

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة 02 اوت 5591 سدك يكدة  
UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme  
de Master  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Microbiologie Appliquée  
Thème :

Etude de l'effet de la technologie de Bioréacteur filtrant  
sur lit mobile (MBBR) sur la biodégradation des  
hydrocarbures des eaux polluées et leurs propriétés  
physico-chimiques

Présentés par :

M<sup>r</sup> : Bouaita Adam

Membre de Jury:

M<sup>me</sup> : ZAIDI Nedjoua      Professeur      Présidente      Université 20 Aout 1955- Skikda

M<sup>me</sup> : LAIB Imen      MCA      Directrice de mémoire      Université 20 Aout 1955- Skikda

M<sup>me</sup> : FEKRACHE Fadila      MCA      Examinatrice      Université 20 Aout 1955- Skikda

Année universitaire: 2021/2022



# Remerciement

Avant tout, nous remercions *Allah* qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce modeste travail dans des bonnes conditions.

Nous tenons à remercier M<sup>me</sup> **ZAIDI Nedjoua** Professeur à L'université de 20 août 1955.SKIKDA pour avoir accepté de présider le jury de notre mémoire.

Nous remercions vivement à M<sup>me</sup> **FEKRACHE Fadila** Maître de conférences A à L'Université de 20 Août 1955 Skikda pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Nous avons le plaisir d'exprimer notre profonde gratitude à notre encadrant Mme : *Laib Imen* maître de conférences A à l'Université de 20 Août 1955 Skikda pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et son persévérance dans le suivi de ce modeste travail qui a été rendu possible grâce à vous Merci encore madame.

Nos plus vifs remerciements s'adressent au personnel du laboratoire de la Raffinerie de SONATRACH SKIKDA

Nos remerciements encore tout le personnel de l'unité ETPII De nous avoir accueillis et collaboré avec nous a réalisation de ce travail.

Enfin nous n'oublions pas de remercier l'ensemble des enseignants du département des sciences de la nature et de vie de l'université de SKIKDA ainsi que son corps administratif et nous remercions tous ceux qui nous ont rendu service et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



# Dédicace

*Si j'ai réalisé et finalisé ce travail c'est bien grâce aux encouragements de mes chers et tendres Père et ma mère, je voudrai le remercier du fond de cœur pour tout ce qu'ils ont fait pour nous.*

*Et aussi A Mon frères et MA sœur*

*A mes Tantes & mes Oncles.*

*A toute ma famille : **Bouaita & Hebhou.***

*A mes cousines & mes cousins.*

*A mes amies .et à tous ceux que j'aime et je respecte.*

*A tous mes camarades de la promotion 2021-2022*

*A toute mes Enseignants.*

*A ma chère encadrant : Mme **laib imen***

*A tous ceux qui m'aiment et à tous ceux que j'aime*



# Sommaire

**Résumés**

**Liste des abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

Introduction.....1

## Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Pétrole Brut :.....	3
1.1Composition du pétrole brut.....	3
1.2.Le raffinage du pétrole .....	3
1.3. Les hydrocarbures pétroliers .....	4
2. Les microorganismes hydrocarbonoclastes .....	8
2.1. Bactéries hydrocarbonoclastes: .....	8
2.2. Les micro-algues hydrocarbonoclastes : .....	9
2.3. Les champignons hydrocarbonoclastes :.....	10
3.Types de biodégradation.....	11
3.1. Biodégradation aérobie :.....	11
3.2. Biodégradation anaérobie :.....	12
4. Facteurs influençant la biodégradation du pétrole.....	13
4.1. Facteur microbiens : .....	13
4.2. Nutriments .....	13
5. Les bio surfactants microbiens : .....	14
6.Optimisation de la bio remédiation des milieux contaminés par les hydrocarbures : .....	15
6.1. Bioaugmentation : .....	15
6.2. Biostimulation : .....	15
6.3. Combinaison biostimulation et bioaugmentation :.....	15
7. Techniques d'immobilisation des bactéries.....	16
7.1.Biodégradation d'hydrocarbures pétroliers utilisant la fixation d'une cellule à une surface .....	16
7.2.Piégeage cellulaire dans des matrices poreuses et biodégradation des hydrocarbures pétroliers.....	19
8.Facteurs influençant la technique de piégeage cellulaire .....	24
8.1.Type de support et concentration .....	24

8.2. Granulométrie du gel .....	24
8.3. Densité cellulaire dans les billes.....	24
8.4. Libération des cellules à partir des supports immobilisés .....	25

## **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

1 Echantillonnage.....	26
1.1 Echantillon tous niveaux (filant) : .....	26
1.2 Echantillonnage du haut, milieu et bas HMB .....	26
2 Etapes de traitement .....	27
3 Description du procédé et matériel biologique utilisé.....	28
4 Analyse spectroscopie d'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en réflexion totale atténuée (ATR) des eaux polluées .....	31
5 Analyse physico-chimiques.....	32
5.1 Mesure de pH et conductivité.....	32
5.2 Le total des solides dissous (TDS): .....	32
5.3 Titre alcalimétrique simple (TA)et titre alcalimétrique complet (TAC).....	32
5.3.1. Titre alcalimétrique simple (TA) .....	33
5.3.2. Titre alcalimétrique complet (TAC) .....	33
5.4 Détermination de la dureté totale (TH).....	33
5.5 Dureté calcique et manganèse .....	34
5.5.1 Détermination du calcium .....	34
5.5.2 Détermination du Magnésium.....	34
5.6 Détermination des chlorures (Cl <sup>-</sup> ) .....	35
5.6.1 Détermination des chlorures (Cl <sup>-</sup> ) hautes teneurs .....	35
5.6.2. Détermination des chlorures (Cl <sup>-</sup> ) faibles teneurs .....	35
5.7 Détermination du phosphate PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .....	35
5.8 Détermination de la demande chimique en oxygène DCO .....	36
5.9 Mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO <sub>5</sub> ) .....	36
5.10 Détermination des hydrocarbures dans les eaux.....	37
6 Analyse statistique.....	38

## Chapitre III : Résultats et Discussion

1	Analyse ATR-FTIR des eaux :.....	39
2	Analyse physico-chimique des eaux :.....	40
2.1	PH : .....	40
2.2	Conductivité :.....	41
2.3	Calcium :.....	42
2.4	Magnésium : .....	42
2.5	Chlorure :.....	43
2.6	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> :.....	44
2.7	TH, TA et TAC :.....	45
2.8	DBO <sub>5</sub> :.....	46
2.9	DCO :.....	47
2.10	TDS :.....	48
2.11	Hydrocarbures : .....	49
3	Analyse des composantes principales :.....	49
4	Discussion :.....	50
	Conclusion et perspective.....	52
	Referance bibliographique .....	53

# Résumé

Les hydrocarbures qui polluent l'eau sont particulièrement difficiles à éliminer de l'environnement. Leur caractère hydrophobe et leur faible biodisponibilité pour les microorganismes d'eau affectent leur vitesse de biodégradation. Dans ce contexte, cette étude a pour objectif de tester l'effet de la technologie du traitement biologique de réacteur filtrant sur lit mobile MBBR (qui utilise des bactéries immobilisées) sur les paramètres physico-chimiques des eaux polluées et d'examiner leur efficacité à dégrader les hydrocarbures.

Afin de mesurer la capacité de dégradation des hydrocarbures par les microorganismes immobilisés appliqués dans ce travail, plusieurs méthodes ont été utilisées : l'analyse FTIR pour vérifier la variation des liaisons chimiques après traitement, le dosage des hydrocarbures totaux résiduels, la détermination de la demande chimique en oxygène (DCO), la détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO5). Plusieurs paramètres physicochimiques des effluents ont été également déterminés (pH, conductivité,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ , TDS, TH, TA). Les résultats obtenus confirment l'efficacité de cette méthode dans le bio traitement des eaux polluées.

**Mots clés :** Hydrocarbures, bactéries immobilisées, réacteur filtrant sur lit mobile, biodégradation.

## Abstract

Hydrocarbons that pollute water are particularly difficult to remove from the environment. Their hydrophobic character and low bioavailability to water microorganisms affect their biodegradation rate. In this context, the objective of this study is to test the effect of the MBBR technology (which uses immobilised bacteria) on the physico-chemical parameters of polluted waters and to examine their efficiency in degrading hydrocarbons.

In order to measure the hydrocarbon degradation capacity of the immobilised microorganisms applied in this work, several methods were used: FTIR analysis to check the variation of chemical bonds after treatment, determination of total residual hydrocarbons, determination of the chemical oxygen demand (COD), determination of the biochemical oxygen demand (BOD<sub>5</sub>) Several physicochemical parameters of the effluents were also determined (pH, conductivity, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>, TDS, TH, TA). The results obtained confirm the effectiveness of this method in the bio-treatment of polluted waters.

Key words: Hydrocarbons, immobilised bacteria, moving bed filter reactor, biodegradation

## المخلص

من الصعب بشكل خاص إزالة الهيدروكربونات التي تلوث المياه من البيئة. تؤثر طابعها الكاره للماء وانخفاض توافرها البيولوجي لماء الكائنات الحية الدقيقة على معدل التحلل البيولوجي. في هذا السياق، الهدف من هذه الدراسة هو اختبار تأثير تكنولوجيا المعالجة البيولوجية لمفاعل ترشيح الأسرة المتنقلة MBBR (الذي يستخدم البكتيريا المثبتة) على الفيزيائي-بالإضافة إلى ذلك، طلب من البرلمان الأوروبي دراسة آثار استخدام المواد الكيميائية في المياه الملوثة وفحص فعاليتها في تدهور الهيدروكربونات.

من أجل قياس قدرة تحلل الهيدروكربونات بواسطة الكائنات الدقيقة المثبتة المطبقة في هذا العمل، تم استخدام عدة طرق: تحليل FTIR للتحقق من تباين الروابط الكيميائية بعد المعالجة، وتحديد إجمالي الهيدروكربونات المتبقية، وتحديد الطلب على الأكسجين الكيميائي (COD)، وتحديد الطلب على الأكسجين الكيميائي الحيوي (BOD5). كما تم تحديد العديد من البارامترات الفيزيائية الكيميائية للنفايات السائلة (الأس الهيدروجيني، الموصلية،  $Ca + 2$ ،  $Mg + 2$ ،  $PO4-3$ ، TDS، TA، TH). تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها فعالية هذه الطريقة في المعالجة البيولوجية للمياه الملوثة.

الكلمات المفتاحية: الهيدروكربونات، البكتيريا المثبتة، مفاعل مرشح الأسرة المتنقل، التحلل البيولوجي

## Liste des abréviations

Abbreviations	Signification
<b>ppb</b>	Partie Par Billion.
<b>ppm</b>	Partie Par Million.
<b>HAP</b>	hydrocarbures aromatiques polycycliques.
<b>FLU</b>	Fluoranthène.
<b>CI</b>	Les systèmes à cellules immobilisées
<b>ETPII</b>	Effluent Treatment Plant
<b>MBBR</b>	Réacteur filtrant sur lit mobile
<b>FTIR</b>	Spectroscopie infrarouge a transformée de fourrier.
<b>ATR</b>	réflexion totale atténuée
<b>pH</b>	Potentiel Hydrogène.
<b>TDS</b>	Le total des solides dissous
<b>TA</b>	Titre alcalimétrique simple
<b>TAC</b>	titre alcalimitrique complet
<b>TH</b>	la dureté totale
<b>DCO</b>	la demande chimique en oxygène
<b>DBO<sub>5</sub></b>	la demande biochimique en oxygène
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnésium
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	calcium
<b>Cl<sup>-</sup></b>	chlorures
<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup></b>	phosphate
<b>KMnO<sub>4</sub></b>	permanganate de potassium

## Liste des tableaux

Tableaux	Le titre	La page
01	La composition élémentaire des pétroles brut	3
02	Tableau 2: Les différentes familles d'hydrocarbures	5
03	L'effet toxique de certains hydrocarbures (BTEX) sur les êtres vivants	6
04	Quelques bactéries hydrocarbonoclastes et leurs caractéristiques	8
05	les microorganismes dégradant certains hydrocarbures	10
06	Récapitulatif des paramètres influençant la biodégradation	14
07	Résumé des études sur la fixation des cellules à la surface des excipients pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers	17
08	Résumé des études sur la technique de piégeage cellulaire pour la biorestauration des milieux pollués par les hydrocarbures pétroliers	21

## Liste des figures

Figures	Le titre	La page
01	Schéma des procédés de raffinage	4
02	Principe de la dégradation aérobie	12
03	Principe de la digestion anaérobie	13
04	schéma de la station d'épuration (ETPII) de la raffinerie de Skikda (RA1k)(ETPII, 2012)Modifier	28
05	Schéma de traitement biologique dans l'ETP, Raffinerie de Skikda Algérie	29
06	Technologie de réacteur filtrant sur lit mobile (MBBR )	30
07	Microorganismes utilisés	32
08	Spectres ATR-FTIR des eaux polluées	39
09	pH des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	40
10	Conductivité des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	41
11	Le taux de Ca <sup>+2</sup> des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	42
12	Le taux de Mg <sup>+2</sup> des échantillons prélevés avant et après le	43

	traitement biologique	
<b>13</b>	Le taux de Cl- des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	44
<b>14</b>	Le taux de PO <sub>4</sub> -3 des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	44
<b>15</b>	Le taux de TAC et TH des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	45
<b>16</b>	Le taux de DBO <sub>5</sub> des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	46
<b>17</b>	Le taux de DCO des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	47
<b>18</b>	Le taux de TDS des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	48
<b>19</b>	Le taux des hydrocarbures des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique	49
<b>20</b>	Analyse ACP	50



# **Introduction**

## Introduction

Les sols et l'eau contaminés par les hydrocarbures pétroliers posent un problème environnemental important en raison de leurs effets néfastes sur l'homme et les divers écosystèmes. L'utilisation généralisée des hydrocarbures pétroliers dans les activités industrielles ainsi que les activités associées à l'extraction du pétrole des réservoirs et au processus de transport ont permis de les identifier comme les contaminants environnementaux les plus répandus (**Partovinia et Rasekh, 2018 ; Mahrotra *et al.*, 2020**).

Diverses méthodes physiques, chimiques et thermiques ainsi que biologiques ont été proposées et appliquées pour assainir ces milieux contaminés (**Singh *et al.*, 2009**). Cependant, la restauration des milieux contaminés par les hydrocarbures de pétrole demeure difficile en raison de leur faible solubilité, de leur non-polarité et de leur nature hydrophobique (**Lu *et al.*, 2011**). Plusieurs techniques de biorestauration ont récemment attiré l'attention en raison de leur nature simple, économique et écologique. La biorestauration du sol et de l'eau peut être mise en œuvre *in situ* et *ex situ* (**Alvarez et Illman, 2006; Boopathie, 2000; Liu *et al.*, 2011**). Différents exemples de techniques d'assainissement *in situ* et *ex situ*, comme la bioventilation, la bioaspersion et la biodégradation, l'agriculture terrestre, le compostage, les biopiles et le biotrickling, ont été examinés (**Boopathy, 2000; Partovinia *et al.*, 2010; Vidali, 2001**). La biodégradation, c.-à-d. l'ajout de microorganismes aux sites contaminés, est souvent considérée comme une méthode plus pratique que d'autres méthodes, car elle peut être mise en œuvre *in situ* et *ex situ*, ainsi que dans une combinaison d'autres techniques de biorestauration (**Tahseen *et al.*, 2016**).

L'efficacité de la biodégradation dépend de l'inoculation de la quantité appropriée de biomasse microbienne, de la méthode d'administration et de la sorption potentielle dans les milieux environnants (**Xu et Lu, 2010**). Il existe plusieurs façons de transférer des microorganismes aux sites contaminés. La procédure la plus courante est l'utilisation directe de l'étape de culture liquide ou du système de cellules libres. Cependant, la distribution adéquate des microorganismes, en particulier dans l'eau, leur activité et leur viabilité ne peuvent pas être complètement assurées à l'aide des systèmes des cellules libres. Afin d'accroître l'efficacité de la biodégradation, diverses techniques de transfert de micro-organismes dans les zones polluées ont été étudiées (**Mrozik et Piotrowska-Seget, 2010**). L'une des techniques les plus prometteuses dans ce domaine consiste à utiliser différents supports pour l'immobilisation cellulaire afin de maintenir une activité microbienne suffisante pendant une

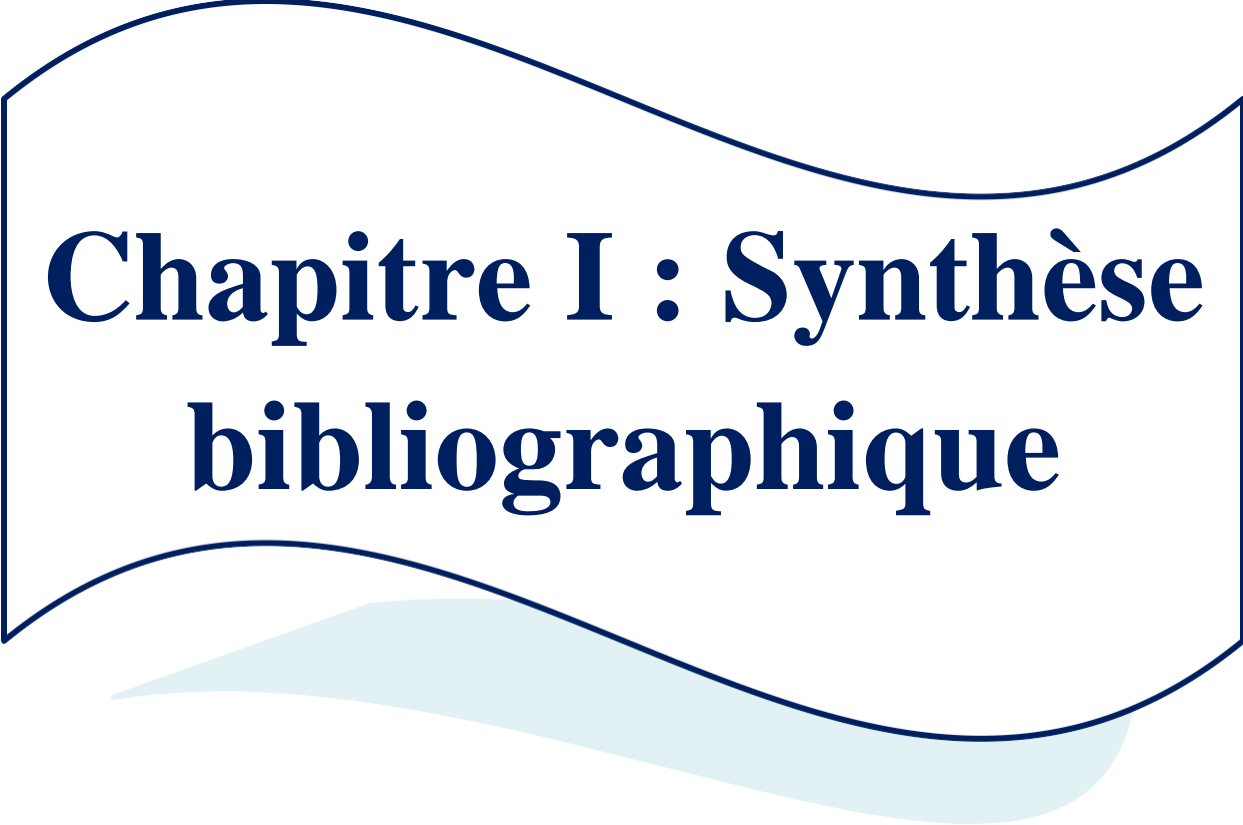
longue période de temps, permettant ainsi une efficacité plus élevée de biodégradation (Cassidy *et al.*, 1996 ; Partovinia et Rasekh, 2018).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de la technologie du traitement biologique de réacteur filtrant sur lit mobile MBBR (qui utilise des bactéries immobilisées) sur les paramètres physico-chimiques des eaux polluées et d'examiner son efficacité à dégrader les hydrocarbures

Notre travail est scindé en deux parties :

❖ la première partie est une synthèse bibliographique donnant des généralités sur la biodégradation des hydrocarbures et l'utilisation de la technologie des cellules immobilisées pour l'épuration des eaux polluées.

❖ La deuxième partie regroupe les différents aspects pratiques de notre étude, les résultats obtenus et leurs discussions.



# **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

## 1. Pétrole Brut :

Par son origine et son mode de formation, le pétrole brut est un mélange extrêmement complexe de molécules ou dominant les hydrocarbures composés de 1 à 40 carbones de différentes famille aliphatique et cyclique (**Picot et Montandon ,2013**) mais qui renferme aussi en petite quantité des composés soufres, oxygénés et azote (**Lefebvre ,1978**).

### 1.1 Composition du pétrole brut

La composition élémentaire des bruts se situe dans les limites suivantes :

**Tableau 1:** La composition élémentaire des pétroles brut (**Lefebvre, 1978**)

Composant	Teneurs (%)
Carbone	84 à 87
Hydrogène	11 à 14
Soufre	0 à 5
Azote	0 à 1
Oxygène	0 à 1

Les pétroles bruts renferment de nombreux métaux, les deux principaux sont le nickel et le vanadium, mais le fer, le zinc, le chrome, le cuivre, le manganèse, le cobalt sont presque toujours présents. Leur concentration va de 1000 ppm à moins de 1 ppb (**Lefebvre, 1978**).

### 1.2 Le raffinage du pétrole

Le raffinage est l'ensemble des opérations qui permettent d'obtenir, à partir du pétrole brut, toute la gamme de produits pétroliers (**Giraud et Boy de la Tour, 1987**) tels que :

- Des produits pétroliers utilisés à des fins énergétiques telles que carburant et combustibles ;
- Des produits pétroliers non-énergétique tels que les solvants, les naphtas, les lubrifiants, les cires et les paraffines, les bitumes, des produits spéciaux (les huiles blanches, les extrais aromatique, le coke) (**Wauquier, 1994**).

Les hydrocarbures se présentent sous les formes gazeuses, liquides ou solides selon la pression et la température Cette caractéristique physique sert de base au fractionnement du pétrole brut en hydrocarbures plus au moins purifiés. Ainsi la principale opération de raffinage est la distillation. Elle se

déroule à pression atmosphérique ou sous vide et sépare selon leur point d'ébullition les hydrocarbures en différentes fraction (coupes) (Picout et Montandon, 2013)

Le schéma suivant est un récapitulatif des différents processus qui se déroulent dans une raffinerie.

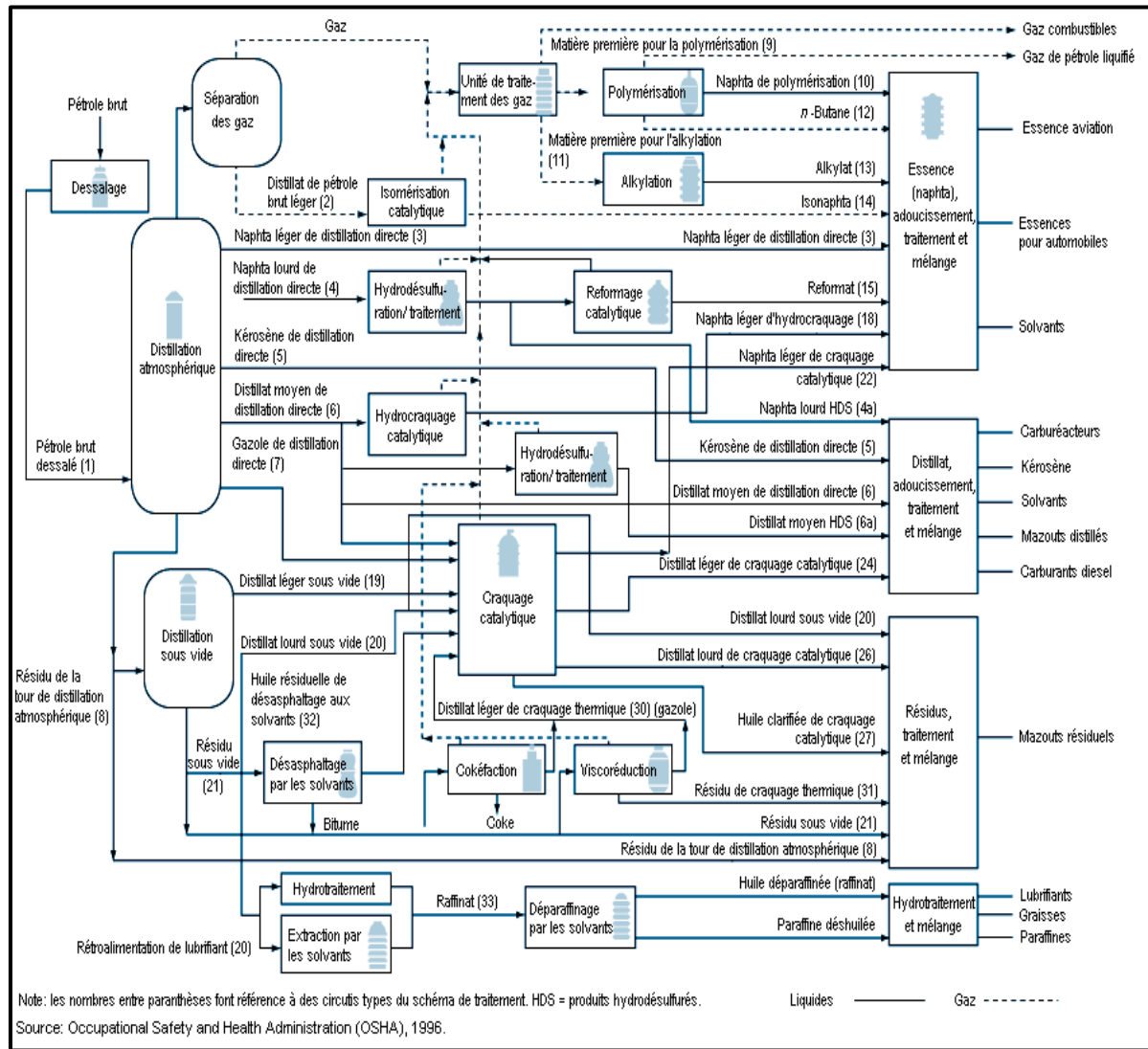


Figure 1: Schéma des procédés de raffinage.

### 1.3. Les hydrocarbures pétroliers

Le terme « hydrocarbure pétrolier » est un terme générique qui désigne les mélanges de composés organiques présents dans des matières géologiques comme l'huile, le bitume et le charbon ou dérivés de ces matières (Standards et Pancanadiens, 2008).

Les hydrocarbures sont composés de chaînes moléculaires constituées d'atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H) (Fattal, 2008). Selon la manière dont les atomes de carbones sont liés les uns aux autres,

on distingue trois types principaux d'hydrocarbures (Lefebvre, 1978). Les différentes familles d'hydrocarbures sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau 2:** Les différentes familles d'hydrocarbures (Lefebvre, 1978).

	Nomenclature Classique		Nomenclature I.U.P.A.C	Formule générale	Présence dans le pétrole brut
<b>Saturés</b>	Paraffines	ou	Alcanes	$C_nH_{2n+2}$	+
	hydrocarbures paraffiniques.				
	Naphtènes	ou	Cyclanes	$C_nH_{2n}$	+
	hydrocarbures naphténiques.				
<b>Insaturés</b>	Oléofines	ou	Alcènes	$C_nH_{2n}$	-
	hydrocarbures oléofiniques.				
	Acétyliniques	ou	Alcynes	$C_nH_{2n-2}$	-
	hydrocarbures acétyliniques				
<b>Aromatiques</b>	Aromatiques	ou	—	—	+
	hydrocarbures aromatiques ou hydrocarbures benzéniques.				

### 1.3.1. La toxicité des hydrocarbures :

La toxicité est la capacité d'une substance de provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé sur toute forme de vie (humains, animaux, poissons et d'autres organismes) (Negraia, 2010).

Le type d'hydrocarbure, la durée du contact, la quantité déposée et surtout le niveau de toxicité, influent sur l'importance de l'impact. Les hydrocarbures légers sont plus toxiques que les hydrocarbures lourds (Fattal, 2008). Les aromatiques sont les plus toxiques suivi des composés oléofiniques, naphténiques, et paraffiniques (généralement pas toxiques). Les hydrocarbures à faible poids moléculaire sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et par

conséquent leur concentration très élevée dans les phases aqueuses (Zhang et al., 2009). L'action toxique du polluant peut provoquer un ralentissement de l'activité de la microflore (Vogel et Ballerini, 2001). Certains hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) sont connus pour être cancérigènes (notamment le benzo(a)pyrène, qui se combine avec l'ADN) ou toxiques (hyperkératose, hyperplasie, tératogène) (Gaujous, 1995). La bioaccumulation de ces composés entraîne des altérations du matériel génétique avec des effets mutagènes et cancérigènes.

**Tableau 3 :** L'effet toxique de certains hydrocarbures (BTEX) sur les êtres vivants (Negraia, 2010).

Substance chimique	Effets génotoxiques	Effets cancérigènes	Effets sur la reproduction
Benzène	Chez animal : génotoxique et induit des aberrations chromosomiques et des micronoyaux in vivo. Les effets sont établis sur les cellules somatiques et sur les cellules germinales (INRS, 2007a). Chez humain : aucune relation ne peut être actuellement établie (INRS, 2007a).	Chez animal : cancérigène par voie orale et inhalatoire (INRS, 2007a). Les organes cibles sont le système hématopoïétique et différents tissus d'origine épithéliale. Chez humain : cancérigène, groupe 1 des agents cancérigènes (INRS, 2007a).	Chez animal : n'est pas toxique pour le développement. Les données animales montrent des dommages testiculaires (INRS, 2007a). Chez humain : transfert placentaire lors de la grossesse (INRS, 2007a)
Toluène	Chez animal : génotoxique avec des résultats variables in vitro et négatifs in vivo (INRS, 2008b). Chez humain : n'est pas génotoxique (INRS, 2008).	Chez animal : n'est pas cancérigène (INRS, 2008b). Chez humain : cancérigène, groupe 3 des agents inclassables (CIRC cité par INRSb, 2008).	Chez animal : n'altère pas la fertilité. Il est toxique pour le développement à des concentrations non toxiques pour les mères (INRSb, 2008). Chez humain : produit

			pouvant avoir un risque possible sur la fonction de reproduction (INRS, 2008)
Éthylbenzène	Chez animal : n'est pas génotoxique dans la plupart des études <i>in vitro</i> et dans toutes les études effectuées <i>in vivo</i> . (INRS, 2007b). Chez humain : études insuffisantes, mais il peut causer une augmentation de la génotoxicité (ATSDR, 2007b)	Chez animal et humain : cancérogène dans le groupe 2B des agents qui peuvent être cancérogènes pour l'homme (CIRC cité par INRS, 2007b)	Chez animal : n'est pas toxique pour la fertilité. Il est foetotoxique à des concentrations toxiques pour les mères (INRS, 2007b). Chez humain : études insuffisantes (INRS, 2007b).
Xylène	Chez animal et humain: n'est pas génotoxique (INRS, 2009)	Chez animal et humain : cancérogène dans le groupe 3 des agents inclassables (CIRC cité par INRS, 2009)	Chez animal : n'est pas toxique pour le développement (INRS, 2009). Chez humain : transfert placentaire lors de la grossesse (INRS, 2009)

**1.3.2. La dégradation des hydrocarbures :**

La biodégradation est la transformation à l'aide des micro-organismes d'un composé organique métabolisable sous une autre forme plus simple, qui peut être moins ou plus toxique que le composé d'origine (biotransformation) et aboutit à un produit final qui est le dioxyde de carbone (minéralisation).

La biodégradation se réalise soit en conditions aérobies, les composés organiques sont complètement oxydés en composés inorganiques solubles et l'oxygène agit comme un accepteur terminal d'électrons, soit en conditions anaérobies, les composés organiques sont oxydés de façon incomplète en acides organiques simples, le méthane et l'hydrogène comme sous-produits (conditions dénitrifiantes, sulfato-réductrices ou méthanogènes) par différents groupes de microorganismes. Contrairement au métabolisme aérobie, le nitrate, le sulfate et le bicarbonate jouent le rôle d'accepteurs terminaux (**Kumar et Gopal , 2015**).

## 2. Les microorganismes hydrocarbonoclastes

La dégradation des hydrocarbures par des microorganismes constitue un domaine de recherche en cours de développement, une fois que des procédures microbiologiques peuvent être employées dans les procédés de dépollution (**Bonaventura et Johnson, 1997**).

Les bactéries et les levures sont généralement des dégradeurs prédominants d'hydrocarbure dans les écosystèmes aquatiques, tandis que les champignons et les bactéries sont les principaux agents de dégradation dans les environnements du sol. Ces microorganismes sont appelés les hydrocarbonoclastes (**Ahearn et Meyers, 1976**).

### 2.1. Bactéries hydrocarbonoclastes:

Les bactéries sont la classe des microorganismes activement impliqués dans la dégradation des hydrocarbures des sites contaminés. Un certain nombre d'espèces bactériennes sont connues pour la dégradation des HAP. La plupart d'entre eux, représentant l'efficacité de la biodégradation, elles sont isolées à partir de sols contaminés à long terme par les déchets pétrochimiques (**Haritash et Kaushik, 2009**).

**Tableau 4** : Quelques bactéries hydrocarbonoclastes et leurs caractéristiques (**Champagnat,1974 ; Pelmont, 1995**).

Bactéries hydrocarbonoclastes		Caractéristiques
➤ <b>GRAM<sup>+</sup></b>	➤ <b>GRAM<sup>-</sup></b>	➤ Génétiquement stables. ➤ Apte à biodégrader une vaste étendue de polluants pétroliers. ➤ Activité enzymatique et
➤ <i>Bacillus</i>	➤ <i>Pseudomonas</i>	
➤ <i>Micrococcus</i>	➤ <i>Alcaligenes</i>	
➤ <i>Actinomycètes</i>	➤ <i>Achromobacter</i>	
➤ <i>Arthrobacter</i>	➤ <i>Acinétobacter</i>	

<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Nocardia</i></li> <li>➤ <i>Rhodococcus</i></li> <li>➤ <i>Corynebactérium</i></li> <li>Mycobactérium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <i>Flavobactérium</i></li> <li>➤ <i>Vibrio</i></li> </ul>	<p>croissance des bactéries dans des conditions environnementales optimum.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxique.</li> <li>➤ 63% pigmentés (orange, jaune et rouge).</li> <li>➤ La majorité des souches bâtonnet sont Gram négatif.</li> <li>➤ 32% des bactéries motiles ou mobiles.</li> <li>➤ 20% des bactéries à Gram positives, filamenteux</li> </ul>
--	--	---

**2.2. Les micro-algues hydrocarbonoclastes :**

Certaines micro-algues sont capables d'attaquer les hydrocarbures, citons l'exemple de *Protatheca zopfii* qui dégrade 40 % du pétrole brut (Walker et al., 1975). Quelques recherches ont aussi démontré la dégradation des HAPs par des algues. En effet *Selenastrum capricornutum*, une algue verte peut dégrader le fluoranthène (FLU), le pyrène(PYR) (Lei et al., 2007) et le benzo(a)pyrène (Cerniglia, 1992 ; Warshawsky et al., 1995 ; Juhasz et Naidau, 2000 ; Lei et al., 2007). La dégradation du b(a)p par cette algue a mené à la formation du dihydrodiols par la voie enzymatique du dioxygénase (Juhasz et Naidau,2000). D'autres espèce comme *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus* et *Scenedesmus quadricauda* ont aussi montré une certaine capacité de dégradation des HAPs (Lei et al., 2007).

### 2.3. Les champignons hydrocarbonoclastes :

Les champignons peuvent transformer les hydrocarbures de façon Co-métabolique en métabolites moins toxiques par l'action de peroxydase et monooxygénase. Un des champignons les plus étudiés pour ses capacités de dégradation est *Phanerochaete chrysosporium* (Boonchan et al., 2000). Il a la capacité de dégrader une grande variété de polluants persistants dans l'environnement comme les HAPs, cette capacité de dégradation serait reliée au système d'enzymes ligninolytiques extracellulaires sécrétées dans l'environnement (Kanaly et Hur, 2006). Les champignons dégradant les HAPs qui sont les plus fréquemment retrouvés dans la littérature appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Trametes*, *Fusarium*, *Sacharomyces*, *Bjerkandera* et *Acremonium* (Lei et al., 2007 ; Maamar, 2015). L'utilisation des champignons d'origine marine dans la biorémediation des milieux salins pollués est facilitée par leur tolérance à la salinité. Elle est aussi appelée mycoremédiation, c'est un processus d'utilisation de mycélium fongique pour restaurer un environnement contaminé par de polluants à un état moins contaminé. L'un des rôles principaux de champignons dans l'écosystème est la décomposition, qui est effectuée par le mycélium. La clé de mycoremédiation est de déterminer les espèces fongiques qui ont droit de cibler un polluant spécifique (Stamets, 2005).

**Tableau 5 :** les microorganismes dégradant certains hydrocarbures

Hydrocarbures	Microorganisme	Remarques	Références
Ethane	-Mycobactérium -Nocardia - Graphium	Tous les alcanes linéaires ont le même principe de dégradation qui aboutit à la formation d'un acide gras puis un acétyle CoA	(Scriban, 1999)
L'octane	- P. jluorescens - P. aerogenosa P. putida		(Scriban, 1999) (Nasir, 2000)
Hexadécane	- Corynebactérium -Mycobactérium - Nocardia - Rhodococcus - Pseudomonas - Alcaligenes		(Pelmont, 2005)

	- Candida maltosa		
Cyclohexane	- Acinetobacter - Pseudomonas	La dégradation des cyclohexanes conduit à la formation des succinyl coA et 1' Acétyl CoA	(Scriban, 1999)
1,2-Di chlorobenzène	- Pseudomonas	-	(Pelmont, 2005)
Naphtalène	- P. putida	-Le produit final est : Pyruvate + Salicylate - Le Salicylate est hydroxylé en Catéchol qui est minéralisé par la voie méta	(Pelmont, 2005)
Benzène Toluène Xylène	P. putida	- Les trois composés aboutissent à la formation des composés du cycle de l'acide citrique à partir de la formation de deux groupements hydroxyle sur le cycle aromatique. Leur disposition doit être en ortho (Catéchol) où en para (l'acide gentisique)	(Scriban, 1999)
2,4- Dichlorophenol	- Différents espèces Bacillus		(Herrera et al., 2008)

### 3.Types de biodégradation

#### 3.1. Biodégradation aérobie : La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dans des conditions aérobies est bien connue depuis plus d'un siècle.

La biodégradation aérobie se fait au cours d'une respiration bactérienne utilisant l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons. Ce métabolisme met en œuvre des mono- ou di-oxygénases qui attaquent les molécules par addition d'oxygène

La biodégradabilité d'une substance organique, est le degré de mobilité physique et chimique que subit cette matière organique provoqué par des microorganismes. Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants :

- Vitesse de dégradation des composés organiques
- Quantité d'oxygène consommée
- Produits résultant de la dégradation
- Activité microbienne (**Zhenpeng et Hongwei, 2002**).

Chez les micro-organismes aérobies, la respiration fournit l'énergie nécessaire à la vie par des réactions biochimiques comme suivant : l'ammoniaque est transformée en nitrites ( $2\text{NH}_4^+ + 3\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NO}_2^- + 4\text{H}_3\text{O}^+$ ) puis les nitrites sont transformés en nitrates ( $2\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_3^-$ ). La première étape dans la dégradation aérobie de ces composés est l'introduction dans le substrat d'un atome d'oxygène dérivé de l'oxygène moléculaire. Cette étape critique est effectuée par les oxygénases (**Olivier et al., 2005**).

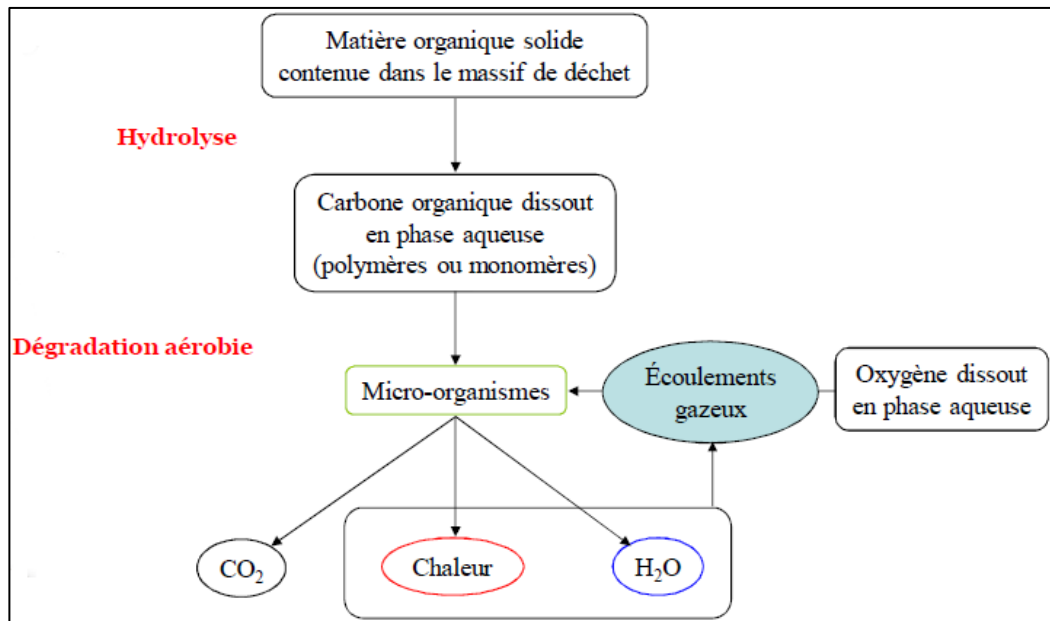


Figure 2 : Principe de la dégradation aérobie (Moletta, 2002).

### 3.2. Biodégradation anaérobie :

Les hydrocarbures sont maintenant reconnus comme une source potentielle de carbone et d'énergie permettant le développement de microorganismes en conditions anaérobie.

La biodégradation anaérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en conditions d'anaérobiose (Bouderhem, 2011). Par Exemple la transformation des nitrates en azote gazeux ( $4 \text{NO}_3^- + 4 \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow 2\text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + 5 \text{O}_2$ ).

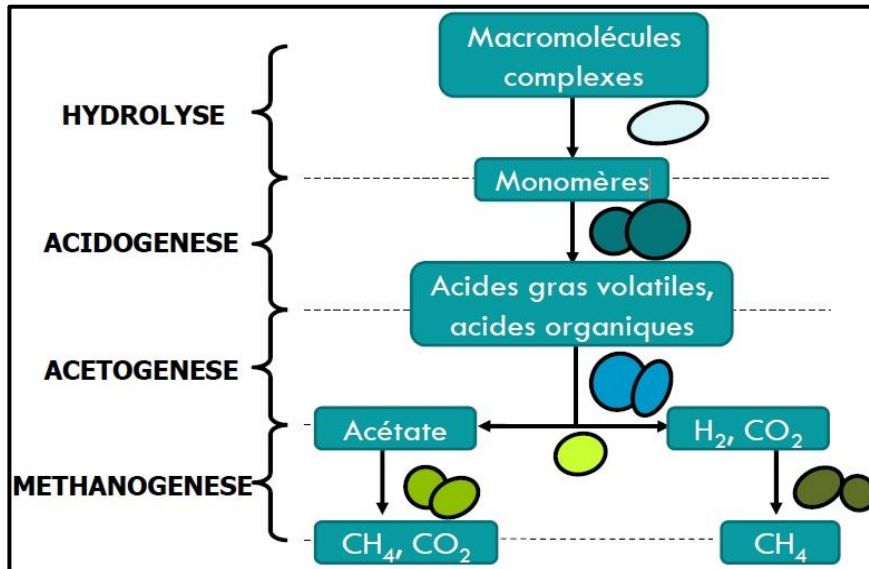


Figure 3 : Principe de la digestion anaérobie (Moletta, 2002).

#### 4. Facteurs influençant la biodégradation du pétrole

**4.1. Facteur microbiens** : il consiste à augmenter, dans le site contaminé, le niveau des populations microbiennes aptes à dégrader le xénobiotique, soit par renforcement des populations autochtones, soit par introduction de nouvelles populations (inoculation) (Pierre et Vincent, 2000).

**4.2. Nutriments** : sont indispensables à l'activité et au développement des micro-organismes. Ce sont des corps simples qui peuvent être assimilés, sans transformation digestive par les organismes et favoriser la croissance des populations de bactéries. Les plus importants sont l'azote et le phosphore (Blifert et Perraud, 2004).

**4.3. Humidité** : est un paramètre important dans le processus de la biodégradation car l'eau est un élément indispensable au développement des bactéries. Les bactéries sont influencées par la concentration osmotique et la disponibilité en eau (Djerbaoui, 2011 ; Gabet, 2004) a signalé que pour une meilleure activité de biodégradation, l'humidité doit être de 25 à 90%.

**4.4. Le pH** : l'activité microbienne est largement influencée par le pH. Il doit être situé entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7 (Gabet, 2004). Si le pH est acide, il peut favoriser la solubilisation des métaux lourds qui sont très toxiques pour les bactéries (Bouderhem, 2011).

**4.5. Température :** elle peut avoir un effet marqué sur la dégradation des hydrocarbures. En effet, la température influence l'état physique des hydrocarbures, ainsi que la composition et l'activité de la communauté microbienne qui se reflète sur le taux de dégradation des hydrocarbures (Atlas, 1981). La température optimale pour la biodégradation est située entre 20 et 30°C (Margesin et Schinner, 1997).

**4.6. Salinité :** est un paramètre qui affecte la biodégradation, alors que la forte salinité diminue le nombre de micro-organismes qui ralentit les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO<sub>2</sub>. Les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation (Bertrand et al., 1993).

**Tableau 6 :** Récapitulatif des paramètres influençant la biodégradation (Ferrai et Planque, 2003).

Facteur de la biodégradation	Bilan des données recensées
Le pH	7-7,8
Le contenu en nutriments	C/N/P=120/10/1
Le contenu en oxygène	Pour la voie aérobie
La température	20-30°C
Le taux d'humidité	-20-90 %
La présence d'accepteurs d'électrons	Nitrate, fer, sulfate, CH <sub>4</sub> , pour la voie anaérobie
La biodisponibilité des HAP	Taux MO faibles
L'âge de la pollution	Pollution récent (< à 50 ans)

### 5. Les bio surfactants microbiens :

Encore appelés tensio-actifs, les surfactants sont des composés chimiques qui abaissent la tension superficielle entre deux surfaces (par exemple une phase huileuse et une phase aqueuse). Ils permettent de mélanger deux phases non miscibles et donc de fabriquer des émulsions. En effet, les hydrocarbures s'adsorbent fortement sur les particules, ce qui les rend difficile à dégrader pour les microorganismes. Les bio surfactants permettent de les solubiliser ou de les disperser sous forme d'émulsion. Ils deviennent alors beaucoup plus facilement dégradables par les microorganismes. Les bio surfactants, fabriqués par des microorganismes, ont l'avantage d'être non toxique et eux-mêmes biodégradables (Romain et al. 2012 ; Banat et al., 2010).

Les bio surfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le microorganisme. On distingue cinq grandes classes de bio surfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (Healy et al., 1996).

### **6. Optimisation de la bio remédiation des milieux contaminés par les hydrocarbures :**

La décontamination par voie biologique consiste à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone (Sutherland et al. 1995). L'efficacité des stratégies de biorestauration varie selon la nature du milieu et le type de contaminant (Balba et al. 1998).

#### **6.1. Bioaugmentation :**

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes au milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodégradation des hydrocarbures. La technique repose sur l'addition d'une souche bactérienne pure pré-adaptée ; ajout d'un consortium pré-adapté ; introduction de bactéries génétiquement modifiées ; et l'addition de gènes pertinents de biodégradation conditionnés dans un vecteur à transférer par conjugaison dans des micro-organismes indigènes (El Fantroussi et Agathos, 2005).

#### **6.2. Biostimulation :**

Elle implique la modification de l'environnement pour stimuler l'activité des populations microbiennes autochtones du sol par l'ajout des nutriments notamment l'azote, le phosphore, l'oxygène ou le carbone (par exemple sous forme de mélasse) au site contaminé, ils sont par ailleurs disponibles en quantités suffisamment faibles ce qui limite l'activité microbienne (Guerin, 1999; Rolling et al. ,2002; Delille et al. ,2004; Kalantary et al. 2014).

#### **6.3. Combinaison biostimulation et bioaugmentation :**

Il est possible de combiner des actions de bio-stimulation avec des actions de bio-augmentation (ensemencement et ajout de fertilisants) (Schratzberger et al. 2003).

La fixation des cellules entières, à l'intérieur ou sur le support ou le support est appelé immobilisation (**Karel et al., 1985; Willaert et Baron, 1996**). Les systèmes à cellules immobilisées (CI) sont plus avantageux que les systèmes à cellules libres en raison de la séparation plus facile, de la réutilisation possible des micro-organismes, de la stabilité contre métabolites toxiques sur de longues périodes de temps et de l'impossibilité d'éliminer les cellules à des taux de dilution élevés (**Cassidy et al., 1996; Rosevear et al., 1987**).

### **7. Techniques d'immobilisation des bactéries**

Les techniques d'immobilisation des cellules sont classées en quatre groupes en fonction de mécanismes physiques comme (**Cassidy et al., 1996; Karel et al., 1985; Willaert et Baron, 1996**) : Fixation ou adsorption sur une surface solide ou supports préformés ; piégeage dans une matrice poreuse : piégeage, encapsulation, protection cellulaire (maintien des cellules à l'intérieur d'une membrane ou d'une capsule. Des procédés de fixation sur une surface solide, de piégeage et/ou d'encapsulation ont été largement appliqués pour la dégradation d'hydrocarbures pétroliers.

#### **7.1. Biodégradation d'hydrocarbures pétroliers utilisant la fixation d'une cellule à une surface**

La fixation cellulaire à une surface est une technique d'immobilisation simple dans laquelle les cellules sont adsorbées sur un support solide. Les matériaux de support peuvent être inorganiques (par exemple, minéraux naturels ou traités tels que la bentonite, la silice, le verre, les métaux, etc.) ou organiques (par exemple, polymères naturels ou synthétiques tels que les polysaccharides, la cellulose, la gélose, l'amidon, les protéines, le polystyrène, le polyacrylamide, etc.). L'adsorption comprend les forces physico-chimiques lors de la liaison de cellules à la surface d'un support. Dans l'adsorption physique, les cellules sont fixées au support par liaison hydrogène, forces de van der Waals, forces gravitationnelles, charge électrostatique ou interactions hydrophobes. Les cellules peuvent être chimiquement liées à une surface par diverses méthodes, dont la réticulation par le glutaraldéhyde et la chélation en oxydes métalliques (**Armentano et al., 2014**). Comme le montre le tableau 1, une vaste gamme de supports tels que l'argile, le son de blé, la tourbe, la bagasse, le charbon actif, la zéolithe et les particules de gravier ont été utilisés dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.

**Tableau 7 :** Résumé des études sur la fixation des cellules à la surface des excipients pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.

Classe	Contaminant	Support	Micro-Organismes	Moyen	Références
Alcane	Hexadécane	Sciure de pin	caoutchouc de <i>Rhodococcus</i>	Aqueux	(Podorozhko <i>et al.</i> , 2008)
	C <sup>10</sup> -C <sup>18</sup>	Tapis de cheveux, Silice	<i>Acinetobacter venetiaus</i> 2AW	Aqueux	(Luckarift <i>et al.</i> , 2011)
	Tétradécane	Bagasse	<i>Acinetobacter venetianus</i>	Aqueux	(Lin <i>et al.</i> , 2015)
BTEX	Benzène	Cellulose et céramique	<i>Rhodococcus</i> sp.	Aqueux	(Paje <i>et al.</i> , 1998)
	Benzène, Toluène, o-Xylène	Fibre d'agave/polymère après consommation matériaux composites expansés	<i>Pseudomonas putida</i> F1	Aqueux	(Robledo-Ortiz <i>et al.</i> , 2011)
HAP	Naphtalène	Géotextile	Consortium microbien	Aqueux	(Kermanshahi pour <i>et al.</i> , 2005)
HAP		Poly(vinylpyrrolidone)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> B4	Aqueux	(Djefal-Kerrar <i>et al.</i> , 2007)
HAP		Bagasse	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aqueux	(Mohammadi et Nasernejad, 2009)
	Phénanthrène	souche de papaye	<i>Mycoplana</i> sp. MVMB2	Aqueux	(Brinda Lakshmi <i>et al.</i> , 2012)
	Phénanthrène et pyrène	Résidus végétaux ou Biochars	<i>Pseudomonas putida</i> , Indigène bactérie	Sol	(Chen <i>et al.</i> , 2012)
	Pyrène	Épis de maïs	Différentes bactéries	Sol	(Wang. <i>et al.</i> , 2012)
	Pyrène	Poudre d'arachide	bacille de Gilvum	Aqueux	(Deng <i>et al.</i> , 2016)
HAP		Matériaux lignocellulosiques	<i>Bjerkandera adusta</i> SM46	Sable marin, Eau de mer	(Andriani et Tachibana, 2016)
	Phénanthrène	Sciure enrobée de silice	<i>Sphingomonas</i> sp. GY2B	Sol Aqueux	(Li <i>et al.</i> , 2016)
Mélange	Boues huileuses	Argile granulaire	Différentes bactéries et levures	Aqueux	(Omar et coll., 1990)
	Diesel	Biofix Drizit	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aqueux	(Wilson et Bradley, 1996)
	Pétrole brut	Son de blé	Arthrobacter sp. bacille Gram négatif	Aqueux	(Obuekwe et Al-Muttawa, 2001)
	Pétrole brut	Bactéries utilisant du pétrole	Macroalgues	Aqueux	(Radwan <i>et al.</i> , 2002)
	Pétrole brut	Chitine et flocons de chitosane	Culture mixte	Aqueux	(Gentili <i>et al.</i> , 2006)
	Pétrole brut	Zéolithe au charbon actif	Bactéries dégradant les hydrocarbures	Sol	(Liang <i>et al.</i> , 2009)
	Diesel	Support hybride de la tourbe	Bactéries mixtes	Aqueux	(Lee <i>et al.</i> , 2010)

---

	Pétrole brut	Cire pour copeaux de bois	<i>Candida sp. S42-12 Candida tropicalis</i>	Aqueux	(Farang <i>et al.</i> , 2010)
	Pétrole brut	Poudre d'arachide	Groupement bactérien	Sol	(Xu et Lu, 2010)
	Diesel	Millet renard soufflé, CA-Chitosan	<i>Arthrobacter sp. F9</i>	Aqueux	(Hou <i>et al.</i> , 2013)
	Pétrole brut	Fibres de coton	<i>Arthrobacter sp. HSC8-3S, Vibrio sp. HC-3B</i>	Aqueux	(Lin <i>et al.</i> , 2014)
Mélange	Pétrole brut	Déchets de grappes de fruits vides de sciure et de palmier à huile	Groupement bactérien	Aqueux	(Kok Kee <i>et al.</i> , 2015)
	Pétrole brut	Enveloppes et tourbe de tournesol	<i>Rhodococcus sp. QBTo</i>	Sol	(Cubitto et Gentili, 2015)
	Diesel	Graphite, perlite, charbon de bambou	<i>Pseudomonas sp. Brevundimonas sp.</i>	Aqueux	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
	Diesel	charbon de bambou	<i>Acinetobacter venetianus</i>	Aqueux	(Chen <i>et al.</i> , 2016)
	Gazole automobile	Paille de riz	<i>Micrococcus luteus Rhizopus arrhizus</i>	Sol	(Nwankwegu <i>et al.</i> , 2017)

---

## 7.2. Piégeage cellulaire dans des matrices poreuses et biodégradation des hydrocarbures pétroliers

Le piégeage est l'une des techniques d'immobilisation des cellules dans lesquelles les microorganismes sont enfermés dans une matrice polymère poreuse pour permettre la diffusion du substrat et du produit (**Martins et al., 2013**).

Par conséquent, le transfert de masse est l'un des principaux facteurs qui influent sur l'activité et l'efficacité des systèmes des cellules immobilisées (CI) (**Barreto et al. 2010**). Le piégeage implique l'inclusion de cellules dans un réseau polymère (piégeage de réseau), une membrane, ou une microcapsule (**Prenosil et al., 2009**).

Le piégeage par des gels et par des matrices poreuses préformées sont deux techniques différentes de piégeage cellulaire. Dans le piégeage par gel, la matrice poreuse est synthétisée in situ autour de la cellule, tandis que pour les systèmes préformés, les cellules diffusent dans la matrice poreuse préformée et croissent jusqu'à ce qu'elles soient immobilisées (**Ha, 2005**).

La technique de piégeage par gel confine les cellules microbiennes dans les pores d'une matrice. Les cellules piégées sont entourées d'une couche épaisse volumineuse (**Siripattanakul et Khan, 2010**).

Les matrices de piégeage sont reconnues comme étant plus durables que les matrices d'encapsulation et elles conviennent donc mieux aux applications environnementales.

Selon les matrices de piégeage utilisées, les techniques de piégeage par gel peuvent être catégorisées en gélification ionotrope de polymère polyionique par réticulation du polymère avec des cations multivalents (c.-à-d. alginate), gélification induite par la température (c.-à-d. agarose, gélatine), polymérisation organique par réaction chimique entre des monomères (c.-à-d. polyacrylamide) et précipitation par séparation de phase (c.-à-d. polystyrène) (**Siripattanakul et Khan, 2010**).

Il existe un certain nombre d'applications réussies de cellules piégées dans la biodégradation des eaux polluées par des hydrocarbures pétroliers, comme le montre le tableau 2.

Pour des applications environnementales (tableau 2), divers polymères naturels (agar, alginate, carraghénane et chitosane) et synthétiques (alcool polyvinylique, polyéthylène glycol, polyuréthane et polyacrylamide) ont été utilisés. Bien que les polymères synthétiques soient souvent considérés comme ayant une résistance mécanique et une durabilité supérieures, leur utilisation est limitée, car ils peuvent ne pas être souhaitables dans les applications environnementales (**Siripattanakul et al., 2008**).

Des lésions cellulaires peuvent se produire pendant la polymérisation des matrices synthétiques. Par exemple, la chaleur produite et les radicaux libres pendant la polymérisation du polyacrylamide influent sur l'activité cellulaire ( **Rosevear, 1984**).

Cependant, le piégeage cellulaire dans un polymère naturel en tant que matrice biodégradable peut être une méthode efficace pour l'introduction des micro-organismes dans l'environnement, ce qui est utile pour les applications dans le sol ( **Cassidy et al., 1996**). Pour cette raison, le gel d'alginate, un polymère naturel, a été le plus largement étudié dans la littérature.

Il a été démontré que l'immobilisation par la technique de piégeage présente des avantages notables par rapport aux systèmes des cellules libres, comme la protection des cellules contre le cisaillement des fluides, les environnements difficiles et la séparation facile des cellules ( **Willaert et Baron, 1996**).

Les limitations du transfert de masse, la stabilité mécanique limitée et la destruction de la structure du gel par la croissance cellulaire et/ou la production de dioxyde de carbone sont les principaux inconvénients du piégeage du gel comparativement à d'autres méthodes d'immobilisation ( **Moslemy et al., 2006; Siripattanakul et Khan, 2010**).

**Tableau 8 :** Résumé des études sur la technique de piégeage cellulaire pour la biorestauration des milieux pollués par les hydrocarbures pétroliers.

Classe	Contaminant	Matrice de piégeage	Micro-organismes	Moyen	Conc./ initial Dégradation	Références
Alcane	n-Alcane	Bouffée	<i>Pseudomonas C12B</i>	Aqueux	1 % (v/v) - 90 %	(Suzuki <i>et al.</i> , 1998)
	n-Alcane	Alginate	<i>Prototheca zopfii</i>	Aqueux	0,3 % (v/v)-100 %	(Yamaguchi <i>et al.</i> , 1999)
	n-Alcane	PUF, alginate	<i>Prototheca zopfii</i>	Aqueux	3 % (v/v) - 100 %	(Kuyukina <i>et al.</i> , 2006)
	Hexadécane	FPVA	<i>caoutchouc de Rhodococcus</i>	Aqueux	100 mM-51 %	(Barreto <i>et al.</i> , 2010)
	Hexadécane	Chitosane	<i>Bacillus subtilis</i>	Aqueux	1 % (v/v)-100 %	(Somerville <i>et al.</i> , 1977)
BTEX	Benzène	Polyacrylamide	<i>Pseudomonas putida</i>	Aqueux	0,1 % (p/v)-NR	(Paje <i>et al.</i> , 1998)
	Benzène	Alginate	<i>Rhodococcus sp.</i>	Aqueux	200 ppm-	(Parameswarappa <i>et al.</i> , 2008)
	Éthylbenzène	Gélose à l'alginate Polyacrylamide	<i>Pseudomonas fluorescens-CS2</i>	Aqueux	0,6 % (v/v)-NR	(Mulla <i>et al.</i> , 2013)
	2_Nitrotoluène	Gélose Alginate Polyacrylamide Alginate-PVA BOUFFÉE	<i>Micrococcus sp.</i> souche SMN-1	Aqueux	30 mM-74 %	(Tsai <i>et al.</i> , 2013)
					30 mM-79 % 30 mM-88 % 30 mM-100 % 30 mM-100 %	
HAP	Benzène	alginate d'APV	<i>Pseudomonas sp. YATO411</i>	Aqueux	52,7 ppm-99 %	(Ramteke et Gogate, 2016)
	Toluène	alginate d'APV	Boues activées	Aqueux	130 ppm-99 %	(Jiang <i>et al.</i> , 2015)
	BTX				30 ppm-100 %	(Chikhi <i>et al.</i> , 2016)
	BTEX	E420	<i>Comamonas sp. EMPLOI</i>	Aqueux	300 ppm-90 %	(Weir <i>et al.</i> , 1995; Weir et coll. 1996)
	Xylène	Alginate	<i>Streptomyces sp. AB1</i>	Aqueux	300 ppm-90 %	(Manohar et Karegoudar, 1998)
Phénanthrène	Alginate	<i>Pseudomonas sp. NGK1</i>	Sol	6,325 mg TPH-49%	(Jianlong <i>et al.</i> , 2001)	
				Naphtalène		Aqueux
	Quinoline	Gélose	<i>Burkholderia sp.</i>	Aqueux	75 mM-93 %	(Manohar <i>et al.</i> , 2001)
		Polyacrylamide			75 mM-89 %	
		Alginate			200 mg/L-100%	
Naphtalène	Alginate	<i>Pseudomonas sp. NGK1</i>	Aqueux	50 mM-100 %	(Jianlong <i>et al.</i> , 2002)	
	Gélose	<i>Burkholderia sp.</i>	Aqueux	50 mM-100 %		
Quinoline	BOUFFÉE			hybride BPVA-PVA-gauze	Aqueux	50 mM-100 %
	Polyacrylamide	50 mM-100 %				

(Suite à la page suivante)

Classe	Contaminant	Matrice de piégeage	Microorganismes	Moyen	Conc./ initial Dégradation	Références
HAP	Naphtalène	Alginate	<i>Pseudomonas sp.</i>	Aqueux	75 mM-80 %	(Abou Seoud et Maachi, 2003)
	Phénanthrène	BPVA	<i>Zoogloea sp.</i>	Sol	100 mg/kg-87%	(Li <i>et al.</i> , 2005)
	Pyrène	Polyvinylpyrrolidone	<i>Rhodococcus erythropolis B4</i>	Aqueux	100 mg/kg-75,4%	(Djefal-Kerrar <i>et al.</i> , 2007)
	Naphtalène				0,15-53,4 %	
	Anthracène	APV	<i>Candida tropicalis</i>	Sol	0,1-69,7 %	(Wang <i>et al.</i> , 2007)
	Pyrène				100 mg/kg-67%	
	Naphtalène	Alginate	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Aqueux	25 mM-34 %	(Feijoo-Siota <i>et al.</i> , 2008)
	Phénanthrène	Alginate	<i>Pseudomonas sp. UG14Lr</i>	Sol	100 mg/kg (20-100%)	(Somtrakoon <i>et al.</i> , 2009)
	Phénanthrène	Alginate	<i>Sphingomonas sp.</i>	Aqueux	100 mg/L-99,8 %	(Tao <i>et al.</i> , 2009)
	Pyrène	Alginate	<i>Mycobacterium frederiksbergense</i>	Aqueux	100-1 000 mg/L	(Sarma et Pakshirajan, 2011)
	Phénanthrène	APV	<i>Consortium microbien</i>	Aqueux	500 ppm-80 %	(Partovinia et Naeimpoor, 2013)
	Cinq HAP	Alginate	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Aqueux	2,5 mg/L-(75-99%)	(Wang <i>et al.</i> , 2013)
	Phénanthrène	Gélose	<i>Pseudomonas stutzeri CECT 930</i>	Aqueux	100 mM-81 %	(Ferreira <i>et al.</i> , 2015)
MIXTE hydrocarbure	Naphtalène	Polyacrylamide	<i>Bacillus fusiformis</i>	Aqueux	100 mM-87 %	(Lin <i>et al.</i> , 2014)
		Alginate			100 mM-92 %	
	Pyrène	APV	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> PYR1, <i>Acinetobacter baumannii</i> INP1	Sol	100 mM-94 %	(Huang <i>et al.</i> , 2016)
		Alginate-PVA-Argiles poudre de cendre d'APV			25-150 mg/L-100%	
	Pyrène	diatomite à oxyde de polyvinyle	<i>Herbaspirillum souche FA1 de chlorophenolicum</i>	Aqueux	200 mg/L-70,7 %	(Xu et coll., 2016)
HAP	PUF- acétogènes anacées	<i>Pseudomonas monteilii P26</i>	Aqueux	50 mg/L-95,5 %	(Alessandrello <i>et al.</i> , 2017)	
MIXTE hydrocarbure	Benzo[a]pyrène	Cendres de charbon-APV	<i>Pseudomonas sp.</i>	Sédiment	92,5-99 %	(Alessandrello <i>et al.</i> , 2017)
		Chitosane			200 ng/g - 71,9 %	(Jin <i>et al.</i> , 2017)
MIXTE hydrocarbure	Pétrole brut	BOUFFÉE	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Aqueux	200 ng/g - 58,9 %	(Oh <i>et al.</i> , 2000)
	Pétrole brut	Gélose-Alginate	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Aqueux	0,2 % (p/v)-57 %	(Zinjarde <i>et al.</i> , 2000)

Essence

Gomme Gellane

Groupeement bactérien

Aqueux

600 ppm-67 %

(Moslemy *et al.*, 2002)

## 8 Facteurs influençant la technique de piégeage cellulaire

La performance du système de CI dépend de la matrice (c.-à-d. le type et la concentration du support, le temps de gélification, la taille des particules, l'effet des additifs, etc.) ou des micro-organismes (c.-à-d. le type de micro-organisme, la densité cellulaire et la charge) (**Partovinia et Rasekh, 2018**).

### 8.1. Type de support et concentration

Pour des applications environnementales, un large éventail de polymères a été examiné pour développer des matrices pour l'immobilisation cellulaire. Parmi les matrices étudiées, l'alginate (polymère naturel), le polyuréthane et l'alcool polyvinylique (PVA) (polymères synthétiques) ont été les plus largement utilisés par de nombreux chercheurs dans la biorestauration des environnements pollués par les hydrocarbures (**Partovinia et Rasekh, 2018**).

### 8.2. Granulométrie du gel

Bien que les matrices polymériques puissent être préparées sous différentes formes et dans une large gamme de tailles de particules, la forme la plus générale est généralement constituée de petites billes polymériques d'environ 0,5 à 5 mm de diamètre. La limitation du transfert d'oxygène est le principal problème des phénomènes de transport dans les systèmes de CI. **Ogbonna et al. (1991)** ont constaté que les limitations en oxygène peuvent être surmontées par une réduction de la taille des billes (0,2-1,2 mm). De plus, dans certains cas, il a été démontré que l'augmentation de la taille des particules de billes, et de la densité cellulaire à l'intérieur des billes a réduit la diffusion du substrat. Par exemple, **Ausheva et al. (2008)** ont observé que la biodégradation des hydrocarbures diminuait avec une augmentation de la taille des billes d'alginate de 300 à 1200 mm. **Jian-long et al. (2001)** ont également observé une réduction de 30 % de la biodégradation de la quinolone avec une augmentation de la taille des billes d'alginate de 3 à 5 mm. (2011) ont signalé que les taux de biodégradation du pyrène étaient de 0,252, 0,315 et 0,058 mg/L/j pour les billes d'alginate de taille 300, 700 et 1 400 mm, respectivement. En général, des études récentes ont montré que l'augmentation de la taille des billes a entraîné une diminution de la diffusion du substrat.

### 8.3. Densité cellulaire dans les billes

Les résultats de certaines études suggèrent que la vitesse de diffusion est diminuée par l'augmentation de la densité cellulaire dans les billes (**Cassidy et al., 1997**). La croissance

cellulaire dans la bille, notamment à proximité de la surface extérieure, peut obstruer les pores de la bille de gel, qui peuvent être une raison de la limitation de diffusion du substrat.

#### **8.4. Libération des cellules à partir des supports immobilisés**

Certaines études ont rapporté que les systèmes de CI peuvent être utiles pour la biorestauration des sols et les eaux contaminés si les cellules, après adaptation à l'environnement, sont libérées des porteurs pour inoculer le sol ou l'eau. **Moslemy *et al.* (2006)** ont démontré que les supports à pores de petite taille conviennent à l'utilisation dans des bioréacteurs en raison de la libération de cellules réduite au minimum et cela peut diminuer le risque du colmatage cellulaire au bioréacteur; cependant, les supports à porosité élevée étaient meilleurs pour les applications sur le terrain que ceux à porosité réduite. Dans l'ensemble, ils ont proposé les polymères naturels ayant une grande taille de pores et un potentiel élevé de biodégradation.



# **Chapitre II : Matériel et méthodes**

---

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet du traitement biologique (en utilisant des bactéries immobilisées) sur les paramètres physico chimiques des eaux polluées et d'examiner son efficacité à dégrader les hydrocarbures .Cette étude a été effectuée au niveau de deux sites distincts : la station d'épuration « Effluent Treatment Plant »(ETPII) et le laboratoire technique de la raffinerie de Skikda (**RA1k**) situé dans l'enceinte de la zone industrielle ( **36° 52' 28" nord, 6° 58' 34" est**) durant une période qui s'est étalée du 24-04-2022 au 12-05-2022.

## **1 Echantillonnage**

L'échantillonnage a été effectué au niveau de la station d'épuration « Effluent Treatment Plant »(ETPII) de la raffinerie de Skikda (RA1k). Afin d'examiner la dégradation des hydrocarbures par des bactéries immobilisées, deux sites de prélèvements ont été choisis : au début et à la fin du procédé de traitement biologique. Les échantillons ont été prélevés selon les méthodes décrites dans la norme **NF M07-001**

### **1.1 Echantillon tous niveaux (filant) :**

Ce mode d'échantillonnage est effectué en faisant descendre une éprouvette bouchée aussi près que possible du niveau de soutirage. On enlève le bouchon par une secousse brusque de la corde ou de la chaîne, et on la remonte à une vitesse telle qu'elle soit remplie aux 9/10 environ de sa capacité lorsqu'elle émerge du liquide.

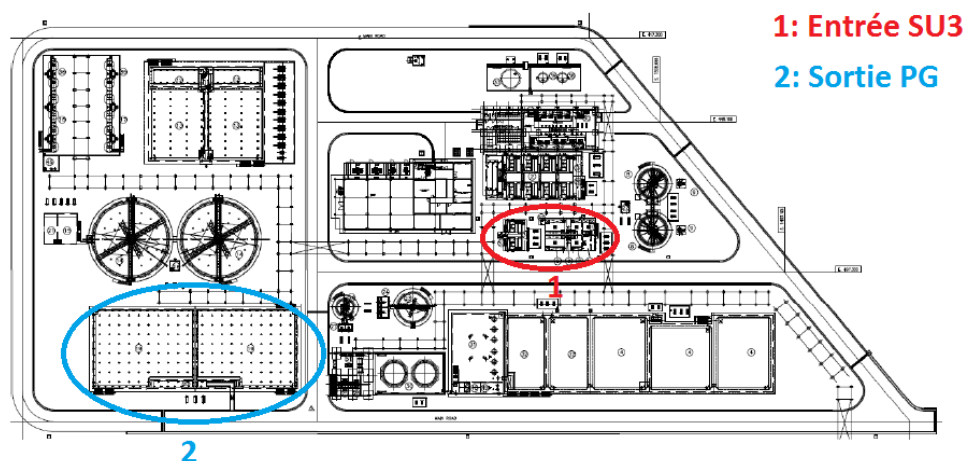
### **1.2 Echantillonnage du haut, milieu et bas HMB**

On descend la bouteille ou l'éprouvette bouchée au niveau voulu à savoir :

- L'échantillon du haut H : milieu du tiers supérieur du contenu du réservoir ;
- L'échantillon du milieu M : milieu du contenu du réservoir ;
- L'échantillon du bas B : milieu du tiers inférieur du contenu du réservoir.

On enlève le bouchon par une secousse brusque de la corde ou de la chaîne, et on laisse la bouteille ou l'éprouvette se remplir complètement au niveau choisi, à ce moment on remonte la bouteille ou l'éprouvette.

Les sites des prélèvements sont entourés de rouge et bleu.



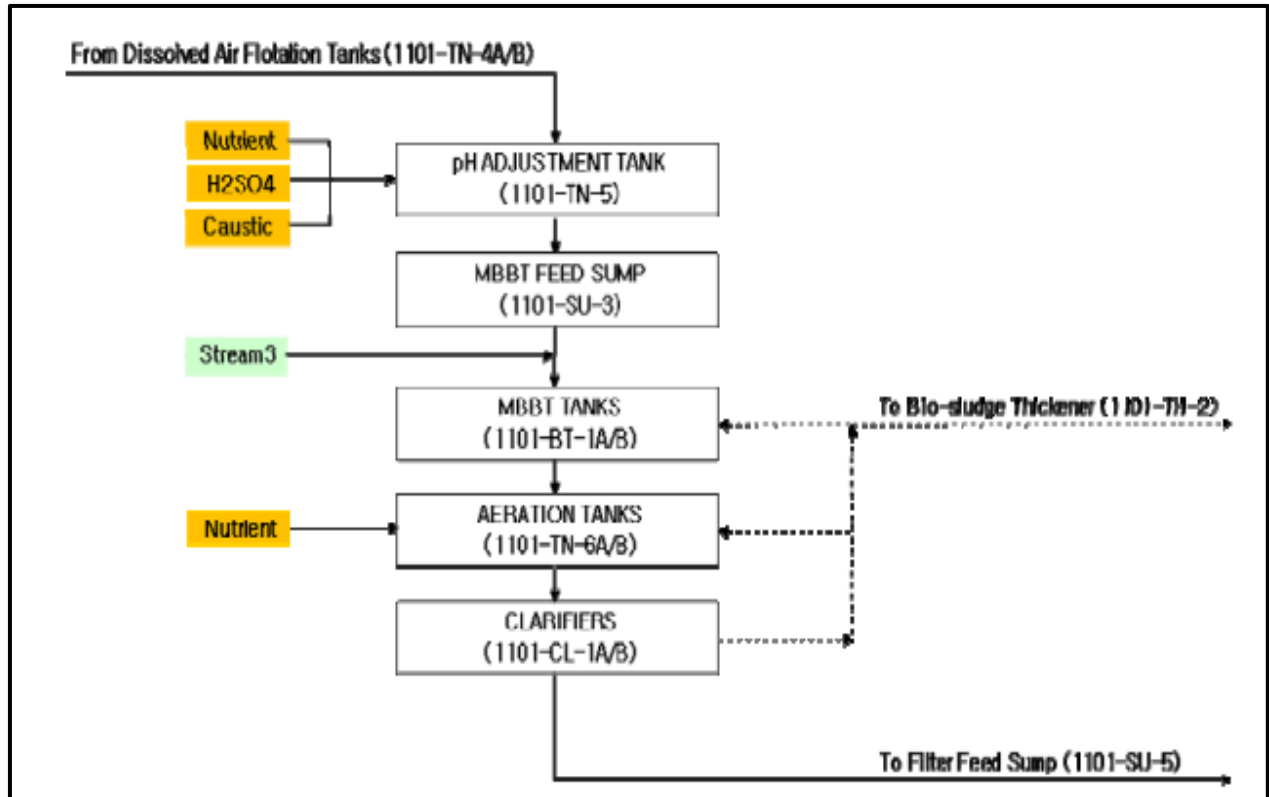
**Figure 4 :** schéma de la station d'épuration (ETPII) de la raffinerie de Skikda (RA1k) (ETPII, 2012) Modifier

## 2 Etapes de traitement

Selon les caractéristiques, les courants d'afflux demandent un traitement différent spécifique à chaque type de courant. Le traitement pour remplir l'exigence de qualité des effluents traités est divisé en traitement primaire, un traitement secondaire et traitement de polissage.

Après le traitement primaire qui inclut la réception des effluents avec installations nécessaires de puisard et de pompage pour les effluents reçus sous gravité, le traitement physique pour criblage et dessablage, l'enlèvement d'huile libre, l'égalisation des effluents, et le traitement physicochimique pour enlèvement d'huile émulsionnée.

Ensuite, les eaux traitées principalement, sont envoyés pour le traitement secondaire (traitement biologique) dans un réacteur filtrant sur lit mobile (MBBR). Cela inclut les procédés biologiques pour enlever **BOD**, **COD**, phénols, sulfures, ammoniac, Etc



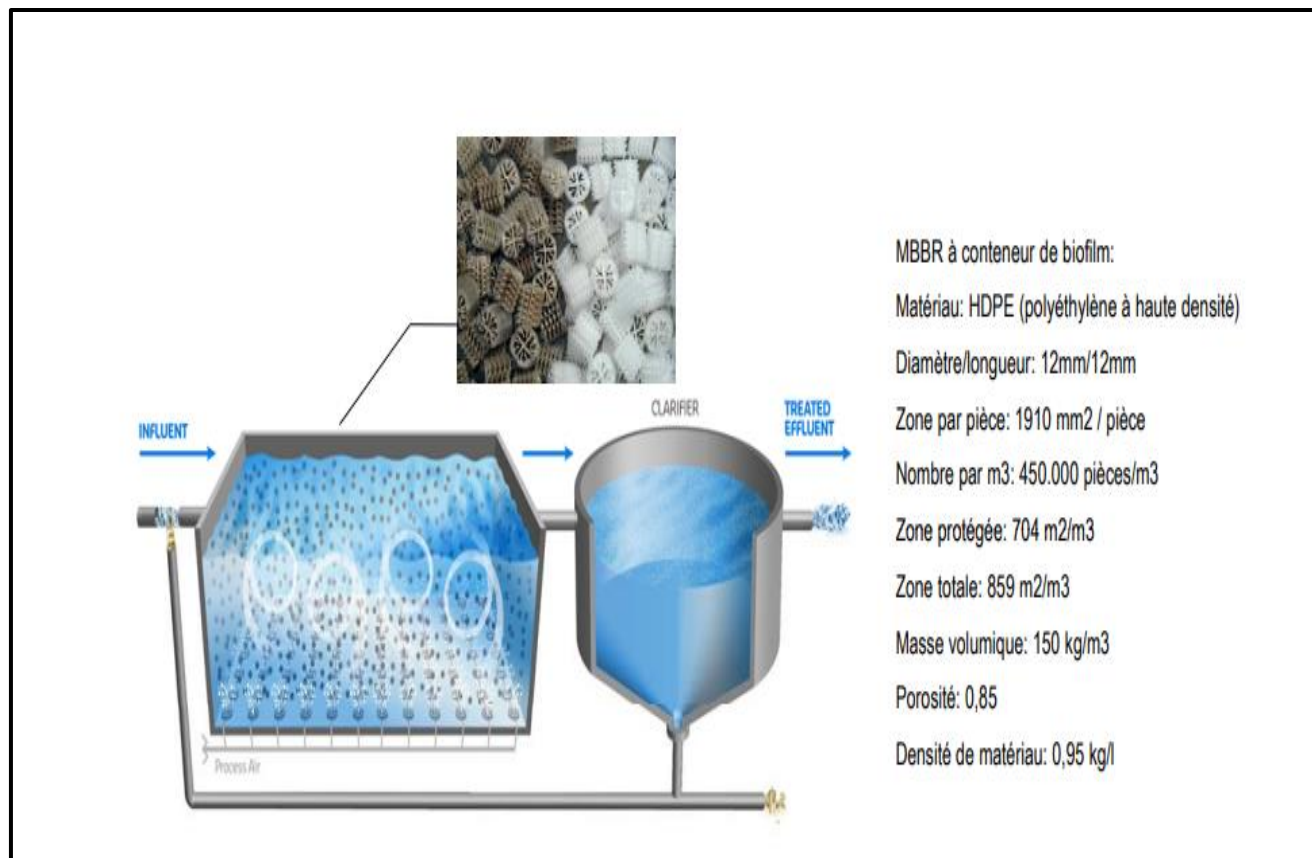
**Figure 5 :** Schéma de traitement biologique dans l'ETP, Raffinerie de Skikda, Algérie.

Afin d'accomplir l'enlèvement supplémentaire des solides en suspension (y compris DBO contribué par entraînement des flocons biologiques) et de réduire la DCO résiduelle, le traitement de polissage est employé pour les effluents. Cela concerne la filtration à sable de pression, l'adsorption à charbon activé et le bassin de protection et les installations de pompage des effluents traités pour le maintien, et l'élimination des effluents traités sont fournis à la fin.

### 3 Description du procédé et matériel biologique utilisé

Le procédé utilisé pour le traitement biologique des eaux polluées est la technologie de réacteur filtrant sur lit mobile (MBBR). Cette technique emploie des milliers de conteneurs de biofilm polyéthylène (des microorganismes immobilisées sur un support de polyéthylène) en opération en motion mélangée dans un bassin de traitement des eaux usées aérées. Chaque bio-conteneur individuel augmente la productivité en fournissant des zones de surface protégée pour aider la croissance de bactérie dans ses cellules. C'est cette population à haute densité de bactérie qui

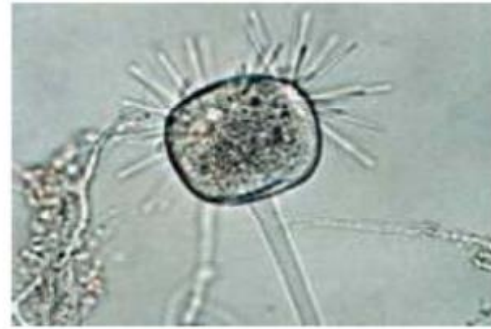
accomplit la bio- dégradation à haut degré dans le système, tout en fournissant également la fiabilité de procédé et la facilité d’opération.

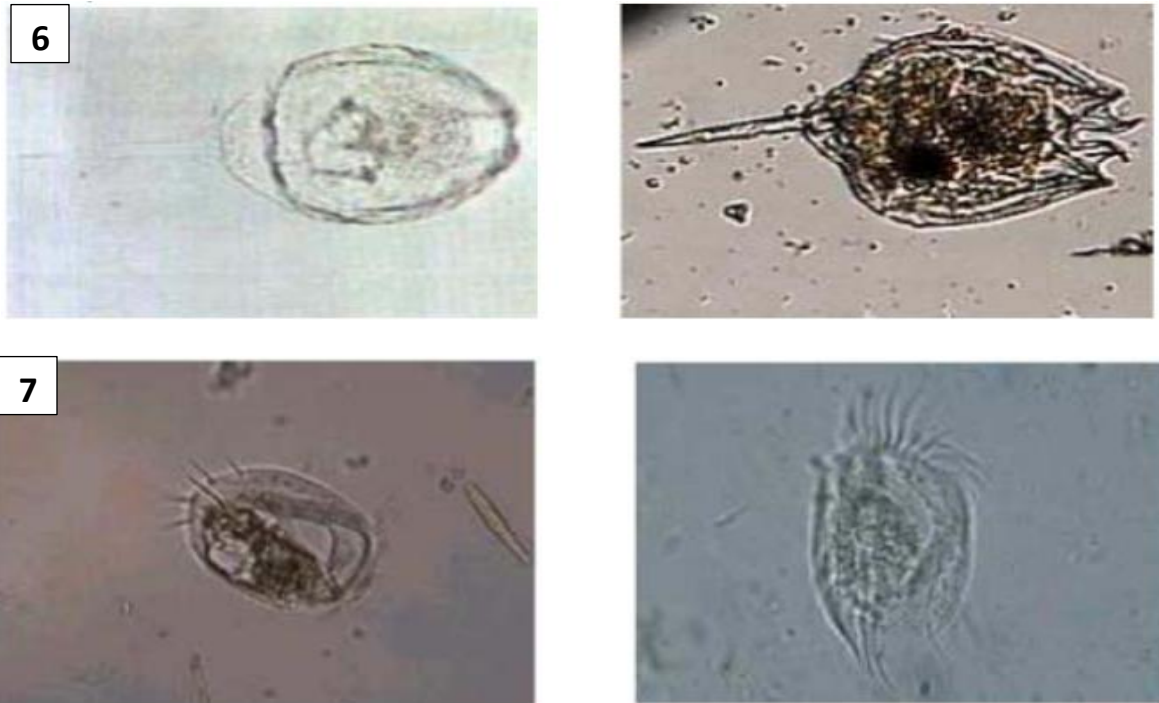


**Figure 6 :** Technologie de réacteur filtrant sur lit mobile (MBBR )

Les genres des bactéries immobilisées utilisées dans cette étude sont : *Vorticella*, *Podophrya*, *Paramecium*, *Rotaria*, *Arcella*, *Monostyla* et *Euplotes* . L’observation microscopique de chaque genre est montrée dans la figure suivante :







**Figure 7 :** Microorganismes utilisés : 1 : Vorticella, 2 : Podophrya, 3 : Paramecium, 4 : Rotaria, 5 : Arcella, 6 : Monostyla, 7 : Euplotes

#### **4 Analyse spectroscopie d'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en réflexion totale atténuée (ATR) des eaux polluées**

Cette analyse a été effectuée au niveau du laboratoire d'analyse Universal-lab, Alger. Au total, 1 ml des eaux polluées ont été analysés par spectroscopie FTIR en réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) en utilisant un spectromètre FTIR de la série Cary-600 (Agilent Technologies, Santa Clara, Californie) avec un ATR (MIRacle™ single reflection ATR) configuré avec une plaque diamant (Di) IRE (PIKE Technologies, Fitchburg, Wisconsin). Les acquisitions ont été réalisées en effectuant 32 balayages entre 4000 et 600  $\text{cm}^{-1}$ , avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Un spectre des conditions ambiantes (background) a été automatiquement soustrait par le logiciel Resolution Pro version 5.0 (Agilent Technologies) pour chaque spectre d'échantillon. Un lissage des spectres a été réalisé avec une largeur de fenêtre de 11 points en utilisant l'algorithme Savitzky–Golay. La correction de la ligne de base (en utilisant le filtre Savitzky–Golay : dérivée seconde avec une largeur de fenêtre de quatre points) et la normalisation vectorielle ont été appliquées à tous les spectres (Sala *et al.*, 2020).

## 5 Analyse physico-chimiques

Ces analyses ont été effectuées au niveau laboratoire technique de la raffinerie de Skikda (RA1k).

### 5.1 Mesure de pH et conductivité

La mesure du pH et la conductivité a été réalisée selon **la norme ASTM D1293**.

Le pH est en relation avec la concentration en ions hydrogène H<sup>+</sup> présents dans une eau, sa mesure est réalisée par une méthode potentiométrique. Le pH-mètre mesure donc la différence de potentiel existant entre une électrode de verre et une électrode de référence plongeant dans l'eau à analyser. D'après les lois de Nernst, cette différence est une fonction linéaire du pH. Tandis que la conductivité d'une solution est la mesure de la capacité des ions à transporter le courant électrique.

#### Mode opératoire

Allumer l'appareil et laisser se stabiliser et laver soigneusement les électrode avec de l'eau distiller, remplir le bécher avec l'eau à analyse, après cette étape immerger les électrodes dans l'échantillon et lire les valeurs du pH et la conductivité affichées sur l'écran après la stabilisation.

### 5.2 Le total des solides dissous (TDS):

Le total des solides dissous (TDS) est une mesure de la teneur combinée dissoute de toutes les substances inorganiques et organiques présentes dans un liquide sous forme de suspension moléculaire, ionisées ou microgranulaires. Les concentrations de TDS sont souvent rapportées en parties par million (ppm).

Pour déterminé ca valeur de (TDS) aussi on doit suivre la formule suivante :

$$TDS = \text{conductivité} \times 0.6$$

### 5.3 Titre alcalimétrique simple (TA) et titre alcalimétrique complet (TAC)

La mesure du titre alcalimétrique simple (TA) et le titre alcalimétrique complet (TAC) a été effectuée selon la norme ASTM-D 1067.

### 5.3.1. Titre alcalimétrique simple (TA)

Prelever 100ml d'échantillon dans un erlenmayer de 300 ml . Ensuite, ajouter 2 à 3gouttes de phénolphaléine. En présence de l'alcalinité (TA) , on obtient une couleur rose pale. Titrer avec l'acide sulfurique  $H_2 SO_4$  à 0.02 N jusqu'à la disparition de la couleur rose et noter le volume ( $V_a$ ) ml.

**Expression du résultat :**

$$TA \text{ en ppm de } CaCO_3 = V_a \times 10$$

### 5.3.2. Titre alcalimétrique complet (TAC)

A la même solution précédente, ajouter 2 à 3 gouttes d'indicateur mixte (couleur bleu),ensuite continuer à titrer avec l'acide sulfurique ( $H_2 SO_4$ ) à 0.02 N jusqu'à virage du bleu à la couleur rose pale et noter le volume ( $V_b$ ) ml.

**Expression du résultat :**

$$TAC \text{ en ppm de } CaCO_3 = V \times 10$$

Avec :  $V = V_a + V_b$

**Remarques importantes :**

**TA :** Correspond à la somme des hydroxydes  $[OH^-]$ + la moitié des carbonates  $\frac{1}{2} [CO_3^{++}]$ .

**TAC :** Correspond à la somme des hydroxydes  $[OH^-]$  ; des carbonates et bicarbonates  $[HCO_3^-]$

## 5.4 Détermination de la dureté totale (TH)

**Ce paramètre a été déterminé selon la norme ASTM D 1126**

C'est un titrage direct le sel disodique de l'acide éthylénediaminetétracétique ou (EDTA) qui forme avec les cations  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  des complexes ou chélates stables dans lesquels les cations sont dissimulés à leurs réactifs habituels. En présence de l'indicateur ériochrome ; noir T ; ces

complexes se colorent en rouge cerise, et vire au bleu quand la quantité d'EDTA a suffisamment complexé tous les  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  présents dans la solution.

On doit prendre 100 ml d'échantillon dans un erlenmeyer de 300 ml, on ajoute 2 ml de solution tampon et ensuite on ajoute une pincée d'indicateur noir ériochrome T.

Titre avec l'EDTA à 0.01M jusqu'au virage bleu de l'indicateur.

**Expression du résultat :**

$$TH \text{ en ppm de } \text{CaCO}_3 = V_{EDTA} \times 10$$

**Remarque importantes :**

La solution doit être tamponnée à pH=10.

## 5.5 Dureté calcique et manganèse

La dureté calcique et manganèse ont été déterminés selon la norme (ASTM D 511)

### 5.5.1 Détermination du calcium

Pour déterminer le taux du calcium, on doit prendre 100 ml d'échantillon ou une partie aliquote mineure diluée à 100 ml dans un erlenmeyer de 300 ml, puis on ajoute 2 ml de solution de NaOH à 1N. Ensuite, on agite et on ajoute une pincée d'indicateur murexide (de couleur rose foncée). On titre avec l'EDTA à 0.01 M, en agitant continuellement jusqu'au virage mauve clair, et noter  $V_{EDTA}$  le volume titré d'EDTA

**Expression du résultat :**

$$[\text{Ca}^{+2}] \text{ en ppm de } \text{CaCO}_3 = V_{EDTA} \times 10$$

### 5.5.2 Détermination du Magnésium

Par différence entre la dureté totale et la dureté calcique, on obtient la dureté du magnésium  $\text{Mg}^{2+}$  exprimée en ppm de  $\text{CaCO}_3$

$$[\text{Mg}^{+2}] \text{ en ppm de } \text{CaCO}_3 = \text{Dureté totale}(TH) - \text{dureté du calcium } \text{Ca}^{+2}$$

## 5.6 Détermination des chlorures (Cl<sup>-</sup>)

Cette analyse a été réalisée selon la norme ASTM- D512

### 5.6.1 Détermination des chlorures (Cl<sup>-</sup>) hautes teneurs

Pour la détermination des chlorures (Cl<sup>-</sup>) haute teneurs il faut introduire une prise d'essai de 100 ml dans un erlenmeyer, puis on ajoute 2 gouttes de chromate de potassium. Ensuite on titre avec la solution de nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>) à 0.02 N jusqu'au virage du jaune au rouge brique

#### Expression des résultats

$$[Cl^{-1}] \text{ en ppm} = (V - \text{blanc}) \times 7.1$$

Avec Blanc = 0.4

### 5.6.2 5.6.2. Détermination des chlorures (Cl<sup>-</sup>) faibles teneurs

Introduire une prise d'essai de 100 ml dans un erlenmeyer, ajouter 2 gouttes de bleu de bromophénol. Ensuite, ajouter goutte à goutte HNO<sub>3</sub> à 0.05 N jusqu'au virage du bleu au jaune clair, puis, ajouter 1 ml de Diphényle carbazone et titrer avec le nitrate de mercure Hg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> à 0.014 N.

Jusqu'au virage au violet, noter le volume v titré

#### Expression du résultat :

$$[Cl^{-1}] \text{ en ppm} = (V - \text{blanc}) \times 5$$

Avec Blanc = 0.1

## 5.7 Détermination du phosphate PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

Le phosphate a été déterminé selon la norme ASTM-D 515-72

Pour réaliser cette analyse, on doit introduire 100 ml d'échantillon dans un erlenmeyer 100 ml, après on ajoute 5 ml d'acide sulfurique à (37+63), 5 ml de molybdate d'ammonium et 5 ml d'acide amino naphthol sulfonique (ANS). Ensuite, on agite et on laisse reposer 5 minutes. La lecture des résultats a été effectuée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de ( $\lambda = 650$  nm).

**Expression du résultat :**

Lire sur le spectrophotomètre la concentration de  $[\text{PO}_4^{3-}]$  exprimée en ppm

**5.8 Détermination de la demande chimique en oxygène DCO**

On introduit 100 ml d'échantillon dans un erlenmeyer de 250 ml, puis on ajoute 5 ml d'acide sulfurique [1+3] et 10 ml de permanganate de potassium  $\text{KMnO}_4$  (0.01 N).

On fait bouillir pendant 10 minutes au bain de sable (si l'analyse devient marron ou incolore durant le chauffage, refaire l'analyse en procédant de la même façon mais en faisant une dilution à 50 % par exemple).

Après chauffage, on ajoute 10 ml d'acide oxalique 0.01 N, ensuite, on titrer la solution chaude avec du permanganate de potassium jusqu'à virage de la solution à une couleur rose persistante, et on prépare un blanc en parallèle en suivant les mêmes étapes que pour l'essai.

**Expression du résultat :**

$$\text{ppm } O_2 = \frac{8000(AB - CD)}{E} = V_t \times 0.8$$

**Avec :**

A: volume total verse de  $\text{KMnO}_4$  en ml.

B : normalité de  $\text{KMnO}_4$  (0.01 N).

C : volume d'acide oxalique en ml.

D : normalité de l'acide oxalique (0.01 N).

E : volume de l'échantillon en ml.

**Remarques importantes :**

- Le résultat doit être exprimé en g/t (gramme par tonne).
- Si une dilution a été réalisée, il faudra multiplier le résultat par le facteur de la dilution.

**5.9 Mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>)**

Pour mesurer la demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>), on rince la bouteille d'incubation avec l'échantillon, puis on introduit 250 ml d'échantillon dans la bouteille, on ajoute 1 ml de

FeCl<sub>3</sub>, 1 ml de CaCl<sub>2</sub>, 1 ml de MgSO<sub>4</sub>, et 1 ml de la solution tampon. On introduit l'agitateur magnétique dans la bouteille, et on met quelques pastilles de KOH dans le bouchon en plastique. On place la bouteille dans son compartiment et on visse la tête, on règle le zéro sur la réglette, après cinq jours d'incubation à 20 ° C. On lit directement sur la réglette la valeur, la DBO<sub>5</sub> (en mg/l d'O<sub>2</sub>).

**N.B :**

Pour des eaux fortement polluées, faire une dilution.

**5.10 Détermination des hydrocarbures dans les eaux**

Le taux des hydrocarbures dans les eaux a été déterminé selon le protocole décrit dans le manuel (oil content analyser OCMA-310)

On met l'appareil sous tension en appuyant sur l'interrupteur situé sur la partie arrière de l'appareil, et on laisse l'appareil se stabiliser pendant 30 minutes jusqu'à ce que **WARM UP** s'éteigne. On règle le zéro de l'appareil avec le solvant pur, selon le protocole suivant :

Prendre 10 ml de solvant **S-316** avec la seringue de 10 ml et l'introduire dans l'injecteur et fermer la capsule, ensuite presser sur **EXTRACT** et attendre 40 secondes, et après tourner le bouton **EXTRACT COCK** vers **OPEN**, une valeur apparaîtra sur l'écran, laisser se stabiliser et presser sur **MEAS** ; la mesure clignote jusqu'à stabilisation, **HOLD** s'allume, et drainer et refaire l'opération jusqu'à apparition du zéro.

**- Analyse de l'échantillon :**

A l'aide de la seringue de 10 ml prélever 10 ml de solvant **S-316** et l'introduire dans l'injecteur, puis ajouter 1 ou 2 gouttes d'acide chlorhydrique [ 1+1 ] à l'aide de la seringue de 20 ml prélever 20 ml d'échantillon et l'introduire dans l'injecteur et fermer la capsule de l'injecteur, presser sur **EXTRACT** et attendre 40 secondes, et on tourne le bouton **EXTRACTION COCK** vers **OPEN** et laisser se stabiliser et presser sur **MEAS** ;

la mesure clignote jusqu'à stabilisation, **HOLD** s'allume, et lire la valeur en **mg/l**, ensuite tourner le bouton **DRAIN COCK** sur la position **OPEN** et récupérer le contenu de l'injecteur dans un bécher propre pour le régénérer. Tourner le bouton **DRAIN COCK** et **EXTRACT COCK** sur la position **CLOSE**, et appuyer sur **ESC** pour retourner en mode mesure.

## **6 Analyse statistique**

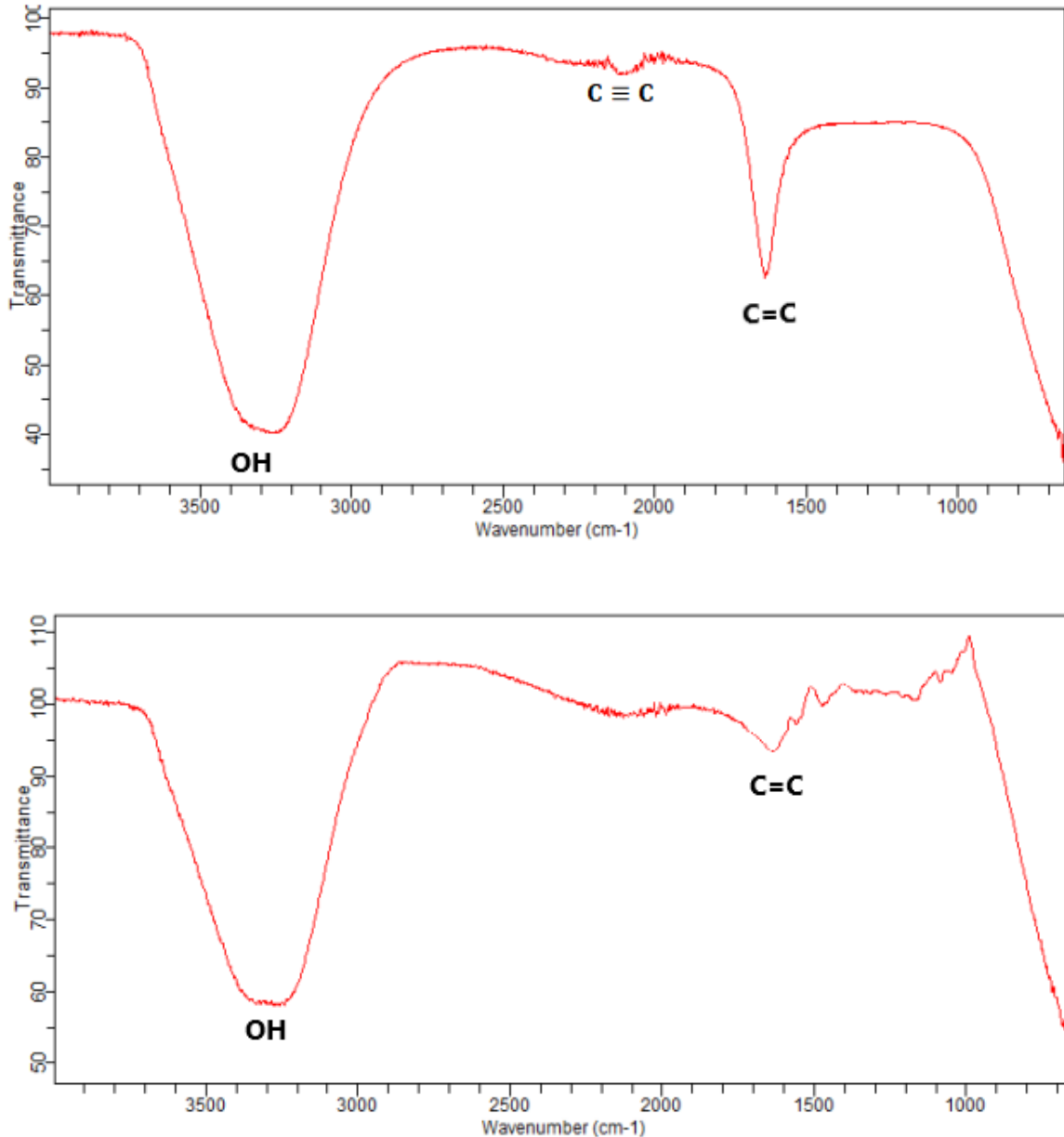
Les moyennes plus ou moins les écarts types des trois répétitions ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2013 (Microsoft Excel Version 3. 2013, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Les spectres FTIR ont été tracés par le logiciel Origin Pro 9.1. (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA). L'analyse de variance ANOVA à un seul facteur suivi par test post hoc – Tukey et la génération de la surface de réponse ont été réalisées par le logiciel STATISTICA 07.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Ok, USA).



# **Chapitre II :** **Résultats et discussion**

### 1 Analyse ATR-FTIR des eaux :

Les spectres ATR-FTIR des eaux avant et après épuration biologique en utilisant des bactéries immobilisées sont montrés dans la figure



**Figure 8 : Spectres ATR-FTIR des eaux polluées : 1 : à l'entrée de la station d'épuration biologique, 2 : sortie de la station d'épuration biologique**

Pour le l'eau polluée prélevée à l'entrée de la station d'épuration biologique, des bandes d'absorption sont apparues à 3300, 2100, 1 621cm<sup>-1</sup> et qui sont attribués aux liaisons : OH,

$C \equiv C$  et  $C = C$  respectivement.

Le premier pic représente la liaison OH lié de l' $H_2O$ , le deuxième pic correspond aux alcynes (des hydrocarbures possédant une instauration caractérisée par la présence d'une triple liaison carbone-carbone). Les divers hydrocarbures aliphatiques, tels que les n-alcanes, les iso-alcanes et les cyclo- alcanes ont été principalement représentés dans par le troisième pic (**Hughey *et al.*, 2007**).

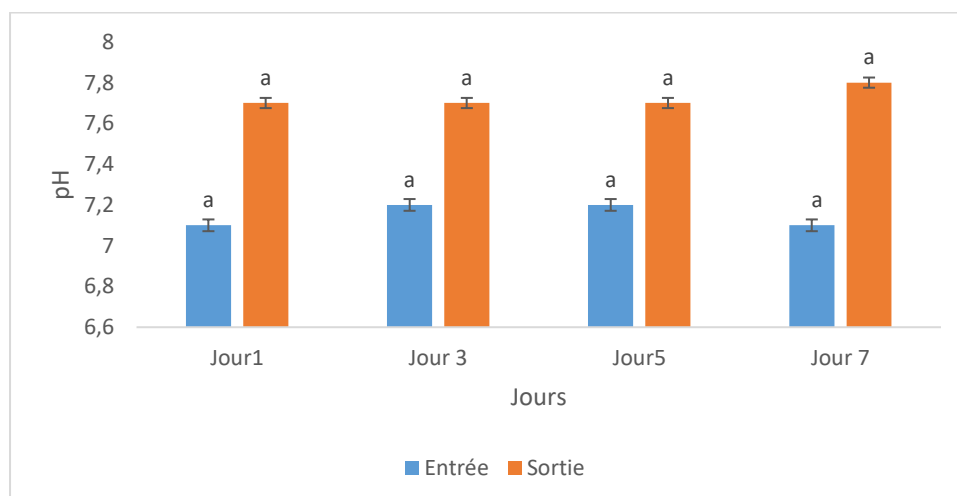
Une disparition des alcynes et une diminution de l'intensité du pic des hydrocarbures aliphatiques ont été enregistrées à la sortie de la station d'épuration biologique. Ce constat est peut-être dû à la biodégradation de ces composés par les micro-organismes immobilisés.

La biodégradation est le seul processus qui peut consommer des contaminants organiques et leurs substances. A l'échelle moléculaire, la biodégradation s'effectue par l'altération de groupes fonctionnels. En chimie organique, le métabolisme des alcanes à longue chaîne en alcool est généralement catalysé par des oxygénases et des peroxydases. Ensuite, l'alcool est converti en acides gras qui ont ensuite été oxydés en phase terminale pour former de l'acétyl-CoA. L'alcool secondaire est oxydé de manière subterminale pour former une cétone et un ester (**Fritsche et Hofrichter ,2005; Wentzel *et al.*, 2007, Yang *et al.*, 2019**).

## 2 Analyse physico-chimique des eaux :

### 2.1 pH :

La variation de pH durant les sept jours du traitement biologique sont enregistrés dans la figure 9 :



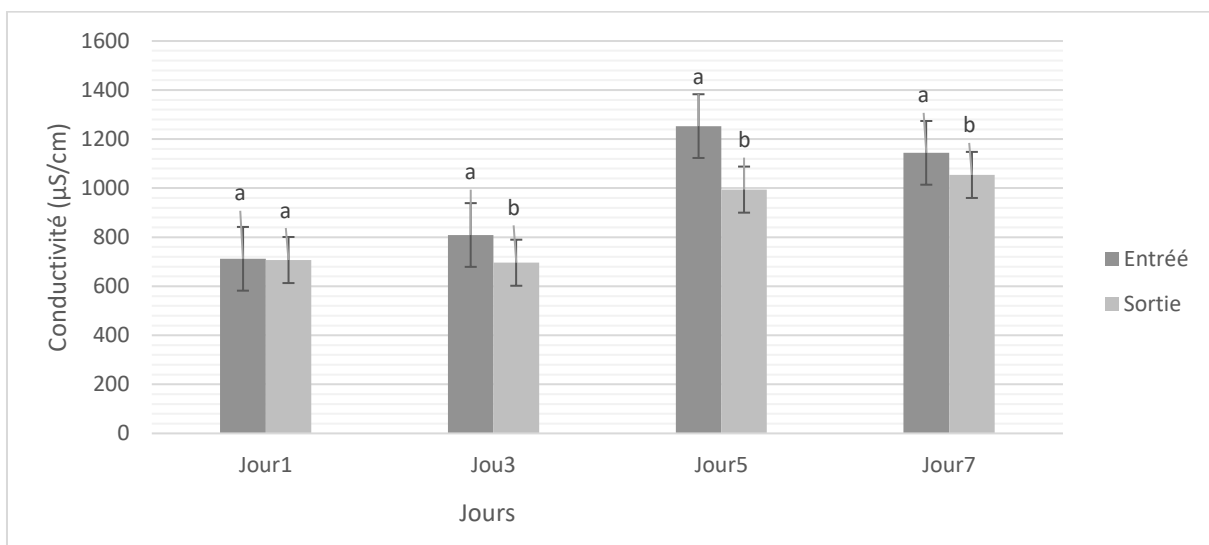
**Figure 9 : pH des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

Pour les échantillons prélevés dans le même jour, l'analyse ANOVA indique qu'il n'y a aucune différence significative ( $P > 0.05$ ) entre l'eau prélevée à l'entrée et à la sortie de la station d'épuration biologique. La gamme de pH souhaitable de l'eau prescrite par l'OMS (2021) est de 6,5 à 8. Les pH des échantillons d'eau collectés auprès des deux points (entrée et sortie de station d'épuration biologique) varient entre  $7,1 \pm 0,5$  et  $7,8 \pm 0,21$ . Dans les deux cas, les valeurs de pH se situent dans l'intervalle des pH autorisés.

Le pH est une mesure de l'acidité ou de l'alcalinité de l'eau et est une des mesures stables. Le pH est un paramètre simple mais est extrêmement important, car la plupart des réactions chimiques en milieu aquatique sont contrôlées par toute modification de sa valeur. Tout ce qui est très acide ou alcalin détruit les microorganismes. Les bactéries sont sensibles aux changements de pH et le traitement biologique nécessite un contrôle ou une surveillance du pH.

La toxicité des métaux lourds est également renforcée à certains moments pH. Ainsi, le pH a une importance primordiale dans le choix de la qualité des effluents des eaux usées.

## 2.2 Conductivité :



**Figure 10: Conductivité des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

Aucune différence significative a été obtenue entre les conductivités des échantillons prélevés avant et après le bio traitement de l'eau le jour 1. Une diminution de la conductivité a été enregistré après le traitement pour les jours (J3, J5 et J7) ( $P < 0,05$ ).

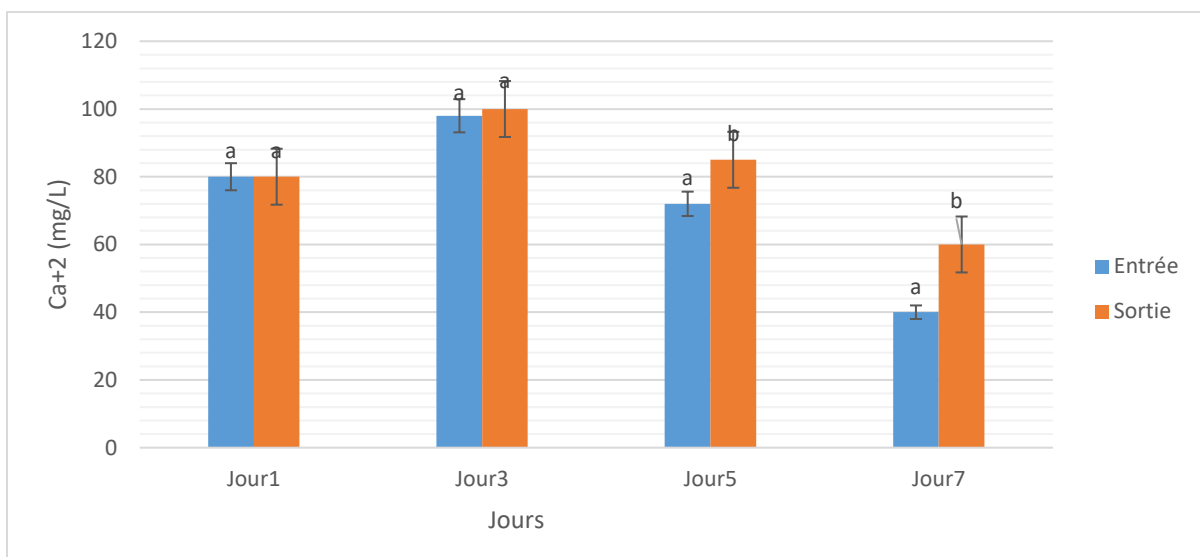
La conductivité électrique fait référence à la capacité de l'eau à conduire un courant électrique et elle est liée à la teneur en substances dissoutes, la charge ionique, la capacité d'ionisation,

la mobilité et la température. Ce paramètre renseigne sur le degré de minéralisation de l'eau, il varie en fonction de la concentration en sels dissous et il est souvent influencé par la température qui agit sur la dissolution des sels dans l'eau (Benrabah *et al.*, 2016).

La mesure de la conductivité électrique permet d'évaluer rapidement la minéralisation globale de l'eau et de suivre son évolution. Les valeurs de conductivité électrique obtenues varient entre  $712 \pm 0,48$  et  $1253 \pm 0,54 \mu\text{S}/\text{cm}$  (à l'entrée de la station d'épuration biologique) et entre  $707 \pm 0,09$ - $1054 \pm 0,53 \mu\text{S}/\text{cm}$  (à la sortie de la station d'épuration biologique). Ces valeurs sont inférieures à la limite autorisée qui est  $\leq 2500 \mu\text{S}/\text{cm}$ .

### 2.3 Calcium :

Les teneurs de  $\text{Ca}^{+2}$  échantillons prélevés avant et après le traitement biologique sont montrés dans la figure 11 :



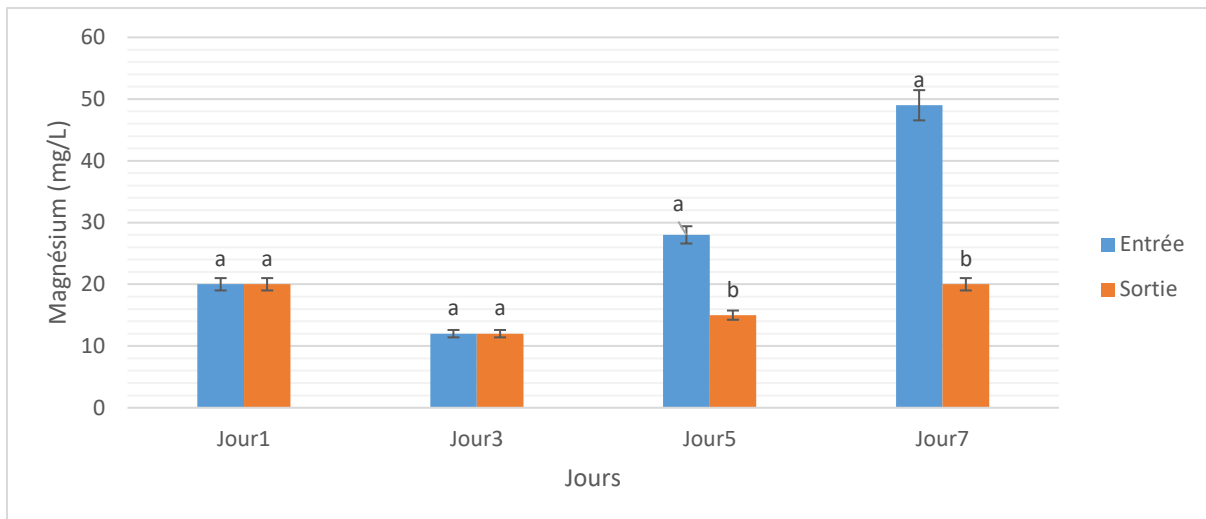
**Figure 11: Le taux de  $\text{Ca}^{+2}$  des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

Aucune différence significative a été obtenue entre les teneurs de calcium des échantillons prélevés avant et après le bio traitement de l'eau le jour 1 et le jour 3. Une augmentation de ce paramètre a été enregistrée après le traitement pour les jours (J5 et J7 ( $P < 0,05$ )).

Le calcium est le principal composant de la dureté de l'eau. Dans nos échantillons d'eau, les teneurs en calcium varient de  $40 \pm 0,08 \text{ mg}/\text{L}$  à  $98 \pm 0,13 \text{ mg}/\text{L}$  (avant le traitement biologique) et de  $60 \pm 0,2$ - $100 \pm 0,25 \text{ mg}/\text{L}$  (après traitement biologique) (Figure 11). Aucune de ces eaux n'a donc une concentration supérieure que la norme qui est  $\leq 200 \text{ mg}/\text{L}$ .

### 2.4 Magnésium :

Les teneurs de  $\text{Mg}^{+2}$  échantillons prélevés avant et après le traitement biologique sont montrés dans la figure 12 :



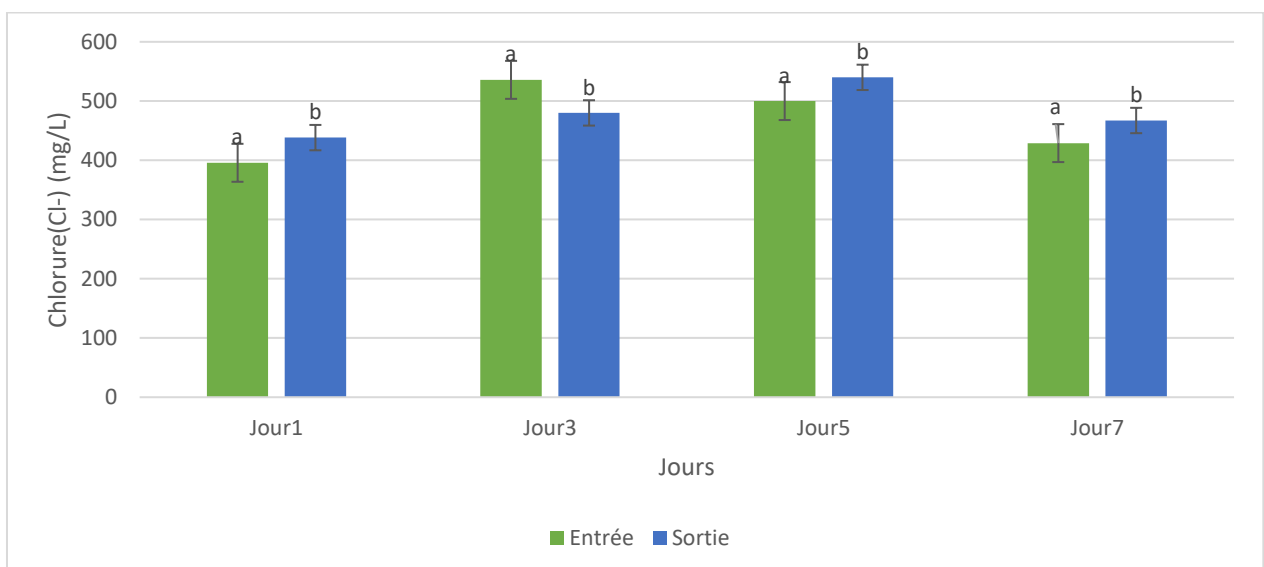
**Figure 12 : Le taux de Mg+2des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

Aucune différence significative a été obtenue entre les teneurs de magnésium des échantillons prélevés avant et après le bio traitement de l'eau le jour 1 et le jour 3. Une diminution de ce paramètre a été enregistrée après le traitement pour les jours (J5 et J7 ( $P < 0,05$ ))

Le magnésium est le deuxième élément le plus important dans la dureté de l'eau après le calcium (Hassoune *et al.*, 2006). Les teneurs enregistrées sont de  $(12 \pm 0,02 - 49 \pm 0,04 \text{ mg/ml})$  pour les échantillons prélevés à l'entrée de la station d'épuration biologique et de  $12 \pm 0,02$  à  $20 \pm 0,05 \text{ mg/L}$  à la sortie de ce traitement (figure 12). Ces niveaux sont inférieurs à la norme acceptée par l'OMS pour le magnésium, qui est de  $50 \text{ mg/L}$ .

## 2.5 Chlorure :

Les teneurs de chlorure enregistrées sont mentionnées dans la figure 13 :

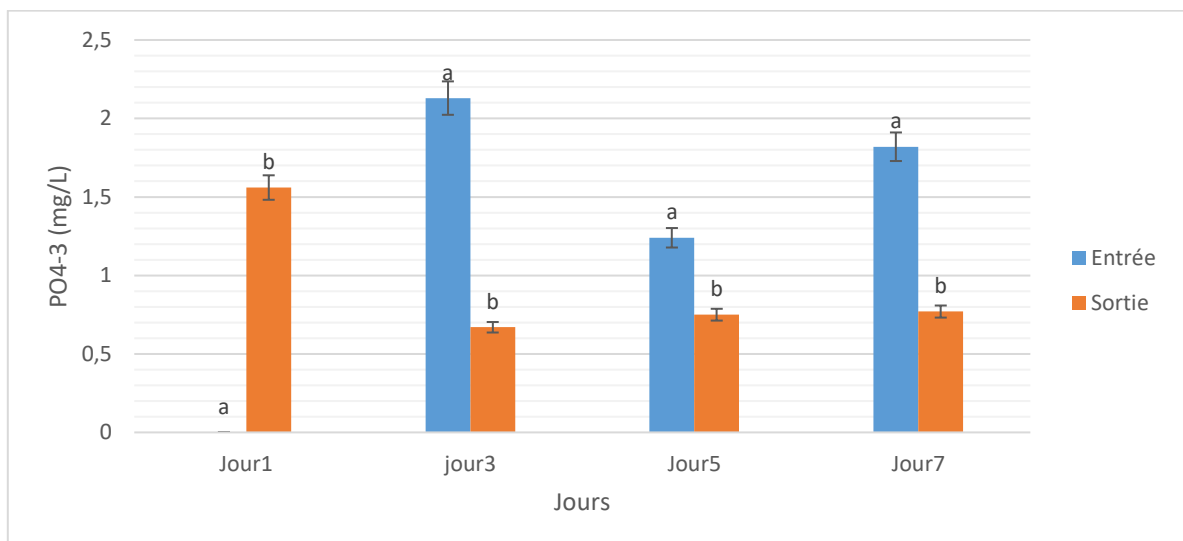


**Figure 13 : Le taux de Cl<sup>-</sup> des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

Une différence significative ( $P < 0,05$ ) a été enregistrée entre les teneurs en chlorure entre le début et la fin de l'épuration biologique d'eau. La teneur en chlorure dans les échantillons d'eau variait entre  $395,8 \pm 0,25$  mg/L et  $540 \pm 0,15$  mg/L (Figure 13), ce qui est au-dessus de la limite acceptable de 250 mg/L fixé. Cet excès de chlorure dans l'eau n'est pas particulièrement nocif et les critères fixés pour cet anion sont basés principalement sur l'appétence et sa corrosivité potentiellement élevée (Yang *et al.*, 2019).

## 2.6 PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> :

Le taux de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> avant et après le traitement biologique :



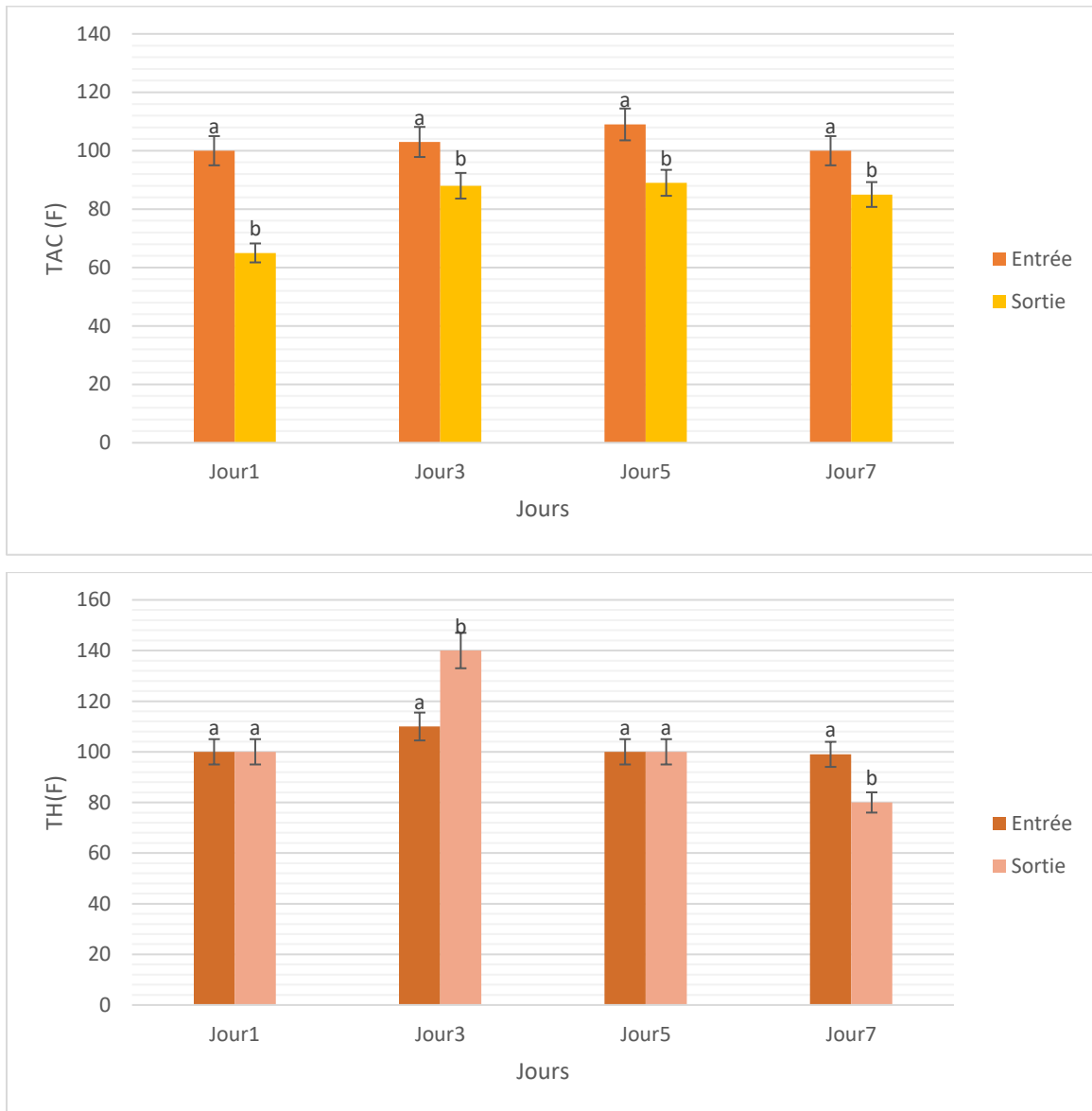
**Figure 14 : Le taux de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

Il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les teneurs en PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> des échantillons prélevés au début et la fin du traitement. Des teneurs de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> relativement supérieures à la limite autorisée (0,1mg/L) ont été enregistrées avant et après le traitement biologique. Le phosphore, sous sa forme soluble bio assimilable, est un élément nutritif essentiel pour les microorganismes. Celles-ci assimilent généralement le phosphore sous forme d'orthophosphates. La précipitation chimique des phosphates se fait principalement avec le fer, le calcium ou le manganèse. Ces précipitations chimiques dépendent du pH. L'adsorption des phosphates sur les matières en suspension et sur les sédiments se fait par des liaisons physiques de type Van Der WAALS ou chimiques par échanges de ligands OH<sup>-</sup> des

complexes hydroxométalliques Elle est influencée par la température et par le pH (Maisarah *et al.*, 2020).

### 2.7 TH, TA et TAC :

Des valeurs de TA  $<0.5^{\circ}\text{F}$  ont été obtenus pour tous les échantillons analysés. Les résultats de détermination des trois paramètres TH, TAC sont rapporté dans la figure15 :



**Figure 15 : Le taux de TAC et TH des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique .**

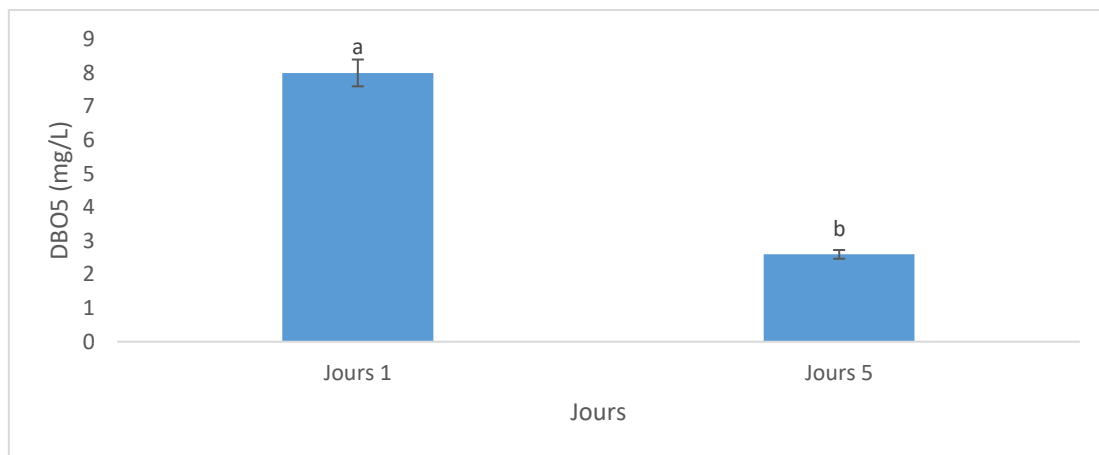
Pour le TAC, il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les échantillons prélevés au début et la fin du traitement.

Aucune différence significative ( $P > 0,05$ ) a été obtenue entre les TH des échantillons prélevés avant et après le bio traitement de l'eau le jour 1 et le jour 5. Une diminution de la ce

paramètre a été enregistrée après le traitement pour les jours (J3 et J7 )( $P < 0,05$ ) .Le titre hydrotimétrique varie de  $25 \pm 0,58$  F à  $55,63 \pm 0,14$  F ( $1 \text{ F} = 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ). Pour le titre alcalimétrique complet (TAC) les résultats montrent que la majorité de ces échantillons ont un TAC compris entre  $100 \pm 0,8$  F et  $109 \pm 0,88$  F (avant le traitement) et ( $65 \pm 0,45$  et  $89 \pm 0,21$  F) après le traitement. Les concentrations d'ions hydrogénocarbonate dans ces eaux sont très élevées pour provoquer la précipitation du carbonate de calcium, un sel très peu soluble, qui est à l'origine des problèmes d'entartrage les plus courants (Hadda, 2009).

## 2.8 DBO<sub>5</sub> :

Les résultats de mesure de DBO5 sont enregistrés dans la figure 16 :



**Figure 16 : Le taux de DBO5 des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

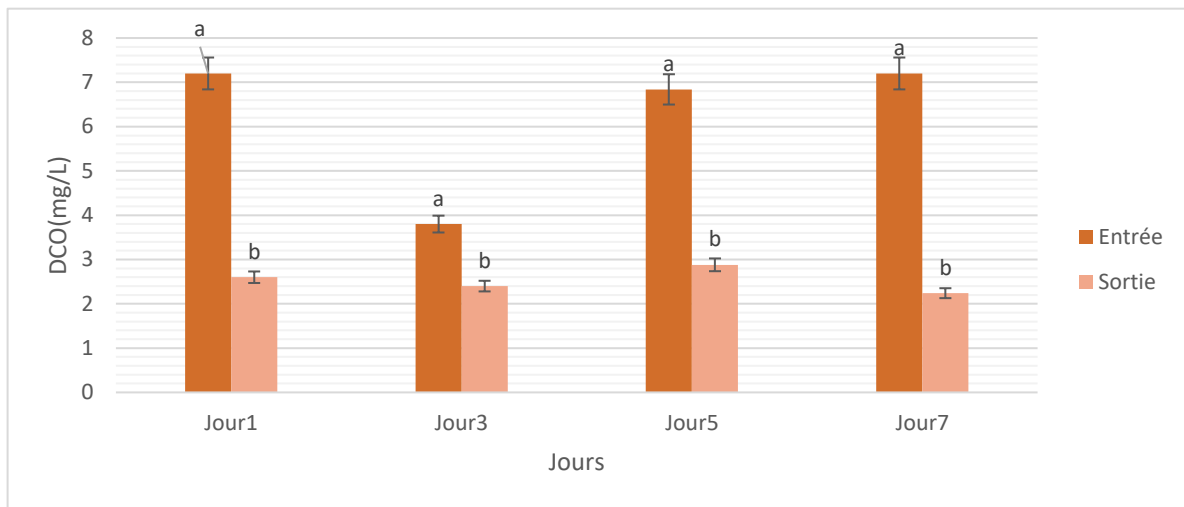
L'analyse ANOVA montre qu'il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les DBO5 des échantillons prélevés avant et après le bio traitement

La DBO (demande biochimique en oxygène) indique la quantité de matières biodégradables d'un effluent. Une augmentation de DBO5 peut être due à une pollution organique d'eaux usées industrielles. Selon le Département de la coopération technique des Nations Unies pour le développement la teneur en DBO5 maximale autorisée est  $< 100$  à  $300 \text{ mg/L}$ . Les données expérimentales de la présente étude montre une valeur de DBO5 de  $8 \pm 0,51 \text{ mg/L}$  à l'entrée de la station d'épuration et  $2,6 \pm 0,15 \text{ mg/L}$  à la sortie du traitement biologique (après 5 jours). Une diminution de la valeur de DBO5 a été constatée après l'épuration biologique, ce qui peut être dû à la biodégradation de la matière organiques par les bactéries utilisées dans ce type de traitement.

Ces valeurs sont étaient extrêmement inférieure à la limite autorisée. Il est important ici de noter qu'une faible teneur en DBO est un indicateur d'une eau de bonne qualité, tandis qu'une DBO élevée indique eau polluée.

## 2.9 DCO :

Les résultats de mesure de DCO sont enregistrés dans la figure 17 :



**Figure 1 : Le taux de DCO des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

L'analyse ANOVA montre qu'il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les DCO des échantillons prélevés avant et après le bio traitement

La DCO (demande chimique en oxygène) renseigne sur la totalité des matières oxydables mais ne donne aucun renseignement sur leur biodégradabilité. La DCO représente les ressources susceptibles de consommer de l'oxygène dans l'eau, par exemple les sels minéraux et les composés organiques. Plus généralement, la DCO représente l'ensemble des matières oxydables et la DBO 5 représente la part des matières organiques biodégradables.

Les valeurs moyennes biannuelles de DCO se situent entre  $3,8 \pm 0,25$  mg/L et  $5,2 \pm 0,18$  mg/ml pour les prélevés à l'entrée de la station d'épuration biologique et de  $2,24 \pm 0,08$  à  $2,88 \pm 0,08$  mg/L à la sortie de ce traitement. (figure17). On remarque que dans tous les échantillons recueillis de la station d'épuration biologique, les valeurs DCO sont inférieures à 4,0 mg/L, ce qui est un maximum admissible.

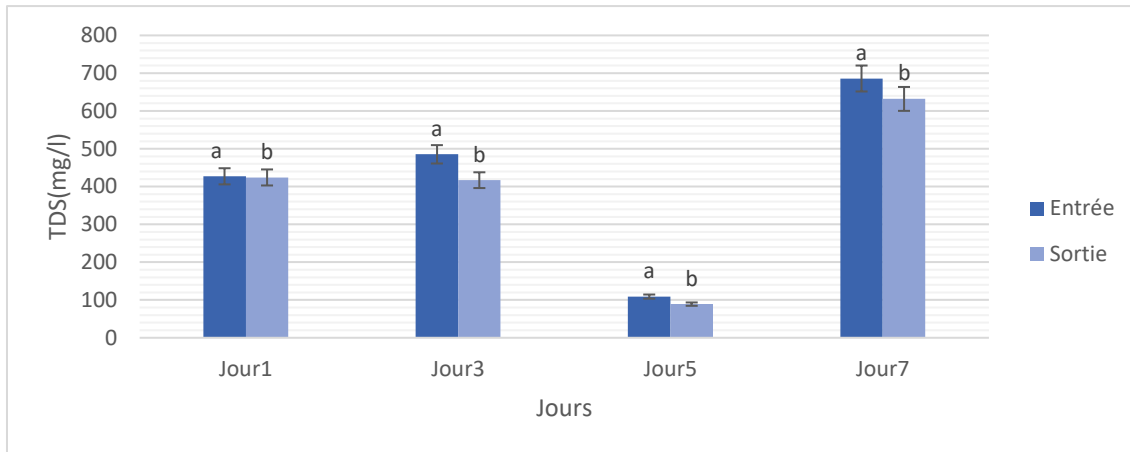
Le rapport DCO/DBO permet de qualifier la biodégradabilité d'un effluent :

- $DCO/DBO < 2$  : effluent facilement biodégradable ;
- $2 < DCO/DBO < 4$  : effluent moyennement biodégradable ;
- $DCO/DBO > 4$  : effluent difficilement biodégradable (Mouchet , 2021)..

Dans notre étude le rapport **DCO/DBO est inférieure à 2** ce qui indique que les effluents sont facilement biodégradable.

### 2.10 TDS :

Les résultats de mesure de TDS sont enregistrés dans la figure 18 :



**Figure 18 : Le taux de TDS des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

L'analyse ANOVA montre qu'il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les TDS des échantillons prélevés avant et après le bio traitement

La teneur en TDS dans l'eau est une mesure de la salinité. Un grand nombre de sels se trouvent dissous dans les eaux naturelles, les plus courants sont les carbonates, les bicarbonates, les chlorures, les sulfates, les phosphates et les nitrates de calcium, de magnésium, sodium, potassium, fer et manganèse, etc.

Une teneur élevée des éléments solides dissous affecte la densité de l'eau, influence l'osmorégulation de l'eau des microorganismes, réduit la solubilité des gaz (comme l'oxygène) et l'utilité de l'eau à des fins industrielles.

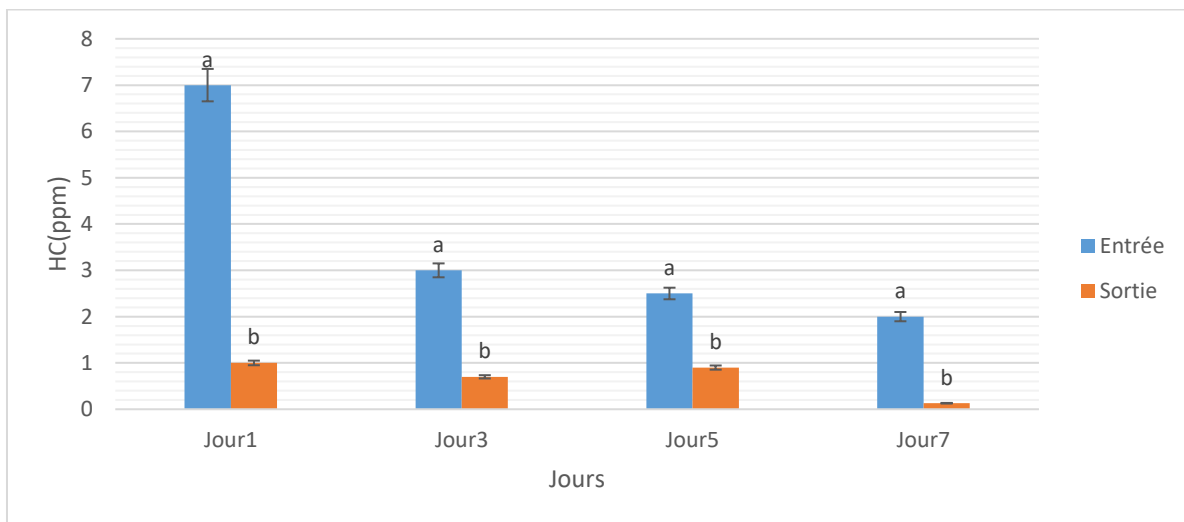
De fortes concentrations de solides dissous peuvent aussi avoir des effets techniques. Les solides dissous peuvent produire de l'eau calcaireuse qui laisse des dépôts et des couches sur les installations et à l'intérieur des tuyaux d'eaux chaudes et des chaudières. Les savons et les détergents produisent moins de mousse avec de l'eau calcaireuse qu'avec de l'eau douce. Les fortes quantités de solides dissous peuvent aussi tacher les appareils ménagers, corroder les tuyaux et avoir un goût métallique. L'eau calcaireuse use les filtres à eau plus rapidement dû à la quantité de minéraux dans l'eau (**Lokhande et al., 2011**).

Dans la présente étude, les de TDS varient entre  $109 \pm 0,2$  et  $686 \pm 0,14$  mg/L pour les échantillons prélevés à l'entrée de la station d'épuration biologique et de  $89 \pm 0,14$  à

632±0,12mg/L à la sortie de ce traitement. Ces valeurs de TDS sont inférieures à la limite autorisée (1200mg/L).

### 2.11 Hydrocarbures :

Les teneurs des hydrocarbures obtenus à l'entrée et la sortie de la station de bio traitement sont montrés dans la figure 19 :



**Figure 2 : Le taux des hydrocarbures des échantillons prélevés avant et après le traitement biologique**

Une différence significative ( $P < 0.05$ ) a été obtenus entre les échantillons prélevés à l'entrée et la sortie de la station d'épuration biologique. Une diminution du taux des hydrocarbures a été enregistrée après le traitement biologique, ce qui indique que les bactéries immobilisées ont dégradé ces composés. Ce constat confirme les résultats obtenus par l'analyse ATR-FTIR.

### 3 Analyse des composantes principales :

Les résultats de l'analyse des composantes principales ainsi que les vecteurs propres sont montrés la figure 20 :

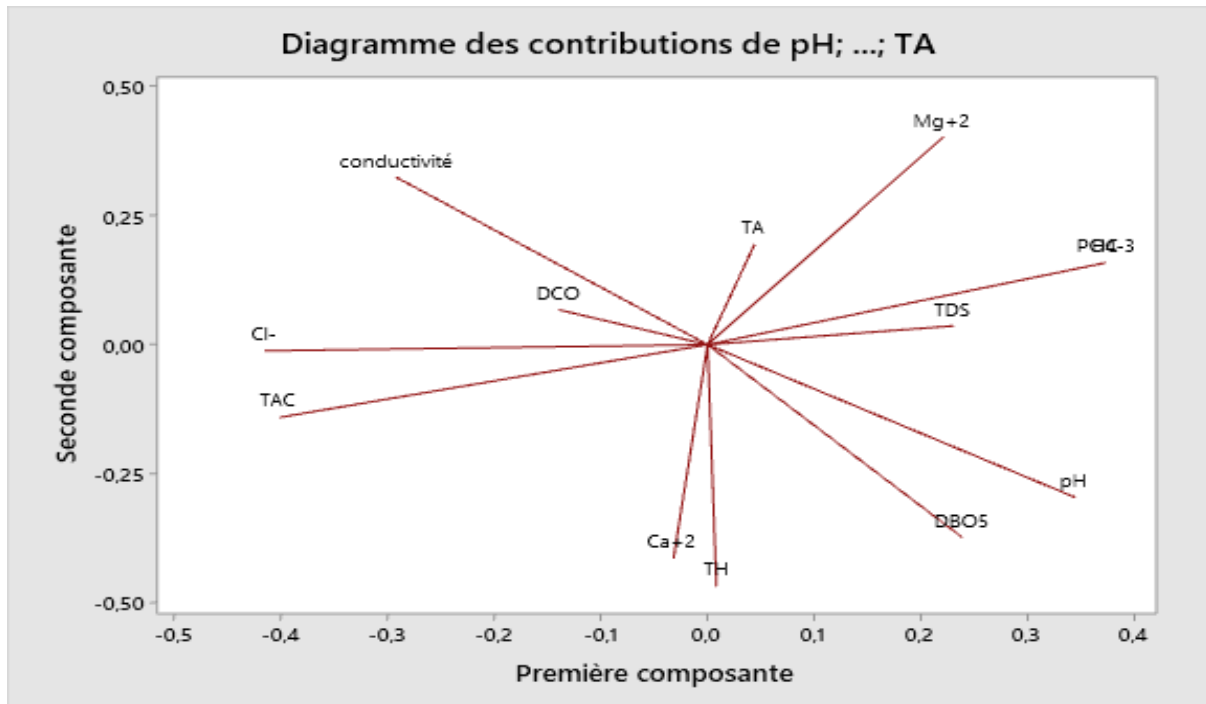


Figure 20: Analyse ACP

Ce type d'analyse peut identifier les paramètres les plus significatifs qui caractérisent tous les ensembles de données et les facteurs générateurs. L'analyse ACP est appliquée pour décrire la corrélation entre les paramètres mesurés et la biodégradation des hydrocarbures.

Dans ces résultats, la première composante principale présente une forte association positive avec HC,  $\text{PO}_4^{-3}$  et TDS et une association négative à  $\text{Ca}^{+2}$  et TH. La carte des variables montre que le taux des hydrocarbures dépend de la concentration de  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  et TDS et il est inversement corrélé  $\text{Cl}^-$  et TAC. Les paramètres ( $\text{Ca}^{+2}$  et TH) et ( $\text{DBO}_5$  et pH) sont fortement corrélés.

#### 4 Discussion :

La technologie qui utilise les bactéries immobilisés a donné des résultats importante concernant la dégradation des hydrocarbures, chose qui a été confirmée par le dosage des hydrocarbures et l'analyse ATR-FTIR. L'efficacité de la biodégradation (métabolisation des hydrocarbures) est influencée par des propriétés physicochimiques (Margesin *et al.*, 2007).

Les micro-organismes utilisés ont montré la capacité de dégrader à la fois les matières organiques et les contaminants inorganiques et de les utiliser pour leur croissance (comme source de carbone) et énergie (en tant que donneurs d'électrons). Les bactéries appartenant aux genres *Alcanivorax*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Helicobacter*, *Marinobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomaonas* et *Vibrio* (Widdel et Rabus,

2001 ; Roy *et al.*, 2002 ; Harayama *et al.*, 2004 ; Varjani, 2017), des genres fongiques comme *Aspergillus*, *Amorphoteca*, *Bjerkandera*, *Fusarium*, *Graphium*, *Neosartoria*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Sporobolomyces*, *Talaromyces* et levures des genres *Candida*, *Pichia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula* et *Yarrowia* (Leahy et Colwell, 1990 ; Boonchan *et al.*, 2000 ; Haritash et Kaushik, 2009) ont déjà été signalés comme étant capables de dégrader les hydrocarbures.

Les micro-organismes utilisent les hydrocarbures via trois principaux types de voies métaboliques telles que phototrophe, chimiotrophe (aérobie) et chimiotrophe (anaérobie) (Leahy et Colwell, 1990) .

L'oxydation bactérienne est une voie commune de dégradation des hydrocarbures des eaux. Dans le cas des hydrocarbures aliphatiques, la dégradation aérobie par les bactéries fait intervenir une oxydation séquentielle des groupements méthyles de la chaîne carbonée, produisant successivement l'alcool, l'aldéhyde ou la cétone, et l'acide gras correspondant. La voie la plus commune est celle de l'oxydation terminale de l'alcane, suivie d'une l' $\omega$ -oxydation. Mais une oxydation subterminale, ou biterminale, a déjà été observée. Par la suite les acides gras intègrent la voie de la  $\beta$ -oxydation ( Logeshwaran.*et al.*, 2018).

En aérobie , les groupes méthyle des n-alcane sont oxydés par les enzymes oxygénases pour former des alcools primaires. L'alcool primaire est ensuite oxydé en aldéhydes, qui sont ensuite oxydés en acides et dirigés vers la  $\beta$ -oxydation conduisant à la formation de dioxyde de carbone via le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). D'autre part, dans la dégradation anaérobie les bactéries sulfato-réductrices, les composés aromatiques sont initialement oxydés en phénols/acides organiques et transformés en acides gras (volatils, à longue chaîne) qui se métabolisent ensuite en méthane et en dioxyde de carbone (Abbasian *et al.*, 2015a; Wilkes *et al.*, 2016).

La dégradation microbienne des hydrocarbures est influencée par la classe chimique de ces composés : tels que les aliphatiques, les ramifiés, les cyclo-aliphatiques, les aromatiques (mono et poly). Par conséquent, les hydrocarbures sont classés selon la susceptibilité de la biodégradation comme suit : les n-alcane ordonnés > alcane ramifiés > aromatiques de faible poids moléculaire > alcane cycliques (Obbard *et al.*, 2004).

Plusieurs enzymes sont impliquées dans ce processus de biodégradation : l'alcane hydroxylase, monooxygénases et l'alcool déshydrogénase ( Logeshwaran.*et al.*, 2018).



# **Conclusion**

---

## Conclusion et Perspectives

Ce travail a pour objectif de tester l'efficacité d'une technologie innovante pour le traitement des eaux polluées par des hydrocarbures (la technologie de réacteur filtrant sur lit mobile (MBBR)).

Cette technique utilise des conteneurs de biofilm polyéthylène (des microorganismes immobilisés sur un support de polyéthylène) en opération en motion mélangée dans un bassin de traitement des eaux usées aérées.

Une analyse FTIR a été utilisée pour l'identification de matériaux organiques dans l'eau. Les modifications du motif caractéristique des bandes d'absorption indiquent clairement un changement dans la composition du matériau. Également Les paramètres physicochimiques (pH, conductivité,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ , TDS, TH, TA, TAC, DCO, DBO5) des eaux prélevées à l'entrée et la sortie de la station d'épuration ont été déterminés.

Afin de vérifier la corrélation entre le taux des hydrocarbures et les propriétés physicochimiques d'eau, une analyse des composantes principales (ACP) a été effectuée.

Les résultats obtenus ont montré que la technologie qui utilise les bactéries immobilisées a donné des résultats fiables concernant la dégradation des hydrocarbures, chose qui a été confirmée par le dosage des hydrocarbures et l'analyse ATR-FTIR. Une disparition des alcynes et une diminution de l'intensité du pic des hydrocarbures aliphatiques ont été enregistrées à la sortie de la station d'épuration biologique. Également, les taux de DBO, DCO et le dosage des hydrocarbures qui ont diminué après traitement. L'analyse ACP a montré que le taux des hydrocarbures est fortement corrélé à la concentration de  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  et TDS et il est inversement corrélé à  $\text{Cl}^-$  et TAC. Une corrélation entre les paramètres ( $\text{Ca}^{+2}$  et TH) et (DBO5 et pH) a été enregistrée.

Ces résultats pourraient servir comme données préliminaires à des analyses futures concernant la biodégradation des hydrocarbures par des bactéries immobilisées.

Mais, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie pour :

A l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie pour :

- ✓ Identifier et quantifier les hydrocarbures à l'entrée et la sortie de la station d'épuration par CPG et HPLC
- ✓ Isoler et identifier les composés néoformés
- ✓ Tester l'effet de chaque paramètre physicochimique sur la biodégradation des hydrocarbures



**Références  
bibliographiques**

- Abou Seoud, M., and Maachi, R. (2003).** Biodegradation of naphthalene by free and alginate entrapped *Pseudomonas* sp. *Z Naturforsch C*, 58:726–31.
- Ahearn, D. G. et Meyers S. P. (1976).** Fungal degradation of oil in the marine environment In: *Recent Advances in Aquatic Mycology*, E. B. Gareth Jones, 1 ère Ed. Elek Science, London, pp. 125-134.
- Alessandrello, M. J., Parellada, E. A., Juarez Tomás, M. S., Neske, A., Vullo, D. L., and Ferrero, M. A. (2017).** Polycyclic aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacterial cells using noncellulosic acetogenins for biofilm formation stimulation on polyurethane foam. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5: 189–95.
- Alvarez, J. P., and Illman, A. W. (2006).** *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models*. Hoboken, New Jersey, USA: Wiley-Interscience.
- Andriani, A., and Tachibana, S. (2016).** Lignocellulosic materials as solid support agents for *Bjerkandera adusta* SM46 to enhance polycyclic aromatic hydrocarbon degradation on sea sand and sea water media. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8: 310–20.
- Armentano, I., Arciola, C. R., Fortunati, E., Ferrari, D., Mattioli, S., Amoroso, C. F., and Visai, L. (2014).** The interaction of bacteria with engineered nanostructured polymeric materials: A review. *The Scientific World Journal*, 2014: 18..
- Atlas, R. M. (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Microbiol Rev*, 45 :180 – 209.
- Ausheva, K., Goncharuk, D., Babusenko, E., Nekhaev, S., Sulygova, Z., and Markvichev, N. (2008).** Development of a bacterial preparation based on immobilized cells. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*, 42:767–73.
- Balba MT., Al-awadhi N. and Al-Daher R., (1998).** Bioremediation of oil contaminated soil, microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*.32(2):155-164.
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R., (2010).** Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*.87(2):427-44.
- Barreto, R. V. G., Hissa, D. C., Paes, F. A., Grangeiro, T. B., Nascimento, R. F., Rebelo, L. M., Craveiro, A. A., and Melo, V. M. M. (2010).** New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. *Bioresource Technology*, 101, 2121–25..
- Bertrand J et al. (1993).** Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 168, 125-138.
- Blifert, C., Perraud, O. P. (2004).** *Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchets*. De Boeck université. P (369 ,372-375).
- Bonaventura C. et Johnson F.M. (1997).** Healthy environments for healthy people, *Bioremediation today and tomorrow*. *J. Environ. Health Perspec.* 105: 5-20
- Boonchan S., Britz ML. and Stanley GA ., (2000).** Degradation and mineralization of high molecular-weight polycyclic aromatic Hydrocarbon by defined fungal-bacterial coculture. *Appl Environ. Microbiol.* 66:1007-1019.
- Boopathy, R. (2000).** Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63–67.
- Bouderhem, (2011).** Université kasdi merbah de ouargla (2011), utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremediation des sols pollués par les hydrocarbures, magister 2011.

- Brinda Lakshmi, M., Muthukumar, K., and Velan, M. (2012).** Immobilization of *Mycoplana* sp.MVMB2 isolated from petroleum contaminated soil onto papaya stem (*Carica papaya* L.) and its application on degradation of phenanthrene. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 40: 870–77.
- Cassidy, M. B., Lee, H., Trevors, J. T. (1996).** Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16: 79–101.
- Cassidy, M. B., Mullineers, H., Lee, H., and Trevors, J. T. (1997).** Mineralization of pentachlorophenol in a contaminated soil by *Pseudomonas* sp. UG30 cells encapsulated in k-carrageenan. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19:43–48.
- Cerniglia CE.,(1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon . *Biodegradation* 3:351-368.
- Chen, B., Yuan, M., and Qian, L. (2012).** Enhanced bioremediation of PAH-contaminated soil by immobilized bacteria with plant residue and biochar as carriers. *Journal of Soils and Sediments*,12: 1350–1359.
- Chen, Y., Yu, B., Lin, J., Naidu, R., and Chen, Z. (2016).** Simultaneous adsorption and biodegradation(SAB) of diesel oil using immobilized *Acinetobacter venetianus* on porous material. *Chemical Engineering Journal*, 289: 463–70.
- Chikhi, S., Ferradji, F. Z., Badis, A., and Bouzid, B. (2016).** Microbial removal of xylene using free and immobilized *Streptomyces* sp. AB1: bioreactors application. *Desalination and Water Treatment*, 57:6148–56.
- Cubitto, M. A., and Gentili, A. R. (2015).** Bioremediation of crude oil-contaminated soil by immobilized bacteria on an agroindustrial waste–sunflower seed husks. *Bioremediation Journal*, 19: 277–86.
- Delille, D., Coulon, F., et Pelletier, E. (2004).** Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-antarctic soils. *Cold Reg Sci Technol.* 40:61–70.
- Deng, F., Liao, C., Yang, C., Guo, C., and Dang, Z. (2016).** Enhanced biodegradation of pyrene by immobilized bacteria on modified biomass materials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, 46–52.
- Djefal-Kerrar, A., Gais, S., Ouallouche, K., Nacer Khodja, A., Mahlous, M., and Hac\_ene, H.(2007).** Immobilization of *Rhodococcus erythropolis* B4 on radiation crosslinked poly(vinylpyrrolidone) hydrogel: Application to the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 265: 370–74.
- Djerbaoui, A. N, (2011).** Utilisation de souches bactériennes autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremediation des sols de Hassi Messaoud contaminé par les hydrocarbures.
- El Fantroussi, S., Agathos, S.N. (2005).** Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol.* 8:268–275.
- Farag, S., Abdel-Fattah, Y. R., and Soliman, N. A. (2010).** Optimization of immobilization conditions for petroleum oil biodegradation using wood chips and wax as carrier for *Candida* spp. *Journal of Biotechnology*, 150(Supplement), 231.
- Fattal P.,(2008).** Pollution des côtes par les hydrocarbures, nature du pétrole et comportement dans le temps. Presses universitaire (Espace et Territoires), Rennes. 400P.
- Feijoo-Siota, L., Rosa-Dos-Santos, F., de Miguel, T., and Villa, T. G. (2008).** Biodegradation of Naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* in marine environments: Testing cells entrapment in calcium alginate for use in water detoxification. *Bioremediation Journal*, 12: 185–92.

- Ferrai B., et Planque J.F., (2003).** Protocole d'étude d'impact du sentier sous-marine de banyuls. Rencontres sur les sentiers sous-marins. Les actes. Hyères, 27/30 mars 2002, Montpellier. 116p.
- Ferreira, L., Rosales, E., Sanromán, M. A., and Pazos, M. (2015).** Preliminary testing and design of permeable bioreactive barrier for phenanthrene degradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930 immobilized in hydrogel matrices. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90: 500–506.
- Gabet, S. (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse Doctorat, Université de Limoges, France.
- Gaujous D.,(1995).** La pollution des milieux aquatiques, aide mémoire .Technique et documentation, Paris,
- Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M., and Rodriguez, M. S. (2006).** Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57: 222–28.
- Giraud et Boy de la Tour, (1987).** Géopolitique du pétrole et du gaz, les coûts du raffinage. Technip, Paris, 390p.
- Guerin T. F. (1999).** Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ land treatment. *J. Hazard. Mater. B*(65):305-315.
- Ha, J. (2005).** Bioremediation of the organophosphate pesticide, coumaphos, using microorganisms immobilized in calcium alginate gel beads (Thesis). Texas A&M University, 181 pp.
- Haritash A.K. and Kaushik C.P.(2009).** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials.*, 2009.169: 1–15
- Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R., (1996).** Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, 18: 41-57.
- Herrera Y., Okoh A.I., Alvarez L., Robledo N. and Trejo-Hernández M.R. (2008).** Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by a *Bacillus* consortium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 55-60.
- Hou, D., Shen, X., Luo, Q., He, Y., Wang, Q., and Liu, Q. (2013).** Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material. *Marine Pollution Bulletin*, 67, 146–51.
- Huang, R. Y., Tian, W. J., Liu, Q., Yu, H. B., Jin, X., Zhao, Y. G., Zhou, Y. H., and Feng, G. (2016).** Enhanced biodegradation of pyrene and indeno(1,2,3-cd)pyrene using bacteria immobilized in cinder beads in estuarine wetlands. *Marine Pollution Bulletin*, 102 :128–33.
- Jiang, B., Zhou, Z., Dong, Y., Wang, B., Jiang, J., Guan, X., Gao, S., Yang, A., Chen, Z., and Sun, H. (2015).** Bioremediation of petrochemical wastewater containing BTEX compounds by a new immobilized bacterium *Comamonas* sp. JB in magnetic gellan gum. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176: 572–81.
- Jianlong, W., Xiangchun, Q., Liping, H., Yi, Q., and Hegemann, W. (2002).** Microbial degradation of quinoline by immobilized cells of *Burkholderia pickettii*. *Water Research*, 36:2288–96.
- Jianlong, W., Liping, H., Hanchang, S., and Yi, Q. (2001).** Biodegradation of quinoline by gel immobilized *Burkholderia* sp. *Chemosphere*, 44:1041–46
- Jianlong, W., Liping, H., Hanchang, S., and Yi, Q. (2001).** Biodegradation of quinoline by gel immobilized *Burkholderia* sp. *Chemosphere*, 44: 1041–46.

- Jin, X., Tian, W., Liu, Q., Qiao, K., Zhao, J., and Gong, X. (2017).** Biodegradation of the benzo[a] pyrene-contaminated sediment of the Jiaozhou Bay wetland using *Pseudomonas* sp. immobilization. *Marine Pollution Bulletin*, 117, 283–90.
- Juhasz A.L. and Naidu R.,(2000).** Bioremediation of high weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & biodegradation*. 45:57-88.
- Kalantary R. R., Anoushiravan M., A. Esrafil1., S. Nasser1., F. R. Ashmagh., S. Jorfi., et M. Ja'fari. (2014).** Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 12(143): 1-9.
- Kanaly RA. and HurG.,(2006).** Growth of *Phanerochaete chrysosporium* on diesel fuel hydrocarbon at neutral pH. *Chemosphere*.63(2):202-211.
- Karel SF, Libicki SB, Robertson CR (1985).** The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chem Eng Sci* 40:1321–1353
- Karel, S. F., Libicki, S. B., and Robertson, C. R. (1985).** The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science*, 40, 1321–54.
- Kermanshahi pour, A., Karamanev, D., and Margaritis, A. (2005).** Biodegradation of petroleum hydrocarbons in an immobilized cell airlift bioreactor. *Water Research*, 39, 3704–14.
- Kok Kee, W., Hazaimah, H., Mutalib, S. A., Abdullah, P. S., and Surif, S. (2015).** Self-immobilised bacterial consortium culture as ready-to-use seed for crude oil bioremediation under various saline conditions and seawater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12:2253–62.
- Kumar B.L and Gopal Sai D. V. R.(2015).** Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *3 Biotech*, 5:867–876.
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Kamenskikh, T. N., Bulicheva, M. V., and Stukova, G. I. (2013).** Survival of cryogel-immobilized *Rhodococcus* strains in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84:118–25.
- Lee, Y. C., Shin, H. J., Ahn, Y., Shin, M. C., Lee, M., and Yang, J. W. (2010).** Biodegradation of diesel by mixed bacteria immobilized onto a hybrid support of peat moss and additives: A batch experiment. *Journal of Hazardous Materials*, 183, 940–44.
- Lefebvre G ,(1978).** *Chimie des hydrocarbures, le pétrole brut*. Technip et Institut Français du pétrole, Paris, 271P.
- Lei AP., Hu ZL.,Wong YS. and Tam NFY.,(2007).** Removal of fluoranthene and pyren by different microalgal species. *Bioresource technol* 98(2): 273- 280
- Li, J., Guo, C., Liao, C., Zhang, M., Liang, X., Lu, G., Yang, C., and Dang, Z. (2016).** A bio-hybrid material for adsorption and degradation of phenanthrene: bacteria immobilized on sawdust coated with a silica layer. *RSC Advances*, 6, 107189–99.
- Li, P. J.,Wang, X., Stagnitti, F., Li, L.,Gong, Z.Q., Zhang,H. R., Xiong, X. Z., and Austin, C. (2005).**Degradation of phenanthrene and pyrene in soil slurry reactors with immobilized bacteria *Zoogloea* sp. *Environmental Engineering Science*, 22:390–99.
- Liang, Y., Zhang, X., Dai, D., and Li, G. (2009).** Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63: 80–87.
- Lin, C., Gan, L., Chen, Z., Megharaj, M., and Naidu, R. (2014).** Biodegradation of naphthalene using a functional biomaterial based on immobilized *Bacillus fusiformis* (BFN). *Biochemical Engineering Journal*, 90:1–7.

- Lin, C., Gan, L., Chen, Z., Megharaj, M., and Naidu, R. (2014).** Biodegradation of naphthalene using a functional biomaterial based on immobilized *Bacillus fusiformis* (BFN). *Biochemical Engineering Journal*, 90:1–7
- Lin, J., Gan, L., Chen, Z., and Naidu, R. (2015).** Biodegradation of tetradecane using *Acinetobacter venetianus* immobilized on bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, 100: 76–82
- Lu, X. Y., Zhang, T., and Fang, H. H. P. (2011).** Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89:1357–71.
- Luckarift, H. R., Sizemore, S. R., Farrington, K. E., Fulmer, P. A., Biffinger, J. C., Nadeau, L. J., and Johnson, G. R. (2011).** Biodegradation of medium chain hydrocarbons by *Acinetobacter venetianus* 2AW immobilized to hair-based adsorbent mats. *Biotechnology Progress*, 27,1580–87.
- Maamar A.,(2015).** Etude de la biodégradation du pétrole brut par le peuplement fongique du port d'Oran. Th Mag.Sc environ mar.Univ Oran.128P.
- Manohar, S., and Karegoudar, T. B. (1998).** Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas* sp. strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 785–92.
- Manohar, S., Kim, C. K., and Karegoudar, T. B. (2001).** Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas* sp. strain NGK1 in polyurethane foam. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 311–16.
- Margesin, R. , Schinner, F., (1997) :** Efficiency of indigenous and inoculated coldadapted microorganisms for biodegradation of Diesel oil in Alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(7) 2660-2664.
- Martins, S. C. S., Martins, C. M., Fi\_uza, L. M. C. G., and Santaella, S. T. (2013).** Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 12:4412–4418.
- Mehrotra, T. , Zaman, M.N. ,Prasad, B.B. , Shukla, A. , Aggarwal, S. Singh R. (2020),** Rapid immobilization of viable *Bacillus pseudomycolides* in polyvinyl alcohol/ glutaraldehyde hydrogel for biological treatment of municipal wastewater, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (9):9167–9180.
- Mohammadi, A., and Nasernejad, B. (2009).** Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. *Journal of Hazardous Materials*, 161: 534–37.
- Molta.,(2002).** Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing. enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (12):5329–5333.
- Moslemy P., Guiot S. R., and Neufeld R. J. (2006).** Encapsulation of bacteria for biodegradation of gasoline hydrocarbons. In J. M. Guisan (Ed.), *Immobilization of enzymes and cells. Methods in Biotechnology*TM (. USA: Humana Press , 22: 415–426.
- Moslemy P., Guiot S. R., and Neufeld R. J. (2006).** Encapsulation of bacteria for biodegradation of gasoline hydrocarbons. In J. M. Guisan (Ed.), *Immobilization of enzymes and cells. Methods in Biotechnology*TM). USA: Humana ,. 22 : 415–426.
- Moslemy, P., Neufeld, R. J., and Guiot, S. R. (2002).** Biodegradation of gasoline by gellan gumencapsulated bacterial cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 80: 175–84.
- Mrozik, A., and Piotrowska-Seget, Z. (2010).** Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 16: 363–75.

- Mulla, S. I., Talwar, M. P., Bagewadi, Z. K., Hoskeri, R. S., and Ninnekar, H. Z. (2013).** Enhanced degradation of 2-nitrotoluene by immobilized cells of *Micrococcus* sp. strain SMN-1. *Chemosphere*, 90:1920–24.
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., and Gibbs, B. F. (2001).** Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 60: 371–80.
- Nasir R. B. (2000).** Bacteriological and genetic study on *Pseudomonas* .*Spp* utilizing hydrocarbon compound. M.Sc. Thesis. University of Baghdad.
- Negraia G. (2010).** Impact éco toxicologique des hydrocarbures mono aromatiques dans l'environnement au Canada, Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maîtrise en environnement. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Norme D 1067-16 de l'ASTM,.** Ces méthodes d'essai couvrent la détermination de l'acidité ou de l'alcalinité de tous les types d'eau, approuvée le 27 Décembre 2016
- Norme D 1126-17 de l'ASTM,.** Cette méthode de test couvre la détermination de la dureté de l'eau par titrage. Cette méthode d'essai s'applique aux eaux d'apparence claire et exemptes de produits chimiques qui complexeront le calcium ou le magnésium, approuvée le 1 Décembre 2017
- Norme D 1293-18 de l'ASTM,.** intitulée Standard Test Méthodes pour le pH de l'eau Ces méthodes d'essai couvrent la détermination du pH par mesure électrométrique en utilisant l'électrode de verre comme senso, approuvée le 15 janvier 2018
- Norme D 511-14(2021) de l'ASTM,.** Ces méthodes d'essai couvrent la détermination du calcium et du magnésium dans l'eau par titrage complexométrique et par spectrométrie d'absorption atomique, approuvée le 06 Décembre 2021
- Norme D 512-89(2012) de l'ASTM,.** Ces méthodes d'essai couvrent la détermination de l'ion chlorure dans les eaux usées, approuvée le 15 juin 2012
- Norme D 515-72 de l'ASTM,.** Ces méthodes d'essai couvrent la détermination des phosphates condensés à de faibles concentrations dans l'eau par chromatographie Liquide, approuvée en 1972, ASTM D 515-72; "1973 Annual Book of ASTM Standards, Part 23", p. 338.
- Norme NF M07-001,.** Méthode d'échantillonnage des produits pétroliers. Approuvée en juillet 1988.
- Nwankwegu, A. S., Onwosi, C. O., Azi, F., Azumini, P., and Anaukwu, C. G. (2017).** Use of rice husk as bulking agent in bioremediation of automobile gas oil impinged agricultural soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 26:96–114.
- Obuekwe, C. O., and Al-Muttawa, E. M. (2001).** Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. *Biotechnology Letters*, 23, 1025–32.
- Ogbonna, J., Matsumura, M., and Kataoka, H. (1991).** Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameters: a review. *Process Biochemistry*, 26, 109–21.
- Oh, Y. S., Maeng, J., and Kim, S. J. (2000).** Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54:418–23.
- Olivier, B et al (2005).** *Petroleum Microbiology*, Edition illustrée, Edition ASM Press.
- Omar, S. H., B€udecker, U., and Rehm, H. J. (1990).** Degradation of oily sludge from a flotation unit by free and immobilized microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:259–63.

- Paje, M. L., Marks, P., and Couperwhite, I. (1998).** Degradation of benzene by a *Rhodococcus* sp. using immobilized cell systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 675–80.
- Paje, M. L., Marks, P., and Couperwhite, I. (1998).** Degradation of benzene by a *Rhodococcus* sp. using immobilized cell systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14:675–80.
- Pala, D. M., de Carvalho, D. D., Pinto, J. C., and Sant'Anna, J. G. L. (2006).** A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58: 254–60.
- Parameswarappa, S., Karigar, C., and Nagenahalli, M. (2008).** Degradation of ethylbenzene by free and immobilized *Pseudomonas fluorescens*-CS2. *Biodegradation*, 19:137–44.
- Partovinia A., Rasekh B., (2018).** Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* ,48 (1):1–38.
- Partovinia, A., and Naeimpoor, F. (2013).** Phenanthrene biodegradation by immobilized microbial consortium in polyvinyl alcohol cryogel beads. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85:337–44.
- Pelmont J. (2005).** *Biodégradation et métabolismes*, Ed. EDP, France.
- Picot A. et Montandon F.,(2013).** *Ecotoxicochimie des hydrocarbures, devenir dans l'environnement des produits pétroliers bruts. Technique et documentation*, Paris ,407P.
- Pierre R, Vincent J, (2000).** *Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air.* (Institut de Recherche pour le Développement IRD, Université de Provence AIX-Marseille 1 E.S.G.B.M.A - E.S.I.L. Luminy).
- Podorozhko, E. A., Lozinsky, V. I., Ivshina, I. B., Kuyukina, M. S., Krivorutchko, A. B., Philp, J.C., and Cunningham, C. J. (2008).** Hydrophobised sawdust as a carrier for immobilisation of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus ruber*. *Bioresource Technology*, 99:2001–2008.
- Prenosil, J. E., Kut, €O.M., Dunn, I. J., and Heinzle, E. (2009).** Biocatalysis, 2. Immobilized biocatalysts. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Wiley-VCH Verlag, 5:478–527.
- Radwan, S. S., Al-Hasan, R. H., Salamah, S., and Al-Dabbous, S. (2002).** Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50: 55–59.
- Ramteke, L. P., and Gogate, P. R. (2016).** Removal of benzene, toluene and xylene (BTX) from wastewater using immobilized modified prepared activated sludge (MPAS). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91:456–66.
- Robledo-Ortiz, J. R., Ramirez-Arreola, D. E., Perez-Fonseca, A. A., Gomez, C., Gonzalez-Reynoso, O., Ramos-Quirarte, J., and Gonzalez-Nunez, R. (2011).** Benzene, toluene, and oxylene degradation by free and immobilized *P. putida* F1 of postconsumer agave-fiber/polymer foamed composites. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65:539–46.
- Roling W. F. M., Milner M. G., Jones D. M., Lee K., Daniel F., Swannell R. J. P., Head I. M. (2002).** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 68 (11): 5537-5548.
- Romain B ., Fechner L ., Naïtall M. et Dreanno C .,(2012).** Biofilm , quand les microbes s'organisent contre les marées noires. *Quae*, France. 164P.

- Rosevear, A. (1984).** Immobilised biocatalysts—a critical review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34:127–50.
- Rosevear, A., Kennedy, J. F., and Cabral, J. M. S. (1987).** Immobilized enzymes and cells. Philadelphia, PA: Adam Hilger.
- Sarma, S. J., and Pakshirajan, K. (2011).** Surfactant aided biodegradation of pyrene using immobilized cells of *Mycobacterium frederiksbergense*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65:73–77.
- Schratzberger M., Daniel F., Wall CM., Kilbride R., MacnaughtonSJ ., Boyd SE.,Rees HL., Lee K. and Swannell RPL.,(2003).**Response of estuarine meio and macrofaunato in situ bioremediation of oil contaminated sediment .*Mar Poll Bull*, 46(4):430-443.
- Scriban R., (1999).** *Biotechnologie , restauration par voie biologique des sols contaminés par les polluants organique* 5éme éd. Lavoisier, Paris
- Singh, A., Kuhad, R. C., and Ward, O. P. (2009).** *Advances in Applied Bioremediation*. Berlin: Springer-Verlag.
- Siripattanakul, S., Khan, E. (2010).** Fundamentals and applications of entrapped cell bioaugmentation for contaminant removal. *Emerging Environmental Technologies*, 2:147–169
- Siripattanakul, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J., and Khan, E. (2008).** Effect of cell-to-matrix ratio in polyvinyl alcohol immobilized pure and mixed cultures on atrazine degradation. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus*, 8: 257–66.
- Somerville, H. J., Mason, J. R., and Ruffell, R. N. (1977).** Benzene degradation by bacterial cells immobilized in polyacrylamide gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 4: 75–85.
- Somtrakoon, K., Suanjit, S., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Cassidy, M. B., Trevors, J. T.,Lee, H., and Upatham, S. (2009).** Comparing phenanthrene degradation by alginate-encapsulated and free *Pseudomonas* sp UG14Lr cells in heavy metal contaminated soils. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84: 1660–68.
- Stamets, P.,(2005).** *Mycelium running, how mushrooms can help save the world*. Ten SpeedPress, Berkley. 356P.
- Standards et Pancanadiens.,(2008).**Relatifs aux hydrocarbures pétroliers(HCP) dans le sol. Supplément technique :1-36
- Sutherland JB., Rafii F., Khan AA. and Cerniglia CE.,(1995).** Mechanisms of polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. In *Microbial Transformation and degradation of toxicorganic chemicals* .Wiley-Liss ,New York: 27-76.
- Suzuki, T., Yamaguchi, T., and Ishida, M. (1998).** Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium- alginate beads for the degradation of hydrocarbons. *Process Biochemistry*, 3: 541–46.
- Tahseen, R., Afzal, M., Iqbal, S., Shabir, G., Khan, Q. M., Khalid, Z. M., and Banat, I. M. (2016).**Rhamnolipids and nutrients boost remediation of crude oil-contaminated soil by enhancing bacterial colonization and metabolic activities. *International Biodeterioration & Biodegradation*,115: 192–98.
- Tao, X. Q., Lu, G. N., Liu, J. P., Li, T., and Yang, L. N. (2009).** Rapid degradation of phenanthrene by using *Sphingomonas* sp. GY2B immobilized in calcium alginate gel beads. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6: 2470–80.
- Tsai, S. L., Lin, C. W., Wu, C. H., and Shen, C. M. (2013).** Kinetics of xenobiotic biodegradation by the *Pseudomonas* sp. YATO411 strain in suspension and cell-immobilized beads. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44:303–309.

- Venkata Mohan, S., Ramakrishna, M., Shailaja, S., and Sarma, P. N. (2007).** Influence of soil–water ratio on the performance of slurry phase bioreactor treating herbicide contaminated soil. *Bioresource Technology*, 98:2584–89.
- Vidali, M. (2001).** Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73: 1163–72.
- Vogel T. et Ballerini D.,(2001).** Biorestoration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés .*Bull.Soc.Fr.Microbiol.*16(3):204- 209.
- Walker JD.,Cowell RR. and Petrakis K.,(1975).** Degradation of petroleum by an alga,*Prototheca zopfii*. *Applied Microbiology* 30: 79-81.
- Wang, P., Luo, L., Ke, L., Luan, T., and Tam, N. F. Y. (2013).** Combined toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals to biochemical and antioxidant responses of free and immobilized *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32:673–83.
- Wang, S., Li, X., Liu, W., Li, P., Kong, L., Ren, W., Wu, H., and Tu, Y. (2012).** Degradation of pyrene by immobilized microorganisms in saline-alkaline soil. *Journal of Environmental Sciences*,24: 1662–69.
- Wang, X., Gong, Z. Q., Li, P. J., and Zhang, L. H. (2007).** Degradation of pyrene in soils by free and immobilized yeasts, *Candida tropicalis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 78:522–26.
- Wang, X.,Wang, X., Liu,M., Bu,Y., Zhang, J.,Chen, J., andZhao, J. (2015).** Adsorption–synergic biodegradation of diesel oil in synthetic seawater by acclimated strains immobilized on multifunctional materials. *Marine Pollution Bulletin*, 92 :195–200.
- Warshawsky D., Cody T., Radike M., Reilman R., Schumann BLadow K., Schneider J.,(1995).** Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chem. Biol. Int* (97) :131-148.
- Wauquier JP., (1994).** Le raffinage du pétrole, caractérisation des produits pétrolier utilisés à des fin énergétiques. Technip, Paris, 461p.
- Weir, S. C., Providenti, M. A., Lee, H., and Trevors, J. T. (1996).** Effect of alginate encapsulation and selected disinfectants on survival of and phenanthrene mineralization by *Pseudomonas* sp UG14Lr in creosote-contaminated soil. *Journal of Industrial Microbiology*, 16:62–67.
- Weir, S., Dupuis, S., Providenti, M., Lee, H., and Trevors, J. (1995).** Nutrient-enhanced survival of and phenanthrene mineralization by alginate-encapsulated and free *Pseudomonas* sp. UG14Lr cells in creosote-contaminated soil slurries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43:946–51.
- Willaert RG, Baron GV (1996).** Gel entrapment and micro-encapsulation: methods, applications and engineering principles. *Rev Chem Eng* 12:5–205
- Willaert, R. G., Baron, G. V. (1996).** Immobilized living cell systems: modelling and experimental methods. 1–17.
- Wilson, N. G., and Bradley, G. (1996).** Enhanced degradation of petrol (Slovene diesel) in an aqueous system by immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 99–104..
- Xu, H., Li, X., Sun, Y., Shi, X., and Wu, J. (2016).** Biodegradation of pyrene by free and immobilized cells of *herbaspirillum chlorophenicum* strain FA1. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227: 1–12.

- Xu, Y., and Lu, M. (2010).** Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 183, 395–401.
- Xu, Y., and Lu, M. (2010).** Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 183:395–401.
- Yamaguchi, T., Ishida, M., and Suzuki, T. (1999).** An immobilized cell system in polyurethane foam for the lipophilic micro-alga *Prototheca zopfii*. *Process Biochemistry*, 34:167–72.
- Zhang J., He., m Shi Y.,(2009).**Comparative sorption of benzo (a) pyren to different humicacids and humin in sediments. *J. Hazard Mater.*166:802-809.
- Zhenpeng et Hongwei.,(2002).** *Microbiologie technique*, Tome1 :Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d’aquitaine.
- Zinjarde, S. S., and Pant, A. (2000).** Crude oil degradation by free and immobilized cells of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/ Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 35: 755–63.