement dans une plage étroite autour d'un pH neutre, c'est à dire entre pH 6,5 et pH 7,5 ; cependant, elles sont aussi capables de croître dans une large gamme de pH (**Byung 2008; Pommerville 2011**). Par exemple, *Escherichiacoli* peut se multiplier pour des pH compris entre 4,4 et 9,0. En revanche, d'autres bactéries acidophiles telles que les *Lactobacillus* se développent et poussent mieux dans les conditions acides ( $3 < \text{pH} < 6$ ), alors que les bactéries alcalinophiles comme *Vibrion Cholérique*, sont très sensibles à l'acide, mais tolèrent des degrés d'alcalinité élevés (pH voisin de 9) (**Bauman 2018; Byung 2008**).

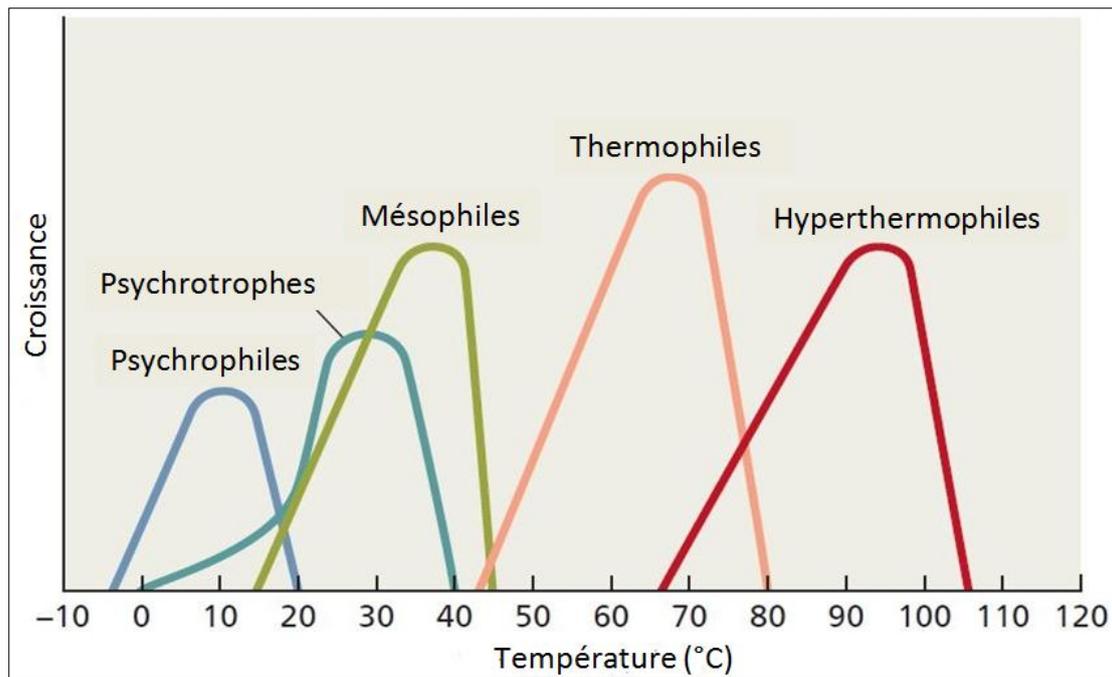
#### II.4.3. Température

La température est l'un des facteurs les plus importants ayant un impact sur la croissance et la survie des microorganismes ; elle a été reconnue comme une variable environnemental importante qui influence la structure des communautés microbiennes (**Martins 2012**). Malgré que l'accroissement de la température peut accélérer les réactions enzymatiques, mais certaines protéines peuvent se dénaturer et perdre leurs formes et leurs fonctions lorsque les liaisons hydrogène se brisent à haute température, affectant ainsi le développement de la cellule microbienne. Aussi, la variation de la température peut agir sur la structure lipidique de la membrane cellulaire, car la diminution de la température rend ces lipides et leurs membranes rigides et fragiles, alors que l'augmentation de la température fait devenir les lipides trop fluides et la membrane ne peut pas contenir la cellule. Ces modifications au niveau de la structure lipidique cellulaire, affectent le transport actif des substrats organiques et inorganiques et diminuent ainsi l'affinité aux nutriments (**Bauman 2018; Martins 2012**).

Dans ce cas, diverses températures ont des effets différents sur la survie et la croissance des microbes. La température la plus basse à laquelle un microorganisme est capable de conduire le métabolisme est appelée température de croissance minimale. Cependant, que de nombreux microbes, en particulier les bactéries, survivent (bien qu'ils ne se développent

pas) à des températures bien inférieures à leur température de croissance minimale, malgré le fait que les membranes cellulaires sont moins fluides et que les processus de transport sont trop lents pour soutenir l'activité métabolique. Tandis que, la température la plus élevée à laquelle un microorganisme continue de se métaboliser est appelée température de croissance maximale. Lorsque la température dépasse cette valeur, les protéines de la cellule microbienne sont définitivement dénaturées et meurent. Dans ce cas, la température à laquelle les activités métaboliques d'un microorganisme produisent le taux de croissance le plus élevé est sa température de croissance optimale (**Bauman 2018; Kanungo and Paniker 2017**).

En fonction de leurs plages de températures préférées, les microbes peuvent être classés en cinq groupes distincts (**Figure II.4**). Cette classification n'a pas de limites strictes, il peut exister des chevauchements d'un groupe à l'autre. Les psychrophiles (psychro=froid), sont des bactéries qui poussent mieux à des températures inférieures à environ 20 °C et peuvent même continuer à croître à des températures aussi basses que 0 °C. Alors que, les mésophiles (mésos=médian), sont des microorganismes qui se développent mieux à des températures allant de 20 à environ 40 °C, bien qu'ils puissent survivre à des températures plus élevées et plus basses. Aussi, on a les bactéries psychrotrophes qui sont plus proches des mésophiles, ayant un optimum à 25 °C mais pouvant s'adapter à 0 °C. En outre, les thermophiles (thermo=chaud), se développent à des températures supérieures à 45 °C dans des habitats tels que les tas de compost et les sources chaudes, leur température optimale de croissance est supérieure à 60 °C. A la fin, on a les bactéries extrêmement thermophiles ou hyperthermophiles, qui se développent mieux à des températures supérieures à 80 °C. Ces deux derniers types, stabilisent leurs protéines avec de l'hydrogène supplémentaire et des liaisons covalentes entre les acides aminés pour devenir des acides gras hautement saturés dans leurs membranes cellulaires et des enzymes thermostables (**Bauman 2018; Pommerville 2011**).



**Figure II.4.** Catégories de microbes basés sur des plages de températures pour la croissance

#### II.4.4. Toxicité

De nombreuses substances ont des effets toxiques sur la croissance et l'activité des microorganismes. Parmi ces effets on différencie deux types : les effets létaux ou directs qui entraînent la mort rapide des espèces exposées après un court délai suivant l'absorption du composé nocif, et les effets sublétaux ou indirects qui engendrent un cumul d'effets nocifs et provoquent parfois des troubles dégénératifs très graves. A terme, si le potentiel adaptatif des espèces ne leur permet pas de devenir résistantes, les effets sublétaux peuvent indirectement engendrer la mort. On appelle une concentration bactériostatique celle qui bloque temporairement le développement bactérien, et concentration bactéricide celle qui tue les bactéries (Dai 2003).

Un milieu de culture ne peut pas contenir des molécules toxiques qui peuvent défavoriser l'action des microorganismes ou les détruire, comme par exemple les substances minérales et la plupart des métaux qui ont un effet toxique sur les microorganismes et sur les systèmes biologiques, aérobies et anaérobies à des concentrations bien définies. Il en est de même pour certains composés organiques (Tableau II.3) (Boeglin 1998).

**Tableau II.3.** Seuil de toxicité pour certains polluants minéraux et organiques

Polluants	Valeur limite (en mg/L)		
	Procédé aérobie	Nitrification	Procédé anaérobie
<b>Polluants minéraux</b>			
Cuivre	2	1	1
Zinc	5	0,5	5
Plomb	1	0,5	5
Chrome	5	2,0	5
Nikel	1	0,5	2
Cadmium	-	0,2	0.5
Sulfures	20 (50)**	(*)	100
Cyanures	1 (50)**	(*)	(*)
<b>Polluants organiques</b>			
Hydrocarbures	50	50	50
Phénol	50 (1000)**	10	(*)
Dinitrophénol	5	(*)	5
Pentachlorophénol	1	(*)	1
Chloroforme (CHCl <sub>3</sub> )	20	20	10
Chlorure de méthylène	50	(*)	(*)
Salinité	16000	(*)	(*)
Chlorures	15000	(*)	(*)
Nitrites	40	(*)	(*)
Sulfites	20	(*)	(*)
Ammoniaque (en N)	16000	(*)	(*)
(*) résultats insuffisants ; (**) après acclimatation des bactéries			

#### II.4.5. Eau

Parmi les besoins minimaux nécessaires pour la croissance et la multiplication des microorganismes, l'eau est un ingrédient essentiel du cytoplasme bactérien ; elle constitue 80 à 90% de la masse bactérienne. Elle joue un rôle fondamental dans la solubilisation des nutriments, et à leurs transports à l'intérieur des cellules microbiennes, et elle participe aussi aux réactions métaboliques et enzymatiques comme un réactif (réaction d'hydrolyse) (Kanungo and Paniker 2017). Sa disponibilité est quantifiée par un paramètre appelé activité de l'eau. Ce paramètre représente le rapport de la pression de vapeur saturante du milieu à la pression de vapeur saturante de l'eau pure à la même température et est inférieur ou égal à 1. Cette activité est inversement proportionnelle à la pression osmotique de l'eau

qui exprime l'effet physique de l'eau sur les microbes (**Martins 2012**). La pression osmotique représente la pression exercée sur une membrane cellulaire des microorganismes par une eau contenant des solutés et d'ions dissous.

Cette pression peut avoir des effets néfastes sur le développement des cellules et la croissance des microorganismes. Par exemple, une cellule placée dans l'eau douce obtient de l'eau de son environnement et gonfle jusqu'à la limite de sa paroi cellulaire. C'est le cas des cellules dépourvues de la paroi cellulaire telles que les cellules de protozoaires, qui sont gonflées jusqu'à ce qu'elles éclatent en solutions hypotoniques. Dans ce cas, il est nécessaire pour ces bactéries d'avoir des parois cellulaires pour empêcher la rupture de leurs membranes plasmiques et conserver leurs formes fonctionnelles. En revanche, une cellule placée dans l'eau de mer, qui est une solution contenant environ 3,5% de solutés et donc hypertonique pour la plupart des cellules, perd de l'eau dans l'eau salée environnante et peut mourir par un rétrécissement de son cytoplasme (les cellules se plastifieraient) (**Bauman 2018; Pommerville 2011**).

## **II.5. Composition et propriétés du floc biologique**

La boue activée normale apparaît comme une suspension de particules floconneuses ou flocs de quelques dixièmes de millimètre à quelques millimètres de diamètre. Elles sont constituées par diverses colonies qui sont complexes et ne peuvent se définir qu'au moyen des principaux groupes écologiques qui sont : les microflores (bactéries libres, floculées et filamenteuses) et les microfaunes (les protozoaires et les métazoaires) (**tableau II.4**) (**Canler et al. 1999; Mesquita et al. 2013; Wilen et al. 2008**). Cet agrégat microbien piégé dans un nuage de substances extracellulaires polymériques (EPS) est sécrété principalement par les bactéries, dans le but d'assurer l'adhésion les unes aux autres pour éviter leur dispersion, et pour retenir et concentrer les substances nutritives de l'eau usée (**Metahri 2012**). En plus de ces colonies écologiques, la boue activée est composée d'autres constituants, à savoir des composés organiques inertes, minéraux et des particules adsorbées.

**Tableau II.4.** Populations de boues activées (Canler et al. 1999)

Populations par litre de boue	Espèces
De 1 à $5.10^5/L$	Métazoaires (rotifères, nématodes).
$10^7/L$	Protozoaires (flagellés, ciliés péritriches, ciliés hypotriches).
$10^{12}/L$	Bactéries (floculées, filamenteuses).

L'essentiel de l'épuration est dû à des bactéries mobiles, parmi lesquelles nous citons : *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Flavobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*. La présence de certaines bactéries filamenteuses telles que *Sphaerotilus* est gênante dans la mesure où elles interviennent pour contrarier la décantation des boues. Ces bactéries se développent souvent dans les milieux déséquilibrés en azote et riches en éléments facilement assimilables (cas des rejets de laiteries et de sucreries) (Mesquita et al. 2013; Wilen et al. 2008).

### II.5.1. La microflore

Les microflores sont des bactéries unicellulaires, de différentes formes (sphériques, cylindriques, incurvées), dont la taille est de l'ordre de quelques microns (de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$ ), à l'exception des bactéries filamenteuses de tailles souvent supérieures (de 10 à plus de 500  $\mu\text{m}$ ) et pouvant être pluricellulaires.

Dans les boues activées, les bactéries jouent un rôle essentiel dans l'épuration biologique, par rapport aux autres organismes. Il est basé essentiellement sur la croissance floculée des bactéries. Ce type de croissance est obtenu dans des conditions bien précises du métabolisme bactérien. Ces bactéries représentent le maillon essentiel du traitement car elles vont consommer les molécules organiques des eaux usées et permettre ainsi leur épuration. Grâce à cette activité, elles se multiplient et deviennent le point de départ d'une chaîne trophique, d'où le terme de microflore car la flore est l'élément de départ des écosystèmes naturels.

Les microflores peuvent se présenter aussi sous différentes formes :

- ✓ Bactéries libres, en général peu abondantes du fait de la prédation par d'autres microorganismes ;
- ✓ Bactéries filamenteuses, présentes normalement en petite quantité mais qui peuvent proliférer dans certaines conditions et poser des problèmes de fonctionnement ;

✓ Bactéries floculées qui s'agrègent pour donner des floccs qui décantent dans le clarificateur.

Les concentrations en microflore sont très élevées, de l'ordre de  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par litre de boues activées. Malgré la diversité des espèces bactériennes susceptibles d'y être ensemencées, provenant des matières fécales mais aussi des eaux naturelles ou de l'air, les boues activées se révèlent être un milieu très sélectif et seulement une dizaine de souches bactériennes sont présentes à un instant donné au niveau d'une installation. De plus, elles sont caractérisées par une grande surface d'échange avec le milieu extérieur, des vitesses de multiplication élevées (une division toutes les 20 minutes dans le cas de souches traitant la pollution carbonée, et une division lentes par jour dans le cas des bactéries assurant la nitrification de l'azote ammoniacal), et aussi caractérisée par des richesses enzymatiques importantes, et d'énormes possibilités d'adaptation aux différents paramètres physico-chimiques (pH, température,...) (Canler et al. 1999).

### **II.5.2. La microfaune**

Elle représente une population importante de quantité de cellules de l'ordre de  $10^5$  à  $10^7$  individus par litre de boues activées. En outre, cette population intéresse en premier lieu l'observateur par la rapidité de l'analyse microscopique (la taille des individus les rend facilement observables). De plus, par leur observation et identification, il peut nous donner des indications sur la qualité de traitement et révéler d'éventuelles anomalies de fonctionnement. Par ailleurs, la présence des microfaunes à vitesse de croissance faible, signifie la bonne qualité de traitement et exprime le fonctionnement stable depuis une longue période (un ou plusieurs semaines). Elles sont aussi utiles pour la détection de la présence d'un élément toxique ; en effet, elles sont les premiers éléments de l'écosystème à être affectés par les toxiques. Pareillement, elles sont des bons indicateurs sur la gestion de l'oxygénation.

Cette microfaune joue un rôle de prédateur des bactéries isolées et des bactéries mortes et ainsi participe à la clarification des effluents par l'assimilation directe de la matière organique. Dans la plupart des cas, les bactéries à ingérer doivent être facilement disponibles donc présentes dans le milieu interstitiel ou à la surface du flocc, bien que certaines microfaunes puissent se nourrir des bactéries situées à l'intérieur de celui-ci. Dans ce cas, on peut résumer les principales activités de la microfaune biologique en deux points : elles participent à l'affinage du processus de traitement des eaux par une ingestion très importante de bactéries libres de l'eau interstitielle (on estime en moyenne qu'un

protozoaire peut ingérer la moitié de son poids en bactéries par heure). Secondairement, elles produisent une grande quantité de mucus, ces excréments contribuent en partie à la floculation qui est une phase indispensable pour le bon fonctionnement du processus épuratoire.

Selon l'organisation cellulaire des microorganismes, on distingue deux familles principales de microfaune : les protozoaires et les métazoaires (**Duchene and Cotteux 1993**).

#### ✓ **Les protozoaires**

Ce sont des organismes unicellulaires, très mobiles et de taille comprise entre 5 à 300 µm. Ils se nourrissent essentiellement de bactéries et de molécules organiques dissoutes. Le rôle principal de ces protozoaires est avant tout la clarification de l'effluent et l'identification de la nature des eaux à traiter. Ils sont très bons indicateurs du fonctionnement stable des stations d'épuration sur une durée assez importante (une à quelques semaines selon la densité). En effet cette microfaune est très sensible aux modifications environnementales et à la situation transitoire : substrats, oxygène dissous, toxiques.

L'existence de certains individus de protozoaires dans les boues activées donne un signe sur la présence de substances toxiques liées à la présence de produits chimiques utilisés par quelques industries tels que l'industrie de la chimie de synthèse, l'industrie textile, etc. D'autres protozoaires sont corrélés à une bonne oxygénation et aussi à une bonne qualité de traitement du carbone qui est généralement très complète (DCO inférieure à 15-20 mg/L) ou bien à une bonne nitrification d'azote (élimination partielle de l'azote).

Il existe un grand nombre d'espèces de protozoaires fixés ou mobiles au niveau des floes. L'âge des boues est un facteur important intervenant au niveau de la croissance des protozoaires. Ils se partagent en différentes classes comme les zooflagellés (*Bodo...*), les holotriches (*Litonotus...*), les ciliées péritriches (*vorticelles...*), les ciliés hypotriches (*Euplotes sp...*) etc...

#### ✓ **Les métazoaires**

Les métazoaires sont des organismes multicellulaires dont la taille peut aller de 100 µm à 1 mm. Leur organisation cellulaire est plus complexe que les microorganismes unicellulaires car l'ensemble de ces individus a des temps de génération très différents. Ce facteur de temps intervient dans la sélection des populations par l'intermédiaire de l'âge des boues du système. En effet, l'âge de boue, donc celui de la culture, est très différent selon le domaine de charge de l'installation (**Canler et al. 1999**). Egalement, le cycle de croissance de ces métazoaires est très lent.

Parmi les principaux métazoaires présents dans les boues activées des stations d'épuration, on retrouve essentiellement deux familles : les nématodes et les rotifères.

Les nématodes sont présents dans les boues subissant une digestion aérobie. Ils sont un signe de dépôt, s'ils se retrouvent probablement dans le bassin d'aération ou dans le décanteur statique à des densités significatives ( $> 3.10^5$  individus/L). Leurs rôles de prédateur bactérien permettent de contribuer au renouvellement de la biomasse épuratrice. Tandis que, les rotifères sont présents et se développent dans les boues âgées et bien oxygénées. Leurs présences aussi stimulent l'activité et la décomposition de la microflore (algues).

## **II.6. Les processus métaboliques**

Le métabolisme de la cellule bactérienne est l'ensemble des réactions chimiques permettant de convertir un élément nutritif en un autre à travers des transformations successives qui se déroulent à l'intérieur ou à l'extérieur d'une cellule pour lui permettre notamment de se maintenir en vie, de se reproduire, et de se développer. Certaines de ces réactions chimiques se déroulent en dehors des cellules microbiennes, comme le transport de substances entre cellules ; cependant, la plupart de ces réactions ont lieu dans les cellules elles-mêmes. Dans l'ensemble de ces réactions constituant le métabolisme, on distingue d'une part l'anabolisme et le catabolisme, et d'autre part la respiration endogène (**Bassompierre 2007;Coyette and Mergeay 2013**).

La connaissance et l'étude des processus métaboliques est essentielle car elle permet d'expliquer les phénomènes observés d'un point de vue macroscopique. Ils sont guidés par les huit énoncés élémentaires suivants:

- ✓ Chaque cellule acquiert des nutriments, qui sont les produits chimiques nécessaires comme éléments constitutifs et sources d'énergie pour le métabolisme ;
- ✓ Le métabolisme nécessite de l'énergie de la lumière ou du catabolisme des nutriments acquis ;
- ✓ L'énergie est souvent stockée dans les liaisons chimiques de l'adénosine triphosphate (ATP) ;
- ✓ A l'aide d'enzymes, les cellules catabolisent les molécules d'éléments nutritifs pour former des éléments simples appelés métabolites précurseurs ;
- ✓ En utilisant des métabolites précurseurs, d'autres enzymes et l'énergie de l'ATP, les cellules construisent des blocs de construction plus grands dans les réactions anaboliques ;

- ✓ Les cellules utilisent des enzymes et de l'énergie supplémentaire provenant de l'ATP pour lier les blocs de construction anabolique ensemble pour former des macromolécules dans les réactions de polymérisation ;
- ✓ Les cellules se développent en assemblant des macromolécules dans des structures cellulaires telles que des membranes et des parois cellulaires ;
- ✓ Les cellules se divisent généralement en deux une fois qu'elles ont doublé de taille (**Bauman 2018**).

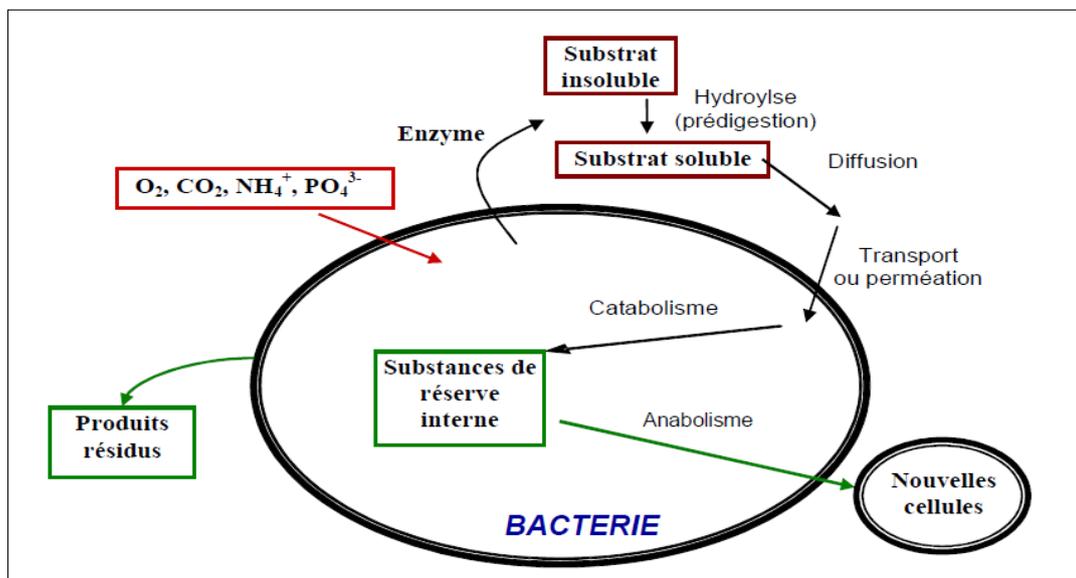
### **II.6.1. Le catabolisme**

Il correspond au processus de fragmentation des substances nutritives complexes en éléments plus simples dont certaines sont des métabolites précurseurs de l'anabolisme (**Figure II.5**). Il représente aussi l'ensemble des réactions d'oxydation et de dégradation enzymatique. C'est une activité exothermique qui libère l'énergie qui est stockée dans les liaisons de l'ATP et servira à la croissance et à l'entretien cellulaire (**Cardot 1999**).

### **II.6.2. L'anabolisme**

Les voies anaboliques sont fonctionnellement l'opposé des voies cataboliques dans la mesure où les voies anaboliques synthétisent les macromolécules et les structures cellulaires. Parce que construire quoi que ce soit nécessite de l'énergie, les voies anaboliques sont endothermiques, c'est à dire qu'elles nécessitent plus d'énergie qu'elles n'en libèrent. L'énergie requise pour les voies anaboliques provient généralement des molécules d'ATP produites lors du catabolisme pour développer la croissance et la division cellulaire (**Figure II.5**) (**Bassompierre 2007**).

Pour résumer, le métabolisme d'une cellule implique à la fois des voies cataboliques qui décomposent les macromolécules pour fournir des blocs de construction moléculaires et de l'énergie sous forme d'ATP, et des voies anaboliques qui utilisent les blocs de construction et l'ATP pour synthétiser les macromolécules nécessaires à la croissance et à la reproduction cellulaires.



**Figure II.5.** Métabolisme d'une bactérie hétérotrophe ou autotrophe

Les réactions de catabolisme et d'anabolisme sont très générales et sont, en fait, constituées de plusieurs réactions élémentaires. C'est la raison pour laquelle on préfère s'intéresser directement aux réactions aboutissant à la réduction de la teneur en matières polluantes et engendrant la croissance des bactéries sans faire de distinction entre catabolisme et anabolisme. Cinq réactions principales sont répertoriées (**Bassompierre 2007**) :

✓ **L'hydrolyse des chaînes complexes de matière organique biodégradable**

C'est une série de réactions enzymatiques extracellulaires appliquées aux substances absorbées (matières organiques colloïdales et azote organique particulaire) et qui ont lieu à la surface des microorganismes. Les molécules organiques complexes sont converties en molécules plus simples qui peuvent pénétrer dans la cellule par perméation ou transport.

✓ **L'oxydation de la matière organique biodégradable**

Une partie des matières absorbées par les microorganismes est utilisée pour fournir l'énergie nécessaire afin d'accomplir leurs fonctions biologiques.

✓ **L'ammonification**

C'est la première étape de la dégradation des déchets azotés organiques. L'azote organique est converti en ammoniacque par une réaction chimique ; cette réaction est complète en milieu des boues activées.

✓ **La nitrification**

En environnement aérobie, les bactéries *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* transforment l'azote ammoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) en présence d'oxygène pour se développer et produire des nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) puis des nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

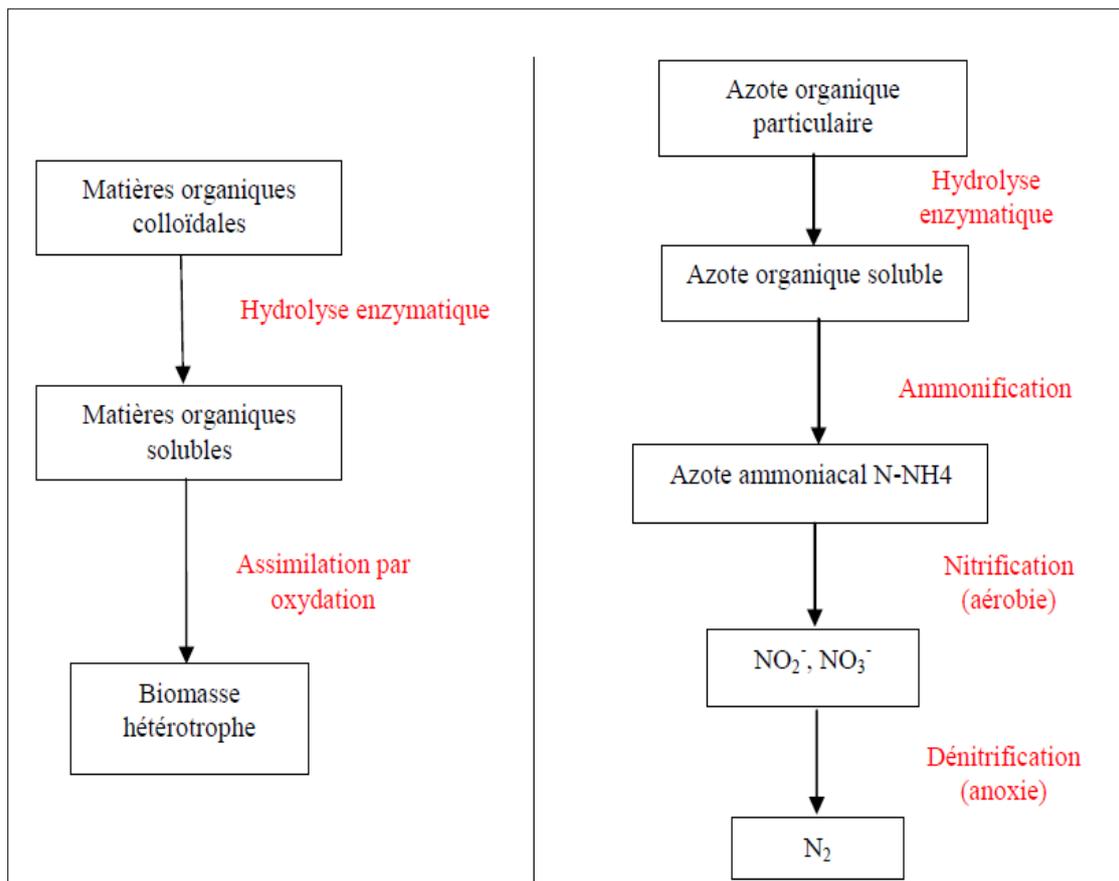
### ✓ La dénitrification

En environnement anoxique, certaines bactéries consomment les nitrates, à la place de l'oxygène, et le carbone pour se développer et produire de l'azote gazeux ( $N_2$ ).

### ✓ La mort cellulaire

Une fraction des produits de mortalité est biodégradable (matière organique colloïdale ou azote organique particulaire) et entre alors dans la boucle de dégradation des composés, l'autre partie représente les résidus endogènes inertes.

La figure II.6 présente les dégradations respectives de la matière organique biodégradable et de l'azote organique dans les procédés biologiques au travers de ces différentes réactions (Cardot 1999).



**Figure II.6.** Dégradation de la matière organique biodégradable et dégradation de la matière azotée dans les procédés biologiques

### II.6.3. La respiration endogène

Elle représentant l'étape d'oxydation des composés cellulaires, leurs dissociations en produits résidus (matières carbonée, azotée). Elle permet de satisfaire les besoins des cellules vivantes en cas de carence en substrat.

## **CHAPITRE III : *LA PHYTOREMEDIATION***

## CHAPITRE III : La phytoremédiation

### III.1. Introduction

Depuis les dernières décennies, les chercheurs ont mesuré l'importance de la capacité des plantes à stocker, dégrader, ou minéraliser les substances polluantes de l'environnement permettant la restauration des ressources essentielles que sont l'eau, les sols et l'air lorsqu'elles sont contaminées. C'est ce que l'on appelle la phytoremédiation (**Fournon 1999**) qui est souvent basée sur la présence d'une biomasse végétale importante dont les plantes sont sélectionnées et adaptées au stress chimique existant dans le système pollué. Ces possibilités d'adaptation sont très souvent liées à des plantes à multiplication rapide, possédant des temps de génération courts et dont les adaptations à des contraintes environnementales sont fréquentes (**San Miguel 2011**).

La création et la mise en place de cette stratégie est basée sur l'observation de scientifiques qui ont montré que certaines plantes terrestres ou aquatiques pouvaient se développer spontanément dans des milieux fortement pollués (**San Miguel 2011**). En effet, ils ont cherché à exploiter cette propriété et l'utiliser comme une méthode de traitement des pollutions. D'un point de vue pratique, certaines stratégies de phytoremédiation représentent un succès réel et qui sont utilisées communément de nos jours. C'est le cas des stations de lagunages à macrophytes (*Typha*, *Phragmites*, *Lemnacées*) utilisées pour purifier l'eau dont la charge polluante est diminuée par un couvert végétal approprié.

L'efficacité de la phytoremédiation dépend des propriétés physico-chimiques des polluants, de leurs modes d'action, de leurs biodisponibilités (type de site contaminé, teneur en matières organiques, etc.), des facteurs climatiques et des espèces végétales (**Susarla 2002**). Elle est une technologie de nettoyage efficace pour une variété de polluants organiques et inorganiques.

La présence des polluants organiques dans l'environnement est principalement d'origine humaine, beaucoup d'entre eux sont toxiques, et certains sont cancérigènes. Ces polluants sont rejetés dans l'environnement *via* les déversements (carburant, solvants), les activités militaires (explosives, armes chimiques), l'agriculture (pesticides, herbicides), l'industrie (textile, chimique, pétrochimique), etc. En fonction des propriétés de la matière organique, elle peut être accumulée et emprisonnée dans les diverses parties des plantes, dégradée dans la zone racinaire ou absorbée suivies d'une dégradation, d'une séquestration ou d'une volatilisation (**Pilonsmits 2005**). Par contre les polluants inorganiques sont des éléments naturels de la croûte terrestre ou de l'atmosphère, et les activités humaines telles que

l'exploitation minière, l'industrie, le trafic, l'agriculture et les activités militaires favorisent leur rejet dans l'environnement, entraînant une toxicité (**Nriagu 1979**). Ces contaminations inorganiques ne peuvent pas être dégradées, mais elles peuvent être phytoremédiées par stabilisation ou séquestration dans les tissus végétaux récoltables, telles que les macronutriments végétaux (nitrate et phosphate) (**Horne 2000**), les oligo-éléments tels que Cr, Cu, Fe, Mn, Mo et Zn (**Lytle et al. 1998**) et les éléments non essentiels tels que Cd, Co, F, Hg, Se, Pb, V et W (**Horne 2000; Blaylock and Huang 2000**).

La phytoremédiation a gagné en popularité auprès des agences gouvernementales et de l'industrie au cours des 20 dernières années. Cette popularité est basée en partie sur le coût relativement bas de cette technologie. Parce que les processus biologiques sont ultimement alimentés par l'énergie solaire, la phytoremédiation est en moyenne dix fois moins chère que les méthodes de remédiation basées sur l'ingénierie telles que l'excavation du sol, le lavage/le brûlage du sol, ou les systèmes de pompage et de traitement (**Glass 1999**). Elle jouit également d'une popularité auprès du grand public en tant qu'alternative « verte et propre » aux usines chimiques. De plus, il faut noter que les produits issus de la phytoremédiation peuvent être valorisés, exemple : compostage de la biomasse végétale, obtention d'énergie calorifique ou électrique, etc (**Flechas and Latady 2003**).

Cependant, il existe également des limites économiques à cette méthode. En effet, le facteur limitant de ces techniques reste le temps de restauration des milieux allant parfois au-delà d'une dizaine d'années, contrainte économique de gestion de l'espace et de son usage qui ne permet pas l'application systématique de cette technologie. Par ailleurs, les industriels hésitent parfois à l'emploi de cette méthode car juridiquement, tout traitement de dépollution d'une durée de plus de six mois entraîne le passage d'une installation classée légère à une installation classée lourde, ce qui entraîne un surcoût et des contraintes juridiques (**Sanmiguel 2011**). Aussi, les plantes qui interviennent dans le nettoyage doivent être là où se trouve le polluant et doivent pouvoir agir sur lui. Par conséquent, les propriétés du site contaminé, le niveau de toxicité et le climat devraient permettre la croissance des plantes. La phytoremédiation peut également être limitée par la biodisponibilité des polluants. Si seule une fraction du polluant est biodisponible, mais que les normes réglementaires de nettoyage exigent que tout le polluant soit éliminé, la phytoremédiation n'est pas applicable en soi (**Flechas and Latady 2003**).

Malgré ces inquiétudes et ces limitations, la recherche sur la phytoremédiation est très répandue. Les scientifiques explorent le pouvoir des plantes de faire face à la contamination, à la fois des métaux et des substances organiques toxiques, car cette

phytotechnologie reste toujours une alternative verte pour le traitement des sites et des eaux contaminées ; elle présente un impact positif sur l'environnement car elle utilise l'énergie du soleil pour la décontamination des sites pollués, contrairement aux techniques traditionnelles qui utilisent l'énergie fossile qui est malheureusement un grand polluant pour l'environnement.

## **III.2. Notions de toxicité et tolérance**

### **a) Notion de toxicologie et d'écotoxicologie**

Le terme toxicologie désigne « l'ensemble des investigations destinées à évaluer la toxicité des polluants sur les espèces vivantes » (Allais et al. 1979) ; il est défini comme « la discipline qui étudie les substances toxiques ou poisons c'est-à-dire les substances qui provoquent des altérations ou perturbations des fonctions de l'organisme conduisant à des effets nocifs donc le plus grave, de toute évidence, est la mort de l'organisme» (Allais et al. 1979). De ces définitions, il en vient à conclure que la notion de la toxicité est liée à l'ensemble des organismes vivants dans un écosystème. Son objectif étant de définir les doses dangereuses, des seuils admissibles de concentration en produits nocifs et de son devenir dans le milieu biologique (Triquet et al. 1998).

Cependant, l'écotoxicologie est définie comme étant la science de l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents contaminants naturels ou artificiels produits par l'activité anthropogénique, ainsi que leurs mécanismes d'action et leurs effets sur les organismes vivants dans la biosphère. Elle est également définie comme la discipline qui étudie les conséquences écologiques de la pollution de l'environnement par les substances toxiques (Cardeal et al. 1993). On assimile la toxicologie aquatique à une partie de l'écotoxicologie qui traite des écosystèmes aquatiques (Baudo 1987).

### **b) Définition d'un toxique**

Une substance est dite toxique lorsque sa présence à une concentration donnée dans le milieu considéré ou bien son absorption à une dose donnée, entraîne chez les organismes vivants des perturbations du fonctionnement de la fonction métabolique ou physiologique susceptible d'aboutir à la mort, ou provoque des altérations des fonctions de l'organisme au niveau moléculaire, cellulaire ou de l'organisme (Lundahl 1974).

### **c) Manifestation de la toxicité**

La toxicité est la manifestation quantitative ou qualitative des concentrations des produits nocifs donnés dans un milieu, ou son absorption se fait à des doses données. Ceci entraîne

des conséquences directes sur les organismes vivants du milieu. Elle admet diverses manifestations auprès de ces organismes vivants qui peuvent être des stress pour les plantes, des troubles de fonctions physiologiques et métaboliques chez des organismes supérieurs pouvant aboutir à la mort.

On peut résumer cette manifestation de deux manières (OCDE 2002) :

- **Manifestation indirect** : par l'accumulation des produits nocifs tout au long d'une chaîne alimentaire (bioaccumulation), et l'apparition des effets toxiques se faisant vers la fin de la chaîne trophique (absorption radriculaire chez les plantes, digestion chez les animaux, etc.).
- **Manifestation direct** : au niveau d'une espèce, où on distingue en général trois formes de manifestations (Allais et al. 1979) :

*Toxicité aiguë* : elle est la manifestation la plus spectaculaire de la nocivité d'un poison. Elle résulte d'une exposition ou d'une absorption de courte durée pouvant entraîner une mort certaine dans l'immédiat. Ces essais sont généralement réalisés sur des organismes jeunes pendant une période de 24 à 76 h et est déterminée par une CL<sub>50</sub> pour les poissons et d'un CE<sub>50</sub> pour les algues et crustacés (OCDE 2002).

*Toxicité subaiguë* : elle résulte de l'exposition fréquente ou répétée sur une période de plusieurs jours ou semaines (Lauwerys 1982). Dans cette forme de toxicité, une proportion significative de population peut survivre à l'intoxication, bien que présentant des signes cliniques liés à l'absorption du toxique (OCDE 2002). Dans ce contexte, l'admission de doses ou du maintien de l'organisme dans le milieu renfermant une concentration définie en substance à étudier pendant des durées définies atteint moins de 10 % de la durée de vie de l'organisme étudié (Allais et al. 1979; OCDE 2002).

*Toxicité chronique*: Elle suppose une exposition continue de très faibles quantités de contaminant sur une espèce à une longue période. Cette exposition peut aller de plusieurs jours à toute une vie, voire davantage selon le cycle reproductif de l'organisme à étudier (Ramade 1992). Cette forme de toxicité résulte de l'effet cumulatif de certaines substances qui vont être partiellement ou totalement retenu dans un organisme vivant. Cet effet est capable de provoquer des manifestations toxiques ainsi que des bouleversements physiques, chimiques et physiologiques de l'espèce (Lauwerys 1982).

- **Evaluation de la toxicité d'un écosystème**

La détermination de la concentration d'un toxique dans un écosystème donné n'est pas souvent suffisante pour la protection de l'environnement. De plus, les méthodes chimiques d'analyse quantitative des toxiques peuvent se révéler coûteuses, insuffisantes et moins

difficiles (OCDE 2002). C'est pourquoi l'approche biologique a été envisagée, car ces méthodes sont simples, rapides fiables et nécessaires pour fournir des informations sur les risques potentiels dus aux toxiques donnés (Baudo 1987).

- **Notion de biomonitoring**

Le biomonitoring a pour objectif d'évaluer l'impact de la pollution en fonction du temps à l'un des niveaux de l'édifice biologique d'un écosystème. Il existe plusieurs types de monitoring. On peut juste citer le monitoring physiologique et le monitoring chimique. Dans ce dernier, on estime les quantités de polluants accumulées ou accumulatrices dans une chaîne trophique (Phillips and Rainbow 1994).

Dans le cadre du suivi de l'impact des différents polluants toxiques et leurs répartitions dans l'écosystème, les macrophytes aquatiques ainsi que les algues sont beaucoup utilisées (Whitton et al. 1982). Ainsi, le biomonitoring intervient dans l'étude des échantillons de ces macrophytes ou/ et algues exposées à ces polluants afin de détecter la présence d'un biomarqueur d'exposition.

- **Les biomarqueurs**

Un biomarqueur est défini comme étant toute modification biochimique, physiologique et morphologique dans les plantes permettant d'évaluer la phytotoxicité contenues dans les milieux contaminés et de mesurer leur exposition à des substances toxiques. Il est à signaler que l'efficacité d'une espèce et donc d'un biomarqueur dépend du degré d'adaptation au stress environnemental des populations étudiées et de leur homogénéité (N.A.S.N.R.C 1989).

- **Les bioessais**

Un biotest est le résultat d'une observation comportementale d'un individu ou d'un groupe d'individus homogènes face aux conditions expérimentales bien définies, avec le milieu test (Biney et al. 1994). Etant donné les différentes sensibilités face aux toxiques qui font l'objet de taxons, le choix de l'espèce bioindicatrice est très complexe (Erickson et al. 1998). L'élevage et le maintien des espèces à étudier est donc une opération délicate puisqu'ils doivent refléter avec fidélité les tests envisagés. Dans les effets recherchés, les polluants peuvent se manifester par leur toxicité immédiate ou toxicité « aiguë » ; dans ce cas, les effets observés sont généralement des effets létaux. La toxicité chronique et l'accumulation des substances le long d'une chaîne alimentaire sont décrits par des modifications morphologiques, des modifications de la croissance, de

la reproduction, de l'activité métabolique et ou du comportement (**Allais et al. 1979; Gong et al. 2005**).

- **Les bioindicateurs**

Un indicateur biologique est un organisme ou un ensemble d'organismes qui par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un éco complexe et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées (**Blandin 1986**).

- d) Utilisation des lentilles d'eau comme bioindicateurs**

L'accumulation de certains polluants par les organismes bioaccumulateurs facilite leur mise en évidence et leur quantification par des méthodes chimiques et/ou physiques en procédant à l'analyse d'échantillons de milieux naturels par les micropolluants, notamment au travers des réseaux de biosurveillance. Ceci fait des plantes aquatiques de bons bioindicateurs (**Triquet et al. 1982**). L'utilisation des lentilles d'eau comme bioindicateurs est un outil irremplaçable pour la recherche écologique. Actuellement, des études en laboratoire et sur le terrain ont fourni des informations importantes sur la capacité de ces plantes aquatiques à agir comme bioindicateurs de la qualité de l'environnement (**Ferrat et al. 2003**). L'espèce *Lemna gibba*, est utilisée pour les études de la qualité de l'eau pour surveiller les métaux lourds et d'autres polluants organiques, car, comme d'autres macrophytes aquatiques vasculaires, elle peut accumuler de manière sélective certaines substances chimiques présentes dans les écosystèmes (**Salt et al. 1995**). Ces plantes peuvent ainsi être le reflet des eaux dans lesquelles elles se situent, et permettant d'obtenir une évaluation globale de la qualité environnementale du milieu (étude des réactions physiologiques liées au stress) et des concentrations environnementales de polluants particuliers (analyses des tissus) (**Cymerman and Kempers 2001**). Ces lentilles d'eau possèdent les différentes qualités suivantes (**Wehr and Whitton 1983**) :

- Elles ont des propriétés physiologiques intéressantes (taille réduite, taux de multiplication élevés et bonne propagation végétative) qui en font un système de test idéal (**Radie et al. 2011**). De plus, le test d'inhibition de la croissance est simple, sensible et économique.
- Elles n'ont pas de racines, ce qui les préserve de l'influence de leur substrat et leur permet de refléter uniquement la qualité de l'eau en établissant un échange direct entre les feuilles et l'eau ;

- Elles n'ont pas de système vasculaire, ce qui limite les transferts internes des polluants dans l'organisme ;
- Elles se développent pratiquement toute l'année et leurs peuplements sont très stables dans le temps et l'espace ; les espèces sont communes, abondantes et largement réparties géographiquement à travers le globe (**Wehr and Whitton 1983; Radie et al. 2011; Smith 1978; Hillman and Culley 1978**) ;
- Elles résistent à de fortes concentrations en métaux et à des pollutions importantes ;
- Elles ont aussi un autre avantage qui est d'utiliser de nombreux composés organiques et peuvent croître même en l'absence de lumière (**O.I.E 1984**) ;
- Elles possèdent une forte capacité d'accumulation des polluants : leurs facteurs de bioaccumulation sont souvent les plus élevés de tous les compartiments de l'écosystème aquatique (**Claveri et al. 1994**) ;

Leur collecte, leur manipulation, leur transport et leur conservation sont aisés (les individus sont de taille réduite ce qui facilite l'échantillonnage) elles accumulent très rapidement (de quelques heures à quelques jours) un grand nombre de micropolluants et se décontaminent (pour les métaux) en quelques semaines à quelques mois (**O.I.E 1984; Mersch 1993; Vray et al. 1992**), ce qui permet la détection des pollutions accidentelles (**Say et al. 1981**).

#### ✓ **Tests biologiques de toxicité**

En général, les tests biologiques de toxicité font partie des bioindicateurs ; ce sont des tests expérimentaux réalisés pour identifier et évaluer le potentiel toxique de substances rejetées par des effluents, ou d'un mélange de substances par la réponse biologique d'organismes vivants. Ils permettent de déterminer les concentrations avec effets ( $CE_{10}$ ,  $CE_{50}$ ,  $LOEC$ ...) ou sans effet ( $NOEC$ ) (**OCDE 2006**). Mais, ces tests biologiques doivent être obligatoirement complétés par des études sur le milieu récepteur, portant sur les indicateurs biologiques de l'écologie d'une manière générale.

Les tests de toxicité représentant l'aspect analytique des études écotoxicologiques, permettent d'établir les relations entre les quantités de toxiques absorbées et les différents effets biologiques sur les organismes des milieux naturels. L'action des substances toxiques sur les organismes vivants peut se traduire par divers effets biochimiques ou physiologiques facilement quantifiable dont le plus important est la mort des organismes, mais aussi des troubles physiologiques (stérilité, ralentissement de la croissance, etc.) (**Baudo 1978**).

Ces essais de toxicité sont normalisés par les lignes directives des diverses organisations internationales telles que : l'Organisation Internationale de Coopération et de Développement Économiques (OCDE), l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO), l'Association Française de Normalisation (AFNOR), etc....(OCDE 2006).

- **Le principe des essais**

Des monocultures du genre *L.gibba*, en phase de croissance exponentielle, sont exposées à différentes concentrations de la substance d'essai sur une période de quatre jours. Chaque essai doit inclure des témoins sans substance d'essai, placé dans des conditions environnementales identiques. Les tests de toxicité visent à quantifier les effets de la substance toxique sur la multiplication végétative des lentilles d'eau durant cette période, et le nombre de frondes représente la première variable à mesurer dans le but de calculer le taux de croissance moyen. La croissance des lentilles d'eau dans les solutions expérimentales est comparée à celle des témoins et la concentration induisant une inhibition de la croissance (par exemple 50%) est exprimée sous la forme de CIx (par exemple CI<sub>50</sub>). La concentration minimale avec effet observé (CMEO ou LOEC) et la concentration sans effet observé (CSEO ou NOEC) peuvent aussi être déterminées (OCDE 2006).

- **Symptômes morphologiques de toxicité**

Le seuil de toxicité d'une substance est la concentration maximale à laquelle aucun signe de toxicité n'est observé au niveau des tissus végétaux. Les signes morphologiques de toxicité dans le cas particulier des espèces *Lemna* concernent :

*La chlorose* : dépigmentation des frondes (virages du vert au jaune) ;

*La dislocation des colonies* : séparation des frondes ;

*La nécrose* : morte localisée de tissu (points bruns ou blancs sur les frondes) ;

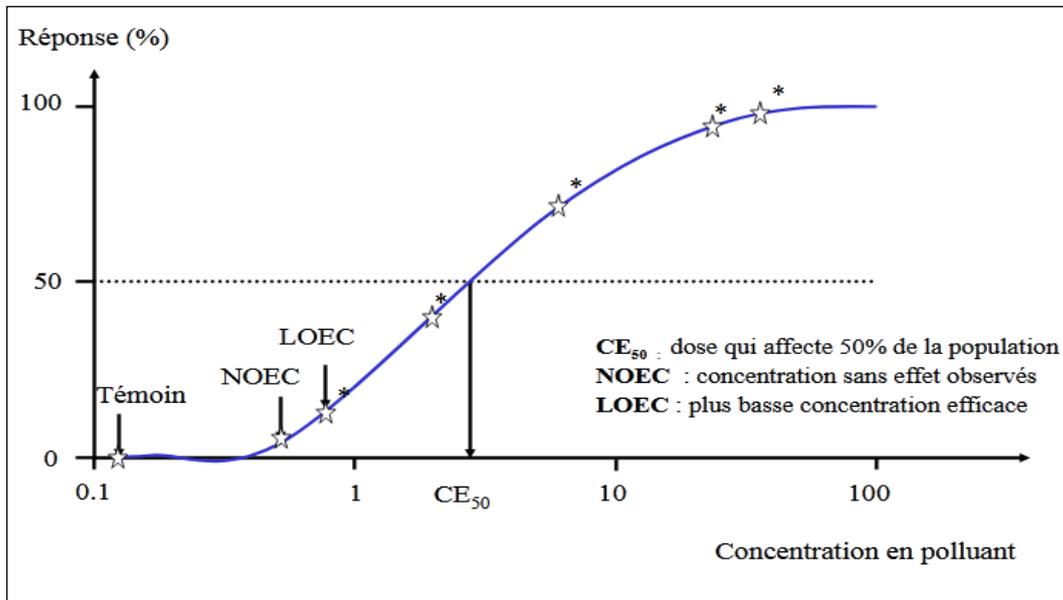
*La réduction de la croissance* : diminution de biomasse ou de vitesse de croissance (OCDE 2006).

- **Mesure des paramètres inhibiteurs de croissance – étude dose-réponse :**

Les organismes vivants réagissent à une substance toxique selon la quantité ou la dose qu'ils reçoivent de ce produit. Le but des études dose-réponse est d'estimer la relation entre la quantité de substance reçue et le risque qu'elle peut causer chez l'organisme (inhibition de la croissance, reproduction, etc.). L'utilisation des tests de toxicité passe par la définition de valeurs remarquables déterminées sur la base de données fournies par le biotest utilisé. Elles sont issues de la corrélation qui existe entre la dose d'exposition et

l'effet toxique (inhibition de la croissance par exemple) représentée sous la forme d'une courbe dose-réponse.

La corrélation existant entre la dose d'un élément et sa toxicité est représentée par une courbe dose-réponse représentée ci-dessous (**Figure III.1**) :



**Figure III.1.** Relation entre les doses et les effets (dose-réponse) et les valeurs remarquables NOEC, LOEC et  $CE_{50}$  (**Perrodin et al 2011**)

a) **Détermination de la  $CI_x$**  : la  $CI_x$  est la concentration inhibant X% de la croissance d'une population d'être vivants. Elle est déterminée à partir de la droite obtenue par régression linéaire de la fonction : croissance = f (concentrations). Dans la majorité des travaux relatifs à l'effet toxique d'une substance, on détermine la concentration inhibant 50% de la croissance, soit la  $CI_{50}$ , (d'autres valeurs peuvent également être utilisées comme la  $CI_{10}$  et la  $CI_{90}$ ).

Pour déterminer la  $CI_x$ , les concentrations expérimentales doivent entourer la valeur de la  $CI_x$  afin que le niveau de confiance soit suffisant. Par exemple, s'il s'agit d'estimer la  $CI_{50}$ , la concentration expérimentale la plus élevée doit dépasser la valeur de la  $CI_{50}$ . Si la  $CI_{50}$  sort de la gamme des concentrations expérimentales, les intervalles de confiance seront larges et il risque d'être impossible d'évaluer correctement la validité de l'ajustement statistique du modèle.

b) **Détermination de la LOEC (valeur de faible effet)** : La LOEC est la concentration minimale de la substance ayant un effet inhibiteur sur le végétal.

c) **Détermination de la NOEC (valeur de non effet)** : La NOEC est la concentration maximale pour laquelle aucun effet n'est observé (l'effet n'est pas différent de celui des contrôles).

Pour estimer la LOEC (CMEO) et la NOEC(CSEO), la plus petite concentration expérimentale doit être suffisamment basse pour que la croissance des lentilles d'eau ne soit pas ralentie de manière significative par rapport à celle des témoins. De plus, la concentration expérimentale la plus élevée doit être suffisamment élevée pour que la croissance soit sensiblement inférieure à celle des témoins. Si ce n'est pas le cas, l'essai devra être répété à une gamme de concentrations différente (à moins que la concentration la plus élevée atteigne la limite de solubilité ou, la concentration limite supérieure autorisée, par exemple 100 mg/L).

Les valeurs LOEC et NOEC se réfèrent à des effets sur la survie, le développement, la reproduction, la croissance et les changements morphologiques. La variabilité des résultats d'essais correspond à la variation des conditions expérimentales. De plus pour assurer leur fiabilité il faut un nombre important de répliques (même expériences, même concentration) lors d'un test écotoxicologique.

### **III.3. Définition et principe de la phytoremédiation**

La phytoremédiation « phyto » = plante et « remedium » = rétablissement de l'équilibre (ou phytorestauration), est apparue ces dernières années comme étant une alternative de dépollution plus économique et plus respectueuse de l'environnement qui s'applique à de très grandes surfaces et à des contaminations superficielles. Elle permet d'élaborer un tampon entre les zones polluées et la biosphère (**Clémence 2008**). Le principe de la phytoremédiation repose sur l'utilisation de différentes plantes pour décontaminer l'environnement et/ou minimiser les risques écotoxicologiques dans les relations sources, exposition, récepteurs. Elle regroupe plusieurs technologies relativement différentes mais toutes basées sur l'emploi des plantes qui développent des mécanismes complexes afin d'extraire, de dégrader ou d'immobiliser les contaminants organiques et inorganiques contenus dans les sols, les sédiments, les boues, les eaux de surface et souterraines ou dans l'air. Ces plantes fixatrices absorbent les polluants à travers leurs racines et leurs feuilles, lesquels sont ensuite transportés dans d'autres parties de la plante pour être utilisés, transformés, dégradés ou stockés (**Chevrier 2013; Adki et al. 2013**). La phytoremédiation des polluants par les plantes terrestres ou aquatiques est généralement différente pour les

matières organiques et inorganiques. Les contaminations organiques sont généralement des xénobiotiques pour la plante. En conséquence, il n'y a pas de transporteurs spécialisés de ces composés dans les membranes végétales, donc l'absorption de ces polluants organiques à l'intérieur des tissus végétaux est effectuée selon l'hydrophobicité de ces composés (**Briggs et al. 1982; Trapp and McFarlane 1994**). Les composants qui ont une certaine aversion pour l'eau (hydrophobes) peuvent pénétrer et se déplacer à travers la bicouche lipidique des membranes cellulaires par simple diffusion, en passant de la région la plus concentrée (le site contaminé) vers la région la moins concentrée (l'intérieur de la racine). Ceux qui ont une trop forte affinité pour les lipides resteront bloqués dans la paroi cellulaire, et ils ne peuvent pas pénétrer dans les fluides cellulaires, tandis que ceux qui ont une trop grande affinité pour l'eau ne seront tout simplement pas absorbés. Une fois dans les plantes, les composants organiques peuvent être liés à d'autres molécules (conjugaison) et entreposés ou encore dégradés (par des enzymes) (**Pilonsmits 2005**). En revanche, les substances inorganiques sont absorbées par des processus biologiques via des protéines de transport membranaire qui sont des macromolécules organiques ou des acides organiques synthétisés par les plantes pour faciliter l'absorption, le transport, l'entreposage et la tolérance des plantes à ces éléments composés métalliques. Ces transporteurs se produisent naturellement parce que les polluants inorganiques sont soit des nutriments eux-mêmes (par exemple, nitrate, phosphate, cuivre, manganèse, zinc) ou sont chimiquement similaires aux nutriments et sont absorbés par inadvertance (par exemple, l'arséniate est absorbé par les transporteurs de phosphate, le sélénate par les transporteurs de sulfate) (**Abedinet al. 2002; Muthusarayanan et al. 2018**).

#### **III.4. Techniques et mécanismes de phytoremédiation**

Aujourd'hui, le terme de phytoremédiation est largement utilisé et rassemble toutes les méthodes basées sur l'utilisation de végétaux terrestres ou aquatiques dans un but d'extraire des matrices contaminées, les stocker, les transférer et/ou les détoxifier. Elles permettent aussi de réduire le risque de dégradation des écosystèmes naturels par différents mécanismes. Les différentes techniques définissant le terme générique de phytoremédiation sont principalement divisées en cinq processus: la phytostabilisation, la phytoextraction, la phytovolatilisation, la phytodégradation et la rhizofiltration (**Muthusarayanan et al. 2018; Hakeem et al. 2014**); ils sont basés sur le type de polluant, du végétal et de son milieu (**Figure III.2**).

✓ **Phytostabilisation** : Celle-ci est réalisée grâce aux végétaux qui ont le pouvoir de fixer et de réduire la mobilité et la biodisponibilité des polluantes dans l'environnement par la diminution de leurs potentiels de dispersion dans les eaux de surface et souterraines (Fournon 1999) ; les composés polluants sont immobilisés en se liant chimiquement par précipitation, stabilisation, absorption ou piégeage par la plante. Dans ce processus, les plantes utilisées doivent avoir un système racinaire très développé qui permet l'adsorption, l'absorption et l'accumulation de contaminants dans leurs tissus (Segura and Ramos 2013) pour empêcher le mouvement des contaminants vers les eaux souterraines et leurs migrations vers le sol de surface et plus loin avec le ruissellement des eaux de pluie (E.P.A 1999). De plus, elles devraient avoir une faible capacité d'accumulation de polluants dans leurs parties aériennes et une tolérance élevée aux variations de pH, de salinité et d'humidité du site pollué (Cunningham and Berti 1993). (Plechovka and Klink 2014) ont mené une étude sur les capacités de phytoremédiation de l'alpiste rouge (*Phalaris arundinacea*) vis-à-vis des métaux traces Zn, Fe, Mn, Pb, Cu, Ni, Cd, Co et Cr accumulés dans l'eau et les sédiments. Les résultats ont montré différentes concentrations de métaux traces dans divers organes de la plante, les concentrations les plus élevées étaient dans les racines et les plus faibles dans les feuilles. Les auteurs ont conclu que la translocation limitée des métaux traces absorbés par fait de cette plante une espèce potentielle pour la phytostabilisation des sédiments contaminés par des métaux (en particulier de Co et Cd).

✓ **Phytoextraction** : (Appelé aussi phytoaccumulation), celle-ci est effectuée par l'utilisation des plantes accumulatrices et/ou hyperaccumulatrices de polluants, et qui sont, soit à forte production de biomasse, comme par exemple *Brassica juncea* (ou moutarde indienne) (Salido et al. 2003), dont la taille compense le faible pourcentage d'accumulation, soit des plantes de biomasse parfois plus faible, mais qui sont capables d'emmagasiner de grandes quantités des polluants (Morikawa and Erkin 2003). Ces plantes sont susceptibles de tolérer et d'accumuler dans leurs tissus (feuilles, tiges, racines) des métaux (Dalcorsio et al. 2019) et des matières organiques du sol et des eaux usées. Ces polluants sont prélevés par les racines de ces plantes accumulatrices puis transférés dans leurs parties aériennes où ils sont séquestrés dans les feuilles (Fournon 1999). Il existe deux catégories de phytoextraction: les processus continus et induits. La phytoextraction continue utilise des plantes qui accumulent des niveaux élevés de contaminants toxiques tout au long de leur cycle de vie, et la phytoextraction induite implique l'utilisation de chélateurs dans une phase particulière de la croissance des plantes, ce qui augmente

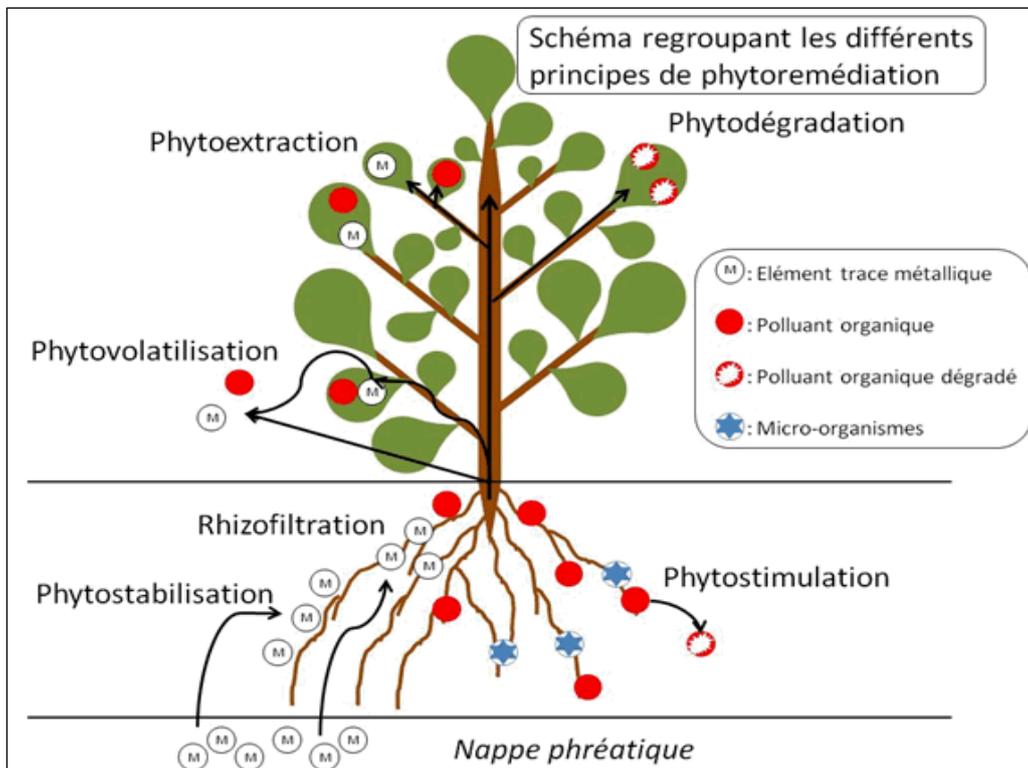
l'accumulation de toxines dans les tissus végétaux (Starck 2005). (Magdalena et al. 2012) ont étudié la tolérance de *Potamogeton pusillus* vis-à-vis du Cr et du Cu ainsi que sa capacité d'élimination de ces métaux d'une solution aqueuse. Les auteurs ont montré que les racines et les feuilles de *P. pusillus* accumulent de plus grandes quantités de Cu et de Cr que les tiges. Ils concluent qu'il peut être recommandé pour l'utilisation dans la phytoextraction des métaux lourds présents dans des eaux contaminées.

✓ **Phytovolatilisation** : C'est un mécanisme particulier par lequel les plantes phytoextractrices peuvent transformer les contaminants du sol ou des eaux pollués en éléments volatiles et les relâchent dans l'atmosphère via les zones foliaires d'échanges gazeux que sont les stomates (Zayed and Terry 1994). Ce processus est observé pour des composants organiques volatiles (COV) et certains composés inorganiques extraits de sites contaminés puis transportés dans leurs systèmes vasculaires, et relargués enfin dans l'atmosphère par transpiration (Taghavi et al. 2005; Barac et al. 2004). Ce mécanisme est principalement utilisé pour la purification de l'eau et des sols contaminés par le sélénium (Se), le mercure (Hg) ou l'arsenic (As) et des composés organiques tels que le trichloréthylène, le benzène, le nitrobenzène, le phénol et l'atrazine (Goncalves et al. 2007). Néanmoins, ce mécanisme est négatif en termes de phytoremédiation puisque la pollution se trouve déplacée d'un compartiment à un autre sans diminution quantitative de la charge polluante et parfois sans diminution du pouvoir toxique de ces polluants.

✓ **Phytodégradation** (ou phytotransformation) : Un contaminant peut être détoxiqué (voire complètement minéralisé) par les systèmes enzymatiques des plantes qui sont capables de catalyser la dégradation des substances absorbées ou adsorbées (Alkio et al. 2005). Cette métabolisation peut avoir lieu dans les tissus de la plante ou dans les microorganismes associés de la rhizosphère (rhizodégradation). La plante peut exsuder des substances nutritives vitales au développement des microorganismes qui pourront jouer un rôle bénéfique de la biodégradation des polluants organiques (Kumar et al. 2019). On parle alors de rhizodégradation, de phytostimulation ou encore de biorémédiation (San Miguel et al. 2011). Cette technique de la phytodégradation est utilisée pour le traitement des sols, des sédiments fluviaux et des boues ainsi que des eaux souterraines et de surface (Hasanuzzaman et al. 2020). La dégradation des composés organiques peut être complète (générant des éléments inorganiques comme le CO<sub>2</sub>, l'eau ou le Cl<sub>2</sub>), mais elle peut aussi être incomplète, entraînant la formation d'intermédiaires stables (appelés métabolites) qui peuvent être entreposés dans la plante (Pilon-smits 2005). La dégradation des produits organiques peut se faire dans les racines ou dans les parties

aériennes des plantes, grâce à des enzymes comme les déhalogénases, les oxygénases et les réductases (Black 1995). Si c'est généralement l'activité enzymatique des plantes qui provoque la dégradation, elle peut aussi être issue de l'activité des microorganismes qui vivent dans les plantes, qu'on appelle alors des endophytes (Pilonismitz 2005). (Zazouli et al. 2014) ont étudié la capacité d'*Azolla filiculoides* à éliminer le bisphénol A (BPA) des solutions aqueuses. L'efficacité d'élimination était supérieure à 90% lorsque la concentration de BPA était de 5 ppm et la quantité de biomasse était de 0,9 g. Les auteurs ont conclu que *A. filiculoides* élimine le BPA de la solution aqueuse par la dégradation des contaminants par les processus métaboliques de la plante ou par la dégradation des contaminants environnants par les enzymes produites et sécrétées par la plante.

✓ **Rhizofiltration** (qui est une méthode de phytoaccumulation) : C'est l'utilisation des racines des plantes aquatiques ou des plantes terrestres pour absorber ou adsorber des polluantes, principalement des métaux (Hakeem et al. 2014) et certains composés organiques comme les pesticides dans des solutions aqueuses, et aussi l'emploi des communautés microbiennes de la rhizosphère pour faciliter l'absorption ultérieure des polluants primaires et secondaires par la plante (Fournon 1999; Sanmiguel 2011). On peut traiter aussi avec la rhizofiltration, les eaux usées municipales ou industrielles, le ruissellement de surface ou l'eau qui s'infiltre dans le sol en zone agricole, le lixiviat des mines et des sites d'enfouissement, ou encore la contamination de l'eau souterraine (Pilonismitz 2005; Glass 1999). Les plantes utilisées dans cette méthode doivent être hautement tolérantes aux composés toxiques, résistantes à une faible concentration d'oxygène et doivent avoir un système racinaire étendu, qui se développe rapidement et produit de grandes quantités de biomasse (Srivastava et al. 2014). Pratas et al. 2014 ont étudié la capacité de trois espèces végétales (*Callitriche stagnalis*, *Potamogeton natans* et *P. pectinatus*) cultivées dans le système de phytofiltration de laboratoire à réduire la concentration d'uranium (U) dans l'eau contaminée. Ils ont observé une absorption rapide d'uranium, entraînant une réduction de sa concentration dans l'eau pouvant atteindre 85,5%.



**Figure III.2.** Principales techniques de phytoremédiation

Les différentes technologies de phytoremédiation décrites ci-dessus sont adaptées à différentes classes de polluants, en fonction du type de pollution et des matrices contaminées (**Tableau III.1**), de nombreuses études ont permis de lister les mécanismes mis en jeu lors de choix et de l'application des techniques de phytoremédiation sur les différents types de polluants, et sur les divers sites contaminés (**San Miguel A 2011**). En effet, la rhizofiltration dans une installation confinée à l'intérieur est relativement coûteuse à mettre en œuvre et donc plus utile pour des volumes relativement petits d'eaux usées contenant des substances inorganiques dangereuses telles que les radionucléides (**Dushenkov and Kapulnik 2000; Negri and Hinchman 2000**). Le principe de la phytostabilisation est utilisé, par exemple, lorsque des chapeaux végétatifs sont plantés sur des sites contenant des polluants organiques ou inorganiques, ou lorsque des plantes sont utilisées comme barrières hydrauliques pour empêcher le lessivage ou le ruissellement de contaminants organiques ou inorganiques. Les plantes peuvent également être utilisées dans ce que l'on appelle des bandes tampons pour intercepter la migration horizontale des panaches d'eaux souterraines polluées et rediriger le flux d'eau vers le haut (**Mccutcheon and Schnoor 2003**). La phytoextraction est principalement utilisée pour les métaux et autres substances inorganiques toxiques (Se, As, radionucléides), ainsi que certains polluants organiques (**Banuelos and Meek 1990; Blaylock and Huang 2000**). La phytostimulation est utilisée pour les matières organiques hydrophobes qui ne peuvent pas

être absorbées par les plantes mais qui peuvent être dégradées par les microbes. La phytovolatilisation peut être utilisée pour les composés organiques volatiles (COV) (Winnike-McMillan et al. 2003), et pour quelques substances inorganiques qui peuvent exister sous forme volatile, comme le Sélénium (Se) et le Mercure (Hg) (Hansen et al. 1998; Rough et al. 1996).

**Tableau III.1.** Différents types de traitements en fonction du polluant à extraire ou à traiter (Morikawa and Erkin 2003)

Types	Produits chimiques traités
<b>Phytoaccumulation/phytoextraction</b>	Cadmium, Plomb, Nickel, Zinc et autres métaux lourds, BTEX (Benzène, Ethylbenzène, Toluène et Xylènes), Pentachlorophénol, composés aliphatiques à chaîne courte et autres composés organiques.
<b>Phytodégradation/ phytotransformation</b>	Munitions (Nitrobenzène, Nitroéthane, Acide picrique), Atrazine, solvants Chlorés (Tétrachlorure de Carbone, Tétrachloroéthylène, Acide Dichloroacétique), Bromure de Méthyle, autres pesticides à base de Chlore et de Phosphore...etc.
<b>Phytostabilisation</b>	Prouvé pour les métaux dans les bassins de résidus miniers et attendu pour les Phénols et les solvants Chlorés (Trichlorométhane et Tétrachlorométhane) etc...
<b>Phytostimulation</b>	Hydrocarbures Polycyclicaromatiques, BTEX, autres Hydrocarbures pétroliers et autres composés organiques...etc.
<b>Phytovolatilisation</b>	Solvants Chlorés (Tétrachloroéthane, Trichlorométhane et Tétrachlorométhane), Mercure et Sélénium.
<b>Rhizofiltration</b>	Métaux lourds, produits chimiques organiques et radionucléides.

### III.5. Espèces végétales utilisées en phytoremédiation

L'idée d'utiliser des végétaux pour la décontamination de l'environnement est survenue après avoir observé que certaines plantes se développaient dans des sites pollués, telle que

les cours d'eau chargés en substances organiques (eaux résiduaires urbaines et industrielles), des étendues d'eau naturelles ou artificielles chargées en matières nutritives, qui sont des sièges d'une multiplication excessive de plantes terrestres ou aquatiques. En effet, ces plantes deviennent alors un système de pompage et de filtration dont les racines et les feuilles sont les extracteurs pouvant trouver, altérer et/ou transporter des éléments et des composés contre des gradients chimiques importants. En outre, le choix de l'espèce végétale est essentiel, plus de 800 espèces végétales se prêtent à la phytoremédiation (A.D.E.M.E 2006) et les plantes sélectionnées en vue d'une utilisation en phytoremédiation doivent, si possible, présenter un bon compromis des qualités suivantes (Keller et al. 2003; Chaudhry et al. 2002) : elle doivent être hypertolérante aux concentrations en polluants, être hyperaccumulatrices, poussent rapidement et atteignent une biomasse élevée avec un système foliaire et racinaire développé ; cela leur permet d'être en contact avec un plus grand volume de site contaminé et de pouvoir en extraire davantage de contaminants, avoir une activité photosynthétique intense, permettre un transport et un stockage à taux élevé, permettre une extraction rapide et peuvent être récoltées facilement, être dotées de mécanismes internes pour métaboliser des polluants, être adaptables au climat local, avoir une certaine résistance aux insectes et aux maladies, et permettre une facilité de gestion. Dans ce sens, de nombreux travaux ont été élaborés dans le but d'étudier la relation entre la pollution et les végétaux. Sous cet aspect, on a pu établir une classification des végétaux et de plantes susceptibles d'intervenir dans les processus de phytoremédiation, on distingue donc :

- Les végétaux victimes de la pollution ;
- Les végétaux bioindicateurs de la pollution qui peuvent être, soit indicateurs soit tolérants de substances toxiques, et qui sont en général des populations d'espèces communes adaptées aux sites pollués. Ces végétaux sont potentiellement utiles pour la phytostabilisation et la phytovolatilisation ainsi que pour l'étude des mécanismes de tolérance mais leurs capacités d'accumulation des contaminants dans les parties aériennes sont faibles. Elles présentent donc peu d'intérêt pour la phytoextraction (Clémence 2008) ;
- Les végétaux accumulatrices et/ou hyperaccumulatrices qui développent des mécanismes de résistance contre certains polluants, que ce soit par la capacité de stockage des contaminants dans les zones non vitales de la plante ou par la capacité de les rendre moins nocifs pour l'environnement (Sanmiguel 2011). Ces plantes peuvent aussi emmagasiner dans leurs tissus des quantités de contaminants normalement toxiques pour la majorité d'autres végétaux. A ce jour, il a été recensé plus de 400 taxons de végétaux

hyperaccumulatrices réparties dans toutes les zones du globe. La plupart des espèces utilisées sont de petites plantes de la famille des Lemnacées. Il existe, toutefois de nombreuses autres plantes hyperaccumulatrices dans d'autres familles (*Violacees*, *Euphorbiacees*, *Carvophyllacees*, etc.) (Clémence 2008).

- Les végétaux bioépurateurs susceptibles d'éliminer de grandes quantités de polluants des sols, des eaux et même de l'atmosphère. Cette bioépuration des différents écosystèmes pollués par ces plantes se fait de façon générale par absorption du polluant suivie de sa dégradation ou sa transformation au sein du tissu végétal (Zhou et al. 2008).
- De plus, on a aussi d'autres types de végétaux que l'on nomme plants à croissance rapide, et qui peuvent être aussi utilisés afin de réhabiliter les sites contaminés avec de nombreuses qualités qui sont les suivantes : leurs grand pouvoir d'évapotranspiration, leurs rapidités de croissance, l'étendue de leurs système racinaire ainsi que leurs facilités de propagation végétative (Kuzovkina and Volka 2009).

Les différentes techniques et mécanismes de phytoremédiation citées précédemment utilisent une variété des propriétés végétales et qui sont favorables à la phytotechnologie, en général sont d'être à croissance rapide, à forte biomasse, compétitive, rustique et tolérante à la pollution. De plus, des niveaux élevés d'absorption végétale, de translocation et d'accumulation dans les tissus récoltables sont des propriétés importantes pour la phytoextraction des substances organiques et inorganiques. Par contre les propriétés végétales favorables à la phytodégradation sont des systèmes racinaires larges et denses et des niveaux élevés d'enzymes dégradantes. Une grande surface racinaire favorise également la phytostimulation, car elle favorise la croissance microbienne, en outre, la production de composés d'exsudat spécifiques peut en outre favoriser la rhizodégradation via des interactions entre les plantes et les microbes spécifiques (Olson et al. 2003). Les plantes les plus populaires utilisées dans la phytoremédiation de certains polluants organiques sont (Figure III.3) :

- ✓ *Jacinthe d'eau* ;
- ✓ *Cabombaaquatica* ;
- ✓ *Callitriche palustris* ;
- ✓ *Elodeacanadensis* ;
- ✓ *Spirodelapolyrhiza* ;
- ✓ *Lentilles d'eau*.

Les lentilles d'eau de la famille des *Lemnacées* sont des petites usines aquatiques flottantes qui se trouvent dans le monde entier (Europe, Afrique de nord, etc.), et qui se sont adaptées

à dégradés variétés de zones géographiques et climatiques. On les trouve partout, sauf dans les régions désertiques sans eau et les secteurs gelés. Ces plantes aquatiques se développent et colonisent très facilement la surface d'eau douce et calme au niveau des étangs, des chenaux, des mares, etc. ; elles sont très communes sous les latitudes tropicales et tempérées. Les lentilles d'eau se présentent généralement sous forme de colonies de frondes très vertes de 0,5 à 15 mm de diamètre. Ces colonies sont formées de 2,3 ou 4 frondes réunies par des pédicelles. Chaque fronde porte une fine racine pouvant atteindre 3 cm. Leurs multiplications sont rapides et leur période d'adaptation au changement de milieu est très courte, ce qui leur confère l'appellation de plantes envahissantes. Elles se multiplient de manière végétative, les frondes mères donnant naissance à des frondes filles qui arrivées à maturité se détachent des frondes mères pour donner de nouvelles colonies. Cet organisme est souvent utilisé pour les études écotoxicologiques et dans des tests normalisés (I.S.O 2001; A.F.N.O.R 1999). Le genre *Lemna* comprend environ une dizaine d'espèces de lentilles d'eau qui diffèrent entre elles par le nombre, l'épaisseur, la forme des frondes et la densité du système racinaire.

Le **Tableau III.2** résume les espèces les plus communes de lentille d'eau ainsi que la description du système foliaire et racinaire de chaque espèce.



**Figure III.3.** Plantes aquatiques les plus communes utilisées en phytoremédiation

**Tableau III.2.** Différentes espèces de lentilles d'eau (Khellaf 2010)

Espèce	Photo de l'espèce	Description botanique
<i>Lemna minor</i>		Lentilles de 1,5 à 6 mm de diamètre, ovale, plane de couleur vert pale, avec une seule racine.
<i>Lemna gibba</i>		Lentilles de 2 à 8 mm de diamètre, en forme de poire de couleur vert à brun rougeâtre. La surface inférieure possède des bosselages et une seule racine.
<i>Lemna trisulca</i>		Lentilles de 5 à 15 mm de diamètre avec des frondes obliques et translucides. Plante submergée à plusieurs racines.
<i>Spirodela polyrhiza</i>		Frondes de 5 à 10 mm de diamètre de couleur vert foncée dessus, violacé dessous. Chaque lentille possède 5 à 15 racines.
<i>Wolffia arrhisa</i>		Fondes minuscules et sans racines sous formée de bille allongée (entre 0,5 et 1 mm).
<i>Wolffiella</i>		Frondes allongées et effilées, d'environ 8 mm de long sur 0,5 mm de large.

Les lentilles d'eau peuvent être utilisées en écotoxicologie en tant qu'indicateurs de l'état de santé des écosystèmes. De même, elles sont bien utilisées dans les procédés de

phytoremédiation. Une description succincte de l'espèce *Lemna gibba* L, objet de la présente étude, est donnée ci-après.

#### ✓ **Description de *Lemna gibba***

C'est une plante vasculaire flottante appartenant à la famille des *Lemnaceae*, que l'on trouve partout dans le monde à la surface des eaux stationnaires ou à faible débit des eaux douces et saumâtres, formant des tapis verts denses (**Driever et al. 2005**). Elle est connue par sa structure simple, sa croissance rapide, sa tolérance importante aux différentes pollutions, et sa capacité facile d'adaptation à des diverses conditions (**Sivakumar et al. 2014**). Selon diverses études, cette espèce a montré, un fort potentiel et une grande efficacité dans le procédé de phytoremédiation de certains polluants inorganiques tels que les métaux lourds (**Khellaf and Zerdaoui 2009a; Khellaf and Zerdaoui 2009b; Muthusarayanan et al. 2018; Sasmaz 2019**), et organiques tels que les pesticides, les médicaments, et les colorants textiles, etc. (**Dosnon 2009; Ceschin et al. 2020; Kaushal et al. 2021**). Ceci nous a ouvert des perspectives très intéressantes pour l'utilisation de cette plante dans le traitement des milieux aquatiques contaminés par les colorants textiles.

#### ✓ **Fiche d'identification de *L.gibba***

*L.gibba* admet des frondes de 2 à 8 mm de diamètre ; elle reconnaît à sa face supérieure légèrement convexe en forme de poire de couleur vert à brun rougeâtre, et à sa face inférieure blanchâtre et très renflées spongieuse. Elle possède des bosselages et une seule racine qui pend dans l'eau. Ses racines fonctionnent comme un organe de stabilité de la lentille pendant qu'elle rencontre la turbulence de vent et d'eau ; aussi ses racines tendent à se rallonger pendant que des éléments minéraux dans l'eau sont épuisés (**David 2006**). Chaque feuille de lentille ronde à ovale appelée encore fronde (2 à 5 mm de longueur), a peu de fibre et contient des cavités remplies d'air permettant à la lentille de flotter librement à la surface des eaux calmes et stagnantes, en formant souvent une couche verte à la surface des mares, des étangs et des lacs notamment au printemps (**Ardenghi et al. 2017**).

#### ✓ **Morphologie de *L.gibba***

Les lentilles peuvent se reconnaître par leurs différentes formes, en observant une vue latérale d'une usine de bourgeonnement, on peut apercevoir le dessous gonflé avec des espaces aériens agrandis, aussi les observations d'une vue dorsale permettent de constater qu'il existe des étamines dépassant des poches de bourgeonnement qui fleurissent lorsque *L.gibba* est mûre. Il arrive aussi d'apercevoir des fruits se développant dépassant de la poche de bourgeonnement latérale (**Ardenghi et al. 2017**).

### ✓ **Mode de reproduction**

Cette espèce a une multiplication très active, elle se propage principalement par reproduction végétative asexuelle où elle se multiplie par division en séparant pour former deux plantes distinctes. Cependant, pendant que chaque nouvelle fronde mûrit, elle lance les nouvelles frondes de formation. Chaque fronde fille est toujours initiée comme bourgeon dans la zone meristématique le long de l'axe central de sa mère où elle émerge alors de la poche du côté de la mère où il a été lancé. Chaque nouvelle fronde est reliée à sa fronde mère par une bande de tissu appelée stipule ou pied et forment de petites colonies. La stipule se prolonge pendant que la fronde mûrit, et quand la fronde fille atteint la pleine maturité, la stipule interrompt sa croissance pour libérer un nouveau faisceau. A ce moment de la croissance des lentilles, la nouvelle fronde libérée a déjà initié de nouvelles filles (**Ardenghi et al. 2017**).

Les plantes ont la propriété de se reproduire à une très grande vitesse en extrayant très efficacement les nitrates et autres éléments nutritifs de l'eau pour les convertir en protéine, si bien qu'une colonie peut doubler de poids en 18 heures seulement (**Ardenghi et al. 2017**).

### ✓ **Ecologie de lentilles**

La croissance des lentilles d'eau dépend de différents paramètres, internes, externes, climatique, etc. Le premier paramètre qui contrôle le processus de la photosynthèse et donc la croissance de *Lemna* est la lumière, car les lenticules sont des végétaux chlorophylliens, autotrophe dont l'utilisation du carbone et la lumière constituent pour elles le facteur énergétique fondamental lui permettant de réaliser la photosynthèse. Chaque espèce possède ses propres exigences face à l'intensité d'éclairage, qui présente pour chacune d'elle, un minimum, un optimum et un maximum (**Wiersema 2015**). Aussi la température joue un rôle très important dans le contrôle de la vitesse de croissance des lentilles d'eau, où la multiplication de *Lemna* se fait mieux entre 18 et 22 °C ; néanmoins, la plante tolère des températures froides atteignant 10 °C et des températures chaudes entre 25 et 30 °C (**Landolt 1992**). Aussi, le pH contrôle la croissance de ces macrophytes, car l'apport de certains ions minéraux nécessaires à leur nutrition est lié au pH de milieu. Les lenticules survivent à des pH neutre ou basique, peuvent aller de 5 à 9, mais se développent mieux à des pH compris entre 6,5 à 7,5 (**Landolt 1998**). Aussi, la croissance de cette plante aquatique est liée à la présence de différents nutriments, qui sont indispensables aux fonctions catalytiques, structurales et métaboliques de *Lemna gibba*.

De façon générale, ces nutriments se regroupent de la manière suivante : le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, les macroéléments (l'azote, le phosphore, le calcium, le potassium, le magnésium et le soufre, et les microéléments (le fer, le manganèse, le bore, le molybdène, le cuivre et le zinc)(**David 2006; Dubois et al. 1988**).

✓ **Biogéographie**

Les lenticules sont présentes dans toutes les régions du globe, de l'équateur aux terres arctiques et le littoral. Cependant les plantes des zones froides, ont un optimum de température pour l'initialisation, l'éloignement et la production des racines inférieures à celui des plantes des zones chaudes (**Dubois et al. 1988**).

On retrouve les lentilles dans plusieurs régions d'Algérie, notamment dans les régions d'El Tarf, Annaba, El Kala, Constantine, Alger, etc(**Quezel and Santa 1962**).

**CHAPITRE IV: *MATERIELS ET METHODES***  
***EXPERIMENTALES***

## CHAPITRE IV: Matériels et Méthodes expérimentales

### IV.1. Introduction

L'objectif principal de ce travail expérimental est le traitement de deux colorants textiles, le Marine Cibanone (MC) et l'Ecarlate Solophényl BNLE (ES) par phytoremédiation avec les lentilles d'eau (*Lemna gibba* L) et biodégradation avec des boues activées. Le but principal est de tester le procédé de biodégradation assisté par phytoremédiation. Les étapes adoptées dans ce travail se résument comme suit :

- Une préparation des polluants organiques avec définition de leurs propriétés physicochimiques;
- Une sélection, traitement et culture des boues activées avec quelques techniques de caractérisation ;
- Une sélection et culture des plantes aquatiques avec définition des conditions de culture ;
- Une élaboration des tests de toxicité *vis-à-vis* des deux colorants afin de déterminer les concentrations tolérées par les macrophytes ;
- Une étude de la capacité de phytoremédiation des deux colorants textiles (ES et MC) par les lentilles d'eau, et étude d'effet de biomasse végétale et de concentrations initiales de polluant pour la mise en évidence du potentiel de phytoremédiation de cette plante aquatique ;
- Une étude du phénomène de biodégradation des deux polluants par les boues activées par l'élaboration d'essais expérimentaux en présence et en absence de glucose ;
- Une étude du phénomène de biodégradation assisté par les lentilles d'eau des deux colorants avec et sans glucose dans le but d'étudier l'effet synergiques de l'ajout des plantes aquatiques sur l'élimination de ces deux polluants organiques ;
- Toutes ces étapes nécessitent le développement et l'utilisation de différentes techniques analytiques (spectrophotométrie UV-vis, IR, DCO, DBO<sub>5</sub>, LC/MS...etc) dans le but de suivre les deux procédés envisagés et quantifier leurs efficacités.

### IV.2. Polluants

#### IV.2.1. Choix des molécules : Marine Cibanone (MC) et Ecarlate Solophényl (ES)

Les colorants choisis dans le présent travail sont des produits de teinturerie textile utilisés abondamment dans l'industrie textile Algérienne implantée dans la ville de Constantine

(Est Algérien); il s'agit de l'Ecarlate Solophényl BNLE (ES) et du Marine Cibane (MC), qui ont été sélectionnés comme molécules modèles de polluants organiques.

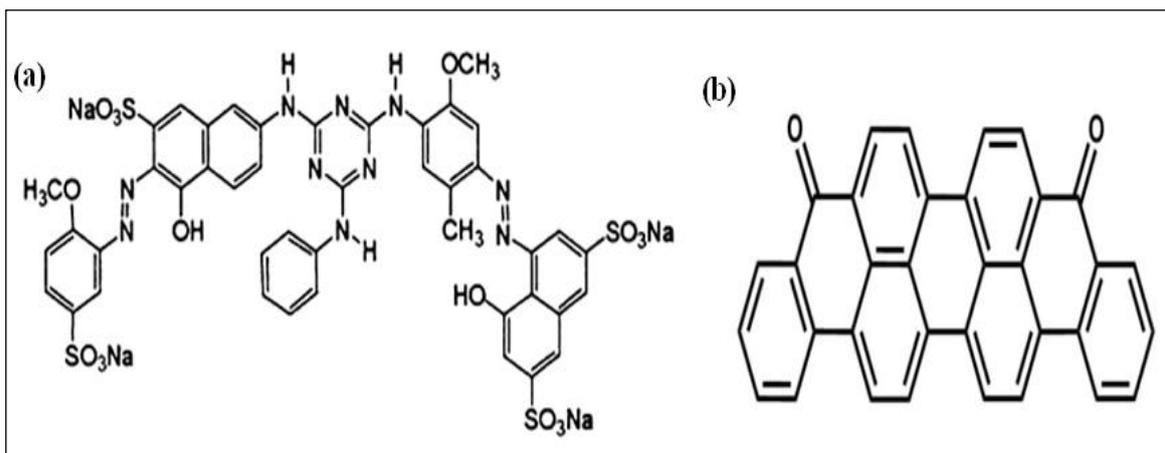
Des solutions mères de  $1 \pm 0,005$  g/L des deux colorants, sont délicatement préparées par dissolution d'une quantité adéquate de chaque colorant dans 1 litre d'eau distillée (pH = 6,5,  $\kappa = 6,0$   $\mu\text{S/cm}$ ). Les solutions préparées sont homogénéisées par agitation magnétique jusqu'à dissolution complète du composé organique. Elles sont conservées dans un incubateur à température égale à 4 °C. Les solutions filles de concentrations définies et préparées juste avant les essais expérimentaux, sont obtenues par dilution des solutions mères.

#### IV.2.2. Propriétés physicochimiques des colorants

Quelques caractéristiques physicochimiques de ces deux colorants sont présentées dans le **Tableau IV.1** ; et leurs structures chimiques développées de ces colorants textiles sont présentés dans la **Figure IV.1**.

**Tableau IV.1.** Propriétés physicochimiques des colorants ES et MC

Propriété physicochimique	Ecarlate Solophényl	Marine Cibane
Formule brute	$\text{C}_{44}\text{H}_{32}\text{N}_{10}\text{Na}_4\text{O}_{16}\text{S}_4$	$\text{C}_{34}\text{H}_{16}\text{O}_2$
Poids moléculaire	1372	456
Aspect physique	Poudre rouge vif	Poudre bleu encre
Nom commercial (anglais)	Direct Red 89	Vat Blue 20
Classe (chimique)	Colorant azoïque	Colorant anthraquinonique
Classe (tinctoriale)	Colorant direct	Colorant de cuve
Abréviation	ES	MC
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	495	580



**Figure IV.1.** Structure chimique des colorants (a) ES et (b) MC

### IV.2.3. Données toxicologiques des colorants

Les colorants azoïques et anthraquinoniques sont les plus fréquemment utilisés dans la fabrication des industries textiles Algériens. Une bonne quantité de ces colorants est perdue dans les rejets textiles par manque d'affinité avec les surfaces à teindre et évacuée vers les rivières d'eau. Ceci peut nuire grandement aux espèces animales, végétales ainsi qu'aux divers microorganismes vivant dans ces eaux, et provoquera de différents problèmes toxiques qui sont les suivants :

- ✓ Augmentation de la DBO<sub>5</sub> et la DCO et la provocation de phénomène d'eutrophisation par la présence de substances nutritives en excès dans les milieux aquatiques. Aussi la consommation de ces substances par les plantes aquatiques augmente et accélère la production anarchique et la prolifération de ces plantes et conduit à l'appauvrissement en oxygène dissous et l'inhibition de la photosynthèse (**Poots et al. 1978**).
- ✓ La sous-oxygénation des milieux aquatiques par la production d'un déséquilibre dans les processus naturels de régulation de taux d'oxygène, car ces processus ne peuvent plus compenser la consommation bactérienne d'oxygène suite à la présence de charges importantes de matière organique *via* les rejets textiles ponctuels (**Manahan 1986**).
- ✓ Le danger potentiel de bioaccumulation dans les milieux aquatiques de certains colorants réfractaires aux procédés de traitements habituellement mis en œuvre et résistants à la biodégradation aérobie (tels que les colorants azoïques suite à leur très faible biodégradabilité due à leurs poids moléculaires élevés et à leurs structures complexes) (**Pagga and Brown 1986; Rais and Rajeev 2010**). Cette bioaccumulation peut affecter les différents êtres vivants de la chaîne alimentaire, engendrant une pollution des eaux de

surface ainsi qu'une pollution inesthétique et des perturbations importantes dans les différents mécanismes naturels existant dans la flore (pouvoir d'auto épuration des cours d'eau, phénomène d'eutrophisation, inhibition de la croissance des végétaux aquatiques, etc.) et dans la faune (destruction d'une catégorie de poissons et de microorganismes).

En outre divers travaux de recherche sur les différents organismes montrent l'effet mutagène et/ou cancérigène des colorants azoïques et anthraquinoniques sur la santé (**Boulal and Bouchema 2014; Brown and DeVito 1993**), car leur teneur en groupements cancérigènes sous forme électrophile ou radicalaire tels que les groupements aromatiques attaque les bases pyrimidiques de l'ADN et de l'ARN et cause par conséquent, une altération du code génétique avec mutation et risque de cancer sur l'homme et l'animal (**Boulal and Bouchema 2014**) comme le cas observé chez certains ouvriers de l'industrie textile qui sont affectées par le cancer de la vessie suite à leur exposition prolongée aux colorants azoïques (**Costa and Rodrigues 1982**). Aussi on a l'apparition de hépatomes (**Robert et al. 2000**) et des réactions allergiques, asthme quelquefois et surtout des dermatites eczémateuses observés avec divers colorants aminés azoïques et anthraquinoniques (**Desoille et al. 1987**). Par ailleurs, la réduction de ces colorants (rupture de la liaison azoïque) génère des amines aromatiques qui sont connues comme mutagènes et cancérigènes ; ces amines causent la méthémoglobinémie, caractérisée par un empêchement du transport d'oxygène dans le sang (**Bereket et al. 1997**). En revanche, la toxicité de ces amines aromatiques est fortement liée à la structure spatiale de la molécule ou, en d'autres termes, à la position des groupes aminés (**Jung et al. 1992**).

### **IV.3. Boues activées**

#### **IV.3.1. Sélection des boues activées et traitement au laboratoire**

Les boues activées (BA) utilisées dans le présent travail pour l'élaboration des essais de biodégradation et les essais de biodégradation assistée par phytoremédiation sont prélevées du bassin d'aération de la station d'épuration municipale STEP de la ville d'Annaba (Est algérien). Ces boues sous forme de suspension sont transportées dans des récipients fermés en plastique jusqu'au laboratoire ; là, elles sont rapidement traitées pour une éventuelle caractérisation et utilisation dans les différentes expériences.

Un protocole expérimental a été mis en place pour le traitement des boues activées. Dans un premier temps, la suspension de boues est placée dans une éprouvette graduée (tube à essai) de 1L pour la laisser décanter et reposer pendant 30 minutes ; le surnageant est alors

retiré et les boues concentrées sont soumises à une centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 min. Ainsi, on obtient le culot auquel on ajoute 20 mL d'eau distillée.

Les boues activées restantes sont placées dans un milieu de culture modifié (Bajaj et al. 2008) composé de nutriments nécessaires au développement des microorganismes sous une agitation modérée, une température ambiante égale à 21 °C et un pH égal à 6,1.

#### IV.3.2. Milieu de culture

Le milieu de culture nécessaire au développement des microorganismes présents dans les boues activées en mode aérobie est composé de molécules facilement assimilables par ces microorganismes. Ces molécules sont des macronutriments et micronutriments dont la nature et la composition sont données dans le **Tableau IV.2**. Les solutions des différents nutriments sont adéquatement préparées et stockées à 4 °C.

**Tableau IV.2.** Composition du milieu de culture

Macronutriments		Micronutriments	
Composition	Concentration (g/L)	Composition	Concentration (g/L)
KNO <sub>3</sub>	3,00	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,24
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,20	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,58
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,01	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,36
NaCl	0,007	NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,11
		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 96 %	1,00 mL/L

#### IV.3.3. Caractérisation des boues activées

Diverses analyses sont effectuées sur les boues activées afin d'évaluer certaines caractéristiques comme la composition, la matière sèche, la matière sèche volatile, la matière en suspension et l'indice de boues (IB). Ces paramètres permettent d'avoir une idée globale sur l'efficacité d'utilisation des boues activées dans un procédé de biodégradation aérobie pour l'élimination de la pollution organique.

Toutes les expériences analytiques ont été effectuées en trois répliques et les valeurs rapportées correspondent à la moyenne des valeurs mesurées.

a) Caractérisation microscopique des boues activées

Les observations microscopiques des échantillons de consortium des boues activées, prélevés à partir des solutions de contrôle et de traitement, au temps initial et au cours du procédé de biodégradation, sont susceptibles d'identifier les microorganismes présents dans les floccs de ces boues activées et pourraient donner des indications sur la qualité de la boue utilisée dans le procédé biologique.

b) Matière sèche (MS)

La matière sèche (MS) ou résidu sec des boues activées est ce que l'on obtient lorsqu'on retire l'eau d'un produit ; elle est constituée de matières minérales et de matières organiques. Elle présente aussi le ratio entre le poids de la matière sèche et le poids de la matière non-séchée (hydratée), déterminée à partir de la norme **NF T90-029 (A.P.H.A 1999)**.

La détermination de la matière sèche (MS) sert à suivre le développement et la croissance microbienne constituant les boues activées. Ce paramètre permet de calculer le pourcentage de développement microbien (PDM) et l'indice de croissance (IC). Cette matière sèche correspond à l'ensemble des matières en suspension et matières solubles ; elle est donnée par la relation suivante :

$$MS \text{ (g/L)} = \frac{(P_1 - P_2)}{V_{\text{échantillon}}} \times 1000 \quad (\text{IV. 1})$$

Où :  $P_1$  est la masse (g) de la coupelle et de l'échantillon de BA après séchage à 105 °C ;

$P_2$  est la masse (g) de la coupelle vide ;

$V_{\text{échantillon}}$  est le volume de l'échantillon de boues activées (50 mL).

Aussi, pour bien quantifier le développement microbien suivi par la mesure des matières sèches (MS), un pourcentage de développement microbien (PDM) est calculé par la formule suivante :

$$\text{PDM (\%)} = \frac{MS_t - MS_{\text{initial}}}{MS_t} \times 100 \quad (\text{IV. 2})$$

$MS_{\text{initial}}$  correspond aux matières sèches mesurées avant traitement ;

$MS_t$  représente les matières sèches mesurées à la fin de traitement.

L'indice de croissance (IC) qui représente le développement microbien est déterminé sur la base de la matière sèche (MS) initiale et finale des boues activées ;

il est exprimé comme suit :

$$IC = \frac{MS_t}{MS_{initial}} \quad (IV.3)$$

c) Matières volatiles en suspension (MVS)

Les matières volatiles en suspension correspondent à la fraction organique des MS ; elle est généralement exprimée en pourcentage par rapport aux MS, déterminée à partir de la norme **NF T90-105 (A.P.H.A 1999; A.F.N.O.R 1999)**. Le contrôle de ce paramètre permet d'évaluer et de connaître la stabilité d'une boue activée. Les MVS sont données par la relation :

$$MVS \text{ (g /L)} = \frac{(P_2' - P_1)}{V_{\text{échantillon}}} \times 1000 \quad (IV.4)$$

$P_2'$  est la masse (g) de la coupelle et de l'échantillon de BA après calcination à 550 °C ;

$P_1$  est la masse (g) de la coupelle et de l'échantillon de BA après séchage à 105 °C ;

$V_{\text{échantillon}}$  est le volume de l'échantillon de boues activées (50 mL).

d) Matières en suspension (MES)

Les MES représentent l'ensemble des matières solides insolubles visibles à l'œil et en suspension dans un liquide ; elles pouvant être retenues soit par filtration ou centrifugation. Les méthodes gravimétriques reposent sur le calcul de la masse de matière sèche (mg/L) obtenue après séparation de MES de l'eau par centrifugation puis déshydratation à 105 °C. Les MES sont déterminées à partir de la norme **NF T 90-105-1 (A.P.H.A 1999; A.F.N.O.R 1999)**. La partie solide est donc séparée du liquide, séchée et pesée, et le calcul de la teneur en MES se fait à partir de l'expression suivante :

$$MES \text{ (g/L)} = \frac{(P_0' - P_0)}{V_{\text{échantillon}}} \times 1000 \quad (IV.5)$$

Où :  $P_0'$  est la masse (g) de la capsule pleine après séchage à 105 °C ;

$P_0$  est la masse (g) de la capsule vide ;

$V_{\text{échantillon}}$  est le volume de l'échantillon de boues activées (50 mL).

e) Test de décantation ( $V_{30}$ )

Ce test permet d'apprécier l'aptitude des boues à la décantation pour assurer une meilleure séparation entre les boues activées et l'eau à traiter à la fin de traitement biologique. Il est

déterminé sur un volume de floccs biologiques présent dans un litre de boues activés ( $V_{30}$ ) en mL/L.

f) Indice de Mohlman (IM) et indice de boues (IB)

L'indice de Mohlman (IM) présente le rapport du volume occupé par un litre de boues activées non diluées après 30 minutes de décantation divisé par la concentration de matières en suspension (MES) des boues **NF EN 14702-1 (A.P.H.A 1999; A.F.N.O.R 1999)**. Il est évalué par la formule suivante :

$$IM \text{ (mL/g)} = \frac{V_{30 \text{ minute}}}{C_{MES}} \quad (\text{IV. 6})$$

On est amené aussi à calculer un autre paramètre, l'indice de boue (IB) en utilisant la dilution la plus faible ( $f$ : facteur de dilution), si la lecture des boues décantées est supérieure à 250 mL après 30 minutes de décantation (une lente décantation). IB est donné par la relation suivante :

$$IB \text{ (mL/g)} = \frac{V_{30 \text{ minute}}}{C_{MES} \times f} \quad (\text{IV. 7})$$

Ces indices sont calculés pour caractériser l'aptitude des boues à la décantation. Ils permettent aussi d'évaluer la concentration des boues activées et facilitent les diagnostics des principaux problèmes de décantation qui peuvent être apparaître.

## **IV.4. Lentilles d'eau**

### **IV.4.1. Sélection de *L.gibba***

L'espèce de lentilles d'eau choisie dans la présente étude est *Lemna gibba* L(**Figure IV.2**), une espèce très abondante dans les étangs naturels situés dans le Nord Est d'Algérie (la ville d'El Tarf). Les plantes repiquées de leur milieu naturel sont transportées jusqu'au laboratoire dans des récipients en plastique remplis d'eau de l'étang. Les meilleures frondes (vertes et avec racines) sont délicatement rincées avec de l'eau de robinet et de l'eau distillée afin d'éliminer les différentes impuretés, puis elles sont placées dans un milieu de culture pour l'élaboration des différentes expériences.



**Figure IV.2.** Photos des lentilles d'eau utilisées dans la présente étude

#### **IV.4.2. Description et morphologie**

La plante aquatique *Lemna gibba* L, est une plante vasculaire flottante appartenant à la famille des *Lemnaceae*, que l'on trouve partout dans le monde formant des tapis verts denses (Driever et al. 2005). Elle est connue par sa structure simple, sa croissance rapide, sa tolérance importante aux différentes pollutions, et sa capacité facile d'adaptation à diverses conditions (Sivakumar et al. 2014).

La plante de 2 à 8 mm de diamètre, se reconnaît à sa face supérieure légèrement convexe en forme de poire de couleur vert à brun rougeâtre, et à sa face inférieure blanchâtres et très renflées spongieuses ; elle possède des bosselages et une seule racine qui pend dans l'eau. Ces racines fonctionnent comme un organe de stabilité de la lenticule pendant qu'elle rencontre la turbulence de vent et d'eau, aussi ces racines tendent à se rallonger pendant que des aliments minéraux dans l'eau sont épuisés. Aussi, les feuilles des lenticules sont de forme ronde à ovale appelée encore fronde (2 à 5 mm de longueur), ont peu de fibre contient des cavités remplies d'air permettant à la lentille de flotter librement à la surface des eaux (Ekouma 2006).

#### **IV.4.3. Conditions de culture et adaptation des plantes**

Les plantes aquatiques ont été placées dans un large aquarium contenant un milieu nutritif contenant des macronutriments et des micronutriments essentiels pour leurs croissances et développements ; la nature et la composition de ce milieu sont données précédemment dans le **Tableau IV.2** (le même milieu de croissance utilisé pour le développement des microorganismes des boues activées). Ces macrophytes sont cultivées pour une photopériode de 12 heures dans les conditions de laboratoire suivantes : Une température égale à 21 °C, maintenue constante à l'aide d'un thermoplongeur, un pH égal à

6,1 maintenu constant par ajout de solutions de HCl ou NaOH (1M), une lumière naturelle et artificielle fournie par des lampes à incandescence (40 W chacune) et une aération continue du milieu nutritif à l'aide d'un barbotage d'air pour fournir de l'oxygène aux frondes de *Lemna* et prévenir éventuellement les maladies fongiques. Les plantes aquatiques sont laissées dans le milieu de croissance pendant 3 jours avant de commencer les différentes expériences.

## **IV.5. Dispositif et protocole expérimentaux**

### **IV.5.1. Tests de toxicité**

Le protocole utilisé pour les tests de toxicité est dérivé d'un projet de ligne directrice 221 de l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) pour un test d'inhibition de la croissance de *Lemna sp* (OCDE 2006). Ce test imite un petit écosystème artificiel, où on étudie pendant quatre jours l'effet des deux colorants MC et ES présents à différentes concentrations (5-100 mg/L) sur la croissance des plantes aquatiques. Ce test permet de déterminer éventuellement la concentration tolérée par l'espèce *L.gibba* et de calculer les différents paramètres inhibiteurs de croissance.

Les essais de toxicité sont effectués en trois réplifications de la manière suivante : neuf à douze frondes de *Lemna* (2 à 3 colonies) sont délicatement placées dans des bécjers en verre de 7 cm de hauteur et 5 cm de diamètre. Ces bécjers contiennent 100 mL de liquide nutritif additionné d'une quantité appropriée de colorant ; ils sont immergés par dans un bain thermostaté dans des conditions similaires à celles évoquées pour la culture végétale des lentilles d'eau mais sans aération. Les bécjers doivent être suffisamment larges pour permettre aux frondes de croître sans se recouvrir à la fin de l'essai. Aussi, ces récipients d'essai sont couverts pour minimiser l'évaporation et la contamination accidentelle, tout en autorisant les échanges nécessaires avec l'air sans réduire l'intensité lumineuse ni modifier les caractéristiques spectrales de la lumière.

Des tests de contrôle (sans colorant) permettent d'observer la différence dans la croissance due à la toxicité du colorant, et calculer éventuellement la vitesse moyenne de croissance des plantes, le taux de croissance relative et les différents paramètres inhibiteurs de croissance (Figure IV.3).



**Figure IV.3.** Schéma du protocole expérimental pour l'élaboration des essais de toxicité des colorants MC et ES avec *L.gibba*

#### IV.5.2. Essais de phytoremédiation

Afin d'examiner la capacité de phytoremédiation des colorants textiles (ES et MC) par *L.gibba*, des essais de traitement et de contrôle (sans polluant) sont élaborés en trois réplifications pendant sept jours pour des concentrations variables de colorant.

Les essais de phytoremédiation sont effectués avec des frondes saines de *L.gibba* (20 et 40 frondes de *Lemna* sont ajoutées à des solutions enrichies en MC et ES respectivement). Les frondes sont placées délicatement dans des bécquers en verre de 7 cm de haut et 5 cm de diamètre contenant 100 mL de milieu nutritif avec une concentration maximale tolérée de 50 mg/L pour les deux colorants (cette concentration est déterminée à partir des tests de toxicité). Ensuite, ces bécquers sont immergés par dans un bain thermostaté dans des conditions similaires à celles évoquées pour la culture végétale des plantes.

Une étude de l'effet de biomasse végétale et de concentrations initiales de polluant est nécessaire pour évaluer le potentiel de phytoremédiation des lentilles d'eau *vis-à-vis* des deux polluantes organiques, pour cela :

- ✓ L'effet de la dose de plantes est étudié dans la gamme comprise entre 10 et 50 frondes avec une concentration tolérée des deux colorants égale à 50 mg/L, un volume de 100 mL, un pH égal à 6,1 et une température de 21 °C pendant 7 jours.

✓ L'effet des concentrations initiales est étudié en faisant varier la concentration de 10 à 50 mg/L, avec un nombre de frondes optimal, un pH de 6,1 et une température de 21 °C pendant 7 jours.

Des prélèvements d'échantillons d'eau colorée (1 mL) sont effectués chaque jour et dilués jusqu'à 10 mL pour garantir la validité du dosage. Le dosage est effectué à la longueur d'onde d'absorption maximale d'ES ( $\lambda_{\max}= 495$  nm) et de MC ( $\lambda_{\max}= 580$  nm).

L'efficacité du traitement est quantifiée par le calcul du pourcentage d'élimination (PE %) du polluant exprimé par la relation suivante :

$$\text{PE (\%)} = \frac{C_{\text{initial}} - C_{\text{final}}}{C_{\text{initial}}} \times 100 \quad (\text{IV.8})$$

Où :  $C_{\text{initial}}$  est la concentration initiale de colorant ;

$C_{\text{final}}$  est la concentration finale de colorant.

#### **IV.5.3. Essais de biodégradation assistée par phytoremédiation**

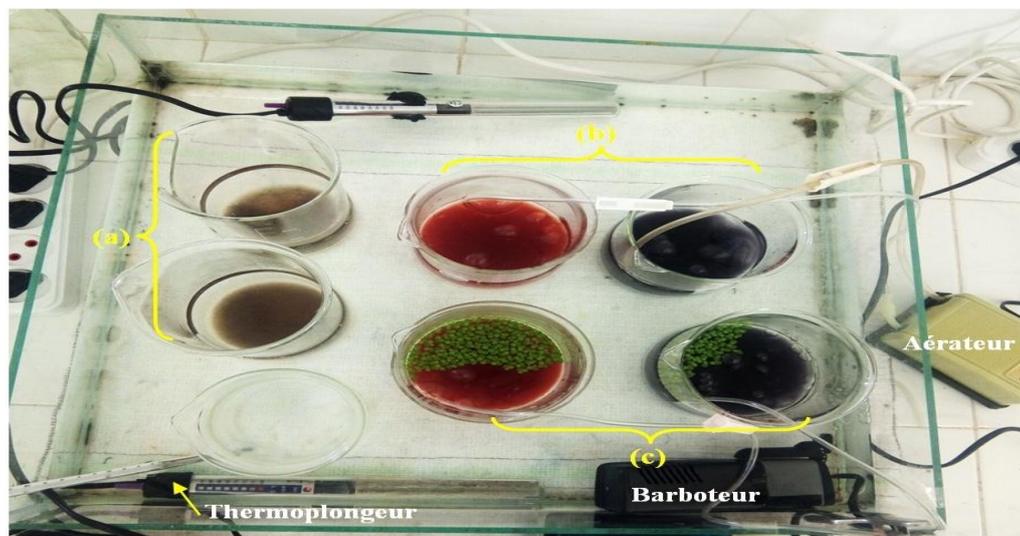
Les différents essais du traitement biologique des colorants textiles MC et ES par les boues activées seules et par les boues activées assistées par *L.gibba* sont réalisés dans le dispositif expérimental présenté sur la **Figure IV.4**. Les essais de traitement et de contrôle (sans polluant) sont élaborés en trois réplifications pendant sept jours.

Le dispositif expérimental est constitué de six réacteurs agités thermostatés d'une capacité de 1 L chacun opérant dans des conditions statiques et en discontinu. Ces conditions expérimentales sont similaires aux conditions d'opération d'un bassin aéré dans une station d'épuration à boues activées et qui sont les suivantes :

- Un volume traité de 900 mL agité et aéré en continu pendant toute la durée du traitement à l'aide d'un aérateur qui alimente l'eau en bulles d'air pour maintenir en vie ces boues activées ;
- Une température égale à 21°C qui est maintenue constante à l'aide d'un thermoplongeur ;
- Un pH de 6,1 maintenu constant par l'ajout de solution de HCl ou NaOH (1M) ;
- Une dose de boues activées de 20 mL/L ;
- Une dose optimale des plantes de 100 et 200 frondes pour MC et ES respectivement (cette dose est déterminée dans les essais de phytoremédiation) ;
- Une concentration de colorant de 50 mg/L ;
- Une concentration de glucose de 2 g/L.

L'eau perdue par évaporation et échantillonnage doit être compensée par l'ajout de milieu de culture. Différents traitements sont élaborés en parallèle afin de quantifier efficacement le présent phénomène :

- Des traitements de contrôle pour les boues activées sans colorants sont élaborés dans le but de suivre le développement des microorganismes en l'absence de polluant. Pour cela, une quantité de boues activées est mise en contact avec le milieu de culture avec et sans glucose afin d'observer leur effet sur la croissance de ces floccs microbiens.
- Des traitements de contrôle (sans colorants) pour les boues activées assistées par les lentilles d'eau sont élaborés dans le but de suivre l'influence de l'ajout des plantes aquatiques sur le développement des microorganismes. Pour cela, une quantité de boues activées et une quantité de *L.gibba* sont mises en contact avec le milieu de culture avec et sans glucose.
- Des traitements de biodégradation avec les boues activées pour les deux colorants MC et ES avec et sans glucose, sont élaborés dans le but d'examiner l'efficacité de ce traitement biologique pour l'élimination de ces polluants organiques sans et avec stimulation de croissance des microorganismes par l'ajout du substrat glucosé.
- Des traitements de biodégradation assistée par les lentilles d'eau pour les deux colorants MC et ES avec et sans glucose, sont élaborés dans le but d'étudier l'effet synergique de l'ajout des plantes aquatiques sur l'efficacité d'élimination de ces polluants.
- Des traitements de biodégradation assistée par les lentilles d'eau pour différentes concentrations initiales (de 10 à 50 mg/L) sont élaborés afin d'évaluer l'effet de concentrations variables de polluant sur le potentiel de dégradation des deux polluants.



**Figure IV.4.** Dispositif expérimental pour l'élaboration des essais de biodégradation, (a) Contrôle (b) Traitement avec les BA, (c) Traitement avec les BA assistée par *L.gibba*

Des prélèvements d'échantillons sont effectués à intervalle de temps régulier (chaque jour), centrifugés à 2000 rpm pendant 10 min pour analyser l'absorbance du colorant après dilution et mesurer la demande chimique en oxygène (DCO).

Le pourcentage d'élimination des composés cibles est calculé à partir de la relation 8, et le rendement de biodégradation des colorants en présence des BA, est évalué par la réduction de la DCO selon la formule suivante :

$$RD (\%) = \frac{DCO_{initial} - DCO_{final}}{DCO_{initial}} \times 100 \quad (IV. 9)$$

Où,  $DCO_{initial}$  et  $DCO_{final}$  sont respectivement la DCO avant et après traitement biologique.

## IV.6. Techniques d'analyse

### IV.6.1. Analyse des colorants par spectrophotométrie UV-vis

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance (ou densité optique) d'une solution à une longueur d'onde.

Un dispositif monochromateur (**Figure IV.5**) permet de générer à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière  $I_0$  qui traverse alors la cuve contenant la solution à analyser. L'appareil mesure l'intensité  $I$  de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée. Le spectrophotomètre peut être utilisé de manière instantanée pour mesurer l'absorbance à une longueur d'onde donnée, ou peut produire un spectre d'adsorption (balayage spectral). Les mesures reposent sur la loi de Beer-Lambert (**Giusti and Wrolstad 2001**) qui relie l'absorption de la lumière par un composé et sa concentration :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon L C \quad (IV. 10)$$

Où :  $A$  est l'absorbance ou densité optique (sans unité) de la solution ;

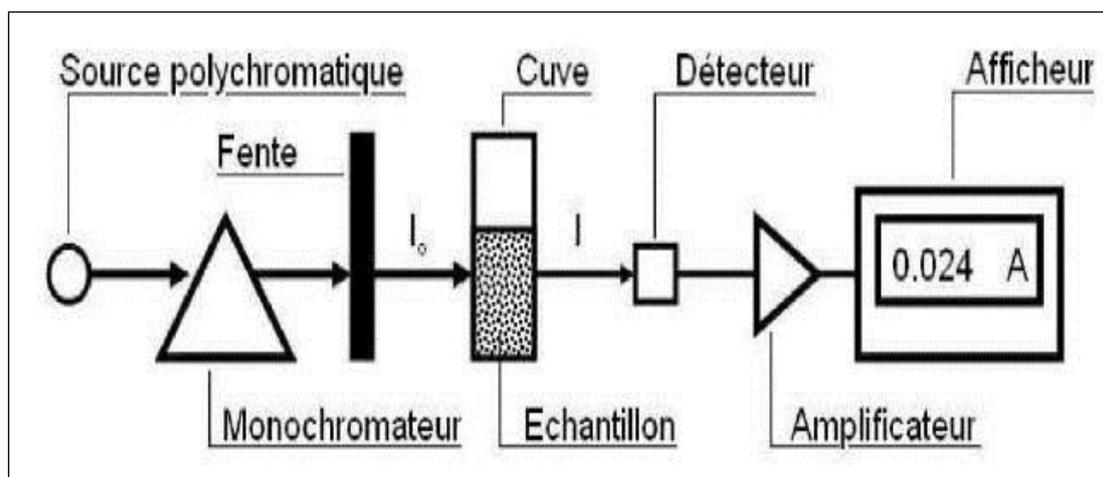
$I_0$  est l'intensité passe à travers une solution ;

$I$  est l'intensité de la lumière transmise ;

$C$  est la concentration de la substance absorbante ( $\text{mol/m}^3$ ) ;

$L$  est la longueur du trajet optique ou épaisseur de la solution traversée (cm) ;

$\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire de la substance absorbante en solution (en  $\text{m}^3/\text{mol.cm}$ )



**Figure IV.5.** Schéma du principe de la spectrophotométrie UV-vis

La détermination de la concentration des colorants MC et ES est effectuée par dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde donnée. On mesure l'absorbance de la solution, qui, par étalonnage permet d'accéder à sa concentration (**Annexe 1**). Par ailleurs, un balayage spectral dans le domaine UV-Vis permet d'avoir la longueur d'onde d'absorption maximale de chaque colorant. L'appareil utilisé dans le présent travail est un spectrophotomètre de type SECOMAM Prim Light V9B; S/N 2836.

Le balayage spectral pour les deux produits effectués entre 300 et 900 nm (**Annexe 1**), a permis de confirmer que les longueurs d'onde d'absorption maximale de MC et ES sont respectivement égales à 580 et 495 nm. Ces deux valeurs sont utilisées pour le dosage ultérieur des deux colorants.

D'autre part, les courbes d'étalonnage pour les colorants MC et ES sont établies pour des intervalles de concentrations de (0-15 mg/L) et (0-17,5 mg/L), respectivement. Ces courbes données dans l'**Annexe 1** sont accompagnées des équations linéaires et des coefficients de détermination.

#### **IV.6.2. Analyse de la biomasse végétale par spectroscopie Infrarouge**

La spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier (FT-IR) est basée sur l'absorption des molécules d'un rayonnement infrarouge et la détection des vibrations caractéristiques des liaisons interatomiques du matériau à analyser (**Dukor et al. 1999**). Pour plus de détails, cette méthode consiste à irradier l'échantillon par un rayonnement infrarouge, et quand la fréquence du rayonnement correspond à une fréquence de vibration des molécules exposées, il se produit un phénomène d'absorption. Ceci se traduit par un pic d'absorption sur le spectre en absorbance. La spectroscopie infrarouge est généralement utilisée sur les

diamants pour identifier leur type (Massy et al. 2004). Cette méthode est adaptée aussi dont le but de déterminer les fonctions de surface des biomasses étudiées, qui sont responsables de la fixation des colorants. Ceci va aussi nous permettre de proposer un éventuel mécanisme de rétention en analysant le biosorbant avant et après fixation des polluants. Elle présente aussi plusieurs avantages, car c'est une technique non destructive et permet d'analyser aussi bien les matériaux organiques et inorganiques, quel que soit leur état (solide, liquide) (Haya 2009). Cette analyse est menée sur un appareil de spectroscopie infrarouge de type ATR-FTIR (IRaffinity-1S model : Shimadzu) sur une plage de longueur d'onde allant de 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **IV.6.3. Analyse de la biomasse végétale par microscopie électronique à balayage (MEB) couplé à une dispersion énergétique des rayons X (EDX) pour l'analyse élémentaire**

La microscopie électronique à balayage est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons- matière qui permet de créer une image à l'échelle micrométrique voir nanométrique avec une haute résolution. Ce principe de fonctionnement consiste à balayer successivement, ligne par ligne, la surface de l'échantillon avec un faisceau d'électrons puis à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau électronique incident. Cette analyse permet l'observation de la morphologie de surface (répartition et reliefs) avec une profondeur de champ beaucoup plus importante qu'en microscopie optique (Kerdoud 2005) ; elle permet aussi d'avoir une idée sur la texture d'un échantillon, et de déduire le degré de rugosité d'une surface analysée. En effet les microscopes électroniques permettent d'obtenir des grossissements allant jusqu'à 500,000 fois (Zhou et al. 2006). La microscopie électronique à balayage est actuellement la méthode la plus utilisée pour observer la morphologie des films minces et pour mesurer leur épaisseur. Ces observations apportent également des compléments d'information sur le mode de croissance des couches. On peut obtenir des images de surface de pratiquement tous les matériaux avec une grande profondeur de champ.

Dans cette étude, les analyses morphologiques de surface de la biomasse de *L.gibba* avant et après les différents traitements biologiques sont réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type FESEM quanta 250 équipé d'un détecteur EDX pour une analyse élémentaire.

#### **IV.6.4. Analyse des produits de dégradation des colorants par LC/MS**

La chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse est une technique très intéressante et adéquate pour l'identification des composés organiques. Cette méthode associe la pouvoir de séparation de la chromatographie en phase liquide à la haute sensibilité d'analyse de la masse, ce qui permet d'identifier une grande variété de composés dans une matrice d'élément importante. Le point fort de cette technique réside dans le pouvoir de séparation de la chromatographie liquide utile pour une large gamme de composés, combiné à la capacité de la spectroscopie de masse qui va quantifier les composés avec un degré élevé de sensibilité et de sélectivité, en fonction des transitions uniques masse/charge ( $m/z$ ) de chaque composé d'intérêt.

Dans la présente étude, les échantillons sont analysés par un appareil de type Agilent 6400 series (Agilent USA, technologies) équipé d'une colonne de dimensions 250 x 2,1 mm, 5 micron, maintenue à une température de 35 °C. La phase mobile est constituée par un mélange d'eau pure et de méthanol. Les échantillons prélevés sont injectés pour atteindre l'ioniseur positif à électrospray (ESI+) pour identifier les sous-produits de biodégradation dans un intervalle  $m/z$  variant entre 0 et 500 avec une tension capillaire de 3,0 kV.

#### **IV.6.5. Mesure de la demande chimique en oxygène (DCO)**

La DCO exprimée en mg O<sub>2</sub>/L est mesurée dans le but de quantifier l'ensemble des composés oxydables, quelle que soit leur origine (organique ou minérale), présents sous forme de solides, colloïdes ou dissous dans l'eau polluée. Elle représente la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder complètement l'ensemble des composés oxydables présents dans un échantillon dans des conditions opératoires définies.

La DCO est mesurée par deux méthodes afin d'analyser nos échantillons au cours des traitements biologiques. La première est la méthode normalisée **NF T90-101 (A.P.H.A 1999; A.F.N.O.R 1999)** qui est opérationnelle au niveau de la STEP de Annaba. Des échantillons sont prélevés chaque jour et sont placés dans une solution standard ; ils sont ensuite mélangés et chauffés à 150 °C pendant deux heures en milieu acide avec de l'argent comme catalyseur et en présence d'un excès de bichromate de potassium (oxydant). Une fois la solution refroidie, on fait un dosage de l'excès du dichromate de potassium par le sel de Mohr jusqu'au virage de la couleur du bleu-vert au brun rouge.

La valeur de la DCO exprimée en mg/L d'oxygène est déduite de la quantité de dichromate consommée par les composés. La formule de calcul de la DCO est donnée par :

$$\text{DCO}(\text{mgO}_2/\text{L}) = \frac{F \times 8000 \times C \times (V_{\text{BL}} - V_e)}{V_0} \quad (\text{IV. 11})$$

C est la concentration de sel de Mohr (mol/L) ;

$V_{\text{BL}}$  est le volume de sel de Mohr versé pour le blanc (mL) ;

$V_e$  est le volume de sel de Mohr versé sur l'échantillon (mL) ;

$V_0$  est le volume de l'essai avant dilution éventuelle (mL) ;

F est le facteur de dilution.

L'autre méthode, appelée micro-méthode est généralement réalisée à l'aide de tubes de réactifs préconditionnés; dans ce cas la manipulation est réduite au minimum, d'où un gain de temps et de produits chimiques.

#### **IV.6.6. Mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>)**

La DBO exprimée en mg O<sub>2</sub>/L est la mesure de la quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes aérobies de l'eau pour oxyder les matières organiques, dissoutes ou en suspension dans l'eau. Il s'agit donc d'une consommation potentielle de l'oxygène par voie biologique. Ce paramètre constitue un bon indicateur de la teneur en matières organiques biodégradables d'une eau polluée (toute matière organique biodégradable polluante va entraîner une consommation d'O<sub>2</sub>), afin d'examiner l'efficacité du traitement biologique des eaux usées.

La DBO est mesurée au bout de 5 jours (DBO<sub>5</sub>) dans un environnement bien contrôlé à une température égale à 20°C, un pH égal à 7,0 ± 0,1 (cette température et ce pH sont favorables à l'activité des microorganismes consommateurs d'O<sub>2</sub>) et à l'obscurité (afin d'éviter toute photosynthèse parasite).

La méthode respirométrique dite manométrique (**A.P.H.A 1999**) donne la mesure directe de l'oxygène consommé par les microorganismes. Cette mesure est réalisée dans un récipient clos et dans des conditions d'agitation et de température constantes. Le dioxyde de carbone produit métaboliquement par les bactéries est piégé par une solution d'hydroxyde de potassium. Il en résulte une chute de pression dans le système, directement proportionnelle à la quantité d'oxygène consommé. Cette baisse de pression est mesurée par un capteur de DBO de type Hach Lange BOD Trak II. La DBO est directement affichée en mgO<sub>2</sub>/L.

#### **IV.6.7. Analyse des boues activées**

a) Caractérisation microscopique des boues activées

Un microscope optique de type AMETEK est utilisé pour identifier les microorganismes présents dans les floes de boues activées, par l'utilisation de différents grossissements.

Des nombreux échantillons de 5 mL de boues sont prélevés à partir des béchers de solutions de contrôle et de traitement des deux colorantes afin de suivre le développement et la diversification des microorganismes présents dans les boues activées. Ces échantillons contenant des organismes vivants sont homogénéisés puis placés entre une lame et une lamelle dans le but de rendre le liquide à observer à faible épaisseur permettant à la lumière de le traverser facilement ce qui ne rend visibles que quelques cellules importantes.

#### b) Protocole opératoire pour la mesure de MS

La détermination de la matière sèche de la biomasse revient à faire sécher un volume connu de boues activées (50 mL) et à déterminer sa masse sèche restante après évaporation totale de l'eau pendant 24 h à 105 °C.

Après chaque expérience de biodégradation, le mélange de chaque bécher est laissé décanter, le surnageant est retiré puis le culot avec un volume connu de 50 mL est séché à 105 °C pendant 24 heures. La masse sèche restante après évaporation totale de l'eau est mesurée et calculée à partir de la formule (IV.1). Toutes les analyses sont effectuées en trois répliques et les valeurs rapportées correspondent à la moyenne des valeurs mesurées.

#### c) Protocole opératoire pour la mesure de MVS

La détermination de la matière volatile en suspension de la biomasse permet de distinguer la partie organique des MS de la partie minérale ; leur mesure revient à faire introduire la coupelle ( $P_1$ ) de l'échantillon des boues activées déjà séchée à 105 °C dans un four pendant 2 h à 550 °C afin de brûler et calciner les matières volatiles. Après refroidissement, le nouveau poids ( $P_2'$ ) est alors mesuré. Les MVS sont évaluées par la relation (IV.4).

#### d) Protocole opératoire pour la mesure de MES

Le principe de détermination de la matière en suspensions de la biomasse est de calculer la masse de matière sèche obtenue après une séparation physique par centrifugation d'un volume de boues activées qui est répartie sur les godets de la centrifugeuse (50 mL d'échantillon par godet). On recueille les culots obtenus après centrifugation pour les déshydrater à 105 °C jusqu'à obtenir des masses constantes ; après refroidissement au dessiccateur les nouveaux poids sont mesurés. Les MVS sont alors données par la relation (IV.5).

e) Test de décantation ( $V_{30}$ )

L'essai est effectué dans une éprouvette graduée de 1 L ou un cône d'IMMOHF que l'on remplit d'échantillons de boues prélevés à la sortie du bassin d'aération de la STEP. On note le volume de boue décantée après un temps de 30 mn ( $V_{30}$ ) ; ce volume représente le volume de floc biologique présent dans un volume total d'un litre de boues activées, le reste étant de l'eau interstitielle.

f) Indice de boues (IB)

Dans certains cas, on est amené à calculer l'indice de boue en utilisant la dilution la plus faible, éventuellement faire des dilutions 1/4 ou 1/2 (c'est-à-dire en mettant 500mL de boues et 500 mL d'eau épurée ou 250 mL de boues et 750 mL d'eau épurée du décanteur), pour laquelle le volume après 30 minutes de décantation ( $V_{30}$ ) est inférieur à 300 mL. Sa formule de calcul est donnée par la formule (IV.7).

#### **IV.6.8.Détermination des pigments photosynthétiques**

Afin d'étudier l'état physiologique de *L.gibba* et mesurer ses réponses au stress abiotique induit par les deux colorants MC et ES avant et après les traitements biologiques, les pigments chlorophylliens (chlorophylles a, b) et caroténoïdes sont analysés quantitativement.

Les tests sont réalisés en utilisant 0,2 g de lentilles d'eau fraîches broyées et homogénéisées dans 100% d'acétone (100 ml) puis centrifugées à 2000 rpm pendant 10 min. L'absorbance du surnageant est alors mesurée par un spectrophotomètre UV-vis à 470, 661 et 644 nm, respectivement (**Vafaei et al. 2012**). Les teneurs en pigments chlorophylle a, chlorophylle b et les caroténoïdes ( $C_{X+C}$ ) sont calculées à l'aide des équations suivantes (**Lichtenthaler and Buschmann 2001**) :

$$\text{Chl a (mg/L)} = 11,24 \times A_{661} - 2,04 \times A_{664} \quad (\text{IV.12})$$

$$\text{Chl a (mg/g)} = \text{Chl a (mg/L)} \times (0,01 \text{ L acétone} / 0,2 \text{ g fronde}) \quad (\text{IV.13})$$

$$\text{Chl b (mg/L)} = 20,13 \times A_{664} - 4,19 \times A_{661} \quad (\text{IV.14})$$

$$\text{Chl b (mg/g)} = \text{Chl b (mg/L)} \times (0,01 \text{ L acétone} / 0,2 \text{ g fronde}) \quad (\text{IV.15})$$

$$C_{X+C}(\text{mg/L}) = 1000 A_{470} - 1,90 \text{ Chl a} - 63,14 \text{ Chl b} / 214 \quad (\text{IV.16})$$

$$C_{X+C}(\text{mg/g}) = C_{X+C}(\text{mg/L}) \times (0,01 \text{ L acétone} / 0,2 \text{ g fronde}) \quad (\text{IV.17})$$

**CHAPITRE V: *ESSAIS DE***  
***PHYTOREMEDIATION DES COLORANTS***  
***MARINE CIBANONE ET ECARLATE***  
***SOLOPHENYL BNLE PAR L.GIBBA***

## **CHAPITRE V: Essais de phytoremédiation des colorants Marine Cibanone et Ecarlate Solophényl BNLE par *L.gibba***

### **V.1. Introduction**

L'étude de l'effet des deux colorants textiles MC et ES sur la croissance des lentilles d'eau et la capacité de phytoremédiation de ces colorants par ces mêmes plantes constitue l'objectif principal de ce chapitre. Ceci nécessite des techniques d'analyses adéquates susceptibles d'expliquer les phénomènes mis en jeu.

Le but des tests de toxicité est de déterminer, dans des conditions expérimentales contrôlées, la concentration de colorant nécessaire pour entraîner un effet déterminé et servir à évaluer la toxicité potentielle de colorant *vis-à-vis* des lentilles d'eau. Il s'agit dans ce cas des tests de détermination des signes morphologiques de toxicité et d'inhibition de croissance des plantes en présence des colorants. Les symptômes morphologiques de toxicité permettent de déterminer la concentration de polluant tolérée par les lentilles d'eau alors que le dénombrement quotidien des frondes de *L.gibba* permet de déterminer l'inhibition de croissance définie par ces colorants.

Le choix des colorants envisagés dans les tests de toxicité (en vue d'une éventuelle phytoremédiation par les lentilles d'eau) sur l'espèce aquatique *L.gibba* est motivé par le fait que ces polluants présentent les problèmes suivants :

- Potentiels toxiques sur la vie aquatique ;
- Problèmes d'eutrophisation ;
- Persistance et bioaccumulation dans le milieu ;
- Transfert dans la chaîne alimentaire ;
- Composés toxiques cancérigènes et mutagènes.

Ces colorants textiles contaminent les écosystèmes de la planète et peuvent conduire à un déséquilibre total de notre environnement ; de ce fait, ces polluants organiques doivent être traités avant leur déversement dans les milieux naturels récepteurs.

Dans ce contexte, nous avons voulu contribuer à la protection et la préservation de l'environnement par ce projet ayant pour objectif l'épuration des effluents textiles par un procédé biologique considéré comme économique et écologique. Il s'agit du procédé de phytoremédiation de polluants organiques du textile (colorants synthétiques) par des plantes aquatiques de type lentilles d'eau ayant fait preuve d'agents de phytoremédiation très efficaces pour traiter différents polluants de diverse nature. Ce type de procédé biologique constitue une étape clé du traitement des effluents chargés de ces colorants.

## V.2. Tests de toxicité

Dans les tests de toxicité et de tolérance, une étape préliminaire est nécessaire afin de définir l'intervalle de variation des concentrations de colorant envisagées dans cette étude ; les concentrations utilisées sont choisies en fonction du comportement des frondes en présence du colorant. Ainsi, le phénomène de nécrose observé, permet de définir la limite supérieure de chaque intervalle. Après cette étape préliminaire, on étudie pendant quatre jours l'effet des deux colorants MC et ES à différentes concentrations (5-100 mg/L) sur la croissance des plantes aquatiques pour déterminer éventuellement la concentration tolérée ( $C_t$ ) par cette espèce et les différents paramètres inhibiteurs de croissance. Ces essais de toxicité dérivent d'un projet de ligne directrice 221 de l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) pour un test d'inhibition de la croissance de *Lemna sp* (OCDE 2006). Le protocole expérimental est décrit et est détaillé dans le chapitre IV.

### V.2.1. Validité des tests de toxicité

Les tests de phytotoxicité doivent satisfaire au critère de bonne santé des lentilles d'eau. Ce critère est basé sur le calcul du temps de doublement de frondes. Lorsque les plantes subissent un stress dû au milieu (carence en éléments nutritifs, lumière insuffisante, température froide, ou autre), le critère de bonne santé n'est pas satisfait et les tests ne devraient pas être élaborés dans ces conditions. Pour que l'essai soit valable, le temps de doublement ( $T_d$ ) du nombre de frondes chez les témoins doit être inférieur à 2,5 jours (60 heures). Le temps  $T_d$  est évalué à partir de l'équation suivante :

$$T_d = \frac{\ln 2}{AGR_c} \quad (V.1)$$

Où  $AGR_c$  est le taux de croissance moyen des frondes dans l'expérience témoin.

D'après les essais expérimentaux de toxicité, on trouve que le temps nécessaire pour doubler le nombre de frondes dans le test de contrôle est de 2,4 jours, ce qui est inférieur à la valeur seuil (2,5 jours) définie dans la directive 221 de l'OCDE (OCDE 2006), validant ainsi les tests de toxicité utilisant *L.gibba*.

### V.2.2. Détermination du seuil de toxicité

Dans le cas particulier de la toxicité chez *Lemna*, l'aspect morphologique permet de s'informer sur la capacité d'utilisation de ce type de végétaux en phytoremédiation en déterminant le seuil de toxicité défini comme étant la concentration maximale à laquelle

aucun signe de toxicité n'est observé au niveau des organes végétaux. La tolérance est définie comme étant le potentiel d'une plante à survivre dans un environnement chargé d'une substance pouvant être toxique.

Les frondes des lentilles d'eau sont quotidiennement observées pour des symptômes visuels de toxicité qui peut se manifester de différentes manières :

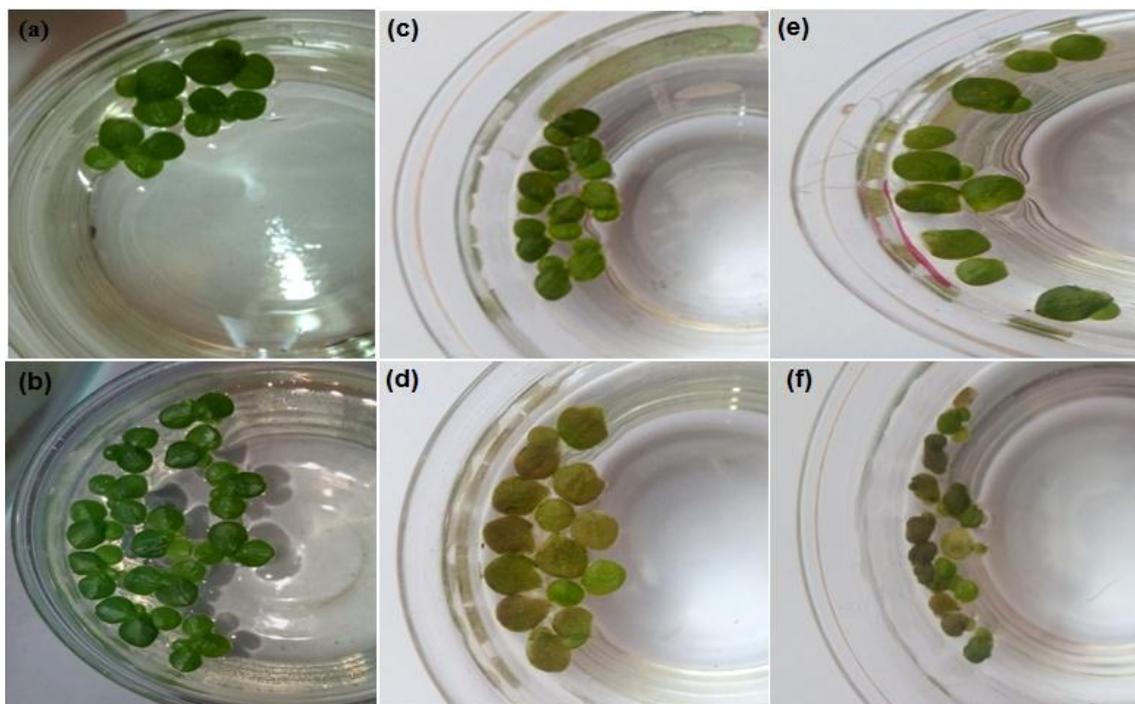
- La chlorose : dépigmentation des frondes (un virage de la couleur des frondes du vert vers le jaune) ;
- La dislocation des colonies : qui consiste en une séparation des frondes;
- La nécrose : morte localisée de tissu ;
- La réduction de la croissance : diminution de biomasse ou de la croissance.

Pour déterminer les effets de MC et ES sur *L.gibba* et la concentration tolérée par cette plante, les symptômes morphologiques de la toxicité de chaque colorant sont identifiés. Les frondes des lentilles d'eau sont observées quotidiennement ; les résultats montrent que les deux colorants causent des dommages visibles aux plantes (**Figure V.1**) à des concentrations supérieures à 50 mg/L. Ces dommages sont visibles dès le deuxième jour d'exposition à ES et dès le troisième jour d'exposition à MC. De plus, les lentilles d'eau présentent plus de signes de toxicité avec ES qu'avec MC.

Ces signes consistent en une dislocation des frondes puis en une réduction de la biomasse avec des concentrations de colorant > 50 mg/L. A des concentrations élevées de colorant (100 mg/L), la chlorose rapide de certaines frondes est observée, et leur couleur passe du vert au jaune en présence de l'un ou l'autre des colorants. Ces signes évoluent vers la nécrose de petites frondes à la fin de chaque test de toxicité.

Plusieurs chercheurs ont affirmé que la surveillance des symptômes visibles de toxicité chez les organismes vivants pourrait être une méthode efficace pour évaluer les effets délétères de certains polluants minéraux et organiques (**Henke et al. 2011; Posada et al. 2013; Song et al. 2015; Costa et al. 2018**). De plus, certains chercheurs ont souligné l'importance d'identifier le critère d'évaluation optimal lors de l'estimation de la toxicité et de considérer les différences intrinsèques entre les espèces lors de l'évaluation des effets toxicologiques des polluants (**Song et al. 2015**).

En conclusion, on peut dire que dans ce travail, les tests de toxicité et de tolérance aux deux colorants Marine Cibanone et Ecarlate Solophényl chez l'espèce *L.gibba* ont permis de déterminer la concentration de polluant tolérée qui est égale à 50 mg/L pour ces deux colorants. Cette concentration est choisie comme étant la concentration maximale de colorant à laquelle les essais de phytoremédiation seront élaborés.



**Figure V.1.** Signes visibles de toxicité présentes par *L.gibba* après 4 jours d'exposition au colorants à des concentrations > 50 mg/L : (a) témoin à t = 0 jours, (b) témoin à t = 4 jours, (c) réduction de la biomasse, (d) chlorose, (e) dislocation des frondes, (f) nécrose

### V.2.3. Détermination des paramètres inhibiteurs de croissance

Plusieurs études publiées définissent la croissance des plantes comme l'augmentation d'un paramètre observable tel que le nombre de frondes, la surface totale des frondes, le poids sec de la plante ou sa teneur en chlorophylle (Mkandawire et al. 2006; Mazur et al. 2018).

Dans cette étude, l'évaluation de l'inhibition de croissance de la macrophyte *L.gibba* en présence des deux colorants MC et ES à différentes concentrations est effectuée par la détermination des différents paramètres inhibiteurs de croissance basé sur le nombre de frondes. Ces paramètres inhibiteurs sont les suivants : le taux de croissance moyen (AGR), le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (% Ir), et certaines valeurs remarquables telles que CI<sub>50</sub>, NOEC et LOEC.

Le dénombrement quotidien des frondes aux temps initial ( $t = 0$ ) et aux temps final ( $t = 4$  j) permet d'établir une relation entre la concentration de colorant et le taux de croissance moyen (AGR) ; il est donné par la relation suivante (OCDE2006) :

$$AGR = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{\Delta t} \quad (V.2)$$

$N_i$  et  $N_j$  sont respectivement le nombre de frondes au temps  $i = 0$  et au temps  $j = 4$  ;

$\Delta t$  est la durée du test (4 jours).

Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance (%Ir) peut ensuite être calculé pour chaque concentration expérimentale (groupe traité) selon la formule suivante (OCDE 2006)

$$\% Ir = \frac{AGR_c - AGR_t}{AGR_c} \times 100 \quad (V.3)$$

$AGR_c$  et  $AGR_t$  sont les taux de croissance moyen dans l'expérience témoin et les expériences de test de toxicité, respectivement.

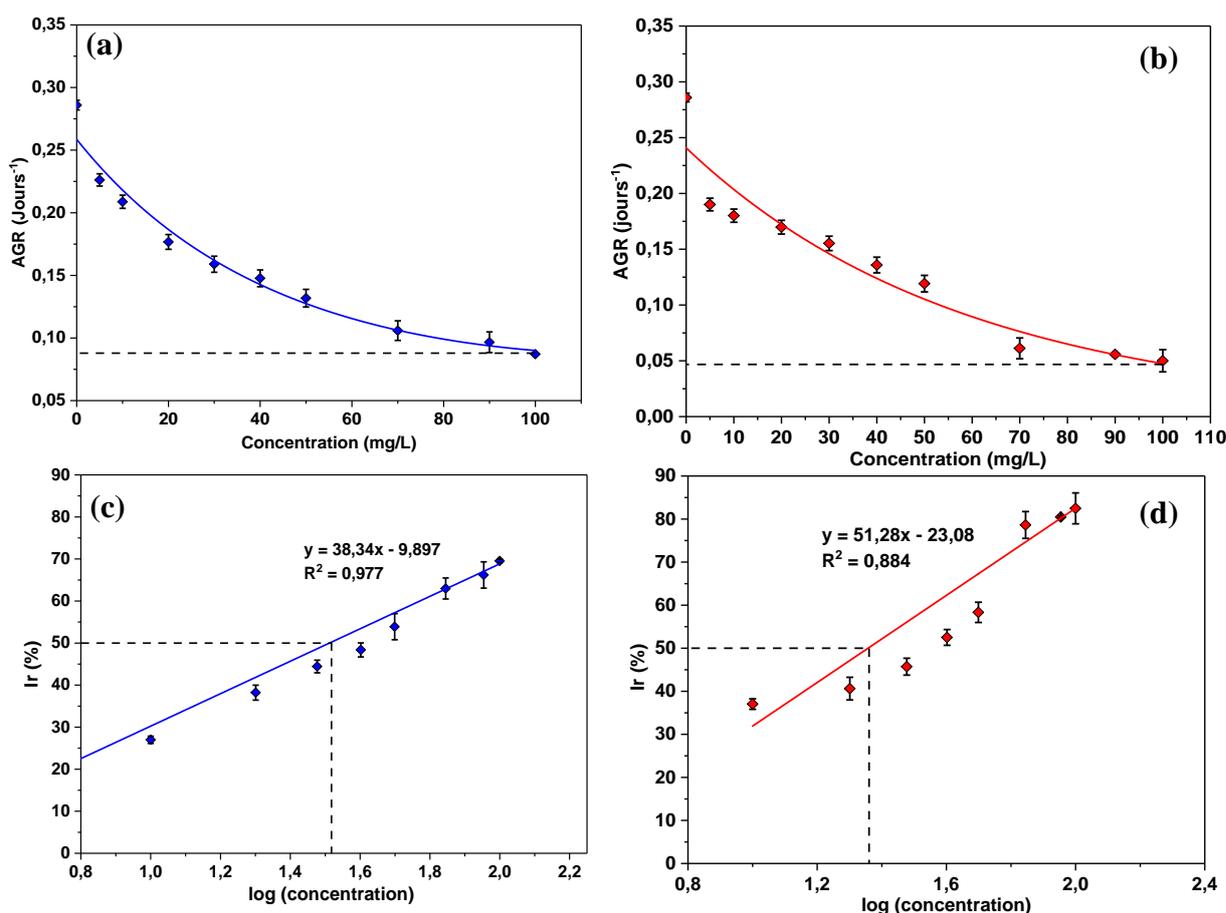
Dans cette étude, les effets toxiques des colorants utilisés sont évalués en déterminant l'inhibition du taux de croissance moyen causé par diverses concentrations de chaque colorant.

La **Figure V.2** représentant le taux de croissance moyen (AGR) de *L.gibba* en fonction des différentes concentrations, montre que MC et ES réduisent le taux de croissance moyen des lentilles d'eau à toutes les concentrations de colorant appliquées dans ce travail.

Pour chaque colorant, le taux de croissance des lentilles d'eau montre une baisse monotone avec l'augmentation de la concentration de colorant, sans atteindre une valeur de plateau ou un palier signe d'une inhibition maximale. A des concentrations de colorant  $\leq 50$  mg/L, la biomasse et le taux de croissance des lentilles d'eau sont affectés, mais il n'y a aucun signe visible de toxicité (chlorose, dislocation des frondes ou nécrose). Cependant, à des concentrations  $> 50$  mg/L, les plantes présentent une biomasse réduite et une chlorose qui évolue vers la nécrose (frondes mortes). Le taux de croissance moyen dans le traitement témoin est de 0,286/jour. Pour chaque colorant, la diminution la plus marquée du taux de croissance s'est produite avec la concentration maximale de colorant de 100 mg/L (les taux de croissance à cette concentration étaient de 0,085 et 0,048/jour pour MC et ES, respectivement, comme indiqué par les lignes en pointillés sur la Figure V.2). Cette concentration a réduit l'AGR de 69,6% (MC) et 82,5% (ES) par rapport au témoin. Cela peut être causé par une inhibition de la division cellulaire résultant d'un stress oxydatif ou d'une altération du photosystème de la plante entraînée par un transport réduit

des électrons du chloroplaste (Sree et al. 2015), ou peut être attribué à un effet inhibiteur du colorant sur la photosynthèse et/ou la synthèse des protéines de croissance (Vafaei et al. 2012).

Certaines études ont rapporté les effets de divers polluants sur plusieurs espèces de plantes aquatiques. Khataee et al. 2012 ont constaté que le taux de croissance relatif (RGR) de *L. minor* diminuait lorsque la concentration d'Acid Blue 92 augmentait. De plus, le RGR de la même espèce diminuait lorsque la concentration initiale de bleu de méthylène augmentait (Reema et al. 2011). Des résultats similaires rapportés par (Khataee et al. 2013) ont indiqué que l'exposition d'*Azolla filiculoides* à l'Acid Blue 92 a entraîné une diminution de la croissance avec l'augmentation de la concentration de colorant (10 et 20 mg/L). Aussi (Vafaei et al. 2012) ont démontré que l'exposition de cette espèce végétale à 10 et 20 mg/L du colorant Basic Red 46 réduisait le RGR de 26,83 et 32,05%, respectivement par rapport au témoin.



**Figure V.2.** Taux de croissance moyen de *L.gibba* avec différentes concentrations et le pourcentage d'inhibition du taux de croissance par rapport à la concentration de colorant de (a, c) MC et (b, d) ES. Les lignes en pointillés (a, b) indiquent le taux de croissance le plus faible. Chaque barre verticale représente l'écart type, n = 3

Les paramètres d'inhibition de croissance sont déduits des courbes insérées dans la **Figure V.2**. Les concentrations conduisant à une réduction de 50% de la croissance des plantes ( $IC_{50}$ ) sont de 36,31 et 26,92 mg/L pour MC et ES, respectivement. Les concentrations minimales de colorant qui ont un effet inhibiteur sur *L.gibba* (LOEC) et les coefficients de détermination ( $R^2$ ) sont également déterminées et sont présentés dans le **Tableau V.1**. La concentration sans effet observé (NOEC) de chaque colorant n'a pas pu être déterminée dans les conditions du présent travail ; en effet, d'autres mesures sont nécessaires, en particulier à des concentrations plus faibles de colorant pour pouvoir calculer la NOEC. Ces valeurs peuvent être utilisées comme indices indicateurs lors de la biosurveillance des polluants issus de l'industrie textile.

**Tableau V.1.** Paramètres d'inhibition de croissance de *L.gibba* en présence des colorants MC et ES

Colorant	$IC_{50}$ (mg/L)	$R^2$	LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
MC	36,31	0,98	5	*
ES	26,92	0,88	5	*

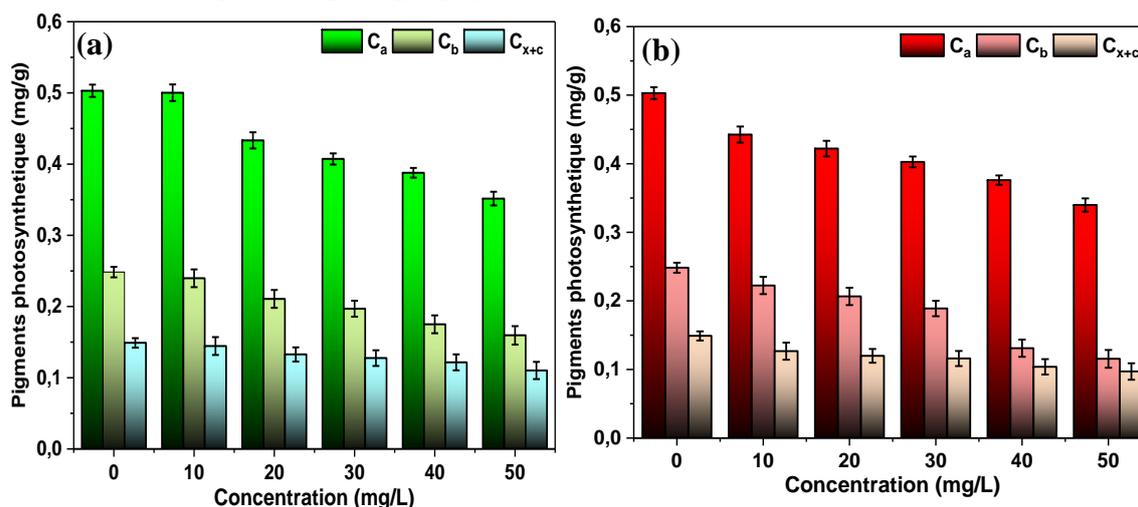
\*Pas observé

#### V.2.4. Détermination des paramètres inhibiteurs des pigments photosynthétiques

Afin de mesurer la réponse de *L.gibba* au stress induit par chaque colorant (10–50 mg/L), ses pigments chlorophylliens et caroténoïdes sont quantifiés. Le protocole expérimental utilisé pour mesurer ces paramètres est expliqué dans le **chapitre IV**, et les équations de calcul de la chlorophylle a (Chl a), la chlorophylle b (Chl b) et les caroténoïdes ( $C_{X+C}$ ) sont calculés à l'aide des équations (**IV.12- IV.18**).

Les effets inhibiteurs des deux polluants MC et ES sur les pigments photosynthétiques sont présentés sur la **Figure V.3** qui montre le changement des niveaux de pigment photosynthétiques en fonction de la concentration de chaque colorant. Les résultats indiquent que la teneur en Chl a est significativement affectée par la présence de chaque colorant ; ce paramètre diminue de 30 et 32% après 4 jours de traitement avec 50 mg/L de MC et ES, respectivement. La teneur en Chl b diminue également significativement, de 36 et 54%, après 4 jours de traitement avec 50 mg/L de MC et ES, respectivement. Les niveaux de caroténoïdes sont aussi réduits de 26 et 35% en réponse à l'exposition de MC et ES, respectivement. Cette diminution des pigments photosynthétiques pourrait être due à l'endommagement de l'appareil photosynthétique, à l'inhibition du transport des électrons et à la décomposition de la membrane chloroplastique par ces deux colorants

textiles (Vafaei et al. 2012; Sandmann and Böger 1980). Plusieurs études ont rapporté des résultats similaires. L'étude menée par (Khataee et al. 2013) a montré que les concentrations de Chl a, Chl b et C<sub>X+C</sub> ont diminué par rapport au témoin dans la plante *Azolla filiculoides* exposé à 10 et 20 mg/L d'Acid Blue 92. Aussi, l'étude de (Sree et al. 2015), a montré qu'un polluant présent dans le milieu de culture a inhibé les enzymes impliquées dans la synthèse des intermédiaires chlorophylliens tels que l'acide 5-aminolévulinique et la protoporphyrine.



**Figure V.3.** Taux de pigments chlorophylliens et caroténoïdes en fonction de la concentration des colorants (a) MC et (b) ES ; Chaque barre verticale indique l'écart type, n = 3

Nous avons utilisé aussi une régression linéaire pour ajuster les points de chaque teneur en pigment par rapport à la concentration initiale de colorant. Dans tous les cas, la relation entre la teneur en pigment et la concentration initiale de colorant s'est avérée linéaire, avec des coefficients de détermination variant entre 0,938 et 0,983, comme le montre le **Tableau V.2**.

**Tableau V.2.** Résultats de la régression linéaire teneur en pigment - concentration initiale de colorant

Pigment	Équation de régression	R <sup>2</sup>
<b>MC</b>		
Chl a	Y = - 0,032x+0,542	0,958
Chl b	Y = - 0,018x+0,270	0,987
Caroténoïdes (C <sub>X+C</sub> )	Y = - 0,007x+0,157	0,983
<b>ES</b>		
Chl a	Y = - 0,029x+0,517	0,963
Chl b	Y = - 0,027x+0,281	0,957
Caroténoïdes (C <sub>X+C</sub> )	Y = - 0,009x+0,151	0,938

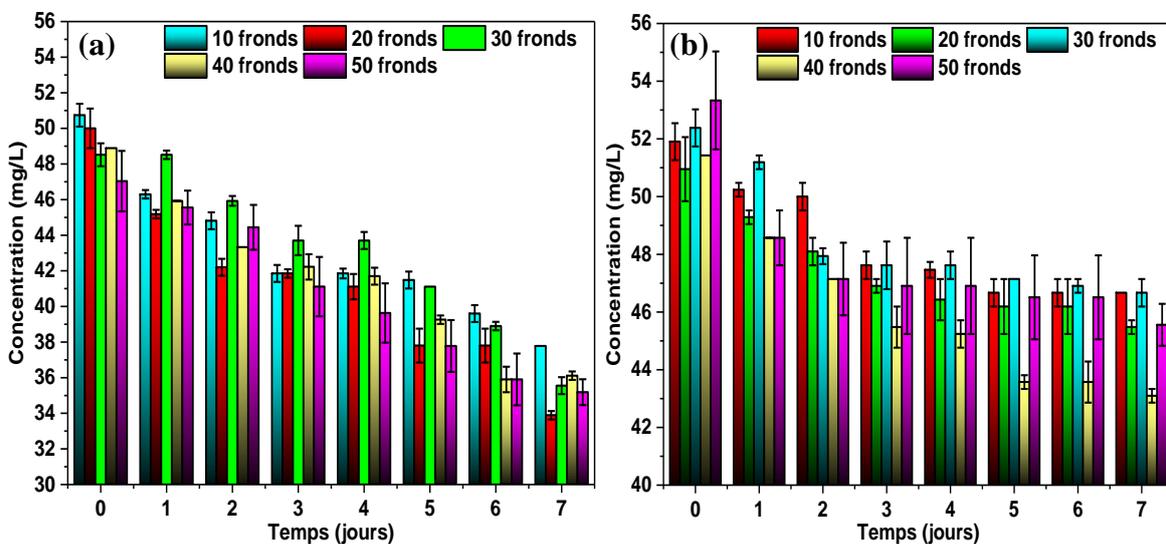
### V.3. Essais de phytoremédiation

Afin d'examiner la capacité de phytoremédiation des colorants par les lentilles d'eau, des essais de traitement et de contrôle sont élaborés en trois réplifications pendant sept jours. Pour mettre en œuvre ces manipulations, les étapes suivantes sont adoptées :

- Détermination de la dose optimale des plantes ;
- Evaluation de l'effet de concentrations variables de polluant sur le potentiel de phytoremédiation de *L.gibba* ;
- Identification du mécanisme de phytoremédiation des colorants par *L.gibba*.

#### V.3.1. Détermination de la dose optimale de la plante *L.gibba*

La détermination de la dose optimale de la plante correspondant aux conditions opératoires définies dans la présente étude est nécessaire en premier lieu. Les courbes illustrées dans la **Figure V.4** représentent l'effet des différents nombres de frondes (10-50 frondes) sur l'élimination des deux colorants MC et ES à la concentration tolérée de 50 mg/L. Ces courbes montrent que globalement, il y a un abattement et une réduction de la concentration de colorants dans la phase liquide pour tous les nombres de frondes utilisés, suggérant que cette biomasse est responsable de l'élimination de ces polluants.

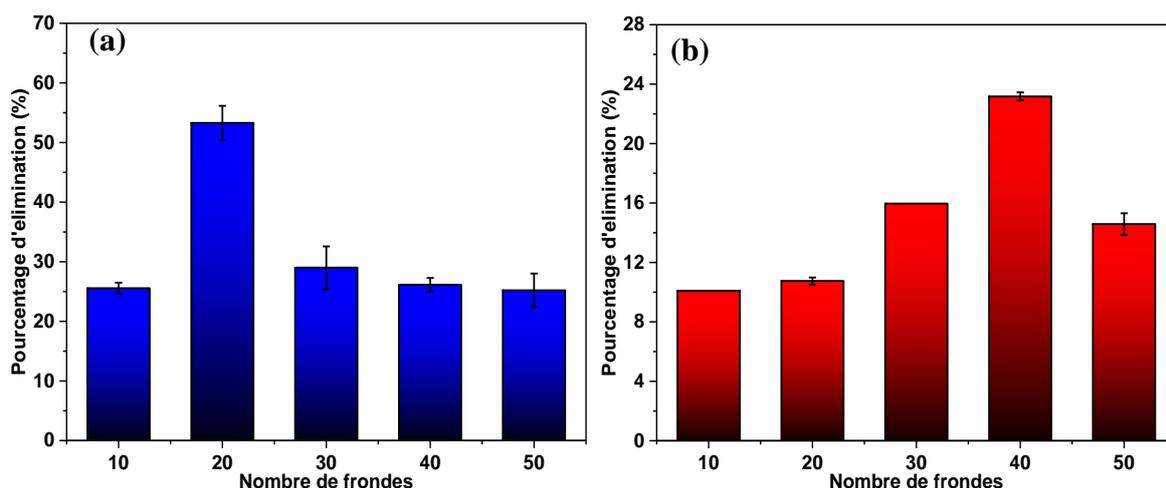


**Figure V.4.** Effet du nombre de frondes sur l'élimination des deux colorants (a) MC, (b) ES. Les barres verticales indiquent l'écart type, n = 3

La **Figure V.5** représente l'effet de différents nombres de frondes sur la variation du pourcentage d'élimination (PE%) des deux colorants pour une concentration tolérée de 50 mg/L. D'après les courbes, la quantité optimale de plantes est de 20 et 40 frondes avec une efficacité d'élimination de 53,3 et 23,2% pour MC et ES, respectivement. Cependant,

dans le cas de MC, la plus grande quantité de plantes (50 frondes) diminue l'efficacité du procédé de phytoremédiation à 25,2% ; cela peut s'expliquer par le fait que dans ces conditions expérimentales, une eutrophisation pourrait se produire dans le milieu aqueux suite à l'augmentation de la densité de population (biomasse/surface de l'eau), qui peut entraîner une diminution de la croissance des plantes affectant la capacité de phytoremédiation du composé organique par *L.gibba* (**Török et al. 2015**). Plusieurs d'autres études ont également montré qu'un autre facteur important limitant la croissance de *L.gibba* est le surpeuplement et les compétitions interspécifiques (**Driever et al. 2005; Frederic et al. 2006**), et une densité élevée de population de plantes peut entraîner une diminution du taux de croissance relatif AGR et par conséquent diminuera l'efficacité du traitement biologique (**Demirezen et al. 2007**). En outre, dans les conditions environnementales favorables, les lentilles d'eau sont capables de coloniser rapidement et d'occuper l'espace grâce à une expansion rapide des colonies (**Kadlec and Bevis 2009**), cependant, lorsque les espaces physiques deviennent limités comme dans ce cas, un surpeuplement et une compétition interspécifique peuvent se produire entre les individus de l'espèce (**Njambuya et al. 2011**).

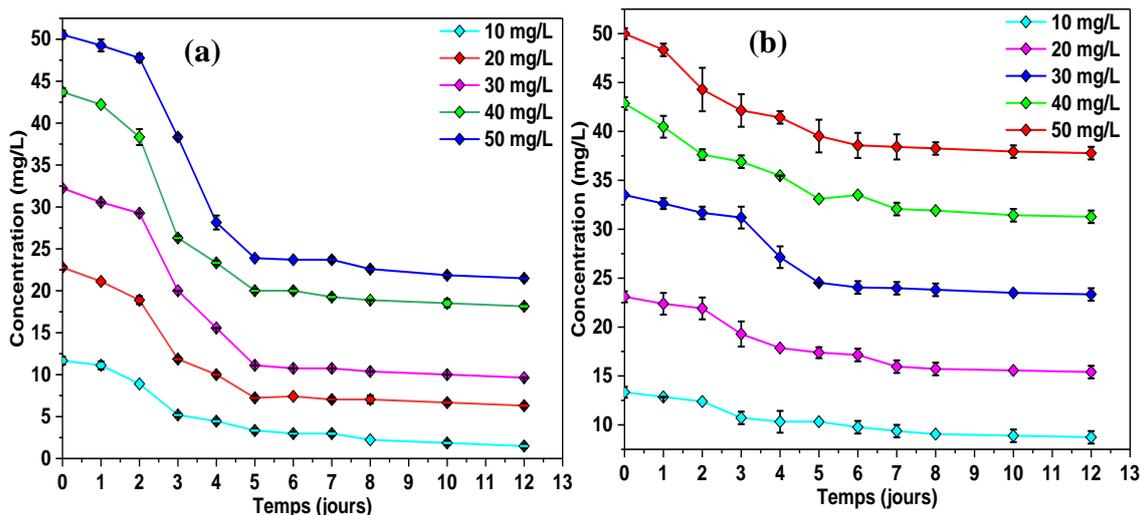
Pour le cas d'ES, on observe que le pourcentage d'élimination de colorant augmente considérablement avec l'augmentation de la quantité de plantes, puisque la plus grande quantité de biomasse augmente l'interaction entre le colorant et la plante, ce qui engendre un effet bénéfique sur l'efficacité d'élimination des polluantes par le procédé de phytoremédiation (**Török et al. 2015**). Plusieurs études ont trouvé le même résultat. (**Vafaei et al. 2012**) ont prouvé que l'élimination du colorant azoïque Basic Red 46 par *Azolla filiculoides* augmentait avec l'accroissement de la quantité de biomasse et atteignait la valeur maximale de 95% d'élimination. Une tendance similaire a été observée par (**Khataee et al. 2010**) qui a prouvé que l'élimination du colorant Vert Malachite atteignait une valeur maximale de 93% par *Macroalgae Charasp* avec une quantité de biomasse plus élevée.



**Figure V.5.** Effet du nombre de frondes de *L.gibba* sur l'efficacité d'élimination des colorants, (a) MC et (b) ES. Les barres verticales indiquent l'écart type, n = 3

### V.3.2. Effet de la concentration initiale de MC et ES

Le but d'étudier l'effet de la concentration initiale des colorants est de voir la relation entre la concentration initiale du polluant et la capacité de la biomasse à éliminer les colorants dans une solution après sept jours de traitement. En général, la concentration initiale de colorant peut être l'un des facteurs influençant l'efficacité de phytoremédiation du colorant provoquant une toxicité à des concentrations élevées (**Pearce et al. 2003; Khataee et al. 2011**). Ainsi, des tests sont effectués pour des concentrations de MC et ES comprises entre 10 et 50 mg/L. Vingt et quarante frondes de *Lemna* sont ajoutées aux solutions enrichies respectivement en MC et ES dans les conditions mentionnées ci-dessus (lumière naturelle et artificielle, V= 100 mL, pH = 6,1 ± 0,1, T = 21 ± 1°C) pendant 7 jours d'exposition.



**Figure V.6.** Élimination de (a) MC et (b) ES par *L.gibba* à différentes concentrations initiales, nombre de frondes = 20 frondes pour MC et 40 frondes pour ES. Les barres verticales indiquent l'écart type, n = 3

Les résultats illustrés sur la **Figure V.6** montrent qu'après traitement, une diminution significative de la concentration de colorant est observée pour toutes les concentrations testées par rapport aux témoins correspondants. Cette diminution est obtenue après quatre jours d'exposition à la biomasse, puis elle atteint l'équilibre à partir du cinquième jour. Dans les conditions du présent travail, l'élimination des colorants textiles par *L.gibba* est plus efficace dans le cas de MC, principalement à des faibles concentrations; ceci est probablement dû à la disponibilité des sites actifs pour l'absorption des molécules de colorant. D'un autre côté, la même figure montre que l'abattement de la concentration du colorant ES à partir de la solution contaminée est légèrement plus faible par rapport à MC, ce qui prouve que cette plante manifeste une efficacité assez différente *vis-à-vis* les deux colorants (MC > ES) probablement dû à leurs structures chimiques qui sont différentes. En effet, le colorant rouge (ES) ayant un poids moléculaire plus élevées peut-être plus difficile pour être absorbé par la biomasse végétale. Dans ce cas, on peut conclure à priori que la taille de la molécule pourrait avoir un effet sur la capacité de phytoremédiation de ces polluants organiques par cette espèce aquatique.

Les différents pourcentages d'élimination (PE%) du polluant sont calculés à partir de l'équation (IV.8) décrite dans le **Chapitre IV**.

D'après le **Tableau V.3**, on constate que ces pourcentages d'élimination diminuent avec l'augmentation de la concentration initiale des deux colorantes. La meilleure efficacité atteinte est de 75 et 30% obtenue pour 10 mg/L de MC et ES, respectivement. Cependant, cette efficacité diminue pour des concentrations plus élevée (20-50 mg/L). Plusieurs études

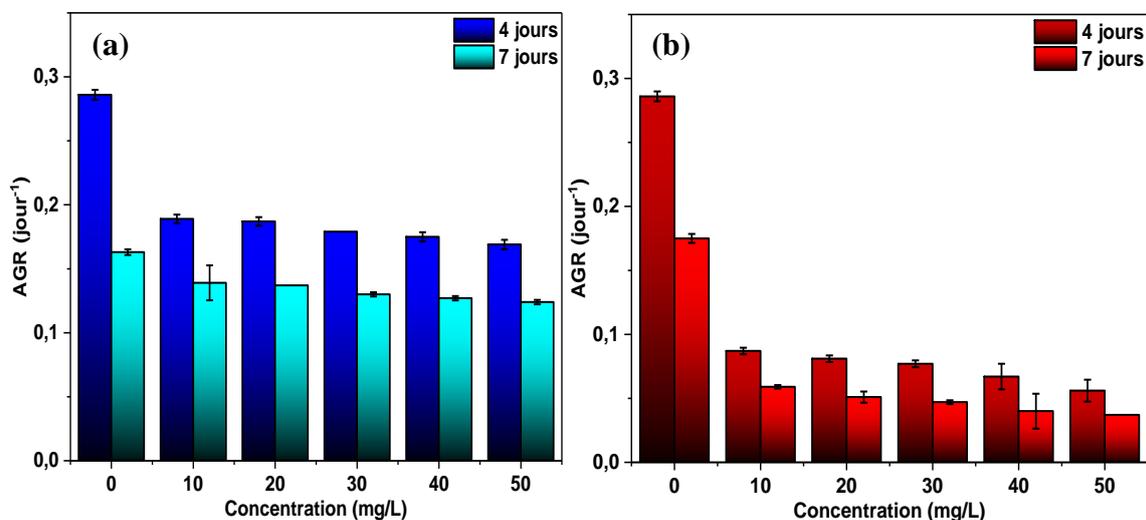
ont affirmé que les espèces de lentilles d'eau étaient efficaces pour éliminer les colorants présents en solution mono-soluté ou en mélange (Vafaei et al. 2012; Khataee et al. 2013; Yaseen and Scholz 2017). L'efficacité d'élimination biologique varie d'une étude à l'autre ; (Török et al. 2015) ont trouvé que *L.minor* était efficace pour éliminer 98% de vert malachite et 96% de violet cristal à une concentration de 40 mg/L. Cependant Yaseen and Scholz 2018 ont démontré que pour un mélange de colorants contenant 2 mg/L de RB 198 et 8 mg/L de BR 46, les pourcentages d'élimination étaient d'environ 53% ; néanmoins, ce pourcentage a diminué à 41% pour des solutions contenant 5 mg/L de chaque polluant. Ces résultats confirment certaines relations entre l'efficacité de phytoremédiation végétale et la concentration initiale en colorant, dans laquelle des concentrations initiales élevées de polluants entraînent une faible efficacité d'élimination biologique.

**Tableau V.3.** Efficacité d'élimination de MC et ES pour différentes concentrations initiales de colorant

Concentration initiale (mg/L)	Pourcentage d'élimination (PE %)	
	MC	ES
10	74,60	29,67
20	69,11	30,93
30	66,67	28,44
40	55,93	25,19
50	53,11	23,17

Afin d'expliquer l'effet de la concentration initiale sur la croissance de *L.gibba*, le taux de croissance moyen (AGR) est évalué ; les résultats présentés sur la **Figure V.7** indiquent que le taux de croissance relatif diminue avec l'augmentation de la concentration initiale des deux colorants durant le 4<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour suite à la présence d'une inhibition significative de la croissance des plantes par la présence d'une concentration élevée des deux colorants. Ceci peut s'expliquer par le fait que les deux molécules de colorants peuvent provoquer un effet inhibiteur sur la photosynthèse de la plante tout en réduisant le transport des électrons, inhiber la synthèse des protéines et la fixation de l'azote et en même temps augmenter l'activité de la protéase (El-Shahate et al. 2011; Sood et al. 2011). Certaines études ont été en accord avec nos résultats. Selon (Kabara et al. 2011), la capacité de la plante *Glandularia pulchella* à éliminer le colorant azoïque vert HE4B diminuait avec l'augmentation de la concentration initiale de colorant dans les solutions,

suite à la toxicité produite sur la plante par ce polluant. Cette toxicité présente un impact sur le système enzymatique, ce qui entraîne une réduction du potentiel d'élimination de cette plante.



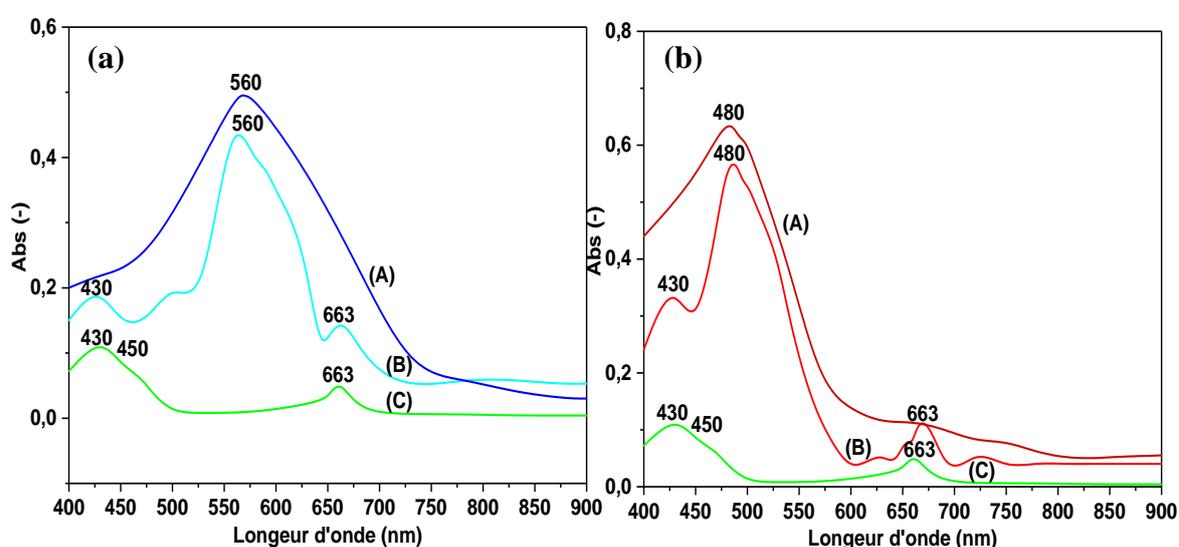
**Figure V.7.** Taux de croissance moyen (AGR) de *L.gibba* avec différentes concentrations de (a) MC et (b) ES

### V.3.3. Identification du mécanisme d'élimination des colorants par *L.gibba*

Certains travaux de recherche ont démontré que les plantes aquatiques pouvaient éliminer les colorants textiles des milieux contaminés avec un mécanisme de phytodégradation. Par exemple, les espèces *Lemna* éliminent les colorants et les transforment en différents composés intermédiaires (Khataee et al. 2012; Khataee et al. 2010; Singh et al. 2019; Movafeghi et al. 2016). D'autres chercheurs ont mis en évidence par ailleurs l'effet synergique entre les plantes et les microorganismes pour la transformation de ces xénobiotiques en produits moins nocifs (Ahir et al. 2017). D'autres études ont cependant étudié le potentiel d'élimination des colorants dangereux par certaines plantes aquatiques sans élucider le mécanisme du phénomène.

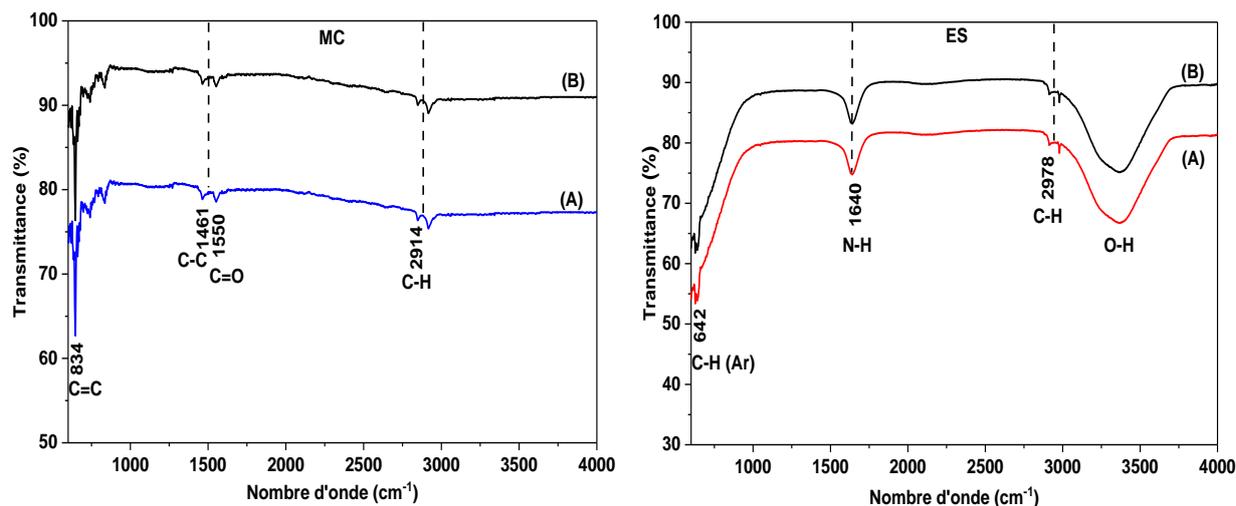
Dans le présent travail, afin d'examiner le mécanisme d'élimination de MC et ES par *L.gibba*, la biomasse végétale est analysée et son contenu est extrait par l'acétone avant et après exposition au colorant. Les différents balayages spectraux utilisant l'analyse UV-vis et FTIR sont alors enregistrés. Comme le montre la **Figure V.8**, les spectres UV-vis (A) représentant les colorants dilués dans l'acétone montrent un décalage de 580 à 560 nm et de 495 à 480 nm en  $\lambda_{\max}$  de MC et ES, respectivement. Cela est dû à la dissolution du colorant dans l'acétone plutôt que dans l'eau ( $\lambda_{\max} = 580$  nm pour MC et  $\lambda_{\max} = 495$  nm pour ES). Les deux spectres (B) sont restés essentiellement inchangés par rapport aux spectres UV-

vis (A) puisque les pics maximums des deux colorants n'ont pas disparu avec  $\lambda_{\max}= 560$  nm pour MC et  $\lambda_{\max}= 480$  nm pour ES. Cependant, dans les mêmes spectres (B), on observe l'apparition de deux nouveaux pics à 430 nm et 663 nm qui sont aussi présents dans les spectres des contrôles (C) (plantes non exposées aux polluants) et qui correspond à la présence de la chlorophylle. Ceci peut suggérer que *L.gibba* accumule les deux polluants à l'intérieur de sa biomasse sans aucune dégradation/phytodégradation (Török et al. 2015; Imron et al. 2019). Comme premier résultat, nous pouvons dire que l'élimination des deux polluants pourrait être effectuée sans changement structurel significatif dans les molécules de colorant. Pour le confirmer, l'analyse FT-IR de MC et ES est réalisée en phase liquide avant et après 7 jours de traitement avec *L.gibba*.



**Figure V.8.** (A) Spectres UV-vis de (a) MC et (b) ES dilués dans l'acétone, (B) Teneur en MC et ES phytoaccumulés extraits de la biomasse de *Lemna* après traitement de 7 jours par l'acétone et (C) Pigments photosynthétiques extraits de la biomasse native (sans colorants) par l'acétone

Les résultats présentés sur la **Figure V.9** indiquent que la phytoaccumulation des polluants a lieu sans modification de la structure moléculaire des deux colorants. En effet, aucun changement dans les pics des spectres n'a été enregistré. Des résultats similaires ont déjà été rapportés pour la phytoaccumulation de plusieurs colorants. Les champignons *A. niger* ont accumulé l'acide Bleu 161 et l'ont retiré d'un milieu contaminé sans changement structurel significatif dans les molécules de colorant (Chojnacka 2007). Aussi, *L.minor* a également montré que le potentiel d'élimination du bleu de méthylène, est principalement dû au mécanisme de phytoaccumulation (Reema et al. 2011). Selon (Nilratnisakorn et al. 2007), l'observation au microscope électronique à transmission de *T.angustifolia* a révélé l'accumulation du colorant Reactive Red 141 dans leurs tissus après 28 jours d'exposition.

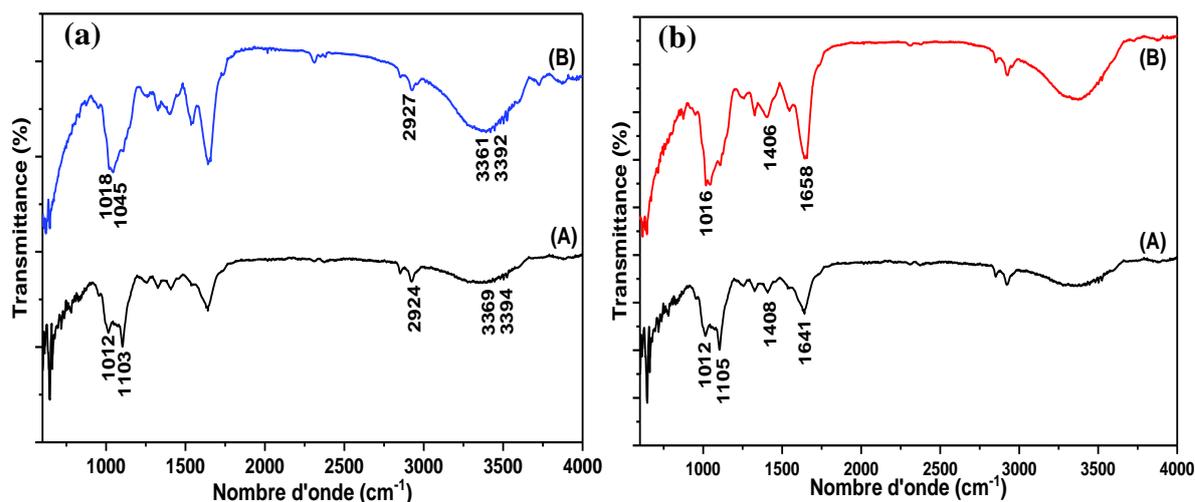


**Figure V.9.** Spectres FT-IR du colorant (a) MC, (b) ES en phase liquide (A) avant traitement et (B) après 7 jours de traitement

Une autre analyse plus approfondie est réalisée par spectroscopie FT-IR sur la biomasse de *L.gibba* pour obtenir plus d'informations sur la nature du mécanisme de liaison entre la plante et le colorant, et les spectres de la biomasse de *Lemna* avant et après exposition au colorant sont présentés sur la **Figure V.10**. Pour le cas d'ES, la **Figure V.10 a** montre la présence des pics à 1012, 1641 et 1408  $\text{cm}^{-1}$  qui sont attribués à l'étirement de C-OH de l'alcool, C=C de l'alcène et à la déformation des fonctions phénol. Ces pics sont déplacés à hautes et basses fréquences à 1016, 1658, 1406  $\text{cm}^{-1}$  respectivement (**Figure V.10 b**) après avoir été exposés à ce colorant pendant 7 jours. Pour le cas de MC, la **Figure V.10 a** montre que les pics attribués à l'alcool primaire (1012 et 1103  $\text{cm}^{-1}$ ) sont décalés aux hautes fréquences vers 1018 et 1045  $\text{cm}^{-1}$  (**Figure 10b**) ainsi que les pics obtenus à 3369 et 3394  $\text{cm}^{-1}$  qui sont affectés aux fonctions amines primaires sont décalés vers les basses fréquences à 3361, 3392  $\text{cm}^{-1}$ .

Cela suggère que les fonctions alcool, alcène, phénol et amine sont responsables de la liaison de la biomasse végétale (*L.gibba*) avec les deux colorants MC et ES. Des travaux similaires ont indiqué que les groupes fonctionnels contenus dans les molécules de colorant peuvent être liés à la surface des plantes aquatiques. **Reema al. 2011** ont montré, après analyse FT-IR, que C=O carbonyle, le groupe amine N-H et P-O présents dans le colorant bleu de méthylène sont liés à la surface de *L. minor*. Sur la base de tous ces résultats, on peut conclure que l'élimination des deux colorants peut s'expliquer par un phénomène de phytoaccumulation qui se déroule en deux étapes : la première étape est l'étape passive (élimination rapide) lorsque le colorant est adsorbé à la surface de la plante par attraction électrostatique et la deuxième étape (étape d'élimination

progressive) a lieu lorsque le colorant s'accumule dans la biomasse de *L.gibba* et se transfère à l'intérieur de ces cellules végétale (Chojnacka 2007; Nilratnisakorn et al. 2007; Khellaf and Zerdaoui 2013). Finalement, on peut conclure de cette étude que le mécanisme impliqué dans l'élimination des colorants à partir d'eau contaminée à l'aide de *L.gibba* consiste en un processus en deux étapes : la biosorption des molécules de colorant conduisant à la liaison des solutés à la biomasse végétale, puis la phytoaccumulation des molécules par les plantes en croissance active.



**Figure V.10.** Spectres FT-IR de la biomasse de *Lemna*(a) MC et (b) ES avant traitement (A) et après 7 jours de traitement (B)

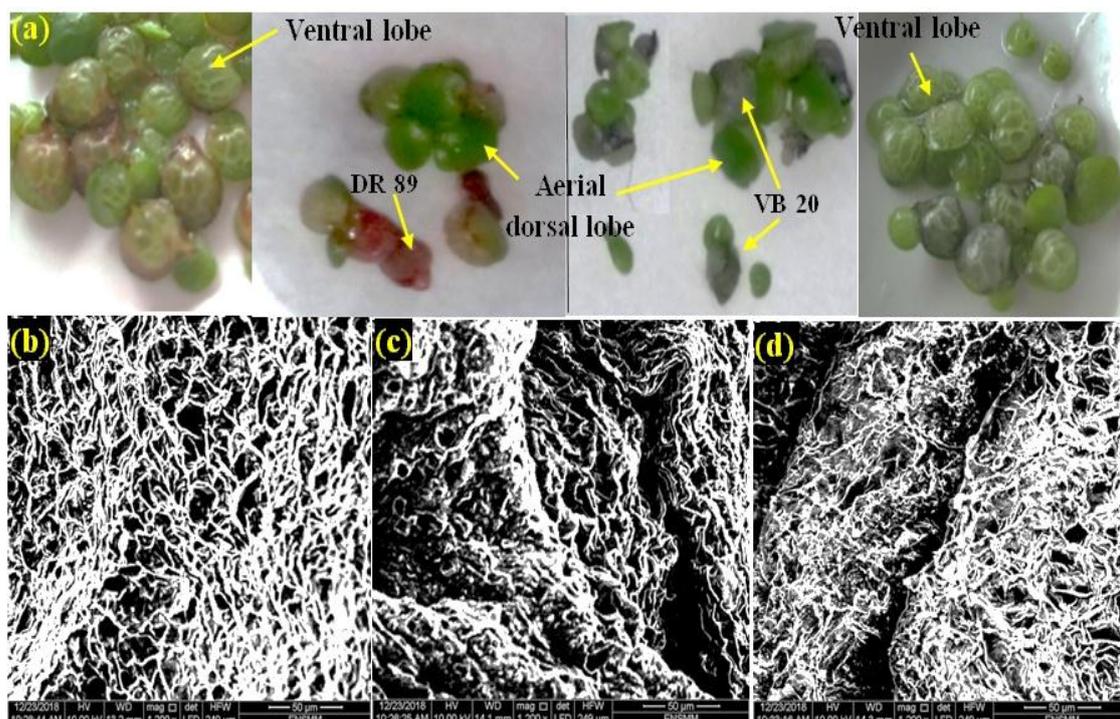
Par ailleurs, les analyses visuelles et la morphologie microscopique de la biomasse végétale de *L.gibba* sont effectuées pour identifier les sites responsables de la phytoaccumulation des deux colorants par cette plante aquatique *L.gibba* possède des frondes formées de lobes dorso-ventraux. Le lobe dorsal aérien contient des pigments de chlorophylle et le lobe ventral est incolore et partiellement submergé assurant la flottabilité de la plante (Hillman 1961).

La **Figure V.11a** représentant l'aspect visuel des frondes de *Lemna* avant et après phytoaccumulation des deux colorants, montre que le lobe dorsal n'est pas coloré par les deux polluants, car la surface de la cuticule le rend imperméable et répulsif à la solution aqueuse de colorant ; cependant, le lobe ventral et les racines fines sont colorés en rouge (ES) et en bleu (MC).

La microscopie électronique à balayage (MEB) fournit une caractérisation visuelle des tissus végétaux à une résolution plus élevée. La morphologie de la plante native (sans exposition aux deux colorants) illustrée sur la **Figure V.11 b** est d'apparence rugueuse avec une surface poreuse et des pores de formes et de diamètres variés ; ces propriétés sont

considérées comme nécessaires à la capacité de phytoaccumulation des deux colorants (Török et al. 2015).

Cependant, la morphologie de la plante après la phytoaccumulation des deux colorants est encore rugueuse avec un petit élargissement des pores en raison des molécules de colorant accumulées sur le tissu végétal (Figures V.11c, V.11 d). Ceci suggère que les pores induits par le colorant entraînent une absorption accrue d'eau et de composés organiques par les frondes. Cependant, une étude plus approfondie est nécessaire pour déterminer l'étendue de ce phénomène sur un large éventail de produits chimiques qui induisent cet effet. De plus, des travaux supplémentaires sont nécessaires à l'avenir pour élucider la connaissance des voies d'accumulation et de dégradation dans plusieurs plantes, ce qui pourrait aider à comprendre et à améliorer le rôle des macrophytes aquatiques en tant qu'agent de phytoremédiation vital pour la pollution de l'eau.



**Figure V.11.** (a) Analyse visuelle de *L. gibba* avant traitement et micrographie MEB de la biomasse de *L. gibba*(b) avant la phytoaccumulation du colorant, (c) après phytoaccumulation de MC, (d) après phytoaccumulation d'ES

**CHAPITRE VI : *ESSAIS DE BIODEGRADATION***  
***ASSISTEE PAR PHYTOREMEDIATION DES***  
***COLORANTS MARINE CIBANONE ET***  
***ECARLATE SOLOPHENYL BNLE***

## **CHAPITRE VI : Essais de Biodégradation assistée par phytoremédiation des colorants Marine Cibanone et Ecarlate Solophényl BNLE**

### **VI.1. Introduction**

Les colorants synthétiques sont considérés comme des produits chimiques les plus consommés, parmi eux 28.10<sup>4</sup> tonnes sont rejetées dans l'environnement à travers le monde entier (**Ogugbue and Sawidis 2011**). Cependant la plus grande partie de ces colorants est employés dans l'industrie textile, majoritairement les colorants azoïques et anthraquinoniques avec une consommation de 65 à 75% respectivement pour les deux colorants (**Carmen and Daniela 2012**). La pollution produite par ces rejets colorés, engendre des problèmes d'eutrophisation, des perturbations non esthétiques à la vie aquatique et des dangers potentiels de bioaccumulation qui peuvent affecter l'homme à travers la chaîne alimentaire (**Chowdhury et al. 2009**). De ce fait, ces rejets textiles contiennent ces colorants doivent être traités avant leur déversement dans les milieux naturels récepteurs, et l'élimination de ces derniers fait appel à des différents traitements physico-chimiques intéressants (**Saratale et al. 2011**). Néanmoins ces méthodes sont confrontées à des obstacles économiques et techniques, tels que les coûts élevés de traitement et la production de sous-produits encore plus dangereux que le polluant de base (**Robinson et al. 2001**), par contre les techniques biologiques ont reçu une sensibilisation importante de la communauté scientifique au cours de la dernière décennie, à cause de leurs nombreux avantages, en termes de la rentabilité, de la bénignité environnementale et du fonctionnement simple (**Sponza and Ulkoy 2005**).

Ces procédés biologiques reposent d'une part, sur les processus de la bioremédiation, dont le principal exemple de traitement des eaux usées le plus répandu au monde est l'utilisation des boues activées, qui sont constituées des différents microorganismes utiliser pour le traitement ultérieur des eaux usées dans un bioréacteur aéré (**Zeghioud et al. 2021; Du et al. 2020**). Aussi, cette technologie consiste d'une solution durable en raison du leurs larges propriétés métaboliques due à la culture mixte des consortiums bactériennes qui présentent un grand avantage par rapport à la culture d'une seule souche bactérienne en raison de leur capacité d'accumuler et de dégrader les différents colorants avec une minéralisation assez complète due à l'association synergique entre ces divers microorganismes (**Krishnan et al. 2016**). Ces derniers sont organisés en unités discrètes appelées floes, maintenus en suspension dans une cuve aérée pour assurer le contact de ces microorganismes avec la

matière organique et les nutriments disponibles dans les eaux usées. Ensuite, ces polluants organiques ont été dégradé et oxyder en présence de l'oxygène par l'activité métabolique des microorganismes et transformer en biomasse microbienne (afin de permettre la survie des microorganismes) et en composés inoffensifs (par exemple, le dioxyde de carbone et l'eau) (**Ghosh et al. 2017; Eldefrawy and Shaalan 2007; Tomei et al. 2016**). Par la suite, l'eau traitée et séparée des floccs de boue par diverses méthodes physiques. Cependant l'élimination de ces polluants organiques par les boues activées se fait à un temps de prétraitement long (plusieurs jours) et dans certains cas la minéralisation n'est pas atteinte (**Khellaf et al. 2018**). De plus certains polluants comme les colorants azoïques ne peuvent pas être dégradés que dans des conditions anaérobies (**Aubert and Schwitzguebel 2004; Chang et al. 2001; Chang et al. 2000**), ou ils vont être biosorbée à la surface de la biomasse biologique et par conséquent vont réduire l'efficacité de traitement de ces polluants (**Hitz et al. 1978**).

D'autre part, les procédés biologiques reposent aussi sur le processus de phytoremédiation qui consiste à utiliser les différentes plantes aquatiques, qui ont la capacité d'éliminer les polluants organiques, soit en dégradant leur molécule avec des différentes enzymes végétales (**Kaushalet al. 2021; Mahajan and Kaushal 2020; Mamirova et al. 2020**), soit en exploitant la capacité d'accumulation de ces plantes accumulatrices, ou ils ont absorbent et concentrent les polluants organiques de ces eaux dans leurs différentes parties (feuilles, tiges, ...etc) (**Saratale et al. 2011;Kaushalet al. 2021;Ceschin et al. 2020**). Parmi ces plantes aquatiques qui a été largement utilisé pour les processus de phytoremédiation, est la lentille d'eau *Lemna gibba* L, suite à sa tolérance élevée aux divers polluantes organiques et minérales, et à sa capacité d'adaptation à des différentes conditions climatiques (**Sivakumar et al. 2014**). Cette plante vasculaire flottante appartenant à la famille des *Lemnaceae* se trouve partout dans le monde, à la surface des eaux stationnaires ou à la surface des eaux douces et saumâtres à faible débit, formant des tapis verts denses (**Driever et al. 2005**).

Cependant, pour un cas idéal, des nombres important de chercheurs à orienter leurs travaux vers le couplage des procédés qui se sont avérer très intéressants du point de vue économique et environnemental. Ce couplage se fait soit par la combinaison d'un procédé physicochimique et un procédé biologique, soit par le couplage des deux procédés biologiques, qui se fait par une conciliation des consortiums mixtes des microorganismes de la boue activée et/ou des souches de microbes pure, des bactéries, des champignons

(bioremédiation) et même des algues et/ou des plantes aquatiques (phytoremédiation) (Turgayet al. 2011; Lianget al. 2014; Guo et al. 2020; Ito et al. 2016).

Dans l'objectif de contribuer au développement de cet axe d'étude, la présente étude porte sur le couplage de deux procédés biologiques; ce couplage consiste en la biodégradation des deux colorants textiles (MC et ES) par des boues activées assistée par la phytoremédiation en utilisant l'espèce végétale *L.gibba*. L'objectif essentiel est d'étudier la capacité de ces deux biomasses biologiques à éliminer et dégrader les deux colorants MC et ES et de réduire le temps de traitement par les boues activées tout en améliorant l'efficacité du traitement global.

Les différents essais relatifs au procédé couplé sont les suivantes :

1. Des traitements de contrôle (sans colorants) pour les boues activées seules, dans le but de suivre le développement des microorganismes en l'absence de polluant. Pour cela, une quantité de boues activées est mise en contact avec le milieu de culture avec et sans glucose afin d'observer l'effet du co-substrat glucosé sur la croissance de ces flocs microbiens ;
2. Des traitements de contrôle (sans colorants) pour les boues activées assistées par les lentilles d'eau, dans le but de suivre l'influence des plantes aquatiques sur le développement des microorganismes. Pour cela, une quantité de boues activées et une quantité de frondes de *L.gibba* sont mises en contact avec le milieu de culture avec et sans glucose ;
3. Des traitements de biodégradation des boues activées pour les deux colorants MC et ES avec et sans glucose, dans le but d'examiner l'efficacité de ce traitement biologique pour l'élimination des polluants sans et avec stimulation de croissance des microorganismes par l'ajout d'un substrat glucosé.
4. Des traitements de biodégradation assistée par les lentilles d'eau pour les deux colorants MC et ES avec et sans glucose, dans le but d'étudier l'effet synergique des plantes aquatiques sur l'efficacité d'élimination des polluants.
5. Des traitements de biodégradation assistées par les lentilles d'eau pour différentes concentrations initiales de colorant (10 - 50 mg/L), afin d'évaluer l'effet de concentrations variables de polluant sur le potentiel de biodégradation des deux polluants.

## **VI.2. Caractérisation des boues activées**

Diverses analyses sont effectuées sur les boues activées afin d'évaluer certaines caractéristiques comme la composition, la matière sèche (MS), la matière sèche volatile

(MVS), la matière en suspension (MES) et l'indice de boues (IB). Ces paramètres permettent d'avoir une idée globale sur l'efficacité d'utilisation des boues activées dans un procédé de biodégradation aérobie pour l'élimination de la pollution organique.

### **VI.2.1. Caractérisation macroscopique des boues activées**

Quelques observations visuelles simples (couleur et odeur) permettent de décrire la biomasse présente dans les boues activées de la STEP de Annaba. Les boues sont de couleur marron grise dégageant une légère odeur de terre (humus). Ces caractéristiques permettent de dire que l'aération du bassin biologique de la STEP de Annaba est bonne et prolongée.

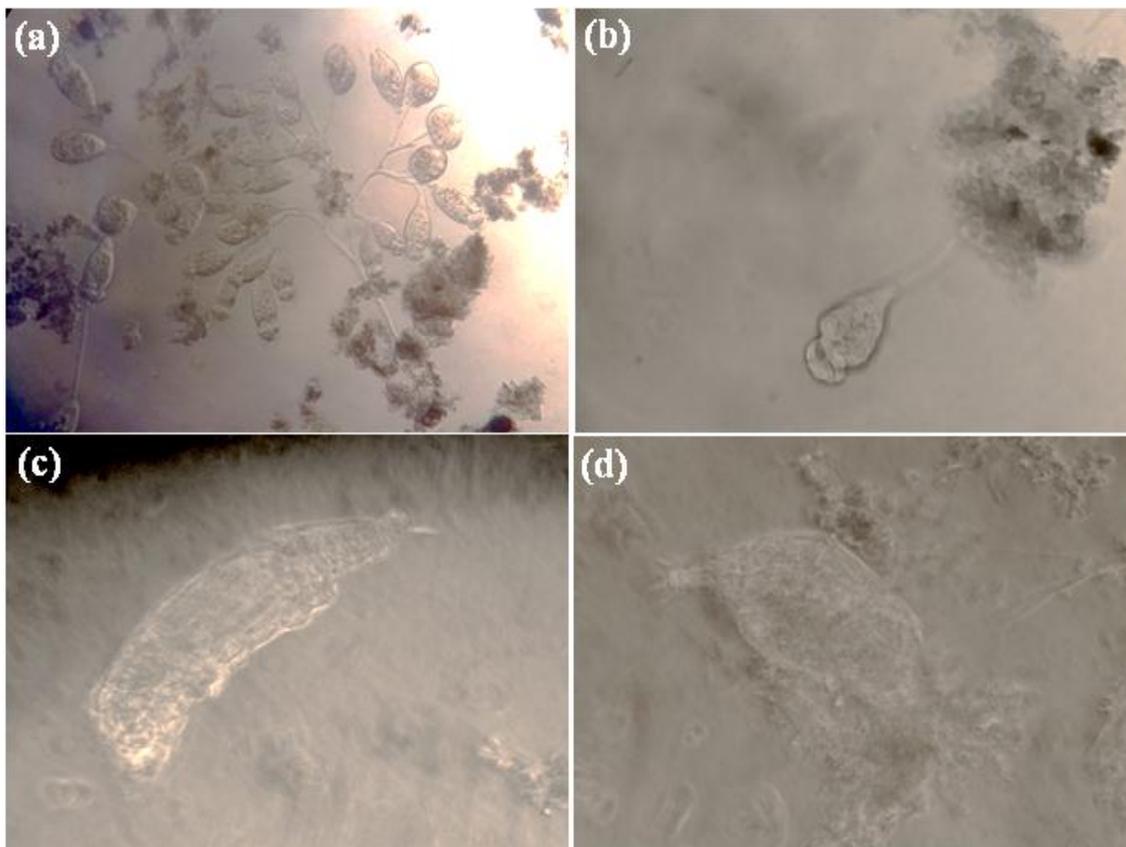
### **VI.2.2. Caractérisation microscopique des boues activées**

Les observations microscopiques des échantillons de consortium des boues activées, prélevés à partir des solutions de contrôle et de traitement, au temps initial et au cours du procédé de biodégradation, sont susceptibles d'identifier les microorganismes présents dans les flocs de ces boues activées et pourraient donner des indications sur la qualité de la boue utilisée dans le procédé biologique.

Dans les flocs des boues activées de la STEP de Annaba, nous avons pu identifier par l'utilisation d'un microscope optique la présence de différents genres de microorganismes, principalement des protozoaires (*Vorticella* à tige courte, *Euplotes sp*, *Epistylis sp*) et des métazoaires (*Rotifera*) (**Figure VI.1**). Cette identification est faite sur la base de CURDS 1969 pour *les ciliés*, et VOIGT 1978 pour *les rotifères* (**Duchene and Cotteux 1993**). De plus on remarque qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les microorganismes trouvés dans les boues activées des solutions de contrôle (sans polluant) et celles des solutions chargées des colorantes MC et ES. Ceci indique que les deux polluants contenus dans nos solutions n'ont pas causé d'effet observable sur les microorganismes, et leur évolution s'est déroulée de façon normale. Depuis le démarrage jusqu'à la fin du traitement, le développement et la diversité normale des microorganismes a été retrouvée. Dans une phase initiale, il y a eu abondance et un développement d'une microfaune composée principalement des métazoaires prédateurs tels que *les Rotifères* qui ont été présents dans les boues subissant une digestion aérobie. Leur rôle de prédateur de bactérien leur permet de contribuer au renouvellement de la biomasse épuratrice, stimule l'activité et la décomposition de la microflore (algues) ; ils aident également à éliminer les bactéries pathogènes (**Duchene and Cotteux 1993; Sowinska and Makowska 2016**).

L'abondance des *Rotifères* dans notre boue activée révèle un fonctionnement stable de notre traitement biologique (**Haluch and Wozniakiewicz 2011**), une bonne condition d'aération et indique une faible charge en boues (**Duchene and Cotteux 1993; Sowinska et al. 2017**). Aussi on a la présence des protozoaires ciliés tels que les *Vorticelles*, *Epistylis sp* et les *Euplotes sp*, et leur rôle principal est la clarification de l'effluent par prédation des bactéries libres (**Duchene and Cotteux 1993**).

La présence significative des *Vorticelles* va de pair avec un traitement du carbone très complet (DBO<sub>5</sub> final dissoute 15-20 mgO<sub>2</sub>/L), toutefois leurs abondances sont toujours signe d'une oxygénation satisfaisante, par contre l'existence des *Epistylis sp* est corrélée à des périodes ou des zones d'anoxie avec une fourniture d'oxygène en général suffisante dans l'ensemble. Aussi *Euplotes sp* n'est présent en milieu aqueux que si l'élimination du carbone est assurée et l'élimination de l'azote au moins partielle avec une oxygénation très suffisante (**Duchene and Cotteux 1993; Sowinska et al. 2017**). On remarque également, la présence de bactéries filamenteuses (présentes sous forme de longs cheveux très fins) en très faibles quantités dans notre boue activée, ce qui indique qu'on a une meilleure séparation entre les boues activées et l'eau traitée en bonne qualité, puisque leurs présences et leurs développements très gênant pour le traitement biologique, car elles décantent très difficilement et agissent comme des parachutes au niveau de la décantation du floc des boues activées. Trois jours après le démarrage de traitement, la croissance des troupeaux impliquait la présence des métazoaires et des protozoaires de plus grande taille, ce qui indiquait un bon état d'épuration et un indice de bonne performance



**Figure VI.1.** Observation microscopique des communautés microbiennes, (a) *Epistylis sp.*, (b) *Vorticella à tige courte*, (c) *Rotifera*, (d) *Euplotes sp.*

Les valeurs de MS, MVS, MES,  $V_{30}$  et IB des boues activées sont données dans le **Tableau VI.1.**

**Tableau VI.1.** Valeurs des paramètres de caractérisation des boues activées de la STEP d'Annaba

Paramètres	Valeurs
Matière sèche MS (g/L)	2,67
Matière sèche volatile MVS (g/L)	2,18
Matière en suspension MES (g/L)	0,520
Test de décantation $V_{30}$ (mL/L)	265,64
Indice de boue IB (mL/g)	127,71

\* Les valeurs de matière sèche (MS), Matière sèche volatile (MVS), Matière en suspension (MES) et Indice de boue (IB) sont calculés à partir des relations **IV.1**, **IV.4**, **IV.5** et **IV.6**.

Les concentrations de MS, MVS et MES sont acceptables et conformes aux valeurs de la notice d'exploitation de la STEP de Annaba (**O.N.A 2012**). Aussi, d'après le **Tableau VI.1**, on remarque que les boues de la STEP de Annaba présentent un volume  $V_{30}$  égal à 265,64 mL/L, qui est supérieur à 250 mL/L ; dans ce cas nous avons procédé au calcul de l'indice de boue (IB) qui est obtenu après une dilution de 1/4 effectuée par de l'eau épurée du décanteur.

La valeur moyenne de IB se situe généralement de 80 à 150 mL/g (bonne décantation). Des problèmes de décantation peuvent apparaître lorsqu'il dépasse 150 à 200 mL/g (boue en gonflement, développement de bactéries filamenteuses), où lorsque cette valeur est inférieure à 80 mL/g, la boue décante trop rapidement et risque de former des dépôts dans les ouvrages et les canalisations (boue avec un aspect granuleux)(**Christopher et al. 1998**). Pour notre cas, les boues activées de la STEP de Annaba présente un indice de boue égal à 127,71mL/g (**Tableau VI.1**), ceci signifie que cette boue est composée de floccs bactériens bien constitués ce qui lui permet d'effectuer une bonne décantation et une meilleure séparation solide-liquide c'est-à-dire entre les boues activées et l'eau à traiter à la fin du traitement biologique. On peut dire aussi que notre indice de boue confirme l'absence de bactéries filamenteuses gênant la décantation des floccs des boues activées, car il est toujours situé entre 80 et 150 mL/g.

### **VI.3. Développement microbien des boues activées avec et sans glucose**

Le développement microbien des boues activées est suivi pour les solutions de contrôle sans polluant (BA + milieu de culture) et pour les solutions de traitement (BA + colorant + milieu de culture) avec et sans la stimulation de croissance des microorganismes par l'ajout du glucose. D'après nos observations visuelles, le développement microbien commence à partir du troisième jour, et est beaucoup plus marqué aussi bien pour les solutions de traitement que pour les solutions témoins. Aussi le calcul des différentes paramètres de suivi de la croissance microbienne présentés dans le **Tableau VI.2** permet de dire, que les molécules cibles (MC et ES) ne sont pas toxiques pour le développement de la communauté des boues activées, puisque dans tous les cas (absence ou présence de glucose), la présence de ces composés n'affecte pas la croissance de la biomasse dans les bioréacteurs et l'indice de croissance (toujours supérieur à 1) est compris entre 2,87 et 3,12 pour MC et entre 1,79 et 2,10 pour ES. On constate également que la croissance des microorganismes dans les boues activées est plus importante dans les solutions de traitement chargées de glucose ; les pourcentages de développement microbien sont de 52,44 et 67,92% en présence de MC et ES, respectivement. Ces pourcentages sont supérieurs à ceux obtenus dans les solutions de contrôle laissant penser que le carbone additionnel (provenant du glucose) favorise le développement et la croissance des microorganismes dans les boues activées (**Turgay et al. 2011; Nouren et al. 2017; Bibi et al. 2019**).

**Tableau VI.2.** Valeurs des matières sèches, pourcentages de développement microbien et indice de croissance des boues activées

Colorants	MC	ES
MS Contrôle (g/L)	33,80	32,80
MS sans glucose (g/L)	54,80	34,20
MS avec glucose (g/L)	59,60	40,20
IC Contrôle	1,77	1,72
IC sans glucose	2,87	1,79
IC avec glucose	3,12	2,10
PDM Contrôle (%)	43,43	41,71
PDM sans glucose (%)	65,11	44,09
PDM avec glucose (%)	67,92	52,44

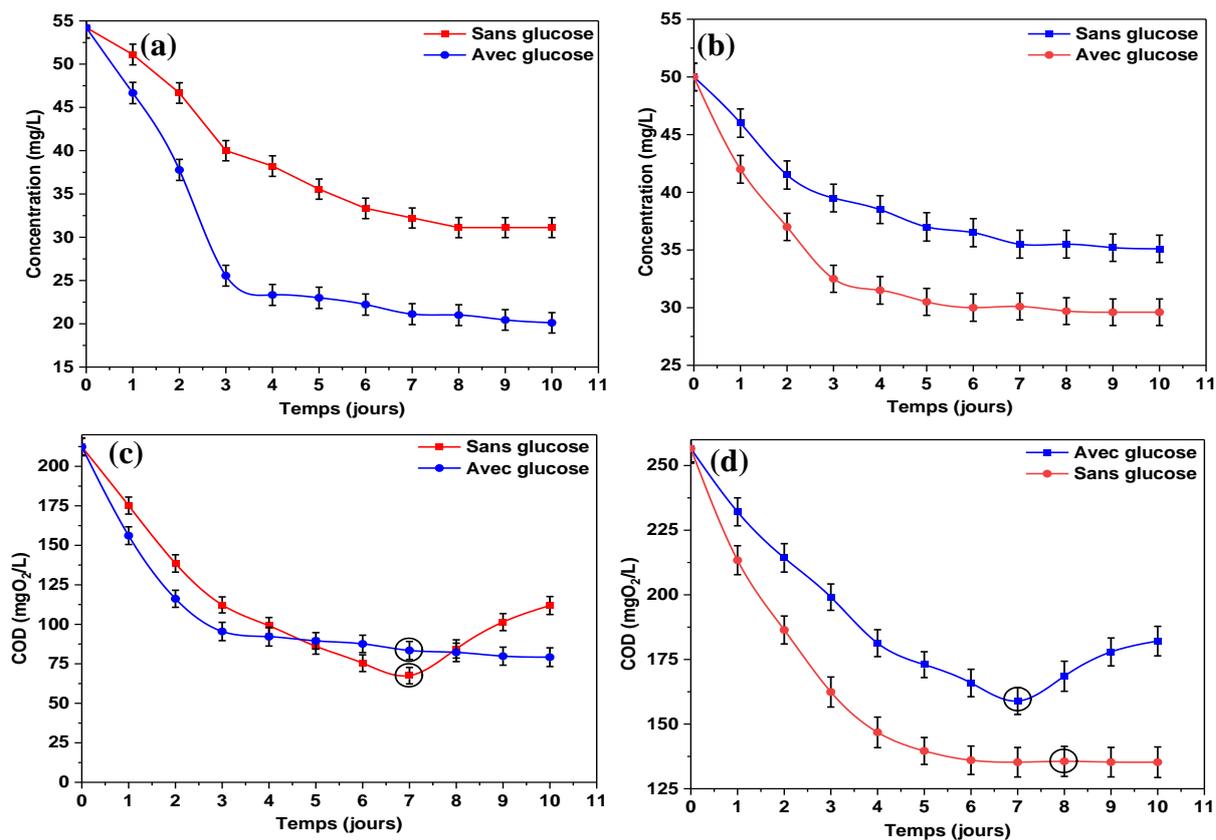
\* Les valeurs des matières sèches (MS), pourcentages de développement microbien (PDM) et indice de croissance (IC) sont calculés à partir des relations **IV.1**, **IV.2** et **IV.3**.

Les pourcentages obtenus dans le cas des traitements sans glucose (43,43– 65,11%) sont toujours supérieurs à ceux des contrôles ; ceci s’explique par le fait qu’au cours du traitement aérobie, les microorganismes dégradent la matière organique par oxydation et retirent de cette opération l’énergie nécessaire pour synthétiser de nouvelles cellules. Dans ce cas, on peut conclure que la molécule organique de colorant quel que soit sa nature constitue une source de nutriments pour les microorganismes des boues activées (**Vilaseca et al. 2010; Wang et al. 2019; Yan et al. 2021**). Aussi, on voit que, parmi les deux colorants traités, MC est le meilleur substrat pour les boues activées avec un indice de croissance égal à 2,87 en l’absence de glucose (**Tableau VI.2**) ce qui révèle une assimilation plus élevée de ce colorant anthraquinonique par rapport au colorant azoïque ES. Ceci probablement dû au fait que les molécules de colorants de petite taille ou de poids moléculaire et structure simple comme MC, peuvent diffuser facilement à travers la paroi bactérienne pour l’assimiler et l’utiliser comme source de nutriments, alors que celles qui sont plus complexes (comme ES) doivent être aux préalables hydrolysées par des systèmes enzymatiques avant d’être assimilés (**Dohanyos et al. 1978**).

#### **VI.4. Effet du glucose sur l'élimination des deux colorants MC et ES**

Les résultats obtenus à l'issue des expériences de biodégradation des colorantes MC et ES par les boues activées sont représentés sur la **Figure VI.2**. Ces résultats révèlent que les microorganismes sont responsables de la diminution de la concentration en phase liquide du polluant, et l'abaissement de cette concentration augmente plus rapidement avec le temps notamment pour les solutions avec glucose ; aussi, l'abattement de la concentration diffère d'un colorant à un autre. La décoloration de la solution chargée en MC (**Figure VI.2 a**) diminue rapidement pendant les trois premiers jours et devient plus lente au bout du quatrième jour, pour atteindre un palier stable à partir du septième jour pour les solutions avec et sans glucose. Cependant, on note une amélioration de l'abattement lorsque le glucose est présent dans la solution. En effet, on enregistre un pourcentage d'abattement de 63 et 43% avec et sans glucose, respectivement (**Tableau VI.3**). Pour le colorant ES (**Figure VI.2 b**), on note une diminution de la concentration durant les cinq premiers jours, puis un équilibre est atteint après le septième jour, avec un abattement de la concentration moins important par rapport au premier colorant.

Les mêmes tendances sont enregistrées pour la DCO. Ceci peut être dû à la différence de poids et/ou de la structure moléculaire (**Dohanyos et al. 1978**). Cependant, l'ajout du glucose permet d'obtenir un abattement plus important avec un pourcentage d'élimination de 44% à celui de 33% en l'absence de glucose (**Tableau VI.3**). Ces résultats révèlent que la présence d'un co-substrat glucosé facilement biodégradable permet de garantir une bonne croissance bactérienne qui produit une biomasse beaucoup plus importante dans la solution permettant de mieux interagir avec les polluants présents dans la solution (**Cervantes et al. 2006; Cui et al. 2020**). Ceci est affirmé par la mesure du développement microbien et l'indice de croissance des microorganismes regroupés dans le **Tableau VI.2**. On peut finalement dire qu'une source de carbone supplémentaire est nécessaire au développement et à la multiplication des microorganismes, rendant favorable l'élimination des colorants.



**Figure VI.2.** Variation de la concentration et de la DCO des colorants en fonction du temps pour les traitements avec et sans glucose (a,c) MC, (b,d) ES

Plusieurs études affirment que l'ajout de glucose comme une source de carbone organique est nécessaire aux microorganismes afin d'améliorer la croissance cellulaire et biostimuler la production d'enzymes pour le co-métabolisme du glucose et des composés organiques (Kanbouchi et al. 2013). Joshi et al. 2013 ont effectué des travaux sur différentes sources de carbone afin de cultiver *Bacillus Megaterium* isolé des effluents industriels et tenter d'éliminer le colorant bleu turquoise ; ces auteurs ont confirmé que le glucose était la meilleure source de carbone pour la croissance des microorganismes, et que la présence d'un co-substrat métabolisable semblait être obligatoire pour le fonctionnement des bactéries décolorantes. Aussi, plusieurs d'autres études sur la décoloration des colorants azoïques par les boues anaérobies, ont démontré que le glucose est le co-substrat le plus largement utilisé dans la réduction de ces colorants, car le taux de traitement est considérablement amélioré lorsque le glucose était ajouté aux solutions (Cervantes et al. 2006; Cui et al. 2020). Egalement, les résultats des travaux de Franciscon et al. 2015 sur le consortium de quatre souches (VN-MLKS) préalablement

isolées d'un effluent de l'industrie textile, affirment que ces souches n'ont pu faire croître et décolorer le colorant azoïque Disperse Red 1 que lorsque le milieu était enrichi de glucose comme source de carbone. Aussi, l'étude de **Saba et al. 2013** a indiqué que l'ajout d'un autre co-substrat autre que le glucose pouvait jouer un rôle essentiel dans l'accélération du processus d'élimination de la couleur des colorants azoïques, et les résultats de cette étude ont indiqué que l'extrait de levure était le meilleur co-substrat en termes d'efficacité de traitement des colorants ; ce substrat sert en effet de source de carbone et d'azote pour les microorganismes et son ajout facilite la croissance des microorganismes dans le bioréacteur, tandis que le co-substrat contenant du glucose dans la composition synthétique des eaux usées avait une efficacité inférieure par rapport à celle du traitement avec l'extrait de levure.

**Tableau VI.3.** Pourcentage d'élimination et rendement de dégradation à la fin du traitement par les boues activées

Colorant	PE (%)		RD (%)	
	Sans glucose	Avec glucose	Sans glucose	Avec glucose
MC	42,62	62,91	47,32	62,71
ES	33,14	43,89	38,78	47,29

\* Les pourcentages d'élimination et les rendements de dégradation sont calculés à partir des équations **IV.8** et **IV.9**.

D'après les résultats précédents, l'élimination des deux colorants est effectuée par les microorganismes présents dans les boues activées. Afin de comprendre le phénomène responsable de cette réduction et mettre en évidence la biodégradation des molécules cibles par ces microorganismes, des mesures de DCO et DBO sont effectuées avant et après le traitement biologique. D'après le **Tableau VI.4**, le coefficient de biodégradabilité  $K_{initial}$ , qui représente le rapport entre la DCO et la DBO initiales de MC, est toujours inférieur à 3, ce qui signifie que le traitement biologique est favorable pour ce polluant. Cependant, le rapport de biodégradabilité initial d'ES est compris entre 3 et 5 indiquant que le traitement de ce polluant par des méthodes biologiques peut ne pas être favorable en raison de sa faible biodégradabilité (**Suschka and Ferreira 1986; Koller 2009**).

D'après les **Figures VI.2c** et **VI.2 d** représentant l'évolution de la DCO avec le temps pour les traitements avec et sans glucose, on remarque qu'il y a une diminution significative du carbone organique qui est relativement lié avec l'abattement de la concentration de ces colorants présent en phase liquide. Généralement, cette diminution a lieu de manière régulière pour le cas des solutions avec glucose, car la présence de ce substrat comme une

source nutritive est nécessaire pour le développement des microorganismes (**Tableau VI.2**) et est favorable pour améliorer la réduction de carbone organique (**Tableau VI.3**). Par ailleurs, la fluctuation dans la valeur de la DCO induite par une augmentation de cette DCO au bout du septième jour pour les deux colorants pour les solutions sans glucose, est probablement due à la lyse des microorganismes survenue suite à l'absence du glucose du milieu nutritif, car ce substrat glucosé est indispensable à la survie des microorganismes. Les rendements de dégradation calculés sur la base de la DCO (**Tableau VI.3**) atteignent des valeurs supérieures à 47 et 63% respectivement pour les solutions sans et avec glucose pour le colorant anthraquinonique (augmentation de 16%), et des valeurs de 39 et 47% pour le colorant azoïque (augmentation de 8%). Ceci peut indiquer que la nature et le type de liaisons et la complexité de la structure chimique des colorants jouent un rôle important dans la capacité du colorant à être dégradé en dehors des paramètres expérimentaux tels que le pH et la concentration initiale du colorant (**Dohanyos et al. 1978**).

Tableau VI.4. Estimation des valeurs de DCO, DBO<sub>5</sub> et coefficient de biodégradabilité K

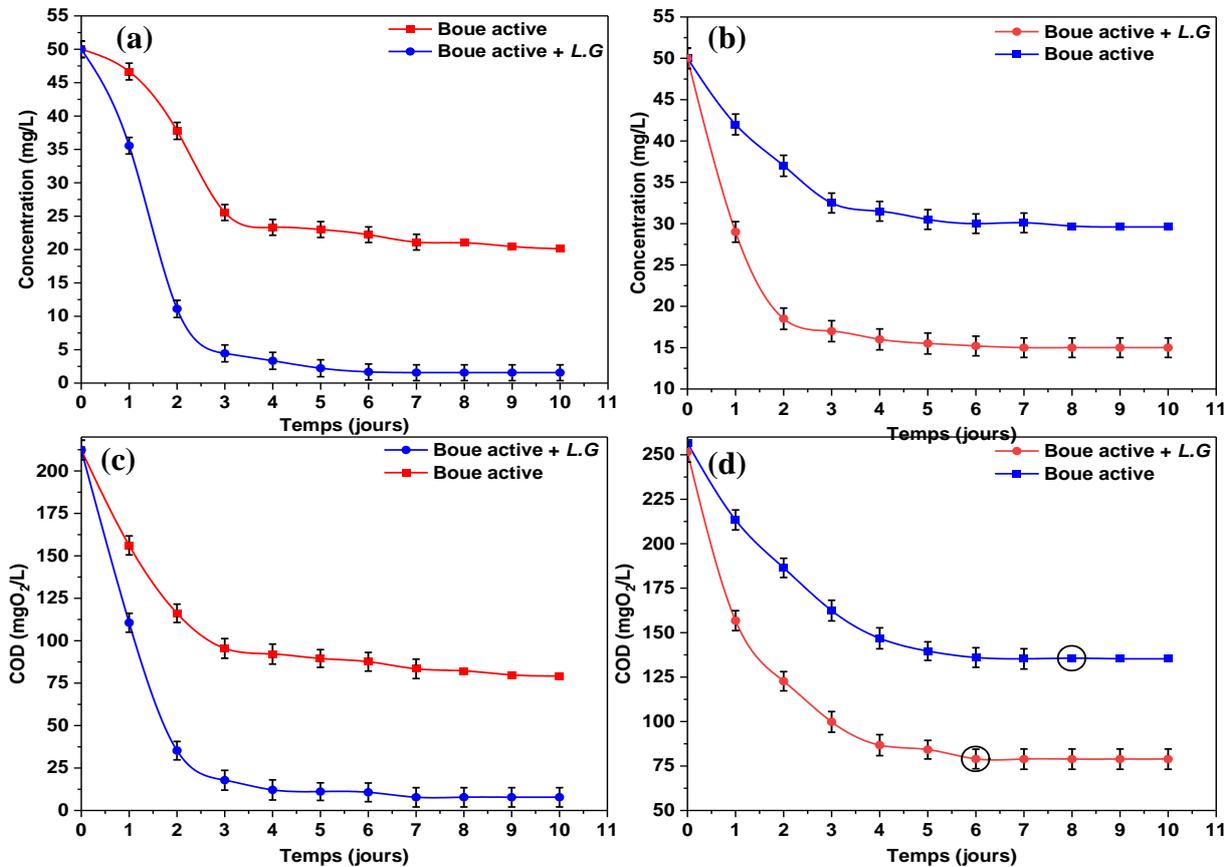
Colorants	Avant biodégradation			
	DCO (mgO <sub>2</sub> /L)	DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	K <sub>initial</sub>	DBO <sub>5</sub> reduction (%)
MC	212,4	78,0	2,7	0
ES	256,6	82,0	3,1	0
Colorants	Après biodégradation avec glucose			
	DCO (mgO <sub>2</sub> /L)	DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	K <sub>final</sub>	DBO <sub>5</sub> reduction (%)
MC	79,2	38,9	2,0	50,1
ES	135,3	45,2	3,1	46,1

### VI.5. Effet du couplage des boues activées et *L.gibba* sur l'élimination de MC et ES

Afin de mettre en évidence l'intérêt du couplage biodégradation/phytoremédiation, plusieurs expériences de biodégradation avec les boues activées seules et d'autres combinant les boues activées et *L.gibba* sont effectuées pour dégrader les deux colorants en présence du glucose. La diminution de la concentration initiale de colorant et aussi de la DCO augmente la décoloration. Ceci est clairement illustré sur la **Figure VI.3**, qui représente les résultats obtenus à l'issue des différentes expériences. D'une manière générale, la concentration en phase liquide des polluants diminue plus rapidement avec le

temps notamment pour les solutions traitées par couplage des boues activées et des plantes aquatiques ; cette diminution s'avère plus faible pour les solutions traitées par les boues activées seules, ce qui, à priori prouve que l'ajout de *L.gibba* améliore le traitement et donc l'élimination des deux polluants.

Pour la solution chargée en MC (**Figure VI.3 a**), l'élimination du colorant est rapide durant les trois premiers jours, puis elle atteint une valeur stable au septième jour avec un pourcentage d'abattement de 97% lorsque les lentilles d'eau sont ajoutées à la solution traitée. Pour les solutions traitées par les boues activées seules, on note un pourcentage plus faible ne dépassant pas les 63% (**Tableau VI.5**). Pour le cas du colorant ES (**Figure VI.3 b**), on a une diminution de la concentration assez lente durant les 5 premiers jours, puis un équilibre observé au septième jour avec un pourcentage d'abattement de 72% qui est également supérieur au pourcentage d'abattement des solutions traitées par les boues activées seules. Cependant, la diminution de la concentration d'ES est toujours moins importante relativement à MC, ce qui peut toujours indiquer que la nature et le type de liaisons et la complexité de la structure chimique jouent un rôle important dans la capacité du traitement des colorants textiles (**Dohanyos et al. 1978**).



**Figure VI.3.** Variation de la concentration et de la DCO des solutions en fonction du temps pour les traitements (avec glucose) avec et sans *Lemna gibba* (a,c) MC, (b,d) ES

L'évolution de la DCO avec le temps pour les traitements avec et sans plantes aquatiques des deux colorants est présentée sur les **Figures VI.3 c** et **VI.3 d**. D'après cette figure, on remarque qu'il ya une diminution significative du carbone organique qui est relativement lié avec l'abattement de la concentration de ces colorants ; cette diminution a lieu de manière régulière pour les deux cas de traitement (sans et avec plantes). Les rendements de dégradation calculés sur la base de la DCO (**Tableau VI.5**) atteignent des valeurs égales à 96 et 69% pour MC et ES, respectivement et ce pour les solutions traitées par le procédé combiné par rapport au procédé de traitement par les boues activées seules où les rendements sont de 63% (MC) et 47% (ES). Ces résultats montrent bien que l'ajout des plantes aquatiques renforcent le traitement et entraînent une augmentation de 33 et 22% pour MC et ES, respectivement.

**Tableau VI.5.** Pourcentage d'élimination et rendement de dégradation à la fin de traitement de biodégradation assistée par phytoremédiation des solutions glucosées

Colorant	PE (%)		RD (%)	
	Sans <i>L.gibba</i>	Avec <i>L.gibba</i>	Sans <i>L.gibba</i>	Avec <i>L.gibba</i>
MC	62,91	97,11	62,71	96,35
ES	43,89	71,83	47,29	68,65

Dans le **Tableau VI.6**, les mesures de DBO effectuée avant et après le traitement de couplage indique une diminution remarquable de la pollution carbonée par ce traitement combiné avec des pourcentages de réduction de DBO de 95 et 69%, respectivement pour MC et ES comparé au traitement des boues activées seules (**Tableau VI.4**). Aussi, d'après le calcul du coefficient de biodégradabilité K, on peut dire que le traitement biologique de MC est toujours favorable, cependant le traitement du polluant ES par des méthodes biologiques n'est pas très favorable en raison de leur faible biodégradabilité.

**Tableau VI.6.** Estimation des valeurs de DCO, DBO<sub>5</sub> et coefficient de biodégradabilité K

Colorant	Avant biodégradation			
	DCO (mgO <sub>2</sub> /L)	DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	K <sub>initial</sub>	DBO <sub>5</sub> reduction (%)
MC	212,4	78,0	2,7	0
ES	251,6	82,0	3,1	0
Colorant	Après biodégradation (avec glucose)			
	DCO (mgO <sub>2</sub> /L)	DBO <sub>5</sub> (mgO <sub>2</sub> /L)	K <sub>final</sub>	DBO <sub>5</sub> reduction (%)
MC	7,8	3,8	2,0	95,1
ES	78,9	25,2	3,1	69,3

D'après ces résultats, on peut conclure que l'ajout de l'espèce végétale *L.gibba* aux boues activées améliore l'élimination et le pourcentage d'abattement de la concentration des deux polluants présents dans les solutions à traiter. De plus, ce procédé couplé permet de réduire le temps de traitement à sept jours relativement au traitement de dix jours avec les boues activées seules. Ceci démontre que les lentilles d'eau participent au le procédé de traitement de ces colorants, et cette participation est probablement due à la phytoaccumulation de ces deux polluants dans leurs différentes parties végétales (**Hocini et al. 2020**). On peut également dire que la combinaison des microorganismes et des bactéries avec des macrophytes aquatiques présente un grand avantage en raison de la large propriété métabolique suite à l'association synergique entre ces deux biomasses biologiques par rapport à l'utilisation d'une seule culture microbienne (**Turgay et al. 2011; Francison et al. 2015; Ambaye and Hagos 2020**).

#### **VI.6. Développement microbien des boues activées avec et sans *L.gibba***

L'ajout des plantes aquatiques n'influe pas globalement sur la croissance et le développement des microorganismes constituant les boues activées et ce aussi bien pour le contrôle que pour les solutions de traitements (**Tableau VI.7**). En effet, l'indice de croissance est toujours supérieur à 1 et varie de 1,56 à 2,26 et de 1,51 à 2,05 pour MC et ES, respectivement. Cependant, on observe une légère réduction du pourcentage de développement microbien pour le contrôle ainsi que pour les solutions de traitement ; d'ailleurs, les pourcentages de développement de la culture des boues activées présentes seules varient dans l'intervalle (1,77-3,12) pour MC et (1,72-2,10) pour ES (**Tableau VI.2**) ; ceci est probablement due aux concurrences des plantes aquatiques sur le milieu de culture et sur le carbone organique obtenu après la biodégradation des molécules cibles, car la croissance et la photosynthèse de ces plantes aquatiques nécessite différents nutriments dans le milieu de culture, à savoir les macroéléments ou les microéléments qui sont indispensables pour le métabolisme des plantes et pour le développement du cycle végétatif (**Hocini et al. 2019; Kumar et al. 2021**).

**Tableau VI.7.** Valeurs des matières sèches (MS), pourcentage de développement microbien (PDM) et indice de croissance (IC) des boues activées assistées par *L.gibba*

Colorant	MC	ES
MS BA contrôle (g/L)	29,80	28,80
MS BA avec <i>L.gibba</i> sans glucose (g/L)	37,60	33,40
MS BA avec <i>L.gibba</i> et glucose (g/L)	43,20	39,20
IC BA contrôle	1,56	1,51
IC avec <i>L.gibba</i> sans glucose	1,97	1,75
IC avec <i>L.gibba</i> et glucose	2,26	2,05
PDM BA contrôle (%)	38,84	33,61
PDM BA avec <i>L.gibba</i> sans glucose (%)	49,15	42,75
PDM BA avec <i>L.gibba</i> et glucose (%)	55,74	51,22

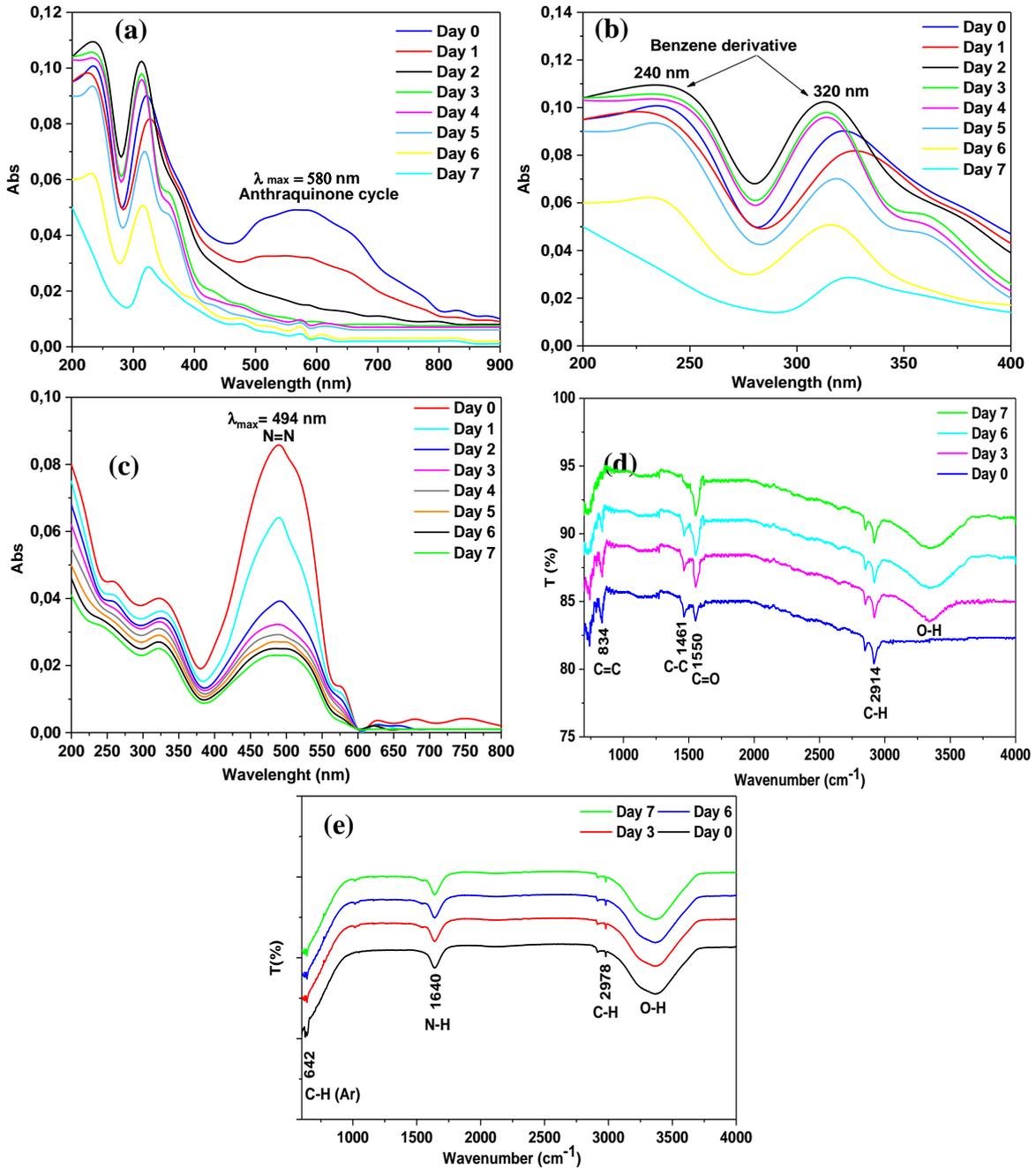
### VI.7. Mécanisme d'élimination des deux colorants

Pour identifier le mécanisme du traitement biologique des deux colorants par les boues activées assistées par phyto-rémediation en présence de *L.gibba*, les techniques LC/MS, spectroscopie FT-IR et spectrophotométrie UV-visible sont utilisées comme outils d'analyse. Ces techniques permettent également de connaître les métabolites générés lors de la biodégradation des colorants par les boues activées.

D'après les **Figures VI.4 a, VI.4 b et VI.4 c** nous remarquons que MC et ES ont deux pics dans la région UV à 240 et 320 nm correspondant au cycle benzène et naphthalène des colorants (Yu et al. 2005) et un pic avec une absorbance maximale à 580 et 495 nm en rapport avec le cycle de l'antraquinone et le chromophore N=N pour MC et ES, respectivement.

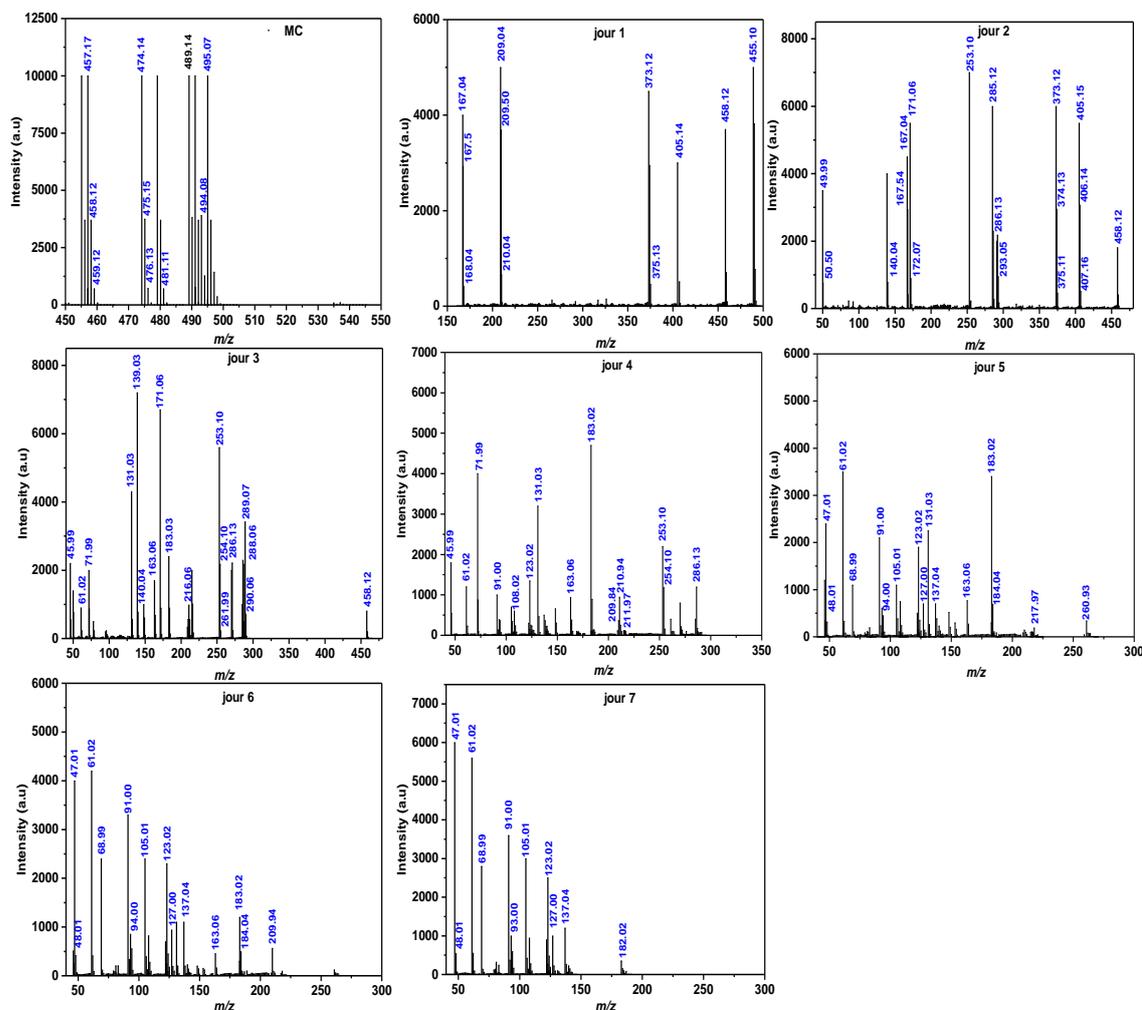
Dans le traitement du spectre d'ES, le colorant présente une diminution d'intensité sans aucun changement de pic, car la plupart des colorants, en outre les azoïques, sont très résistants à l'attaque microbienne (Lodato et al. 2007). Cependant, pour le MC, le pic obtenu à 580 nm commence à disparaître à partir du troisième jour, suggérant le clivage du cycle de l'antraquinone par la communauté microbienne des boues activées (Parmar and Shukla 2017). De plus, de nouveaux pics sont apparus avec une intensité d'absorbance plus élevée aux longueurs d'onde de 320 et 240 nm au cours du deuxième

jour, indiquant que la concentration des dérivés de benzène et de naphthalène augmente en raison du métabolite biogénéré (Benabbas et al. 2020; Chowdhury and Bhattacharyya 2015). Tant que le traitement se poursuit, l'absorbance de ces pics diminue progressivement suggérant la transformation des composés aromatiques en petites molécules organiques.



**Figure VI.4.** Spectres UV-visible et analyse FT-IR de (a, b, d) MC et (c, e) ES après biodégradation par les boues activées

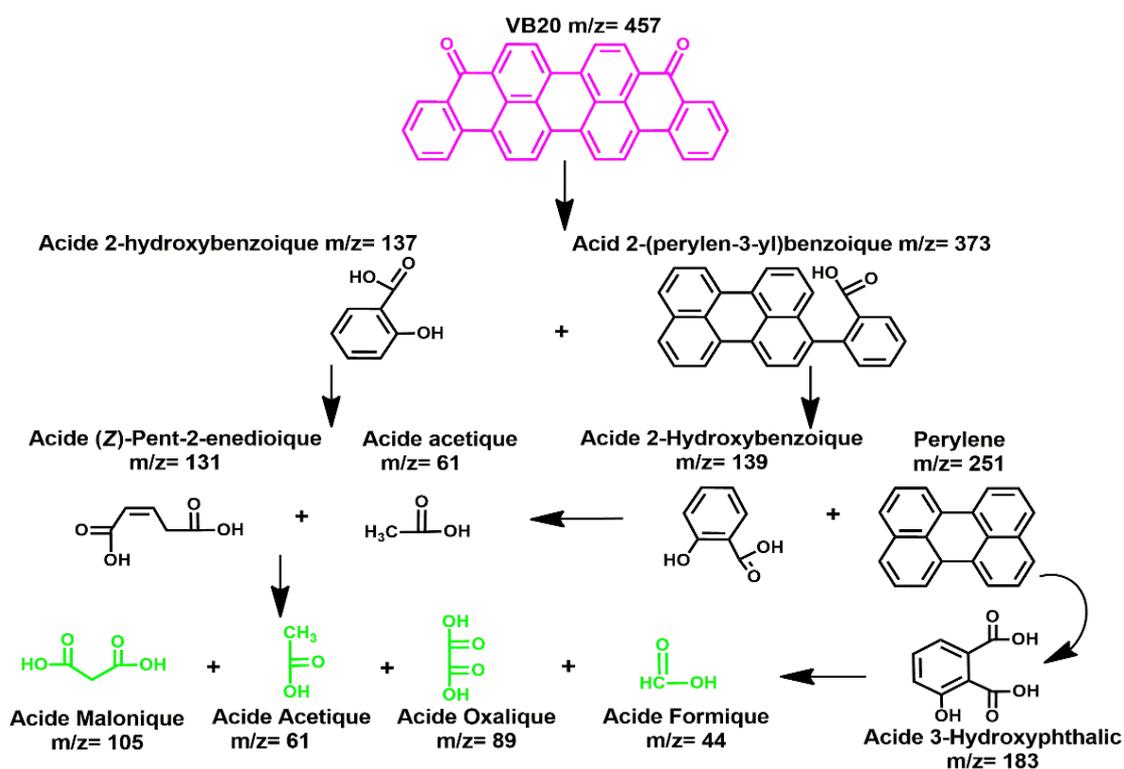
La transformation des colorants induite par les boues activées est également évaluée à l'aide de l'analyse FT-IR ; des échantillons de liquides sont prélevés à différents intervalles de temps au cours du processus de biodégradation. Les résultats représentés sur la **Figure VI.4 e** montrent que pour ES la présence de pics à 642, 1640, 2978  $\text{cm}^{-1}$  et un large pic entre 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$  sont associés à la vibration d'étirement de CH pour le cycle benzénique, NH-amine, CH-alcane et pour OH, respectivement. Pendant l'élimination du colorant, ces pics restent inchangés, ce qui confirme la stabilité du colorant azoïque pendant le processus de biodégradation aérobie, car l'oxygène est un facteur limitant la biodégradation des colorants azoïques récalcitrants, suite à une compétition pour le cofacteur NADH entre la respiration et l'azoréduction (**Saratale et al. 2011; Sudarjanto et al. 2006; Chang et al. 2001**). De plus, le colorant azoïque n'est pas dégradé dans les conditions du présent travail probablement par manque des microorganismes nitrifiantes responsables de la dégradation des liaisons azoïques de ce colorant. D'après **LeBihan et al. 2001**, cet effet ne peut être expliqué que par la présence d'autres microorganismes (protozoaires et métazoaires) susceptibles d'entraîner une diminution du taux de croissance des bactéries nitrifiantes par prédation. Ce que l'on peut dire ici, c'est que la diminution de la concentration de ce colorant et les taux de décoloration obtenus sont certainement liés aux phénomènes de biosorption plutôt qu'au processus de dégradation, et que l'élimination de ce colorant est due principalement à leur biosorption graduelle dans la matrice biologique des boues activées jusqu'à atteindre la concentration d'équilibre (**Basibuyuk and Forster 2003; Yang et al. 2013; Porter et al. 1976; Sirianuntapiboon and Srisornsak 1976**). Néanmoins, cette biosorption dépend de la structure moléculaire, du type et du nombre des positions des substituants dans la molécule de colorant, ainsi que de leur groupe chromophore et sa solubilité. Dans le cas de MC, la **Figure VI.3 c** montre des pics majeurs à 834 et 1461, 1550, 3500  $\text{cm}^{-1}$  qui sont attribués à l'étirement de C=C et C-C du cycle benzénique, C-H alcane et C=O de la fonction cétone. Le métabolite obtenu au cours du processus de biodégradation montre que les pics relatifs à C=C et C-C disparaissent pratiquement et que le pic relatif à C=O devient plus intense au cours des sept premiers jours confirmant le clivage des cycles aromatiques et du cycle anthraquinonique du colorant par la communauté microbienne des boues activées (**Ayed et al. 2009**). Aussi, un nouveau pic apparaît entre 3000 et 3500  $\text{cm}^{-1}$  lié à l'étirement de O-H et au fur et à mesure que le traitement se poursuit, le pic devient plus intense (6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours) suggérant que MC est dégradé en métabolites intermédiaires.



**Figure VI.5.** Analyse par LC/MS des métabolites de biodégradation du MC à différents intervalles de temps

Les résultats obtenus sont également interprétés par l'analyse LC/MS représentée sur la **Figure VI.5**, qui montre que pendant le processus de biodégradation, le cycle d'antraquinone du colorant est clivé, pour produire de l'acide 2-hydroxybenzoïque et de l'acide 2-(pérylén-3-yl) benzoïque aux valeurs  $m/z$  égales à 137 et 373, respectivement. Dans le cas de l'acide 2-hydroxybenzoïque, le métabolite identifié aux valeurs  $m/z$  de 131 et 61 sont respectivement l'acide (Z)-pent-2 énédioïque et l'acide acétique, qui sont transformés en chaîne carbonée de faible poids moléculaire au cours de la dernière journée. La biodégradation de l'acide 2-(pérylén-3-yl) benzoïque produit du pérylène et de l'acide 2-hydroxybenzoïque qui sont obtenus aux valeurs  $m/z$  de 137 et 251, respectivement. Le métabolite du perylène est ensuite transformé en dérivé d'acides carboxyliques en passant d'abord par l'acide 3-hydroxyphtalique ( $m/z = 183$ ) comme métabolite intermédiaire. Ces résultats démontrent que l'élimination du colorant MC se produit par le biais d'un processus de biodégradation par la communauté microbienne des boues activées,

et cette biodégradation est composée de deux grandes étapes, transport des substrats vers la bactérie (biosorption) et métabolisation du substrat. L'étape de biosorption est relativement rapide par rapport à celle de métabolisation (**Pandolfi and Pons 2004**). Après la phase de biosorption, les microorganismes des boues activées oxydent la molécule de colorant en mode aérobie pour donner d'autres sous-produits non toxiques pour l'environnement, et produire soit de l'énergie sous forme d'ATP, soit synthétiser de nouveaux constituants cellulaires. De plus, on constate visuellement que tous les granulés des souches bactériennes conservent leur couleur d'origine (marron foncé) et ne sont pas colorés par le colorant biosorbé. Cela indique que l'élimination de la couleur est principalement due à la biodégradation par les boues activées (**Chen et al. 1999**). Plusieurs études ont démontré que les boues activées (ou les bactéries isolées des boues activées) dégradent avec succès les colorants organiques, en particulier dans les conditions aérobies (**Boonnorat et al. 2018; Kanagaraj et al. 2014**).



**Figure VI.6.** Représentation du mécanisme de biodégradation du MC

Le processus de biodégradation du MC est représenté sur la **Figure VI.6**. Ces résultats confirment que ce colorant est éliminé par un processus de biodégradation qui se produit d'abord par l'attaque du cycle anthraquinonique du colorant pour obtenir des acides aromatiques et des composés de faible poids moléculaire. Au fur et à mesure que la biodégradation se poursuit, l'ouverture du cycle des acides aromatiques se produit pour

obtenir une chaîne d'acide aliphatique courte. Ces résultats sont cohérents avec la biodégradation du colorant anthraquinonique trouvée dans la littérature en utilisant différents systèmes de traitement des eaux contaminées (**Alam et al. 2020; Fanchiang and Tseng 2009; Chao et al. 2020**).

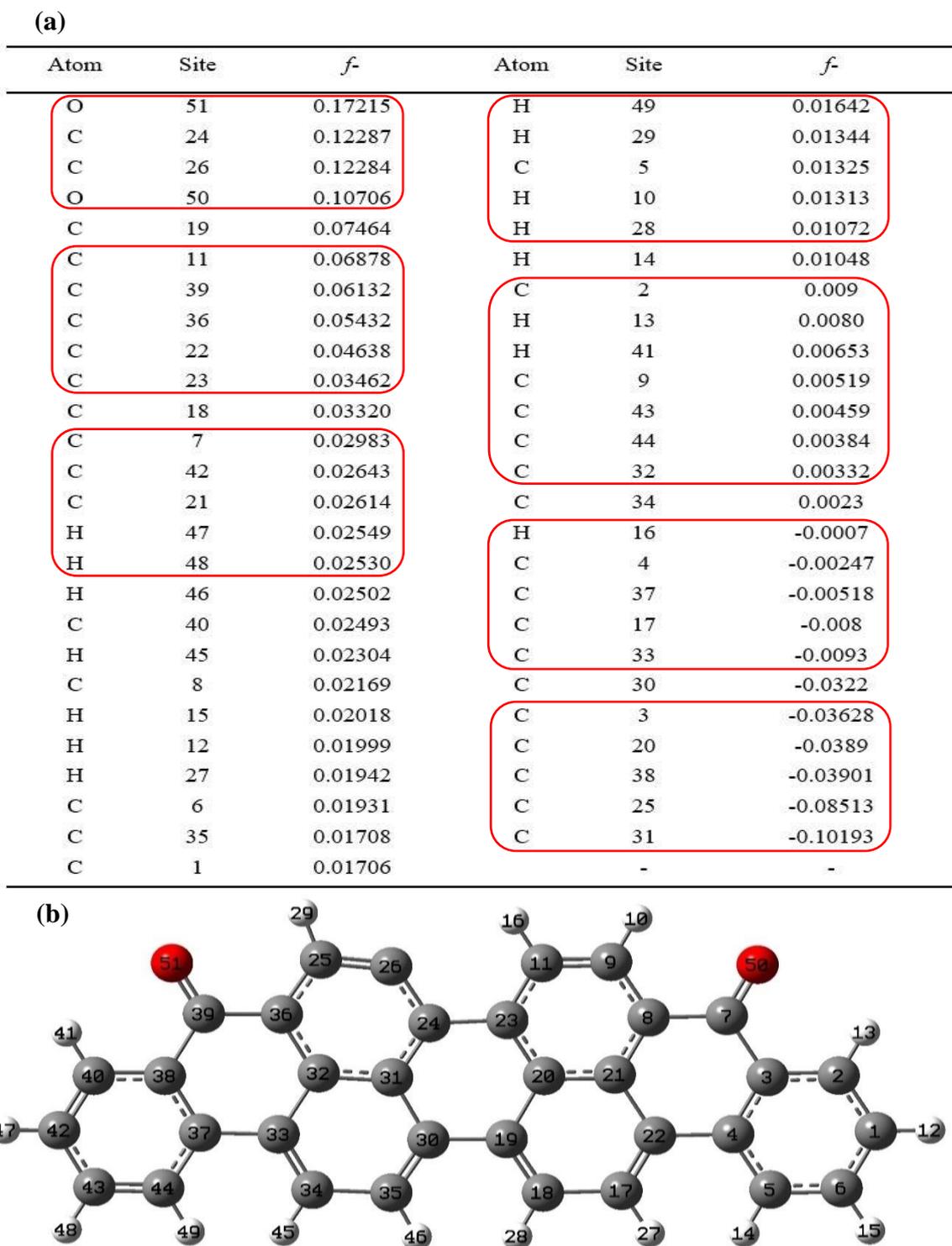
Le calcul DFT est effectué sur le package Gaussien 09 (**Scheiber et al. 2010**) pour déterminer l'indice de Fukui qui est utilisé pour la prédiction des sites réactifs des attaques radicalaires, électrophiles et nucléophiles (**Feng et al. 1997**). Une optimisation complète de la géométrie des molécules de polluant est d'abord réalisée en utilisant B3LYP fonctionnel et /6-31G (d,p) comme ensemble de base. L'analyse de la population naturelle est ensuite calculée pour déterminer l'indice de Fukui en utilisant l'équation suivante :

$$f_k^0 = (q_{N-1}^0 - q_{N+1}^0) \quad (\text{VI.1})$$

Où  $q_N^0$  est la population de charge atomique de l'atome K à l'état correspondant.

Pour clarifier le site le plus réactif de molécule MC, l'indice de Fukui ( $f^-$ ) est utilisé par de nombreux chercheurs comme concept important pour explorer les molécules de dégradation (**Esrabili and Saeidi 2018; Huang et al. 2016; Maitarad et al. 2016; Liu et al. 2017**) ; il est calculé à l'aide de la méthode de calcul théorique DFT.

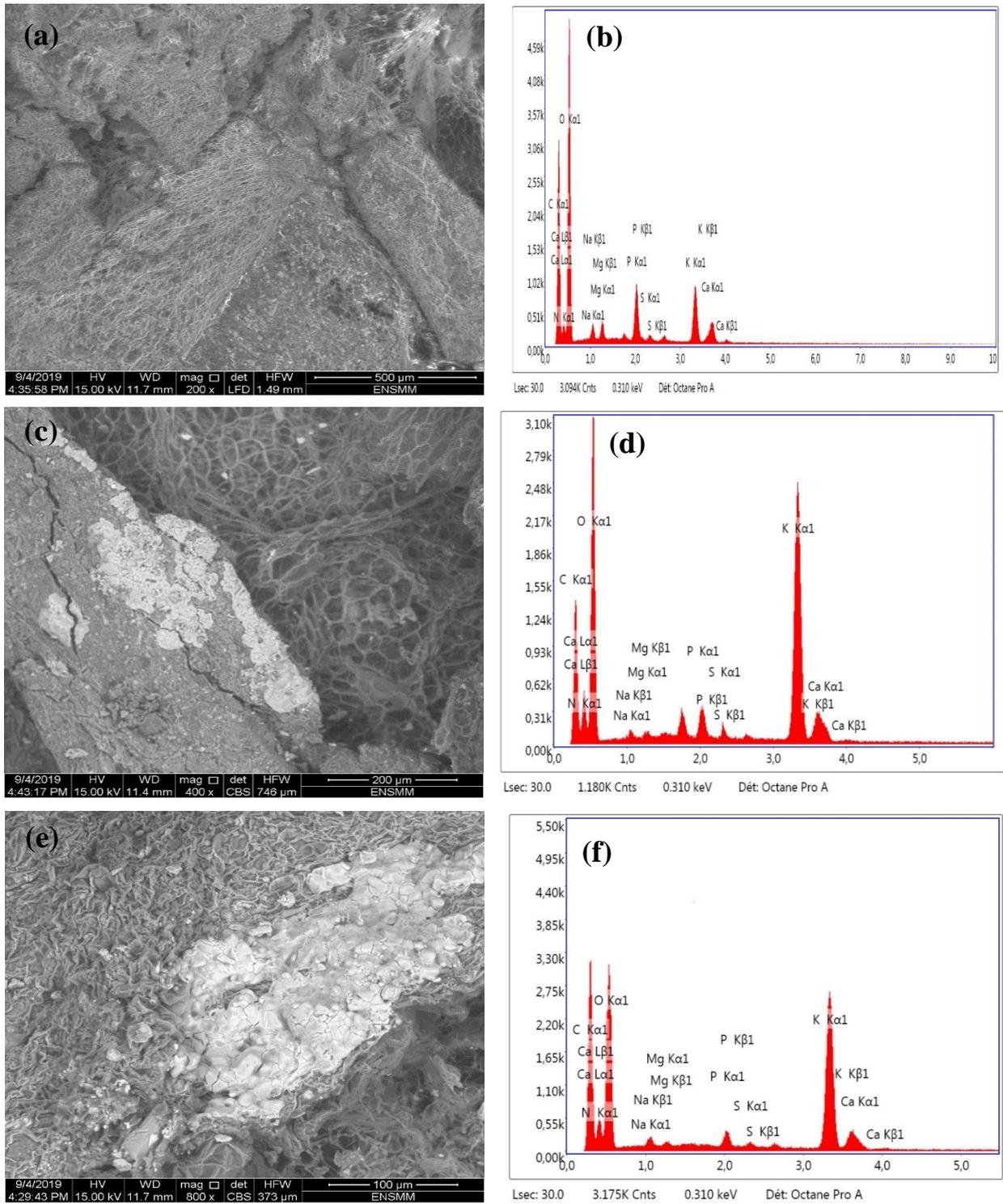
Les résultats de l'analyse des populations naturelles et la géométrie optimale de la molécule MC sont représentés sur la **Figure VI.7**. L'indice de Fukui le plus élevé est obtenu pour les sites atomiques situés dans le cycle de l'anthraquinone considérés comme les sites les plus réactifs pour la dégradation biologique. Ceci suggère que la biodégradation du colorant se produit d'abord par destruction des cycles d'anthraquinones. De plus, les indices de Fukui les plus élevés pour C19 (0,07464), C18 (0,03320), H46 (0,02502), H45 (0,02304), H27 (0,01942), C35 (0,01708), H28 ( 0,01072), C34 (0,0023), C17 (-0,008) et C30 (-0,0322) soulignent que le cycle du phénanthrène est également attaqué par les boues activées puis l'oxydation se poursuit pour obtenir des acides benzoïques qui sont ensuite convertis en acides de bas poids moléculaire.



**Figure VI.7.** (a) Indice de Fukui calculé pour MC et (b) géométrie optimale de la molécule de MC

La morphologie de *L.gibba* est observée au microscope électronique avant et après le traitement biologique des boues activées assistée par phytoremédiation et ce afin d'appuyer les observations précédentes relatives au mécanisme d'élimination des colorants MC et ES par ces plantes. D'après la **Figure VI.8 a**, on peut voir que la biomasse native de *L.gibba*

(avant traitement) admet une surface rugueuse et poreuse avec des cavités hétérogènes et des pores de formes et de diamètres variés. Cette biomasse est également observée après des expériences de phytoremédiation utilisant le mode CBS (électron rétrodiffusé centré) qui est sensible au mode de phases différentielles. À partir des **Figures VI.8 c** et **VI.8 e**, nous pouvons observer que les deux colorants textiles sont présents à la surface de la biomasse de couleur blanche suggérant que cette dernière peut accumuler des colorants organiques à la surface des frondes ; ceci révèle une affinité importante des lentilles d'eau pour les colorants anioniques (**Khaled et al. 2020**). Pour étayer l'observation ci-dessus, les résultats EDX représentés dans le **Tableau VI.8** montrent qu'il y a un changement majeur dans la composition de la biomasse où le pourcentage massique de C, N et O augmente après les expériences de phytoremédiation confirmant que la plupart des colorants présents dans la solution sont éliminés par le phénomène de phytoaccumulation (**Hocini et al. 2020**). Le pourcentage massique des éléments inorganiques varie lorsque la biomasse est exposée à ES et la quantité de Na, Mg, K, Ca, P et S diminue ce qui peut être dû à la toxicité du colorant qui peut inhiber la fixation de ces éléments inorganiques. Ces éléments sont signalés comme étant importants pour la croissance des plantes, la photosynthèse et sont bénéfiques pour la survie des plantes dans des conditions de stress abiotique (**Wang et al. 2013; Wang et al. 2014; Zhao et al. 2005; Amtmann et al. 2008**).



**Figure VI.8.** Images SEM et analyse EDX de (a, b) *L.gibba*, (c, d) *L.gibba* après accumulation d'ES, (e, f) *L.gibba* après accumulation de MC

**Tableau VI.8.** Analyse EDX de *L.gibba* avant et après traitement des colorants par phytoremédiation

Elément	<i>L.gibba</i>	<i>L.gibba</i> + MC	<i>L.gibba</i> + ES
C	22,29	24,61	27,85
N	8,49	8,25	15,74
O	56,62	59,45	62,37
Na	3,83	3,86	2,59
Mg	2,24	1,46	1,26
P	2,37	1,05	1,21
S	0,27	0,35	1,29
K	2,59	10,00	9,22
Ca	1,30	0,97	0,93

### VI.8. Réponses de *L.gibba* au stress abiotique induit par les colorants

Les tests de phytotoxicité qui reposent sur la détermination de la teneur en chlorophylle dans les plantes, sont très sensibles à l'exposition à une pollution ; ils fournissent des informations précieuses sur les associations entre les toxiques et l'appareil photosynthétique (Kertész et al. 2015).

Les concentrations des pigments photosynthétiques, à savoir la chlorophylle a (Chl a), la chlorophylle b (Chl b) et les caroténoïdes totaux (xanthophylles et carotènes  $C_X + C$ ) sont quantitativement analysées afin de vérifier le degré de toxicité des sous-produits de dégradation du colorant MC. Ces mêmes tests permettent d'analyser le comportement de *L.gibba* exposé aux solutions d'ES traitées par le procédé combiné.

D'après la **Figure VI.9 a**, les métabolites dérivés du colorant MC présente un faible impact sur la teneur en Chl a, Chl b et les niveaux des caroténoïdes  $C_X + C$ ; en effet, les valeurs de ces pigments diminuent par rapport à celles du témoin avec des pourcentages de réduction ne dépassant pas 9%. Dans ce cas on peut suggérer que les sous-produits de dégradation de MC affectent légèrement le système photosynthétique des lentilles d'eau sans présenter de symptômes visuels de toxicité. Ce résultat indique que les macrophytes aquatiques

manifestent des mécanismes de défense et une activité antioxydante contre les sous-produits de biodégradation de MC pour empêcher les effets délétères sur la physiologie des plantes (**Liu et al. 2017**). Mais cette constatation reste à confirmer et soutenue par d'autres informations sur les paramètres photosynthétiques qui sont compromis à l'exposition aux toxiques, pour mieux comprendre l'effet réel du contaminant dégradé, car les altérations physiologiques des plantes pourraient ne pas être entièrement déterminées, et les effets sur l'efficacité photosynthétique pourraient se produire avant l'apparition des symptômes visuels de toxicité (**Alkimin et al. 2019**). De plus, il faut tenir compte des interactions toxiques qui sont extrêmement dépendantes du mécanisme spécifique de toxicité de chaque substance.

Dans la **Figure VI.9 b**, les concentrations des pigments photosynthétiques diminuent significativement par rapport à ceux du contrôle pour les deux modes de traitement biologiques. Cette réduction se voit dans les pourcentages de réduction qui sont de 32 et 47% pour Chla, 49 et 66% pour Chl b et 42 et 59% pour les caroténoïdes  $C_{X+C}$ , pour le traitement combiné et pour le traitement avec *L.gibba*, respectivement. Cela indique que le colorant ES endommage la biosynthèse des pigments photosynthétiques par l'inhibition des enzymes impliquées dans le transport photosynthétique des électrons et la décomposition de la membrane chloroplastique (**Gulnaz et al. 2006**). Cependant, ce stress abiotique induit par ES est moins important à la fin du traitement combiné ce qui signifie que la biosorption de ce colorant par les boues activées montre un impact positif et réduit la toxicité de ce polluant envers les lentilles d'eau. Ceci peut nous amener à conclure que le système de traitement combiné présente non seulement divers avantages que ce soit en terme d'efficacité de traitement et de réduction du temps de traitement, mais aussi en terme de réduction de la toxicité de ce colorant envers l'environnement.

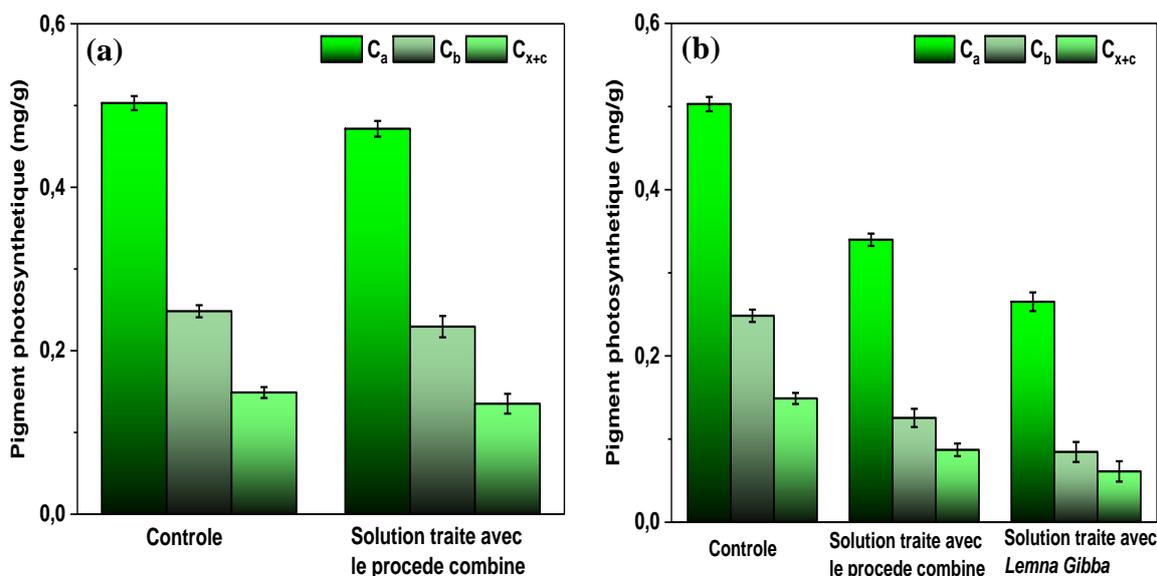
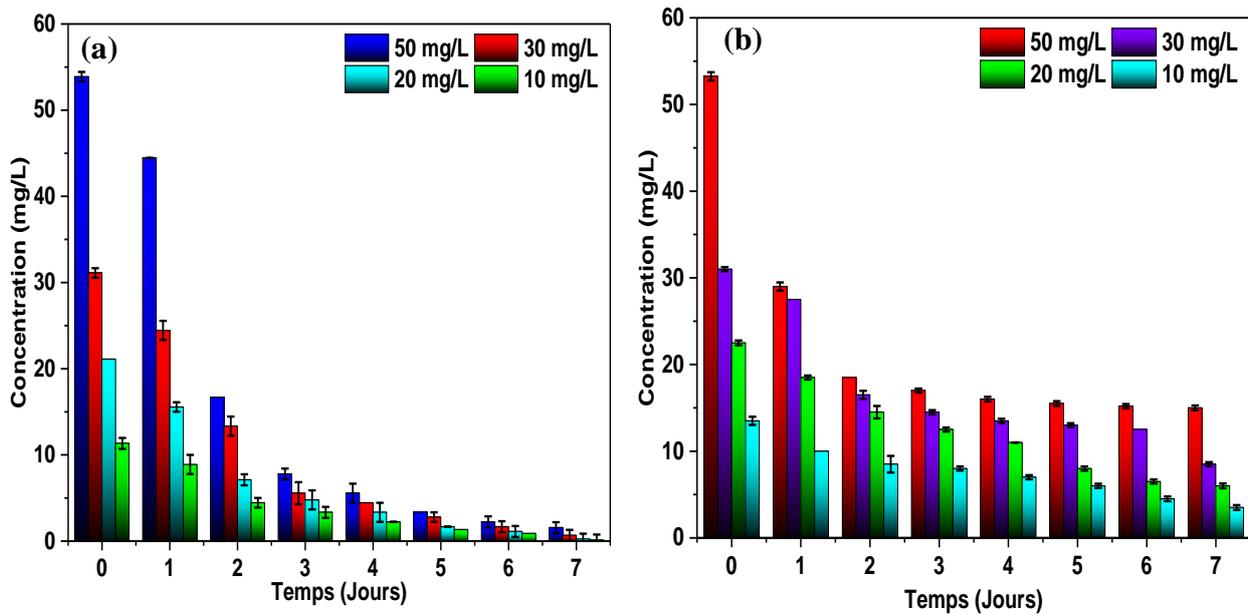


Figure VI.9. Teneur en pigments photosynthétiques de *L.gibba* pour (a) MC et(b) ES

### VI.9. Influence de la concentration initiale de MC et ES

Afin de déterminer la relation entre la concentration initiale de polluant et la capacité d'élimination des deux colorants par les boues activées combinées à *L.gibba*, nous testons quatre concentrations initiales (10, 20, 30 et 50 mg/L) de MC et ES. Le temps de traitement est fixé à sept jours dans les conditions opératoires évoquées précédemment.

La Figure VI.10 montre que dans les conditions du présent travail, une diminution significative de la concentration des deux colorants est observée pour toutes les concentrations testées, principalement dans le cas de MC (Figure VI.10 b) lorsque la concentration de colorant est égale à 10 mg/L. D'autre part, la même figure indique que l'abattement du colorant ES (Figure VI.10 a) de la solution contaminée est légèrement plus faible par rapport à MC. Ceci est déjà expliqué auparavant par le fait que le colorant MC ait subi une biodégradation par les microorganismes présents dans les boues activées, par contre l'élimination du polluant ES est principalement réalisée par une simple biosorption sur les boues activées et par phytoaccumulation par les plants aquatiques.



**Figure VI.10.** Effet de la concentration initiale de(a) MC et (b) ES sur la capacité de biodégradation des colorants par les boues activées assistées par les lentilles d'eau

Les résultats exprimés en pourcentage d'élimination (PR) révèlent un pourcentage d'abattement de colorant de 99 et 74% pour 10 mg/L de MC et ES, respectivement (**Tableau VI.9**). Ces résultats satisfaisants montrent que le couplage des deux procédés est très efficace *vis-à-vis* des deux colorants dans la plage des concentrations initiales variant de 10 à 50 mg/L. Cependant, le pourcentage d'élimination des deux colorants diminue avec l'augmentation de la concentration initiale pour les des deux polluants, et cela pourrait être attribué au fait que l'augmentation de la concentration en ces composés organiques augment entraînent la saturation des sites actifs de la biomasse des boues activées et des plantes aquatiques par la surcharge de la quantité de polluant. Ce résultat est en accord avec la littérature pour la biosorption de colorants sur les boues activées (**Lee 1996; Töröket al 2015**) et pour la phytoaccumulation de ces mêmes polluants des plantes aquatiques (**Hocini et al. 2020; Zhou et al. 2008; Haddad et al. 2018**). Il est cependant important de rappeler que l'élimination des colorants par ce procédé couplé beaucoup plus efficace dans le cas du MC lorsque la concentration en colorant dans l'eau est faible.

**Tableau VI.9.** Pourcentage d'élimination et rendement de biodégradation

<b>Concentration initiale (mg/L)</b>	<b>MC</b>		<b>ES</b>	
	<b>PE (%)</b>	<b>RD (%)</b>	<b>PE (%)</b>	<b>RD (%)</b>
<b>10</b>	99,02	99,22	74,07	80,28
<b>20</b>	98,95	98,61	73,33	75,75
<b>30</b>	97,86	97,52	72,58	72,99
<b>50</b>	97,11	95,07	71,83	68,65

Tous ces résultats confirment certaines relations entre l'efficacité de traitement biologique par les boues activées assistée par les lentilles d'eau et la concentration initiale en colorant.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude a porté sur la capacité de microorganismes présents dans les boues activées de STEP et des plantes aquatiques de type lentilles d'eau d'éliminer des colorants textiles qu'on retrouve souvent dans les effluents liquides. Il s'agit des colorants Marine Cibane (MC) et Ecarlate Solophényl BNLE (ES) procurés par l'entreprise de textile implantée dans la ville de Constantine (Est algérien). L'objectif principal de ce travail était d'élaborer dans un premier temps des essais de phytoremédiation des deux polluants par l'espèce aquatique *L.gibba* originaire de la ville d'El-Tarf (Est d'Algérie) et dans un deuxième temps de tenter d'éliminer les mêmes polluants par biodégradation avec les boues activées (prélevées de la STEP de Annaba) assistée par phytoremédiation avec la même espèce végétale.

Les premiers résultats de cette étude ont montré que *L.gibba* tolère les deux colorants (MC et ES) à des concentrations allant jusqu'à 50 mg/L dans un milieu nutritif sans manifester de symptômes visuels de toxicité. Bien qu'aucun dommage morphologique visible des macrophytes n'ait été observé à ces concentrations, on a enregistré une diminution significative du taux de croissance et une réduction de la teneur en pigments photosynthétiques (chlorophylle et caroténoïdes) après une période d'exposition de 4 jours. On a pu donc conclure que les tests de toxicité et de tolérance à MC et ES chez *L.gibba* ont permis de déterminer la concentration de polluant tolérée qui est de 50 mg/L. Cette concentration a été alors choisie comme concentration maximale pour l'élaboration des essais de phytoremédiation. En effet, ces derniers ont prouvé que *L.gibba* pourrait être un agent intéressant pour la phytoremédiation des deux polluants MC et ES. On a pu montrer que le procédé dépendait de la dose de plantes et de la concentration initiale de colorant. Dans les conditions opératoires du présent travail, l'efficacité d'élimination de MC et ES était de 53,3 et 23,2 %, respectivement.

Un résultat intéressant a pu être mis en évidence lors de cette étude. C'est que la capacité d'élimination de MC par *L.gibba* était plus grande que celle d'ES, en particulier aux faibles concentrations ce qui a prouvé que cette plante manifestait une efficacité différente *vis-à-vis* des deux colorants. A priori, on peut dire que la taille de la molécule pourrait avoir un effet sur la capacité de phytoremédiation de composés organiques par cette espèce

aquatique. On a pu constater que les pourcentages d'élimination de MC et ES diminuaient avec l'augmentation de leur concentration ; pour un pH initial égal à 6,1 et une température de 21 °C, la meilleure efficacité atteinte était de 75 et 30% obtenue pour 10 mg/L de MC et ES, respectivement. Cependant, cette efficacité diminuait légèrement pour des concentrations plus élevées.

Le mécanisme de phytoremédiation a été élucidé par analyse UV-vis et FT-IR ; il nous a permis de comprendre que les colorants sont éliminés en deux étapes : la première est l'étape passive (élimination rapide) ou l'étape d'adsorption des molécules sur la surface des lentilles d'eau par une attraction électrostatique ; l'analyse FT-IR a montré que les fonctions de la biomasse, à savoir les fonctions alcool, alcène, phénol et amine, sont impliquées dans la rétention des molécules. La seconde étape est l'étape d'élimination progressive qui est une phytoaccumulation des polluants à l'intérieur de la biomasse de *L.gibba*. A ce stade, aucune phytodégradation des molécules étudiées n'a été mise en évidence. Le changement morphologique a également été observé à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) avant et après l'opération de phytoremédiation. La morphologie de la plante native (sans exposition aux deux colorants) était d'apparence rugueuse avec une surface poreuse et des pores de formes et de diamètres variés, cependant, la morphologie de la plante après accumulation des colorants demeurait encore rugueuse avec un petit élargissement des pores en raison de l'absorption des molécules de MC et ES à l'intérieur de la biomasse de *L.gibba*.

L'ensemble de ces résultats obtenus nous a permis de conclure que l'espèce aquatique *L.gibba* pourrait être un bon candidat pour l'élimination des polluants organiques contaminant les milieux aqueux. Nous avons donc pensé à ce que le présent procédé pourrait être couplé à d'autres espèces biologiques (plantes aquatiques, micro-organismes, boues activées) dans une perspective d'augmenter encore plus l'efficacité du traitement biologique. Le couplage lentilles d'eau/boues activées nous a donc paru une idée prometteuse pour améliorer l'opération d'élimination des deux polluants tout en garantissant un procédé de traitement respectueux de l'environnement. Avec cette approche, plusieurs essais expérimentaux avec les boues activées de la STEP de Annaba ont été préalablement effectués afin de comprendre le phénomène de dégradation de MC et ES par ces boues et rechercher certains paramètres optimums pour pouvoir mettre en œuvre les manipulations du procédé combiné.

Dans le procédé à boues activées seules, les observations microscopiques des échantillons du consortium constituant ces boues ont montré la présence de différents gènes de

microorganismes, principalement des protozoaires (*Vorticella* à tige courte, *Euplotes sp*, *Epistylis sp*) et des métazoaires (*Rotifera*) reconnus comme ayant la capacité de dégrader la matière organique. D'autre part, les concentrations mesurées de MS, MVS et MES étaient conformes aux valeurs de la notice d'exploitation de la STEP de Annaba ; l'indice de boue (IB) est égal à 127,7 mL/g, ce qui signifiait que cette boue est composée de floccs bactériens bien constitués susceptibles d'assurer une bonne décantation et une séparation solide-liquide facile. Les différents paramètres de suivi de la croissance microbienne (matières sèches, pourcentages de développement microbien et indice de croissance des boues activées) ont permis de dire que les molécules de MC et ES ne sont pas toxiques pour le développement de la communauté des boues activées. Les pourcentages de dégradation de MC et ES dans le cas des traitements sans glucose (44-65%) étaient toujours supérieurs à ceux des contrôles(41-43%) et se sont améliorés en présence de glucose (52 et 68%). Les résultats obtenus à l'issue des expériences de biodégradation de MC et ES par les boues activées ont révélé que les microorganismes étaient responsables de la diminution de la concentration en phase liquide des polluants notamment pour les solutions stimulées par le glucose. Ce co-substrat facilement biodégradable a certainement garanti une bonne croissance bactérienne et a permis une bonne interaction entre les molécules ce qui a entraîné la production d'enzymes responsables du co-métabolisme des composés organiques. Aussi, les rendements de dégradation calculés sur la base de la DCO ont atteint des valeurs supérieures à 47 et 63% respectivement pour les solutions sans et avec glucose pour le colorant anthraquinonique(MC) et des valeurs de 39 et 47% pour le colorant azoïque (ES).

Le couplage biodégradation/phytoremédiation a nettement amélioré l'élimination et la dégradation des deux colorants. En effet, pour la solution chargée en MC, un pourcentage d'abattement de 97% a été atteint lorsque les lentilles d'eau étaient ajoutées à la solution, comparée celle traitée par les boues activées seules où on a noté un pourcentage qui ne dépassait pas les 63%. Pour le cas du colorant ES, un pourcentage d'abattement de 72% supérieur à celui de la solution traitée par les boues activées seules (44%) a également été obtenu. On peut affirmer que l'ajout *L.gibba* renforce le traitement biologique par les boues activées et entraîne une augmentation de rendements d'élimination de 33 et 22% de MC et ES, respectivement. Cette amélioration est certainement liée au consortium mixte des microorganismes et des plantes aquatiques qui étaient responsables de l'élimination des colorants par biosorption, biodégradation et phytoaccumulation. D'ailleurs, le suivi de la croissance et du développement à l'aide de différents paramètres a montré une excellente

synergie entre les deux espèces biologiques même en présence de colorants, notamment lorsque le glucose a été ajouté à la solution. En effet, l'indice de croissance a toujours été supérieur à 1.

Le traitement des spectres UV-visible et FT-IR de MC, a montré que l'élimination de ce colorant par la communauté microbienne des boues activées a été initiée par le clivage du cycle de l'antraquinone et la dégradation des composés aromatiques générés pour obtenir des chaînes d'acides aliphatiques courtes. Aussi, l'analyse LC/MS a confirmé que l'élimination de MC est principalement due à la biodégradation par les boues activées. L'indice de Fukui a, de son côté, clarifié le site le plus réactif de la molécule MC, et les sites atomiques situés dans le cycle de l'antraquinone considérés comme les sites les plus réactifs pour la dégradation biologique. Pour ce qui est d'ES, les spectres UV-vis et FT-IR ont démontré que ce colorant présentait une résistance à l'attaque microbienne. Cependant, la diminution de sa concentration et les taux de décoloration obtenus étaient principalement dus à leur biosorption graduelle dans la matrice biologique jusqu'à l'obtention de la concentration d'équilibre.

Les observations morphologiques à l'aide du mode CBS (électron rétrodiffusé centré) de *L.gibba* avant et après élaboration du traitement combiné ont montré que cette plante aquatique a accumulé MC et ES à la surface de ses frondes ce qui a révélé une affinité importante de cette espèce pour les colorants anioniques. Ces résultats importants ont été confirmés par les analyses EDX.

En vue de mesurer l'innocuité des produits de dégradation des colorants, nous avons réalisé des tests de phytotoxicité par l'analyse des pigments photosynthétiques de *L.gibba*. Les métabolites dérivés du colorant MC présentaient un faible impact sur la teneur en Chl a, Chl b et les caroténoïdes  $C_{x+c}$  des lentilles d'eau; ces valeurs étaient inférieures à celles du témoin avec des pourcentages de réduction ne dépassant pas 9%. Le stress abiotique induit par ES était moins important à la fin du traitement combiné ce qui signifie que le traitement combiné a donné un impact positif et a réduit la toxicité de ce polluant envers les lentilles d'eau.

Cette étude a montré que la combinaison des deux procédés biologiques (biodégradation et phytoremédiation) pourrait être une approche intéressante pour le traitement des colorants textiles. D'après les résultats exposés ci-dessus, on peut conclure que l'ajout de l'espèce *L.gibba* aux boues activées a amélioré l'élimination et le pourcentage d'abattement de la concentration des polluants présents dans les solutions à traiter. De plus, ce procédé couplé a permis de réduire le temps de traitement à sept jours (au lieu de dix jours avec les boues

activées seules). Ceci a prouvé que les lentilles d'eau participaient au traitement de ces colorants *via* la phytoaccumulation de ces deux polluants dans leurs différentes parties végétales. Aussi, ces résultats nous ont amenés à conclure que le système du traitement combiné présentait non seulement divers avantages que ce soit en terme d'efficacité de traitement et de réduction du temps de traitement, mais aussi en terme de réduction de la toxicité de ces colorants envers l'environnement.

Ce projet pourrait être complété et approfondi ; nous suggérons donc de :

- Tester d'autres polluants organiques d'origines diverses afin de recommander ce procédé innovant pour épurer des effluents industriels qui portent préjudice à l'environnement ;
- Faire de multitudes combinaisons microorganismes/plantes aquatiques et tester leur synergie et leur capacité de traitement car la nature est constituée d'un immense réservoir d'organismes vivants capables de protéger la planète et contribuer à son équilibre;
- Poursuivre les projets de recherche déjà entamés sur le traitement de polluants organiques par l'adoption de procédés biologiques couplés efficaces et durables ;
- Développer et évaluer à l'échelle pilote puis à grande échelle ces procédés afin d'établir des protocoles, des standards et des techniques d'application efficaces et économiques susceptibles de garantir un développement durable.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références Bibliographiques

- Abedin MJ, Feldmann J, Meharg AA (2002) Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiology* 128:1120-28.
- Abouzaid A (2001) Etude de différents traitements des effluents de l'industrie textile : Coagulation-floculation-adsorption-nanofiltration. Thèse de Doctorat, Université Chouaib Doukkali (Maroc), 108 pages.
- A.D.E.M.E Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (2006) Traitement biologique des sols pollués: recherche et innovation, Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie, 92 p.
- Adki VS, Jadhav JP, Bapat VA (2013) at the cross roads of environmental pollutants and phytoremediation: a promising bio remedial approach. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23(2):125-140.
- AFNOR N (1999) Qualité de l'eau– Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence. AFNOR, Paris (France).
- AFSSA (2003) Demande d'évaluation de l'exposition aux HAP dans l'eau de boisson et réflexion sur l'éventuel risque associé, réf. CES/RAP N°2005 – SA – 0056.
- Ahir U, Sohail S, Khan UH (2017) Concurrent uptake and metabolism of dyestuffs through bio-assisted phytoremediation: asymbiotic approach. *Environmental Science and Pollution Research* 24 (29): 22914-22931.
- Alam R, Ardiati FC, Solihat NN, Alam MB, Lee SH, Yanto DHY, Kim S (2020) Biodegradation and Metabolic Pathway of Anthraquinone Dyes by *Trametes hirsuta* D7 Immobilized in Light Expanded Clay Aggregate and Cytotoxicity Assessment. *Journal of Hazardous Materials* 5(405):124176.
- Allais JP, Gripois D, Moreteau B, & Ramade F (1979) N-Acetylation enzymatique de la tryptamine par des homogenats de cerveaux de *Locusta migratoria* avant et après intoxication par le chlordimeform où le lindane. *Experientia* 35(10):1357-1359.
- Ali H (2010) Biodegradation of Synthetic Dye. A Review, *Water, Air and Soil Pollution* 213: 251-273.
- Alkimin GD, Daniel D, Frankenbach S, Serôdio J, Soares AMVM, Barata C, Nunes B (2019) Evaluation of pharmaceutical toxic effects of non-standard endpoints on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Science of the Total Environment* 657: 926 937.
- Alkio M, Tabuchi TM, Wang X, Colon-Carmona A (2005) Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitiveresponse-like symptoms. *Journal of Experimental Botany* 56:2983-2994.

- Amirouche M, Barkai CS (2007) Étude expérimentale pour l'épuration des eaux usées par electroflottation. Mémoire de fin d'études, Université de Bejaia.
- Ambaye TG, Hagos K (2020) Photocatalytic and biological oxidation treatment of real textile wastewater. *Nanotechnology for Environmental Engineering* 5(3):28.
- Amtmann A, Trouard S, Armengaud P (2008) the effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia Plantarum* 133(4):682-691.
- Andreozzi R, Caprio V, Insola A, Marotta R (1999) Advanced oxidation process (AOPs) for water purification and recovery. *Catalysis Today* 53:51-59.
- Appleton EL (1996) A Nickel-Iron wall Against Contaminated Groundwater. *Environmental Science and Technology* 30:536-539.
- A.P.H.A American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation (1999) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington DC.
- Ardenghi NM, Armstrong WP, Paganelli D (2017) *Wolffia Columbiana* (Araceae, Lemnoideae): first record of the smallest alien flowering plant in southern Europe and Italy. *Botany Letters* 164(2):121-127.
- Aubert S, Schwitzguebel JP (2004) Screening of plant species for the phytotreatment of wastewater containing sulphonate anthraquinones. *Water Research* 38:3569–3575.
- Ayed, L, Cheriaa, J, Laadhari, N, Abdelkarim, C, Amina, B (2009) Biodegradation of crystal violet by an isolated *Bacillus* sp. *Annals of Microbiology* 59 (2): 267-272.
- Baghriche O (2005) Contribution de méthodes destructives (Photolyse et P.O.A's) et non destructives à l'élimination de deux colorants (Bleu de méthylène et rouge Congo) en solution aqueuse. Thèse de Magister, Université Mentouri Constantine (Algérie), pages 24-35.
- Banuelos GS, Meek DW (1990) Accumulation of selenium in plants grown on selenium treated soil. *Journal of Environmental Quality* 19:772-77.
- Bajaj M, Gallery C, Winter I (2008) Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an anaerobic fixed bed reactor. *BioresourTechnol* 99:8376-8381.
- Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, Van Der Lelie D (2004) Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology* 22: 583-588.
- Baudo R, (1987) *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia – Ecotoxicological testing with Daphnia*. Peters and Bernardi Editors, Verbania Pallanza, 461-482.
- Basibuyuk M, Forster CF (2003) An examination of the adsorption characteristics of a basic dye (Maxilon Red BL-N) on to live activated sludge system. *Process Biochemistry* 38(9):1311-1316.

- Bassompierre C (2007)** Procédé à boue activées pour le traitement d'effluents papetiers : de la conception d'un pilote à la validation de modèles. Thèse de Doctorat, Institut national polytechnique de Grenoble, (France), 232 pages.
- Bauer C, Jacques P, Kalt A (2001)** Photooxidation of an azo dye induced by visible light incident on the surface of TiO<sub>2</sub>. *Journal of Photochemistry and Photobiology A, Chemistry* 140:87-92.
- Bauman RW (2018)** Micro Biology with diseases by body system, fifth Edition Pearson, 939 pages.
- Benaissa A (2011)** Etude de la dégradation photocatalytique d'un colorant synthétique et d'un tensioactif. Thèse de doctorat, Université de Constantine (Algérie), 176 pages.
- Benabbas K, Zabat N, Hocini I (2020)** Azo dye removal by acid pretreated biomass and its regeneration by visible light photocatalysis with incorporated CuO. *Environmental Technology* 1–53.
- Bengrine A (2011)** Dépollution des eaux usées sur un support naturel Chitosane-Bentonite, Mémoire de magister, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, (Algérie), 111 pages.
- Benhacine Z (2017)** Comparaison des rejets liquides de deux industries de la Wilaya de Constantine. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine (Algérie), 57 pages.
- Benmansour H, Barillier D, Corroler D, Ghedira K, Ghedira LC, Mosrati R (2009)** In vitro study of DNA damage induced by acid orange 52 and its biodegradation derivatives. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28:489-495.
- Benmansour H, Boughzala O, Dridi D, Barillier D, Chekir-Ghedira L, Mosrati R (2011)** Les colorantes textiles sources de contamination de l'eau : criblage de la toxicité et des méthodes de traitement. *Journal of Water Science* 24(3): 209-238.
- Bereket G, Aro AZ, Ozel MZ (1997)** Removal of Pb(II), Cd(II), Cu(II), and Zn(II) from Aqueous Solutions by Adsorption on Bentonite. *Journal of Colloid and Interface Science* 187(2): 338-43.
- Bibi I, Javed S, Ata S, Majid F, Kamal S, Sultan M, Jalani K, Umair M, Khan MI, Iqbal M (2019)** Biodegradation of synthetic orange G dye by *Pleurotus sojar-caju* with *Punica granatum* peel as natural mediator. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 22:101420.
- Biney C, Amuzu AT, Calamari D, Kaba N, Mbome IL, Naeve H, Ochumba O, Osibanjo O, Radeconde V, Saad MAH (1994)** Etude des métaux lourds, *Revue de la Pollution dans l'Environnement Aquatique Africain* FAO 25:1-6.
- Black H (1995)** Absorbing possibilities: phytoremediation. *Environmental health perspectives* 103(12): 1106-1108.
- Blandin P (1986)** Bioindicateur et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'Ecologie* T.17 (4): 1-309.
- Blaylock MJ, Huang JW (2000)** Phytoextraction of metals. In *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to clean up the Environment*, Ed. I Raskin, BD Ensley, pp. 53–70. New York:Wiley.

- Boeglin (1998)** JC Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés, traitements biologiques des eaux résiduaires. J 3942.
- Boonnorat J, Techkarnjanaruk S, Honda R, Anghong S, Boonapatcharoen N, Muenmee S, Prachanurak P (2018)** Use of aged sludge bioaugmentation in two-stage activated sludge system to enhance the biodegradation of toxic organic compounds in high strength wastewater, *Chemosphere* 202:208-217.
- Bouafia S (2010)** Dégradation des colorants textiles par procédés d'oxydation avancée basée sur la réaction de fenton, application à la dépollution des rejets industriels, Thèse de Doctorat. Université PARIS-EST (France), pages 75-101.
- Boeglin JC (1999)** Lutte contre la pollution de l'eau, édition Technique de l'ingénieur traité environnement 1250 :1-10.
- Boeglin JC, Roubaty L (2007)** Pollution industrielles de l'eau, édition technique de l'ingénieur, traité dans l'environnement 1210:1-12.
- Bordet J (2007)** L'eau dans son environnement rural, édition JOHANET, Paris, 317 pages.
- Boulal A, Bouchema M (2014)** Etude cinétique de la dégradation d'un colorant par oxydation. Mémoire de Master. Université Mohamed Boudiaf Oran. Algérie.
- Bouyarmane H (2014)** Etude des processus d'adsorption et de photodégradation des polluants organiques supportés sur les composites TiO<sub>2</sub>-Apatite. Thèse de Doctorat, Université Mohammed V – AGDAL Rabat (Maroc), 147 pages.
- Bourier R (2008)** Les réseaux d'assainissement, 5<sup>ème</sup> édition Lavoisier, édition TEC & DOC, Paris, 1013 pages.
- Bottoni P, Caroli S, Barra Caracciolo A (2010)** Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicological & Environmental Chemiser* 92(3):549-65.
- Briggs GG, Bromilow RH, Evans AA (1982)** Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionized chemicals by barley. *Pesticide Science* 13:405-504.
- Brown MA, DeVito SC (1993)** Predicting azo dye toxicity, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 23 249-324.
- Bulletin de la Société des sciences naturelles, Ouest de la France** 4:153-168. **Triquet AC, Lagadic L, Caquet T, Ramade F (1998)** Utilisation de biomarqueurs pour la biosurveillance de la qualité de l'environnement. Ed. Tec et Doc, Paris, 306 pages.
- Byung HK (2008)** Geoffrey Michael Gadd, *Bacterial Physiology and Metabolism*, edition 1: Cambridge University Press, 554 pages.
- Cardeal ZL, Pradeau D, Hamon M, Abdoulaye I, Pailler FM, & Lejeune B (1993)** new calibration method for gas chromatographic assay of carbon monoxide in blood. *Journal of analytical toxicology* 17(4):193-195.
- Carliell CM, Barclay SJ, Naidoo N, Buckley CA, Mulholland DA (1995)** Microbial decolorisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. *Water SA* 21:61-69.

- Cao J, Wei L, Huang Q, Wang L, and Han S (1998) Reducing degradation of azo dye by zero-valent iron in aqueous solution. *Chemosphere* 38, 3:565-571.
- Carmen Z, Daniela S (2012) Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents-A Critical Overview, *Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention*. Environmental and Analytical Update, Edition Dr. Tomasz Puzyn, 55-87.
- Canler JP, Perret JM, Duchene PH, Cotteux E (1999) Aide au diagnostic des stations d'épurations par observation microscopique des boues activées, Cemagref Edition, France, 20 pages.
- Cardot C (1999) Les traitements de l'eau – Procédés physico-chimiques et biologiques. Paris Ellipses, 320 pages.
- Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati, F, Calamari D, Zuccato E (2006) Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science & Technology* 40:357-363.
- Centre d'information sur l'eau, C.I.E.A.U. La réglementation des eaux usées (brochure). Traitement des eaux usées (brochure). [www.cieau.com](http://www.cieau.com).1970.
- Cervantes FJ, Enriquez JE, Mendoza-Hernandez MR, Razo-Flores E, Field JA (2006) The role of sulphatereduction on the reductive decolorization of the azo dye reactive orange 14. *Water Science and Technology* 54:171-177.
- Ceschin S, Crescenzi M, Iannelli MA (2020) Phytoremediation potential of the duckweeds *Lemna minuta* and *Lemna minor* to remove nutrients from treated waters. *Environmental Science and Pollution Research* 27:15806-15814.
- Chang JS, Chou YP, Chen SY (2001) Decolorization of Azo Dyes with Immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochemistry* 36:757-763.
- Chang JS, Chou, C, YC Lin , PJ Lin , JY Ho et TL Hu (2001) Kinetic characteristic of bacterial azo dyes decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Research* 35: 2841-2850.
- Chang JS, Lin YC (2000) Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnology Progress* 16:979-985.
- Chao HJ, Xue D, Jiang W, Li D, Hu Z, Kang j, Liu D (2020) A low-voltage pulse electrolysis method for the degradation of anthraquinone and azo dyes in chloride medium by anodic oxidation on Ti/IrO<sub>2</sub>-RuO<sub>2</sub>-SnO<sub>2</sub> electrodes. *Water Environment Research* 92:779-788.
- Chaudhry Q, Schröder P, Werck-Reichhart D, Grajek W, Marecik R (2002) Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 9(1):4-17.
- Chen KC, Huang WT, Wu JY, Houg JY (1999) Microbial Decolorization of Azo Dyes by *Proteus Mirabilis*, *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 23(1):686-690.
- Chevrier E (2013) La phytoremédiation, une solution d'avenir pour le Québec. Thèse de l'obtention du grade de maitre en environnement, Université de Sherbrooke, (Canada), 102 pages.

- Chojnacka K (2007). Bioaccumulation of Cr (III) ions by blue-green alga *Spirulina sp.* Part I. A comparison with biosorption. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2(4): 218-223.
- Chowdhury AK, Sarkar AD, Bandyopadhyay A (2009) Rice Husk Ash as a Low Cost Adsorbent for the Removal of Methylene Blue and Congo Red in Aqueous Phases. *CLEAN - Soil, Air, and Water* 37(7): 581-591.
- Chowdhury PR and Bhattacharyya KG (2015) Synthesis and Characterization of Co/Ti Layered Double Hydroxide and Its Application as a Photocatalyst for Degradation of Aqueous Congo Red. *RSC Advances* 5: 92189-92206.
- Christopher M. Bye and Peter L. Dold (1998) Sludge Volume Index Settle ability Measures: Effect of Solids Characteristics and Test Parameters. *Water Environment Research*; 70 (1): 87-93.
- Chung KT, Fluk GE, Andrews AE (1981) Mutagenicity testing of some commonly used dyes, *Applied and Environmental Microbiology* 42:641-648.
- Claveri B, Morhain E, et Mouvet C (1994) A methodology for the assessment of accidental copper pollution using the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere* 28(11): 2001-2010.
- Clémence BES (2008) Phytoremédiation des sols d'un site de traitement du bois contaminés par le cuivre. Thèse de Doctorat. Université Bordeaux l'école Doctorale des Sciences et Environnements, (France), 299 pages.
- Corcoran E, Nellesmann C, Baker E, Bos R, Osborn D, Savelli H (2010) Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. A Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme.
- Coronado-Posada N, Cabarcas-Montalvo M, Olivero-Verbel J (2013) Phytotoxicity assessment of a methanolic coal dust extract in *Lemna minor*. *Ecotoxicology and environmental safety* 95:27-32.
- Costa CA, Rodrigues AE (1982) Adsorption at the gas-solid and liquid-solid interface. First Ed., Elsevier Sci. Publisher Compa. Amestrdam.
- Costa MB, Tavares FV, Martinez CB, Colares IG, Martins CDMG (2018) Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: potential application to environmental monitoring and phytoremediation. *Ecotoxicology and environmental safety* 155:117-124.
- Coyette J, Mergeay M (2013) *Microbiologie*, 4ème édition, Boeck Supérieur, 114 pages.
- Cui D, Zhang M, Wang J, Wang H, Zhao M (2020) Effect of quinoid redox mediators during azo dye decolorization by anaerobic sludge: Considering the catalyzing mechanism and the methane production. *Ecotoxicol Environ Safety* 1(202):110859.
- Cunningham J, AL-Sayyed G, Srijaranai S (1994) Adsorption of model pollutants onto TiO<sub>2</sub> particles in relation to photoremediation of contaminated water. *Aquatic and surface photochemistry*. CRC Press 2:17-18.

- Cunningham SD, Berti WR (1993). Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro, Cell & Developmental Biology* 29: 207-212.
- Cymerman SA, Kempers AJ (2001) Concentrations of heavy metals and plant nutrients in water, sediments and aquatic macrophytes of anthropogenic lakes (former open cut brown coal mines) differing in stage of acidification. *Science of the Total Environment* 281(1-3):87–98.
- Dahane S (2015) La préconcentration de micro polluants organiques dans l'eau et de leur extraction par des nanomatériaux. Thèse de Doctorat, Université d'Oran (Algérie), 105 pages.
- Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environmental Health Perspective* 107(6):907-42.
- Dai J (2003) Effets de la localisation et de la spéciation des métaux lourds sur leur impact biologique dans des sols pollués du Nord de la France. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris, (France), 228 pages.
- David NE (2006) Etude de la cinétique et modélisation de la biosorption de quelques métaux lourds :  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  par la plante aquatique *Lemna gibba*. Mémoire de magister. Université de Saad Dahlab de Blida, (Algérie), 208 pages.
- Dalcorso G, Fasani E, Manara A, Visioli G, Furini A (2019) Heavy metal pollutions: state of the art and innovation in phytoremediation. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (14):3412.
- Dégremont (1989) Mémento technique de l'eau, édition 9, Volume 1, Lavoisier, Paris, 2503 pages  
Containing Triarylmethane Dyes by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Industrial Effluent. *Biotechnology Research International* 1–11.
- Desoille H, Scherrer J, Truhauter R (1987) Précis de médecine du travail ». 5ème Edition Masson, 838-845.
- Demirezen D, Aksoy A, Uruc K (2007) Effect of population density on growth, biomass and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba* (*Lemnaceae*). *Chemosphere* 66: 553–557.
- Delporte C (2007) Traitement biologique aérobie des effluents industriels, édition technique d'ingénieur, traité environnement 1300:1-15.
- Desoille H, Scherrer J, Truhauter R (1987) Précis de médecine du travail. 5ème Edition Masson 838-845.
- Dégremont (1984) Memento Technique de l'eau. 7ème Edition Dunod, Paris, France.
- Déronzier G, Choubert JM (2004) Traitement du phosphore dans les petites stations d'épuration à boues activées. Document Technique FNDAE n° 29, 1ère édition, Cemagref éditions, France.
- Djasser. Thèse de Magistère Université Mentouri Constantine (Algérie), pages 22-29.
- Dohanyos M, Madera V, Sedlacek M (1978) Removal of organic dyes by activated sludge. *Programme Water Technology* 10(5/6):559-575.
- Dossantos, A, Cervantes FJ, et Van Lier JV (2007) Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology* 98:2369-2385.

- Dosnon OR (2009) *Phytoremédiation d'eaux contaminées par des pesticides : tolérance et capacité d'élimination par des plantes aquatiques*. Thèse de Doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne, (France), 226 pages.
- Driever SM, Nes EHV, Roijackers RMM (2005). Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density. *Aquatic Botany* 81: 245-251.
- Dulucq S, Brigitte L (2004) *Oxydation des effluents de l'industrie textile*, vol.14, N0. 15: 4-12 pages.
- Du H, Wu Y, Wu H, Li F (2020) Effect of ozone pretreatment on characteristics of dissolved organic matter formed in aerobic and anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Environmental Science and Pollution Research* 28(3):1-12.
- Dubois JP, Blake G, Gerbeaux P, Brun G (1988) Aquatic vegetation of Lake Annecy. *Swiss journal of hydrology* 50(1):96-110.
- Duchene Ph, Cotteux E (1993) Les éléments les plus significatifs de la microfaune des boues activées, TSM N° 9, Paris.
- Duguet J-P, Bernazeau F (2006) *Réglementation et traitement des eaux destinées à la consommation humaine*. 1ère édition. ASTEE.
- Dukor RK, Story GM, Marcott C (1999) A method for analysis of clinical tissue samples using FTIR microspectroscopy imaging. In: Greve J., Puppels G.J., Otto C. (eds) *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions*. Springer, Dordrecht.
- Dushenkov S, Kapulnik Y (2000) Phytofiltration of metals. In *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to clean up the Environment*, Ed. I Raskin, BD Ensley, pp. 89–106. New York: Wiley.
- Driever SM, Nes EHV, Roijackers RMM (2005) Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density. *Aquatic Botany* 81: 245-251.
- Edeline F (1997) *Epuration biologique des eaux, théorie et technologie*. Edition technique et documentation, Lavoisier, 308 pages.
- Eichlerova I, Homolka L, Lisa L, Nerud F (2005) Orange G and remazol brilliant blue R decolorization by white rot fungi *Dichomitus squalens*, *Ischnoderma resinotum* and *Pleurotus calyptratus*. *Chemosphere* 60:398–404.
- Ekouma DN (2006) *Etude de la cinétique et modélisation de la biosorption de quelques métaux lourds : Cd<sup>2+</sup> Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> par la plante aquatique Lemna gibba*. Mémoire de magister, Université de Saad Dahlab de Blida, Alger.
- Eldefrawy N, Shaalan H (2007) Integrated membrane solutions for green textile industries. *Desalination* 204 (1-3):241-254.
- Elwakeil NE (2013) Retracted article: botanical pesticides and their mode of action. *Gesunde Pflanzen* 65(4):125-149.
- E.P.A Environmental Protection Agency U (1999) *Phytoremediation Resources Guide*. Government of the United States of America: Washington, USA, p 56.

- El-Shahate RM, El-Araby MMI, Eweda EW, El Berashi MN (2011) Evaluation of the effect of three different pesticides on *Azolla pinnata* growth and NPK uptake. *Journal of American Science* 7(1):1020-1031.
- Erickson RJ, Brooke LT, Kahl MD, Venter F V, Harting SL, Markee TP, & Spehar RL (1998) Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(4):572-578.
- Errais E (2011) Réactivité de surface d'argiles naturelles étude de l'adsorption de colorants anioniques. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg (France), pages 75-86.
- Esfarili MD, Saeidi N (2018) Carbon-doped boron nitride nanosheet as a promising catalyst for N<sub>2</sub>O reduction by CO or SO<sub>2</sub> molecule: a comparative DFT study. *Applied Surface Science* 444: 584-589.
- Fanchiang JM, Tseng DH (2009) Degradation of anthraquinone dye C.I. Reactive Blue 19 in aqueous solution by ozonation. *Chemosphere* 77(2):214-221.
- Fang H, Wenrong H, Yuezhong L (2004) Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4BS. *Water Research* 38:3596-3604.
- Fenet H, Gomez E, Leclerc M, Casellas C (2006) Devenir des médicaments dans l'environnement. *Environnement, Risques et Santé*, 5(4):243-247.
- Feng K, Yanagisawa K, Yamasaki N (1997) Synthesis of 565 birnessite-type potassium manganese oxide. *Journal of Materials Science Letters* 566(16):110-112.
- Ferrat L, Pergent-Martini C, et Roméo M (2003) Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* 65:187-204.
- Flechas FW, Latady M (2003) Regulatory Evaluation and Acceptance Issues for Phytotechnology Projects. In: Tsao D.T. (eds) *Phytoremediation. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 78. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Forgacs E, Cserhàti T, and Oros G (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, *Environment International* 30:953-971.
- Fournon D (1999) La phytoremédiation. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier de Grenoble (France), 119 pages.
- Francisco E, Mendonça D, Seber S, Morales DA, Zocolo GJ, Zanoni MB, Umbuzeiro, GA (2015) Potential of a bacterial consortium to degrade azo dye Disperse Red 1 in a pilot scale anaerobic-aerobic reactor. *Process Biochemistry*, 50(5), 816-825.
- Frederic M, Samir L, Louise M, Abdelkarim A (2006) Comprehensive modeling of mat density effect on duckweed *Lemna minor* growth under controlled eutrophication. *Water Research* 40: 2901-2910.
- Garric J, Ferrari B (2005) Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques. Niveaux d'exposition et effet biologique. *Revue des sciences de l'eau* 18(3):307-30

- Gaujous D (1999) La pollution des milieux aquatique, aide-mémoire, 2<sup>ème</sup> éditions, édition TEC & DOC, Lavoisier, Paris, 220 pages.
- Ghosh A, Dastidar MG, Sreerishnan TR (2017) Bioremediation of chromium complex dyes and treatment of sludge generated during the process. *International Biodeterioration & Biodegradation* 119:448-460.
- Gong R, Ding Y, Liu H, Chen Q, & Liu Z (2005) Lead biosorption and desorption by intact and pretreated spirulina maxima biomass. *Chemosphere* 58(1):125-130.
- Goncalves JF, Becker AG, Cargnelutti D, Tabaldi AL, Pereira LB, Battisti V, Spanevello RM, Morsch VM, Nicoloso FT, Schetinger MRC (2007) Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 223-232.
- Gilden RC, Huffling K, & Sattler B (2010) Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing* 39(1):103-110.
- Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Characterization and measurement of anthocyanins by UV visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry* (1): F1-2.
- Glass DJ (1999) Current market trends in phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 1: (1), 1-8.
- Grosclaude G (1999) L'eau, usages et polluants, tome 2, édition INRA, Paris, 203 pages.
- Graid A (1984) Épuration biologique des eaux usées urbaines, édition OPU Algérie, tome 1, Alger, 261 pages.
- Guergour S (2014) Elimination des polluants organiques contenus dans les eaux usées par Electro-Fenton. *Memoire de magister, Ferhat Abbas-Setif-1 UFAS (Algérie)*, 117 pages.
- Gulnaz O, Kaya A, Dincer S (2006) the reuse of dried activated sludge for adsorption of reactive dye. *Journal of Hazardous Materials* 134: 190-196.
- Guo D, Zhang X, Shi Y, Cui B, Fan J, Ji B, Yuan J (2020) Microalgal-bacterial granular sludge process outperformed aerobic granular sludge process in municipal wastewater treatment with less carbon dioxide emissions. *Environmental Science and Pollution Research* 28(11):13616-13623.
- Guiraud JP (2012) *Microbiologie alimentaire*, Paris : Dunod, 576 pages.
- Haddad M, Abid S, Hamdi M, Bouallagui H (2018) Reduction of adsorbed dyes content in the discharged sludge coming from an industrial textile wastewater treatment plant using aerobic activated sludge process. *Journal of Environmental Management* 223: 936-946.
- Haguenoer JM (2008) *Médicaments et eaux*. Rapport de l'Académie Nationale de Pharmacie, 105 p. <http://www.acadpharm.org>.
- Haluch KR, Wozniakiewicz T (2011) Microscopic analysis of activated sludge and its role in control of technological process of wastewater treatment. *Tech. Trans Environ Eng* 2:41-162.
- Hao OJ, Kim H, Chiang PC (2000) Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30 (4):449-505.

- Hberra I** (2014) Biosorption du colorant textile Marine Cibanone par la biomasse sèche de lentilles d'eau. Mémoire de master, Université Badji mokhtar –Annaba (Algérie).
- Hakeem KR, Sabir M, Öztürk M, Mermut AR** (eds) Soil remediation and plants. Academic Press, San Diego, pp 255-285.
- Hamada E, Oshima N, Suzuki T, Kobayashi H, Kondo K and Kanazawa I** (1998) Development of a pulsed slow-positron beam using a radioisotope, In: Proceedings of the 12th. Workshop on Radiation Detectors and Their Uses (No. KEK-PROC--93-8). National Lab. for High Energy Physics pages 172-158.
- Hamidou KO** (2008) Influence des rejets industriels sur la pollution des eaux à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). Mémoire d'études Approfondies en Gestion Intégrée des Ressources Naturelle, Université polytechnique de Bobo-Dioulasso (U.P.B) Burkina Faso, 78 pages.
- Hammami S** (2008) Etude de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée : application à la dépollution des rejets industriels. Université Paris Est (France) et Université d'El Manar (Tunis), 208 pages.
- Hansen D, Duda PJ, Zayed A, Terry N** 1998 Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. Environmental science and technology 32:591-97.
- Harazono K, et Nakamura K** (2005) Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the whiterot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. Chemosphere 59:6368.
- Harrlekas F** (2008) Etude ces Couplage des procédés membranaires aux techniques physico-chimiques ou biologique pour le traitement des rejets liquides de l'industrie de textile. Thèse de Doctorat, Université de Marrakech (Maroc), 178 pages.
- Haya S** (2009) Élaboration d'un nanomatériau mésoporeux de type NANORODS à base de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>), et sa mise en œuvre dans un procédé d'élimination photocatalytique des polluants organiques (PCP, MO, CV). Mémoire de Magister, Université Badji Mokhtar Annaba, (Algérie), 134 pages.
- Henke R, Eberius M, Appenroth K-J** (2011) Induction of frond abscission by metals and other toxic compounds in *Lemna minor*. Aquatic Toxicology 101(1):261–265.
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, Fujita M, Fotopoulos V** (2020) Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. Antioxidants (Basel) 29; 9 (8):681.
- Hitz HR, Huber W, Rud RH** (1978) the adsorption of dyes by activated sludge Journal of the Society of Dyers and Colourists 94:71-76.
- Hillman WS** (1961) The Lemnaceae or Duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. Botanical Review 27: 221-287.

- Hillman WS, Culley DD (1978). Les utilisations de la lenticule. *Scientifique Américain* 66: 442-451.
- Hocini I, Khellaf N, Benabbas K, Djelal H, Amrane A (2020) Identification of the Mechanism Involved in the Removal Potential of Textile Pollutants by the Aquatic Plant *Lemna gibba* L. *Journal of Chemical Health Risks* 10(2): 145-153.
- Hocini I, Benabbas K, Khellaf N, Djelal H, Amrane A (2019) Can duckweed be used for the biomonitoring of textile effluents. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration* 4 (1).
- Horne AJ (2000) Phytoremediation by constructed wetlands. In *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, ed. N Terry, G Banuelos, pp. 13–40. Boca Raton: Lewis.
- Huang L, Zha K, Namuangruk S, Junkaew A, Zhao X, Li H, Zhang D (2016) Promotional effect of the TiO<sub>2</sub> (001) facet in the selective catalytic reduction of NO with NH<sub>3</sub> in situ DRIFTS and DFT studies. *Catalysis Science & Technology* 6:8516–8524.
- I.C.E.D.D Institut de Conseil et d'Etudes en Développement Durable ASBL (2007) Situation environnementale des industries, Industrie textile et de l'habillement, du cuir et de la chaussure, Rapport textile, 96 pages.
- Imron MF, Kurniawan SB, Soegianto A, Wahyudianto FE (2019) Phytoremediation of methylene blue using duckweed (*Lemna minor*). *Heliyon* 5(8): e02206.
- I.S.O (Organisation Internationale de Normalisation), Water Quality (2001) Determination of the toxic effect of water constituents and wastewater to duckweed (*Lemna minor*). Duckweed growth inhibition test.
- I.T.M.F International textile manufacturer's federation – international textile shipment statistics, vol.14, 1991.
- Ito T, Adachi Y, Yamanashi Y, Shimada Y (2016) Long-term natural remediation process in textile dye-polluted river sediment driven by bacterial community changes. *Water Research* 100 :458-465.
- Jinqi L, Houtian L (1992) Degradation of azo dyes by algae. *Environmental Pollution* 75:273-278.
- J.O.R.A (2006) Journal Officiel de la République Algérienne. Décret N° 06-141 du 23 avril 2006. Définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels.
- Jung R, Steinle D, Anliker R (1992) A compilation of genotoxicity and carcinogenicity Data on aromatic aminosulphonic acids, *Food Chemical. Toxicology* 30:635-660.
- Joshi B, Kabariya K, Nakrani S, Khan A, Parabia F M, Doshi H V, Thakur M C (2013) Biodegradation of Turquoise Blue Dye by *Bacillus Megaterium* Isolated from Industrial Effluent. *American Journal of Environmental Protection* 1(2): 42-47.
- Kabra AN, Khandare RV, Kurade MB, Govindwar SP (2011) Phytoremediation of a sulphonated azo dye Green HE4B by *Glandularia pulchella* (Sweet) Tronc. (Moss Verbena). *Environmental Science and Pollution Research* 18(8): 1360-1373.

- Kadlec RH, Bevis FB (2009)** Wastewater treatment at the Houghton Lake wetland: vegetation response. *Ecological engineering* 35: 1312–1332.
- Kanagaraj J, Senthilvelan T, Panda R C (2014)** Biodegradation of azo dyes in industrial effluent: an eco-friendly way toward green technology. *Clean Technologies and Environmental Policy* 17(2):331-341.
- Kanbouchi I, Souabi S, Chtaini A, Aboulhassan MA (2013)** Anaerobic-aerobic treatment of textile wastewater in a sequencing batch reactor, *Scientific Study and Research. Chemical Engineering and Chemistry* 14(4):207-220.
- Kanungo R, Paniker A (2017)** Textbook of Microbiology, tenth edition, universities press, 725 pages.
- Kassinou FD, Meric, S, Nikolaou A (2011)** Pharmaceuticals residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399: 251-75.
- Kaushal J, Mahajan P, Kaur N (2021)** A review on application of phytoremediation technique for eradication of synthetic dyes by using ornamental plants. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Kaushik G, Gopal M, et Thakur I (2010)** Evaluation of performance and community dynamics of microorganisms during treatment of distillery spent wash in a three stage bioreactor. *Bioresource Technology* 101:4296-4305.
- Kebiche O (1996)** Biodégradabilité, absorbabilité et échange ionique de quelques colorants cationiques présents dans les effluents liquides de la teinturerie de l'unité couverte d'Ain.
- Kerdoud D (2005)** Préparation par électrochimie et CVD ultrasonore de couches de  $TiO_2$  en vue de la dépollution de l'eau étude cristallographique et électrochimique. Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine, (Algérie), 116 pages.
- Keller C, Hammer D, Kayser A, Richner W, Brodbeck M, & Sennhauser M (2003)**. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant and Soil* 249:67-81.
- Kent K, Weston AA, Caminada D (2006)** Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76:122-59.
- Kertész FI, Kungléné-Nagy Z, Gruiz K (2015)** Assessing toxicity of organic aquatic micropollutants based on the Total chlorophyll content of *Lemna minor* as a sensitive endpoint. *Period. Polytech. Chemical Engineering* 59:262-271.
- Khaled B, Nassira Z, Imene H (2020)** Eco-friendly synthesis of self-regenerative low-cost biosorbent by the incorporation of CuO: a photocatalyst sensitive to visible light irradiation for azo dye removal. *Environmental Science and Pollution Research* 27:31074-31091.
- Khataee AR, Dehghan G, Ebadi A, Zarei M., Pourhassan M (2010)** Biological treatment of a dye solution by *Macroalgae Charasp* : Effect of operational parameters, intermediates identification

and artificial neural network modeling. *Bioresource Technology* 101: 2252-2258.

**Khataee AR, Movafeghi A, Torbati S, Lisar SYS, Zarei M (2012)** Phytoremediation potential of duckweed (*Lemna minor* L) in degradation of CI Acid Blue 92: artificial neural network modeling. *Ecotoxicology and environmental safety*80:291–298.

**Khataee AR, Movafeghi A, Vafaei F, Lisar SYS, Zarei M (2013)** Potential of the aquatic fern *Azolla filiculoides* in biodegradation of an azodye: modeling of experimental results by artificial neural networks. *International Journal of Phytoremediation*15:729–742.

**Khataee AR, Zarei M, Dehghan G, Ebadi E, Pourhassan M, (2011)** Biotreatment of a triphenylmethane dye solution using a Xanthophyta alga: modeling of key factors by neural network . *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 42: 380–386.

**Khellaf N (2010)** Tolérance aux métaux Cd, Cu, Ni et Zn chez les lentilles d'eau- Application à la phytoremédiation de Zn par l'espèce aquatique *L.gibba*. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, (Algérie), 147 pages.

**Khellaf N, Djelal H, Amrane A, Carbrol A (2018)** Biostimulation to Improve the Dye Biodegradation of Organic Dyes by Activated Sludge. *Journal of Chemical Health Risks* 7(4):247-258.

**Khellaf N, Zerdaoui M (2013)** Phytoaccumulation of zinc by the duckweed, *L.gibba*L: Effect of temperature, pH and metal source. *Desalination and Water Treatment*51:5755-5760.

**Khellaf N, Zerdaoui M (2009a)** Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution. *Iranian Journal of Environmental Health Science And Engineering* 6, 3:161-166.

**Khellaf N, Zerdaoui M (2009b)** Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L. *Bioresource Technology* 100 (23): 6137–6140.

**Kodam KM, Kolekar YM (2015)** Bacterial Degradation of Textile Dyes, *Microbial Degradation of Synthetic Dyes. Wastewaters, Environmental Science and Engineering*, Springer International Publishing Switzerland 243-266.

**Koller E (2004)** Traitement des boues issues de l'épuration. In *Traitement des pollutions industrielles. Technique et ingénierie*, Dunod, Paris, 115 pages.

**Koller E (2009)** *Traitement des pollutions industrielles, Eau, Air, Déchets, Sols, Boues*, 2ème édition, Dunod, 569 pages.

**Krishnan J, Kishore AA, Suresh A, Madhumeetha B, Gnana Prakash D (2016)** Effect of pH inoculum dose and initial dye concentration on the removal of azo dye mixture under aerobic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 119:16-27.

**Kumar N, Jeena N, Kumar N, Gangola S, Singh H (2019)** Phytoremediation facilitating enzymes: an enzymatic approach for enhancing remediation process. *Smart Bioremediation Technologies* 289-306.

**Kumar S, Kumar S, Mohapatra T (2021)** Interaction between Macro and Micro Nutrients in Plants. *Frontiers in Plant Science* 12:665583.

- Kuzovkina YA, Volk TA (2009) the characterization of willow (*salix L.*) varieties for use in ecological engineering applications: Co-ordination of structure, function and autecology. *Ecological Engineering* 35:1178-1189.
- Labardi F, Arjald J (2015) Diagnostic et calcul de la charge polluante de la zone industrielle «Oukacha-ain sebaa». Mémoire de fin d'étude. Université Cadi Ayyad, Marrakech (Maroc), 39 pages.
- Landolt E (1992) Lemnaceae duckweed family. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science* 10-14.
- Landolt E (1998) Lemnaceae. In *Flowering Plants· Monocotyledons* (pp. 264-270). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lauwerys (1982) *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. Ed. Masson, Paris, 1<sup>ière</sup> édition, 134 pages.
- Lauwerys (1992) *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. Ed. Masson, Paris, 2<sup>ème</sup> édition, 679 pages.
- Levet D (2008) *Guide pratique des substances toxiques dans les eaux douces et littorales*. Dépôt légal : éditions AESN, 276 pages.
- Lebihan Y, Martinage V, Lessard P, Paul E (2001) Influence possible des protozoaires sur le taux de mortalité des bactéries autotrophes nitrifiantes. *Revue Des Sciences de L'eau* 14(1):91.
- Lee TH (1996) Removal of reactive dyes from aqueous solution by different bacterial genera. *Water Science and Technology* 34(10): 89-95.
- Leszkowicz AP (2014) Évaluation de la toxicité de produits pharmaceutiques relargués dans les effluents. Université de Toulouse (France), 78 pages.
- Lin H F, Ravikrishna R, Valsaraj K T (2002) *Separation and Purification Technology*, 28:87-102.
- Liang YH, Li D, Zhang XJ, Zeng HP, Yang Z, Cui SM, Zhang J (2014) Nitrogen removal and microbial characteristics in CANON biofilters fed with different ammonia levels. *Bioresource Technology* 171:168-174.
- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1(1): F4.3.1-F4.3.8.
- Liu J, Meeprasert J, Namuangruk S, Zha K, Li H, Huang L, Maitarad P, Shi L, Zhang D (2017) Facet-activity relationship of TiO<sub>2</sub> in Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> nanocatalysts for selective catalytic reduction of NO with NH<sub>3</sub>: In Situ DRIFTS and DFT Studies. *Journal of Physical Chemistry* 121:4970–4979.
- Lodato A, Alfieri F, Olivieri G, Donato A Di, Marzocchella A, Salatino P (2007) Azo-dye conversion by means of *Pseudomonas sp. OX1*, *Enzyme and Microbial Technology* 41:646-652.
- Lundahl P (1974) Contribution à l'étude de la pollution des eaux par les substances toxiques; propriétés biologiques de quelques agents de surface anioniques.

- Lytle CM, Lytle FW, Yang N, Qian JH, Hansen D, Zayed A, Terry N (1998) Reduction of Cr (VI) to Cr (III) by wetland plants: potential for in situ heavy metal detoxification. *Environmental Science & Technology* 32:3087-3093.
- Magdalena VM, Pignata ML, Wunderlin DA (2012) Enhanced phytoextraction of chromium by the aquatic macrophytes *Potamogeton pusillus* in presence of copper. *Environmental Pollution* 161:15-22.
- Mahajan P, Kaushal J (2020) Phytoremediation of azo dye methylred by macroalgae *Chara Vulgaris* L.: kinetic and equilibrium studies. *Environmental Science and Pollution Research* 27:26406-26418.
- Maitrad P, Meeprasert J, Shi L, Limtrakul J, Zhang D, Namuangruk S (2016) Mechanistic insight into the selective catalytic reduction of NO by NH<sub>3</sub> over low-valent titanium- porphyrin: A DFT study. *Catalysis Science & Technology* 6:3878–3885.
- Mamirova A, Pidlisnyuk V, Amirbekov A, Ševců A, Nurzhanova A (2020) Phytoremediation potential of *Miscanthus sinensis* and in organochlorine pesticides contaminated soil amended by Tween 20 and Activated carbon. *Environmental Science and Pollution Research* 28(1):1-15.
- Manahan SE (1994) *Environmental chemistry*. Lewis publishing, 6ème édition, Atlanta, GA, USA.
- Massy ST, Barthélémy A, Darraud, C (2004) Contribution à la réalisation de fonctions optiques à base de cristaux photoniques sur LiNbO<sub>3</sub>. Thèse de doctorat, Université Limoges (France), 176 pages.
- Martins G (2012) Communautés microbiennes de la baie de raisin, Incidence des facteurs biotiques et abiotiques. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 2, 289 pages.
- Mazur R, Szoszkiewicz K, Lewicki P, Bedla D (2018) The use of computer image analysis in a *Lemna minor* L. bioassay. *Hydrobiologia* 812(1):193–201.
- Mccutcheon SC, Schnoor JL (2003) Overview of phytotransformation and control of wastes In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, ed. SC McCutcheon, L'Schnoor, pp. 3–58. New York:Wiley.
- Meink F, Gasser A, & Colas R (1977) *Les eaux résiduaires industrielles*, Masson 2ème édition, pages 14-15.
- Mkandawire K, Taubert B, Dudel EG (2006) Limitations of growth parameters in *Lemna gibba* bioassays for arsenic and uranium under variable phosphate availability. *Ecotoxicology and environmental safety* 65:118–128.
- Merouani DR (2011) Traitement de colorants azoïques et anthraquinoniques par procédés d'oxydation avancée (POA). Thèse de Doctorat, Université de Lille (France) et Université de Mostaganem (Algérie), 202 pages.
- Mersch J (1993) Modalités d'utilisation de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* en tant qu'indicateur biologique de la contamination des écosystèmes d'eau douce par les métaux lourds

comparaison avec un autre type d'organismes sentinelles, les mousses aquatiques. Université de Metz (France), 213 pages.

**Merzoug N** (2014) Application des tiges de dattes dans l'adsorption de polluants organiques. Mémoire de Magister, Université Mohamed Cherif Massaadia Souk-Ahras (Algérie), 104 pages.

**Mesquita DO, Amaral AL, Ferreira EC** (2013) Activated sludge characterization through microscopy: A review on quantitative image analysis and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta* 802:14-28.

**Metahri M** (2012) Elimination simultané de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitées par des procédés mixte cas de la STEP Est de la ville de Tizi-Ouzou. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Maamri de Tizi Ouzou (Algérie), 138 pages.

**Milano J C, Loste-Berdot P, & Vernet J L** (1995) Photooxydation du Vert de Malachite en Milieu Aqueux en Presence de Peroxyde D'Hydrogene: Cinétique et Mécanisme Photooxydation of Malachite Green in Aqueous Medium in the Presence of Hydrogen Peroxide: Kinetic and Mechanism. *Environmental technology* 16(4):329-341.

**Miquel G** (2003) La qualité de l'eau et de l'assainissement en France, édition sénat pp 254-256.

**More TT, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY** (2012) Applications of Membrane Processes for Concentrated Industrial Wastewater Treatment, in: *Membrane Technology and Environmental Applications*. American Society of Civil Engineers 217-238.

**Morikawa H, Erkin ÖC** (2003) Basic processes in phytoremediation and some applications to air pollution control. *Chemosphere* 52:1553-1558.

**Movafeghi A, Khataee AR, Moradi Z, Vafaei F** (2016) Biodegradation of direct blue 129 diazo dye by *Spirodela polyrrhiza*: An artificial neural networks modeling. *International Journal of Phytoremediation* 18(4): 337-347.

**Muthusaravanan S, Sivarajasekar N, Vivek JS** (2018a) Phytoremediation of heavy metals: mechanisms, methods and enhancements. *Environmental Chemistry Letters* 16:1339-1359.

**Muthusaravanan S, Sivarajasekar N, Vivek JS, Paramasivan T, Naushad M, Prakashmaran J, Gayathri V, Al-Duaij OK** (2018b) Phytoremediation of heavy metals: mechanisms, methods and enhancements. *Environmental Chemistry Letters* 16:1339-1359.

N.A.S.N.R.C. National Academy of Science/National Research Council, Washington (1989) Recommended dietary allowances.

**Nabih Z** (2013) Apport de la chimiométrie pour l'analyse et l'interprétation de quelques paramètres physicochimiques influençant la répartition des métaux lourds, des éléments nutritifs et des anions dans les eaux de l'oued de Bouregreg. Thèse de doctorat, Université Mohammed V- Rabat (Maroc), 149 pages.

**Namasivayam C, Thamaraiselvi K, Yamun RJ** (1994) Removal of paraquat by adsorption on 'waste' Fe (III)/Cr (III) hydroxide: adsorption rates and equilibrium studies. *Journal of Pest Science* 41:7-12.

- Negri MC, Hinchman RR (2000) the use of plants for the treatment of radionuclides. In Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to clean up the Environment, Ed. I Raskin, BDEnsley, pp. 107–32. New York:Wiley.
- Nigam P, Banat IM, Singh D, Marchant R (1996) Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochemistry* 31:435-442.
- Nilles AB (2008) Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins. Thèse de Doctorat, Université de la Rochelle (France), 227 pages.
- Nilratnisakorn S, Thiravetyan P, Nakbanpote W (2007) Synthetic reactive dye wastewater treatment by narrow-leaved cattails (*Typha angustifolia* Linn): Effects of dye, salinity and metals. *Science of the Total Environment* 384(1-3): 67-76.
- Njambuya J, Stiers I, Triest L (2011) Competition between *Lemna minuta* and *Lemna minor* at different nutrient concentrations. *Aquatic Botany* 94: 158–164.
- Nriagu JO (1979) Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature* 279 (5712):409-411.
- Nouren S, Bhatti HN, Iqbal M, Bibi I, Kamal S, Sadaf S, Sultan M, Kausar A, Safa Y (2017) By-product identification and phytotoxicity of biodegraded Direct Yellow 4 dye. *Chemosphere* 169:474-484.
- O.C.D.E Organisation de coopération et de développement économiques (2006). Test No. 221: Lemna sp. growth inhibition test. Organisation de coopération et de développement économiques.
- O.C.D.E Publication de la Direction de l'environnement de l'OCDE (2002) Document d'orientation pour l'utilisation du système harmonisé de classification des produits chimiques dangereux pour l'environnement aquatique. Série de l'OCDE N° 27.
- Ogugbue CJ, Sawidis T (2011) Bioremediation and Detoxification of Synthetic Waste water Containing Triarylmethane Dyes by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Industrial Effluent. *Biotechnology Research International* 1-11.
- O.I.E (Office International de l'Eau) (1984) Plantes aquatiques utiles ; les lentilles d'eau ou lemnacée. Ed. Tec & doc, Lavoisier France, p 69.
- Olson PE, Reardon KF, Pilon-Smits EAH (2003) Ecology of rhizosphere bioremediation. *Phytoremediation transformation and control of contaminants* 317-354.
- Omernik J M (1977) Nonpoint source--stream nutrient level relationships: a nationwide study (Vol. 1). Corvallis Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency.
- O.N.A Office National de L'assainissement (2012) Fiche technique de la station d'épuration des eaux usées urbaines de la ville d'Annaba. Accessible sur : <https://www.ona-dz.org/Reutilisation-des-eaux-epureeset.html>.
- Pagga U, et Brown D (1986) The degradation of dyestuffs part II: behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* 15:479-491.

- Pal A, Gin KY, Reinhard M (2010) Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment* 408:6062-6069.
- Pandolfi D, Pons MN (2004) Gram-staining characterisation of activated sludge filamentous bacteria by automated colour analysis. *Biotechnology Letters* 26(24):1841-1846.
- Parmar ND, Shukla SR (2017) Biodegradation of anthraquinone based dye using an isolated strain *Staphylococcus hominis* sp. *hominis* DSM 20328. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 37(1):203214.
- Pearce CI, Lloyd JR, Guthrie JT (2003) The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes Pigments* 58:179-196.
- Perrodin Y, Boillot C, Angerville R, Donguy G, Emmanuel E (2011) Ecological risk assessment of urban and industrial systems: A review. *Science of the Total Environment* 409(24):5162-5176.
- Phillips DJH, Rainbow PS (1994) *Bio monitoring of trace aquatic contaminants*, Aldenn Press Ltd, Oxford.
- Piadeh F, Moghaddam MRA, Mardan S (2014). Present situation of wastewater treatment in the Iranian industrial estates: Recycle and reuse as a solution for achieving goals of eco-industrial parks. *Resources, Conservation & Recycling* 92:172–178.
- Pilonis E (2005) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biology* 56: 15-39.
- Plechovka L, Klink A (2014) Trace metal bioindication and phytoremediation potentialities of *Phalaris Arundinacea* L. (reed canary grass). *Journal of Geochemical Exploration* 146: 27-33.
- Pommerville JC (2011) *Alcarno's fundamentals of microbiology*, Ninth edition, Jones and Bartlett publishers, 915 pages.
- Poots VJP, McKay G, Heal JJ (1978) Removal of acid dye from effluent natural an adsorbent II. *Journal of Water Wood Research* 10:926-935.
- Porter JJ, Snyder EH (1976) Long-term biodegradability of textile chemicals. *Journal (Water Pollution Control Federation)* 48(9):2198-210.
- Pratas J, Paulo C, Favas PJC, Venkatachalam P (2014) Potential of aquatic plants for phytofiltration of uranium-contaminated waters in laboratory conditions. *Ecological Engineering* 69:170-176.
- Quezel P, Santa S (1962). *New flora of Algeria and southern desert regions*. New flora of Algeria and southern desert regions.
- Radie S, Stipanicev D, Cvjetko P, Marijanovic Rajcic M, Sirac S, Pevalek-Kozlina B, et Pavlica M (2011) Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 182-187.

- Rais A, Rajeev K (2010)** Adsorptive removal of congo red dye from aqueous solution using bael shell carbon. *Applied Surface Science* 257:1628-1633.
- Ramade F (1992)** Précis d'écotoxicologie. Tec et Doc, Paris.
- Ramvalho PA, Scholze H, Card Oso MH, Ramalho MT, et Oliveira Camp Os AM (2002)** Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. *Enzyme and Microbial Technology* 31:848-854.
- Ramalho DCF (2005)** Degradation of dyes with microorganisms studies with Ascomycete yeasts. Université de Minho (Portugal), pages 14.
- Rejsek F (2002)** Analyse des eaux, aspects réglementaires et techniques, Canopé - CRDP de Bordeaux, 360 pages.
- Reema RM, Saravanan P, Kumar MD, Renganathan S (2011)** Accumulation of methylene blue dye by growing *Lemna minor*. *Separation Science and Technology* 46:1052–1058.
- Renou S (2006)** Analyse de cycle de vie appliquée aux systèmes de traitement des eaux usées. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine (spécialité Génie des Procédés et des Produits), Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (France), 261 pages.
- Robinson T, McMullan G, Marchant R, et Nigam P (2001)** Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77:247-255.
- Robert D, Parra S, Pulgarin C, Krzton A, Weber JV (2000)** Chemisorption of phenols and acids on TiO<sub>2</sub> surface. *Applied Surface Science* 167:51-58.
- Rodier J, Legube B, Merlet N (2009)** L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eau résiduaires, eaux de mer, 8<sup>ème</sup> édition, DUNOD, Paris, 1526 pages.
- Rosenkranz HS, Klopman G (1990)** Structural basis of the mutagenicity of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes, *Mutagenesis* 5 (2):137-146.
- Rough CL, Wilde HD, Stack NM, Thompson DM, Summers AO, Meagher RB (1996)** Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial merA gene. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 3182-87.
- Saba B, Khalid A, Nazir A, Kanwal H, Mahmood T (2013)** Reactive black-5 azo dye treatment in suspended and attach growth sequencing batch bioreactor using different co-substrates. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85: 556-562.
- Salhi K (2015)** Etude de la dégradation des milieux aquatiques par différents types de rejets. Mémoire de fin d'étude. Université des Frères Mentouri Constantine (Algérie), 48 pages.
- Salido AL, Hasty KL, Lim JM, Butcher DJ (2003)** Phytoremediation of arsenic and lead in contaminated soil using Chinese brake ferns (*Pteris vittata*) and Indian mustard (*Brassica juncea*). *International Journal of Phytoremediation* 5:89-103.
- Sanir K, Banerjee UC (1999)** Decolorization of triphenylmethane dyes, textile, and dyestuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme and microbial Technology* 24:433-437.

- Sandmann G, Böger P (1980) Copper deficiency and toxicity in *Scenedesmus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 98(1): 53-59.
- Sanmiguel A (2011) Phytoremédiation des organochlorés. Etude mécanistique et fonctionnelle des capacités épuratrices du système plante-rhizosphère. Thèse de doctorat, Université de Grenoble (France), 314 pages.
- Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP (2011) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 42(1):138-157.
- Sasmaz M, Öbek E, Sasmaz A (2019) Bioaccumulation of cadmium and thallium in Pb-Zn tailing waste water by *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Applied Geochemistry* 100: 287-292.
- Say PJ, Harding JPC, Whitton BA (1981) Aquatic mosses as monitors of heavy metal contamination in the river etherow, Great Britain. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical* 2(4):295–307.
- Scheiber P, Riss A, Schmid M, Varga P, Diebold U (2010) Observation and Destruction of an Elusive Adsorbate with STM:O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>(110). *Physical Review Letters* 105(21):216101.
- Seghezzi L, Zeeman G, van Lier J B, Hamelers H V M, & Lettinga G (1998) A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors. *Bioresource Technology* 65(3):175–190.
- Segura A, Ramos JL (2013) Plant–bacteria interactions in the removal of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology* 24:467-473.
- Servais P (1999) La matière organique dans les milieux naturels. *Presse de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées français*, pages 49.
- Sheng HL, Chi ML (1993) Treatment of textile waste effluents by ozonation and chemical coagulation. *Water Research* 27 (12):1743-1748.
- Shibagaki N, Rose A, McDermott J, Fujiwara T, Hayashi H (2002) Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant Journal* 29:475-86.
- Silva MDCL (2008) Effet de la variabilité du fractionnement de la pollution carbonée sur le comportement des systèmes de traitement des eaux usées par boues activées. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine (France), 208 pages.
- Singh V, Pandey B, Suthar S (2019) Phytotoxicity and degradation of antibiotic of loxacin in duckweed (*Spirodela polyrhiza*) system. *Ecotoxicol Environ Safety* 179: 88-95.
- Sivakumar D, Shankar D, Dhivya P, Balasubramanian K (2014) Bioaccumulation study by *Lemna Gibba* L. *Pollution Research* 33(3): 531-536.
- Sirianuntapiboon S, Srisornsak P (2007) Removal of disperse dyes from textile wastewater using bio sludge. *Bioresource Technology* 98(5):1057-1066.
- Sivakumar D, Shankar D, Dhivya P, Balasubramanian K (2014) Bioaccumulation study by *Lemna gibba*. *Pollution Research* 33(3):531-536.

- Smith AJE (1978) the moss flora of Britain and Ireland. Cambridge University Press, Cambridge, 706 pp.
- Song L, Vijver MG, Peijnenburg WJGM (2015) Comparative toxicity of copper nanoparticles across three *Lemnaceae* species. *Science of the Total Environment* 518–519:217–224.
- Sood A, Pabbi S, Uniyal PL (2011). Effects of Paraquat on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Aquatic Fern *Azolla microphylla*. *Asian Journal of Plant Physiology* 58(4): 667-673.
- Sowinska A, Makowska M (2016) Suspended and immobilized biomass in individual wastewater treatment systems SBR and SBBR. *Desalination and Water Treatment* 57:23610-23621.
- Sowinska A, Pawlak M, Mazurkiewicz J, Pacholska M (2017) Comparison of the Results from Microscopic Tests Concerning the Quality of Activated Sludge and Effluent. *Water* 9(12): 918.
- Specht K, Platzek T (1995) Textile dyes and finishes - Remarks to toxicological and analytical aspects, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 91:352-359.
- Sponza DT, Uluköy A (2005) Treatment of 2, 4-dichlorophenol (DCP) in a sequential anaerobic (upflow anaerobic sludge blanket) aerobic (completely stirred tank) reactor system, *Process Biochemistry* 40(11):3419–3428.
- Sree KS, Keresztes Á, Mueller-Roeber B, Brandt R, Eberius M, Fischer W, Appenroth KJ (2015) Phytotoxicity of cobalt ions on the duckweed *Lemna minor*—morphology, ion uptake, and starch accumulation. *Chemosphere* 131:149–156.
- Srivastava S, Sounderajan S, Udas A, Suprasanna P (2014) Effect of combinations of aquatic plants (*Hydrilla*, *Ceratophyllum*, *Eichornia*, *Lemna* and *Wolffia*) on arsenic removal in field conditions. *Ecological Engineering* 73: 297-301.
- Starck Z (2005) Plant responses to the abiotic environmental stresses – acclimatization and adaptation. *Łakarstwo w Polsce* 8:173-184.
- Stoker HS, Seager SL (1977) Organic Chemical Pollution: Petroleum, Pesticides, and Detergents. *Environmental Chemistry* 401-427.
- Stolte M, Vieth M (2001) Fondement histopathologique des modifications de la muqueuse œsophagienne. Ce que l'endoscopiste peut (et doit) voir. *Acta endoscopica* 31:125–129.
- Sudarjanto G, Keller-Lehmann B, Keller J (2006) Optimization of integrated chemical–biological degradation of a reactive azo dye using response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials* 138(1):160-168.
- Susarla S, Medina VF, McCutcheon SC (2002) Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18: 647-658.
- Suschka J, Ferreira E (1986) Activated sludge respirometric measurement. *Water research* 20(2): 137-144.
- Swam J, Ramsa JA (1999) Effects of glucose and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 25:278-284.

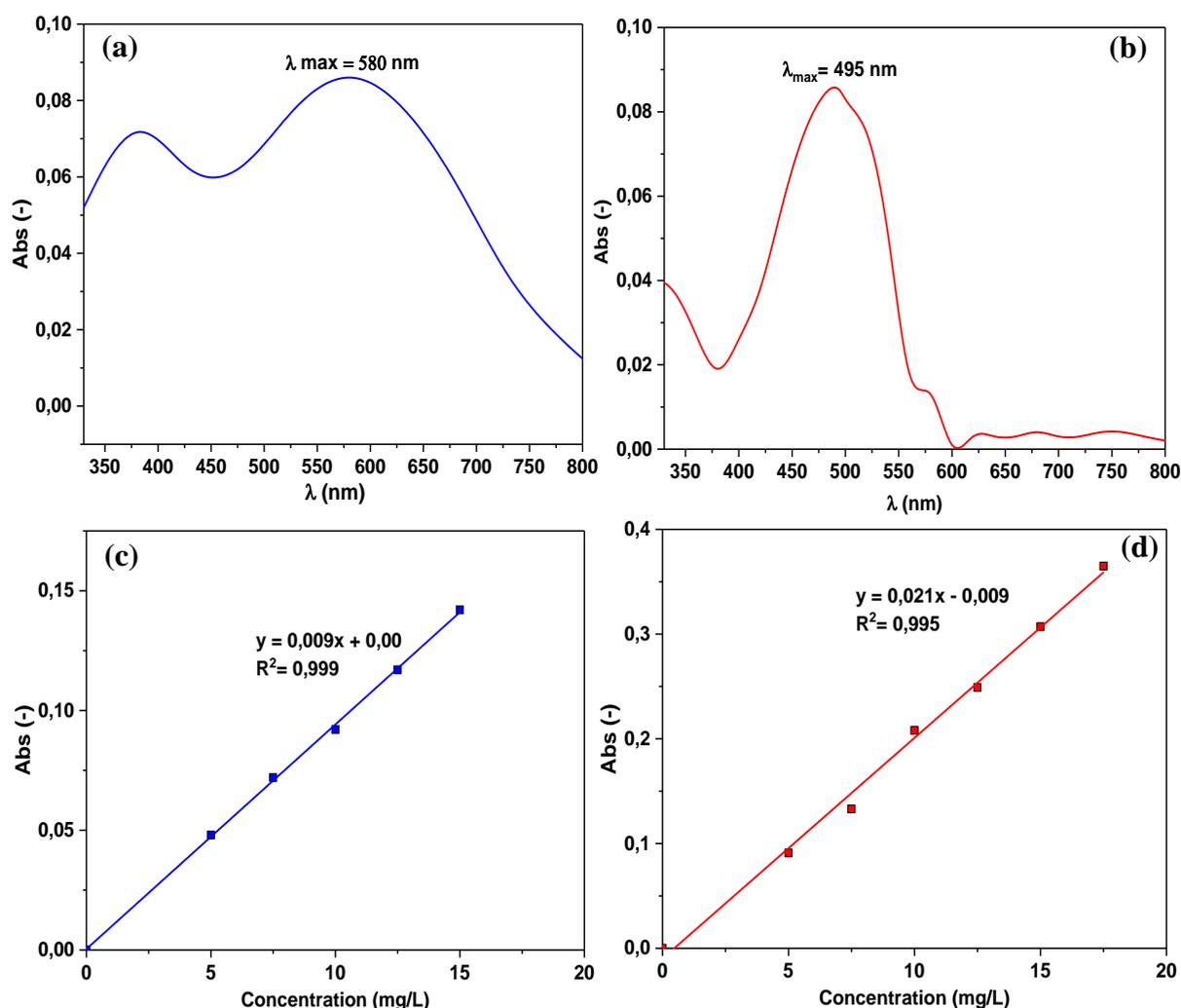
- Thomas O (1995) *Métrieologie des eaux résiduaaires*, édition Cebedoc, 192 pages.
- Tchobanoglous G, Franklin L, Burton H, Stensel D (2003) *Wastewater engineering: treatment and reuse* I Metcalf & Eddy, Inc. - 4th ed.
- Tomei MC, Angelucci DM, Daugulis AJ (2016) Sequential anaerobic- aerobic decolourization of a real textile wastewater in a two-phase partitioning bioreactor. *Science of the Total Environment* 573:585–593.
- Török A, Buta E, Indolean C, Tonk S, Silaghi-Dumitrescu L, Majdik C (2015) Biological removal of triphenylmethane dyes from aqueous solution by *Lemna minor*. *Acta Chimica Slovenica*. 62(2): 452-61. doi: 10.17344/acsi.2014.1109.
- Trapp S, McFarlane C (1994). *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Processes*. Boca Raton, FL: Lewis. 254 pp.
- Triquet AC, Amiard-Triquet C, et Metayer C (1982) Distribution de quelques métaux (Cd, Pb, Cu, Zn) chez les organismes vivants de l'estuaire de la Loire et des zones côtières adjacentes.
- Turgay O, Ersoz G, Atlay S, Forss J, Welander U (2011) The treatment of azo dyes found in textile industry wastewater by anaerobic biological method and chemical oxidation. *Separation and Purification Technology* 79(8):26-33.
- U.N.E.S.C.O (2019) *Rapport mondial des Nations Unies sur la mise en valeur des ressources en eau*.
- Vafaei F, Khataee AR, Movafeghi A, Lisar SYS, Zarei M (2012) Bioremoval of an azo dye by *Azolla filiculoides*: Study of growth photosynthetic pigments and antioxidant enzymes status. *International Biodeterioration & Biodegradation* 75:194-200.
- Vandevivere PC, Bianchi R, Verstraete W (1998) Treatment and Reuse of Wastewater from the Textile Wet-Processing Industry: Review of Emerging Technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 72:289-302.
- Vilaginés R (2010) *Eau, environnement et santé publique*, 3eme édition, édition TEC & DOC Lavoisier, paris, 217 pages.
- Vilaseca M, Gutiérrez MC, López-Grimau V, López-Mesas M, Crespi, M (2010) Biological Treatment of a Textile Effluent After Electro chemical Oxidation of Reactive Dyes. *Water Environment Research* 82(2):176–182.
- Vray F, Baudin JP, et Svadlenkova M (1992) Effects of some factors on uptake and release of ruthenium-106 by a freshwater moss, *Platyhypnidium riparioides*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23(2):190-197.
- Walker GM, Weatherley LR (2001) COD removal from textile industry effluent: pilot plant studies. *Chemical Engineering Journal* 84:125-131.
- Walsh G E, Bahner L H, & Horning W B (1980) Toxicity of textile mill effluents to freshwater and estuarine algae, crustaceans and fishes. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* 21(3):169-179.

- Wang M, Shen Q, Xu G, Guo S (2014) New insight into the strategy for nitrogen metabolism in plant cells. *International Review of Cell and Molecular Biology* 310:1-37.
- Wang M, Zheng Q, Shen Q, Guo S (2013) The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences* 14:7370-7390.
- Wang X, Xia K, Yang X, Tang C (2019) Growth strategy of microbes on mixed carbon sources. *Nature Commun* 10: 1279.
- Weber E, Wolfe NL (1987) Kinetic studies of reduction of aromatic azo compounds in anaerobic sediment/water systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6:911-920.
- Wehr JD et Whitton BA (1983) Accumulation of heavy metals by aquatic mosses. 3: Seasonal changes. *Hydrobiologia* 100:285-291.
- Wiersema JH (2015) Application of the name *Lemna punctata* G. Mey., the type of *Landoltia* Les & DJ Crawford. *Plant Biology* 17: 5-9.
- Wilén BM, Lumley D, Mattsson A, Mino T (2008) Relationship between floc composition and floc-culation and settling properties studied at a full scale activated sludge plant. *Water Research* 42(16):4404-4418.
- Willmott, NJ Guthrie JT, et Nels, on G (1998) The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. *Journal of the Society of Dyers and Colourists* 114:38-41.
- Winnike-McMillan SK, Zhang Q, Davis LC, Erickson LE, Schnoor JL (2003) Phytoremediation of methyl tertiary-butyl ether. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, ed. SC McCutcheon, JL Schnoor, pp. 805–28. New York: Wiley.
- Whitton BA, Say PJ, Jupp BP (1982) Accumulation of zinc, cadmium and lead by the aquatic liverwort *Scapania*. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical* 3(4):299-316.
- Woodard F (2001) *Industrial waste treatment Handbook*, Woodard & Curraned, Waste Management. Butterworth–Heinemann, United States of America.
- Wun JNG (2006) *Industrial Wastewater Treatment*, World Scientific Publishing Company.
- Yan X, Yang J, Guo D, Ma J, Su X, Sun J (2021) Effect of carbon source of nitrous oxide emission characteristics and sludge properties during anoxic/aerobic wastewater treatment process. *Environmental Science and Pollution Research* 28:57557-57568.
- Yang Y, Nakada N, Tanaka H (2013) Adsorption of fullerene nC60 on activated sludge: Kinetics, equilibrium and influencing factors. *Chemical Engineering Journal* 225(1):365-371.
- Yeoh BAG (1995) anaerobic treatment of industrial wastewaters in Malaysia, in: *Post Conference Seminar on Industrial Wastewater Management in Malaysia*, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Yaseen DA, Scholz M (2017) Comparison of experimental ponds for the treatment of dye wastewater under controlled and semi-natural conditions. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 16031-16040.
- Yaseen DA, Scholz M (2018) Treatment of synthetic textile wastewater containing dye mixtures with microcosms. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 1980-1997.

- Yu FY, Li CW, Kang SF (2005) Color dye and DOC removal, and acid generation during Fenton oxidation of dyes. *Environmental Technology* 26:537-544.
- Yuseuf RO, et Sonibare JA (2004) Characterization of textile industries effluents in Kaduna, Nigeria and pollution implications. *Global Nest Journal* 6:212-22.
- Zayed AM, Terry N (1994) Selenium volatilization in roots and shoots - effects of shoot removal and sulfate level. *Journal of Plant Physiology* 143: 8-14.
- Zazouli AM, Mahdavi Y, Bazrafshan E, Balarak D (2014) Phytodegradation potential of bisphenol A from aqueous solution by *Azolla filiculoides*. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 12: 1-5.
- Zeghroud H, Khellaf N, Amrane A, Djelal H, Bouhelassa M, Assadi AA, Rtimi S (2021) Combining photocatalytic process and biological treatment for Reactive Green 12 degradation: optimization, mineralization, and phytotoxicity with seed germination. *Environmental Science and Pollution Research* 28:12490–12499.
- Zhao D, Reddy KR, Kakani VG, Reddy VR (2005) Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis and hyperactive spectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy* 22:391-403.
- Zhao X, Ma J, Ma H, Gao D, Sun Y, Guo C (2018) Removal of polyacrylate in aqueous solution by activated sludge: Characteristics and mechanisms. *Journal of Cleaner Production* 178: 59-66.
- Zhenhu H, Hui C, Feng J, Shoujun Y (2010) Removal of Congo Red from aqueous solution by cattail root. *Journal of Hazardous Materials* 173:292–297.
- Zhou M, Yu Q, Lei L (2008) the preparation and characterization of a graphite–PTFE cathode system for the decolorization of C.I. Acid Red 2. *Dyes and Pigments* 77(1):129-136.
- Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jing G (2008) Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analitica chimica acta* 606: 135-150.
- Zhou W, Apkarian R, Wang ZL, Joy D (2006) Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). In: Zhou W., Wang Z.L. (Eds) *Scanning Microscopy for Nanotechnology*. Springer, New York, NY.

## **LES ANNEXES**

## Annexe A1 :



**Figure A1.** Balayage spectral et courbes d'étalonnage dans l'UV-Vis des colorants

(a, c) MC et (b, d) ES

Le balayage spectral pour les deux produits effectués entre 300 et 900 nm (**Figures A.1a et A.1 b**), a permis de confirmer que les longueurs d'onde d'absorption maximale de MC et ES sont respectivement égales à 580 et 495 nm. Ces deux valeurs seront utilisées pour le dosage ultérieur des deux colorants.

Pour tracer les courbes d'étalonnages des deux colorants, des solutions étalons de concentrations différentes sont analysées à l'aide du spectrophotomètre à la longueur d'onde d'absorption maximale de chaque colorant. On mesure l'absorbance (A) de chaque étalon et on trace la courbe d'étalonnage  $A = f(\text{Concentration})$ . Ces courbes d'étalonnage ont été établies pour des intervalles de concentrations de [0-15 mg/L] et [0-17,5 mg/L], pour les colorants MC et ES respectivement.

Les **Figures A.1c et A.1d** représentent la variation de l'absorbance en fonction de la concentration du colorant pour les deux composés. Les courbes sont linéaires et présentent des coefficients de détermination supérieurs à 0,99. Le domaine de validité de ces analyses correspond à des concentrations inférieures à 15 mg/L.

La détermination de la concentration des colorants MC et ES est effectuée par dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde donnée. On mesure l'absorbance de la solution qui, par étalonnage, permet d'accéder à sa concentration.

## Annexe A2 :

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
1						1 jour						
2			nombre de frondes			concentration	0	50 P + G	50 P seule			
3		concentra	0	50 P + G	50 P seule	$\mu_1$ ( nb des fr/j)	0,223	0,154	0,000			
4		0 jour	12	12	12	$\mu_2$ ( nb des fr/j)	0,223	0,080	0,080			
5		1 jour	15	14	12	$\mu_3$ ( nb des fr/j)	0,154	0,080	0,080			
6			15	13	13	$\mu_j$ moy 1 jour	<b>0,200</b>	<b>0,105</b>	<b>0,053</b>			
7			14	13	13	l'écart type de $\mu$	0,04	0,04	0,05			
8		2 jour	19	17	14	2 jour						
9				19	17	14	$\mu_1$ ( nb des fr/j)	0,230	0,174	0,077		
10			18	17	14	$\mu_2$ ( nb des fr/j)	0,230	0,174	0,077			
11		3 jour	25	21	17	$\mu_3$ ( nb des fr/j)	0,203	0,174	0,077			
12				25	21	17	$\mu_j$ moy 2 jour	<b>0,221</b>	<b>0,174</b>	<b>0,077</b>		
13			26	20	18	l'écart type de $\mu$	0,02	0,00	0,00			
14		4 jour	39	26	20	3 jour						
15				36	26	20	$\mu_1$ ( nb des fr/j)	0,245	0,187	0,116		
16			37	25	20	$\mu_2$ ( nb des fr/j)	0,245	0,187	0,116			
17		5 jour	54	30	23	$\mu_3$ ( nb des fr/j)	0,258	0,170	0,135			
18				49	34	24	$\mu_j$ moy 3 jour	<b>0,249</b>	<b>0,181</b>	<b>0,122</b>		
19			51	32	24	l'écart type de $\mu$	0,01	0,01	0,01			
20		6 jour	75	41	28	4 jour						
21				68	42	28	$\mu_1$ ( nb des fr/j)	0,295	0,193	0,128		
22			73	40	29	$\mu_2$ ( nb des fr/j)	0,275	0,193	0,128			
23		7 jour	105	51	34	$\mu_3$ ( nb des fr/j)	0,282	0,183	0,128			
24				108	52	34	$\mu_j$ moy 4 jour	<b>0,284</b>	<b>0,190</b>	<b>0,128</b>		
25			96	54	33	l'écart type de $\mu$	0,01	0,01	0,00			

**Figure A2.** Le taux de croissance moyen des frondes dans l'expérience témoin (AGRc) nécessaire pour calculer le temps de doublement (Td) du nombre de frondes pour le colorant ES

### Annexe A3 :

		nombre de frondes			concentration			0			50 P + G			50 P seule						
1																				
2																				
3	concentra		0	50 P+G	50	$\mu_1$ (nb des fr/j)	0,223	0,223	0,080											
4	0 jour		12	12	12	$\mu_2$ (nb des fr/j)	0,223	0,154	0,080											
5	1 jour		15	15	13	$\mu_3$ (nb des fr/j)	0,154	0,154	0,080											
6			15	14	13	$\mu_j$ moy 1 jour	0,200	0,177	0,080											
7			14	14	13	l'écart type de $\mu$	0,04	0,04	0,00											
8	2 jour		19	18	15	2 jour														
9			19	17	15	$\mu_1$ (nb des fr/j)	0,230	0,203	0,112											
10			18	17	15	$\mu_2$ (nb des fr/j)	0,230	0,174	0,112											
11	3 jour		25	24	18	$\mu_3$ (nb des fr/j)	0,203	0,174	0,112											
12			25	23	19	$\mu_j$ moy 2 jour	0,221	0,184	0,112											
13			26	23	19	l'écart type de $\mu$	0,02	0,02	0,00											
14	4 jour		39	30	22	3 jour														
15			36	30	23	$\mu_1$ (nb des fr/j)	0,245	0,231	0,135											
16			37	31	23	$\mu_2$ (nb des fr/j)	0,245	0,217	0,153											
17	5 jour		54	41	27	$\mu_3$ (nb des fr/j)	0,258	0,217	0,153											
18			49	42	27	$\mu_j$ moy 3 jour	0,249	0,222	0,147											
19			51	42	26	l'écart type de $\mu$	0,01	0,01	0,01											
20	6 jour		75	54	36	4 jour														
21			68	54	36	$\mu_1$ (nb des fr/j)	0,295	0,229	0,152											
22			73	55	30	$\mu_2$ (nb des fr/j)	0,275	0,229	0,163											
23	7 jour		105	72	43	$\mu_3$ (nb des fr/j)	0,282	0,237	0,163											
24			104	72	44	$\mu_j$ moy 4 jour	0,284	0,232	0,159											
25			96	73	44	l'écart type de $\mu$	0,01	0,00	0,01											

**Figure A3.** Le taux de croissance moyen des frondes dans l'expérience témoin (AGRc) nécessaire pour calculer le temps de doublement (Td) du nombre de frondes pour le colorant MC