

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université 20 Août 1955 - Skikda



Faculté de Technologie  
Département de Génie des procédés  
Laboratoire de domiciliation : Laboratoire de recherche de Physico-chimie des surfaces  
et interfaces (LRPCSI)

## THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
DOCTORAT EN 3<sup>ème</sup> CYCLE \_ LMD

**Domaine :** Sciences et Technologie      **Filière :** Génie des procédés

**Spécialité :** Génie de l'environnement

Présentée par

**DZIZI Sabrina**

*Intitulée*

**Influence de la Composition du Milieu sur la Croissance des  
Microalgues : Application à la Dépollution des Eaux usées**

Soutenue le : 09/07/2023

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mme AMMOUCHI Nesrine	MCA	Univ. de Skikda	Président
Mme CHAIB Nadjla	Professeur	Univ. de Skikda	Rapporteur
Mme ROUIDI Sonia	MCA	Univ. de Skikda	Examineur
Mr OUKOUAK Abdelkader	MCA	Univ. D'El-Oued	Examineur

Année Universitaire : 2022 - 2023

# REMERCIEMENTS

---

*Je tiens tout d'abord à remercier **DIEU**, le tout puissant, de m'avoir illuminée et ouvert les voies du savoir, et pour m'avoir donné la volonté, la patience, la force et le courage pour mener à bien ce modeste travail.*

*Une partie de ce travail a été réalisée au laboratoire de recherche sur la physico-chimie des surfaces et interfaces (**LRPCSI**), je remercie vivement Monsieur Le Professeur **DJAZI Fayçal**, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.*

*Ma gratitude sincère et profonde est adressée à ma directrice de thèse Madame **CHAIB Nadjla**, Professeur à l'Université de Skikda pour ses conseils judicieux, remarques et suggestions qui m'ont permis d'améliorer constamment la qualité de ce travail ainsi que pour la gentillesse et la patience qu'elle a manifesté, pour ses appuis, ses orientations durant toute la période de ce travail.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Madame **AMMOUCHI Nesrine**, MCA, à l'université du 20 août 1955, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Mes sincères remerciements sont adressés également à Madame **ROUIDI Sonia**, MCA, à l'université du 20 août 1955, et à Monsieur **OOUAKOUAK Abdelkader**, MCA, à l'université d'El-Oued pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu manifester à l'égard de ce travail, en acceptant d'examiner cette thèse et de faire partie du jury.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à mes deux chers : **Mr. SATOUH Azzeddine et Mme. DEKKAR Samira Amel** pour leurs générosités et leur soutien moral et financiers qu'ils m'ont apportés durant tout au long de la période de la réalisation de ma thèse de Doctorat. Tous mes remerciements vont à ma famille et mes amis qui ont été nombreux à m'aider et à m'encourager. **Dr. CHARCHAR Nabil et Dr. BELAHMADI Mohamed Seddik Oussama** Maîtres de recherche classe A au centre de recherche en biotechnologie (**CRBt**) de Constantine, pour leur aide à la réalisation de ce travail. Par la même occasion, je tiens à remercier vivement les ingénieurs des laboratoires du Hall de technologie et en particulier **Mr DJILANI Abdel Karim**, ingénieur principal et coordinateur des laboratoires. Je le remercie pour son accueil chaleureux, et pour toute l'aide matérielle et technique qu'il m'a apporté durant la période pendant laquelle j'ai travaillé dans le laboratoire.*

*Enfin, Il m'est agréable d'adresser mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à élaborer cette thèse de doctorat. A tous, je suis redevable et très reconnaissante.*

## DEDICACE

---

*Je dédie ce travail à mes très chers parents, tout mon respect et affection en témoignage de leur soutien, patience, sacrifices, leurs bonté, ainsi que pour leurs conseils et orientations dans toute ma vie.*

*Que Dieu me les garde.*

*Et surtout je dédie ce modeste travail à ma bougie qui brûle pour m'éclairer le chemin, à celle qui m'a donné l'espoir de vivre, à la personne la plus chère à mon cœur : **ma mère**, Que Dieu la protège.*

*A mes très chers frères et ma sœur,*

*À toutes les personnes qui m'ont aidé, soutenu et contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail*

*A tous ceux que j'aime et qui m'aiment de près ou de loin.*

*Sabrina*

# RESUME

---

L'utilisation simultanée des microalgues pour le traitement des eaux usées est une option faisable. La capacité des microalgues à dégrader les matières organiques, l'élimination des nutriments et l'absorption des métaux lourds sont bien connus depuis longtemps, par contre l'utilisation des algues n'a pas été entièrement exploitée pour le traitement des eaux usées. Le succès de cette technologie dépend encore beaucoup de la sélection, de la culture et de la récolte efficaces des souches microalgales. L'objectif de ce présent travail s'articule autour de l'étude des capacités d'élimination des différents polluants tels que : les phosphates, les nitrates, les métaux lourds et les hydrocarbures par une espèce de microalgue brune (les diatomées) (*Nitzschia sp.*), une espèce de microalgue verte (*Chlorella vulgaris*) et une espèce de microalgue bleue-verte (*Aphanocapsa zanardinii*). Ces microalgues ont été cultivées dans leurs milieux de culture spécifiques stériles (Bold Basal Medium BBM, Bleue Green Medium BG11 et WCM) jusqu'à l'obtention d'un volume de biomasse suffisant, puis transférées dans de nouveaux bioréacteurs contenant des eaux usées synthétiques stériles pour la bioremédiation de la pollution carbonée, azotée et phosphorée en utilisant *Nitzschia sp.*, et l'élimination du cadmium (50mg/L, 100mg/L, 250mg/L) en utilisant séparément *C. vulgaris* et *A. zanardinii*. La bio-élimination du pétrole (0,1%, 0,5% et 1%) a été réalisée par ces deux dernières souches en utilisant le pétrole comme source unique de carbone et d'énergie. Les rendements calculés de notre traitement biologique de l'eau usée par les diatomées (*Nitzschia sp.*) étaient très prometteurs. La demande chimique en oxygène (DCO) et la demande biologique en oxygène (DBO) ont été réduites respectivement de 80,27% et 58%. Les rendements de l'enlèvement de phosphore et d'azote étaient les suivants : 71,91% et 98,47% respectivement. Les résultats obtenus ont montré que les deux microalgues ont une capacité significative à éliminer le cadmium avec des taux d'élimination significatifs en utilisant séparément *A. zanardinii* (75,13%) et *C. vulgaris* (86,07%). Et d'autre part, nous avons vérifié l'efficacité des ces deux microalgues phototrophes pour éliminer le pétrole brut des eaux usées des raffineries. On obtient les bons rendements: (79,12% et 88,6%) à la concentration en pétrole de 1% pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* respectivement.

**Mots-clés:** Microalgues, Culture de biomasse, Eaux usées, Dépollution, Biotechnologies, Développement durable.

# ABSTRACT

---

The use of microalgae for wastewater treatment is a feasible option. The capacity of microalgae to degrade organic matter, the elimination of nutrients, the absorption of heavy metals have been well known for a long time, on the other hand the use of algae has not been fully utilized for the treatment of wastewater. The success of this technology still depends very much on the efficient selection, cultivation and harvesting of microalgal strains. The objective of this present thesis revolves around the study of the capacities of the elimination of different pollutants such as phosphorus and nitrogen by a bioprocess consisting in the use of brown microalgae (diatoms) (*Nitzschia sp.*), the bioremediation of heavy metals (Cadmium) and the biodegradation of hydrocarbons (Crude oil) using a species of green microalgae (*Chlorella vulgaris*) and blue-green microalgae (*Aphanocapsa zanardinii*). These microalgae were grown in specific sterile grown medium (Bold Basal medium BBM, Bleu Green Medium BG11 and WCM) until sufficient biomass volume was obtained, then transferred to new flasks containing sterile synthetic wastewater for the bioremediation of carbon pollution, nitrogen and phosphorus using *Nitzschia sp.*, and cadmium removal using separately *C. vulgaris* and *A. zanardinii* was performed by selecting three concentrations of cadmium ( $50\text{mg.L}^{-1}$ ,  $100\text{mg.L}^{-1}$ , and  $250\text{mg.L}^{-1}$ ). Crude oil (0.1%, 0.5% and 1%) as the sole source of carbon and energy. The calculated yields of our biological water treatment by diatoms (*Nitzschia sp.*) were very promising. Chemical oxygen demand (COD) and biological oxygen demand (BOD) were reduced by 80.27% and 58% respectively. The efficiencies of phosphorus and nitrogen removal were as follows: 71.91% and 98.47% respectively. The results showed that both microalgae have a significant ability to remove  $\text{Cd}^{2+}$  cadmium as the sole source of contamination with significant removal rates using separately *A. zanardinii* (75.13%) and *C. vulgaris* (86.07%) as bioremediation tools. And on the other hand, we check the effectiveness of these phototrophic microalgae to remove crude oil from refinery wastewater. Good bio-elimination rates are obtained: (79.12% and 88.6%) at a petroleum concentration of 1% for *A. zanardinii* and *C. vulgaris* respectively.

**Keywords:** Microalgae, Biomass growth, Wastewater, Depollution, Biotechnology, Sustainable development.

# ملخص

يعد الاستخدام المتزامن للطحالب الدقيقة لمعالجة مياه الصرف الصحي خيارًا ممكنًا. إن قدرة الطحالب الدقيقة على تحليل المادة العضوية، وامتصاص العناصر الغذائية، وإزالة المعادن الثقيلة جد معروفة منذ فترة طويلة، ومع ذلك لم يتم استغلال استخدام الطحالب بشكل كامل في معالجة مياه الصرف الصحي. لا يزال نجاح هذه التقنية يعتمد إلى حد كبير على كفاءة اختيار سلالات الطحالب الدقيقة وزراعتها وحصادها. الهدف من هذا العمل الحالي يدور حول دراسة قدرات القضاء على الملوثات المختلفة مثل: الفسفور والنتروجين عن طريق المعالجة الحيوية وهي استخدام الطحالب الدقيقة البنية (الدياتومات *Nitzschia*). نزع المعادن الثقيلة (الكاديوم *cadmium*) وإزالة الهيدروكربونات (النفط الخام) من خلال استخدام الطحالب الدقيقة الخضراء (*Chlorella vulgaris*) و الطحالب الخضراء المزرقة (*Aphanosapsa zanardinii*). تم استزراع هذه الطحالب الدقيقة في وسطها المعقم الخاص بها *Bleue Green Medium* ، *Bold Basal Medium BBM* و *WCM* و *BG11* حتى تم الحصول على حجم كافٍ من الكتلة الحيوية ، ثم تم نقلها إلى قوارير جديدة تحتوي على مياه الصرف الصحي المعقمة الاصطناعية و الحقيقية. للمعالجة الحيوية لتلوث النيتروجين، الفسفور والكربون قمنا باستخدام *Nitzschia sp*، تم إجراء إزالة الكاديوم باستخدام *A. zanardinii* و *C. vulgaris* بشكل منفصل عن طريق اختيار ثلاثة تركيزات من الكاديوم (50 مغ/ل، 100 مغ/ل، 250 مغ/ل). التخلص الحيوي من النفط الخام يستخدم تركيزات مختلفة من هذا الأخير (1%، 0,5%، 0,1%) كمصدر وحيد للكربون والطاقة. كانت العوائد المحسوبة لمعالجتنا البيولوجية للمياه بواسطة الدياتومات (*Nitzschia sp*) واعدة جدًا. تم تخفيض الطلب الكيميائي للأوكسجين و الطلب البيولوجي للأوكسجين بنسبة 80,27% و 58% على التوالي. كانت كفاءة إزالة الفسفور والنيتروجين كما يلي: 91,71% و 47,98% على التوالي. أظهرت النتائج أن كلا من الطحالب الدقيقة لديها قدرة معتبرة على إزالة الكاديوم كمصدر وحيد للتلوث مع معدلات إزالة معنوية باستخدام كل من *A. zanardinii* (75,13%) و *C. vulgaris* (86,07%) كأدوات معالجة حيوية. ومن ناحية أخرى، نتحقق من فعالية هذه الطحالب الدقيقة ضوئية التغذية في إزالة النفط الخام من مياه الصرف الصحي. تحصلنا على عائد جيد للتطهير البيولوجي بنسبة 79,12% و 88,6% عند تركيز 1% من البترول لكل من *A. zanardinii* و *C. vulgaris* على التوالي.

**الكلمات المفتاحية:** الطحالب الدقيقة، زراعة الكتلة الحيوية ، مياه الصرف الصحي ، إزالة التلوث، التكنولوجيا الحيوية، التنمية المستدامة.

# TABLE DES MATIERES

---

<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b><u>CHAPITRE I: CONTEXTE DE L'ETUDE</u></b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>I.1. POLLUTION DES MILIEUX AQUATIQUES .....</b>	<b>5</b>
<b>I.2. LES DIFFERENTS TYPES DE POLLUTIONS DES EAUX .....</b>	<b>6</b>
I.2.1. LA POLLUTION MICROBIOLOGIQUE.....	6
I.2.2. LA POLLUTION PHYSIQUE .....	6
I.2.2.1. <i>La pollution mécanique</i> .....	6
I.2.2.2. <i>La pollution thermique</i> .....	7
I.2.2.3. <i>La pollution radioactive</i> .....	7
I.2.3. LA POLLUTION CHIMIQUE .....	7
<b>I.3. POLLUTION PAR LES METAUX LOURDS.....</b>	<b>10</b>
I.3.1. DEFINITION DES METAUX LOURDS.....	10
I.3.2. CLASSIFICATION DES METAUX LOURDS .....	11
I.3.3. UTILISATION DES METAUX LOURDS.....	11
I.3.4. SOURCES DE POLLUTION PAR LES METAUX LOURDS ET LES METALLOÏDES.....	12
I.3.5. EFFETS TOXICOLOGIQUES DES METAUX LOURDS ET DES METALLOÏDES.....	13
I.3.6. TRANSFERT DES METAUX VERS LES ORGANISMES AQUATIQUES .....	15
<b>I.4. POLLUTION PAR LES HYDROCARBURES .....</b>	<b>16</b>
I.4.1. COMPOSITION CHIMIQUE DES HYDROCARBURES .....	16
I.4.2. LE PETROLE BRUT .....	17
I.4.3. DEFINITION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES.....	19
I.4.4. SOURCES DES HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN .....	20
I.4.5. EFFETS DE LA POLLUTION PAR LES HYDROCARBURES.....	23
I.4.6. DEVENIR DES HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN .....	24
I.4.7. BIODISPONIBILITE DES HYDROCARBURES .....	27
I.4.8. BIOREMEDIATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES.....	28
I.4.8.1. <i>Assainissement microbien de la pollution aux hydrocarbures aromatiques polycycliques</i> .....	28

1.4.8.2. Bioremédiation à médiation enzymatique microbienne .....	32
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>33</b>
<b><u>CHAPITRE II: ETAT DE L'ART</u></b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>35</b>
<b>II.1. LES MICROALGUES AU SERVICE DE L'HOMME ET L'ENVIRONNEMENT ..</b>	<b>35</b>
<b>II.2. APPLICATION DES MICROALGUES A LA BIOREMEDIATION DES EAUX USEES .....</b>	<b>36</b>
II.2.1. LES MICROALGUES POUR TRAITEMENT DES EAUX USEES .....	37
II.2.2. SYSTEMES DE CULTURES DES MICROALGUES .....	38
II.2.2.1. Systèmes de culture ouverts .....	38
II.2.2.2. Systèmes fermés (ou photobioréacteurs).....	40
II.2.2.3. Systèmes hybrides .....	42
II.2.3. INTERETS ET LIMITES DES SYSTEMES DE CULTURE DES MICROALGUES .....	42
<b>II.3. FACTEURS INFLUENÇANT LE DEVELOPPEMENT MICROALGAL .....</b>	<b>43</b>
II.3.1. LA LUMIERE.....	44
II.3.2. LA TEMPERATURE.....	44
II.3.3. LE CARBONE : SOURCE D'ENERGIE.....	45
II.3.4. LE PH.....	45
II.3.5. LES SELS NUTRITIFS .....	46
II.3.6. L'AGITATION .....	46
<b>II.4. LA PHYCOREMEDIATION DES EAUX USEES .....</b>	<b>47</b>
II.4.1. HISTORIQUE DE L'UTILISATION DES MICROALGUES DANS LE TRAITEMENT DES EAUX .....	47
II.4.2. PHYCOREMEDIATION DES METAUX LOURDS A L'AIDE DE L'UTILISATION DES MICROALGUES VIVANTES .....	49
<b>II.5. BIO-ELIMINATION EXTRACELLULAIRE DES METAUX LOURDS (MLS) AVEC DES MICROALGUES VIVANTES.....</b>	<b>50</b>
II.5.1. COMPOSITION DES PAROIS CELLULAIRES ET SON ROLE DANS LA BIOSORPTION DES MLS .....	50
II.5.2. INTERACTIONS PHYSICOCHIMIQUES DES MLS ET DE LA SURFACE CELLULAIRE .....	52
II.5.3. INTERACTIONS DES SUBSTANCES POLYMERES EXTRACELLULAIRES AVEC LES MLS.....	53
II.5.4. MECANISMES DE BIOACCUMULATION DES METAUX LOURDS DANS LES MICROALGUES ...	54
II.5.5. TRANSPORTEURS DE METAUX DANS LA MEMBRANE CELLULAIRE DES MICROALGUES.....	55
II.5.6. VOIES DE DETOXIFICATION DES ML INTRACELLULAIRES .....	56
II.5.6.1. Chélation par les métallothionéines.....	56

II.5.6.2. Chélation par les phytochélatines.....	57
II.5.6.3. Chélation par les polyphosphates.....	58
II.5.7. COMPARTIMENTATION DES MLS DANS LA VACUOLE, .....	58
<b>II.6. AVANTAGES DU TRAITEMENT DES EAUX USEES A BASE DE</b>	
<b>MICROALGUES.....</b>	<b>59</b>
II.6.1. RENTABILITE .....	59
II.6.2. BESOINS DE FAIBLE ENERGIE .....	59
II.6.3. REDUCTION DE LA FORMATION DE BOUES .....	60
II.6.4. EMISSIONS DE GAZ A EFFET DE SERRE .....	60
II.6.5. ENGRAIS ET BIO-ENGRAIS.....	62
II.6.6. ALIMENTATION ANIMALE.....	62
II.6.7. PRODUCTION DE BIOCARBURANTS .....	63
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>63</b>
<b><u>CHAPITRE III: MATERIEL ET METHODES</u></b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>65</b>
<b>III.1. DESCRIPTION DE LA ZONE D’ETUDE.....</b>	<b>65</b>
<b>III.2. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS.....</b>	<b>68</b>
<b>III.3. PREPARATION DES ECHANTILLONS DE MICROALGUES.....</b>	<b>68</b>
<b>III.4. CULTURE DES MICROALGUES .....</b>	<b>70</b>
III.4.1. CONDITIONS DE CULTURE .....	70
III.4.1.1. La température .....	71
III.4.1.2. Le pH.....	71
III.4.1.3. La lumière .....	71
III.4.1.4. L’agitation.....	71
III.4.1.5. Le carbone : source d’énergie.....	72
III.4.1.6. Les sels nutritifs.....	72
III.4.2. CONCEPTION DU PHOTOBIOREACTEUR DE CULTURE DES MICROALGUES .....	72
III.4.3. PREPARATION DE MILIEU DE CULTURE LIQUIDE DE BOLD (1967) .....	73
III.4.4. PREPARATION DE MILIEU DE CULTURE POUR LES DIATOMEES BENTHIQUES .....	75
III.4.5. PREPARATION DE L’EXTRAIT DE SOL.....	76
III.4.6. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE SOLIDE.....	77
<b>III.5. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES MICROALGUES .....</b>	<b>78</b>
<b>III.6. MAINTIEN DES CULTURES MONOCLONALES .....</b>	<b>80</b>

<b>III.7. PURIFICATION DES SOUCHES DE MICROALGUES.....</b>	<b>82</b>
<b>III.8. MESURE DE LA CROISSANCE EN BIOMASSE.....</b>	<b>83</b>
III.8.1. LA NUMERATION CELLULAIRE (NC) .....	83
III.8.2. LA MATIERE SECHE (MS) .....	84
III.8.3. LA DENSITE OPTIQUE (DO) .....	85
<b>III.9. CARACTERISATION DE L'EAU DE MER PRELEVEE.....</b>	<b>86</b>
III.9.1. CARACTERISATION BACTERIOLOGIQUE.....	86
III.9.2. CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE .....	88
III.9.2.1. <i>Le potentiel d'hydrogène (pH)</i> .....	89
III.9.2.2. <i>L'oxygène dissous (O<sub>2</sub> dis)</i> .....	90
III.9.2.3. <i>La conductivité électrique (CE)</i> .....	90
III.9.2.4. <i>Les Matières en Suspension (MES)</i> .....	90
III.9.2.5. <i>La demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>)</i> .....	91
III.9.2.6. <i>La demande chimique en oxygène (DCO)</i> .....	91
III.9.2.7. <i>La détermination des ions de phosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)</i> .....	92
III.9.2.8. <i>La détermination des ions ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)</i> .....	92
III.9.2.9. <i>La détermination de l'azote KJELDAHL (NK)</i> .....	93
III.9.2.10. <i>La détermination du carbone organique total (COT)</i> .....	93
III.9.2.11. <i>La détermination des hydrocarbures totaux (HT)</i> .....	95
III.9.2.12. <i>La détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)</i> .....	96
<b>III.10. CONCEPTION DU PHOTOBIOREACTEUR DE TRAITEMENT DES EAUX USEES (PBRT) .....</b>	<b>96</b>
III.10.1. DESCRIPTION DU PROCEDE BIOLOGIQUE DANS LES TROIS BASSINS .....	97
III.10.2. PARAMETRES SUIVIS AU COURS DE LA CULTURE DES MICROALGUES .....	98
III.10.3. DETERMINATION DU TAUX DE CROISSANCE DE LA BIOMASSE.....	98
III.10.4. PRESENTATION DES ESPECES SELECTIONNEES ET ISOLEES .....	99
III.10.4.1. <i>Présentation structurale de Chlorella vulgaris</i> .....	99
III.10.4.2. <i>Présentation structurale de Aphanocapsa zanardinii</i> .....	100
III.10.4.3. <i>Présentation structurale de Nizschia sp.</i> .....	100
<b>III.11. BIOREMEDIATION DES EAUX USEES PAR LES MICROALGUES.....</b>	<b>101</b>
III.11.1. BIOREMEDIATION DES EAUX CONTAMINEES PAR DU CADMIUM EN UTILISANT DES MICROALGUES .....	101
III.11.1.1. <i>Présentation du métal lourd étudié : Cadmium (Cd)</i> .....	101
III.11.1.2. <i>Description du montage expérimental pour l'élimination du cadmium</i> .....	102

<i>III.11.1.3. Centrifugation et récupération de la biomasse</i>	103
<i>III.11.1.4. Préparation de l'Eau usée synthétique</i>	104
III.11.2. BIOREMEDIATION DES EAUX CONTAMINEES PAR DU PETROLE BRUT EN UTILISANT DES MICROALGUES	105
<b><u>CHAPITRE IV: RESULTATS ET DISCUSSION</u></b>	
<b>INTRODUCTION</b>	<b>109</b>
<b>IV.1. CARACTERISATION DES EAUX DES SITES DE PRELEVEMENT</b>	<b>109</b>
IV.1.1. CARACTERISATION BACTERIOLOGIQUE	109
IV.1.2. CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE	109
<i>IV.1.2.1. La température (T)</i>	110
<i>IV.1.2.2. Le potentiel d'hydrogène (pH)</i>	111
<i>IV.1.2.3. La conductivité électrique (CE)</i>	111
<i>IV.1.2.4. L'oxygène dissous (O<sub>2</sub> dis)</i>	112
<i>IV.1.2.5. La DCO et la DBO<sub>5</sub></i>	113
<i>IV.1.2.6. Les matières en suspension (MES)</i>	114
<i>IV.1.2.7. Les différentes formes de l'azote</i>	115
<i>III.2.2.8. Les teneurs en phosphates</i>	117
<i>IV.1.2.9. La caractérisation de la fraction organique</i>	117
<b>IV.2. IDENTIFICATION DES ESPECES</b>	<b>118</b>
IV.2.1. <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	118
IV.2.2. <i>APHANOCAPSA ZANARDINII</i>	119
IV.2.3. <i>NITZSCHIA SP.</i>	120
<b>IV.3. SUIVI DE LA CINETIQUE DE CROISSANCE DES MICROALGUES</b>	<b>120</b>
IV.3.1. SUIVI DE LA CINETIQUE DE LA CROISSANCE EN BIOMASSE AVEC LA CE	122
IV.3.2. SUIVI DE LA CINETIQUE DE LA CROISSANCE EN BIOMASSE AVEC L'O <sub>2</sub> DISSOUS	124
<b>IV.4. CARACTERISATION DE L'EAU USEE SYNTHETIQUE</b>	<b>125</b>
IV.4.1. DETERMINATION DES RAPPORTS DE BIODEGRADABILITE DE L'EAU USEE SYNTHETIQUE	126
IV.4.2. TRAITEMENT DE L'EAU USEE SYNTHETIQUE PAR LA CULTURE DE <i>NITZSCHIA SP.</i>	127
<i>IV.4.2.1. Evolution de la concentration en biomasse et de la CE de l'eau usée synthétique en fonction du temps</i>	127
<i>IV.4.2.2. Evolution de la concentration en biomasse et de l'O<sub>2</sub> dissous de l'eau usée synthétique en fonction du temps</i>	128

<b>IV.5. EVALUATION DE L'EFFICACITE DE TRAITEMENT BIOLOGIQUE PAR LES DIATOMÉES (NITZSCHIA).....</b>	<b>129</b>
IV.5.1. ELIMINATION DE LA POLLUTION AZOTEE PAR LES DIATOMÉES ( <i>NITZSCHIA SP.</i> ) .....	130
IV.5.2. ELIMINATION DU PHOSPHATE $PO_4^{3-}$ PAR LES DIATOMÉES ( <i>NITZSCHIA SP.</i> ) .....	133
IV.5.3. RENDEMENT D'ABATTEMENT DES VALEURS DE $DBO_5$ ET DE DCO .....	135
<b>IV.6. ELIMINATION DU CADMIUM PAR LES MICROALGUES <i>CHLORELLA</i> ET <i>APHANOCAPSA</i> .....</b>	<b>136</b>
IV.6.1. EVOLUTION DE LA BIOMASSE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS EN Cd.....	136
IV.6.2. TAUX D'ELIMINATION DU CADMIUM.....	141
<b>IV.7. LA DEGRADATION DU PETROLE BRUTE PAR LES MICROALGUES <i>CHLORELLA</i> ET <i>APHANOCAPSA</i> .....</b>	<b>144</b>
IV.7.1. SUIVI DE LA CROISSANCE EN BIOMASSE .....	145
IV.7.2. EVALUATION DU RENDEMENT .....	150
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>155</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>157</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>159</b>

# LISTE DES FIGURES

---

## CHAPITRE I

FIGURE I. 1: PRINCIPAUX MECANISMES MEMBRANAIRES PERMETTANT L'ENTREE DES METAUX DANS LA CELLULE (ADAPTE DE MASSON, 2013).....	15
FIGURE I. 2: LES DIFFERENTS COMPOSES DES HYDROCARBURES EXISTANT DANS LES PETROLES BRUTS (D'APRES (BERTRAND & MILLE, 1989)) .....	18
FIGURE I. 3: INVENTAIRE DES PRINCIPAUX HAPS D'APRES LES RECOMMANDATIONS DE L'US-EPA (WILSON & JONES, 1993) .....	20

## CHAPITRE II

FIGURE II. 1: DIVERSITE DU CHAMP D'APPLICATION DES MICROALGUES (SUMI, 2009).....	36
FIGURE II. 2: TRAITEMENT DES EAUX USEES PAR LES MICROALGUES.....	37
FIGURE II. 3 : SYSTEME DE TRAITEMENT DES EAUX USEES (BASSIN DE TYPE RACEWAY) (UDAIYAPPAN ET AL., 2017). .....	39
FIGURE II. 4: MODELE DE PHOTOBIOREACTEURS TUBULAIRES (MOHD UDAIYAPPAN ET AL., 2017). .....	41
FIGURE II. 5: PROCEDE DE TRAITEMENT DES EAUX PAR LES MICROALGUES (FILALI, 2012).....	48
FIGURE II. 6: MECANISMES DE PHYCOREMEDIATION DES MLs (MODIFIEE PAR GARCIA-GARCIA ET AL. (2016) ET SURESH KUMAR ET AL. (2015)) .....	50
FIGURE II. 7: VUE SCHEMATIQUE DES STRUCTURES DE LA PAROI CELLULAIRE DE CERTAINES ESPECES DE MICROALGUES (BAUDELET ET AL., 2017; DE CARVALHO ET AL., 2020). .....	52
FIGURE II. 8: MECANISMES DE BIO-ELIMINATION EXTRACELLULAIRE DES MLs A L'AIDE DE CELLULES VIVANTES DE MICROALGUES, MODIFIES PAR (MANTZOROU ET AL., 2018).....	54
FIGURE II. 9: SCHEMA GENERAL DE DETOXIFICATION INTRACELLULAIRE DES MLs DANS LES CELLULES DE MICROALGUES ADAPTE PAR (BLABY-HAAS & MERCHANT, 2012; TORRES ET AL., 2008).....	56

## CHAPITRE III

FIGURE III. 1: LOCALISATION DES SITES D'ECHANTILLONNAGE A SKIKDA (GOOGLE MAPS) .....	66
FIGURE III. 2: SITE ST1 APRES LE POINT DE REJET DE LA RAFFINERIE DANS LA ZONE ESTUAIRE A : IMAGE SATELLITAIRE (GOOGLE MAPS) B : IMAGE <i>IN SITU</i> (PHOTO PERSONNELLE) .....	66
FIGURE III. 3: SITE ST2 LA PLAGE « BEN MHIDI ». A : IMAGE SATELLITAIRE (GOOGLE MAPS) B : IMAGE <i>IN SITU</i> (PHOTO PERSONNELLE) .....	67
FIGURE III. 4: SITE ST3 LA PLAGE MILITAIRE. 1. A : IMAGE SATELLITAIRE (GOOGLE MAPS), B : IMAGE <i>IN SITU</i> (PHOTO PERSONNELLE) .....	67

FIGURE III. 5: ECHANTILLONNAGE DES MICROALGUES A L' AIDE D'UN FILET ET REMPLISSAGE DES BOUTEILLES EN VERRE STERILES (PHOTOS PERSONNELLES) .....	68
FIGURE III. 6: PREPARATION DES ECHANTILLONS .....	69
FIGURE III. 7: IDENTIFICATION MACROSCOPIQUE DES COLONIES DE MICROALGUES .....	69
FIGURE III. 8: IDENTIFICATION DES MICROALGUES PAR OBSERVATION MICROSCOPIQUE. ....	70
FIGURE III. 9: MONTAGE DU PHOTOBIOREACTEUR POUR LA CULTURE DES MICROALGUES.....	73
FIGURE III. 10: ETAPES DE PREPARATION DE L'EXTRAIT DE SOL.....	77
FIGURE III. 11: ISOLEMENT DES MICROALGUES SUR LE MILIEU BOLD GELOSE.....	78
FIGURE III. 12: REPIQUAGE DANS UN MILIEU LIQUIDE .....	79
FIGURE III. 13: REPIQUAGE DANS UN MILIEU GELOSE .....	79
FIGURE III. 14: REPIQUAGES SUCCESSIFS PAR COUPLAGE .....	80
FIGURE III. 15: SOUCHES DES MICROALGUES PURIFIEES APRES 7 JOURS D'INCUBATION .....	82
FIGURE III. 16: NUMERATION CELLULAIRE A L' AIDE DE LA CELLULE THOMA SOUS MICROSCOPE PHOTONIQUE MUNI D'UNE CAMERA ET RELIE A L' ORDINATEUR .....	83
FIGURE III. 17: DETERMINATION DES MATIERES SECHES (MS).....	85
FIGURE III. 18: MESURE DE DO PAR SPECTROPHOTOMETRE (HELIOS EPSILON 3SGN006008 UV-VIS) .....	86
FIGURE III. 19: PHOTOBIOREACTEUR (PBRT) POUR LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE DES EAUX USEES .....	97
FIGURE III. 20: CULTURES MERES EN MILIEU LIQUIDE AMENDE DU CADMIUM DES MICROALGUES EN CROISSANCE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> ET <i>APHANOCAPSA ZANARDINII</i> . ....	103
FIGURE III. 21: LES TROIS CONCENTRATIONS DE PETROLE BRUT UTILISEES (0,1%, 0,5% ET 1%).	106
FIGURE III. 22: TEMOINS DES ESPECES SANS PETROLE BRUT .....	107

## CHAPITRE IV

FIGURE IV. 1: LES VALEURS DE LA CONDUCTIVITE DES TROIS SITES DE PRELEVEMENT .....	111
FIGURE IV. 2: LES VALEURS DE L'OXYGENE DISSOUS POUR LES TROIS SITES.....	112
FIGURE IV. 3 : LES VALEURS DE LA DCO ET LA DBO <sub>5</sub> OBTENUES POUR LES TROIS SITES. ....	114
FIGURE IV. 4: LES VALEURS DE MES POUR LES TROIS SITES DE PRELEVEMENT. ....	115
FIGURE IV. 5: LES VALEURS DES NITRITES (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), D'AMMONIUM (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) ET DE L'AZOTE KDJELDHAL (NKDJ) DANS LES TROIS STATIONS DE PRELEVEMENT. ....	116
FIGURE IV. 6: LES VALEURS DES PHOSPHATES POUR LES TROIS SITES DE PRELEVEMENT. ....	117
FIGURE IV. 7: LES VALEURS DU CARBONE ORGANIQUE TOTAL (COT), HYDROCARBURES TOTAUX (HT) ET (HAPS).....	118

FIGURE IV. 8: OBSERVATION MACROSCOPIQUE (A) ET MICROSCOPIQUE (X1000) (B) DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> (PHOTOS PERSONNELLES) .....	119
FIGURE IV. 9 : OBSERVATION MACROSCOPIQUE (A) ET MICROSCOPIQUE (X1000) (B) DE L'ESPECE <i>APHANOCAPSA ZANARDINII</i> (PHOTOS PERSONNELLES) .....	119
FIGURE IV. 10: OBSERVATION MACROSCOPIQUE (A) ET MICROSCOPIQUE (X1000) (B) DE L'ESPECE <i>NITZSCHIA SP.</i> .....	120
FIGURE IV. 11 : EVOLUTION DE LA CROISSANCE EN BIOMASSE DES TROIS ESPECES DE MICROALGUES ( <i>NITZSCHIA SP.</i> , <i>A. ZANARDINII</i> ET <i>C. VULGARIS</i> ) ET DE LA CONDUCTIVITE DU MILIEU DE CULTURE (WC, BBM ET BG11) RESPECTIVEMENT EN FONCTION DU TEMPS .....	123
FIGURE IV. 12: EVOLUTION DE LA CROISSANCE EN BIOMASSE DES TROIS ESPECES DE MICROALGUES ( <i>NITZSCHIA SP.</i> , <i>A. ZANARDINII</i> ET <i>C. VULGARIS</i> ) ET DE LA CONCENTRATION EN O <sub>2</sub> DISSOUS DU MILIEU DE CULTURE (WC, BBM ET BG11) RESPECTIVEMENT EN FONCTION DU TEMPS.....	124
FIGURE IV. 13: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE DE <i>NITZSCHIA SP.</i> ET DE LA CONDUCTIVITE ELECTRIQUE DE L'EAU USEE SYNTHETIQUE EN FONCTION DU TEMPS .....	127
FIGURE IV. 14: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE DE <i>NITZSCHIA SP.</i> ET DE LA CONCENTRATION EN O <sub>2</sub> DISSOUS DE L'EAU USEE SYNTHETIQUE EN FONCTION DU TEMPS. ....	128
FIGURE IV. 15: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE DE <i>NITZSCHIA SP.</i> ET DE LA CONCENTRATION EN AMMONIUM, NITRITES ET NITRATES DE L'EAU USEE PENDANT 33 JOURS .....	130
FIGURE IV. 16: EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE DE <i>NITZSCHIA SP.</i> ET DE LA CONCENTRATION EN PHOSPHATE DE L'EAU USEE PENDANT 33 JOURS.....	133
FIGURE IV. 17: ÉVOLUTION DE LA DENSITE OPTIQUE DES DEUX MICROALGUES EN FONCTION DU TEMPS. (A) <i>A. ZANARDINII</i> , (B) <i>C. VULGARIS</i> . DO <sub>0</sub> , DO <sub>1</sub> , DO <sub>2</sub> ET DO <sub>3</sub> MENTIONNENT LES CONCENTRATIONS DE Cd <sup>2+</sup> (0, 50, 100 ET 250 MG/L).....	137
FIGURE IV. 18: ÉVALUATION DE LA CROISSANCE DU POIDS DE LA BIOMASSE SECHE EN FONCTION DU TEMPS. (A) <i>A. ZANARDINII</i> , (B) <i>C. VULGARIS</i> . MS <sub>0</sub> , MS <sub>1</sub> , MS <sub>2</sub> ET MS <sub>3</sub> REFERENCES AUX CONCENTRATIONS DE Cd <sup>2+</sup> (0, 50, 100 ET 250 MG/L).....	138
FIGURE IV. 19: CROISSANCE DE LA POPULATION CELLULAIRE DANS LES CULTURES DE MICROALGUES EN FONCTION DU TEMPS. (A) <i>A. ZANARDINII</i> , (B) <i>C. VULGARIS</i> . LOG(N) : NOMBRE DE CELLULES TRANSFORMEES EN LOG. LOG(N <sub>0</sub> ), LOG(N <sub>1</sub> ), LOG(N <sub>2</sub> ) ET LOG(N <sub>3</sub> ) FONT RESPECTIVEMENT REFERENCE AUX CONCENTRATIONS EN Cd <sup>2+</sup> (0, 50, 100 ET 250 MG/L)....	139
FIGURE IV. 20: ÉLIMINATION DU Cd <sup>2+</sup> A L'AIDE DE MICROALGUES BLEUES-VERTES ET VERTES : (A) <i>APHANOCAPSA ZANARDINII</i> , (B) <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .....	142

FIGURE IV. 21: DEGRADATION DU PETROLE BRUT: A : DEBUT D'INCUBATION. B : EMULSIFICATION  
DU PETROLE. C : DEGRADATION DU PETROLE ET PRODUCTION DE BIOMASSE..... 145

FIGURE IV. 22: EFFET DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION DU PETROLE BRUT SUR LA DENSITE  
OPTIQUE DU *A. ZANARDINII* ET *C. VULGARIS*. ..... 147

FIGURE IV. 23: EFFET DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION DU PETROLE BRUT SUR LES  
NOMBRES DES CELLULES VIABLES DU *A. ZANARDINII* ET *C. VULGARIS*..... 149

# LISTE DES TABLEAUX

---

**CHAPITRE II**

TABLEAU II. 1: AVANTAGES ET LIMITES DES SYSTEMES DE CULTURE DES MICROALGUES (CHEAH ET AL., 2015; UMAMAHESWARI & SHANTHAKUMAR, 2016; ZHANG ET AL., 2014).....43

**CHAPITRE III**

TABLEAU III. 1: LOCALISATION DES SITES D’ECHANTILLONNAGE .....65

TABLEAU III. 2: MILIEU DE CULTURE DE BOLD 1967 : MILIEU D’USAGE GENERAL POUR LES MICROALGUES VERTES UNICELLULAIRES (BAJWA ET AL., 2017)..... 74

TABLEAU III. 3: MILIEU DE CULTURE WC POUR LES DIATOMEES ..... 76

TABLEAU III. 4: COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE BG11 SPECIFIQUE POUR LES MICROALGUES VERTES UNICELLULAIRES .....81

TABLEAU III. 5: COMPOSITION CHIMIQUE DE L’EAU USEE SYNTHETIQUE ..... 105

**CHAPITRE IV**

TABLEAU IV. 1: DENOMBREMENT DE FAMT ..... 109

TABLEAU IV. 2: PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES DE L’EAU DES TROIS SITES DE PRELEVEMENT DES MICROALGUES ..... 110

TABLEAU IV. 3 : RESULTATS DE LA CROISSANCE EN BIOMASSE DE *NITZSCHIA SP.* EN FONCTION DES PARAMETRES DE CONTROLE DE CONDUCTIVITE, pH, TEMPERATURE ET O<sub>2</sub> DISSOUS..... 121

TABLEAU IV. 4: RESULTATS DE CROISSANCE EN BIOMASSE DE *A. ZANARDINII* ET *C. VULGARIS* CULTIVEES DANS LE MILIEU DE CULTURE BBM ET BG11 RESPECTIVEMENT. .... 122

TABLEAU IV. 5 : RESULTATS DES DIFFERENTS PARAMETRES EFFECTUES AVANT TRAITEMENT. ... 125

TABLEAU IV. 6: RAPPORTS DE BIODEGRADABILITE DE L’EAU USEE SYNTHETIQUE..... 126

TABLEAU IV. 7 : RESULTATS DE LA CULTURE DE *NITZSCHIA SP.* DANS L’EAU USEE SYNTHETIQUE 127

TABLEAU IV. 8: COMPARAISON DES RESULTATS DE CARACTERISATION DES DEUX BASSINS DE TRAITEMENT DU PHOTOBIOREACTEUR BASSIN1 (EAU USEE) ET BASSIN3 (EAU EPUREE)..... 129

TABLEAU IV. 9: ÉVOLUTION DE LA DENSITE OPTIQUE POUR *A. ZANARDINII* ET *C. VULGARIS* CULTIVES SUR BBM LIQUIDE AVEC DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DE Cd<sup>2+</sup>. .... 137

TABLEAU IV. 10: ÉVOLUTION DU POIDS DE LA BIOMASSE SECHE DES DEUX MICROALGUES CULTIVEES AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE Cd<sup>2+</sup> ..... 138

TABLEAU IV. 11: EVOLUTION DE LA CROISSANCE DES BIOMASSES D’ALGUES CULTIVEES SUR BBM LIQUIDE ENRICHIS OU NON EN Cd A DIFFERENTES CONCENTRATIONS. .... 139

TABLEAU IV. 12: TAUX DE CROISSANCE  $\mu$  ET TEMPS DE DOUBLEMENT DE GENERATION G DETERMINES POUR LES DEUX ESPECES *A. ZANARDINII* ET *C. VULGARIS* POUR CHAQUE CONCENTRATION DE Cd. .... 140

TABLEAU IV. 13: TAUX DE BIO-ELIMINATION DU $Cd^{2+}$ A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN UTILISANT LES MICROALGUES <i>A. ZANARDINII</i> ET <i>C. VULGARIS</i> .....	142
TABLEAU IV. 14: ÉVOLUTION DE LA DENSITE OPTIQUE POUR <i>A. ZANARDINII</i> ET <i>C. VULGARIS</i> AVEC DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DE PETROLE BRUT. ....	146
TABLEAU IV. 15: ÉVOLUTION DE LA NUMERATION CELLULAIRE LOG (N) POUR <i>A. ZANARDINII</i> ET <i>C.</i> <i>VULGARIS</i> AVEC DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DE PETROLE BRUT.....	148
TABLEAU IV. 16: TAUX DE CROISSANCE $\mu$ ET TEMPS DE DOUBLEMENT DE GENERATION G DETERMINEES POUR LES DEUX ESPECES <i>A. ZANARDINII</i> ET <i>C. VULGARIS</i> POUR CHAQUE CONCENTRATION DE PB (1%, 0,5% ET 0,1%).....	140
TABLEAU IV. 17: TAUX DE BIO-ELIMINATION DU PETROLE BRUT A DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN UTILISANT LES MICROALGUES <i>A. ZANARDINII</i> ET <i>C. VULGARIS</i> .....	150

# **LISTE DES ABREVIATIONS**

---

**A**

ADN  
 Acide désoxyribonucléique .....23

ADP  
 Adénosine diphosphate ..... 15

AEP  
 Alimentation en eau potable .....24

AFM  
 Microscopie à force atomique .....59

Ag<sup>+</sup>  
 Argent..... 13

Al<sup>3+</sup>  
 Aluminium..... 13

ARN  
 Acide ribonucléique ..... 134

As<sup>2+</sup>  
 Arsenic..... 13

ASTM  
 American Society for Testing and  
 Materials ..... 13

ATP  
 Adénosine triphosphate ..... 134

ATPases  
 Enzymes d'hydrolyse ou de synthèse des  
 molécules d'adénosine-triphosphate  
 (ATP).....55

ATPases de type P1B  
 are integral membrane proteins that  
 couple ATP hydrolysis to metal cation  
 transport.....55

**B**

BBM  
 Bold Basal Medium.....69

BG11  
 Blue Green Medium .....72

BTP  
 Bâtiment et travaux publics .....36

**C**

Ca<sup>2+</sup>  
 Calcium.....52

Ccc1/VIT1  
 des familles de compléments croisés  
 sensibles au Ca<sup>2+</sup>/transporteur de fer  
 vacuolaire1 .....55

CCUS  
 Capture et utilisation rentables du carbone  
 .....61

Cd<sup>2+</sup>  
 Cadmium..... 11

CDF  
 facilitateur de diffusion de cations .....55  
 Facilitateur de diffusion de cations .....55

CE  
 Conductivité électrique.....88

CIRC  
 Centre International de Recherche sur le  
 Cancer ..... 102

CN  
 Cyanure.....9

CO<sub>2</sub>  
 Dioxyde de carbone.....2

Co <sup>2+</sup>	Imagerie par spectroscopie électronique	59
Cobalt .....		13
<i>COT</i>	<b>F</b>	
<i>Carbone organique total</i> .....	Fe <sup>2+</sup>	
	Fer ferreux.....	11
Cr <sup>3+</sup>	FPN	
Chrome .....	FerroPortiN .....	55
CRBt	FTR	
Centre de recherche en biotechnologie	Fe-Transporter.....	55
(Constantine).....		89
CTR	<b>G</b>	
Cu -familles de transporteurs.....	GC-MS	
	Chromatographie en phase gazeuse	
Cu <sup>2+</sup>	couplée à un spectromètre de masse..	89
Cuivre .....	GCS	
	Glutamylcystéine synthétase.....	57
Cys	Glu	
la cystéine .....	le glutamate.....	57
		57
<b>D</b>	Gly	
DBO	la glycine.....	57
Demande biochimique en Oxygène .....		60
DO	GS	
Densité optique .....	Glutathion synthétase .....	57
		83
<b>E</b>	GSH	
EDS	Groupe sulfhydrile.....	57
Spectroscopie à rayons X à dispersion		
d'énergie .....	<b>H</b>	
	ha	
EELS	Hectar .....	40
Spectroscopie de perte d'énergie	HAPs	
électronique.....	Hydrocarbures aromatiques polycycliques	
	.....	19
EP	HC	
Effluents pétroliers .....	Hydrocarbures .....	16
		152
EPS	HCA	
Extracellular polymeric substance .....	Hydrocarbures aromatiques .....	16
		53
ESI		

HCN	Logarithme à base de 2 de la
acide cyanhydrique ..... 9	concentration en biomasse ..... 121
Hg <sup>2+</sup>	LUX
Mercure ..... 11	Unité du flux lumineux..... 71
HRAP	<b>M</b>
High rate algal ponds ..... 40	MES
Systèmes d'étangs d'algues à haut débit 61	Matières en suspension..... 6, 84
HT	MET
Hydrocarbures totaux ..... 95	Microscope électronique à transmission 58
HWM	Mg <sup>2+</sup>
High Molecular Weight..... 29	Magnésium..... 52
<b>K</b>	milieu f/2
K	Milieu de culture de Guillard F/2 utilisé
Coefficient de biodégradabilité des eaux	pour la culture d'algue..... 133
usées ..... 94	MLs
K <sup>+</sup>	Métaux lourds ..... 49
Potassium..... 52	Mn <sup>2+</sup>
kDa	Manganèse ..... 13
kilo Dalton ..... 56	MO
<b>L</b>	Matière organique ..... 95
LB-EPS	Mo <sup>2+</sup>
Substances polymères extracellulaires	Molybdène ..... 14
attachés à la paroi cellulaire ou les EPS	MS
lâchement liés..... 53	Matière sèche ..... 83
LED	MT
Diode électroluminescente ..... 71	Microtubules ..... 56
LMW	MTs
Light Molecular Weight ..... 29	Métallothionéines ..... 56
Log (N)	<b>N</b>
Log décimal du nombre de cellules (N)	N
..... 138	Nitrogène (Azote)..... 48
log[C]	Na <sup>+</sup>

Sodium .....	52	<b>P</b>	
NaCl		P	
Chlorure de sodium .....	68	Phosphore .....	48
NADPH		Pb <sup>2+</sup>	
Nicotinamide Adenine Dinucleotide		Plomb.....	11
Phosphate .....	117	PBR	
NC		Photobioréacteur .....	41
Numération cellulaire .....	83	PBRT	
NH <sub>3</sub>		Photobioréacteur de traitement .....	69
Ammoniaque.....	10	PC	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		Phytochélatines .....	56
Ammonium.....	10	PCA	
Ni <sup>2+</sup>		Plate Count Agar .....	87
Nickel .....	13	PCS	
NK		Phytochélatine synthase.....	56
Azote Kjeldahl .....	115	pH	
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		Potentiel d'Hydrogène .....	13
Nitrites .....	10	<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup></b>	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		Les ortho-phosphates.....	89
Nitrates .....	10	polype	
NRAMP		Polymères d'orthophosphate.....	58
Natural Resistance-Associated		ppm	
Macrophage Proteins.....	55	Partie par million.....	19
NT		PSM	
Azote total .....	125	Poste de sécurité microbiologique .....	78
NTEL		PT	
National Energy Technology Laboratory		Phosphore total.....	126
.....	61	<b>Q</b>	
<b>O</b>		<b>Q<sub>Total</sub></b>	
O <sub>2</sub> dis		Quantité d'hydrocarbures totale .....	96
Oxygène dissout.....	90	<b>R</b>	
OMS		R <sub>PB</sub> %	
Organisation Mondiale de la Santé .....	13		

Rendement d'épuration du pétrole brute en pourcentage ..... 150	Témoin..... 150
<b>RWP</b>	<b>U</b>
Raceway pond.....44	UFC
<b>S</b>	Unité formant colonie.....87
Se <sup>2+</sup>	USA
Selenium..... 13	United States of American.....21
<b>SIM</b>	<b>V</b>
Spectroscopie d'ions sélectifs..... 89	Vs
<b>SL-EPS</b>	Volume de l'échantillon (sample volume) .....96
Substances polymères extracellulaires solubles dans les milieux de croissance .....53	<b>W</b>
Sr <sup>2+</sup>	WAF
Strontium ..... 13	Water-Accommodated fraction..... 153
<b>STEP</b>	WC
Station d'épuration ..... 1	The standard culture medium for freshwater diatoms from habitats with neutral to high pH..... 72
<b>T</b>	<b>Wi, W<sub>f</sub></b>
TB- EPS	Poids initial et poids final .....96
Substances polymères extracellulaires étroitement liés..... 53	<b>Z</b>
<b>TBT</b>	ZIP
Tributylétain ..... 37	Zrt-Irt-like protein .....55
<b>TCA</b>	Zn <sup>2+</sup>
Acide tricarboxylique..... 29	Zinc..... 11
<b>Tm</b>	

# **INTRODUCTION GENERALE**

---

## **INTRODUCTION GENERALE**

L'eau est un élément de préservation de la santé de l'Homme, mais aussi, le véhicule le plus commun et le plus important de la transmission des maladies, surtout que les risques de pollutions existent à chaque étape du parcours de l'eau. La surveillance de sa qualité comprend plusieurs étapes et on imagine difficilement la somme des compétences et de technicités nécessaires pour assurer les qualités saines de l'eau par l'exploitation des sources d'eau afin d'éliminer les substances et les microorganismes susceptibles de présenter un risque pour la santé.

Plusieurs stratégies ont été utilisées pour la dépollution des eaux usées telle que le traitement par des procédés biologiques classiques (Le lagunage, les lits bactériens, les disques biologiques et les boues activées). Les technologies conventionnelles appliquées pour éliminer les polluants chimiques tels que les métaux lourds et les hydrocarbures en particulier à de faibles concentrations sont inefficaces et/ou coûteuse (**Dwivedi, 2012**). A cet effet, le développement d'autres méthodes plus efficaces est devenu une nécessité. Toutefois, le traitement des eaux usées est un processus très important pour la vie humaine. Cependant, l'épuration des eaux usées est effectuée non seulement pour protéger la santé de la population et éviter les maladies contagieuses, mais aussi pour protéger l'environnement. A l'heure actuelle, ce dernier but devient de plus en plus important et les techniques de traitement et les stations d'épuration évoluent constamment. Les traitements usuels ont été complétés par des traitements qui visent à éliminer le plus possible de substances nocives pour les écosystèmes (**Moulin et al., 2013**).

La plupart des stations d'épuration (STEP), ne répondent pas à l'objectif principal d'élimination des substances dangereuses et toxiques présentes dans les eaux usées. Ce problème présente la limite primordiale contre la réutilisation des eaux usées. C'est dans ce but que se sont développées à l'heure actuelle des procédés innovants pour le traitement des eaux usées, qui sont par exemple : Les technologies membranaires (**Tamburini et al., 2013**) telles que : l'osmose inverse couplée à de l'ultrafiltration en prétraitement, les procédés d'adsorption réversible, les procédés d'oxydation avancée et les biotechnologies telles que l'utilisation des photobioréacteurs qui constituent une évolution des procédés biologiques au respect de l'environnement et du développement durable.

L'une de ces méthodes est la phycoremédiation qui utilise des microalgues pour la dépollution des eaux usées,

En effet, les microalgues sont des microorganismes aquatiques unicellulaires photosynthétiques qui présentent une grande diversité morphologique et des caractéristiques

biochimiques intéressantes qui leur confèrent un grand nombre d'applications à l'échelle scientifique et industrielle dans différents domaines (**Filali, 2012**), elles sont apparues comme une solution dans une optique de durabilité environnementale qui pourraient permettre de retirer efficacement les nutriments en fortes concentrations dans les eaux usées. Les microalgues possèdent un potentiel biotechnologique évident.

L'utilisation des microalgues dans les processus biotechnologiques a reçu beaucoup d'attention à l'échelle mondiale actuelle. Ceci est principalement dû au fait qu'ils sont peu coûteux à cultiver, nécessitant que la lumière du soleil et le CO<sub>2</sub>, tout en fournissant une gamme d'emplois telles que: la protection de l'environnement par l'utilisation de leurs aptitudes à fixer le CO<sub>2</sub> et quelques métaux lourds pendant leurs périodes de croissance (traitement des eaux usées, réduction des gaz à effet de serre) et à produire de l'énergie sans dégagement de gaz à effet de serre (production de biocarburants), l'alimentation des poissons, la génération de métabolites d'intérêt et en biorestauration (**Becerra-Celis, 2009**). En effet, du fait des conséquences du réchauffement climatique et des émissions importantes de gaz à effet de serre, plusieurs études se sont orientées vers le rôle potentiel des systèmes biologiques (**Collotta et al., 2018; Dhar et al., 2020; Razzak et al., 2013; Sukačová et al., 2017**), et plus spécialement l'implication de la biotechnologie microalgale respectueuse de l'environnement, dans la réduction et l'élimination de ces émissions (**Daneshvar et al., 2022**). Beaucoup de travaux ont porté sur la culture des microalgues et leurs capacités et rôles importants dans le traitement des eaux usées et la biosorption des différents types des métaux lourds et polluants (**Andrade & Andrade, 2018; Li et al., 2021; Lin et al., 2020; Salam, 2019**).

En raison de leur surface cellulaire spécifique étendue, les microalgues ont des capacités d'absorption particulièrement intéressantes pour la décontamination de milieux pollués et la lutte contre l'eutrophisation. Ces applications de bioremédiation sont largement documentées dans la littérature scientifique (**Abdel-Raouf et al., 2012; Choi & Lee, 2012; Tricolici et al., 2014; Wang et al., 2010**). Les taux de croissance élevés des microalgues, associés à leurs capacités d'absorption de l'azote et du phosphore, peuvent ainsi être mis à profit pour l'épuration des eaux urbaines ou industrielles ou des effluents d'élevage (**Rana, 2010; Samori et al., 2013**). Elles sont utilisées depuis longtemps dans des procédés de lagunage, qui utilisent des végétaux aquatiques comme agents épurateurs (**Rassam et al., 2012**).

C'est dans ce cadre que s'inscrit la présente thèse qui porte sur l'utilisation des microalgues pour éliminer la pollution carbonée, azoté, phosphoré, les métaux lourds et les hydrocarbures contenus dans les eaux usées.

Dans l'introduction générale, sont présentés la problématique générale, le contexte scientifique et les objectifs tracés.

La présente thèse est composée de quatre chapitres.

Le premier chapitre est consacré à la présentation du contexte de l'étude à travers une synthèse bibliographique des différentes notions importantes abordées tout au long de notre thèse.

Le deuxième chapitre constitue l'état de l'art de notre thèse. Ce chapitre est consacré à une synthèse générale sur les microalgues et leurs applications dans le domaine de la dépollution des eaux usées.

Au cours du troisième chapitre, nous présenterons la méthodologie de recherche suivie pour la réalisation des travaux expérimentaux dans l'objectif de répondre à la problématique proposée dans le thème de notre thèse, en étudiant l'efficacité d'utilisation des microalgues dans la bioremédiation des eaux usées.

Le quatrième chapitre a pour objectif de présenter les principaux résultats obtenus et leur discussion qui permet de ressortir des aspects novateurs et originaux issus de notre investigation de recherche scientifique.

Enfin, une conclusion générale fait un bilan global des différentes méthodologies suivies et les principaux résultats obtenus. Des perspectives de recherches envisageables seront identifiées à la fin de la conclusion générale.

# CHAPITRE I :

## CONTEXTE DE L'ETUDE

---

## **INTRODUCTION**

La pollution de l'eau est devenue maintenant un problème universel. D'un jour à l'autre, une évaluation de la politique des ressources en eau est nécessaire pour empêcher ce problème. Des décès et des maladies sont causés dans le monde entier en raison de la pollution de l'eau et environ 14 000 personnes meurent chaque jour à cause de la pollution de l'eau (**Arif, 2020**). Les pays développés comme les pays en développement sont confrontés aux problèmes de pollution de l'eau (**Yang, 1990**). La qualité de l'eau est influencée par de nombreux facteurs comme les précipitations, le climat, le type de sol, la végétation, la géologie, les conditions d'écoulement, les eaux souterraines et les activités humaines. La plus grande menace pour la qualité de l'eau est posée par les sources ponctuelles des industries et des municipalités. Les activités comme l'exploitation minière, le développement urbain et l'agriculture affectent également la qualité de l'eau. La pollution de source non ponctuelle comprend également les nutriments, les sédiments et les contaminants toxiques (**Florescu et al., 2011**).

### **I.1. POLLUTION DES MILIEUX AQUATIQUES**

La pollution des eaux est l'introduction dans le milieu aquatique de toute substance susceptible de modifier les caractéristiques physiques, chimiques et/ou biologiques de l'eau et de créer des risques pour la santé de l'homme, de nuire à la faune et la flore terrestres et aquatiques (**Ramade, 2000**).

Selon la gestion intégrée des ressources en eau « La pollution de l'eau est déterminée par la transformation des caractéristiques physiques, chimiques ou biologiques de l'eau sous l'action d'une activité humaine ou naturelle de façon à la rendre dangereuse ou préjudiciable pour la santé, la sécurité et le bien être public » (**GWP, 2000**).

La pollution de l'eau est formée par des décharges, évacuations, boues directs ou indirects de corps étrangers ou de matières indésirables telles que les microorganismes, les produits toxiques, les déchets industriels.

La pollution de l'eau est peut-être observée dans :

- Les nappes ou les sources d'eaux par suite d'infiltration d'eaux usées ;
- Les eaux de surfaces qui sont souillées par les déversements des eaux non traitées ;
- Les canalisations et les réseaux d'alimentations en eau (**Bouziani, 2000**).

## **I.2. LES DIFFERENTS TYPES DE POLLUTIONS DES EAUX**

### **I.2.1. La pollution microbiologique**

Elle est marquée par le déversement des eaux usées urbaines très chargées en germes entériques excrétés avec les matières fécales. Cette flore intestinale normale est contenue des organismes pathogènes. On peut classer tous ces organismes en quatre grands groupes: les virus, les bactéries, les protozoaires et les helminthes selon leur ordre grandissant de taille (**Baumont, 2004**). Lors de l'introduction dans un milieu aquatique d'un effluent de matières organiques fécales humaines ou animales, il résulte d'un déplacement des germes pathogènes à ce dernier où ils subissent une dissolution. Bien que ces germes intestinaux soient habitués à un milieu riche en matière organique, ils peuvent survivre dans des conditions défavorables qui développent chez eux des possibilités accrues de résistance. Du fait qu'ils sont souvent aérobies/anaérobies facultatifs, ils peuvent se développer dans différents horizons aquatiques aussi bien en eaux superficielles que souterraines. Ces germes sont la source de développement des maladies infectieuses (peste, choléra, poliomyélite, hépatite virale, etc....) (**Sahnoun, 2010**). Par conséquent, des stérilisants tels que le chlore doivent être utilisés pour éliminer ces polluants dans l'eau potable (**Ewaid & Abed, 2017**).

### **I.2.2. La pollution physique**

C'est une pollution qui s'explique par l'existence des particules de différentes tailles et de matières très diversifiées dans l'eau, qui lui donnent une propriété trouble. On peut distinguer les substances qui se déposent au fond (plus lourdes que l'eau), les substances qui flottent (plus légères que l'eau) et les substances non séparables (de même densité que l'eau) (**Bouziati, 2000**). Ce type de polluants modifie la couleur, le goût et l'odeur de l'eau. La pollution physique est un changement du caractère physique du milieu (**Sahnoun, 2010**). Dont on peut citer:

#### ***1.2.2.1. La pollution mécanique***

Elle provient des déversements des impétrées et des éléments solides apportés par les eaux usées industrielles, ainsi que les eaux de ruissellement. Ces contaminants sont soit des particules grossières, soit du sable ou bien les matières en suspension (MES) (**Galaf & Ghannam, 2003**). Ces déchets solides divers (objets d'origines variés) posent des problèmes

d'esthétiques. Les matières colorantes affectent la transparence du milieu (**Gaamoune, 2010**) et diminuent la pénétration de la lumière (**De Villers et al., 2005**).

### ***1.2.2.2. La pollution thermique***

L'une des formes de pollution physique est la température élevée. Ce sont les eaux évacuées par les industries utilisant un circuit de refroidissement dans la plupart des installations (centrales thermiques, nucléaires, raffineries, aciéries..). L'élévation de la température qu'elles induisent diminue la teneur en oxygène dissous (**Rodier et al., 2009**), cette diminution nuit aux organismes aquatiques (**Ewaid & Abed, 2017**). Elle augmente la vitesse de la biodégradation et la propagation des germes. Une augmentation de température favorise les effets catastrophiques de la contamination (**Galaf & Ghannam, 2003**).

### ***1.2.2.3. La pollution radioactive***

Ces contaminants sont spécialement un ensemble des particules et des complexes radioactifs qui contiennent les dérivés de l'uranium, le plutonium, le césium et l'iode, etc. (**Festy et al., 2003**). La pollution radioactive des eaux comporte un risque de plus en plus important, elle a une conséquence directe sur les populations aquatiques en raison de la nuisance de ses éléments et des caractéristiques oncogènes et mutagènes de ses émissions. Le risque de ce type de pollution est accru par l'activité nucléaire et la tentative d'élimination des déchets nucléaires. Les matières radioactives peuvent s'infiltrer dans les masses d'eau, où elles sont absorbées par les organismes vivants. Les organismes sont transmis à l'homme provoquant divers effets sur la génétique (**Ewaid & Abed, 2017**). Le radium est le rayonnement le plus important qui cause le cancer des os. Aussi, la présence de matières radioactives dans l'eau conduit à un changement physiologique (**Ewaid et al., 2019**), ou dans le pire des cas, à partir d'une explosion nucléaire.

### **1.2.3. La pollution chimique**

La pollution chimique est probablement la plus fréquente, très ressentie et très diverse (**Festy et al., 2003**). Elle est produite à partir des rejets chimiques, principalement d'origine industrielle. Ce type de pollution résulte de la présence de quantités excessives de sels dissous, d'acides, fluorures, métaux, matières organiques, engrais et pesticides. Les métaux sont pour la plupart solubles dans l'eau dans une certaine mesure, y compris certains toxiques comme le baryum, le cadmium, le plomb et le mercure. Alors que les métaux non toxiques comprennent le calcium, le magnésium, le sodium, le fer et le cuivre, dont l'augmentation provoque certaines

maladies. Une concentration excessive de sodium, par exemple, rend l'eau désagréable au goût et entraîne des risques pour la santé pour les maladies cardiaques et rénales et l'empoisonnement des plantes. De même, la plupart des matières organiques peuvent être dissoutes dans l'eau. Ce sont soit des matières organiques, qui peuvent être dissoutes par les bactéries présentes dans l'eau, ou ils ne sont pas solubles, tels que les pesticides et les détergents. Les engrais comprennent principalement de l'azote et du phosphore, et leur présence dans l'eau aide les plantes aquatiques à pousser de plus en plus. Cela peut entraîner le phénomène de vieillissement des lacs, qui finissent par se transformer en marécages ou en terres arides (**Ewaid & Abed, 2017**).

Annuellement, des milliers des composés sont synthétisés par les industries chimiques. La plus grande partie de ces produits sont conçus pour être toxiques et persistants (**Gaamoune, 2010**). Cependant, les produits chimiques d'origine naturelle sont les polluants les plus néfastes à la santé sont qui se trouvent habituellement dans les eaux souterraines (**Roberts et al., 2007**).

Donc la pollution chimique des eaux est divisée en deux catégories qui sont :

- Organiques (hydrocarbures, pesticides, détergents, phénols.) ;
- Minérales (métaux lourds, cyanure, azote, phosphore...).

### **A. La pollution organique**

Elle représente les eaux usées qui contiennent des composés organiques biodégradables, produit par les manufactures alimentaires et agroalimentaires (laiteries, abattoirs, sucreries...), et par les eaux usées domestique (excrétions humaines, gras, lipides...etc.). Cette pollution consomme l'oxygène dissous de ces eaux. Les polluants organiques ce sont principalement les détergents, les pesticides et les hydrocarbures (le pétrole et ses dérivés), fongicides (**Ewaid et al., 2019**).

#### ➤ **Les hydrocarbures**

Sont des composées faiblement solubles dans l'eau et biodégradables. Ils résultent des industries du pétrole et des transports, caractérisés par la flottation sur la surface de l'eau à cause de leur faible densité par rapport à l'eau, et ils forment une fine couche qui perturbe les échanges gazeux avec l'atmosphère.

#### ➤ **Les détergents**

Sont des substances tensioactives artificielles qui proviennent des déversements des eaux usées urbaines et industrielles. Les nuisances engendrées par l'utilisation des détergents sont :

- L'apparition de goût du savon.
- Ils provoquent un ralentissement du processus d'épuration naturelle ou artificielle par la formation de mousse

- La diminution de la dissolution de l'oxygène dans l'eau.

➤ **Les pesticides**

Les conséquences néfastes des pesticides, qui sont généralement classées en tant que des produits utilisés en agriculture, sont liées aux caractéristiques suivantes :

- Rémanence et stabilité chimique conduisant à une accumulation dans les produits alimentaires ;

- Rupture de l'équilibre nature.

## **B. La pollution minérale**

La multiplication des végétaux est influencée par la pollution minérale des eaux, ce type de pollution peut provoquer aussi des problèmes physiologiques chez les animaux. Les métaux lourds et les éléments minéraux nutritifs sont généralement les constituants des polluants minéraux (Mayet, 1994).

➤ **Les métaux lourds**

Les eaux usées urbaines contiennent des métaux lourds de l'ordre de quelques µg/L. Elles englobent le fer, le zinc, le cuivre et le plomb de grande concentration par rapport aux autres métaux (manganèse, aluminium, chrome, arsenic, sélénium, mercure, cadmium, molybdène, nickel, etc.) qui sont présents à l'état de traces.

➤ **Les cyanures**

Ce sont des substances toxiques à effet rapide qui peuvent exister sous plusieurs formes, telles que les formes gazeuses, liquides et solides. Bien que les cyanures se trouvent naturellement dans de nombreux aliments et plantes. Les équipements de cyanuration, galvanoplastie, traitement de minerais sont responsables de déversement dans les eaux d'autres composés cyanogènes. La formation de l'acide cyanhydrique (HCN) qui se produit lors du rejet des ions CN<sup>-</sup> dans l'eau, devient très dangereuse selon l'équilibre de cette réaction :



➤ **La pollution par l'azote**

Les sources des déchets plus ou moins riches en azote sont celles issues des activités industrielles lors de la production des engrais, des cokeries, et des industries chimiques et

agroalimentaires (OFEV, 2014). L'azote existe sous deux formes: La forme réduite qui regroupe l'azote ammoniacal ( $\text{NH}_3$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) et l'azote organique (protéine, créatine, acide urique), plus une forme oxydée en ions nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ).

### ➤ **La pollution par le phosphore**

Les usines de traitement de surfaces des métaux et les laverie industrielles de production d'engrais agroalimentaire sont les majeures sources de la pollution phosphorée (Rodier et al., 2009). Le phosphore est un élément nutritif comme l'azote. La multiplication exagérée des algues et de phytoplancton dans les environnements aquatiques en présence des phosphates provoque le phénomène d'eutrophisation.

Les nitrates et les phosphates sont des composés qui provoquent le phénomène de verdissement de l'eau, ou ce qui est connu sous le nom de floraison. Ils apparaissent comme une couche verte de mauvaises herbes à la surface des réservoirs, des lacs, bord de mer et eaux stagnantes. Il recouvre la surface de l'eau, ce qui empêche l'oxygène d'entrer dans l'eau et affecte la vie des organismes aquatiques. Les algues vertes sont constituées de carbone, d'azote et de phosphore. Il est noté que les nitrates se combinent avec l'hémoglobine, à la place de l'oxygène, provoquant étouffement (Ewaid et al., 2019).

## **I.3. POLLUTION PAR LES METAUX LOURDS**

Les métaux lourds, aussi nommés éléments-traces métalliques, sont présents dans le milieu marin de façon naturelle et certains sont mêmes essentiels au bon fonctionnement de nombreux processus biologiques (Daby, 2006). Les éléments métalliques les plus dangereux pour la santé humaine et des écosystèmes sont principalement le mercure, le cadmium, le nickel et le plomb, et quelques autres comme le cuivre, le zinc, l'argent et le chrome (Sahnoun, 2010).

### **I.3.1. Définition des métaux lourds**

Les métaux lourds ou les éléments métalliques naturels se trouvent généralement dans l'environnement en très fines concentrations de l'ordre de traces tels que le mercure, plomb, cadmium, cuivre, arsenic, nickel, zinc, cobalt, manganèse etc. (Arris, 2008). D'un point de vue chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux.

D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$  (Adriano, 2001).

### **I.3.2. Classification des métaux lourds**

D'un point de vue biologique, les métaux sont généralement séparés en deux catégories en fonction de leurs effets physiologiques : métaux essentiels et métaux toxiques essentiels ou non pour les êtres vivants. En effet, ils peuvent s'avérer indispensables au déroulement des processus biologiques (oligo-éléments), et d'autres ne sont pas nécessaires à la vie, et peuvent provoquer des dommages (El-Sheekh et al., 2003; Picaud, 2017).

#### **A. Les éléments traces essentiels**

Les métaux traces essentiels sont des éléments vitaux, leur déficience entraîne soit la mort de l'individu, soit un déséquilibre grave dans la fonction de son organisme. En utilisant une définition plus large, on peut considérer comme « essentiel » tout élément minéral dont la carence a pour conséquence l'altération d'une ou plusieurs fonctions de l'organisme comme le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), le cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), le zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), ces dernières pouvant être corrigées par un apport adéquat (El-Sheekh et al., 2003; Nys et al., 2020; Picaud, 2017). Il remplit des fonctions biochimiques bien précises dans l'organisme et que son absence entraîne l'apparition de symptômes pathologiques qui disparaissent lorsque le composé est à nouveau présent (Kucuksezgin et al., 2006).

#### **B. Les éléments traces non essentiels (métaux toxiques)**

Inversement, ces éléments ne présentent aucune fonction métabolique, ils ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. C'est le cas du plomb ( $\text{Pb}^{2+}$ ), du mercure ( $\text{Hg}^{2+}$ ), du cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) (Behanzin et al., 2015).

### **I.3.3. Utilisation des métaux lourds**

Les métaux lourds ont été largement utilisés dans les nouvelles technologies (métallurgiques et électroniques) en raison de leurs diverses caractéristiques uniques. De ce fait, ils peuvent être employés dans les aciers inoxydables, les matériaux de construction, les munitions, les matériaux médicaux, la bijouterie, etc. (Salvarredy Aranguren, 2008), et même les produits chimiques agricoles comme les fongicides, les insecticides et les herbicides peuvent

contenir des métaux toxiques comme le  $\text{Cu}^{2+}$ , le  $\text{Cd}^{2+}$ , le  $\text{Zn}^{2+}$  et le  $\text{Pb}^{2+}$  (Compaoré & Nanéma, 2010).

### **I.3.4. Sources de pollution par les métaux lourds et les métalloïdes**

Environ 40 % des lacs et rivières de la planète ont été pollués par des métaux lourds (Zhou et al., 2020) dans lesquels ils sont introduits par l'intermédiaire de phénomènes naturels et humains (Gouin et al., 2016). Les sources de ces polluants peuvent être naturelles et anthropiques.

#### **A. Sources naturelles**

Les sources naturelles de métaux lourds comprennent principalement l'altération géologique, l'érosion des sols et les poussières en suspension dans l'air (Shen et al., 2019). Les interactions avec les métaux contenant les roches, normalement présentes dans l'environnement, et les éruptions volcaniques (Ali et al., 2019). L'apport des volcans qui peuvent se produire en raison d'émissions importantes mais sporadiques, d'une activité volcanique explosive ou de faibles émissions continues, y compris l'activité géothermique et le dégazage (Ghorab, 2018).

#### **B. Sources anthropiques**

Ils proviennent «des substances consommées par l'individu humain, de la corrosion des réseaux de distribution d'eau et d'assainissement, des eaux pluviales dans le cas de réseau unitaire, des activités de service (santé, automobile) et éventuellement de rejets industriels» (Cauchi et al., 1996). Les rejets industriels et domestiques, l'activité minière et les eaux d'écoulement contaminées par les engrais et les pesticides utilisés en agriculture sont autant de sources ayant contribué à l'augmentation des concentrations de métaux lourds dans le milieu marin et surtout en zone côtière (Kaiser, 2001).

La source anthropique englobe les activités pétrochimiques, l'utilisation de combustibles fossiles (centrales électriques au charbon, chaudières, fours à ciment), les activités industrielles, le transport (véhicules et moteurs routiers et non routiers, embarcations), l'incinération des déchets, les déchets urbains (eaux usées, boues d'épuration, ordures ménagères) et agricole et certains produits (interrupteurs électriques, amalgames dentaires, éclairages fluorescents) (Gautam et al., 2014; Gouin et al., 2016). L'exploitation minière est l'un des secteurs clés à considérer, en particulier parce qu'il joue un rôle central dans les économies des pays développés et en développement. Cette activité génère une grande présence de métaux lourds, libérés en raison de l'extraction de minéraux, et transportés par les rivières et les ruisseaux, dans lesquels ils peuvent être dissous dans l'eau ou dans les sédiments (Vélez-Pérez et al., 2020).

Ces espèces métalliques ont tendance à s'infiltrer dans les nappes phréatiques, et peuvent également provoquer une pénurie d'eau, empêcher la croissance des cultures en raison de l'érosion des sols et nuire gravement à la santé humaines et provoquent des problèmes aux animaux et aux communautés humaines locales (**Birn et al., 2018**).

Les activités anthropiques, l'urbanisation et l'industrialisation représentent des facteurs clés dans l'augmentation de la concentration de ces polluants, en particulier au cours des dernières décennies. En Inde, il a été signalé que la concentration d'arsenic atteignait 107 µg/L dans l'eau potable (**Roychowdhury et al., 2003**). Au Nigéria, des niveaux élevés de  $Mn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $As^{2+}$ ,  $Se^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Co^{2+}$  ont été trouvés dans des échantillons d'eau prélevés autour de plusieurs communautés minières de plomb-zinc de Abakaliki (**Obasi & Akudinobi, 2019**). Pour l'Amérique latine, on a estimé qu'au moins de 4,5 millions de personnes étaient chroniquement exposés à des niveaux d'arsenic supérieurs à 50 µg/L, et dans certains cas jusqu'à 2 000 µg/L (**Fernández-Luqueño et al., 2013**). Dans ces trois cas, la concentration des métaux lourds analysés était bien supérieure aux valeurs de référence définies par l'Organisation mondiale de la santé (OMS). De plus, environ 140 millions de personnes dans 50 pays boivent régulièrement de l'eau contenant de l'arsenic à des concentrations supérieures à la valeur de référence de l'OMS de 10 µg/L (**Bolisetty et al., 2019**). En Chine, des concentrations élevées de  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  ont été signalées dans 9 rivières côtières du bassin de la baie de Laizhou. Les concentrations trouvées étaient supérieures aux valeurs admissibles données pour l'eau potable (**Xu et al., 2017**). Une importante contamination au mercure a été signalée dans le bassin de la rivière Coyuni, qui était associée aux processus d'amalgame utilisés dans l'exploitation minière artisanale de l'or au Venezuela (**Garcia-Sanchez et al., 2008**). Divers métaux lourds ont été trouvés dans deux rivières principales d'Antalya (Turquie). Plus précisément, les concentrations de  $Sr^{2+}$  et  $Al^{3+}$  dépassaient les valeurs autorisées de la spécification standard pour le réactif eau ASTM D1193 (**Leventeli et al., 2019**).

### **I.3.5. Effets toxicologiques des métaux lourds et des métalloïdes**

Les métaux présents dans l'eau peuvent prendre la forme de complexes, de particules ou de solutions. La dilution, la dispersion, la sédimentation et l'adsorption/désorption sont les principaux processus qui régissent la distribution des métaux lourds. Néanmoins, plusieurs processus chimiques peuvent également être impliqués. En conséquence, la spécification de diverses formes solubles est régie par les constantes d'instabilité de divers complexes, ainsi que par les propriétés physico-chimiques de l'eau (pH, ions dissous et température) (**Ghorab, 2018**).

Les métaux lourds contaminent les eaux de surface et souterraines, entraînant une baisse de la qualité de l'eau potable et de l'eau d'irrigation, ainsi que la possibilité qu'ils pénètrent dans la chaîne alimentaire humaine, présentant un risque pour la santé humaine. D'autres, comme le cuivre, le fer, le zinc, le manganèse et le cobalt sont des éléments essentiels qui jouent un rôle majeur dans le métabolisme biologique même à de très faibles quantités (**Adesiyan et al., 2018**).

Les métaux lourds s'accumulent sous leur forme chimique donnée ou en combinaison avec d'autres métaux, ce qui rend difficile de les retirer de l'eau. Des traces de ces métaux par exemple ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) sont nécessaires aux activités métaboliques, pour éviter les maladies et les syndromes chez l'homme (**Tchounwou et al., 2012**). Cependant, une concentration excessive de ces mêmes métaux lourds peut entraîner de graves problèmes de santé humaine tels que des troubles musculaires, physiques et les processus dégénératifs neurologiques (**Azeh Engwa et al., 2019**).

De longues périodes d'exposition aux métaux lourds toxiques ont été associés à la dystrophie musculaire, à la maladie d'Alzheimer, à différents types de cancer et à la sclérose en plaques (**Cabral-Pinto et al., 2020a; Cabral Pinto et al., 2020b; Fu & Xi, 2020; Gerardo et al., 2020; Srivastava et al., 2017**). Endommagement ou diminution des activités nerveuses centrales et mentales, dommages aux poumons, au foie, aux reins, aux compositions sanguines, et d'autres organes clés ont également été observés (**Tan et al., 2018**).

Le rejet de métaux lourds dans les sources d'eau peut entraîner également des désordres physiques, chimiques et biologiques, générant des changements dans la diversité, la densité, la composition spécifique des populations et la structure de la communauté (**Ullah et al., 2017**). La nature et le degré de changement dépendent largement de la concentration en ions de métaux lourds et peuvent même interrompre les processus enzymatiques (**Bobaker et al., 2019; Mokarram et al., 2020**).

Le mercure est un minéral dont les composés peuvent être mélangés avec le sol et l'eau. La contamination avec des composés de mercure provoque des troubles du système nerveux central, ainsi que des insomnies, la dépression psychologique, l'oubli, la gingivite et l'inflammation des reins (**Ewaid et al., 2019**).

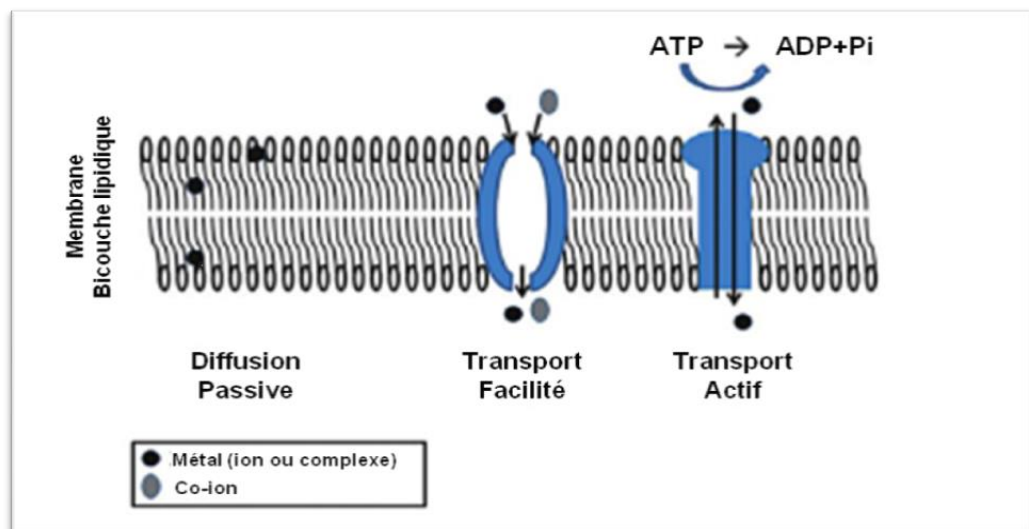
Le cadmium est utilisé dans plusieurs industries telles que la fabrication de plastiques et de batteries. La contamination de l'eau par le cadmium entraîne des maladies rénales, pulmonaires, cardiaques et osseuses. En outre, les usines de plomb qui produisent des batteries sont parmi les sources les plus importantes de pollution par le plomb (**Ewaid et al., 2019**).

### I.3.6. Transfert des métaux vers les organismes aquatiques

Les métaux ne peuvent traverser les membranes biologiques par simple diffusion, ils sont alors pris en charge par le transport facilité. Le processus de bioaccumulation métallique s'effectue en trois étapes principales : la diffusion du métal vers la surface biologique, la diffusion au travers de la couche externe puis la complexation du métal à des sites physiologiques inertes ou actifs, affectant ou non le métabolisme (Campbell & Couillard, 2004).

- **Les métaux dissous**

La prise en charge des métaux dissous par la membrane épithéliale des branchies (voie directe de contamination) constitue l'interface clé pour les mécanismes de transport transmembranaire et peut s'effectuer selon trois mécanismes généraux (Figure I.1):



**Figure I. 1: Principaux mécanismes membranaires permettant l'entrée des métaux dans la cellule (adapté de Masson, 2013).**

- ✓ Le transport facilité du cation par des transporteurs transmembranaires protéiques ou des canaux transmembranaires :  $ATP \longrightarrow ADP + Pi$
- ✓ le transport facilité d'un complexe métallique anionique.
- ✓ le transport passif est réalisé par une diffusion simple du complexe métallique lipophile.

- **Métaux particuliers**

Les métaux particuliers vont en effet être réellement assimilés uniquement après ingestion de la particule et solubilisation du métal. Cette étape de solubilisation peut se produire directement dans le tractus digestif ou dans les vacuoles créées par invagination de la membrane

biologique. Dans ces deux cas, les conditions physico-chimiques (pH, oxydoréduction...) vont favoriser la solubilisation des métaux initialement liés à la particule. Les métaux nécessitent un passage à travers la membrane digestive ou vacuolaire après avoir été solubilisés, par les mêmes processus que les membranes épithéliales des branchies (**Campbell & Couillard, 2004**).

L'endocytose peut également jouer un rôle important dans le transfert des métaux chez les organismes aquatiques. Ce mécanisme, décrit au niveau des branchies, de l'épithélium du manteau et au niveau de la barrière intestinale (**Depledge & Rainbow, 1990; Roesijadi, 1994**) induit l'incorporation des métaux aux lysosomes et leur relargage dans le cytosol.

La croissance en biomasse, l'utilisation de l'oxygène dissous par les microorganismes, la prolifération des cellules etc. sont affectées par la contamination par les métaux lourds (**Viarengo, 1989**). Au niveau cellulaire, le principal mode de toxicité des métaux réside dans la création d'un stress oxydant (**Tátrai et al., 2001**).

#### **I.4. POLLUTION PAR LES HYDROCARBURES**

Tous les milieux (sol-air-eau) sont susceptibles d'être pollués ou contaminés par les hydrocarbures (HC), mais la grande fréquence des déversements en mer fait que le milieu aquatique soit le plus exposé à la pollution.

##### **I.4.1. Composition chimique des hydrocarbures**

Les (HC) sont des composées organiques formées d'une association d'atomes de carbone et d'hydrogène ayant une formule générale brute ( $C_xH_y$ ) ou x et y sont deux chiffres entiers naturels et également de petites quantités de composés hétéro-atomiques incluant du soufre, de l'oxygène, de l'azote et des éléments métalliques en traces (**Bocard, 2006**). Selon la norme **AFNOR X 31410**, les (HC) comprennent de nombreux produits pétroliers (du pétrole brut jusqu'aux produits pétroliers raffinés incluant le kérosène, les essences, les lubrifiants et les huiles moteurs) (**Colombano et al., 2014**).

Les HC sont groupés selon leur composition chimique en trois grandes classes à savoir : les hydrocarbures saturés et insaturés non aromatiques, les hydrocarbures lourds, et les hydrocarbures aromatiques (HCA). Les HC d'origine biogène et pétrolière appartiennent à ces trois groupes des HC.

### I.4.2. Le pétrole brut

Le pétrole, en latin "petroleum" qui signifie «huile de roche», se présente sous la forme d'un liquide sombre, collant et visqueux (Vieira et al., 2007). La décomposition thermique de la matière organique (plancton, végétal, animal, etc.) par une activité microbiologique intense peut produire du pétrole enfoui profondément sur des dizaines de millions d'années. Après l'extraction du pétrole brut naturel du sous-sol, est transporté vers les raffineries où il subit une distillation pour fabriquer divers produits (Speight, 2006; Varjani, 2017). C'est un complexe de plusieurs hydrocarbures pétroliers, composés de différents rapports de carbone et d'hydrogène. Cependant, ils contiennent également de l'azote, du soufre et de l'oxygène en quantités variables (Chandra et al., 2013; Varjani, 2017). Il existe trois groupes de pétrole brut qui sont : le pétrole léger, moyen ou lourd classés en fonction des proportions relatives des constituants de haut poids moléculaire présents dans sa composition (Varjani, 2017). Les différentes fractions du pétrole brut peuvent varier selon le lieu et l'âge d'un champ pétrolifère ainsi que la profondeur du puits pétrolier. (a) base d'asphalte, (b) base de paraffine et/ou (c) base mixte sont les majeures classes de presque 85% des constituants de toutes les formes du pétrole brut (Atlas, 1981; Varjani, 2017). Les quatre grands groupes du pétrole brut sont: (a) saturées (aliphatiques), (b) aromatiques, (c) résines et (d) asphaltènes (Soltani, 2004).

La **figure (I.2)** représente les différents types des HC qui sont présents dans les pétroles bruts et leurs teneurs.

Un pourcentage de 65 à 95 % de la majorité des pétroles bruts contient des HC. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales, qui sont présentes en proportions variables selon l'origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) (Soltani, 2004).

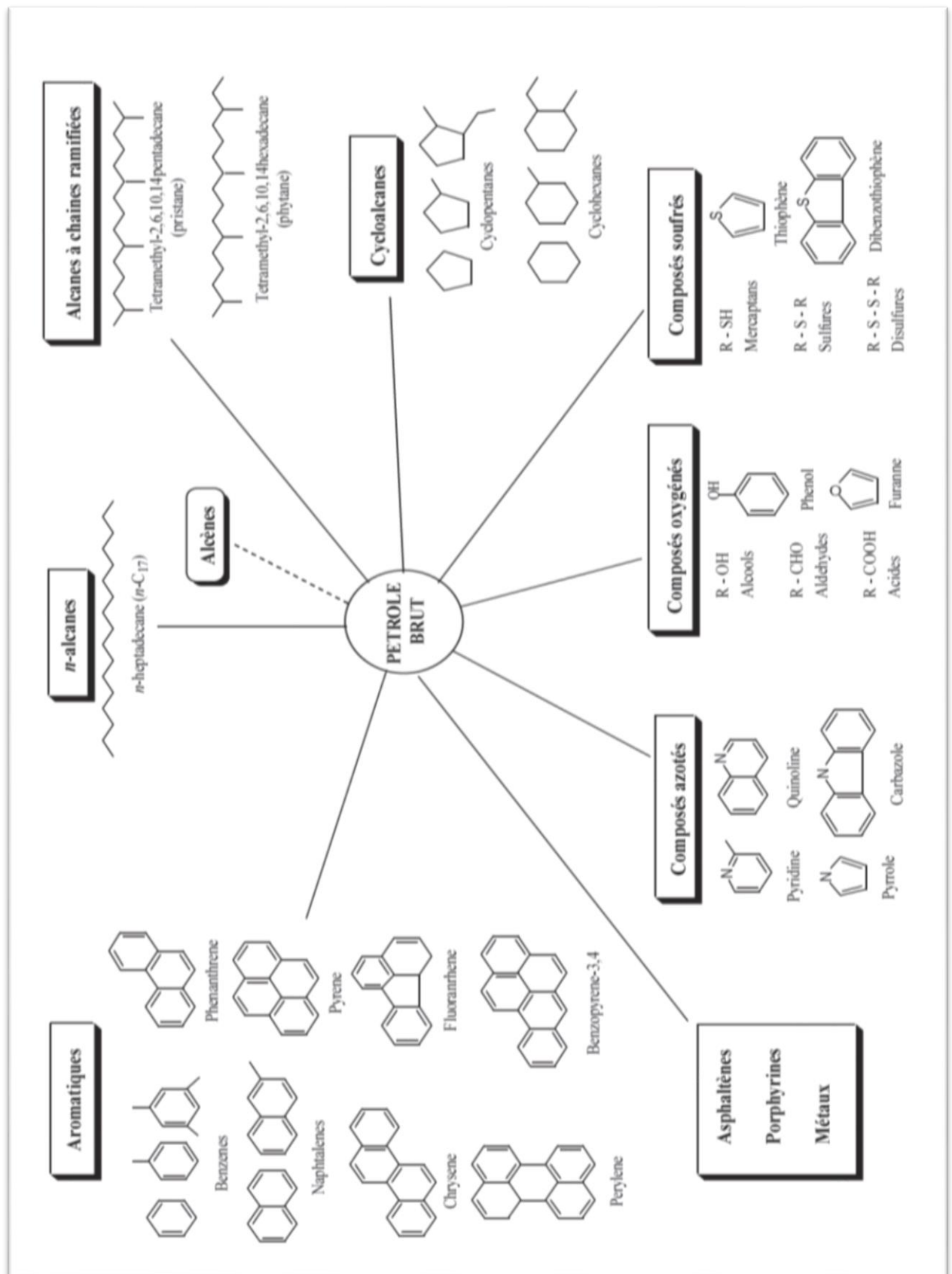


Figure I. 2: Les différents composés des hydrocarbures existant dans les pétroles bruts (d'après (Bertrand & Mille, 1989))

### I.4.3. Définition des hydrocarbures aromatiques

Un hydrocarbure aromatique (HCA) est une substance composée d'atomes de carbones et d'hydrogène dont les molécules possèdent de 1 à 7 cycles benzéniques de formule générale  $C_nH_{2n-6}$ . Ces hydrocarbures peuvent être mono-aromatiques, di-aromatiques ou poly-aromatiques et des ramifications aliphatiques peuvent être associées.

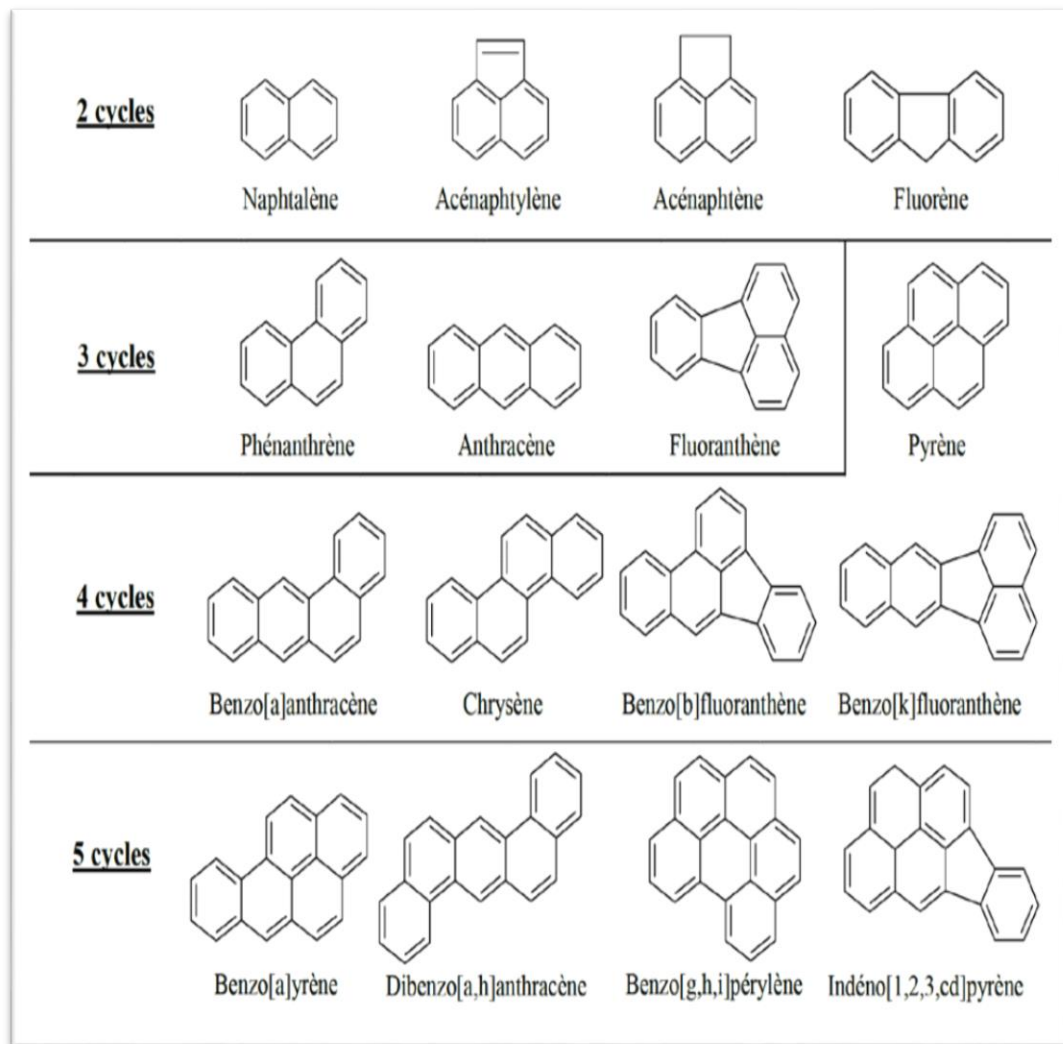
Les HCA sont des liquides, volatiles à température ambiante. Caractérisés par un aspect incolore, avec une odeur perceptible à des quantités dans l'air qui peut varier entre 1 ppm (pour les xylènes) et 12 ppm (pour le benzène). Ils sont faiblement dissous dans l'eau (de 0,02 à 0,2 % en poids) mais peuvent se mélanger à la majorité des solvants organiques et aux huiles minérales, végétales ou animales. Ces composés sont tous inflammables ou facilement inflammables. C'est le cas, par exemple, du benzène (point d'éclair  $-11^{\circ}\text{C}$ ) ou du toluène (point d'éclair  $4^{\circ}\text{C}$ ) (Boust, 2005).

- *Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)*

Les HAPs sont des substances organiques apolaires et neutres composés de 2 à n cycles benzéniques associés entre eux et ils sont formés par la combustion partielle de matière organique (pyrolyse et pyrosynthèse) ou la distillation des dérivés de la houille ou du pétrole particulièrement des dérivés du charbon (IARC, 2010; Rollin & Quiot, 2005). Les niveaux de HAP mesurés dans ces industries sont 10 à 10 000 fois plus importants que ceux auxquels la population générale est exposée (Hemon-delsaux, 2013).

A l'heure actuelle, presque 130 HAPs sont reconnues mais uniquement 16 sont fréquemment étudiés dans les recherches environnementales (Figure I.3). On considère généralement les HAPs légers qui possèdent 3 cycles ou moins et les HAPs lourds qui présentent plus de 3 cycles.

La stabilité chimique et la hydrophobicité des HAPs accroît avec le nombre de cycles et le poids moléculaire, cette stabilité est très grande, par contre leurs volatilité et hydrophobicité est faible, (Kim et al., 2013). Ces propriétés les rendent relativement résistants à la biodégradation. De ce fait, ils persistent dans l'environnement, faisant courir un risque sanitaire. En effet, des études ont montré que certains HAPs sont génotoxiques, mutagènes et cancérigènes (Doornaert & Pichard, 2003; Genies, 2017).



**Figure I. 3: Inventaire des principaux HAPs d'après les recommandations de l'US-EPA (Wilson & Jones, 1993)**

#### I.4.4. Sources des hydrocarbures en milieu marin

L'origine de la pollution de l'eau marine la plus importante est représentée par les HC. Cette contamination peut être occasionnelle ou volontaire (Galaf & Ghannam, 2003). Les hydrocarbures en milieu océaniques peuvent être d'origines naturelles et/ou anthropiques.

##### A. Origines naturelles des hydrocarbures en milieu marin

- *Suintements sous marins (sources géochimiques)*

Les écoulements naturels sont les résultats du déplacement du pétrole brut vers la colonne d'eau sus-jacente. Il est estimé que presque 600 000 tonnes de pétrole brut sont des fuites naturelles traversant dans le milieu marin par an dans le monde. Comparativement, cela

représente 45 % de l'ensemble des intrants pétroliers dans l'environnement (NRC, 2003). Selon **Pelmont (2005)**, les sédiments marins sont des suintements naturels de produits pétroliers. Des milliers de tonnes des hydrocarbures se dispersent annuellement sur toute la surface océanique, cette pollution marine discrète a été connue depuis longtemps. Régulièrement ou chroniquement, ces gisements montrent des résurgences (cas du golfe du Mexique - USA et du golfe de San Jorge - Argentine) qui libèrent du pétrole dans les milieux marins sus-jacents. Quoique d'après **Sauret (2011)** un ruissellement naturel n'a que peu d'effet sur l'écosystème marin car il est souvent ayant une bonne adaptation à cet apport persistant.

- *Produits par les végétaux.*

Correspondent aux hydrocarbures naturellement produits par les végétaux. On les retrouve en effet dans les cires des végétaux supérieurs et en quantité moindre, dans les résines et les déchets microbiens (**Aboul-Kassim & Simoneit, 1995 et 1996; Bomboi & Hernandez, 1991; Colombo et al., 1989**). Les hydrocarbures issus des végétaux terrestres et marins restent cependant à l'état de traces (**Aboul-Kassim & Simoneit, 1995**). Les végétaux produisent essentiellement des hydrocarbures aliphatiques provenant essentiellement de la combustion de forêts et d'herbage, avec les éruptions volcaniques. L'érosion des roches contribue également mais à moindre hauteur, à l'apport naturel total biologique (**Hahn & Pfeifer, 1994**).

- *Diagenèse précoce de la matière organique*

La diagenèse précoce de la matière organique dans les gisements sous marins est le résultat de la combinaison de plusieurs processus biologiques, chimiques et physiques (bioturbation, décomposition de la matière organique par l'activité bactérienne (aérobie/anaérobie) et des phénomènes de précipitation/dissolution) qui peuvent accélérer la maturation de la matière organique déposée à la surface des sédiments sous forme de pétrole (**Bougeois, 2015**).

La biosynthèse et la libération des hydrocarbures dans le milieu marin sont réalisées par l'activité métabolique des organismes aquatiques et terrestres ou par la dégradation de leurs matières organiques (**Mille et al., 2007; Zaghdan et al., 2007**). D'après le « **National Research Council** » (1985) presque 180 millions de tonnes/an des hydrocarbures déversés dans les océans sont d'origine biogène.

## B. Origine anthropique des hydrocarbures

Plusieurs industries associées à l'extraction du pétrole, à son transport et en usage de produits finis (carburants, lubrifiants,...) sont les principales sources de la pollution anthropique par les hydrocarbures.

### ➤ Sources pyrolytiques

Les procédés de combustion à température élevée sont les majeures sources pyrolytiques. La circulation automobile considérée comme l'une des principales sources d'hydrocarbures puisqu'elle combine les deux processus. Les véhicules émettent des gaz d'échappement provenant de la combustion incomplète des carburants (**Fraser et al., 1999**) et sont aussi à l'origine de déversements de produits variés tels que les carburants, les huiles lubrifiantes ou les débris de pneumatiques (**Bomboi et al., 1990; Bomboi & Hernandez, 1991; Hahn & Pfeifer, 1994; Takada et al., 1990**). Le chauffage urbain et les diverses industries employant des processus pyrolytiques (production de coke, craquage catalytique, etc.) constituent aussi des sources importantes d'hydrocarbures en milieu urbain (**Aboul-Kassim & Simoneit, 1995**).

### ➤ Sources pétrogéniques

Les sources pétrolières, correspondant à une pétrogenèse à basse température (**Fraser et al., 1999**). A l'heure actuelle, de grandes quantités de déversements des décharges pétroliers dans la mer méditerranée.

#### • *Rejets industriels et domestiques des hydrocarbures*

Les rejets industriels et domestiques des stations d'épuration contiennent des quantités non négligeables en hydrocarbures suites à leurs utilisations en tant que sources d'énergie et de matière primaire pour divers produits tout au long de la chaîne industrielle. Selon les estimations, presque 77% de la charge de pollution aboutissant les océans sont liés à des origines terrestres (Les eaux de ruissellement et des déversements directes terrestres correspondent à un pourcentage de 44% et 33% résultant de l'atmosphère). Environ, 12 % des dérivés du transport marin, 10 % des déversements en mer, 1% du déplacement et de la production des ressources minérales, spécifiquement du pétrole (**Pizon, 2005**).

Les déversements accidentels proviennent à partir de plateformes offshore, les dépôts atmosphériques ainsi que les eaux de production. Les eaux de production sont un mélange de différents composés organiques et inorganiques dont de nombreux polluants, et représentent les déchets les plus importants de l'industrie pétrolière et gazière (**Fakhru'l-Razi et al., 2009**;

**Lusinier et al., 2019**). Les concentrations moyennes en hydrocarbures autorisées dans les eaux de production rejetées (avant dilution dans le milieu marin) sont d'environ 30-40 mg/L (**Lusinier et al., 2019**) avec des maximums journaliers autorisés de 100 mg/L.

- **Les accidents pétroliers**

Les dangers les plus sérieux sont les apparences les plus évidents comme les marées noires qui influencent la faune aquatique et provoquent une forte mortalité sans oublier les effets économiques engendrés pour les riverains vivants de la pêche ou du tourisme (**Soltani, 2004**). Une excellente aptitude d'évaporation dans l'atmosphère est le caractère des composants les plus légers, un pourcentage moins de 10% de la contamination par le pétrole provient des accidents marins cela peut être justifié par le fait qu'ils ne soient pas les seuls responsables de la pollution des mers, mais leur catastrophe est le résultat du propriété massif des épandages et des conséquences néfastes spectaculaires sur l'environnement (**Pelmont, 2005**).

#### **I.4.5. Effets de la pollution par les hydrocarbures**

Dans le contexte de ce travail nous avons limité nos investigations bibliographiques aux effets des HC sur l'écosystème aquatique et sur l'homme. Les effets des HC touchent pratiquement tous les secteurs de la vie aquatique.

- **Les effets écologiques**

Les aromatiques sont les plus toxiques, suivis des composés oléfiniques, naphthéniques et paraffiniques (généralement peu toxiques). La toxicité serait à craindre dans les eaux de boissons pour des doses supérieures au seuil d'apparition d'odeur et de goût. Des affections cutanées ont été constatées, dues à des produits d'addition du mazout. Les risques les plus inquiétants peuvent provenir d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), soupçonnés d'être cancérigènes (3-4 benzopyrène, par exemple) (**Gaujous, 1995**).

- **Les effets sur les médiateurs chimiques**

En perturbant les relations écologiques liées aux chimio-médiateurs, les HC peuvent modifier le comportement des êtres vivants et l'équilibre écologique. Cette perturbation peut être liée au blocage des organes chimiorécepteurs ou à l'induction de fausses réponses. Ainsi, certains HC extraits du kérosène ont un pouvoir attractif pour le homard (**Gaujous, 1995**).

- **Les effets cancérigènes**

Certains HAPs sont connus pour être cancérigènes (notamment le benzopyrène, qui se combine avec l'ADN) ou toxiques (hyperkératose, hyperplasie, effets tératogènes). En

alimentation en eau potable (AEP), les HC dissous ou émulsionnés sont limités en ressources à 1 mg/L et en distribution à 0.01mg/L. Les HAPs sont limités en ressources à 1µg/L et en distribution à 0,2 µg/L pour le total des six substances : fluoroanthène ; benzo 3,4 fluoroanthène ; benzo 11,12 fluoroanthène ; benzo 1,12 pyrilène ; indéno 1, 2, 3 pyrène et benzo 3, 4 pyrène.

➤ **Les effets sur les produits de la pêche**

Les inconvénients des HC sur la consommation du poisson ou des coquillages sont :

**Le goût :** le seuil de perception du goût du pétrole est voisin de 1ppm. Cette concentration peut être facilement atteinte chez : les organismes filtreurs (huîtres, moules) et les nécrophages (bars, thons), les HC étant concentrés dans la chaîne alimentaire.

**La toxicité :** la présence dans le poisson ou les organismes marins de HAP cancérigènes provenant de pollution reste discutable.

Les HC peuvent exalter la toxicité (synergie) d'autres polluants (micropolluants, métaux lourds) ce qui pourrait être à l'origine des nécroses (altérations cutanées) chez les poissons, qui les rendent invendables (**Gaujous, 1995**).

➤ **Les effets sur l'homme**

La toxicité des HC sur l'homme se fait soit par inhalation d'HC gazeux, soit par ingestion des produits contaminés tels que : les poissons, les huîtres, les moules, etc. ; comme elle peut avoir lieu par contact cutané. La toxicité des HC chez l'homme est très variable et dépend de la nature chimique de l'HC en question : l'éthane et le propane, HC aliphatiques saturés sont asphyxiants. Alors que l'inhalation d'HC aliphatiques saturés à nombre de carbone élevé provoque une action narcotique qui croît. Les (HAPs) sont plus toxiques.

#### **I.4.6. Devenir des hydrocarbures en milieu marin**

Certains processus de base affectant le devenir du pétrole brut dans le milieu naturel, qu'ils soient d'origine physique, chimique ou biologique sont bien référencés. Ces processus comprennent l'évaporation, l'émulsification, la dissolution, la photo-oxydation et l'oxydation microbienne (**Colvin et al., 2020; Daling et al., 2014; Stout & Wang, 2016**). Le pétrole obéit à ces différents processus lorsqu'il est versé en milieu marin et il entraîne des changements de son apparence générale et de ses propriétés physico-chimiques. Les hydrocarbures présentent plusieurs origines et exposent aussi à divers processus en environnement marin. Ce processus est appelé altération ou vieillissement, et est principalement dû à des facteurs abiotiques et biologiques (**Federation, 2022; Harayama et al., 1999**).

## A. Dégradation abiotique

### ➤ L'évaporation

Le taux et la vitesse d'évaporation dépendent de la volatilité du pétrole, les substances pétroliers possèdent un point d'ébullition inférieur à 200 °C, elle a une aptitude d'évaporation dans les premières 24 heures dans les environnements à températures élevées (**Federation, 2022**). Le pétrole s'évapore et éliminé pendant les 24 à 48 premières heures après le déversement, les hydrocarbures les plus légers (< C15), moyens (C15-C20) et lourds (> C25) vont disparaître par ce processus jusqu'à 75%, 40% et 10% respectivement après quelques jours de décharges qui résultent d'une pollution atmosphérique (**Kanan, 2012**). Le taux d'évaporation peut augmenter si le pétrole continue à s'étaler, en raison de l'augmentation de la surface de la marée noire (**Federation, 2022**).

### ➤ La photo-oxydation

Lors de l'écoulement du pétrole en milieu marin, il subit une transformation photochimique grâce à la présence de la lumière solaire. Quelques études ont proposé que les composés pétroliers sont influencés par la polymérisation réalisée par la lumière, cependant que d'autres ont rappelé leur photo-dégradation (**Harayama et al., 1999**). Les substances aliphatiques permettent de décomposer par la réaction d'oxydation photo-sensibilisée tandis que ces composés sont photo-chimiquement inertes. La destruction de la double liaison carbone-carbone en position 1 et des n-alcanes en alcènes terminaux et en complexes carbonylés de faible masse moléculaire est provoquée par les composés HCA ou polaires et de l'antraquinone présents dans l'eau de mer (**Ehrhardt & Weber, 1991**). Les êtres vivants marins ont un effet toxique produit par les substances hydrosolubles du pétrole. L'irradiation solaire affecte la toxicité d'un pétrole : les nappes de pétrole deviennent moins toxiques en raison de la perte d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), mais la toxicité de la fraction hydrosoluble augmente à mesure que sa concentration augmente (**Nicodem et al., 1997**).

### ➤ L'émulsification

Les caractères du pétrole déversés subissent une énorme modification par le phénomène d'émulsification. On trouve deux modèles d'émulsions qui sont: eau-dans-huile et huile-dans-eau lorsque les milieux sont bien agités et en présence des substances ayant des caractères tensioactifs (comme les asphaltènes) (**Council, 2003**). Les émulsions eau-dans-huile contiennent entre 60 et 80% d'eau sous forme de gouttelettes de 1 à 20 µm, provoquant une augmentation du volume du pétrole de départ de 3 à 4 fois (**Federation, 2022; Fingas, 1995**). Leur densité est

généralement supérieure à celle du pétrole d'origine (1,03 comparée à 0,8–0,95). Après évaporation des fractions légères, des résidus lourds du pétrole peuvent s'agréger afin de former des boules de goudron dont le diamètre varie de la taille microscopique à plusieurs millimètres (**Harayama et al., 1999**).

➤ **La dissolution**

La dissolution rapide des substances pétrolières hydrosolubles dans la colonne d'eau est réalisée lorsqu'on a un pétrole dispersé. Les HCA légers comme le benzène et le toluène sont des composés caractérisés par une grande solubilité dans l'eau de mer. Cependant, l'élimination des HCA se fait quand ces composés sont évaporés. Un processus de 10 à 1000 fois plus rapide que la dissolution. La dissolution est l'un des procédés les moins distinctifs car la plupart des pétroles bruts et tous les pétroles lourds possèdent, partiellement de faibles rapports de ces composés (**Federation, 2022**).

➤ **La sédimentation**

Très peu de pétroles coulent dans l'environnement marin. Lorsqu'un pétrole flottant se rapproche de la côte, une sédimentation peut se produire à cause de l'augmentation de la densité du pétrole par rapport à celle de l'eau de mer. En effet, la densité de quelques composés pétroliers s'approche à celle de l'eau de mer lorsque toutes les fractions légères subissent une étape d'évaporation et que le sédiment du pétrole est modifié en mer. On assiste parfois à une combinaison entre les pétroles (flottants, submergés ou dispersés) avec des sédiments en suspension. Cela arrive particulièrement dans les eaux peu profondes. Si la contamination est forte, des «tapis de goudron» denses peuvent se former sur le fond marin près du rivage. Les sédiments qui se forment parfois, peuvent posséder une densité plus élevée à l'écoulement si le pétrole est brûlé volontairement après l'étape de déversement (**Federation, 2022**).

Différentes réactions contribuent dans l'augmentation de cette densité, telles que l'évaporation, la dissolution, l'oxydation, la constitution des accumulations et l'adsorption du pétrole dispersé sur les molécules en suspension.

## **B. Facteurs biologiques**

➤ **La biodégradation**

Les différents microorganismes qui existent dans l'eau de mer dégradent entièrement ou partiellement les hydrocarbures par leur utilisation comme source de carbone et d'énergie. Ils peuvent donner des composés hydrosolubles, de dioxyde de carbone et l'eau. La biodégradation

est considérée comme l'étape ultime dans l'élimination des hydrocarbures de l'environnement marin.

La vitesse de dégradation dépend de plusieurs facteurs tel que : la chaleur, les éléments nutritifs et la teneur en oxygène dissous ainsi que du type d'hydrocarbure. Les substances qui possèdent une masse moléculaire plus légère se dégradent plus vite que ceux qui sont plus lourds (Sauer et al., 1998).

#### **I.4.7. Biodisponibilité des hydrocarbures**

Les caractéristiques principales des molécules et des propriétés physico-chimiques du milieu influencent la biodisponibilité des HC. Dans l'eau, les hydrocarbures sont présents : sous forme dissoute, sous forme adsorbée et/ou complexée sur la matière organique dissoute et sous forme adsorbée sur les particules en suspension. Les matières organiques existantes en milieu marin peuvent avoir une source naturelle ou anthropique. Par conséquent, elles ont différentes natures et peuvent avoir ainsi différentes influences sur la biodisponibilité des hydrocarbures qui leurs sont adsorbés. La matière organique naturelle est constituée principalement de substances humiques et elle est faiblement dégradable, alors que celle d'origine anthropique, moins hydrophobe et moins stable, est plus facilement dégradée, ce qui peut rendre les hydrocarbures plus bio-disponibles (Gourlay et al., 2003). Il existe une variation de la biodisponibilité des HC à travers la colonne d'eau, et selon des systèmes ayant une profondeur plus ou moins élevée. A cause de leur propriété hydrophobe, les HC ont l'aptitude d'accumulation facile dans les précipités où ils peuvent aboutir à des concentrations 3 à 4 fois plus élevées que dans les eaux surnageantes (Notar et al., 2001). La séquestration des hydrocarbures dans les sédiments a été mise en évidence dans différentes études (Fu et al., 1994; Kraaij et al., 2001; Wang et al., 2019). Le piégeage des HC dans les micropores et les interventions des couches aromatiques des substances organiques conduit à leur claustration (Jonker & Koelmans, 2002). Les composés de faible masse moléculaire (origine pétrogénique) se retrouvent plutôt en phase dissoute et ceux de haut poids moléculaire (origine pyrolytique) sont préférentiellement adsorbés sur la phase particulaire réduisant ainsi leur disponibilité envers les organismes (Cailleaud et al., 2007). Les réactions d'adsorption des HC sur le sédiment sont influencées par la granulométrie et par conséquence agissent sur leur distribution relative. Les molécules les plus fines sont souvent riches en HAPs ayant un poids moléculaire élevé relativement par rapport aux fractions de sédiment plus grossières qui sont riches en HAPs de plus faible masse moléculaire (Dachs et al., 1997). Les hydrocarbures sont majoritairement présents dans la phase particulaire de la colonne

d'eau. Cependant, certains facteurs peuvent augmenter la solubilité de ces contaminants comme la température, la présence de matière organique dissoute, les phénomènes de photo-oxydation ou la présence de microorganismes dégradant ces composés en une forme plus soluble (Lee, 2003; Viamajala et al., 2007). Toutes les caractéristiques physico-chimiques telles que la salinité et le pH ont encore un effet sur la solubilité des hydrocarbures.

#### **I.4.8. Bioremédiation des hydrocarbures aromatiques polycycliques**

Les méthodes biologiques sont respectueuses de l'environnement et ont gagné beaucoup d'attention pour l'assainissement des HAPs récemment en raison de plusieurs inconvénients des méthodes physiques et chimiques, y compris le coût, la complexité des procédures, le fardeau réglementaire et le manque de dégradation complète (Agnello et al., 2016; Ghosal et al., 2016). Les techniques de bioremédiation sont généralement classées comme ex situ ou sur place. Les techniques ex situ impliquent l'élimination physique des matériaux contaminés (sol : excavation et eau : pompage) vers une autre zone éventuellement à l'intérieur du site pour traitement. Les techniques sur place impliquent le traitement du matériel contaminé dans le lieu, qui ont un grand consentement public en raison de moins de dépenses, interruption minimale du site et possibilité élevée d'interruption permanente par l'élimination des déchets (Shah, 2014).

##### ***I.4.8.1. Assainissement microbien de la pollution aux hydrocarbures aromatiques polycycliques***

Selon Kuppusamy et al. (2017), les méthodes biologiques ont suscité une large attention pour l'assainissement des HAPs, suivi par les méthodes intégrées, l'oxydation chimique et les méthodes physiques.

Parmi toutes les méthodes biologiques d'assainissement des HAPs, l'utilisation fréquente de l'atténuation naturelle, de la bio-augmentation et la bio-stimulation est la plus élevée (33%), suivie des bioréacteurs (22%), phytoremédiation/rhizoremédiation (22%), compostage (13%), biopiles (4%), bioremédiation enzymatique (2%), vermiremédiation (2%), et autres (2%). De plus, la deuxième méthode intégrée la plus attractive est appliquée dans l'ordre suivant, c'est-à-dire : biologique-biologique (42%), chimique-biologique (27%), physico-chimique (21%), physico-chimiques-biologiques (5%) et thermiques-chimiques (5%) (Kuppusamy et al., 2017). La remédiation microbienne des HAPs (bioaugmentation et biostimulation) traite par application séparée ou combinée de microbes spécifiques tels que les bactéries, les archées, les champignons

et les algues. Cependant, la dégradation assistée par les bactéries et les champignons a été largement étudiée.

### **A. Bactéries**

Les bactéries ont une polyvalence métabolique unique pour la dégradation des polluants HAPs (Ma & Zhai, 2012). Au cours de la dégradation bactérienne aérobie des HAPs, l'oxygène fonctionne comme l'électron final accepteur et aussi comme co-substrat pour l'hydroxylation et le clivage du cycle aromatique par l'oxygène (Chen et al., 2016), alors que la dégradation anaérobie bactérienne des HAPs utilise une approche tout à fait diversifiée pour casser et ouvrir l'anneau aromatique en fonction du type de réaction réductrice et de l'alternative accepteurs d'électrons finaux (Dhar et al., 2020; Ghosal et al., 2016).

Principalement, les bactéries effectuent une dégradation aérobie des HAPs en utilisant un métabolisme facilité par l'oxygénase (comprenant la mono-oxygénase et di-oxygénase enzymes). La première étape dans la dégradation aérobie des HAPs est l'hydroxylation du cycle aromatique par les enzymes di-oxygénases et la formation du cis-dihydrodiol, qui s'est finalement oxydé en intermédiaires diols à l'aide des enzymes déshydrogénases.

Ces diols intermédiaires finissent par s'ouvrir à travers l'action des di-oxygénases casseuses de cycle intra diol ou extra diol via la voie d'ortho-clivage ou de méta-clivage, capable de former des intermédiaires tels que le catéchol, les acides gentisiques et l'acide protocatéchuique, qui se transforme finalement en cycle d'acide tricarboxylique (TCA) intermédiaires (Mallick et al., 2011). La di-oxygénase est la multienzyme complexe comprenant généralement de la réductase, de la ferrédoxine et sous-unités terminales d'oxygénase (Ghosal et al., 2016; Mallick et al., 2011; Wu et al., 2020). Les bactéries élaborent également une stratégie de dégradation des HAPs assistée par le cytochrome P450 avec la formation de trans-dihydrodiols ou anaérobie sous réduction des nitrates et des sulfates (Lu et al., 2011; Mallick et al., 2011; Yang et al., 2020). Bien que la dégradation aérobie des HAPs soit classique et de préférence, la dégradation anaérobie des HAPs gagne plus attentions de nos jours en raison de la présence des conditions anoxiques dans diverses niches environnementales telles que la zone phréatique, les sédiments aquatiques profonde et les sols inondés d'eau (Dhar et al., 2020; Ghosal et al., 2016). Les espèces bactériennes aérobies et anaérobies ont été abondamment rapportées dans la littérature pour la dégradation des LMW/HWM des HAPs à travers des cultures pures, des consortiums et des approches des mélanges de culture bactérienne (Huang et al., 2016; Lors et al., 2012; Patel et al., 2018; Yang et al., 2020). La dégradation complète des HAPs peut être obtenue par des cultures bactériennes mixtes et consortiums bactériens résultant d'activités cataboliques collaboratives des participants et éventuellement la présence de diverses

voies de dégradations. Ainsi, la plupart des études récentes mettent l'accent sur la dégradation des HAPs assistée par cultures bactériennes mixtes et consortiums (**Haleyur et al., 2019; Patel et al., 2019; Vaidya et al., 2018**). La dégradation par des bactéries immobilisées et génétiquement modifiées est également une approche considérable (**Peng et al., 2018**). Une des difficultés majeures pour la dégradation dans le sol/les sédiments est une dispersion d'inoculum; il est facile pour le sol de surface, cependant, difficile pour le sol souterrain en raison du transport microbien limité car les cellules bactériennes adhèrent fortement à la matière organique du sol.

L'immobilisation des microbes délivrant l'inoculum peut servir la solution en augmentant la durée de conservation et les activités des microbes dans le sol (**Mrozik & Piotrowska-Seget, 2010**). **Huang et al. (2016)** ont rapporté une amélioration du pyrène et la dégradation de l'indéno [1,2,3-cd]pyrène (71% et 81%) dans le sol contaminé par du pétrole à l'aide de *Pseudomonas taiwanensis* et *Acinetobacter baumannii* immobilisés sur des perles de cendre. L'immobilisation assure la stabilité biologique de microbes de l'inoculum, la protection contre les sous-normes et les sous conditions environnementales optimales est une concurrence réduite avec les microbes indigènes (**Mrozik & Piotrowska-Seget, 2010**). Outre les bactéries mésophiles, les bactéries extrêmophiles telles que halophiles, acidophiles et thermophiles ont été également signalés pour la dégradation des HAPs (**Arulazhagan et al., 2016; Mehetre et al., 2019; Mohammad et al., 2012**). Les applications de thermotolérant et les bactéries thermophiles pour la dégradation des HAPs sont bénéfiques, car une température élevée provoque une diffusion accrue des HAPs par diminution de la viscosité, augmentant finalement la biodisponibilité des HAPs (**Mehetre et al., 2019**). Au cours de la dernière décennie, l'analyse communautaire des bactéries (**Muangchinda et al., 2018; Yang et al., 2020**), les voies biochimiques des bactéries pour la dégradation des HAPs (**Chen et al., 2016; Vaidya et al., 2017**), les bactéries associées à la dégradation gènes (**Peng et al., 2019; Sangkharak et al., 2020**), les enzymes (**Chen et al., 2016; Wu et al., 2020**) et la régulation des gènes des processus de dégradation des HAPs (**Kan et al., 2020; Wu et al., 2020**) ont été énormément recherchés.

## B. Les Archées

Les habitats environnementaux extrêmes, en particulier les régions salines, sont les plus vulnérables à la pollution pétrolière en raison de leur lien étroit avec les industries pétrolières, qui libèrent principalement de nombreux polluants, dont les HAPs est demandés des extrêmophiles plutôt que des micro-organismes conventionnels pour la bioremédiation (**Mohammad et al., 2012**). Au cours des dernières années, les archées ont attiré l'attention des chercheurs sur la bioremédiation des HAPs, bien que peu d'études de recherche aient été

rapportées (Al-mailem et al., 2017; Bonfá et al., 2011). La voie de dégradation et les mécanismes derrière la bioremédiation via archaea n'ont pas été largement étudiées comme les bactéries, Khemili et al. (2015) ont isolé un arhaeon halophile '*Natrialba sp. C21*' producteur de bio-surfactant à partir d'eau salée polluée par l'huile pour la dégradation du phénol, naphtalène et pyrène dans des conditions de salinité très élevées (25% NaCl). Ils ont également tenté de trouver le modèle de dégradation via des dosages enzymatiques tels que la catéchol-1,2-di-oxygénase, catéchol-2,3-di-oxygénase, protocatéchol-3,4-di-oxygénase et protocatéchol-4,5-di-oxygénase. L'activité maximale de la catéchol 1,2-di-oxygénase a indiqué que la dégradation s'est produite via la voie d'ortho-clivage.

### C. Champignons

La mycoremédiation des HAPs a été largement rapportée depuis plusieurs années avec de nombreuses espèces de champignons. Contrairement aux bactéries, tous les champignons n'utilisent pas les HAPs comme seule source de carbone; ils co-métabolisent plutôt les HAPs et génèrent une gamme de produits oxydés dont le CO<sub>2</sub>. Les champignons exécutent la dégradation des HAPs médiée par l'enzyme mono-oxygénase (Gupta & Pathak, 2020). Principalement deux types, à savoir les champignons ligninolytiques (champignons de la pourriture blanche) et des champignons non ligninolytiques, ont été signalés dans la littérature pour la bioremédiation des HAPs (Baldantoni et al., 2017; Birolli et al., 2017; Ojha et al., 2019; Wang et al., 2014). Les champignons ligninolytiques produisent des enzymes telles que la lignine peroxydase, peroxydase de manganèse et laccases pour la dégradation de la lignine présente dans le bois et oxydent simultanément les HAPs et se transforment en intermédiaires diphénols qui finissent par s'oxyder en quinones (Aydin et al., 2016). Les enzymes ligninolytiques génèrent des produits polaires hydrosolubles après clivage catalytique des composés aromatiques, éventuellement disponibles pour le métabolisme fongique et la microflore du sol présente à proximité (Gupta & Pathak, 2020). D'autre part, les champignons non ligninolytiques produisent les enzymes de type mono-oxygénase du cytochrome P450, qui oxydent les HAPs et le plomb forment de l'oxyde d'arène et de l'eau; plus loin, les oxydes par réarrangement non enzymatique forment des phénols, qui se conjuguent avec le xylose, l'acide gluconérique et le glucose (Cerniglia & Sutherland, 2010; Ghosal et al., 2016; Hayward & Stadtman, 1959). Quelques espèces fongiques sont également capables de produire des bio-surfactants afin de surmonter l'obstacle des HAPs HMW moins solubles, ce qui a entraîné une meilleure dégradation (Ojha et al., 2019). L'application directe des champignons sur le terrain présente de nombreuses limites, notamment une inadéquate croissance en biomasse, d'énormes difficultés de manipulation de la biomasse,

manque d'une méthodologies d'application et la production d'enzymes dégradantes en vrac, qui peut être surmonté par des enzymes fongiques oxydatives remédiées par la bioremédiation des HAPs (Harms et al., 2011).

#### D. Les algues

Les algues, premières productrices du littoral et des écosystèmes estuariers, elles peuvent jouer un rôle important dans la bioremédiation des HAPs au sein des écosystèmes aquatiques. La bioremédiation par les algues est plus efficace pour l'élimination des HAPs qui se produisent par biodégradation cellulaire et/ou bioaccumulation (Ke et al., 2010). La biodégradation des HAPs emploie les voies enzymatiques mono-oxygénase et di-oxygénase et produit des intermédiaires hydroxylés et di-hydroxylés, respectivement, selon le type d'algue (Chan et al., 2006). Les microalgues (cyanobactéries) sont des algues bleu-verte unicellulaires d'eau douce, ont attiré une énorme attention pour son omniprésence, facile à propager, et l'efficacité la plus importante de la dégradation des HAPs HMW (García de Llasera et al., 2016; Ke et al., 2010). Plusieurs études d'élimination des HAPs à base d'algues en laboratoire ou en microcosme échelle ont été rapportées dans la littérature (Arias et al., 2016; García de Llasera et al., 2016), bien qu'à grande échelle ou sur le terrain, la bioremédiation des HAPs par les algues reste à découvrir et nécessite une attention scientifique pour développer des stratégies efficaces.

#### E. Co-cultures

Les approches de co-culture telles que les co-cultures bactériennes-fongiques, la synergie champignon-algue et la synergie bactérie-algue sont prouvées comme les approches bio-réparatrices les plus efficaces au laboratoire ainsi que des applications à grande échelle (Sharma et al., 2016; Subashchandrabose et al., 2019). Pendant la dégradation aérobie, les algues fournissent de l'oxygène pour favoriser la dégradation. La synergie bactéries-algues est plus avantageuse que les consortiums des bactéries et les co-cultures bactério-fongiques car les algues fournissent divers composés extra polymères et allégés (constitués de lipides, protéines, acides nucléiques, produits de fermentation, etc.), qui favorise la croissance bactérienne et/ou fongique.

##### *1.4.8.2. Bioremédiation à médiation enzymatique microbienne*

La Bioremédiation à médiation enzymatique microbienne implique l'utilisation des enzymes isolées à partir des bactéries, des champignons et d'autres organismes vivants pour l'élimination des HAPs. L'action enzymatique est extrêmement efficace et sélective en raison de taux de réaction plus élevés et de la capacité pour catalyser des réactions à une large gamme de

température et de pH. L'oxygénase, la déshydrogénase, la lignine peroxydase, le manganèse, la peroxydase, les laccases et les phénoloxydases sont des enzymes responsables pour l'oxydation des HAPs (Mohan et al., 2006). Les enzymes oxydatives des champignons sont plus efficaces car ce sont des enzymes moins spécifiques au substrat (Gupta & Pathak, 2020; Harms et al., 2011).

Zhang et al. (2020) ont isolé du nouveau gène de peroxydase de manganèse de *Cerrena unicolor* BBP6 et cloné dans *Pichia pastoris*, qui avait diverses capacités de décoloration des colorants avec 80 à 91% de l'activité de dégradation du fluorène et du phénanthrène dans 24 h, et l'expression d'enzyme recombinante la plus élevée était 154,5 Unité/L. Le seul inconvénient de cette méthode est le coût liés à la production, à l'extraction et à la purification d'enzymes (Kuppusamy et al., 2017).

## CONCLUSION

Il existe différentes compositions et diverses origines de pollution des eaux qui constituent beaucoup de problèmes pour la nature lors de leur rejet sans subir un traitement de décontamination et d'épuration préalable. A travers le présent chapitre, nous avons essayé de présenter une synthèse bibliographique sur les différents types de pollution qui explique notamment la pollution par les métaux lourds et par les hydrocarbures.

# CHAPITRE II :

# ETAT DE L'ART

---

## INTRODUCTION

Les microalgues sont des microorganismes aquatiques unicellulaires photosynthétiques qui se multiplient dans les milieux fortement aqueux et sont capables de convertir l'énergie lumineuse et une source de carbone (CO<sub>2</sub>) en un ensemble de produits organiques. Le terme «micro» désigne la dimension d'une microalgue qui varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres (Dejoye, 2013). Elles sont souvent désignées sous la dénomination de "Phytoplancton" (Sumi, 2009). Elles peuvent être unicellulaires ou multicellulaires. Elles ont la tendance de se développer rapidement dans plusieurs environnements et elles peuvent croître dans des conditions extrêmes (espèces halophiles dans les milieux très salés, espèces thermophiles dans les milieux très chauds).

### II.1. LES MICROALGUES AU SERVICE DE L'HOMME ET L'ENVIRONNEMENT

Les microalgues possèdent une vraie capacité d'exploitation dans le domaine industriel causée par leur biodiversité, elles ont une extraordinaire richesse en vitamines, lipides, protéines, sucres, pigments et antioxydants, les algues sont aujourd'hui essentiellement utilisées dans le secteur des compléments alimentaires (protéines..), des aliments fonctionnels, de la cosmétique (crèmes de soin, maquillages...), de l'aquaculture ou encore dans le secteur pharmaceutique.

♦ **L'alimentation humaine** : les algues sont consommées directement par les êtres vivants ou en utilisant leurs extraits comme éléments additifs (pigments colorants, caroténoïdes, texturants, arômes, substances grasses) (Buono et al., 2014; Mimouni et al., 2012).

♦ **L'alimentation animale** : aquaculture (poissons et coquillages, unique source d'aliment pour les éclosiers et intérêt pour le contrôle de la toxicité), animaux d'élevage et animaux de compagnie (pet food), comme source de protéines (en substitution aux farines de poissons qui constituent un prélèvement minier sur la ressource pélagique) et/ou de compléments nutritifs (Priyadarshani & Rath, 2012).

♦ **La cosmétique** : de nombreux produits comportent, dans leurs formulations, des ingrédients issus de microalgues (Priyadarshani & Rath, 2012).

♦ **Utilisation en bioénergie** : l'application des microalgues comme une source d'énergie est très remarquable grâce à leurs productivités élevées en biomasse, qui nous ont permis de fabriquer du biogaz par méthanisation. Quelques microalgues sont riches en sucre et peuvent produire du bioéthanol, d'autres contiennent de grandes fractions en lipides permettant la

production du biodiesel, alors la production de biogaz et de biodiesel dépend de la composition de chaque espèce microalgale (Dejoye, 2013).

♦ **Les substances bio-sourcées** : les bioplastiques algaux, sont des additifs utilisés pour la construction des BTP (béton et bitume), des collants, des polysaccharides, des polyesters et des hydroxyacides (Rastoin, 2016).

♦ **Les produits pharmaceutiques phytothérapeutiques humaine et animale**: Tel que les substances anti-oxydants, les acides aminés nécessaires, les tocophérols, les antibactériens peuvent être trouvées dans quelques compositions des antibiotiques, les médicaments de prophylaxie en nutrition tels que les acides gras insaturés,  $\omega 3$  et  $\omega 6$ , les anti-inflammatoires et les anti-mutagènes, la restauration de la résistance cellulaire au cancer, l'activité anti-angiomatique, pratiquement toutes les vitamines A, B1, B6, B12, C, E, prophylaxie en neurologie et ophtalmologie (Buono et al., 2014; Mimouni et al., 2012).

## II.2. APPLICATION DES MICROALGUES A LA BIOREMEDIATION DES EAUX USEES

Les microalgues exhibent un très grand nombre d'applications grâce à leur biodiversité et leurs caractéristiques biochimiques intrinsèques, on les utilise dans différents domaines tels que l'industrie pharmaceutique, agro-alimentaire, environnementale et les énergies renouvelables (Figure II.1) (Filali, 2012).

Selon leurs propriétés biochimiques et physiologiques, elles sont capables d'être exploitées dans des applications environnementales très variées, elles exposent beaucoup d'utilités pour la dépollution des eaux résiduaires, pour capturer et valoriser le  $CO_2$  et pour produire de l'énergie propre comme les biocarburants.

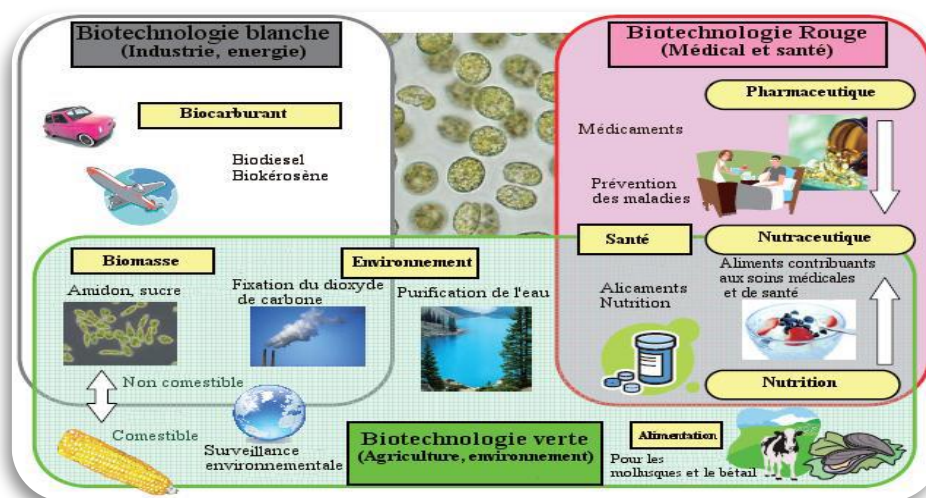


Figure II. 1: Diversité du champ d'application des microalgues (Sumi, 2009)

### II.2.1. Les microalgues pour traitement des eaux usées

Les microalgues ont besoin de plusieurs nutriments responsables de leur multiplication. Elles sont capables d'absorber ces nutriments, par conséquent elles peuvent bio-éliminer les polluants qui se trouvent dans les eaux résiduaires. Elles peuvent ainsi diminuer les concentrations des phosphates et des nitrates. Elles ont une action détoxifiante et dépolluante et peuvent agir selon deux modes : soit directement grâce à leur capacité à adsorber les métaux lourds, soit indirectement afin de produire de l'oxygène dissous aux bactéries permettant la bioremédiation des eaux contaminées. Des recherches ont déjà été faites pour montrer l'utilisation des microalgues pour l'élimination des métaux lourds existant dans les eaux résiduaires (Bolisetty et al., 2019; Chaib et al., 2021; Danouche et al., 2020, 2021; Perales-Vela et al., 2006) et sur la biodégradation des polluants toxiques comme le tributylétain « TBT » par *Chlorella vulgaris* (Luan et al., 2006).



**Figure II. 2: Traitement des eaux usées par les microalgues**

Les émissions des gaz à effet de serre particulièrement le CO<sub>2</sub> est l'une des grandes catastrophes parmi les différentes formes de la pollution environnementale. Il a été prouvé que les microalgues jouent un rôle très encourageant pour la bio-fixation du CO<sub>2</sub> (Filali, 2012). La reproduction photosynthétique des microalgues permet d'arranger positivement leur culture à un traitement d'effluents liquides et de fumées industrielles (par biofixation de CO<sub>2</sub>, nitrates et phosphates par exemple).

## II.2.2. Systèmes de cultures des microalgues

Dans plusieurs recherches scientifiques, la culture des microalgues à l'échelle du laboratoire est bien connue et est bien maîtrisée, par contre elle est mal manipulée dans l'échelle industrielle (**Figure II.2**). La sélection du système de culture dépend du degré de vérification indispensable à la production des composés à valeur ajoutée souhaités. IL existe deux essentiels systèmes de cultures de microalgues qui ont été développés, pour être utilisés dans les laboratoires et dans les industries (**Lucchetti, 2014**).

♦ **Les systèmes ouverts** : se caractérisent par l'exposition d'une partie importante de la culture à l'atmosphère, appelés bassins.

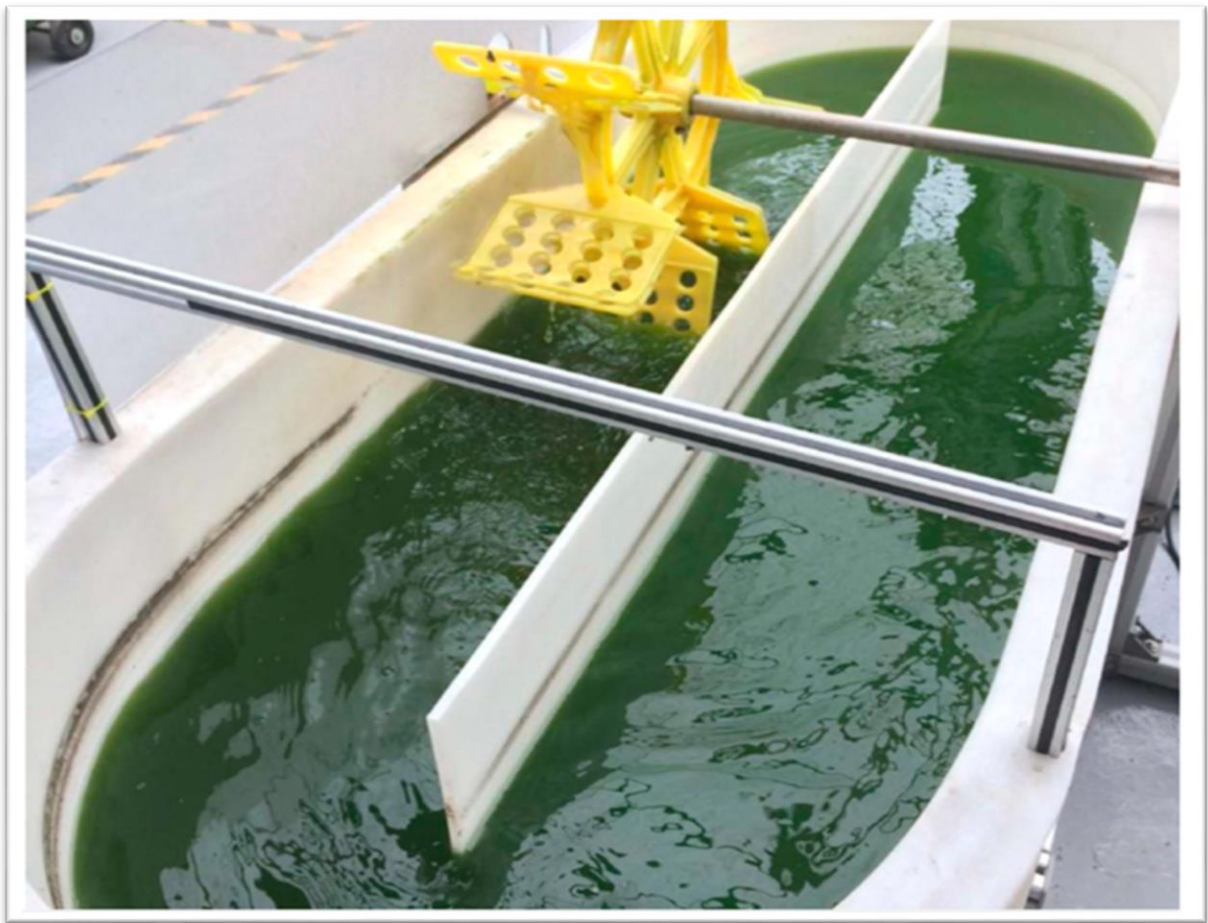
♦ **Les systèmes fermés** : il n'y a pas d'exposition directe de la culture avec l'atmosphère, ils sont appelés des photobioréacteurs.

Récemment, il existe trois systèmes différents, qui sont utilisés pour la culture des microalgues. Ces systèmes comprennent un bassin ouvert, un bassin fermé ainsi que photobioréacteurs et systèmes hybrides (**de Godos et al., 2014; Razzak et al., 2013**).

### II.2.2.1. Systèmes de culture ouverts

Ces dernières années, les systèmes ouverts sont devenus les moyens habituellement employés pour la culture industrielle des microalgues. Ces bassins ouverts (**Figure II.3**) sont plus pratiques, aisés et ils ont un faible coût de construction et d'exploitation que les bioréacteurs fermés. Ils sont les moins énergivores et ont une maintenance et un nettoyage facile. A l'heure présente, ses propriétés rendent ces systèmes de culture persistants et viables, malgré leur faible productivité et rendement (**Lucchetti, 2014**). Pour ce genre de systèmes de culture, la luminosité est souvent fournie par leur exposition naturelle à la lumière du soleil, donc il n'y a pas de frais associés à ce paramètre. Cependant, les microalgues n'utilisent qu'un faible apport de la lumière puisqu'elles obéissent aux changements de la température et de l'intensité lumineuse solaire quotidienne et saisonnière. Des problèmes de contaminations existent (par des bactéries, champignons, protozoaires et d'autres microalgues) et de grosses pertes d'eau par évaporation sont observées dans ce type de système de culture. Il est bien difficile de contrôler les conditions de cultures, puisque certaines microalgues possèdent une grande résistance pendant leur croissance sous les effets des conditions physicochimiques ordinaires aux bassins ouverts (pH élevé, haute température ou forte salinité). Les variations des formes, de la configuration, du type des

matières de fabrication et du système d'agitation permettent la réalisation de plusieurs bassins distingués.



**Figure II. 3 : Système de traitement des eaux usées (bassin de type raceway) (Udaiyappan et al., 2017).**

Un système d'étang ouvert a été utilisé pour la culture des microalgues au cours des dernières années, en utilisant les nutriments des eaux usées et le CO<sub>2</sub> atmosphérique en présence de la lumière solaire (Zhang et al., 2014). Les étangs ouverts sont généralement de 0,3 à 0,6 m de profondeur et de 0,8 à 1 m de largeur (Cheah et al., 2015). Différents types de conception d'étang ouvert sont utilisés, mais le plus couramment utilisé comprennent les systèmes inclinés, les bassins circulaires et les bassins de type Racway (Kiran et al., 2014; Kumar et al., 2015). Les systèmes inclinés sont conçus pour induire un écoulement de la suspension de culture d'algues du haut vers le bas de la pente surface. La force de gravité est utilisée comme turbulence pour assurer un bon mélange de microalgues. La densité cellulaire augmente également en raison des meilleures conditions de mélange. Ce type de système convient à la culture de *Chlorella*, *Phaeodactylum* et *Scenedesmus*, car elle peut survivre sous un mélange

d'environnement répétitif (Chen, 1996; Kiran et al., 2014). Les bassins circulaires et les bassins à chenaux occupent une superficie d'environ 1 ha, tandis que les étangs extensifs peuvent s'étendre jusqu'à 200 ha. Les bassins circulaires contiennent un agitateur rotatif central pour mélanger la culture. Cependant, la rotation d'agitateur devient inefficace dans les bassins de grande taille ( $\geq 1$  ha) et nécessite beaucoup d'énergie pour le mélange. Les étangs Raceway sont également connus sous le nom de « high rate algal ponds » (HRAP). Il contient une roue à aubes pour une recirculation en boucle fermée voie pour assurer un meilleur brassage des cultures. Un canal avant de la roue à aubes est utilisé pour introduire les nutriments et la culture des microalgues. Les systèmes de culture d'étangs à canalisation de grande taille sont peu coûteux mais moins productifs en microalgues (Spolaore et al., 2006). Par exemple, *Chlorella* et *Spirulina* ont produit une faible productivité de la biomasse ( $17 \text{ g/m}^2 \cdot \text{jour}$ ) dans un étang de raceway par rapport aux systèmes fermés (de Godos et al., 2014). Les systèmes d'étangs ouverts nécessitent un peu coût de construction et d'exploitation. Cependant, ils exigent de grande zone de terres, ce qui peut augmenter le coût en capital. Afin de fixer le coût du terrain, gorgé d'eau peuvent être une option appropriée pour construire des étangs ouverts pour la culture. Plusieurs facteurs affectent la culture des microalgues dans un système d'étang ouvert tels que les facteurs environnementaux, les conditions météorologiques, les contaminants/les prédateurs (bactéries et champignons) et les espèces indésirables d'algues qui peuvent pousser sur les mêmes ressources.

#### II.2.2.2. Systèmes fermés (ou photobioréacteurs)

Les microalgues peuvent être cultivées en photobioréacteur fermé dans lequel se déroulent des réactions biologiques de photosynthèse, en présence d'énergie lumineuse (Figure II.4), qu'on peut les examinées en maîtrisant les conditions de culture pour la production de la biomasse phytoplanctonique, de dioxyde de carbone  $\text{CO}_2$  et de l'énergie lumineuse (Olivo, 2007). L'utilisation des matériaux transparents pour la fabrication des photobioréacteurs de culture des microalgues est nécessaire pour laisser passer la lumière tout en permettant les microalgues d'exercer des interactions de photosynthèse. L'illumination des cultures se fait grâce à la lumière solaire ou artificielle avec des lampes électriques fluorescentes. Leur optimisation peut être réalisée par un certain angle de déclivité du photobioréacteur.



**Figure II. 4: Modèle de photobioréacteurs tubulaires (Mohd Udaiyappan et al., 2017).**

Au l'intérieur d'une enceinte fermée, le bioréacteur, des microorganismes photosynthétiques (des microalgues) sont cultivés, dans des conditions bien déterminées et contrôlées, à l'aide des substrats nutritives nécessaires à leur croissance et d'un apport d'énergie lumineuse. Les interactions biologiques ayant lieu en milieu fermé, il est indispensable de maîtriser les conditions physicochimique de cultures appliquées. Il faut en particulier gérer l'accès aux nutriments et le processus d'homogénéisation du milieu, et effectuer un suivi de la température et du pH (Olivo, 2007).

#### **a. Les formes géométriques les plus courantes**

La forme géométrique du photobioréacteur est parmi les caractéristiques les plus importantes qui influencent majoritairement l'accès de la lumière. D'après ce critère on peut distinguer deux formes plus rentables de photobioréacteurs : ceux de forme géométrique plane et d'autres de forme géométrique cylindrique. À partir de leurs exigences particulières on peut aussi regrouper plusieurs variations pour chacune de ces deux types :

- Les photobioréacteurs plats.
- Les photobioréacteurs cylindriques : contiennent :
  - Les photobioréacteurs de type colonne
  - Les photobioréacteurs de type annulaire
  - Les photobioréacteurs tubulaires agencés horizontalement
  - Les photobioréacteurs tubulaires agencés verticalement

Contrairement aux systèmes d'étangs ouverts, les photobioréacteurs (PBR) sont utilisés pour cultiver des microalgues sous environnement contrôlé. Des réactions chimiques complexes ont lieu, qui convertit le CO<sub>2</sub>, le H<sub>2</sub>O et les nutriments à une biomasse d'algues riche en huile, gras et

protéines en présence de lumière qui offre un environnement de culture des microalgues maîtrisé en termes de pH, mélange, intensité solaire maximale, densité de culture et température (Alwayzy et al., 2014; Kesaano & Sims, 2014; Razzak et al., 2013). Divers systèmes de PBR sont utilisés, notamment réservoir vertical, tube hélicoïdal, air-lift, tube horizontal, tubulaire, plat et photobioréacteurs à colonne verticale. Les PBR tubulaires sont fabriqués à l'aide de tube linéaire en verre ou en plastique, et peuvent être disposés comme des tubes hélicoïdaux dans l'environnement extérieur. Les PBR à plaque plate sont construits en utilisant des récipients rectangulaires en matériau transparent, qui possèdent un rapport surface/volume élevé. Une autre configuration de PBR dite PBR de colonne qui donne un bon mélange et une culture gérable. Il est facile à construire et permet une exposition maximum à la lumière (Razzak et al., 2013). Airlift PBR offre un taux de transfert de masse élevé, des cycles lumière/obscurité réguliers et les cellules d'algues subissent une faible contrainte de cisaillement. Le bullage du gaz est utilisé pour le mélange de culture qui est réalisé par le déplacement de la culture entre la colonne montante et la section inférieure du bioréacteur (Pires, 2017). Ces PBR sont appropriés pour la culture des microalgues car ils permettent une faible accumulation d'oxygène dissous et une efficacité photosynthétique. Cependant, dans ces réacteurs il y a un manque de contrôle de la température et de la gestion de la charge hydrodynamique.

### ***II.2.2.3. Systèmes hybrides***

Les systèmes hybrides combinent les propriétés des bassins ouverts et les systèmes de bioréacteurs fermés. Lors de la première étape de culture, l'espèce désirée est cultivée dans un étang ouvert. Pendant la deuxième étape, la culture en étang ouvert avec la souche préférée est cultivée en système fermé (Christenson & Sims, 2011). Ce système hybride peut exposer la culture d'algues aux stress nutritionnels et peut augmenter la productivité de la biomasse et l'accumulation de lipides.

### **II.2.3. Intérêts et limites des systèmes de culture des microalgues**

Les cultures utilisant l'énergie solaire comme les bassins de types «raceway» ayant des besoins fondamentaux plus simples et un coût financier moins cher que les photobioréacteurs (Tableau II.1). Les bassins de type « Raceway » présentent toutefois des points faibles non négligeables: ces bassins étant à ciel ouvert, la productivité peut être affectée par des contaminations non désirées et la perte d'eau par évaporation peut jouer un rôle significatif. De plus, une moindre productivité en biomasse volumique (plus de 13 fois supérieure dans un système fermé). La comparaison des bassins et des photobioréacteurs, a permis de détecter de

nombreuses anomalies concernant les bassins. Néanmoins, ces contraintes peuvent être réduites si l'on souhaite cultiver une espèce extrémophile, et si les conditions extérieures sont propices à la culture.

**Tableau II. 1: Avantages et limites des systèmes de culture des microalgues (Cheah et al., 2015; Umamaheswari & Shanthakumar, 2016; Zhang et al., 2014).**

Systèmes de production	Avantages	Limites
<b>Ouvert / bassin de type Raceway</b>	Facile à construire, relativement bon marché, entretien facile, bon pour la culture de masse.	Nécessite plus de surface, perte d'évaporation élevée, diffusion élevée de CO <sub>2</sub> dans l'air, mauvaise utilisation de la lumière, faible productivité de la biomasse, contamination microbiennes et locales des algues.
<b>PBR tubulaires</b>	Productivité élevée de la biomasse, adaptée à la culture de masse en plein air et moins risques de contamination.	Coût d'installation initial élevé et accumulation toxique d'encrassement par l'oxygène surchauffé, grandes empreintes de pieds. Croissance des murs qui affecte la diffusivité de la lumière.
<b>PBR à plaque plate</b>	Fournit une surface d'éclairage élevée, un bon chemin lumineux, productivité de la biomasse relativement plus élevé, faible contamination par les algues indésirables, puissance de consommation réduite et faible accumulation d'oxygène dissous.	Nécessite une grande surface de terrain, de nombreux matériaux de support nécessaires pour le mesurage et contrôle difficile de la température.
<b>PBR à colonne</b>	Facile à stériliser, bon mélange, faible d'encrassement, capacité de transfert de masse élevée. et faible photo-oxydation.	Petite surface d'éclairage, mise à l'échelle, difficile à construire, consommation élevée d'énergie.
<b>Étangs hybrides</b>	Meilleur contrôle de la culture en biomasse et réduction de la consommation d'énergie.	Coût d'investissement initial élevé et coût de maintenance élevé

### II.3. FACTEURS INFLUENÇANT LE DEVELOPPEMENT MICROALGAL

Pour croître, les microalgues ont de nombreux besoins. Les facteurs physiques les plus importants sont une source d'énergie, généralement la lumière et une température optimale et les facteurs chimiques sont la concentration disponible en dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> et un apport en macronutriment et en oligo-éléments (Burlew, 1953).

La croissance des microalgues est influencée par plusieurs facteurs tels que l'agitation et la quantité en oxygène dissous.

### **II.3.1. La lumière**

Parmi les paramètres les plus sérieux pour assurer une bonne croissance photosynthétique des algues est l'intensité lumineuse, elle a un effet sur la composition cellulaire des microalgues (photo-adaptation ou photo-acclimatation) (**Richmond, 2004**). L'énergie radiative ne s'accumule pas, c'est pour cela que la lumière doit être fournie en permanence et doit être considérée comme un substrat (**Miron et al., 2000; Molina Grima et al., 1996**). La lumière est l'une des contraintes majeures pour la productivité de la biomasse algale. La pigmentation de la culture des algues provoque une diminution exponentielle dans l'intensité lumineuse (**Kumar et al., 2013**). La lumière reçue par chacune des cellules algales dépend de la profondeur de l'étang, de la concentration de la biomasse et du régime de turbulence (**Sutherland et al., 2014**). Parmi eux, la profondeur de l'étang et la concentration de la biomasse détermine le degré d'atténuation de la lumière, alors que les régimes des turbulents déterminent la fréquence à laquelle une cellule entre et sort du régime de lumière favorable (**Sutherland et al., 2014**). Cependant, une augmentation de la profondeur du RWP compromet la productivité algale réelle. il est aussi rapporté dans la littérature des profondeurs hautes que 50 cm (**Brennan & Owende, 2010**). La profondeur recommandée de 20 cm pour l'étang du caniveau compte tenu de la performance hydraulique globale en termes de consommation d'énergie (**Mendoza et al., 2013**). Dans une étude de la pénétration de la lumière dans la culture d'algues, il a été constaté que la pigmentation des cellules algales ne bloque pas la lumière de manière significative jusqu'à concentration de biomasse de 0,66 g/L (**Kumar et al., 2013; Tredici, 2004**). D'un autre côté, maintenir la faible concentration de la biomasse dans les étangs ouverts n'est pas souhaitable, puisqu'il augmente le coût de récolte et diminue le total de la productivité de la biomasse des microalgues en assurant un mélange suffisant et une lumière/obscurité appropriée pour le cycle est l'option économiquement viable pour la culture des algues.

### **II.3.2. La température**

La croissance des microalgues est affectée par la température qui est l'un des facteurs physiques qui agissent sur leur multiplication. Il existe une intensité lumineuse caractéristique pour chaque valeur de la température pour atteindre un maximum rendement de la croissance photosynthétique. Il y'a un accroissement de la température optimale avec l'augmentation de

l'intensité lumineuse. Il existe aussi une température optimale pour une croissance en biomasse maximale mais cette variation de la température agit aussi sur la composition cellulaire.

Lorsque la température diminue, le degré d'insaturation des lipides augmente et l'accroissement de la température provoque l'augmentation des concentrations des pigments, et aussi une élévation de la concentration des radicaux d'oxygène (**Richmond, 2004**). Les microalgues nécessitent des quantités élevées en carbone et en nutriment pour obtenir le même taux de croissance trouvé à leur température optimale (**Mata et al, 2010**). C'est ainsi que les microalgues d'eau douces connaissent une croissance optimale dans un intervalle de température allant de 20 à 25°C (**Bouarab et al, 2002**).

### **II.3.3. Le carbone : source d'énergie**

Le carbone inorganique est très nécessaire pour le processus de la photosynthèse. Les microalgues peuvent absorber cet élément sous deux formes dans les systèmes de culture, soit par l'ajout des sels de bicarbonate ou par l'enrichissement de l'air insufflé (parce que l'air atmosphérique ne contient pas une concentration élevée de CO<sub>2</sub> pour la culture intensive des microalgues). Pour que les microalgues puissent utiliser le CO<sub>2</sub> pour la photosynthèse, celui-ci doit être solubilisé (**Cadoret & Bernard, 2008**).

### **II.3.4. Le pH**

Les microalgues consomment le CO<sub>2</sub> dissous pour la photosynthèse. Il en résulte une augmentation du pH du milieu de culture par une modification de l'équilibre carbonaté de l'eau. Le pH des cultures concentrées peut ainsi dépasser 9,5. En pH alcalin, le CO<sub>2</sub> est absorbé en raison des réactions qui se produisent entre les ions d'hydroxyles et le CO<sub>2</sub> pour produire du bicarbonate. le pH optimal de la plupart des algues se situe entre 7 et 8 qui donne une bonne multiplication des microalgues (**González-López et al., 2012**). Par conséquent, la livraison de CO<sub>2</sub> dans l'étang de la voie de roulement par un produit chimique, la réaction est limitée car la formation de bicarbonate domine à des valeurs de pH supérieures à 10. Un transfert de masse suffisant et le taux de croissance active des cellules d'algues à pH 8 (**de Godos et al., 2014**). Les espèces de *spirulina sp.* sont généralement cultivées dans les RWP car elles poussent efficacement à un pH plus supérieur à 10, minimisant ainsi les risques de contamination.

### II.3.5. Les sels nutritifs

L'azote est un élément très important dans la structure et le fonctionnement des protéines. C'est la substance la plus utilisée après le carbone (**Becker, 1994**). Le rendement de croissance des microalgues est presque similaire selon les sources d'azote utilisées (urée, nitrite, nitrate). Plusieurs recherches démontrent que lorsqu'il existe un déficit en azote, il y a une amélioration de la production et de l'accumulation des lipides. Il y a aussi un stockage des caroténoïdes secondaires dans ce cas (**Becker, 1994**).

Le phosphore est un élément majeur qui sert comme nutriment essentiel dans les processus de fonctionnement cellulaire. L'accumulation de pigments chez certaines microalgues est l'impact de la déficience en phosphore, cependant cette conséquence est plus faible qu'une insuffisance en azotée.

Les microalgues ont besoin également de **potassium**, de **fer**, de **silice** (pour les diatomées), de **soufre**, de **métaux** sous forme de traces et des **vitamines**. Le fer est un métal en trace nécessaire pour la multiplication des espèces microalgales par sa participation dans le transfert des électrons dans la réaction de la photosynthèse (**Richmond, 2004**).

### II.3.6. L'agitation

La fourniture d'un mélange adéquat est la préoccupation majeure dans les Raceways Ponds (RWP). Le mélange représente près de 69 % du coût total des utilités. Le mélange optimal dans les RWPs peut améliorer la productivité des algues de près de 10 fois (**Hreiz et al., 2014**), Il sert à plusieurs fins telles que :

- L'exposition périodique des cellules au soleil
- En les maintenant en suspension et éviter la sédimentation algale
- Disponibilité des nutriments pour les cellules algales,
- Elimination des photo-oxygène généré synthétiquement, etc. (**Prussi et al., 2014**).
- Le mélange est important pour éviter la photo-limitation et la photo-inhibition et améliorer l'efficacité de la lumière d'utilisation (**Chiaramonti et al., 2013**). Cependant, mélanger inutilement devrait être évité l'absence de la lumière (**Rogers et al., 2014**), cela peut atteindre 25 % pendant la nuit. Par conséquent, la réduction de la vitesse d'agitation a été conseillée.

L'agitation régulière ou temporaire des cultures de microalgues est nécessaire, selon les espèces, pour diverses raisons (**Richmond, 2004**) :

- Diminuer la concentration en oxygène dissous ;
- Augmenter les échanges de nutriments et les transferts de masse.
- Prévenir la formation d'un gradient de nutriment ou de gaz

L'agitation est l'un des facteurs les plus importants pour améliorer la productivité de la croissance en biomasse car cela permet d'accroître l'efficacité et la concentration optimale (**Richmond, 2004**).

## **II.4. LA PHYCOREMEDIATION DES EAUX USEES**

Comme nous avons montré plus haut, il existe plusieurs facteurs influençant la croissance des microalgues tels que la présence des éléments nutritifs et d'une source de carbone. Les microalgues deviennent très intéressantes grâce à leur aptitude de retirer ces substances, et potentiellement performantes pour la phytoremédiation, qui consiste en l'utilisation des végétaux pour le retrait ou la bioconversion des polluants contenus dans un milieu contaminé dans le but de le traiter. La phytoremédiation utilisant des microalgues hétérotrophes pour ce type de mécanisme, puisqu'elles peuvent permettre de retirer des sources de carbone organique du milieu. La bioremédiation des eaux usées utilise des espèces hétérotrophes tandis que la mixotrophie est également ciblée lors de la valorisation des rejets gazeux de CO<sub>2</sub> (**Boileau, 2015**).

### **II.4.1. Historique de l'utilisation des microalgues dans le traitement des eaux**

L'intention d'utilisation des algues pour le remédiation tertiaire des eaux municipales a été bien étudiée depuis le début des années 70. Le traitement avait été employé pour la réduction de la capacité d'eutrophisation de ces eaux usées (**Wang et al., 2010**). Il a été véritablement démontré que les algues exposaient un potentiel de bioremédiation plus important que pouvaient retirer de nombreux nutriments des eaux usées, avec une grande productivité des boues activées. Il semblait donc économiquement plus intéressant d'utiliser ces microorganismes en traitement secondaire plutôt que tertiaire. Les étangs aérés ont été utilisés pour ces applications. Les résultats inattendus, en raison de leur efficacité de phytoremédiation et leur rapidité de croissance, ont poussé plusieurs auteurs à tester la croissance de différentes espèces d'algues

dans des eaux usées spécifiques, afin de vérifier leur potentiel pour la production de biocarburants à prix plus compétitifs (Boileau, 2015).

La plupart des résultats obtenus par plusieurs auteurs ont rapportés des conclusions relativement liées à l'efficacité des chlorophycées pour la bioremédiation des eaux usées chargées en nutriments. Par exemple, selon Wang et al. (2010), le taux d'élimination des nutriments qui se trouvent dans les eaux usées municipales par *Chlorella sp.* a été étudié à l'échelle du laboratoire. En conclusion, ils ont démontré que ces espèces microalgales permettent facilement de multiplier par l'utilisation du nutriment des eaux résiduaires comme substrat de culture dans un volume de 100 ml. Des concentrations non négligeables des métaux sont de plus éliminées par ces microalgues, simultanément avec l'abattement des taux élevés en phosphates et en nitrates. Les meilleurs taux de croissance et des rendements de retrait ont été obtenus avec le milieu le plus riche en nutriments (N et P principalement) (Wang et al., 2010). D'autres études à l'échelle du laboratoire ont fourni des conclusions semblables avec des espèces de microalgues et des compositions d'eaux usées différentes (Cabanelas et al., 2013; Cho et al., 2013; Samorì et al., 2013).

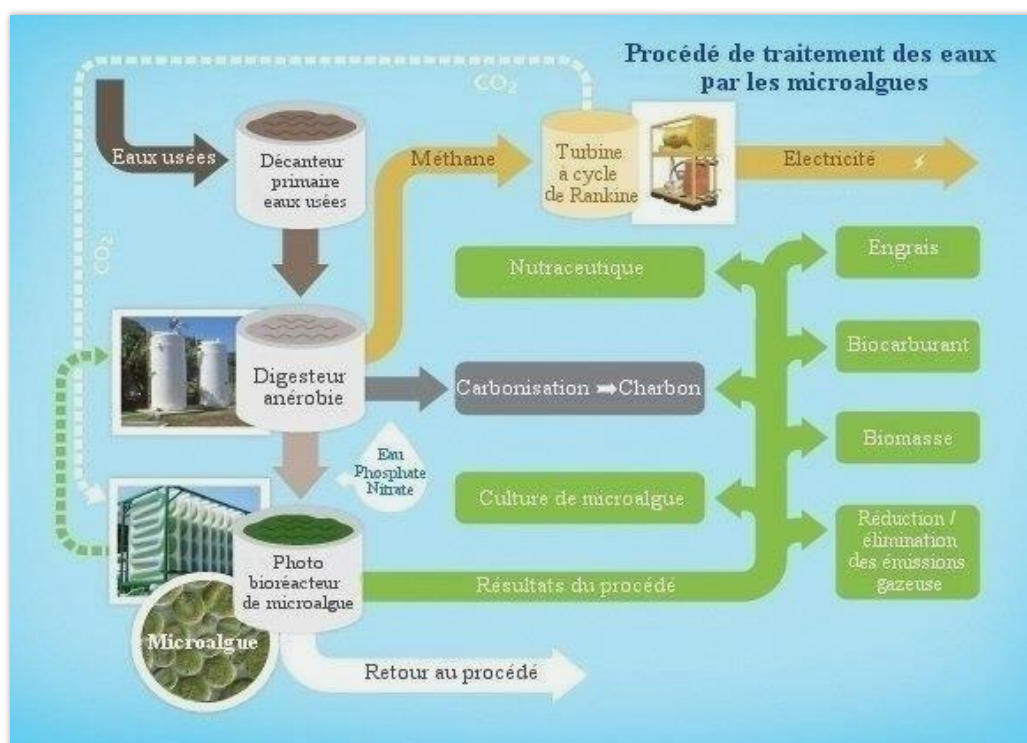


Figure II. 5: Procédé de traitement des eaux par les microalgues (Filali, 2012).

#### II.4.2. Phycoremédiation des métaux lourds à l'aide de l'utilisation des microalgues vivantes

L'élimination des polluants d'un milieu aquatique peut habituellement se réaliser par l'intermédiaire de divers mécanismes, dont la bioaccumulation, la biodégradation ou la précipitation.

La bioaccumulation ne constitue pas un processus destructif. Il s'agit plutôt d'un processus par lequel il y a un transfert de pollution du milieu de culture vers la cellule. En fait, la cellule possède des mécanismes lui permettant d'absorber ou d'adsorber les contaminants et de les accumuler, soit à l'intérieur ou à la surface de la membrane cellulaire. Les cellules ne permettent pas de consommer les polluants durant ce mécanisme pour leur croissance, mais conduisent tout de même à la bioremédiation des eaux (**Boileau, 2015**).

Le terme biodégradation ou la biotransformation est défini de façon générale comme le mécanisme permettant de transformer les contaminants (polluants organiques) en composés assimilables par des micro-organismes (bactéries, champignons ou algues). Pour la production de la biomasse, la biodégradation totale est marquée par la conversion des polluants en dioxyde de carbone, en eau et en énergie (**Noel, 2014**). Les microalgues peuvent montrer trois types de modifications dans l'étape de biodégradation. Il peut s'agir d'une minéralisation des contaminants, soit d'une transformation complète des molécules organiques en composés inorganiques assimilables par les cellules. Le terme englobe également les modifications plus mineures sur les cycles aromatiques, comme le remplacement d'un groupe fonctionnel laissant la structure initiale intacte ou la fragmentation complète. La biodégradation peut impliquer des enzymes intra ou extracellulaires ou peut être régit par des modes de transport actif, lorsque le contaminant en question peut être directement intégré dans les voies normales de bioconversion de la cellule.

Finalement, la transformation des métaux solubles en complexes insolubles est réalisée par le phénomène de précipitation qui réfère à l'habileté des cellules par l'intermédiaire de produits oxydants qui existent sur la membrane cellulaire (**Boileau, 2015**).

Pour inclure à la fois des stratégies de Bioremédiation extracellulaire et/ou intracellulaire, **la figure (II.6)** résume les principales voies impliquées dans la Bioremédiation et l'atténuation des MLs.

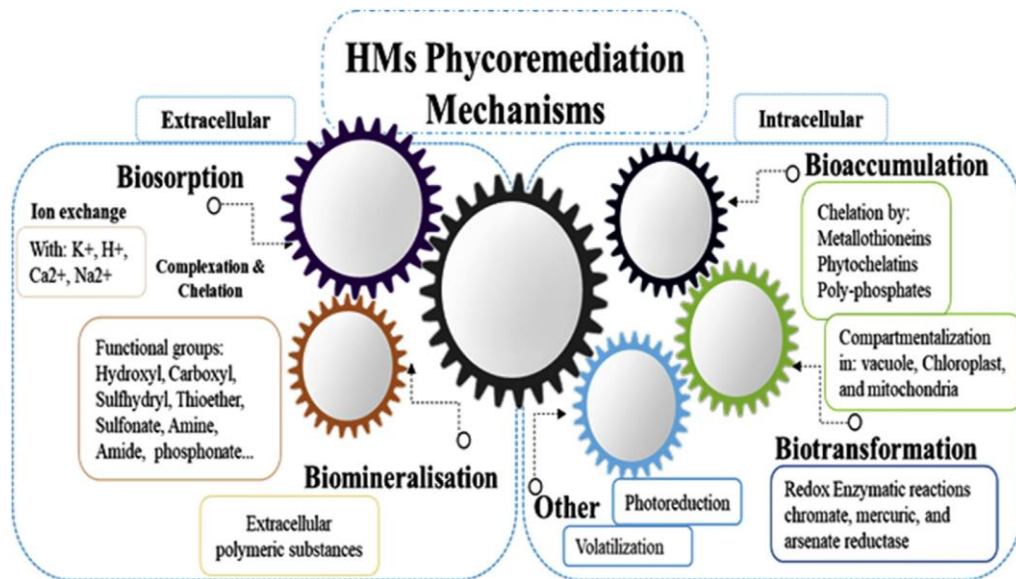


Figure II. 6: Mécanismes de phycoremédiation des MLs (modifiée par García-García et al. (2016) et Suresh Kumar et al. (2015))

## II.5. BIO-ELIMINATION EXTRACELLULAIRE DES METAUX LOURDS (MLs) AVEC DES MICROALGUES VIVANTES

L'absorption extracellulaire des MLs par les cellules vivantes des microalgues peut se produire par biosorption dans la paroi cellulaire ou dans les substances polymères extracellulaires (EPS) formées par les microalgues en réponse à des conditions de stress. Dans le premier cas, la biosorption des MLs fait référence à une propriété physicochimique de la surface cellulaire de la microalgue qui se lie aux ions des MLs de la solution indépendamment du métabolisme cellulaire. Cependant, la biosorption des MLs dans l'EPS est un processus dépendant du métabolisme. En réponse au stress métallique, les cellules de microalgues peuvent non seulement réguler la synthèse d'EPS, mais aussi modifier les propriétés de ces biopolymères selon les besoins (Naveed et al., 2019; Ubando et al., 2021).

### II.5.1. Composition des parois cellulaires et son rôle dans la biosorption des MLs

La paroi cellulaire est l'interface entre le compartiment intracellulaire et le milieu extérieur (Macfie & Welbourn, 2000). Il contient des macromolécules multifonctionnelles telles que des lipides, des protéines et des glucides, qui offrent à sa surface différents groupes fonctionnels chargés négativement tels que amino, hydroxyle, carboxyle, sulfhydryle, sulfate, phosphate, phénol, etc. (Javanbakht et al., 2014). Ces groupes chargés négativement permettent la liaison des ions du milieu environnant, faisant de la couche externe de la paroi cellulaire le

premier participant à l'élimination des MLs (Leong & Chang, 2020; Saavedra et al., 2018; Singh et al., 2021). Par conséquent, la compréhension de la structure, de la composition et des propriétés de la paroi cellulaire est essentielle lors de l'étude des mécanismes de biosorption (Podder & Majumder, 2017). De plus, ce mécanisme non métabolique dépend étroitement à des conditions opératoires, l'influence des conditions physicochimiques dont le pH, la température, la présence d'autres ions et le ratio adsorbant/adsorbat doit être contrôlée (Zeraatkar et al., 2016). Néanmoins, même dans des conditions de fonctionnement similaires, la sensibilité et l'efficacité de la biosorption varient selon le genre et l'espèce de microalgues (Suresh Kumar et al., 2015). Par exemple, la croissance de *Chlorella sorokiniana* et *Scenedesmus obliquus* dans des milieux contaminés par le  $Pb^{2+}$ , le  $Cd^{2+}$ , le  $Cu^{2+}$  et le  $Cr^{6+}$  était significativement différente (Danouche et al., 2020). Ceci peut être attribué à la physiologie de la souche, en particulier la composition et la structure des parois cellulaires. Selon l'espèce et le stade de croissance, différentes structures et compositions de la paroi d'appel ont été signalées. Au sein de ce phylum, il s'agit d'une simple membrane cellulaire comme celle des espèces *Dunaliella* et *Isochrysis*, qui consiste en une bicouche lipidique avec des protéines intégrées et périphériques, et parfois une coiffe de glycoprotéines et de glycolipides enveloppe l'extérieur de la surface des cellules. Complexer des structures multicouches avec du matériel intracellulaire supplémentaire dans des vésicules comme celle des souches de dinoflagellés, ou celle des espèces d'euglénophytes et de cryptophytes qui se caractérisent à la fois par du matériel intracellulaire et extracellulaire associé aux membranes cellulaires (D'Hondt et al., 2017).

La Figure (II.7) illustre la structure de la paroi cellulaire de certaines espèces de microalgues. De plus, les espèces du même genre peuvent présenter également des variations dans la composition de leurs parois cellulaires. Par exemple, *C. vulgaris* a une couche interne (Rashidi & Trindade, 2018), tandis que *C. homosphaera* et *C. zofingiensis* ont tous deux une couche interne et une couche externe, et ont également la version trilaminaire de la couche externe (Rodrigues & Pinto, 2011). Dans le cas de *C. trilaminaire*, la couche la plus externe est composée de sporopollénine, la couche intermédiaire est principalement composée de polysaccharides de type mannose et chitine, et la couche la plus interne est une bicouche phospholipidique (Dixon & Wilken, 2018).

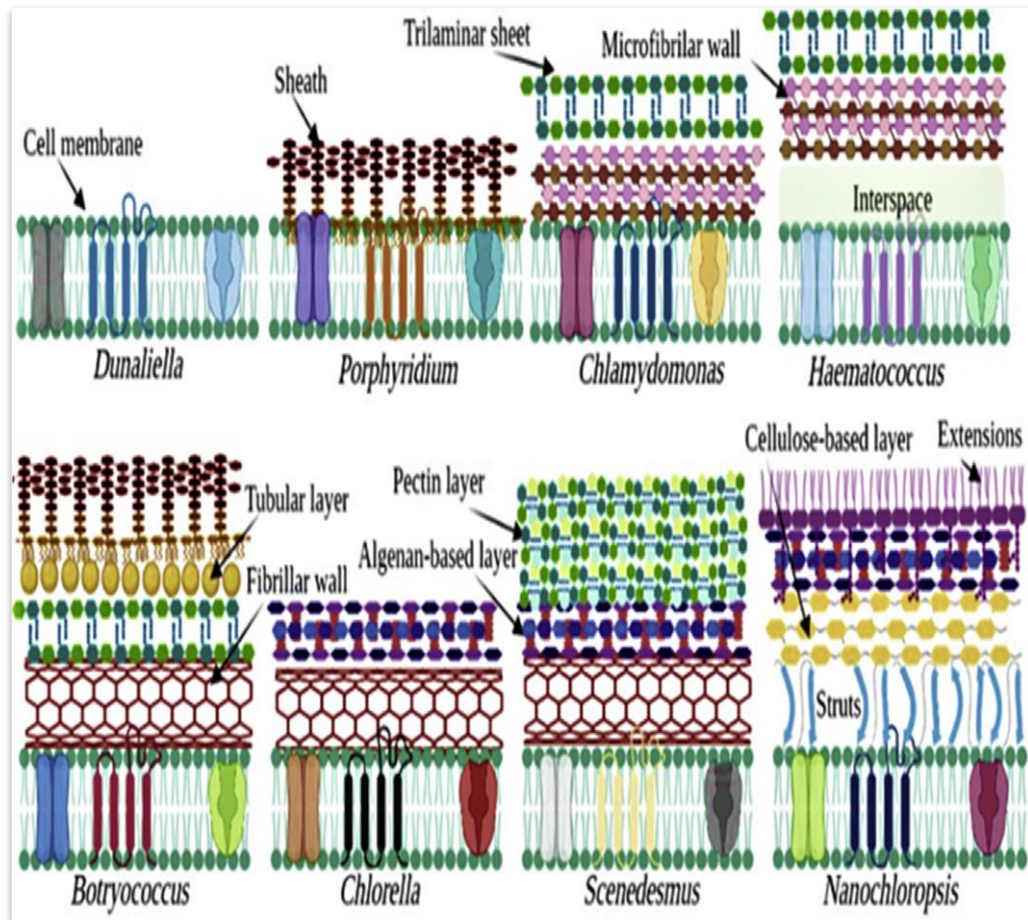


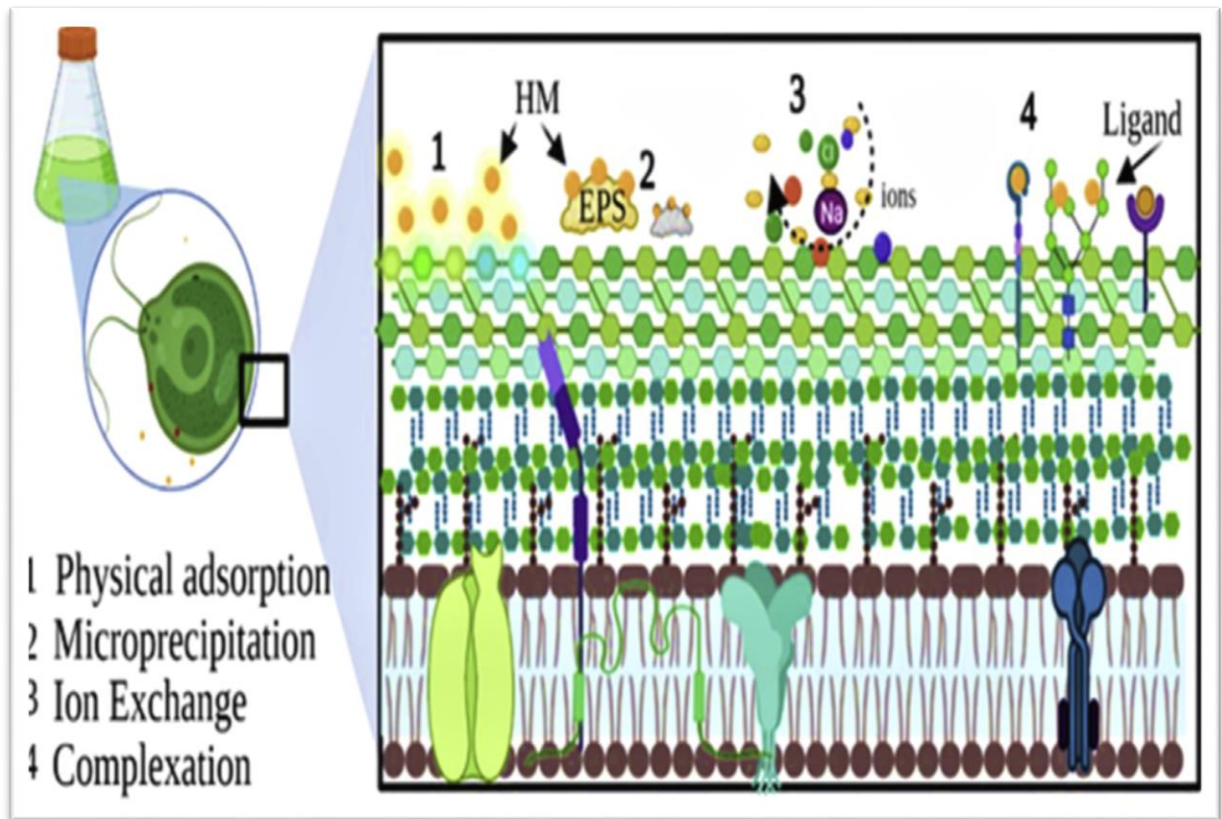
Figure II. 7: Vue schématique des structures de la paroi cellulaire de certaines espèces de microalgues (Baudeflet et al., 2017; de Carvalho et al., 2020).

### II.5.2. Interactions physicochimiques des MLs et de la surface cellulaire

Comprendre l'interaction des ions des MLs et de la surface cellulaire des microalgues est difficile, en raison de la complexité de la surface cellulaire. Plusieurs interactions chimiques et physiques ont été signalées. La chélation et la complexation des MLs avec des groupes actifs de la paroi cellulaire étaient les principaux mécanismes impliqués. De plus, la surface cellulaire des microalgues incorpore des ions tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , qui peuvent être remplacés de manière réversible par d'autres ions des MLs toxiques en solution, via un processus appelé échange d'ions. Les forces physiques, principalement de van der Waals et les interactions électrostatiques, peuvent à leur tour gérer le mécanisme d'adsorption physique de la liaison du métal à la surface de la cellule. D'autre part, la microprécipitation est un processus qui peut être associé à la fois aux voies passives et actives d'absorption des métaux (Mantzorou et al., 2018).

### II.5.3. Interactions des substances polymères extracellulaires avec les MLs

Les EPS sont des biopolymères extracellulaires de haut poids moléculaire qui peuvent être produits par une diversité de microorganismes, y compris des espèces de microalgues. Ils comprennent les acides nucléiques, les protéines, les lipides, le sucre, les substances humiques et d'autres composants inorganiques extracellulaires qui peuvent se lier aux glucides (Xiao & Zheng, 2016). Ainsi, nous pouvons diviser les EPS des microalgues en trois grandes catégories, les EPS solubles dans les milieux de croissance (SL-EPS), les EPS attachés à la paroi cellulaire ou les EPS lâchement liés (LB-EPS), ainsi que les EPS étroitement liés (TB-EPS), qui sont des revêtements de type gel de la paroi cellulaire (Naveed et al., 2019). Les microalgues sont généralement menacées dans les écosystèmes aquatiques par la présence de matières dangereuses comme les métaux toxiques. L'un des mécanismes adaptatifs développés par ces organismes en tant que mécanisme d'autodéfense est la production d'EPS. Généralement, la production d'EPS augmente sous la stimulation des métaux. Selon Yu et al. (2019), le LB-EPS de *Chlamydomonas reinhardtii* avait augmenté de manière significative après l'exposition au Cd. Récemment, Li et al. (2021) ont également mis en cause une augmentation de la production d'EPS par *C. reinhardtii* sous stress de  $Pb^{2+}$  et de  $Cd^{2+}$ . De même, Zhang et al. (2015) ont signalé que l'augmentation des rendements en EPS de culture de *Chlorella sp.* indique que l'absorption de  $Cu^{2+}$  est effectuée par EPS plutôt que par chélation intracellulaire. En comparant les cellules sans EPS et recouvertes d'EPS de *C. pyrenoidosa*, Zhang et al. (2020) montrent que les EPS améliorent la capacité d'adsorption, réduisent l'accumulation intracellulaire et augmentent la tolérance aux ions  $As^{2+}$ . Les EPS semblent être capables de former une couche protectrice extracellulaire à la surface de la paroi cellulaire, empêchant l'effet nocif des MLs dans l'environnement intracellulaire. Par conséquent, leur excrétion est un mécanisme de survie, permettant un maintien de l'intégrité cellulaire (Hou et al., 2017; Naveed et al., 2019). De plus, les EPS ont de nombreux groupes hydrophobes chargés, qui sont appropriés pour une liaison active aux MLs (Zhang et al., 2020). Selon Li et al. (2017), la biosorption des métaux dans les EPS peut être liée aux propriétés de la surface cellulaire et aux groupes fonctionnels. La figure (II.8) résume les interactions qui peuvent gérer le mécanisme de biosorption des MLs dans les cellules de microalgues.



**Figure II. 8: Mécanismes de bio-élimination extracellulaire des MLs à l'aide de cellules vivantes de microalgues, modifiés par (Mantzorou et al., 2018)**

#### II.5.4. Mécanismes de Bioaccumulation des métaux lourds dans les microalgues

Contrairement au processus de biosorption, la bioaccumulation est une voie métabolique dépendante. Il fait référence à l'accumulation intracellulaire des MLs à travers les membranes cellulaires des microalgues vivantes basée sur des voies de transport passives et/ou actives (Chojnacka, 2010). Elle se caractérise par deux étapes successives : premièrement, une absorption rapide, passive et non spécifique des ions métalliques sur la paroi cellulaire, suivie d'un transport actif et/ou passif à travers la paroi cellulaire et la membrane plasmique jusqu'au cytoplasme (Suresh Kumar et al., 2015). En effet, Pérez-Rama et al. (2002) ont rapporté que l'absorption de  $Cd^{2+}$  à l'aide de *Tetraselmis suecica* était un processus biphasique, assisté dans la première phase par une adsorption sur des protéines ou des polysaccharides, suivie d'une accumulation dépendante de l'énergie dans le cytosol. De plus, lorsque la concentration de métal dans l'environnement extracellulaire est significativement plus élevée que la concentration intracellulaire, les cations peuvent être transportés par les groupes chargés négativement de la surface cellulaire, pour atteindre le compartiment intracellulaire via un transport actif à travers la membrane plasmique après liaison aux molécules de thiols principalement. cystéine (Monteiro

et al., 2012). Les autres acides aminés tels que l'histidine, le glutamate et la proline peuvent également jouer un rôle crucial dans la chélation et la détoxification des métaux (Hayat et al., 2012; Leszczyszyn et al., 2010; Suresh Kumar et al., 2015). Comme la plupart des MLs sont hydrophiles, leur transport à travers la membrane plasmique (lipophile) est assuré principalement par une protéine spécifique (transporteurs de métaux). Par la suite, plusieurs voies de détoxification peuvent avoir lieu dans les compartiments intracellulaires (Leong & Chang, 2020; Monteiro et al., 2011).

### II.5.5. Transporteurs de métaux dans la membrane cellulaire des microalgues

Les transporteurs de métaux jouent un rôle important dans l'interaction des algues avec leur environnement. Ils représentent la première ligne de contrôle des équilibres osmotiques, ainsi qu'ils gèrent la concentration intracellulaire des ions essentiels à l'homéostasie des micronutriments, afin de faire face aux effets délétères des MLs non essentiels (Hanikenne et al., 2005). L'implication des transporteurs membranaires a été caractérisée chez différentes espèces de microalgues (García-García et al., 2012; Rosakis & Köster, 2004) Selon Blaby-Haas & Merchant (2012), deux groupes de transporteurs sont responsables de l'influx et de l'efflux de chacun des ions métalliques dans le modèle algal *C. reinhardtii*. En effet, le groupe des transporteurs (A) assure le trafic des MLs du milieu extracellulaire vers le cytosol, dont les Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins (NRAMP), les Zrt-Irt-like protein (ZIP), le Fe-Transporter (FTR) et le Cu-familles de transporteurs (CTR). Ce groupe de transporteurs a également été identifié dans la membrane vacuolaire et a la même fonction que les transporteurs assimilateurs. Le deuxième groupe (B) comprend des membres du facilitateur de diffusion de cations (CDF), des ATPases de type P1B, de FerroPortiN (FPN) et des familles de compléments croisés sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ /transporteur de fer vacuolaire1 (Ccc1/VIT1) (Figure II.9), ils diminuent la concentration en métal dans le cytoplasme par un mécanisme actif d'efflux d'ions métalliques dans l'environnement extracellulaire, Cela se produit lorsque la concentration en métal dépasse les besoins cellulaires, ou si le complexe métal-peptide commence à affecter le métabolisme cellulaire (Tripathi et al., 2019). Très peu d'études ont décrit le rôle des transporteurs membranaires dans l'accumulation de MLs chez les microalgues. Ainsi, les recherches futures sur ce sujet sont cruciales pour une meilleure compréhension des voies d'accumulation des métaux dans les cellules des microalgues.

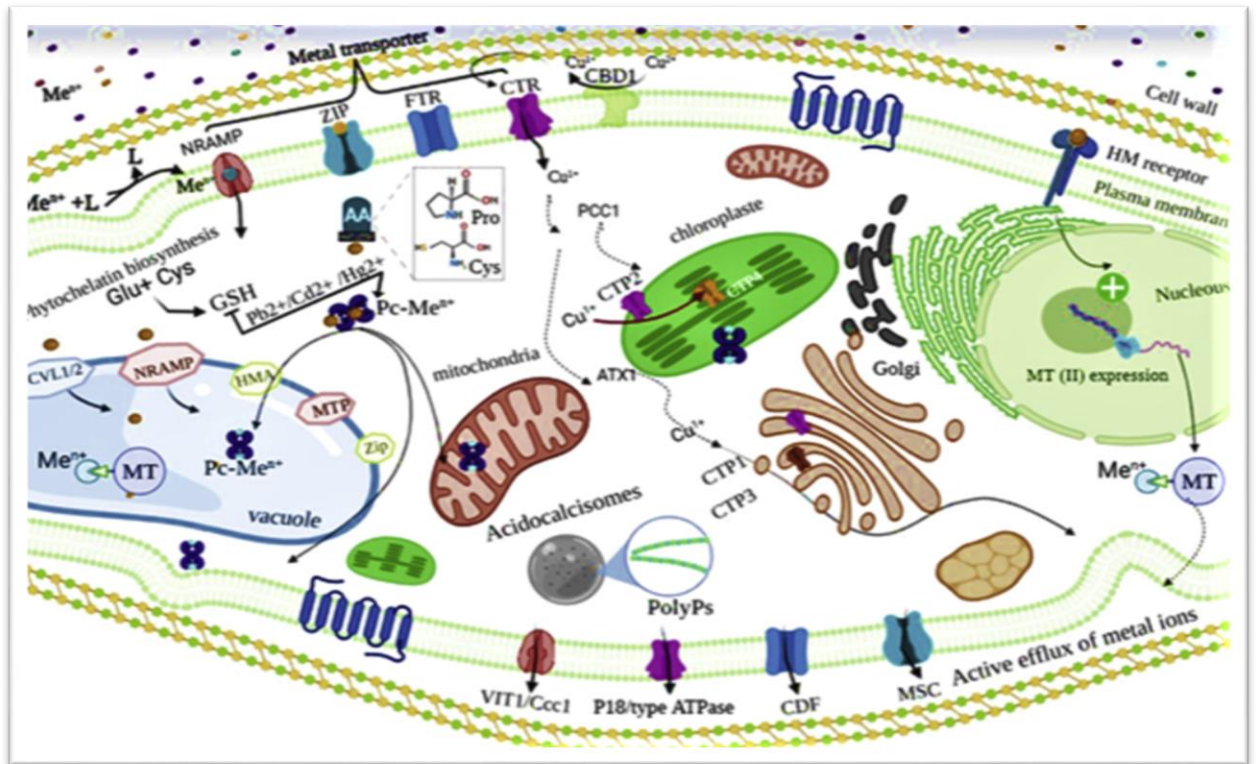


Figure II. 9: Schéma général de détoxification intracellulaire des MLs dans les cellules de microalgues adapté par (Blaby-Haas & Merchant, 2012; Torres et al., 2008).

### II.5.6. Voies de détoxification des ML intracellulaires

Diverses stratégies sont utilisées par les microalgues pour maintenir les concentrations des ions intracellulaires au niveau optimal et protéger la cellule contre les métaux non essentiels (Torres et al., 2008). Ces stratégies comprennent la modification de la perméabilité de la membrane plasmique et de la fonction de la paroi cellulaire, l'activation de la phytochélatine synthase (PCS), la formation de complexes MLs-métallothionéines, MLs-polyphosphates, la compartimentation en organites, ainsi que l'activation de métal systèmes d'efflux (García-García et al., 2016; Mantzorou et al., 2018).

#### II.5.6.1. Chélation par les métallothionéines.

Les microtubules (MT) sont des petits peptides qui peuvent être divisés en deux groupes, les protéines codées par des gènes (MTs de classe I et II) et les polypeptides synthétisés par voie enzymatique (MTs de classe III) communément appelés phytochélatines (PC) (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Les MTs de classe II sont une famille super riche en cystéine située dans le cytosol, caractérisée par un faible poids moléculaire (6 à 7 kDa). Ces protéines de liaison aux métaux sont principalement impliquées dans le contrôle des concentrations intracellulaires de

métaux à des niveaux réguliers (**Gaur & Rai, 2001**). Les MTs de classe II sont peu étudiées chez les microalgues par rapport aux autres organismes. Les MTs les plus connues des microalgues sont des genres *Chlorella*, *Aureococcus*, *Symbiodinium*, *Nannochloropsis*, *Thalassiosira* et *Ostreococcus* (**Balzano et al., 2020**). Étant donné que les microalgues peuvent survivre dans des habitats contaminés par les MLs, elles ont le potentiel pour de nouvelles formes de MTs. Par conséquent, les recherches futures devraient se concentrer sur la découverte de ces nouveaux MTs à l'aide d'expériences *in silico* et des recherches expérimentales.

### II.5.6.2. Chélation par les phytochélatines.

En réponse à l'exposition aux métaux, les microalgues, comme d'autres organismes, synthétisent par voie enzymatique des PC plutôt que des MTs codées génétiquement. Les PC sont également des peptides contenant des thiols constitués de trois acides aminés : le glutamate (Glu), la cystéine (Cys) et la glycine (Gly), avec une structure générale  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , le groupe sulfhydryle dans la molécule de cystéine est responsable de la reliure métallique. Leur voie de biosynthèse commence par la formation de  $\gamma\text{-Glu-Cys}$  par la  $\gamma\text{-glutamylcystéine}$  synthétase ( $\gamma\text{-GCS}$ ). Ensuite, la glutathion synthétase (GS) catalyse la production de glutathion (GSH). Ensuite, le transfert de  $\gamma\text{-Glu-Cys}$  du GSH vers une autre molécule de GSH est suivi de la formation de  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{-Gly}$  (**Hirata et al., 2005**). En effet, il a été rapporté que le GSH est le ligand clé lorsque les concentrations de métaux intracellulaires sont faibles, tandis que la détoxification des métaux est assurée par les PC lorsque les concentrations de métaux sont élevées (**Gaur & Rai, 2001**). La synthèse de MTs de classe III dans des souches de microalgues a été documentée dans plusieurs études, elle a été identifiée pour la première fois chez *C. fusca* après exposition aux ions  $\text{Cd}^{2+}$  (**Gekeler et al., 1988**). Par la suite, de nombreuses recherches ont visé à clarifier la biosynthèse des PCs sous exposition aux MLs telles que **Gómez-jacinto et al. (2015)** qui ont identifié des Hg-PC chez *C. sorokiniana* sous exposition au  $\text{Hg}^{2+}$ . également chez *S. bijugatus* traité au  $\text{Cu}^{2+}$  (**Nagalakshmi & Prasad, 2001**) et *Stichococcus bacillaris* traité au  $\text{Pb}^{2+}$  (**Pawlik-Skowrońska, 2002**). De plus, il a été rapporté que le  $\text{Cd}^{2+}$  était le stimulateur le plus efficace de la PCs synthase des espèces de *Chlamydomonas*, tandis que d'autres métaux ont montré une efficacité moindre à divers degrés (**Abboud & Wilkinson, 2013; Kobayashi et al., 2006; Li et al., 2021; Suárez et al., 2010**). Néanmoins, la synthèse de PC a été plus fortement induite par le  $\text{Zn}^{2+}$  chez les espèces de *Dunaliella* (**Hirata et al., 2001; Tsuji et al., 2003**). Récemment, **Wang et al. (2017)** ont rapporté que le GSH était le principal composé sulfhydryle non protéique chez *D. salina*. Son exposition à l' $\text{As}^{3+}$  et à l' $\text{As}^{5+}$  a induit la synthèse de PC indiquant ainsi leur implication dans la détoxification de l'As. Les MLs liés aux PC, ils peuvent

être stockés dans des organites de cellules de microalgues sous forme de complexes organométalliques.

### **II.5.6.3. Chélation par les polyphosphates.**

Dans la nature, les polymères d'orthophosphate (polype) abondent dans les organismes eucaryotes et procaryotes. De nombreuses recherches sur les algues rapportent que l'accumulation de corps de polypes dans des ocalcismes acides fondés principalement dans des granules de vacuoles spécifiques dans le trans-Golgi qui présentent diverses variantes selon leur disposition, leur composition et leur consistance (Goodenough et al., 2019; Tsednee et al., 2019). Cependant, le polype peut également être localisé dans d'autres compartiments cellulaires, notamment la paroi cellulaire, le cytoplasme, les mitochondries, le réticulum et le noyau endoplasmiques (Sanz-Luque et al., 2020; Werner et al., 2007). Par exemple, le métabolisme du polype chez *C. reinhardtii* peut être régulé via une réaction enzymatique de l'exopolyphosphatase, ou via des mécanismes de compartimentation, principalement par les transporteurs membranaires acidocalcismes (Ruiz et al., 2001). La séquestration et la détoxification des MLs font partie des diverses fonctions et réponses cellulaires où les polypes sont impliqués, notamment le cycle du phosphore (P) dans les océans, le réservoir de P, l'acclimatation à la privation de nutriments ainsi qu'en réponse aux conditions de stress osmotique et thermique (Sanz-Luque et al., 2020). Il a été rapporté que la formation de polypes facilite l'accumulation et le stockage des MLs (Wang & Dei, 2006). En fait, la fonction cruciale des acidocalcismes et des polypes dans le maintien de l'homéostasie cellulaire des ions essentiels souligne l'hypothèse que ce rôle pourrait être étendu à la régulation des niveaux de MLs toxiques dans la bioaccumulation du compartiment intracellulaire via la chélation et la compartimentation (García-García et al., 2016).

### **II.5.7. Compartimentation des MLs dans la vacuole,**

Les chloroplastes et les mitochondries comme mentionné précédemment, la séquestration du complexe MTs-MLs en particulier les organites cellulaires, et surtout les vacuoles, les chloroplastes et les mitochondries ont incité les chercheurs à développer des hypothèses sur les voies de bioaccumulation des métaux et les mécanismes de tolérance associés. Diverses techniques biophysiques peuvent être utilisées pour étudier la localisation intracellulaire et l'analyse des MLs ou de leurs complexes (Polyp-ML, MT-ML PCs-ML), principalement en utilisant le microscope électronique à transmission (MET) avec des techniques et des accessoires

supplémentaires, tels que la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS), la spectroscopie de perte d'énergie électronique (EELS), l'imagerie par spectroscopie électronique (ESI) et la microscopie à force atomique (AFM) (Tripathi et al., 2019). Chez les espèces végétales, la compartimentation vacuolaire a été signalée comme un élément indispensable de la détoxification des MLs (Sharma et al., 2016). En revanche, la séquestration des métaux a été identifiée dans différents organites cellulaires. Par exemple, Shanab et al. (2012) ont trouvé au moyen d'une analyse MET, des corps sphériques sombres denses aux électrons accumulés dans les vacuoles de *Pseudochlorococcum typicum* exposés aux ions  $Pb^{2+}$ . Volland et al. (2012) ont également localisé l'accumulation de  $Cr^{4+}$  en utilisant la MET couplée à l'EELS et à l'ESI à l'intérieur des cellules de *Micrasterias denticulata* en tant que composé chrome-fer-oxygène et une vacuolisation accrue. En revanche, Hanikenne et al. (2009), ont décrit que le principal lieu de stockage des complexes PCs- $Cd^{2+}$  chez *C. reinhardtii* se trouvait dans le chloroplaste. De même, Mendoza-Cózatl & Moreno-Sánchez (2005) ont découvert que plus de 60 % du  $Cd^{2+}$  accumulé réside à l'intérieur du chloroplaste d'*Euglena gracilis*. De même, Soldo et al. (2005) ont rapporté que le  $Cu^{2+}$  intracellulaire était détecté dans les thylakoïdes et le pyrénéoïde des cellules d'*O. nephrocytioides*. De plus, Mendoza-Cózatl et al. (2005) ont démontré l'accumulation de complexes  $Cd^{2+}$  et  $Cd^{2+}$ - $Mt^{+3}$  dans les chloroplastes et les mitochondries d'*E. gracilis*.

## II.6. AVANTAGES DU TRAITEMENT DES EAUX USEES A BASE DE MICROALGUES

### II.6.1. Rentabilité

Le coût du maintien de la croissance des microalgues dans les eaux usées est inférieur à celui des traitements conventionnels. Les charges organiques ont trouvé que les eaux usées de la brasserie sont adaptées à la croissance des microalgues, ce qui en fait un moyen extrêmement attrayant pour un traitement durable et à faible coût des eaux usées (de-Bashan & Bashan, 2010; Hoffmann, 1998) Plusieurs espèces de microalgues sont capables de capter les nutriments des eaux usées. Le coût en capital de ce procédé est moins cher par rapport aux procédés conventionnels de traitement des eaux usées (Oswald, 2003).

### II.6.2. Besoins de faible énergie

Les microalgues libèrent de l'oxygène en tant que sous-produit pendant le traitement des eaux usées, ce qui est utilisé par les bactéries aérobies pour dégrader d'avantage les charges

organiques restantes. Cela réduit le coût énergétique par rapport au coût de l'énergie mécanique pour l'aération lors du traitement conventionnel des eaux usées. Environ 1 k.Watt.h d'énergie électrique est nécessaire pour éliminer 1 kg de DBO dans le processus de boues activées. Au cours de ce processus, 1kg de CO<sub>2</sub> fossile est produit par la production d'électricité. Les microalgues ne nécessitent aucun apport d'énergie pour éliminer 1 kg de DBO des eaux usées de la brasserie et produire 1 kWatt.h d'énergie électrique grâce à la production de méthane par la biomasse algale (**Wang et al., 2016**).

### **II.6.3. Réduction de la formation de boues**

L'objectif principal de chaque station d'épuration est de réduire ou d'éliminer les boues. Le traitement conventionnel des eaux usées se caractérise par l'utilisation de grandes quantités de produits chimiques. Une utilisation importante de produits chimiques peut entraîner la formation de boues. Cela produit des déchets solides dangereux qui doivent être éliminés dans l'environnement. Le traitement des eaux usées par des microalgues ne nécessite aucun additif chimique et les boues s'accumulent sous forme de biomasse algale (**Oswald, 2003**).

### **II.6.4. Emissions de gaz à effet de serre**

Le réchauffement climatique est une grande préoccupation dans le monde entier. Selon **Wang et al. (2008)**, l'atténuation du CO<sub>2</sub> a été stratégiquement abordée de deux manières; chimiquement et biologiquement. Les approches chimiques impliquent la séparation, le transport et la séquestration. Ces approches sont énergivores et coûteuses, il est donc nécessaire de trouver des moyens alternatifs rentables et durables pour limiter la menace.

Les microalgues sont l'une des approches biotechnologiques émergentes pour atténuer le CO<sub>2</sub> et environ 2 000 000 d'espèces sont utiles pour la séquestration du CO<sub>2</sub> (**Keffer & Kleinheinz, 2002**). La fixation du CO<sub>2</sub> par la culture d'algues photo-autotrophes a la capacité de diminuer le CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère. Les microalgues fixent environ 183 tonnes de dioxyde de carbone pour produire 100 tonnes de biomasse (**Chisti, 2007**). Elles se développent plus rapidement que les autres plantes terrestres en raison de leur capacité à capter l'énergie solaire plus efficacement (**Mohd Udaiyappan et al., 2017**).

**Li et al. (2008)** ont révélé que les microalgues ont des taux de croissance et des capacités de fixation du CO<sub>2</sub> beaucoup plus élevés que les plantes forestières, agricoles et aquatiques conventionnelles. De plus, les microalgues nécessitent du dioxyde de carbone pour leur croissance et toute source de CO<sub>2</sub> peut être utilisée pour cultiver des algues. Cependant,

l'utilisation de CO<sub>2</sub> pur peut être très coûteuse et l'utilisation d'air ne nécessite pas de transport, mais la quantité de CO<sub>2</sub> (~0,04% en poids sec) contenue dans l'air peut ne pas être suffisante pour la croissance des microalgues. Une quantité suffisante de CO<sub>2</sub> doit être fournie pour permettre une croissance optimale des algues (**Ewing & Msangi, 2009; Lam et al., 2012; Van Iersel, 2009**).

Les émissions de carbone sont profondément attachées dans l'économie mondiale. Les secteurs certainement les plus intensifs en carbone sont l'énergie et les transports. Un rapport de 2019 publié par le National Energy Technology Laboratory (NETL, USA) recommandait un objectif de coût de captage du carbone maximum de 40 \$/tonne de CO<sub>2</sub> ; cependant, même les méthodes de captage du CO<sub>2</sub> les mieux établies dépassent de loin cette marge de coût (**Zheng et al., 2020**). Une autre analyse récemment publiée des efforts mondiaux pour atteindre l'ambitieux objectif de l'Accord de Paris de 2°C a révélé que, bien que techniquement et économiquement réalisable, les coûts pour atteindre cet objectif nécessitent une collaboration mondiale inébranlable (**Wei et al., 2021**).

**Wei et al. (2021)** ont proposé une disposition globale pour la capture et l'utilisation rentables du carbone (CCUS), en considérant un prix moyen mondial du CO<sub>2</sub> d'environ 62,65 \$/tonne de CO<sub>2</sub>. La stratégie qu'ils définissent nécessite près de 8,20 billions de dollars d'investissements financiers, ce qui, même compensé par les avantages traditionnels de la capture du carbone (récupération assistée du pétrole), entraîne un coût total de 5,76 billions de dollars jusqu'en 2050. Ce coût extraordinaire peut techniquement être couvert par des efforts de collaboration intergouvernementaux. Le succès commercial est beaucoup plus réalisable si ces coûts peuvent être réduits en adoptant de nouvelles techniques économiques à l'échelle industrielle (**Daneshvar et al., 2022**).

En comparaison, le traitement des eaux usées à base de microalgues réduit les tonnes de CO<sub>2</sub> par rapport aux méthodes de traitement conventionnelles. Par exemple, les étangs de canalisation ou les systèmes d'étangs d'algues à haut débit (HRAP) réduisent de 100 à 200 tonnes de CO<sub>2</sub> par ml d'eaux usées traitées en utilisant les bactéries, la lumière du soleil et la photosynthèse par rapport au traitement électromécanique dans un étang d'oxydation conventionnel. De plus, l'assimilation de l'azote par les algues pourrait réduire des tonnes supplémentaires de CO<sub>2</sub> (100–200) par ml (**Shilton, 2015**). Par conséquent, le traitement des eaux usées à base de microalgues ou lorsqu'il est intégré à d'autres usines de traitement des eaux usées peut atténuer biologiquement les niveaux de CO<sub>2</sub>. Cette méthode est plus économique et écologique (**Collotta et al., 2018; Kuo et al., 2016**).

### II.6.5. Engrais et bio-engrais

La fertilité des sols est modifiée par l'utilisation excessive d'engrais inorganiques en augmentant et en diminuant le pH du sol, respectivement. De plus, les engrais inorganiques contiennent des substances telles que les nitrates et les phosphates qui sont ensuite rejetées dans les plans d'eau par les pluies et les eaux usées qui peuvent conduire à l'eutrophisation. Les microalgues jouent un rôle utile dans l'agro-industrie. Les engrais végétaux ont été obtenus par la transformation de la biomasse algale récoltée dans les eaux usées. La composition minérale et l'aptitude de rétention d'eau des sols agricoles a été améliorée par ces engrais (**Bhardwaj et al., 2014**). Selon **Hasyim et al. (2011)** l'irrigation utilisant les eaux usées brutes de la brasserie comme source d'engrais entraîne une faible croissance des plantes, ce qui se traduit par un faible rendement et un mauvais état du sol. Les microalgues peuvent également fixer l'azote dans le sol, *Nostoc sp.*, *Scytonema sp.*, *Aulosira sp.*, *Topolythrix sp.* et *Plectonema sp.* sont généralement utilisées comme engrais biologiques (**Das et al., 2011**).

### II.6.6. Alimentation animale

À cause des besoins nutritionnels et de la digestibilité facile des microalgues, ces dernières ont servi comme aliment des êtres vivants dans l'industrie aquatique. La composition des matières sèches des microalgues contient de 39 à 71% de protéines, de 10 à 57% de glucides, particulièrement des polysaccharides, de la cellulose et des amidons (**Yan et al., 2013**). La biomasse microalgale récupérée peut également être utilisée directement ou indirectement comme nourriture des larves d'huîtres, des crevettes et de bivalves, et des poissons par l'enrichissement des zooplanctons. **Phang et al. (2000)**, ont révélé que la composition de la biomasse de spiruline cultivée dans un HRAP pour le traitement des eaux usées de sagou peut être utilisée comme alimentation animale de haute qualité. La biomasse de microalgues est viable en remplacement partiel dans les aliments pour volaille des protéines et des caroténoïdes conventionnels pour rehausser la couleur jaune de la peau du poulet de chair et du jaune d'œuf (**Becker, 2013**). Plusieurs études ont suggéré l'incorporation de la biomasse de microalgues traitées à base d'eaux usées dans l'alimentation animale. Cependant, il a reçu peu d'attention en raison de la perception du public et des réglementations alimentaires de qualité sur les aliments pour animaux.

### II.6.7. Production de biocarburants

Un biocarburant est un produit (biohydrogène, biodiesel, bioéthanol, biométhanol) obtenu à partir de la biomasse qui donne de la chaleur de combustion très élevée (Nigam & Singh, 2011; Razzak et al., 2013). Il y a une demande croissante d'énergie dans le monde. Environ 80% de l'énergie consommée provient de sources fossiles (Surriya et al., 2014). Cependant, l'extraction et l'utilisation de combustibles fossiles augmentent les émissions de gaz à effet de serre dans l'atmosphère (Cea-Barcia et al., 2014) ce qui conduit au réchauffement climatique. A l'heure actuelle, les recherches sont orientées vers les origines d'énergie alternatives en raison des désavantages liés aux combustibles fossiles. Les biocarburants ont acquis une attention considérable et ont été considérés comme une source prometteuse d'énergie alternative. Les espèces microalgales seraient la source la plus encourageante pour la production du biocarburant. En effet, elles ont un rendement de multiplication plus haut et une grande efficacité photosynthétique (Mahdy et al., 2015). Les biocarburants de première génération ont soulevé des préoccupations liées à la pénurie de terres arables, ce qui peut à son tour entraîner une pénurie de nourriture dans le monde. Les plantes oléagineuses telles que le palmier, le soja et le colza présentent un intérêt ces derniers temps, mais une grande superficie de terres arables est utilisée pour leur culture (Caporgno et al., 2016). Les biocarburants de deuxième génération utilisent le *Jatropha curcas*, mais son faible taux de croissance couplé à la forte utilisation des terres arables le rend non rentable. Cependant, le biocarburant issu des microalgues produirait 10 à 100 fois plus de carburant par unité de surface que les autres sources de biocarburant (cultures conventionnelles) telles que le soja et le palmier à huile (Greenwell et al., 2010). De plus, les microalgues ne présentent aucun problème lié aux terres arables (Keffer & Kleinheinz, 2002), car les microalgues peuvent être cultivées dans la brasserie et d'autres eaux usées industrielles.

### CONCLUSION

Les microalgues suscitent de plus en plus d'intérêts. Pour de nouvelles applications, notamment énergétiques et environnementales, une grande quantité de biomasse et donc une forte productivité sont nécessaires. Mais le système doit être viable au niveau économique, énergétique et environnemental. Les systèmes de production actuels sont soit chers soit avec une faible productivité. De plus, ils sont souvent conçus pour une seule application et se focalisent donc sur le produit (molécule à haute valeur ajoutée, dépollution, énergétique...). Pour être viable, les systèmes de culture de microalgues doivent être performants dans la culture mais aussi économiquement.

# **CHAPITRE III :**

## **MATERIEL ET METHODES**

---

## INTRODUCTION

Dans ce chapitre nous traitons les différentes méthodes expérimentales mises en œuvre dans notre étude. Nous abordons la description de la conception du dispositif pilote dans lequel ont été réalisées nos expériences de culture des microalgues utilisées pour la bioremédiation des eaux usées industrielles synthétiques. Un contrôle régulier a été réalisé et suivi dans le temps de tous les paramètres nécessaires à la croissance en biomasse. Au cours de cette étude expérimentale, les eaux usées utilisées comme milieu de culture de nos microalgues ont été caractérisées du point de vue physicochimique et bactériologique. Un suivi de l'évolution de l'abatement des teneurs en métaux lourds et pétrole brut a été réalisé durant et à la fin de l'expérience.

### III.1. DESCRIPTION DE LA ZONE D'ETUDE

La baie de Skikda est située dans la partie nord-est de l'Algérie, à environ 470 km à l'est de la capitale Alger. La zone d'étude est en contact avec un énorme complexe industriel pétrochimique, où le pétrole brut, les métaux lourds et les produits d'hydrocarbures raffinés contaminent les écosystèmes via la pollution atmosphérique ainsi que des effluents liquides qui sont déversés dans les écosystèmes aquatiques.

Pour toute analyse de l'eau de la zone estuaire, des échantillons d'eau de mer ont été collectés sur 3 stations situées à proximité de la raffinerie de pétrole de Skikda.

Les différentes stations de prélèvement (**Figure III.1**) ont été choisies selon l'importance de leurs rejets et déversements (industriels, sanitaires et autres) en mer. Les coordonnées géographiques de ces sites sont présentées dans le tableau (**Tableau III.1**).

La première station (St1) est située après le point de rejet de la raffinerie dans la zone estuaire, la deuxième station (St2) se situe sur la plage « Larbi Ben M'hidi Ex-Jeanne d'Arc ». Enfin, la troisième station (St3) se situe sur la plage militaire N°1.

**Tableau III. 1: Localisation des sites d'échantillonnage**

Sites	Latitude N	Longitude E
St1	36°52'50.6	6°55'50.6
St2	36°53'39.5	7°00'36.7
St3	36°53'32.2	6°53'13.1



Figure III. 1: Localisation des sites d'échantillonnage à Skikda (GOOGLE MAPS)

1. Le site St1 après le point de rejet de la raffinerie dans la zone estuaire

Est situé au Nord-Centre de Skikda en face de l'hôtel Saf-saf.



Figure III. 2: Site St1 après le point de rejet de la raffinerie dans la zone estuaire a : Image satellitaire (Google MAPS) b : Image *in situ* (Photo personnelle)

## 2. Le site St2 : Plage " Larbi Ben M'hidi Ex-Jeanne d'Arc "

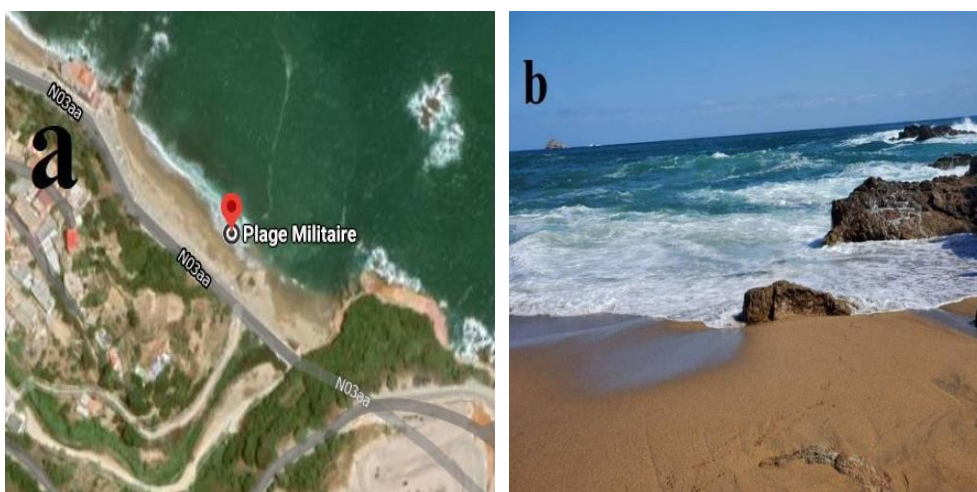
Cette plage fait plus de 7 kilomètres de long dont la moitié se situe au Nord-Ouest de Skikda dans la commune de Filfila. Elle est longée et délimitée au sud par la route CW21. Elle se trouve à 17 kilomètres du centre ville de Skikda.



**Figure III. 3: Site St2 la plage « Ben Mhidi ». a : Image satellitaire (Google MAPS) b : Image *in situ* (Photo personnelle)**

## 3. Le site St3 : La plage militaire 1

La plage militaire N°1 est située à l'Ouest de la commune de Skikda, juste au niveau du pont où les eaux de « Oued Greva » y passent pour se déverser en hiver dans la plage. Délimitée des deux côtés par des rochers et par l'ancien pont appelé « pont romain ». Cette plage est très fréquentée en hiver aussi par les chercheurs de quiétude.



**Figure III. 4: Site St3 la plage militaire.1. a : Image satellitaire (Google MAPS), b : Image *in situ* (Photo personnelle)**

### III.2. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

Des échantillons d'eau de mer ont été prélevés à 0,30 m au-dessous de la surface de l'eau et stockés dans des flacons en verre de 1 litre stérilisés. Trois échantillons d'eau ont été prélevés à partir de chaque site. Ces derniers sont par la suite homogénéisés pour avoir un échantillon moyen pour chaque site.

L'échantillonnage des microalgues a été réalisé à l'aide d'un filet à phytoplancton de 20  $\mu\text{m}$  de vide de maille (**Francoeur et al., 2013**). L'opération consiste à filtrer 10 litres d'eau (à 30 cm en dessous de la surface de l'eau) (**Figure III.5**). Le filtrat collecté a été par la suite versé dans deux bouteilles en verre ombrées de 125 ml : le premier contenant 5 ml de Lugol dilué à 10% pour l'observation microscopique, et la deuxième sans conservation pour la mise en culture. Les échantillons ont été conservés dans des flacons hermétiquement fermés et transportés dans une glacière à 4°C et à l'obscurité afin de stopper toute activité biologique jusqu'à l'arrivée au laboratoire le jour même.



**Figure III. 5: Echantillonnage des microalgues à l'aide d'un filet et remplissage des bouteilles en verre stériles (photos personnelles)**

### III.3. PREPARATION DES ECHANTILLONS DE MICROALGUES

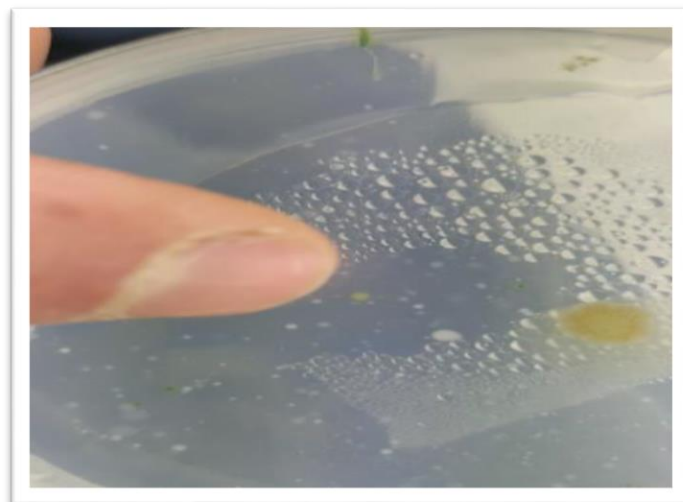
Au laboratoire, les échantillons ont été centrifugés à 2000 tr/min. pendant 5 min pour enlever tous les débris (**Boonchai et al., 2012**). La biomasse concentrée a été diluée dans de l'eau distillée stérile et filtrée sur papier Wattman (puis le filtrat a été lavé plusieurs fois avec une solution de NaCl (0,9 %) afin d'éliminer les bactéries. Maintenant, les échantillons sont prêts à

l'identification des microalgues sélectionnées qui serviront pour culture dans un milieu de culture spécifique Bold Basal Medium (BBM), jusqu'à atteinte d'une biomasse suffisante pour le traitement des eaux usées dans le photobioréacteur de traitement (PBRT).



**Figure III. 6: Préparation des échantillons**

L'identification macroscopique des colonies de microalgues est basée sur les critères de forme, aspect, taille, contour, diamètre et couleur des colonies selon les clés de détermination utilisées pour les microalgues d'eau douce de **Bellinger & Sigeo (2010)**, **Serediak & Huynh (2011)**, **Vuuren et al. (2006)** et **Canter-Lund & Lund (1995)**.



**Figure III. 7: Identification macroscopique des colonies de microalgues**

Une observation à l'état frais des microalgues fixées au Lugol, sous microscope optique, à différents grossissements a été réalisée afin de bien identifier ces souches des microalgues isolées.



**Figure III. 8: Identification des microalgues par observation microscopique.**

### **III.4. CULTURE DES MICROALGUES**

La culture est une étape très importante pour favoriser la croissance des microalgues, c'est le point de départ de notre étude au laboratoire.

#### **III.4.1. Conditions de culture**

La culture doit respecter des conditions physiques et chimiques particulières nécessaires à la reproduction des microalgues qui sont indispensables de les maîtriser telles que : la température, le potentiel d'hydrogène (pH), les nutriments (un apport en macronutriment tels que l'azote, le phosphore, le potassium, le magnésium...etc. et en oligo-éléments comme le fer et le zinc), le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> et la luminosité afin de favoriser la photosynthèse (**Burlew, 1953; Simosa, 2016**), et l'agitation pour éviter la décantation de la biomasse algale libre dans le PBRT et le PBRC.

#### ***III.4.1.1. La température***

Ce paramètre a été mesuré par un thermomètre de paillasse. La valeur optimale de la température, pour avoir une bonne croissance des microalgues, doit être maintenue entre 20 et 25°C. La température est l'un des facteurs physiques influençant le plus la croissance des microalgues. Si les microalgues ne se multiplient pas à la température optimale, la nécessité d'un apport suffisant en carbone et en nutriment est très important pour obtenir le même taux de prolifération. C'est ainsi que les microalgues d'eau douces connaissent une très bonne croissance dans un intervalle de température allant de 20 à 25°C (**Richmond, 2004**). La température d'incubation de nos microalgues a été fixée à 25±0,5°C.

#### ***III.4.1.2. Le pH***

Ce paramètre nous a servi pour contrôler la concentration du CO<sub>2</sub> dans le milieu, tout en respectant l'intervalle de pH optimal pour la culture des microalgues situées entre 6,5 et 8,5. Ce pH peut devenir ainsi un facteur limitant. Il est donc possible d'augmenter la densité des cultures en jouant sur ce paramètre. La méthode la plus simple à mettre en œuvre est l'ajout de dioxyde de carbone (gazeux CO<sub>2</sub>) dans l'air qui sert à mélanger les cultures. Une proportion de 0,5 à 1 % peut être conseillée. Il est aussi possible d'utiliser de l'acide chlorhydrique (HCl) dans les cultures continues. Une bonne multiplication des microalgues se fait naturellement dans un intervalle optimal de pH de 6,5 à 8,5 (**Becker, 1994**).

#### ***III.4.1.3. La lumière***

Dans cette étude nous avons utilisé une chambre de culture allumée par des ampoules électriques de type LED (pour favoriser le processus de photosynthèse exercé par les microalgues) à une intensité de 4000 Lux par alternative 16 heures de lumière / 8 heures d'obscurité (nuit).

#### ***III.4.1.4. L'agitation***

Les flacons de culture sont mis dans un agitateur orbital à 150 Tr/min, pour assurer une bonne homogénéisation du milieu de culture durant la période d'incubation.

#### **III.4.1.5. Le carbone : source d'énergie**

Les microalgues ont besoin de carbone inorganique pour la photosynthèse, il peut être apporté sous forme de sels (bicarbonate) ou par enrichissement de l'air insufflé (car l'air ambiant ne contient pas assez de CO<sub>2</sub> pour la culture intensive des microalgues).

#### **III.4.1.6. Les sels nutritifs**

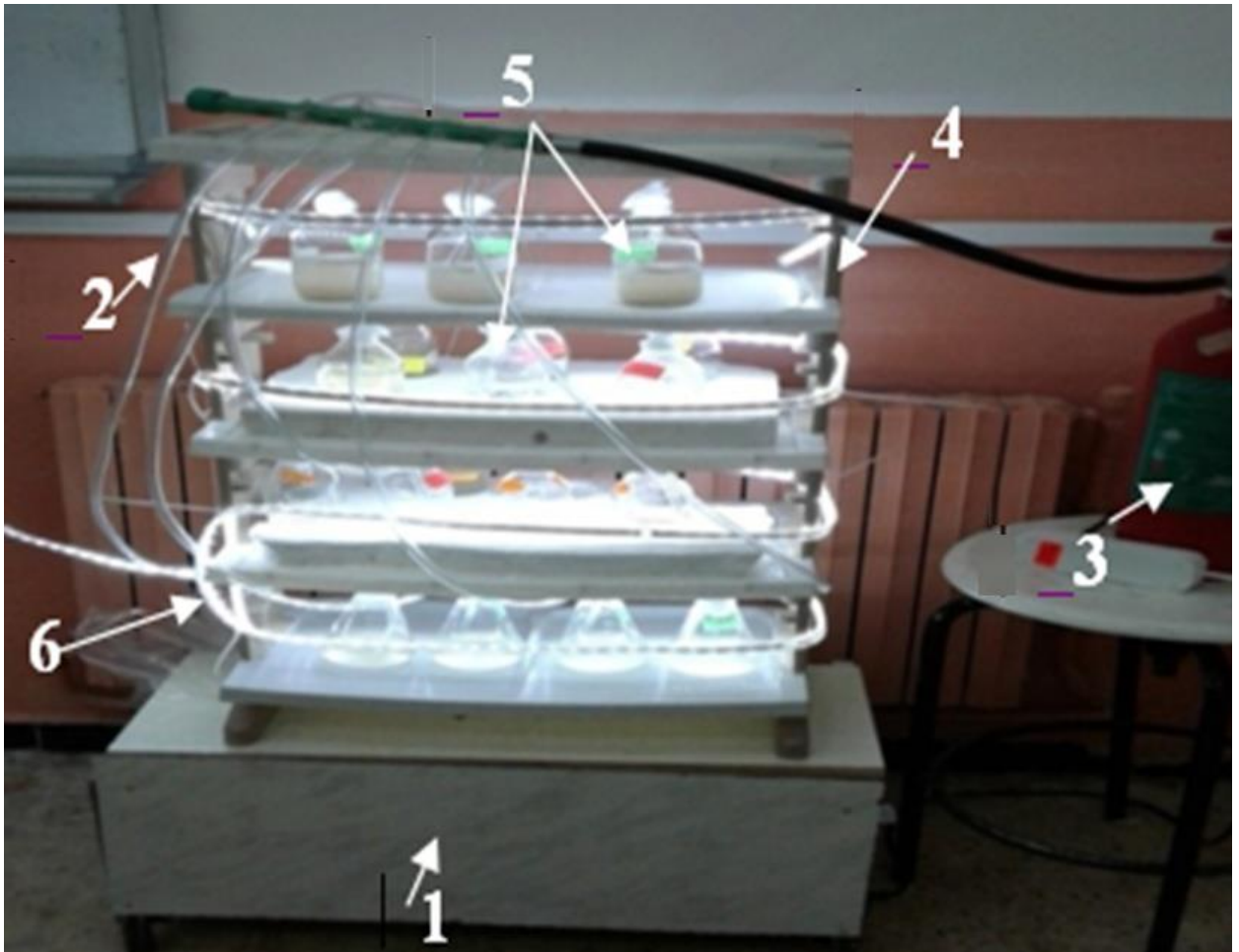
Provenant des milieux de culture Bold Basal Medium (BBM) et du Blue Green Medium (BG11) utilisées pour les microalgues vertes (Chlorophycées) et les microalgues bleues-vertes (cyanobactéries). (WCM) a été utilisé pour la culture des microalgues brunes (diatomées).

### **III.4.2. Conception du photobioréacteur de culture des microalgues**

Pour maîtriser la production des microalgues, il est nécessaire d'utiliser un système de culture fermé appelé photobioréacteur, et il offre des avantages de productivité, y compris une efficacité de production élevée et une minimisation de la contamination biologique (**Chisti, 2007; Huntley & Redalje, 2007; Moheimani & McHenry, 2013; Vasudevan & Briggs, 2008**). Cependant, la complexité de leur technique se traduit généralement par des capitaux et des coûts d'opérations relativement élevés (**Borowitzka, 1999; Cuzzocrea et al., 1998; Vasudevan & Briggs, 2008**).

Les objectifs de production utilisant des photobioréacteurs sont généralement capables de maximiser la productivité de la biomasse et minimiser les coûts de production (**Cuzzocrea et al., 1998; Kunjapur & Eldridge, 2010; Moheimani & McHenry, 2013; Ugwu et al., 2008**). Comme la productivité de la biomasse doit rester élevée pour compenser les coûts de production élevés, le transfert de masse de la culture doit être efficace, et les limitations de transfert de masse sont un problème courant dans les systèmes de photobioréacteurs fermés (**Borowitzka, 1999; Cuzzocrea et al., 1998; Hankamer et al., 2007; Ugwu et al., 2008**).

Un système de photobioréacteur de culture (PBRC) a été monté au laboratoire afin de réaliser une culture continue des microalgues prélevées (**Figure II.9**), constitué de plusieurs bassins d'alimentation en microalgues soumis à une agitation continue, reliés par des tuyaux de distribution de CO<sub>2</sub> et tout le système est éclairé par une source de lumière.



**Figure III. 9: Montage du photobioréacteur pour la culture des microalgues**

- |   |                            |
|---|----------------------------|
| 1- Agitateur                                | 4- Chambre de culture      |
| 2- Tuyau de distribution de CO <sub>2</sub> | 5- Verreries de culture    |
| 3- Source de CO <sub>2</sub>                | 6- Source de lumière (LED) |

### III.4.3. Préparation de milieu de culture liquide de Bold (1967)

Nous avons préparé un milieu de culture favorable pour avoir une bonne croissance des microalgues vertes qui est le milieu de culture de Bold Basal Medium (BBM).

BBM est un milieu de culture générale d'algues d'eau douce qui a été utilisé pour cultiver une variété des microalgues vertes (*Trichosarcina*, *Chlorococcum*, *Anacystis* et *Chlorella*) sans avoir besoin d'extrait de sol ou de vitamines (Brown et al., 1963; Nichols & Bold, 1965). La nature majoritairement inorganique de ce milieu permet de faciliter l'entretien de la culture axénique (Nichols & Bold, 1965).

La préparation de BBM est réalisée par l'utilisation des éléments nutritifs enregistrés dans le tableau suivant (Tableau III.2). Pour préparer un litre de ce milieu de culture à pH = 7 à

partir des 10 solutions stocks préparées à l'avance, nous mélangeons 10 ml de chacune des solutions 1 à 6, puis nous ajoutons 1 ml de chacune des solutions 7 à 10, et nous complétons jusqu'à un litre avec de l'eau distillée stérile.

Nous avons ajouté 2 g de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Kim et al., 2019) (C'est une source de carbone organique pour les microalgues) et compléter à un litre avec de l'eau distillée. Ces solutions ont été stérilisées à 120 °C pendant 120 min et conservées à 4°C. Le pH a été ajusté à 7 avant autoclavage.

Une fois le milieu de culture de **Bold 1967** est préparé, nous avons procédé à leur caractérisation physicochimique avant la mise en culture des microalgues vertes prélevées à fin de les comparer avec de celles trouvées dans les sites d'échantillonnage.

**Tableau III. 2: Milieu de culture de Bold 1967 : milieu d'usage général pour les microalgues vertes unicellulaires (Bajwa et al., 2017).**

- **Éléments majeurs :**

1- Source de Nitrate	$\text{NaNO}_3$	25 g/L
2- Source de Calcium	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5 g/L
3 et 4 Source de phosphore	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ ou $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7,5 g/L
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17,5 g/L
5- Source de Magnésium	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,5 g/L
6- Chlorure de Sodium	$\text{NaCl}$	2,5 g/L

- **Éléments traces :**

7- Agent de chélation et de neutralisation des ions métalliques, et de contrôle de la viscosité	EDTA + KOH	50 g/L + 31 g/L
8- Facteurs de croissance des microalgues	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,98 g/L eau acidifiée
9- Acide borique	$\text{H}_3\text{BO}_3$	11,42 g/L

- **Solution 10** : dissoudre les sels suivants dans un litre d'eau acidifiée

ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,82 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,44 g
MoO <sub>3</sub> ou Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,71 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57 g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O ou CoCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,49 g

Un (01) litre d'eau acidifiée est préparé en ajoutant 1 ml d'acide sulfurique à 999 ml d'eau distillée.

#### III.4.4. Préparation de milieu de culture pour les diatomées benthiques

La composition chimique du milieu de culture que nous avons utilisé, Freshwater « WC » medium (**Guillard & Lorenzen, 1972**) est bien détaillée dans le (**Tableau III.3**). Ce milieu peut être modifié, en particulier, les concentrations en CaCl<sub>2</sub> et MgSO<sub>4</sub> peuvent être augmentées pour obtenir un milieu avec une conductivité plus élevée favorable à la bonne croissance des diatomées dans des conditions expérimentales optimales.

La concentration des cellules de phytoplancton en milieu de culture est généralement plus haute que celle trouvée dans la nature. Les cultures d'algues doivent donc être enrichies avec des aliments pour compenser les insuffisances dans l'eau de mer, les macronutriments incluent les nitrates, les phosphates et les silicates.

Les silicates sont spécifiquement employés pour la croissance des diatomées qui utilisent ce composé pour la production d'une coquille externe. Les micronutriments se composent de divers oligo-métaux, la vitamine thiamine (B1), la cyanocobalamine (B12) et parfois la biotine (vitamine B8 ou H).

Ce milieu riche en éléments nutritifs indispensables à la culture des diatomées est insuffisant à lui seul pour assurer une bonne croissance de diatomées. Ces dernières ont besoin de matière organique comme source de carbone présentée dans notre cas par un extrait de sol ; et d'une source de CO<sub>2</sub> important pour le processus de photosynthèse.

Tableau III. 3: Milieu de culture WC pour les diatomées

- **Éléments majeurs :**

Élément	Concentration (mg/L)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36,76
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	36,97
NaHCO <sub>3</sub>	12,60
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71
NaNO <sub>3</sub>	85,01
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	28,42

- **Éléments traces :**

Élément	Concentration (mg/L)
Na <sub>2</sub> EDTA	4,36
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,15
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.022
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18
Na <sub>2</sub> .MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,006
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1

- **Vitamines :**

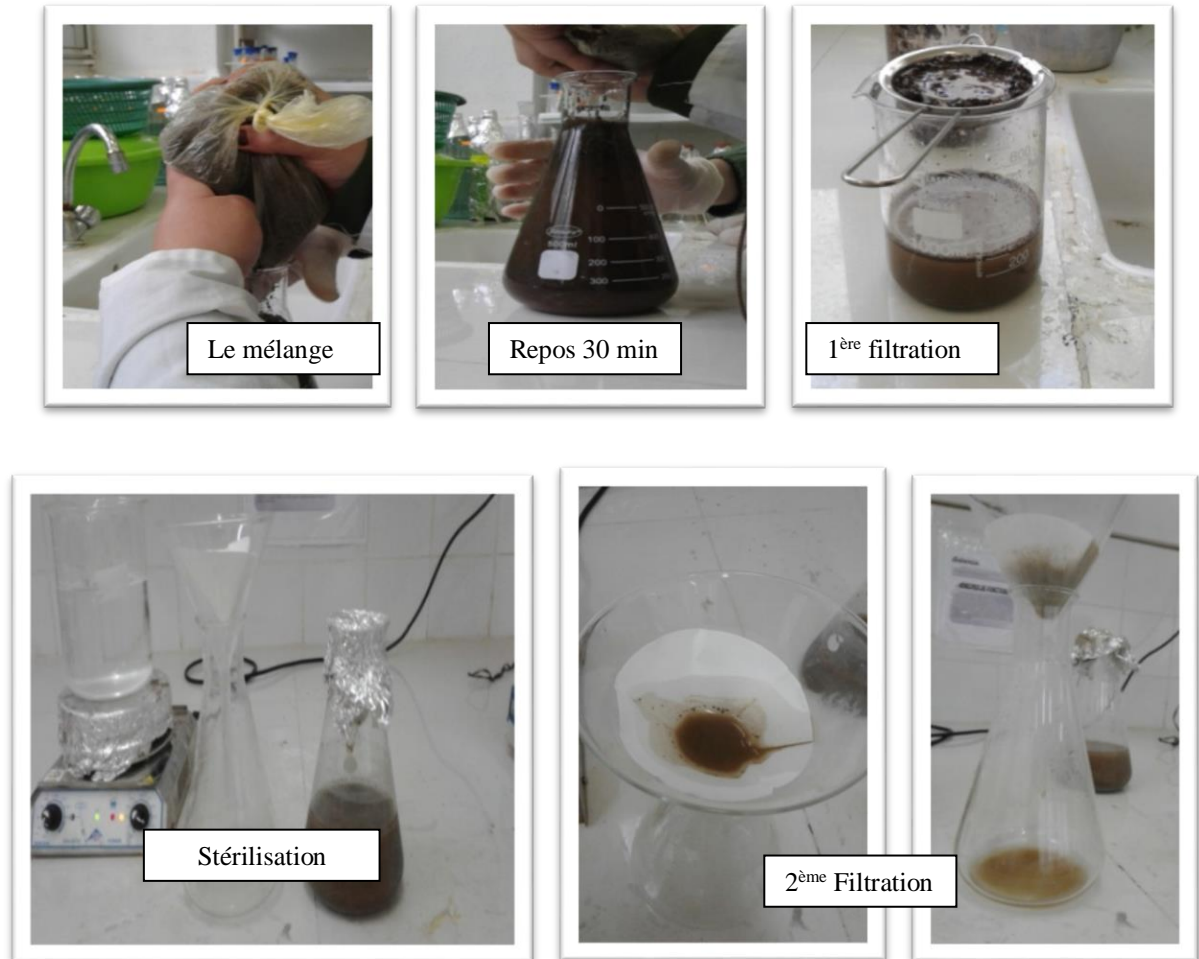
Vitamines	Concentration
Thiamine, HCl B <sub>1</sub>	0,1 mg/L
Biotine B <sub>8</sub>	0,5 ug/L
Cyanocobalamine B <sub>12</sub>	0,5 ug/L

### III.4.5. Préparation de l'extrait de sol

La méthode de préparation de l'extrait de sol peut être décrite comme suit :

- ❖ Nous avons mélangé 0,5 kg d'extrait de sol à partir d'une zone de pâturage qui n'a pas été traitée par les engrais chimiques avec un volume de 0,5 L d'eau distillée,
- ❖ Nous avons laissé le mélange reposer pendant 30 min puis nous l'avons filtré,
- ❖ La solution obtenue est ensuite stérilisée dans un bain marie pendant 60 min,
- ❖ Ensuite la solution a été filtrée une dernière fois sur papier Wattman,

- ❖ une seconde stérilisation de la solution d'extrait de sol a été réalisée au moyen d'un autoclave pendant 20 min,
- ❖ La purification se fait par décantation, centrifugation et filtrations successives, jusqu'à une filtration finale dans des flacons stériles. Les extraits de sols sont conservés dans un congélateur à 3°C au besoin.



**Figure III. 10: Etapes de préparation de l'extrait de sol**

La solution d'extrait de sol a été conservée au réfrigérateur pour être utilisée ultérieurement et mélangée au milieu nutritif WC précédent à raison de 4 ml pour un litre de milieu de culture.

#### **III.4.6. Préparation du milieu de culture solide**

Pour préparer un litre de milieu de culture solide à partir des 10 solutions stocks de BBM préparées à l'avance, mélanger 10 ml de chacune des solutions 1 à 6, en plus de 1 ml de chacune des solutions 7 à 10, ensuite, ajouter 14 g d'Agar agar et compléter à un litre avec de l'eau

distillée. Les manipulations doivent être sous une agitation continue pour éviter toute précipitation d'Agar-agar. Ces solutions ont été stérilisées à 120 °C pendant 120 min et conservées à 4°C. Le pH a été ajusté à 7 avant autoclavage.

### III.5. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES MICROALGUES

L'isolement des différentes espèces microalgales a été réalisé en essayant de simuler les conditions du milieu d'origine. A l'aide d'une micropipette nous avonsensemencé un volume de 0,1ml de chaque échantillon prélevé sur un milieu solide gélosé (BBM + Agar). Ce volume d'eau est ensuite étalé sur toute la surface de la boîte de pétri en utilisant une pipette pasteur stérile.

Toutes ces manipulations sont effectuées dans un poste de sécurité microbiologique (PSM) (**Figure III.11**) au niveau du laboratoire de culture *in vitro* au centre de recherche en biotechnologie de Constantine. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées dans une chambre de culture à une température de 25°C et une photopériode de 8h de lumière/16h d'obscurité à une source de lumière de 4000 lux.



**Figure III. 11: Isolement des microalgues sur le milieu Bold gélosé.**

L'isolement des microalgues est aussi effectué à partir des dilutions de l'eau échantillonnée et cultivée dans le milieu de culture spécifique liquide. La méthode adoptée est celle des dilutions, ou nous avons mis 1ml de l'échantillon dans 9 ml d'eau distillée stérile, qui vaut la dilution  $10^{-1}$ . Une série successive de dilution suit jusqu'à atteindre  $10^{-4}$  (**Figure III.12**).

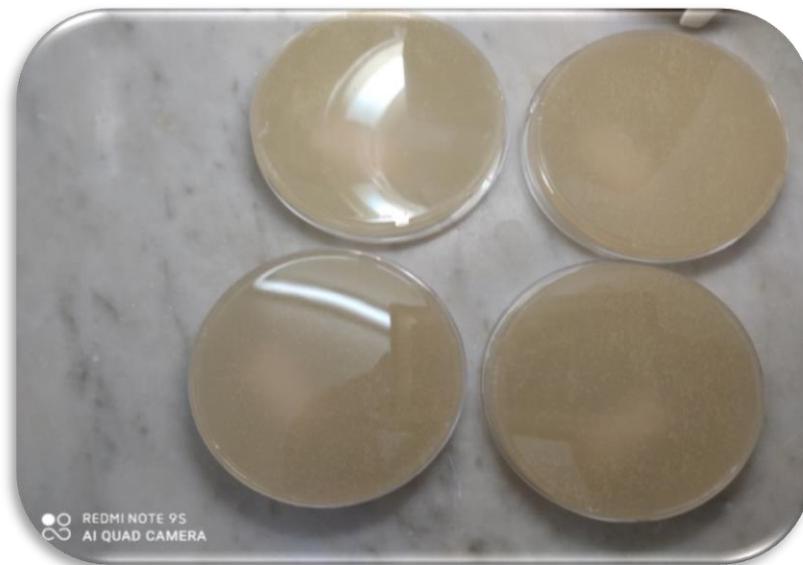
L'ensemencement d'une souche en milieu liquide est réalisé par prélèvement d'un échantillon de microalgue à la pointe d'une pipette pasteur, qui est ensuite plongée dans le milieu liquide qui contient 5 ml de milieu de culture. Toutes ces manipulations s'effectuent au voisinage immédiat d'une flamme de bec Bunsen afin d'éviter les risques de contamination. Les tubes qui

contiennent les souches dans le milieu liquide sont conservés dans l'incubateur avec une température de 25°C et une source de lumière. Après une semaine, nous avons commencé l'observation sous microscope optique en ajoutant 5 ml du milieu liquide à chaque tube.



**Figure III. 12: Repiquage dans un milieu liquide**

La méthode de l'ensemencement d'une souche en milieu solide est celle de l'étalement à l'aide d'une pipette pasteur une goutte à partir de la quatrième dilution et l'ensemencer sur un milieu solide. L'incubation est faite dans un incubateur à 25°C. Quand les microalgues commencent à se développer, chaque colonie est isolée et ensemencée sur une nouvelle boîte de Pétri, pour obtenir des cultures uni-algales (**Figure III.13**).



**Figure III. 13: Repiquage dans un milieu gélosé**

Après une période d'enrichissement, l'isolement des microalgues a été réalisé par la combinaison de deux techniques : dilution en série et stries (Venkatesan et al., 2015). La dilution en série est la méthode la plus courante et la plus établie d'isolement des microalgues (Singh et al., 2015). Un ensemble de tubes à essai stérilisés avec du milieu (BG11, BBM, WCM) a été utilisé pour la dilution. Les ensembles de dilution ont été déterminés sur la base du nombre estimé de cellules dans la culture enrichie. Ce nombre a été évalué à l'aide d'un microscope optique. Après la procédure de dilution, 100  $\mu$ L de chaque dilution ont été striés dans le milieu solide (BG11, BBM, WCM) dans des boîtes de Pétri (Figure II.14). Ensuite, les boîtes ont été incubées pendant une période de 21 à 30 jours à 25°C et sous une illumination continue moyenne de 150  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>.s (El Arroussi et al., 2017). Après la période d'incubation, des colonies morphologiquement distinctes ont été retirées et striées à nouveau pendant une période moyenne de (21  $\pm$  2) jours, afin de garantir la purification d'une seule espèce de microalgues (Schuelter et al., 2019).



Figure III. 14: Repiquages successifs par couplage

### III.6. MAINTIEN DES CULTURES MONOCLONALES

Les cultures monoclonales peuvent être maintenues en chambre de culture, où les conditions de température et d'éclairage sont contrôlées. Les cultures doivent être régulièrement transférées dans un nouveau milieu. Afin d'éviter des contaminations, il est important d'opérer ces repiquages dans une hotte à flux laminaire. Le transfert doit être réalisé avant l'épuisement du milieu. Il est recommandé de pouvoir conserver les cultures mères après leur transfert dans un nouveau flacon afin d'avoir une sécurité dans le cas d'une mauvaise manipulation (contamination, mauvais étiquetage, etc.). Dans cette étude nous avons pu isoler trois souches de microalgues : *Chlorella vulgaris*, *Aphanocapsa zanardinii* (*Anacystis aeruginosa*)

et *Nitzschia sp.* Le genre de la microalgue verte des *Chlorella vulgaris* qui est une espèce de microalgue verte à métabolisme photolithotrophe autotrophe à possibilité de chimio-organotrophie se cultive parfaitement à la lumière. Pour plus de commodité, ces souches d'algues sont cultivées sur un milieu unique, le milieu BG11 (**Tableau III.4**). Pour le genre de la microalgue bleu-verte *Aphanocapsa zanardini* (*Anacystis aeruginosa*) nous pouvons les cultiver et les isoler directement sur le milieu de départ BBM et aussi par l'utilisation du milieu BG11. Nous avons utilisée le milieu de culture WCM pour l'isolement et la purification de *Nitzschia sp.* qui représente le genre des bacillariophycées.

Pour préparer 1 litre de **BG11** à pH = 7 nous avons mélangé 10 ml de chaque solution stock de 1 à 9. Puis nous avons complété à 1 litre avec de l'eau distillée stérile. Le milieu a été ensuite autoclavé et laissé refroidi avant la mise en culture de *Chlorella vulgaris*.

**Tableau III. 4: Composition du milieu de culture BG11 spécifique pour les microalgues vertes unicellulaires**

- **Solution des éléments majeurs :**

1- NaNO <sub>3</sub>	15 g/L
2- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	4 g/L
3- MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5 g/L
4- CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3,6 g/L
5- Acide Citrique C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,6 g /L
6- Ammonium Ferrique Citrate Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>3</sub>	0,6 g /L
7- EDTA (disodique, Mg <sup>2+</sup> )	0,1 g/L
8- Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2 g/L

- **Solution (9) des métaux traces :**

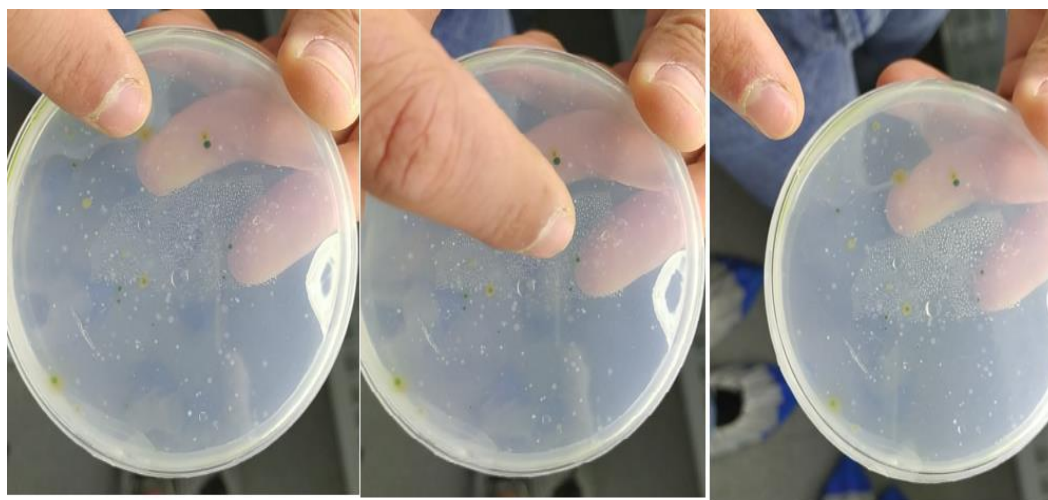
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81 g/L
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39 g/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,05 g/L
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,08 g/L

### III.7. PURIFICATION DES SOUCHES DE MICROALGUES

La recette utilisée au laboratoire pour l'isolement et la purification est simplifiée car elle nécessite uniquement la préparation de deux solutions mères de chaque milieu de culture spécifique pour chaque espèce. Ces solutions, une fois stérilisées à 120 °C pendant 20 min, peuvent être conservées quelques mois à 4°C. Pour préparer 100 ml de milieu de culture liquide, il faut mélanger 10 ml de la solution A (des éléments majeurs) et 0,1 ml de la solution B (des éléments en trace), puis compléter à 100 ml avec l'eau distillée stérile. La solution est ensuite stérilisée en autoclave à 120 °C pendant 20 min. Pour préparer 100 ml de milieu de culture solide, 1,5 g d'agar sont ajoutés à 100 ml de la solution liquide préparée précédemment. La solution est ensuite stérilisée à 120 °C pendant 20 min. Une fois refroidie, environ 20 ml de milieu encore liquide sont coulés dans des boîtes de Pétri, au voisinage immédiat de la flamme d'un bec Bunsen, afin de conserver un environnement stérile. Une fois la gélose refroidie, les boîtes peuvent être utilisées immédiatement ou entreposées pour une courte période afin d'éviter toute contamination (**Barberousse, 2006**). Après incubation, les souches des microalgues ainsi isolées sont repiquées plusieurs fois dans le même milieu d'isolement afin d'avoir des cultures pures. Chaque colonie de microalgue isolée est ensemencée sur une nouvelle boîte de Pétri est incubée dans les mêmes conditions de culture.

Toutes ces manipulations s'effectuent dans un post de sécurité microbiologique PSM afin d'éviter les risques de contamination.

Les tubes qui contiennent les souches dans le milieu liquide sont ensuite incubées dans une chambre de culture à une température de 25°C et une photopériode de 16h lumière/8h obscurité à une source de lumière de 4000 lux.



**Figure III. 15: Souches des microalgues purifiées après 7 jours d'incubation**

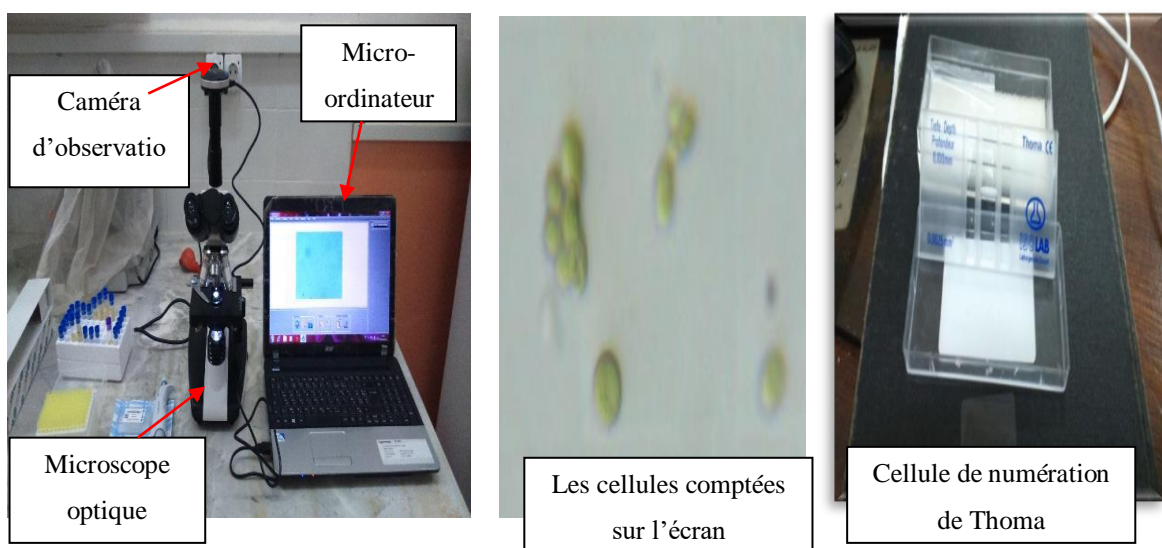
### III.8. MESURE DE LA CROISSANCE EN BIOMASSE

La croissance en biomasse dans chaque culture à la fin de chaque repiquage a été mesurée, afin de s'assurer de la jeunesse et la viabilité de nos cellules de microalgues et d'établir un comptage de leur nombre (numération cellulaire NC, la densité optique DO, la matière sèche MS) en fonction du temps.

Ces mesures nous ont permis d'étudier l'évolution de la croissance des microalgues au cours de toute la période de culture, et de déterminer la phase de croissance exponentielle à partir de laquelle chaque repiquage a été réalisé dans un volume plus important.

#### III.8.1. La numération cellulaire (NC)

La détermination de la biomasse algale à été effectuée par la technique de numération cellulaire, selon la méthode de **Guiraud (1998)**. La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est-à-dire en nombre de cellules par litre. La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope optique, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (appelée cellule de numération de Thoma). A l'aide de cette méthode de mesure nous avons pu constater une augmentation de la densité cellulaire, depuis le premier repiquage jusqu'à sa stabilisation à la fin de l'expérience pour le même volume utilisé pour la culture.



**Figure III. 16: Numération cellulaire à l'aide de la cellule Thoma sous microscope photonique muni d'une caméra et relié à l'ordinateur**

Le calcul de la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée est réalisé en utilisant la formule suivante :

Si on a **n** cellules dans **V** litres, alors on a **N** cellules dans un litre

$$\mathbf{N \times V = n \times 1} \quad \text{Alors} \quad \mathbf{N = n / V}$$

Avec :

- ❖ **n** : nombre de cellules comptées.
- ❖ **V** : volume de comptage.
- ❖ **f** : facteur de dilution
- ❖ **N** : nombre de cellules par litres.

Si la solution avait été diluée :

$$\mathbf{N = (n / V) \times f}$$

### III.8.2. La matière sèche (MS)

Les matières sèches sont déterminées par la technique de filtration sous vide comme décrit par **Rodier (2009)**, les cellules récupérées d'un volume de culture connu ont été par la suite centrifugées et lavées 2 fois à l'eau distillée, puis le culot a été pesé après séchage à 105 °C jusqu'à masse constante (ne pas oublier de pré-peser le récipient de séchage ...). Les résultats de MS sont trouvés par l'utilisation de la formule suivante :

$$\mathbf{MS = (M_1 - M_0 / V) * 1000}$$

Avec :

- ❖ **M<sub>1</sub>**= masse finale
- ❖ **M<sub>0</sub>**=initiale
- ❖ **V**=volume d'eau filtrée



Figure III. 17: Détermination des Matières sèches (MS)

### III.8.3. La densité optique (DO)

Les densités optiques initiales des cultures des microalgues ont été déterminées. Le suivi de la croissance des microalgues s'effectue chaque 48 h par la mesure de la densité optique par spectrophotomètre UV-visible (Modèle HELIOS EPSILON 3SGN006008) à une longueur d'onde de 620 nm (**Chandrashekharaiyah et al., 2021**).

Le spectrophotomètre utilisé est un appareil à double-faisceau, il permet de quantifier les molécules présentes en solution, capables d'absorber des photons, dans la gamme de longueurs d'onde 190-1100 nm. L'absorbance ( $A$ ) de la solution est calculée à partir de la loi de Beer-Lambert :  $A = \epsilon cl = \text{Log} \left( \frac{I_0}{I} \right)$

Tel que :

- ❖  $\epsilon$  : Coefficient d'absorbance ( $l \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), il dépend de la longueur d'onde, la nature chimique de l'entité et la température.
- ❖  $I_0$  : Intensité du faisceau incident
- ❖  $I$  : Intensité transmise du faisceau traversant l'échantillon



**Figure III. 18: Mesure de DO par Spectrophotomètre (HELIOS EPSILON 3SGN006008 UV-VIS)**

### **III.9. CARACTERISATION DE L'EAU DE MER PRELEVEE**

Les analyses des eaux les plus courantes dépendent d'une évaluation des paramètres physicochimiques et biologiques. Ce potentiel de pollution généralement exprimés en mg/L, est quantifié et apprécié par une série d'analyses. Certains de ces paramètres sont indicateurs de modifications que cette eau sera susceptible d'apporter aux milieux naturels récepteurs. Pour les eaux usées domestiques, industrielles et les effluents naturels (**Metahri, 2012**), on peut retenir les analyses suivantes :

#### **III.9.1. Caractérisation bactériologique**

L'analyse bactériologique a pris en compte dans cette partie uniquement à la flore bactérienne aérobie mésophile totale (FAMT). Elle est déterminée à l'aide de la méthode décrite par **Joffin et Leyral, (2009)**

**A. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT)**

La flore aérobie mésophile totale (FAMT) est un indicateur d'hygiène important permettant de juger la qualité sanitaire des produits. En effet, elle permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant colonie) présent dans un produit ou sur une surface. Ce dénombrement se fait à 30°C ce qui permet de dénombrer trois grands types de flore :

- La flore thermophile T° optimale de croissance à 45°C
- La flore mésophile T° optimale de croissance entre 20°C et 40°C
- La flore psychrophile T° optimale de croissance à 20°C

Comme il s'agit d'un milieu ordinaire, la plupart des micro-organismes peuvent se développer, sauf ceux qui sont exigeants et les Micro-organismes anaérobies stricts. Il est donc préférable de parler de la Flore Mésophile Aérobie (FMA) à 30°C que de "flore totale". L'unité est l'UFC (Unité Formant colonie) car une colonie observable sur la gélose peut venir d'un micro-organisme isolé, ou bien d'une spore ou d'une micro-colonie.

**B. Méthode des dilutions successives**

Nous prenons un (01) ml de l'échantillon avec une pipette graduée, et transversons le dans un tube contenant 9 ml d'eau distillé stérile. Nous venons de réaliser une dilution au 10<sup>-1</sup>. Nous renouvelons l'opération en changeant de pipette et en versant de nouveau 1 ml dans un nouveau tube d'eau distillé stérile, et ainsi de suite jusqu'à ce que la concentration en bactérie devienne relativement faible. Nous considérons que les colonies sont dénombrables si leur nombre est compris entre 30 et 300. Au dessus de 300, elles sont indénombrables, en dessous de 30 nous considérons qu'elles sont trop rares pour être dénombrées. Pour savoir quand arrêter les dilutions, référons nous aux normes des produits. Les dilutions doivent être faites en milieu aseptique. Nous devons bien homogénéiser les tubes entre chaque dilution.

**C. Ensemencement dans la masse de la gélose PCA**

La gélose PCA (Plate Count Agar) est une gélose standard pour le dénombrement. Afin de préparer un litre de ce milieu de culture, nous mélangeons 6g de peptone, 3g de l'extrait de levure, 15g de gélose et 1g de glucose dans un litre d'eau distillée. Le pH est maintenu à 7,2.

Nous prenons une nouvelle pipette et à partir de la dernière dilution, nous prélevons 1 ml de la dilution que nous répartirons en goutte au fond de la boîte correspondante, et nous renouvelons l'opération pour la seconde boîte. Sans changer de pipette nous remontons à la dilution supérieure, et nous recommençons et ce ainsi de suite jusqu'à la première dilution.

Nous recouvrons les gouttes d'une couche de la gélose PCA (15 ml) en surfusion mais légèrement refroidie (à une température pour laquelle permettant la survie des micro-organismes et pour laquelle la gélose ne prend pas en masse environ 45°C). Nous homogénéisons en gardant la boîte de Pétri fermée grâce à des mouvements circulaires.

Quand la gélose a refroidi, nous coulons une seconde couche mince de la gélose PCA (5 ml) ce qui aura pour effet d'immobiliser les bactéries, et donc de former des colonies bien définies. Nous laissons refroidir les boîtes jusqu'à la solidification complète.

Nous commençons par annoter nos boîtes de pétri, elles doivent contenir sur la tranche :

- La date d'incubation
- La dilution qui va être utilisée
- La température d'incubation
- La durée d'incubation

Nous avons préparé deux boîtes par chaque dilution et les incubées à 30°C pendant 72 h dans une étuve (**MODEL MEMMERT**).

#### D. Calcul du nombre de FAMT

Pour calculer le nombre de FAMT, la formule mathématique suivante peut être utilisée:

$$N = \frac{\Sigma \text{colonies}}{V_{ml} * (n1 + 0,1n2) * d1}$$

- ❖ **N** : Le nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial
- ❖ **Σ colonies** : La somme des colonies des boîtes interprétables
- ❖ **Vml** : Le volume de la solution déposée (1ml) à chaque boîte
- ❖ **n1** : Le nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue
- ❖ **n2** : Le nombre de boîte considéré à la seconde dilution retenue
- ❖ **d1** : Le facteur de la première dilution retenue

### III.9.2. Caractérisation physicochimique

Les paramètres physico-chimiques mesurés *in situ* après l'échantillonnage de l'eau de mer sont: la température (**T**) en °C ; la conductivité électrique (**CE**) en mS/cm, le potentiel hydrogène (**pH**) ; l'oxygène dissous (**O<sub>2</sub>dis**) en mg/L. Les autres paramètres physico-chimiques

sont analysés au niveau du laboratoire d'analyse environnementale du centre de recherche en biotechnologie (CRBt, Constantine), à savoir:

- Les matières en suspension (**MES**) en mg/L déterminées par la méthode de filtration sous vide sur des membranes en nitrate de cellulose comme décrit par **Rodier (2009)**.
- Les nitrites (**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>**) et les ortho-phosphates (**PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>**) en mg/L dans les eaux de mer sont analysés selon la méthode spectrométrique d'absorption moléculaire décrite par la norme (**AFNOR NFT 90-013**),
- L'azote Kjeldahl (**NK**) en mg/L par la méthode de la digestion de l'échantillon dans un bloc digestor selon la norme (**ASTM 3590**).
- L'ammonium (**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**) en mg/L par la méthode spectrophotométrie UV-visible décrite par la norme (**ASTM D 1426-93**).
- La demande chimique d'oxygène (**DCO**) en mg/L par la méthode spectrophotométrie UV-visible décrite par la norme (**AFNOR T90-101**).
- La demande biochimique en oxygène (**DBO<sub>5</sub>**), en mg/L selon la méthode manométrique basée sur le principe du respiromètre de **WARBURG**.
- Le carbone organique total (**COT**) en mg/L par passage à l'appareil sur la méthode « **BRANCO** »
- Les hydrocarbures totaux (**HT**) en ppm ont été déterminés à l'aide de la méthode gravimétrique décrite par **Fusey et al (1973, 1976, 1981)**.
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (**HAPs**) sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) fonctionnant dans le mode d'acquisition d'ions sélectifs « **SIM** ».

### **III.9.2.1. Le potentiel d'hydrogène (pH)**

Le pH (potentiel d'hydrogène) est un nombre qui permet de connaître le caractère (acide, neutre, basique) d'un milieu aqueux à 25 °C, dont le plus important est habituellement la concentration en anhydride de carbone liée à la minéralisation totale. Il est déterminé par la concentration en atome d'hydrogène (ion H<sup>+</sup>), il est mesuré dans notre cas avec un pH-mètre de type **HANNA Hi 8314**. Après rinçage à l'eau distillée, l'électrode est plongée dans l'échantillon à analyser, la valeur du pH est affichée directement sur l'écran du pH-mètre (**AFNOR, 1994**).

Les organismes sont très sensibles aux variations de pH, l'influence du pH se fait ressentir par le rôle qu'il exerce sur les autres éléments comme les ions des métaux dont il peut diminuer ou augmenter leur mobilité en solution et donc leurs toxicités.

### ***III.9.2.2. L'oxygène dissous ( $O_2$ dis)***

La teneur en oxygène dissous ( $O_2$ dis), est définie comme étant la quantité d'oxygène présente en solution dans l'eau, et est disponible pour la respiration végétale et animale. Comme tous les gaz, l'oxygène atmosphérique et celui résultant de la respiration des organismes et des microorganismes aquatiques, ainsi qu'une partie de l'oxygène produit par les organismes phototrophes, se dissout dans l'eau.

La concentration en oxygène dissous est un paramètre essentiel dans le maintien de la vie, et donc dans les phénomènes de dégradation de la matière organique et de la photosynthèse.

Une eau très aérée est généralement sursaturée en oxygène dissous, alors qu'une eau chargée en matières organiques dégradables par des microorganismes et sous saturée. En effet, la forte présence de matière organique, dans un plan d'eau, permet aux microorganismes de se développer tout en consommant de l'oxygène dissous.

L'oxygène dissous est mesuré à l'aide d'un oxymètre portable de type **YK-22DO**, l'appareil a été d'abord étalonné par l'ingénieur du laboratoire, puis a servi pour les mesures des teneurs en  $O_2$ dis au cours de tout le processus des traitements biologiques anaérobie et aérobie. Le résultat affiché sur l'écran est en fonction de la température. Il est exprimé en mg/L.

### ***III.9.2.3. La conductivité électrique (CE)***

La conductivité électrique (CE) est l'expression numérique de la capacité d'une solution à transporter un courant électrique, cette capacité dépend de la présence d'ions et de sa concentration totale, de sa mobilité, sa valence et sa concentration relative. Elle fournit une indication sur la teneur en sel dissous.

### ***III.9.2.4. Les Matières en Suspension (MES)***

Les matières en suspension (MES) constituent l'ensemble des particules minérales et/ou organiques présentes dans un milieu aquatique naturel ou pollué qui ne se solubilisent pas dans l'eau. Elles peuvent être composées de particules de sable, des argiles, des limons, de terre et de sédiments arrachés par l'érosion, de divers débris apportés par les eaux usées, d'êtres vivants planctoniques. Elles correspondent à la concentration en éléments non dissous d'un échantillon. La concentration élevée des matières en suspension (MES) dans l'eau favorise la réduction de la luminosité et diminue la production biologique en raison, en particulier, d'une chute de l'oxygène dissout consécutive à une réduction du phénomène de photosynthèse.

Les MES comme étant les résidus retenus sur une membrane filtrante de 1,5  $\mu\text{m}$  de porosité nominale après séchage dans une étuve à 105°C pendant 1h 30 min.

#### ***III.9.2.5. La demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>)***

Parmi les principaux paramètres de qualité habituellement étudiés pour évaluer de façon indirecte la charge organique globale contenue dans une eau usée, il y a la demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>) qu'est une expression pour indiquer la quantité d'oxygène utilisée pour la dégradation des matières organiques décomposables par des processus biologiques pendant cinq (5) jours. La mesure de la DBO<sub>5</sub> a été réalisée selon la méthode manométrique basée sur le principe du respiromètre de **WARBURG** au cours duquel la respiration de la biomasse est directement mesurée par un appareil. Le principe de la méthode respirométrique se résume comme suit: Le CO<sub>2</sub> issu de l'oxydation totale de la matière organique est adsorbé par des pastilles de NaOH ce qui crée une dépression dans le flacon. Un manomètre détecte cette dépression et la conversion en DBO est alors possible sachant le volume de l'échantillon, la dilution et un facteur fournis par le constructeur, qui dépend du volume total utilisé dans le flacon. Un volume d'échantillon est placé dans des flacons en verre brun à bouchon rodé, puis mis à incubation pendant cinq (05) jours à 20°C. A la fin de la réduction biochimique, après les 5 jours, nous pouvons lire la valeur de la DBO<sub>5</sub> sur l'écran de l'OxiTop. La valeur de la DBO<sub>5</sub> (exprimé en mg O<sub>2</sub>/L) permet d'évaluer la charge polluante dans l'eau usée et sa biodégradabilité (**Rodier et al., 1996**).

#### ***III.9.2.6. La demande chimique en oxygène (DCO)***

La demande chimique en oxygène s'exprime en mg d'O<sub>2</sub>/L et correspond effectivement à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder, par voie chimique, dans des conditions opératoires définies, les matières organiques présentes dans un échantillon donné. La DCO est déterminée selon la méthode de **Knechtel (1978)**. L'échantillon d'eau usée est oxydé par une solution sulfurique chaude de dichromate de potassium avec le sulfate d'argent comme catalyseur. Les chlorures sont masqués par le sulfate de mercure. L'oxydation se fait dans un réacteur (HACH) à une température de 150°C et en présence d'un excès de bichromate de potassium en milieu acide. 2,5 ml d'échantillon dilué sont mélangés avec 1,5 ml de la solution de bichromate de potassium et 3,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18M) contenant 10 g/L d'AgSO<sub>4</sub>. Après deux heures d'incubation, la densité optique (la concentration des ions Cr<sup>3+</sup>) est mesurée par un spectrophotomètre UV-visible à 600 nm. La DCO est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage propre à chaque

préparation de bichromate. La courbe d'étalonnage est réalisée avec l'hydrogénophthalate de potassium ( $C_8H_5KO_4$ ), dans les mêmes conditions d'analyse, à différentes concentrations (0 g/L à 0,8 g/L).

#### **III.9.2.7. La détermination des ions de phosphates ( $PO_4^{3-}$ )**

Le phosphore est présent dans l'eau sous plusieurs formes : phosphates, poly-phosphates, phosphore organique etc. L'ion ortho-phosphate est la forme la plus abondante dans l'eau et provient en majeure partie des déjections animales et des produits de lessive. Il joue un rôle important dans la respiration des cellules vivantes, dans le stockage et le transfert de l'énergie. A des concentrations élevées dans l'eau, il provoque l'eutrophisation. La protection des milieux aquatiques induit l'abatement du phosphore. Par contre, la réutilisation des eaux à des fins agricoles ne nécessite pas une réduction des teneurs en azote et en phosphore.

L'ion phosphate  $PO_4^{3-}$  est un anion poly-atomique. Il se présente sous la forme d'un tétraèdre dont les sommets sont formés par les quatre atomes d'oxygène encadrant un atome de phosphore. Cet ion, qui comporte trois charges négatives, est la base conjuguée de l'ion hydrogénophosphate ( $HPO_4^{2-}$ ) (ou phosphate inorganique) qui est lui-même la base conjuguée de l'ion di-hydrogénophosphate ( $H_2PO_4^{2-}$ ) qui est lui-même la base conjuguée de l'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ). La concentration des ions phosphates ( $PO_4^{3-}$ ) ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre à UV-visible à une longueur d'onde  $\lambda = 400$  nm.

#### **III.9.2.8. La détermination des ions ammonium ( $NH_4^+$ )**

L'ammonium est un nutriment pour les plantes, mais peut également avoir des effets toxiques, en particulier sur les poissons, lorsque sa concentration est supérieure à 0,2 mg/L. La toxicité de l'ammoniac est dépendante du pH et de la température et ajoute l'effet tampon qui masque toute toxicité supplémentaire au-dessus du pH égale à 8. Pour éviter des dommages écologiques, nous devons considérer la fluctuation du pH causée par la photosynthèse qui est difficile dans le cas de l'ammoniac sous la forme d'un large éventail de paramètres tels que la concentration, le pH et la température.

L'eau de surface avec une concentration en  $NH_4^+$  supérieure à 1,5 mg/L appartient à la qualité de 5<sup>ème</sup> classe. Dans toutes les déterminations, en particulier sur la rivière, un niveau élevé d'ammonium peut être observé, probablement en raison de la matière organique dissoute dans l'eau. La conséquence de fortes concentrations d'ammonium peut être due généralement à une augmentation de la quantité d'algues (Florescu et al., 2011).

La détermination de la concentration des ions ammonium  $\text{NH}_4^+$  a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à UV-visible à une longueur d'onde  $\lambda = 425 \text{ nm}$ .

### **III.9.2.9. La détermination de l'azote KJELDAHL (NK)**

L'azote KJELDAHL correspond à celui qui se trouve sous la forme de composés azotés organiques et d'ammonium. Il ne comprend donc pas des composés oxydés de l'azote tels les nitrates et les nitrites, ni certaines autres formes, les oximes, l'hydrazine, les hétérocycles.

L'expression « azote KJELDAHL » trouve son origine dans le nom de celui qui a mis au point la méthode universelle utilisée pour doser les fractions azotées concernées.

- **L'azote minéral** est constitué par l'ammoniaque, les nitrites, les nitrates.
- **L'azote organique** est essentiellement formé par des protéines, des polypeptides, de l'urée, des acides aminés.
- **L'azote ammoniacal** représente l'azote sous la forme  $\text{NH}_4^+$

L'azote organique est minéralisé sous forme de sulfate d'ammonium par l'action conjuguée de l'acide sulfurique et de catalyseurs de minéralisation (mélange de Sélénium, Merck). Le schéma de la réaction est le suivant :



Cette méthode consiste à la digestion de l'échantillon dans un bloc digestor en présence de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  et  $\text{CuSO}_4$ . Durant la digestion l'azote organique est converti en ion ammonium, après digestion, le résidu est refroidi puis dissout dans de l'eau et transféré dans le tube de l'appareil automatique KJELDAHL. L'ammonium et l'azote contenu est déterminé par le point final du pH.

### **III.9.2.10. La détermination du carbone organique total (COT)**

La matière organique joue un rôle essentiel dans les environnements aquatiques trouvée par la mesure du carbone organique total (COT). Elle affecte le processus biogéochimique, le cycle des nutriments, la disponibilité biologique, le transport chimique et les interactions. A également des implications directes dans la planification du traitement des eaux usées et le traitement de l'eau potable. Le COT est la quantité de carbone lié dans un composé organique et est utilisé comme indicateur non spécifique de la propreté ou de la qualité de l'eau. Ça a été reconnu comme un paramètre analytique pour mesurer la qualité de l'eau au cours du processus d'épuration. Son origine dans l'eau provient de la décomposition de la matière organique

naturelle (acide humique, acide fulvique, amines et urée) et de sources synthétiques (détergents, pesticides, engrais, herbicides, produits chimiques industriels et composés organiques chlorés).

En utilisant les mesures de COT, le nombre de composés contenant du carbone peut être ainsi déterminé. La quantité importante en carbone dans l'eau (contenu organique) correspond à une consommation excessive de l'oxygène.

Une teneur élevée en matières organiques signifie une augmentation de la croissance des micro-organismes qui contribuent à l'épuisement des réserves d'oxygène. Les effluents de déchets industriels peuvent contenir des composés contenant du carbone avec différents niveaux de toxicité. Ces situations peuvent créer des conditions défavorables à la vie aquatique, telles que l'épuisement de l'oxygène et la présence de substances toxiques (**Florescu et al., 2011**).

Pour déterminer le COT, nous prenons 100 ml d'échantillon et nous ajoutons 40 ml de la solution de digestion bien mélangé dans un tube de digestion avec l'ajout de 4 à 5 pierres bouillantes (boiling stones). Nous plaçons le tube dans le digestor, régler la température à 200°C pendant 1 h, augmenter la température à 380°C et chauffer pendant 1h 30 min. L'échantillon est laissé refroidir à température ambiante et ajouter 30 ml d'eau distillée chaude pour arrêter la solidification de l'échantillon et bien mixer. Passer à l'appareil sur la méthode « **BRANCO** »

- **La biodégradabilité**

La biodégradabilité traduit l'aptitude d'un effluent à être décomposé ou oxydé par les micro-organismes qui interviennent dans le processus d'épuration biologique des eaux usées. La biodégradabilité est exprimée par un coefficient K, tel que,  $K = DCO / DBO_5$  :

- Si  $k < 1,5$  : cela signifie que les matières oxydables sont constituées en grande partie de matières fortement biodégradable ;
- Si  $1,5 < K < 2,5$  : cela signifie que les matières oxydables sont moyennement biodégradables.
- Si  $2,5 < K < 3$  : les matières oxydables sont peu biodégradables.
- Si  $K > 3$  : les matières oxydables sont non biodégradables.

Un coefficient K très élevé traduit la présence dans l'eau d'éléments inhibiteur de la croissance bactérienne, tels que, les sels métalliques, les détergents, les phénols, les hydrocarbures ... etc.

La valeur du coefficient K détermine le choix de la filière de traitement à adopter, si l'effluent est biodégradable on applique un traitement biologique, si non on applique un traitement physico-chimique.

La valeur du rapport DCO/DBO qui indique le coefficient de biodégradabilité d'un effluent, il permet aussi de définir son origine (**Suschka & Ferreira, 1986**). Généralement la valeur de la DCO est :

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

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

$$\text{MO} = (2 \text{ DBO}_5 + \text{DCO})/3$$

#### III.9.2.11. La détermination des hydrocarbures totaux (HT)

Les hydrocarbures totaux (HT) sont des composés organiques provenant de la distillation du pétrole. Il est important de connaître leur concentration pour déterminer le degré de pollution de l'eau de mer. Les HT (pour l'eau et les sédiments) ont été déterminés à l'aide de la méthode gravimétrique, méthode décrite par **Fusey et al. (1973, 1976, 1981)**.

Cette méthode peut être simplement réalisée en évaporant le solvant d'extraction et la pesée du résidu. L'abiotique (processus d'évaporation) de la perte a été précédemment estimée dans les flacons stériles marqués. Le principe de la méthode comporte les points suivants :

1. Un volume de (100 ml) de l'échantillon à analyser a été versé dans une ampoule à décanter.
2. Quelques gouttes de méthyle orange et 0,2 ml de HCl à 50 % ont été ajoutés afin d'acidifier l'échantillon.
3. Du chloroforme (meilleur solvant pour l'extraction des phases organiques) a été ajouté pour un volume égal à la moitié du volume de l'échantillon.
4. Le mélange a été bien agité en ouvrant le bouchant de l'ampoule à décanter de temps en temps pour laisser s'échapper le gaz puis il a été décanté pendant quelques minutes.
5. Enfin, la phase supérieure a été filtrée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour éliminer toute trace d'humidité.
6. Le solvant contenant la phase organique a été récupéré dans un bécher préalablement pesé et placé dans une étuve jusqu'à évaporation totale. L'échantillon final a été pesé et la quantité obtenue de résidu a été calculée à l'aide de la formule ci-dessous :

$$Q_{\text{Total}} (\text{ppm}) = W_f - W_i/V_s$$

Avec :

- ❖  $Q_{\text{Total}}$  : est la quantité d'hydrocarbures totale,
- ❖  $W_f$  : la pesée finale de l'échantillon,
- ❖  $W_i$  : la pesée initiale de l'échantillon
- ❖  $V_s$  : le volume de l'échantillon.

#### **III.9.2.12. La détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)**

La détermination de la concentration des HAPs s'effectue principalement en trois étapes. La première étape consiste à extraire les HAPs à l'aide d'un solvant organique qui est le dichlorométhane ou de l'hexane après l'ajout d'étalons de recouvrement « surrogates ». Dans la deuxième étape, il y a transport de solvant du dichlorométhane à l'hexane si les HAPs sont purifiés sur colonne de gel de silice. A la fin, dans la troisième étape, l'extrait est concentré puis analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) fonctionnant dans le mode d'acquisition d'ions sélectifs (« SIM »). La concentration des HAPs est déduite lorsque nous comparons les dimensions des surfaces chromatographiques obtenues à un temps de rétention donné entre l'échantillon à analyser et celles de chacun des étalons de HAPs, tout en tenant compte des surfaces obtenues pour les étalons volumétriques (standards internes). Le résultat obtenu est rapporté corrigé en fonction de la récupération de l'étalon de recouvrement associé à un groupe de HAPs (QUÉBEC, 2016).

### **III.10. CONCEPTION DU PHOTOBIOREACTEUR DE TRAITEMENT DES EAUX USEES (PBRT)**

Le principe de fonctionnement du système de dépollution des eaux usées synthétiques que nous avons monté au laboratoire est le suivant : au sein d'une enceinte confinée, le photobioréacteur, les diatomées (*Nitzschia sp.*) photosynthétiques sont cultivées, dans des conditions de lumière, de CO<sub>2</sub>, de température et de pH contrôlées. L'apport en nutriments nécessaires à leur croissance est assuré par l'eau usée (Figure III.20).

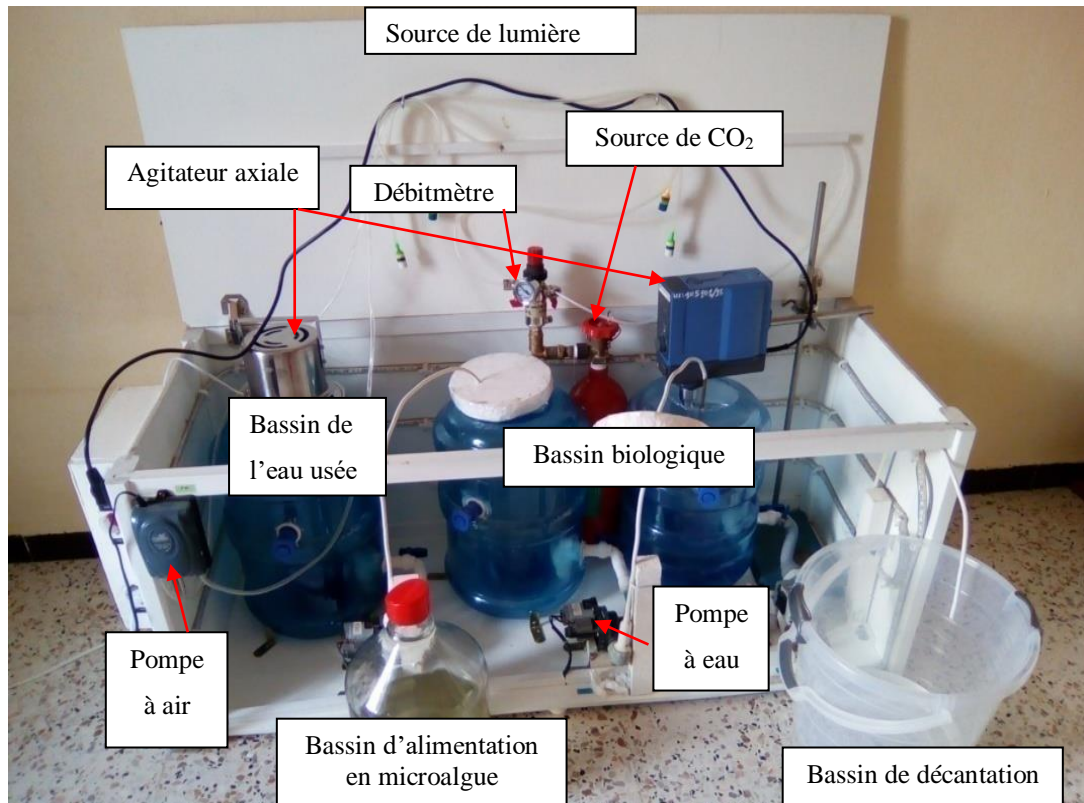


Figure III. 19: Photobioréacteur (PBRT) pour le traitement biologique des eaux usées

### III.10.1. Description du procédé biologique dans les trois bassins

- **Bassin de stockage de l'eau usée (1) :** ce bassin sert à alimenter en continu (quotidiennement) notre micro-station d'épuration en eau usée synthétique;
- **Bassin de culture de diatomées (1') :** ce bassin contient des diatomées cultivées qui alimentent le bassin (2) et renforcent le traitement biologique par les espèces de diatomées (*Nitzschia sp*);
- **Bassin biologique (2) :** c'est au sein de ce bassin que se déroule la biodégradation de l'eau usée par *Nitzschia sp*. Ce bassin est alimenté à partir des deux bassins (1) et (1') à raison d'ajouter 400 ml d'eau usée + 200 ml de culture de *Nitzschia sp* chaque jour ;
- **Bassin de décantation :** ce bassin joue le rôle de clarificateur. Il reçoit chaque jour 250 ml d'eau traitée provenant du bassin (2). La séparation de la phase liquide (eau épurée) et la phase boue décantée a duré environ 24 heures de temps entre le 23<sup>ème</sup> et le 24<sup>ème</sup> jour à la fin de l'expérience de dépollution. Pour faire ensuite la caractérisation physique et chimique de cette eau épurée.

### III.10.2. Paramètres suivis au cours de la culture des microalgues

Chaque jour, dans chaque bioréacteur, les paramètres physiques et chimiques suivants ont été mesurés : l'oxygène dissous ( $O_2$  dis), le pH, la température (T) et la conductivité électrique de l'eau (CE). Une solution tampon (acide méthanoïque :  $CH_2O_2$ ) a été ajoutée en cas de nécessité pour maintenir un pH constant à environ  $7,7 \pm 0,24$  pour la croissance de nos microalgues.

Les paramètres chimiques tels que le phosphore ( $PO_4^{3-}$ ), l'ammonium ( $NH_4^+$ ), et le nitrate ( $NO_3^-$ ) ont été déterminés avec un photomètre de laboratoire **AL400**. La demande chimique en oxygène (DCO), exprimée en milligrammes d'oxygène utilisé par litre d'eau usée stérile, est souvent utilisée comme substitut du degré de pollution organique et inorganique de l'eau. En d'autres termes, la diminution de ce paramètre permet de mesurer l'efficacité du traitement des eaux usées.

La DCO et la  $DBO_5$  ont été mesurée uniquement en début et à la fin de l'expérience en raison des volumes importants (1L) requis pour la surveillance de ce paramètre et qui dépassent la capacité des photobioréacteurs utilisés.

La température a été légèrement influencée pendant le processus de traitement et a été maintenue stable à  $18 \pm 0,24^\circ C$ . Ces valeurs ont été recommandées pour favoriser une croissance optimale des cellules de microalgues. Trois lots d'essai ont été réalisés pour déterminer la croissance optimale de la biomasse de microalgues dans des conditions similaires de pH et de température.

### III.10.3. Détermination du taux de croissance de la biomasse

Les cellules de microalgues ont été prélevées par soutirage à l'aide d'une seringue stérile de 5 ml, puis centrifugées à 2500 tr/min pendant 5 minutes afin d'éviter l'endommagement des parois des cellules.

Le suivi de la croissance en biomasse a été déterminé tout d'abord par la méthode de numération cellulaire (NC) afin de s'assurer de la viabilité de nos microalgues cultivées, puis par la méthode de densité optique (DO).

Pour chaque bioréacteur et à chaque moment d'échantillonnage, le taux de croissance de nos microalgues ( $\mu$ , exprimé en divisions par jour), et le temps de génération (temps de doublement) ( $\theta = \frac{\ln(2)}{\mu}$ ) a été calculé suivant la formule de **Guillard (1973)**.

Le taux de croissance a été calculé à partir de la pente de la courbe de la phase exponentielle :

$$\mu = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1}$$

Avec:  $N_1$  et  $N_2$  sont respectivement les nombres de cellules aux temps  $t_1$  et  $t_2$ .

Les coefficients de régression ont été analysés en utilisant des régressions linéaires des contenus cellulaires transformés en log10 par rapport au temps en jours, afin d'augmenter la précision des résultats. Tous les calculs sur les données de concentration cellulaire ont été effectués en utilisant (Excel). Les tests statistiques ont été utilisés pour tester la signification du coefficient de régression ( $R^2$ ) au niveau 0,001. Ces taux sont calculés à partir des valeurs moyennes de trois essais.

### III.10.4. Présentation des espèces sélectionnées et isolées

#### III.10.4.1. Présentation structurale de *Chlorella vulgaris*

Le genre *Chlorella* est l'un des microalgues eucaryotes phototrophes des mieux étudiés. La diversité évolutive de *Chlorella* avait fait l'objet de plusieurs discussions approfondies au cours de ces dernières décennies (Alabi-Ali et al., 2019; El-Naggar et al., 2020; Zerhouni et al., 2021). Ce genre de microalgues est cosmopolite, des espèces de *Chlorelles* peuvent croître aussi bien en eau douce qu'en eau salée (Heeg & Wolf, 2015). *Chlorella vulgaris* appartient à la lignée des Chlorophytes. Elle a été découverte par un chercheur hollandais Beijerinck en 1890. C'est une microalgue verte unicellulaire eucaryote d'eau douce. Elle est de forme ronde ou ellipsoïde, d'un diamètre moyen de 5  $\mu\text{m}$ . Elle possède un chloroplaste pariétal contenant de la chlorophylle a et b ainsi que des caroténoïdes comme pigments accessoires, des pyrénoloïdes, des thylakoïdes, des grains d'amidons et du matériel génétique. L'amidon est la réserve majeure de glucides de la cellule. D'autres organites sont également présents dans la cellule : un noyau, des mitochondries, de petites vacuoles, des gouttelettes lipidiques, des ribosomes (Hoek et al., 1995). La membrane cellulaire externe est composée de trois membranes contenant de la glucosamine (Allard & Templier, 2000; Takeda, 1993).

La *Chlorelle* a d'abord été cultivée commercialement au Japon et aussi en Chine dans les années 1960, avant la Spiruline, mais les limites de la technologie à cette époque n'ont pas conduit à une fabrication en Chine. Au cours de la dernière décennie, la Chine est également devenue le principal producteur mondial de la *Chlorelle*, dépassant la production traditionnelle au Japon. La production de la *Chlorelle* est globalement considérablement plus petite en volume que celle de la Spiruline, probablement un quart, mais le prix par tonne est nettement plus élevé. De nombreuses entreprises de production de la Spiruline produisent la *Chlorelle* aux côtés de la Spiruline, généralement en plus petite partie du plus grand processus de production de la

Spiruline. La Chlorelle a un processus de production techniquement plus difficile et coûteux, par rapport à la Spiruline, en raison d'un plus grand potentiel de contamination et du besoin de centrifugeuses pour récolter ces cellules microscopiques. Cela contraste avec la récolte plus facile de la spiruline filamenteuse et moins de problèmes de contamination dus au milieu de croissance à haute teneur en bicarbonate. Il y a peu d'informations sur la production de la Chlorelle en Chine, la centrifugation est utilisée pour récolter la biomasse algale, et le CO<sub>2</sub> est utilisé pour fournir le carbone. La Chlorelle est séchée par pulvérisation et vendue de manière similaire à la Spiruline, en tant que complément nutritionnel humain (**Chen et al., 2016**).

#### ***III.10.4.2. Présentation structurale de *Aphanocapsa zanardinii****

*Aphanocapsa zanardinii* appartient aux cyanobactéries, souvent appelée algues bleues-vertes, sont des algues procaryotes, ont des cellules sphériques, dispersées dans un mucilage informe, formant des colonies allant de 1 à 2 µm de diamètre; jusqu'à 30 µm de diamètre. En tant que tels, ils n'ont pas les plastides trouvés dans les groupes d'algues eucaryotes et peuvent être facilement identifiés par la distribution de pigments photosynthétiques dans leurs cellules microalgales. Les cyanobactéries sont souvent de couleur bleu-verte, mais peuvent aussi être olive-terne ou noires. Environ 2 000 espèces de cyanobactéries sont actuellement reconnues (**Graham & Wilcox, 2000**). Les cyanobactéries présentent une croissance unicellulaire, coloniale et filamenteuse. Certaines cyanobactéries sont mobiles, présentant une forme de motilité glissante à travers les surfaces. D'autres peuvent réguler leur flottabilité pour se déplacer verticalement dans la colonne d'eau. De nombreuses cyanobactéries peuvent fixer l'azote et peuvent donc dominer les basses zones humides azotées. Malgré ses aptitudes à se développer dans des milieux extrêmes, les Cyanophycées possèdent des températures de croissance optimales aux alentours de 30 à 35°C.

#### ***III.10.4.3. Présentation structurale de *Nitzschia* sp.***

*Nitzschia Hassal, 1845* (Classe de Diatomophyceae ou Bacillariophyceae; Ordre: Pennales; Famille: Nitzschiaceae). Les cellules sont habituellement libres, mais parfois réunies en colonie à muqueuses ou filamenteuses. L'algue étudiée serait *Nitzschia closterium* (Ehrenberg. W Smith). D'après la classification de **Grunovv 1880**, cette espèce entre dans la section Nitzschiella (Rabenhorst). Les valves de cette diatomée sont habituellement longues et étroites aux extrémités. Ces dernières sont fines, allongées, légèrement courbées soit du même côté, soit des côtés opposés, donnant ainsi à la valve un aspect légèrement sigmoïde. La carène est centrale

à marginale, quant à la surface valvaire, elle porte de très fines ponctuations disposées en stries transapicales (**Ben Said, 1994**). Ce sont des organismes unicellulaires eucaryotes de la famille des bacillariaceae. Il s'agit d'organismes phytoplanctoniques pélagiques, c'est-à-dire tirant leur énergie de la photosynthèse (comme les plantes terrestres) et vivant dans la colonne d'eau. Elles sont présentes dans l'ensemble des mers du globe et peuvent représenter une fraction importante des communautés phytoplanctoniques. Les diatomées (*Nitzschia sp.*) emmagasinent leurs réserves sous forme de 'Chrysolaminaran' (un polymère hydrosoluble du glucose « glucane  $\beta$ 1,3 ramifié en  $\beta$ 1,6 » utilisé comme substance de réserve vacuolaire par certaines algues), un polysaccharide, ainsi que d'huiles. Elles sont d'ailleurs reconnues pour leur contenu en acides gras et pendant plusieurs années, les scientifiques croyaient que les lipides représentaient le seul composé de réserve. Les composants majeurs de ces lipides sont les triglycérides.

### III.11. BIOREMEDIATION DES EAUX USEES PAR LES MICROALGUES

#### III.11.1. Bioremédiation des eaux contaminées par du cadmium en utilisant des microalgues

##### III.11.1.1. Présentation du métal lourd étudié : Cadmium (Cd)

Élément naturel de numéro atomique  $Z = 48$ , abrégé en Cd, présent dans certains minerais sous forme d'impuretés. C'est un métal argenté qui ternit à l'air. Il est soluble dans les milieux acides, mais pas en milieu alcalin. C'est le 65<sup>ème</sup> élément naturel le plus abondant de la croûte terrestre. On le trouve dans les piles, soudures, accumulateurs, pigments de peinture, produits pour la photogravure, les engrais et les pesticides (**Tou-dallil, 2013**)

Dans l'environnement, il n'est presque jamais trouvé à l'état métallique, mais dans son état d'oxydation uniquement. Les principaux composés du cadmium sont l'oxyde de cadmium, le chlorure de cadmium et le sulfure de cadmium (**Bisson et al., 2011**).

Le cadmium est utilisé pour ses caractéristiques physico-chimiques dans une multitude d'industries, principalement pour la fabrication des batteries, des piles, des pigments, des agents de polymérisation ou de stabilisation des matières plastiques et dans les traitements des surfaces de métaux (**Sahnoun, 2010**).

Le cadmium à l'état métallique n'est pas soluble; ses sels le sont plus ou moins, en fonction du pH. En milieu aquatique, le cadmium est relativement mobile et peut être transporté sous forme de cations hydratés ou de complexes organiques ou inorganiques (**Bisson et al., 2011**). La concentration du cadmium dans l'eau douce non polluée est généralement inférieure à

0,001 mg/L et celle de l'eau de mer d'environ 0,00015 mg/L. Les eaux superficielles contenant plus de quelques microgrammes de cadmium par litre sont probablement polluées par les rejets des usines métallurgiques, des ateliers d'électroplasties, des fabriques de pigments cadmiés, de textiles, de plastiques stabilisés au cadmium, ou par les boues d'épuration (Tou-dallil, 2013).

La concentration admissible du cadmium dans l'eau potable est inférieure à 0,005 mg/L en fonction des critères d'ordre sanitaire (Yan Hui et al., 2003). L'apport hebdomadaire maximal admissible de cadmium pour l'adulte se situe entre 0,4 et 0,5 mg. La consommation quotidienne d'eau à la concentration maximale acceptable de cadmium fournirait environ 12% de l'apport maximal admissible (Frangi & Richard, 1997).

Le cadmium à l'état métallique sous forme fragmenté (poussières) peut pénétrer dans l'organisme vivant par les voies respiratoires déjà au niveau de la cavité nasale, mais surtout dans le tractus pulmonaire (bronches et alvéoles), qui peut ainsi transformer vers le sang, se distribuer dans l'organisme et provoquer des effets néfastes et toxiques au niveau de différentes cibles (poumons, reins, os, prostate, pancréas, thyroïde, vésicule biliaire...). Une exposition à long terme ou très intense peut provoquer une inflammation massive du parenchyme pulmonaire entraînant une pneumonie chimique sévère, « la pneumopathie cadmique » dont le taux de décès s'élève à 20%. La symptomatologie peut n'apparaître qu'après une phase de latence trompeuse. De ce fait le cadmium métallique et ses composés divalents sont classés cancérigènes chez l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (Frangi & Richard, 1997).

### III.11.1.2. Description du montage expérimental pour l'élimination du cadmium

Les microalgues isolées (*Aphanocapsa zanardinii* et *Chlorella vulgaris*) qui ont été cultivées dans un milieu de culture spécifique (BBM), ont été par la suite mises en culture dans diverses concentrations en cadmium. Le milieu de culture liquide Bold a été amendé avec trois concentrations croissantes du cadmium, à savoir 50 mg/L (Traitement 1), 100 mg/L (Traitement 2) et 250 mg/L (Traitement 3), tandis que le milieu Bold seul a servi de témoin. Des cultures mères en milieu liquide des ces deux espèces isolées (*Aphanocapsa zanardinii* et *Chlorella vulgaris*) ont été préalablement lancées pour servir comme inoculum dans ces expériences. Les expériences sont réalisées dans des flacons de 250 ml contenant des échantillons à tester de 150 ml (culture + milieu), chaque flacon est inoculé par un volume de 1 ml contenant la culture d'une espèce de microalgues. Les flacons sont fixés à un agitateur orbital tournant à 150 tr/min. La température de la chambre a été maintenue à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . L'éclairage était fourni par des lampes fluorescentes blanches froides continues à 4000 lux avec une photopériode de 16h lumière/8h

obscurité. Les expériences étaient menées pendant 30 jours, et tous les tests ont été effectués en triple.

NB : tout le matériel et la verrerie utilisés dans notre étude ont été lavés, rincés avec l'eau distillée et stérilisés par autoclavage (**Modelé SYSTEC VB-120**) à 120 °C pendant 120 min. Le pH du milieu de culture des espèces de microalgues a été ajusté à 6,5 en utilisant une solution de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH).



**Figure III. 20: Cultures mères en milieu liquide amendé du cadmium des microalgues en croissance *Chlorella vulgaris* et *Aphanocapsa zanardinii*.**

Les densités optiques initiales des cultures des microalgues ont été déterminées. Le suivi de la croissance des microalgues s'effectue chaque 48 h par la mesure de la densité optique par spectrophotomètre UV-visible (**Modèle HELIOS EPSILON 3SGN006008**) à une longueur d'onde de 600 nm, par numération cellulaire et par la matière sèche pendant 30 jours.

### ***III.11.1.3. Centrifugation et récupération de la biomasse***

Chaque 5 jours de culture les flacons sont récupérés et centrifugés. Le contenu de chaque flacon (milieu de culture + Cd<sup>2+</sup> et la biomasse algal) est transféré dans des tubes coniques de 50 ml puis centrifugée à 4000 tours pendant 15 min à T = 24 C° pour séparer la biomasse (culot) et le milieu de culture (surnageant). Le surnageant est analysé pour doser la concentration en Cd<sup>2+</sup>.

La centrifugation et la récupération de la biomasse algale sont effectuées au niveau du laboratoire d'électrophorèses du centre de recherche en biotechnologie (CRBt), Constantine. Les flacons sont transportés dans une glacière au laboratoire privé Horizon Analyse du Sol et des Eaux à Annaba pour faire le dosage du cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) selon la méthode spectrophotométrie méthode à la dithizone. Le pH du milieu lors de l'analyse du cadmium est égal à 5 afin d'éviter le dépôt de cadmium dans le milieu.

#### III.11.1.4. Préparation de l'Eau usée synthétique

Pour la culture des microalgues (*Nitzschia sp*) dans le photobioréacteur de traitement biologique des eaux usées (PBRT), nous avons préparé une eau usée synthétique similaire dans sa composition aux eaux usées industrielles biodégradables.

Ces eaux usées synthétiques utilisées dans cette étude comme source de nutriments ont été préparé en mélangeant les 3 solutions respectivement:

- **Solution 1** : Réalisée en ajustant les éléments majeurs (**Tab. II.5**) pour que le milieu soit riche en phosphate, nitrate et sulfate (source de nutriment), avec un apport supplémentaire égale 10 ml d'une solution de silicate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) à une concentration de 2 g/L (nécessaire pour le développement des diatomées *Nitzschia sp.*), et 5 ml des éléments des métaux traces (**Tab. II.5**). Ces ingrédients sont dissous dans un litre d'eau distillée stérile.
- **Solution 2** : Afin de favoriser encore la biodégradabilité de notre eau usée synthétique, nous préparons une solution de Xylène avec 500 ml d'eau distillée et 6 ml de xylène puis mettre cette solution à l'étuve à une température égale à 120°C pendant 3 heures, laisser refroidir pour pouvoir la mélanger avec les autres réactifs. En ajoutant 10 ml de la solution de xylène puis mettre 15 ml de glycérol.
- **Solution 3** : Nous avons mélangé 100 g d'extrait de sol avec un volume de 1 L d'eau distillée. Le mélange est autorisé à laisser reposer 30 minutes puis filtrer une première fois en utilisant une passoire pour enlever les débris et les autres salissures et micro-organismes. La purification a été effectuée par décantation et filtrations successives, jusqu'à filtration finale en flacons stériles. A la fin nous prenons un volume égal à 4 ml et nous le mélangeons avec la solution 1 et la solution 2. Poser le flacon sur un agitateur magnétique pendant 30 min pour homogénéiser la solution résultante.

Tableau III. 5: Composition chimique de l'eau usée synthétique

- **Éléments majeures :**

Éléments	Concentration (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,36
Na <sub>2</sub> .EDTA	1
Na <sub>2</sub> .CO <sub>3</sub>	2

- **Métaux traces :**

Éléments	Concentrations (g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,61
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,69
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,87
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,025

Un volume total de 10 L a été préparé puis stérilisé dans des petits flacons en verre stériles afin d'éviter toute contamination bactérienne ou par d'autres microorganismes et promouvoir le traitement biologique en utilisant uniquement nos microalgues isolées.

Les microalgues isolées ont été cultivées dans des photobioréacteurs séparément.

### **III.11.2. Bioremédiation des eaux contaminées par du pétrole brut en utilisant des microalgues**

Pour la culture des microalgues dans des eaux contaminées par du pétrole brut, nous avons suivi les mêmes étapes que pour la culture de ces microalgues dans les différentes concentrations en cadmium. Le repiquage est réalisé régulièrement chaque 3 jours, d'un volume initial de 250 ml un volume final de 1.5 litres autour d'un bec bunsen, afin d'éviter la contamination du milieu de culture et l'échantillon de microalgue et travailler dans des

conditions de stérilisation. L'intérêt de cette culture était de permettre une bonne croissance des microalgues tolérantes à la pollution.

### A. Choix du substrat

Le substrat retenu pour cette étude est le pétrole brut, il est constitué de plusieurs hydrocarbures qui sont des substances reconnues par leur toxicité et leur persistance dans les milieux. Il est utilisé dans notre étude comme seule source de carbone et d'énergie pour la culture des microalgues.

### B. Dégradation du Pétrole brut

Les cultures sont réalisées dans des fermenteurs miniaturisés formant un système clos. Il s'agit de flacons en verre de 250 ml de capacité contenant des concentrations de pétrole brut croissante de l'ordre de 0,1%, 0,5% et 1 % comme seule source de carbone et d'énergie dans un volume de 150 ml. Une série de flacons inoculés par ces deux souches de microalgues isolées (*Aphanocapsa zanardinii* et *Chlorella vulgaris*) ont été cultivées en milieu aérobie (en présence d'oxygène). Les cultures sont incubées dans une étuve microbiologique à une température égale à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sous une agitation continue de 150 tr/min (Liu et al., 2016) et une source de lumière d'une intensité de 4000 lux, avec une photopériode de 16h lumière/8h obscurité. Puis nous procédons à une série de prélèvement périodique durant 30 jours afin de suivre la dégradation du pétrole brut, par un consortium de souches de microalgues isolées à partir de la station 1 (zone estuaire la plus contaminée par les rejets de la raffinerie) (Figure III.21).



Figure III. 21: Les trois concentrations de Pétrole brut utilisées (0,1%, 0,5% et 1%).

### C. Témoins et contrôle

Deux témoins sont réalisés dans les mêmes conditions d'expérience par les deux souches de microalgues *Chlorella vulgaris* et *Aphanocapsa zanardinii* en absence du pétrole brut.

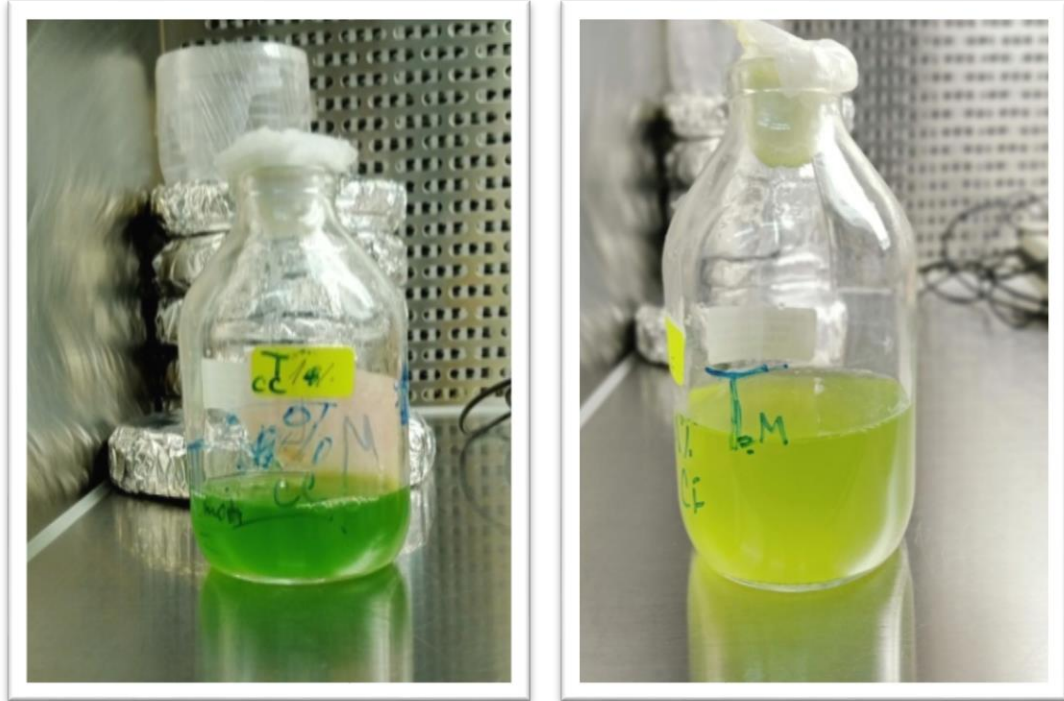


Figure III. 22: Témoins des espèces sans pétrole brut

### D. Suivi de l'évolution de la biomasse

Ce suivi a été réalisé grâce à la mesure de la cinétique de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre UV-visible à 600 nm pour chaque prélèvement et pour chaque souche séparément. La production de la biomasse permet de nous donner une idée sur la dégradation du substrat qui est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. Nous déterminons aussi cette croissance en biomasse par numération cellulaire (NC).

# **CHAPITRE IV :**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

---

## INTRODUCTION

Dans ce chapitre l'influence de la composition des eaux usées et leur contamination par les phosphates, les nitrates, le cadmium et le pétrole brut sur la croissance de trois espèces de microalgues (*Chlorella vulgaris*, *Aphanocapsa zanardinii* et *Nitzschia sp.*) a été étudiée. Les expérimentations menées avaient pour objectifs de vérifier l'efficacité de ces microalgues isolées à réduire cette pollution à partir d'un échantillon d'eau usée synthétique dont les caractéristiques étaient similaires à celle d'une eau usée industrielle.

### IV.1. CARACTERISATION DES EAUX DES SITES DE PRELEVEMENT

#### IV.1.1. Caractérisation bactériologique

Le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT) à partir des trois sites d'échantillonnage a été réalisé chaque 24h pendant 3 jours (72 heures) (**Tableau IV.1**).

**Tableau IV. 1: Dénombrement de FAMT**

	St1	St2	St3
$N_{\text{FAMT}}$ (UFC/ml)	$(1,16 \pm 0,55) \cdot 10^4$	$(7,6 \pm 0,02) \cdot 10^3$	$(3,1 \pm 0,07) \cdot 10^3$

On remarque que la FAMT dénombrée à partir des trois sites d'échantillonnage est très proche l'une de l'autre avec une légère augmentation du nombre de ces bactéries au niveau de la station St1 ( $1,16 \cdot 10^4$  UFC/ml).

Ces nombres de bactéries restent inférieurs à la norme maximale admissible ( $10^7$  à  $10^8$  bactéries/L) pour les eaux de rejet et eaux superficielles, en raison de leur sensibilité aux conditions de forte salinité de l'eau de mer (zone estuaire de prélèvement) et de température de l'eau relativement basse (**Tableau IV.2**) au moment du prélèvement pendant trois jours successifs. En plus des courants marins qui lessivent et diluent les effluents liquides au niveau de nos trois sites de prélèvement.

#### IV.1.2. Caractérisation physicochimique

La connaissance des paramètres physicochimiques des eaux des sites d'échantillonnage permet de nous donner une appréciation préliminaire de la qualité et le degré de la pollution de l'écosystème à partir duquel nos microalgues ont été isolées. Autrement dit, cette caractérisation physicochimique des eaux nous permet de mieux connaître la niche écologique de nos espèces

sélectionnées et isolées à partir de ces trois sites de prélèvement. Les résultats obtenus des paramètres mesurés sont regroupés dans le tableau (IV.2) :

**Tableau IV. 2: Paramètres physicochimiques de l'eau des trois sites de prélèvement des microalgues**

	St1	St2	St3
<b>T (°C)</b>	18,18±0,11	13,79±0,01	14,30±0,13
<b>pH</b>	8,03±0,01	8,18±0,02	7,3±0,09
<b>CE (mS/cm)</b>	50,475±5,28	54,025±3,07	53,320±4,28
<b>O<sub>2</sub> dis (mg/L)</b>	4,7±0,10	4,25±0,21	5,5±0,07
<b>DCO (mg/L)</b>	285,58±7,67	279,752±19,86	227,37±19,18
<b>DBO<sub>5</sub> (mg/L)</b>	5,752±1,82	5,752±1,82	5,752±1,82
<b>MES (mg/L)</b>	256±24	262±15,87	232±28
<b>COT (mg/L)</b>	0,471±0,001	0,471±0,001	0,471±0,001
<b>HAP (mg/L)</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>HT (ppm)</b>	205±9,16	136±3,60	123±7,93
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg/L)</b>	0,236±0,017	0,098±0,013	0,069±0,010
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L)</b>	0,05±0,002	0,05±0,002	0,05±0,002
<b>N Kjeldahl (mg/L)</b>	1±0,04	1±0,04	1±0,04
<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (mg/L)</b>	0,158±0,071	0,114±0,006	0,107±0,078

#### IV.1.2.1. La température (T)

La température de l'eau joue un rôle très important dans la solubilité des sels et des gaz dont, entre autres, l'oxygène indispensable à l'équilibre de la vie aquatique. Par ailleurs, la température augmente les vitesses des interactions chimiques et biochimiques d'un facteur de 2 à 3 pour un accroissement de température de 10°C. L'activité métabolique des organismes aquatiques est donc également accélérée lorsque la température de l'eau s'accroît (Nur & Buma, 2019). La température de l'eau enregistrée au niveau de St1 (zone estuaire après le déversement des eaux usées de la raffinerie) était la plus élevée comparée à celles mesurées au niveau des deux autres stations St2 et St3 (13,79±0,01 et 14,3±0,13 °C respectivement) (Tableau IV.2). La température élevée des eaux de l'effluent de sortie qui sont utilisées dans le processus de refroidissement ont probablement étaient la cause principale de l'augmentation de la température au niveau de cette station St1 (18,18±0,11 °C). Les valeurs de température enregistrées indiquent que les espèces de microalgues présentes dans les trois sites sont mésophiles.

#### IV.1.2.2. Le potentiel d'hydrogène (pH)

Selon l'OMS qui exige que le pH des eaux de surface doit être compris dans l'intervalle de 6,5 et 8,5 (Guergazi & Achour, 2005), on peut dire que la qualité des eaux de la zone d'étude en termes d'acidité et d'alcalinité est bonne.

Les résultats obtenus ne montrent pas une grande variation entre les trois stations de prélèvement pour ce paramètre. Les valeurs enregistrées sont globalement très proches et sont comprises entre  $7,3 \pm 0,09$  enregistrée à la St3 et  $8,18 \pm 0,02$  enregistrée à la St2. Le pH est l'un de la liste des paramètres majeurs à prendre en compte pour une culture stable et croissante. Savoir l'interpréter et le réguler est une étape cruciale dans la production de microalgues (Blinda, 2007). Chaque microalgue a son pH optimal. La chlorelle possède un pH optimal de 8,5 à 9, elle rejoint donc la famille des espèces alcaliphiles, la microalgue *Chlorella vulgaris* croît pour des pH compris entre 5 et 9, avec un pH optimal compris entre 7 et 8 (Richmond, 2004). Pour la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, le pH optimal se situe autour de 9.5 (Vonshak, 1997). Les cyanobactéries du genre *Anacystis* (*Aphanocapsa*) peuvent supporter des pH faibles à neutres, et sont donc qualifiés comme des espèces acidophiles et neutrophiles.

C'est un paramètre indispensable à surveiller pour la croissance des microalgues. Si notre culture se trouve dans un environnement avec un pH non adapté, elle peut voir sa croissance ralentie ou inhibée. Il est même possible de perdre la culture.

#### IV.1.2.3. La conductivité électrique (CE)

La conductivité électrique (CE) est une formule numérique qui exprime la capacité d'un milieu aqueux à conduire le courant électrique. La plupart des sels minéraux en solution sont de bons conducteurs. Par contre, les composés organiques sont de mauvais conducteurs.

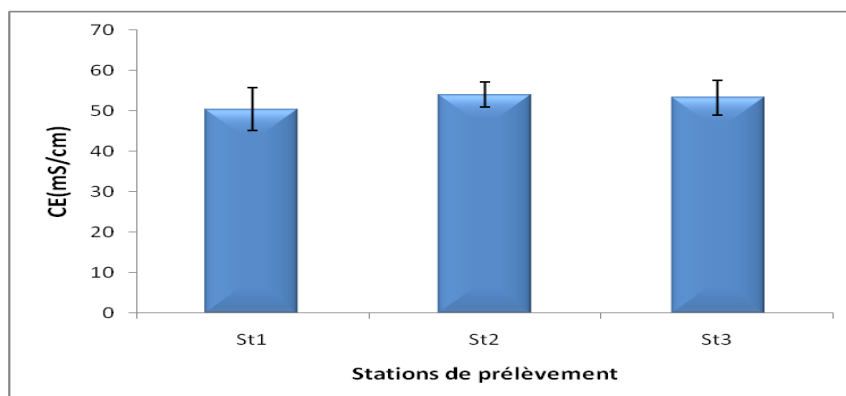


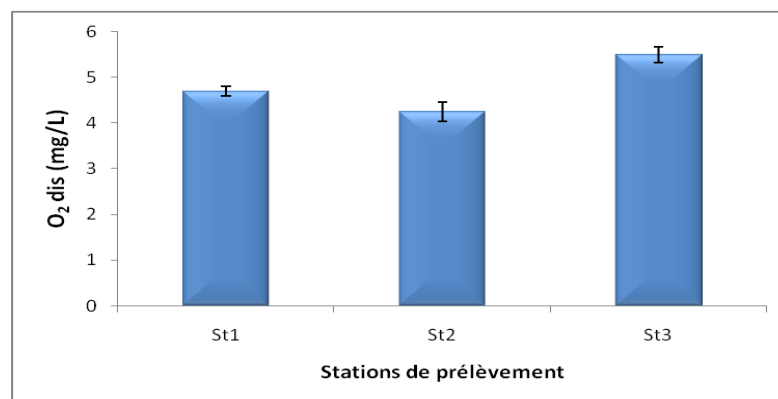
Figure IV. 1: Les valeurs de la conductivité des trois sites de prélèvement

La conductivité (CE) reflète le degré de minéralisation de l'eau et renseigne sur le taux de salinité. Les valeurs de la conductivité électrique de l'eau enregistrées dans les trois sites sont comprises entre  $50,47 \pm 5,28$  mS/cm au niveau de la station St1 (zone estuaire),  $54,02 \pm 3,07$  et  $53,32 \pm 4,28$  mS/cm au niveau de la station St2 et la station St3 respectivement (**Figure IV.1**). Cette forte salinité est due à la situation des points d'échantillonnage dans l'eau de mer.

Ceci dit que nos espèces de microalgues sélectionnées supportent des conductivités très élevées correspondant à celles des eaux polluées, et sont ainsi adaptées à des conditions extrêmes de croissance dans des milieux marins salés. Du fait de leur capacité à s'adapter à une large gamme d'environnements, les microalgues sont en mesure de supporter des milieux aux propriétés physicochimiques extrêmes absolument diversifiées. Ainsi certaines microalgues sont adaptées à l'eau douce (*Chlorella*, *Synura*, *Oscillatoria*...), d'autres aux milieux marins (*Rhodella*, *Porphyridium*...) et certaines sont des espèces halophiles (*Gyrodinium*, *Dunaliella*...). Les microalgues marines peuvent s'adapter à des milieux de concentrations en sel (NaCl) de 10% à 50% (m/v) en fonction de la microalgue (**Asfour, 2019**). Le changement de salinité du milieu conduit à un stress osmotique et ionique qui peut s'interpréter par la formation de dépôts et un accroissement du contenu lipidique des algues. Ainsi, (**Filali, 2012**) ont noté lors du stress ionique chez certaines espèces de *Dunaliella*, une augmentation de la concentration en caroténoïdes s'ensuit une inhibition de leur croissance.

#### IV.1.2.4. L'oxygène dissous ( $O_2$ dis)

Les concentrations en oxygène dissous forment l'un des plus importants paramètres de la qualité des eaux pour la vie aquatique. Il est également un bon indicateur de pollution d'un écosystème aquatique et du suivi de son autoépuration. Il est aussi considéré comme le facteur essentiel à la vie aquatique, en particulier aux organismes assurant l'autoépuration des hydro-systèmes (**Derwich et al., 2008**).



**Figure IV. 2:** Les valeurs de l'oxygène dissous pour les trois sites

Les valeurs enregistrées de l'oxygène dissous dans l'eau sur les trois sites étaient  $4,7\pm 0,10$  pour St1,  $4,25\pm 0,21$  mg/L au niveau de la station St2 et  $5,5\pm 0,07$  mg/L enregistrée au niveau de la station St3 (**Figure IV.2**).

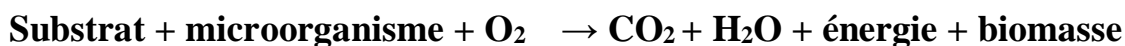
Une concentration élevée en dioxygène dissous ( $O_2$ dis) est souvent le résultat d'une activité photosynthétique non négligeable, l'oxygène est impliqué dans différentes voies, il est produit par photosynthèse et il est consommé par les différentes activités respiratoires tels que la photorespiration, la respiration à la lumière, la respiration à l'obscurité, la chlororespiration, la réaction de Mehler pour protéger contre la photoinhibition (**Badger et al., 2000; Christine & Graham, 2000**). Sa présence en grande concentration en photobioréacteurs peut avoir un effet inhibiteur de croissance. Si une concentration en oxygène importante est combinée à une concentration moins importante en dioxyde de carbone, cela est connu pour stimuler la photorespiration chez les microalgues. A l'inverse, à des fortes intensités lumineuses, la concentration d'oxygène dissous pourra protéger l'appareil photosynthétique. La photo-respiration et la réaction de Mehler seront en effet activées, protégeant ainsi le PSII de l'énergie excessive reçue (**Wu et al., 1991**). **Torzillo et al. (1984)** étaient les premiers à mettre en évidence l'inhibition de la photosynthèse par une concentration d'oxygène dissous élevée chez *Arthrospira maxima*.

#### **IV.1.2.5. La DCO et la DBO<sub>5</sub>**

La demande chimique en oxygène (DCO) représente la quantité d'oxygène emprunté à un oxydant dans les conditions standards et permet d'apprécier la teneur en matière oxydables de ce dernier (**Okkacha, 2008**).

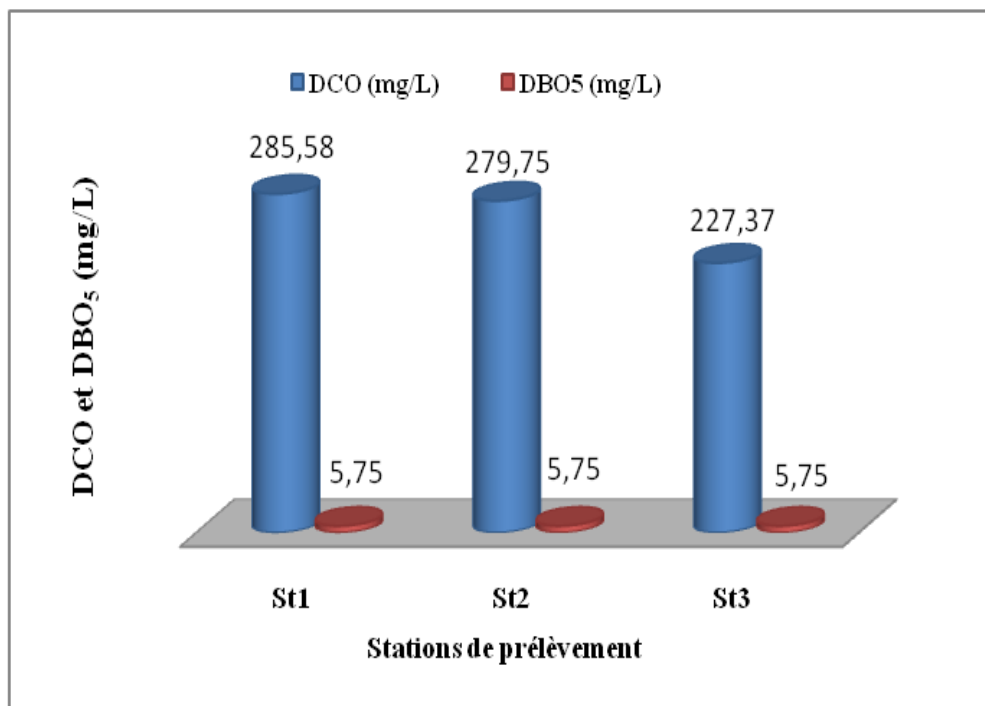
La demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>) étant la quantité d'oxygène consommée par les bactéries à 20°C à l'obscurité et pendant 5 jours. Ce temps d'incubation d'un échantillon préalablementensemencé assure l'oxydation biologique d'une fraction de matière organique carbonée.

Ces paramètres mesurent la quantité d'oxygène nécessaire à la destruction des matières organiques grâce aux phénomènes d'oxydation par voie aérobie (en présence d' $O_2$ ). Elle se résume à la réaction biochimique suivante :



C'est-à-dire, dans les eaux usées, les bactéries consomment l'oxygène dissous libéré par les microalgues pour dégrader la matière organique (MO) en dioxyde de carbone et en eau lors de l'interaction algues-bactéries. Ce procédé est une démonstration que les microalgues fournissent

une quantité substantielle de molécules d'oxygène (O<sub>2</sub>) comme agent oxydant pour l'oxydation bactérienne et réduit donc les valeurs de la DBO et la DCO dans les eaux usées.



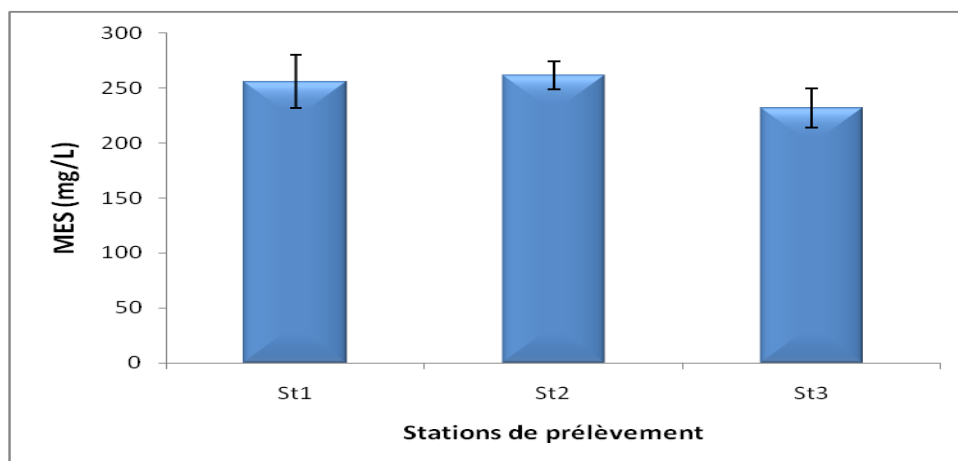
**Figure IV. 3 : Les valeurs de la DCO et la DBO<sub>5</sub> obtenues pour les trois sites.**

Les valeurs de la DCO, recueillies durant cette étude, au niveau des trois sites de prélèvement varient entre  $227,37 \pm 19,18$  mg/L et  $285,58 \pm 7,67$  mg/L (**Figure IV.3**). Ces teneurs élevées de la demande chimique en oxygène (DCO) concernent spécialement les unités industrielles ce qui prouve une inexistence ou un mauvais traitement des rejets. Tandis que la DBO<sub>5</sub> est identique dans les trois sites de prélèvement est égale  $5,752 \pm 1,82$  mg/L.

#### **IV.1.2.6. Les matières en suspension (MES)**

C'est un paramètre très important à contrôler car il affecte la transparence de l'eau et diminue la pénétration de la lumière et, par la suite, la photosynthèse des microalgues. Par ailleurs, les matières en suspension peuvent accumuler des quantités élevées de matières toxiques (métaux, pesticides, huiles minérales, hydrocarbures aromatiques polycycliques).

La détermination des matières en suspension (MES) est essentielle pour évaluer la répartition de la charge polluante entre pollution dissoute et pollution sédimentée, car le devenir de ces deux composantes est très différent, tant dans le milieu naturel que dans les systèmes d'épuration.



**Figure IV. 4: Les valeurs de MES pour les trois sites de prélèvement.**

Dans cette étude, les valeurs enregistrées des matières en suspension ne montrent pas une grande variation, elles oscillent entre  $232 \pm 28$  mg/L et  $262 \pm 15,87$  mg/L (**Figure IV.4**), où les valeurs minimales sont enregistrées au niveau de la St3. Ces résultats montrent que les sites étudiés sont très turbides avec une valeur moyenne de 250 mg/L. La turbidité représente l'opacité d'un milieu trouble, c'est la réduction de la transparence d'un liquide due à la présence des MES fines, comme les argiles, les grains de silice et les matières organiques. La turbidité varie suivant les matières en suspension (MES) de l'eau.

#### ***IV.1.2.7. Les différentes formes de l'azote***

Les nitrites constituent une étape importante dans la métallisation des composés azotés; ils s'insèrent dans le cycle de l'azote entre l'ammoniaque et les nitrates; leur présence est due soit à l'oxydation bactérienne de l'ion ammoniaque soit à la réduction des nitrates. Ils ne représentent qu'un stade intermédiaire et sont facilement oxydés en nitrates (**Sahnoun, 2010**).

Les nitrates sont largement utilisés pour la culture de microalgues par rapport aux sels d'ammonium car ils sont plus stables avec moins de risque de changement de pH. De plus, les concentrations d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) supérieures à  $25 \mu\text{M}$  sont toxiques pour les microalgues ; ainsi, le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) est couramment utilisé dans les milieux de culture (**Procházková et al., 2014**).

L'analyse des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) au niveau de l'eau de mer de Skikda a montré que les teneurs relevées sont faibles dans les eaux des 3 stations étudiées. En effet, les valeurs de la concentration des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) varient entre  $0,069 \pm 0,010$  et  $0,236 \pm 0,017$  mg/L, Les concentrations de ( $\text{NH}_4^+$ ) et (NK) sont identiques pour les trois sites à la valeur de ( $0,05 \pm 0,002$  et  $1,00 \pm 0,04$ ) mg/L respectivement. Ces teneurs peuvent être le résultat des produits

azotés pouvant subir une nitrification par les microorganismes des eaux, ou une oxydation par l'oxygène dissous dans l'eau.

L'utilisation du nitrate comme substrat azoté chez les microalgues est très répandue au niveau de la cellule, cela requiert qu'il soit réduit au niveau intracellulaire en ammonium pour qu'il soit assimilé (Carlson, 1973). Les différentes étapes d'assimilation du nitrate dans les cellules sont donc les suivantes :

1. Le nitrate est assimilé par les cellules, une nitrate réductase catalyse le nitrate et le réduit en nitrile qui sera à son tour transporté aux chloroplastes.
2. Une enzyme nitrite réductase catalyse le nitrile en ammonium pour qu'il soit enfin incorporé dans les squelettes carbonés.

L'ammonium, étant réduit directement, il est assimilé facilement par les microalgues et nécessite au final moins d'énergie (Podevin et al., 2015). Néanmoins, toutes les souches ne peuvent assimiler l'azote sous cette forme. On note également que des concentrations élevées peuvent inhiber la croissance des microalgues. Une concentration >10mM d'ammonium inhibe la croissance de *Dunaliella tertiolecta* (Chen et al., 2011) et une concentration de 15mM inhibe la croissance de *Arthrospira platensis* (Ferreira et al., 2010). Cet effet inhibiteur est causé par le fait que le transport excessif d'ammonium au sein des cellules peut empêcher la formation d'ATP dans le chloroplaste, provoquant ainsi une inhibition de la photosynthèse (Ramanna et al., 2014).

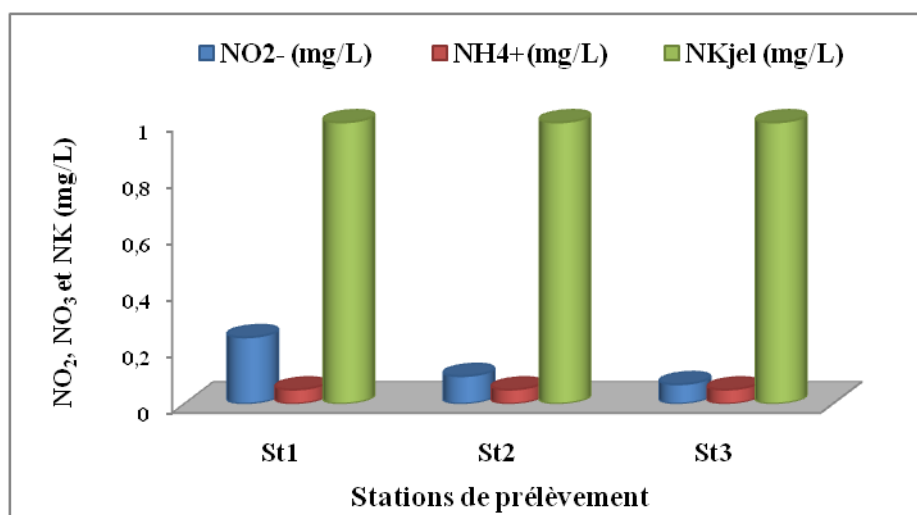


Figure IV. 5: Les valeurs des nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), d'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) et de l'azote Kjeldhal (NKdj) dans les trois stations de prélèvement.

### III.2.2.8. Les teneurs en phosphates

Le phosphore intervient dans la synthèse des acides nucléiques et des phospholipides (constituants des membranes cellulaires) et dans la constitution des molécules du métabolisme énergétique, l'ATP et le NADPH. Sa concentration cellulaire va donc avoir un impact direct sur la production de la biomasse. Chez *Chlorella vulgaris*, il a été montré que les cellules déficientes en phosphore augmentaient la production de glycolate via le mécanisme de photo-respiration permettant ainsi la dissipation de l'énergie absorbée en excès par le photosystème, évitant ainsi d'endommager la cellule. Cependant, les mécanismes de régulation du manque de phosphore par la cellule restent peu connus (Moseley et al., 2006).

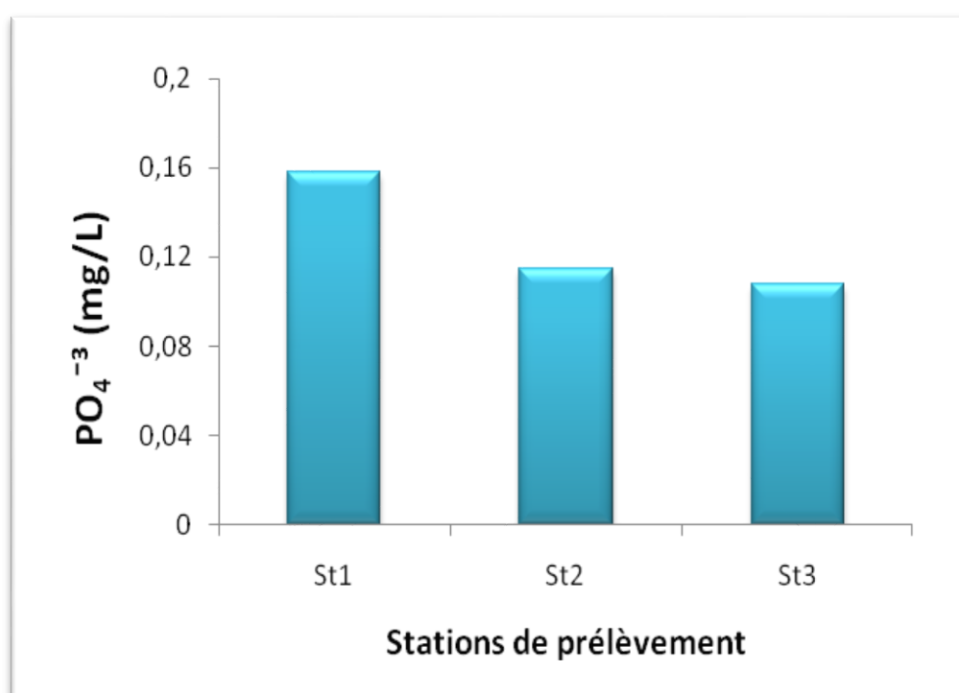


Figure IV. 6: Les valeurs des phosphates pour les trois sites de prélèvement.

Les teneurs en phosphates des eaux des différentes stations varient entre  $0,10 \pm 0,078$  mg/L et  $0,15 \pm 0,071$  mg/L.

### IV.1.2.9. La caractérisation de la fraction organique

Le COT est l'un des paramètres de la contamination organique le plus couramment utilisé pour évaluer la charge organique des effluents. Il englobe à la fois le Carbone Organique Dissous et la matière organique particulaire. La concentration du COT est égale à  $0,471 \pm 0,001$  mg/L pour les trois stations. Les HAPs sont nul dans les trois sites tandis que les concentrations des HT sont ( $205 \pm 9,19$  ;  $136 \pm 3,60$  et  $123 \pm 7,93$ )

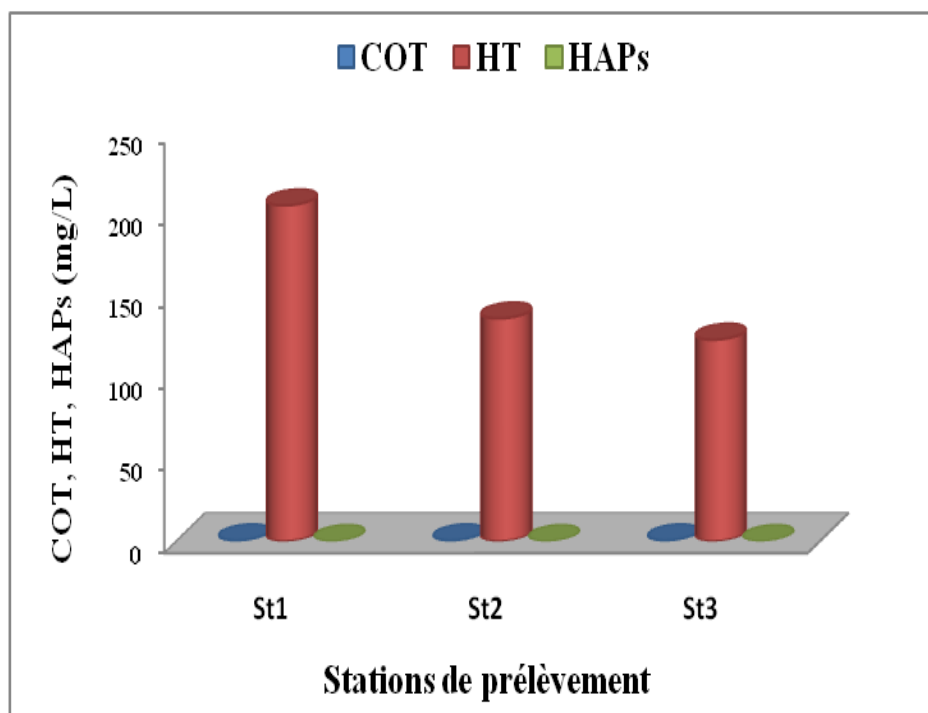


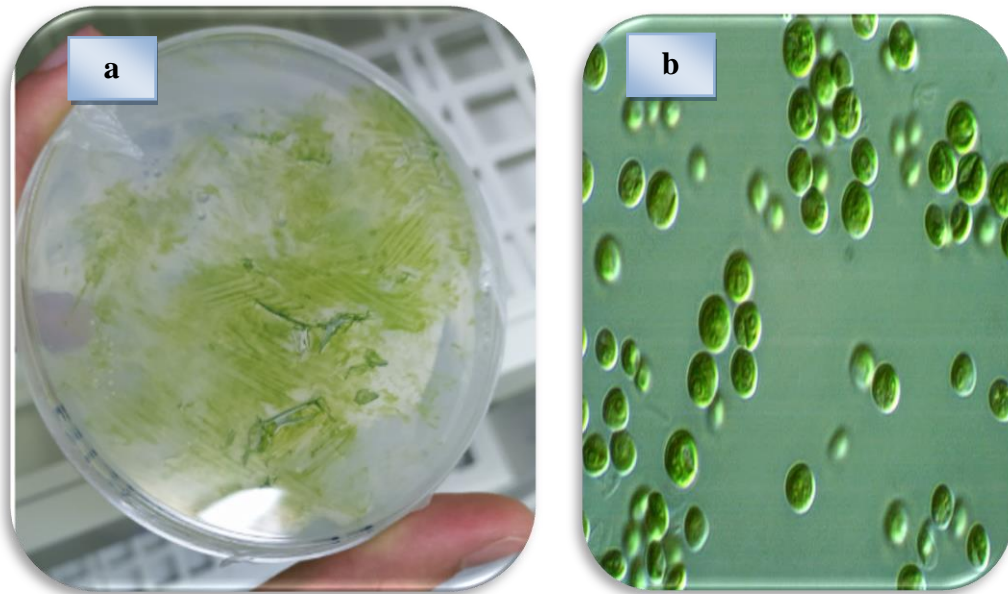
Figure IV. 7: Les valeurs du carbone organique total (COT), hydrocarbures totaux (HT) et (HAPs).

## IV.2. IDENTIFICATION DES ESPECES

Dans la présente étude, trois espèces de microalgues ont été isolées à partir de la zone estuaire et les stations de prélèvement de l'eau de mer de la baie de Skikda, en étudiant leur aspect macroscopique et microscopique. Les résultats montrent que nos microalgues appartiennent aux genres de *Chlorella vulgaris* (microalgues vertes), *Aphanocapsa zanardinii* (*Anacystis*) (Cyanobactéries), et *Nitzschia sp.* (diatomées, microalgues brunes).

### IV.2.1. *Chlorella vulgaris*

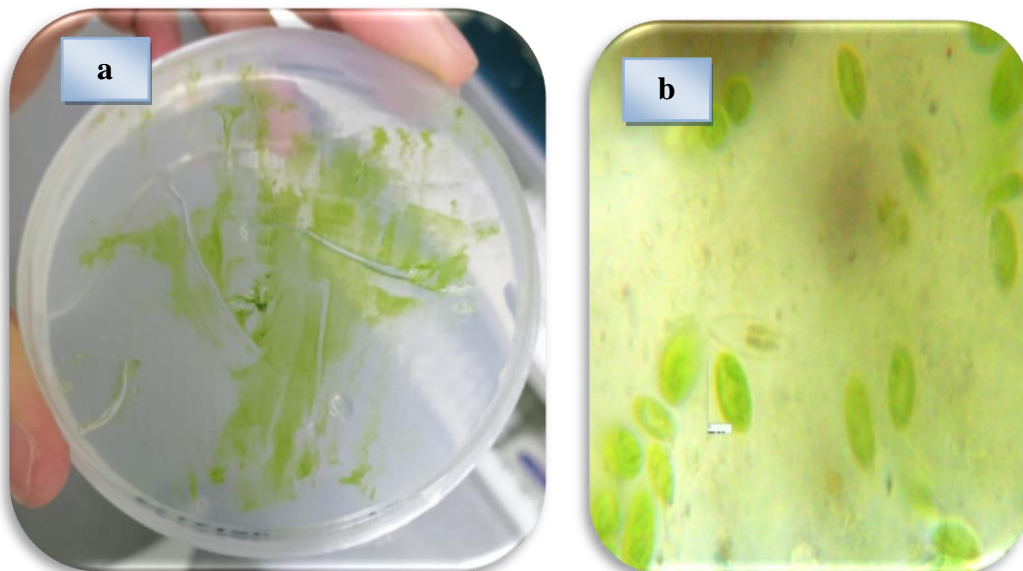
*Chlorella vulgaris* était la première espèce isolée de notre site d'échantillonnage qui appartient à la classe des chlorophycées. Elle est unicellulaire eucaryote (possédant un noyau) (Figure IV.8) a une taille qui varie de 3 à 5  $\mu\text{m}$  et se trouve sous deux formes ronde ou ellipsoïdale. Elle contient un chloroplaste pariétal qui se compose des caroténoïdes, de la chlorophylle a et b, un pyrénoloïde, des thylakoïdes, du matériel génétique et des grains d'amidon (Clément-Larosière et al., 2014; Rowley, 2010). Cette microalgue a un mode de reproduction asexuée, la cellule mère se divisant en quatre spores qui s'échappent et germent pour donner un organisme identique à celui qui les a produit (Richmond, 2004).



**Figure IV. 8: Observation macroscopique (a) et microscopique (x1000) (b) de *Chlorella vulgaris* (Photos personnelles)**

#### **IV.2.2. *Aphanocapsa zanardinii***

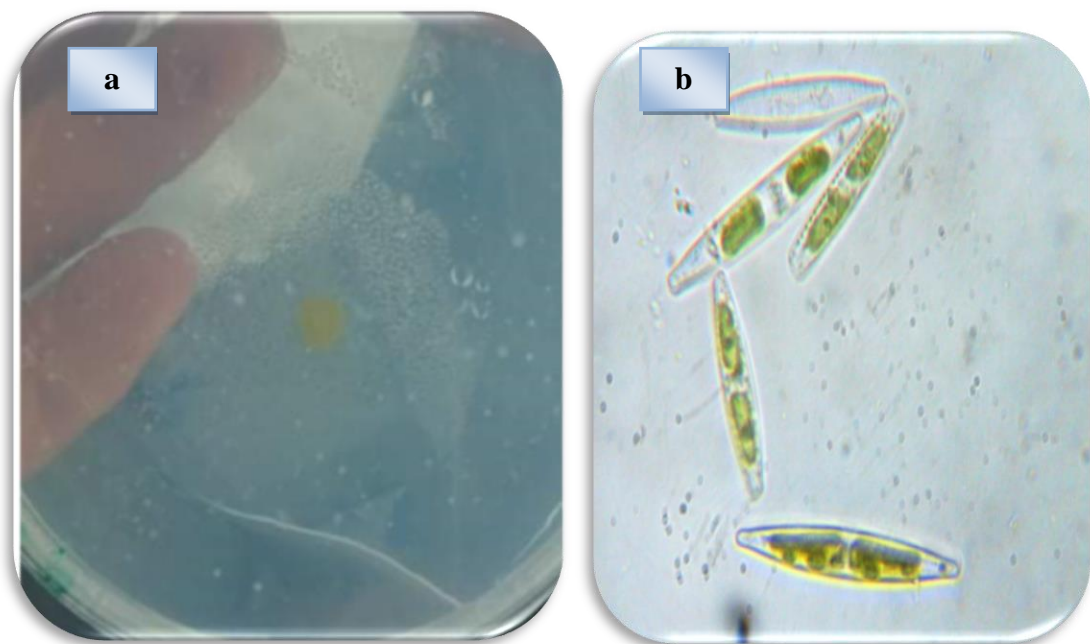
Le genre *Aphanocapsa* (*Anacystis*) fait partie des cyanobactéries (**Figure IV.9**) qui se trouvent principalement dans les petits plans d'eau des zones tempérées. Certaines espèces se trouvent également dans les zones littorales, les lacs, les marais et même dans les sols.



**Figure IV. 9 : Observation macroscopique (a) et microscopique (x1000) (b) de l'espèce *Aphanocapsa zanardinii* (Photos personnelles)**

### IV.2.3. *Nitzschia sp.*

Les cellules de *Nitzschia* sont généralement longues, droites et étroites mais peuvent être ovoïdes ou même légèrement sigmoïdes. Ils sont généralement isolés mais peuvent former des colonies étoilées ou vivre dans des tubes de mucilage (**Figure IV.10**). Les cellules contiennent généralement deux plastides qui sont vers chaque pôle de la cellule. Le système du raphé chez *Nitzschia* est fibulé et se trouve normalement sur ou près du bord de la surface valvulaire. Le raphé est sur les marges opposées des deux valves d'un frustule (symétrie nitzschioïde), contrairement à la position du raphé de *Hantzschia*.



**Figure IV. 10: Observation macroscopique (a) et microscopique (x1000) (b) de l'espèce *Nitzschia sp.***

### IV.3. SUIVI DE LA CINÉTIQUE DE CROISSANCE DES MICROALGUES

Les paramètres les plus importants régulant la croissance des microalgues sont la quantité et la qualité des nutriments, la lumière, le pH, la turbulence, la salinité et la température. Les courbes de croissance de la biomasse ont montré une gamme optimale de taux de croissance, qui est tirée des trois lots d'essai, on contrôlant leurs cultures dans leurs milieux de culture spécifiques.

**Tableau IV. 3 : Résultats de la croissance en biomasse de *Nitzschia sp.* en fonction des paramètres de contrôle de Conductivité, pH, Température et O<sub>2</sub> dissous.**

Temps (Jours)	*log[C]/L	CE (mS/cm)	O <sub>2</sub> dis (mg/L)
<b>J1</b>	25,25±0,98	4,2±0,05	8,7±0,09
<b>J7</b>	25,25±0,98	4,01±0,09	8,4±0,09
<b>J12</b>	26,84±0,23	3,9±0,01	7,9±0,02
<b>J15</b>	28,58±1,10	3,5±0,1	7,5±0,10
<b>J20</b>	28,95±0,66	3,1±0,13	7,31±0,03
<b>J22</b>	29,32±0,53	2,99±0,14	7,12±0,03
<b>J25</b>	30,22±1,04	2,76±0,11	6,33±0,02
<b>J27</b>	30,37±0,95	2,62±0,06	6,27±0,04
<b>J29</b>	30,9±0,74	2,4±0,07	6,25±0,07
<b>J39</b>	31,77±0,93	2,32±0,02	6,03±0,02
<b>J43</b>	31,86±0,78	2,29±0,01	5,76±0,01
<b>J46</b>	32,65±0,69	2,26±0,2	5,05±0,00
<b>J50</b>	33,09±0,17	1,98±0,1	4,99±0,07
<b>J53</b>	33,5±0,06	1,44±0,07	4,59±0,07
<b>J56</b>	33,64±0,27	1,36±0,02	3,37±0,01

\*log[C]/L : log décimal de la concentration en biomasse des diatomées présentes dans un (01) Litre de milieu de culture.

Le pH et la température ont été maintenus dans les intervalles optimaux de croissance des diatomées, qui sont de 20±0,33 à 25±0,84 °C pour la température, et de 6,5±0,24 à 8,5±0,68 pour le pH. Le taux de croissance  $\mu$  calculé pour l'espèce *Nitzschia sp.* est égal à (0,27jour<sup>-1</sup>) est inférieur à 1 et le temps de doublement (multiplication) de génération G=2,56 jours dans leur milieu de culture spécifique WC.

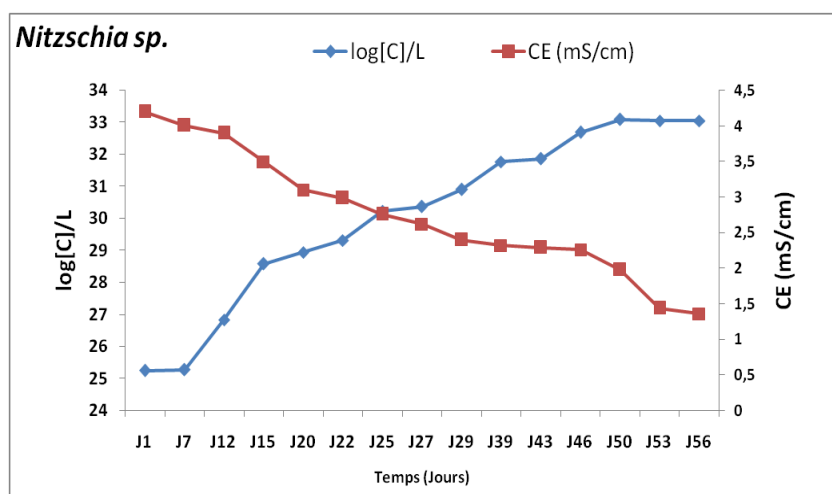
**Tableau IV. 4: Résultats de croissance en biomasse de *A. zanardinii* et *C. vulgaris* cultivées dans le milieu de culture BBM et BG11 respectivement.**

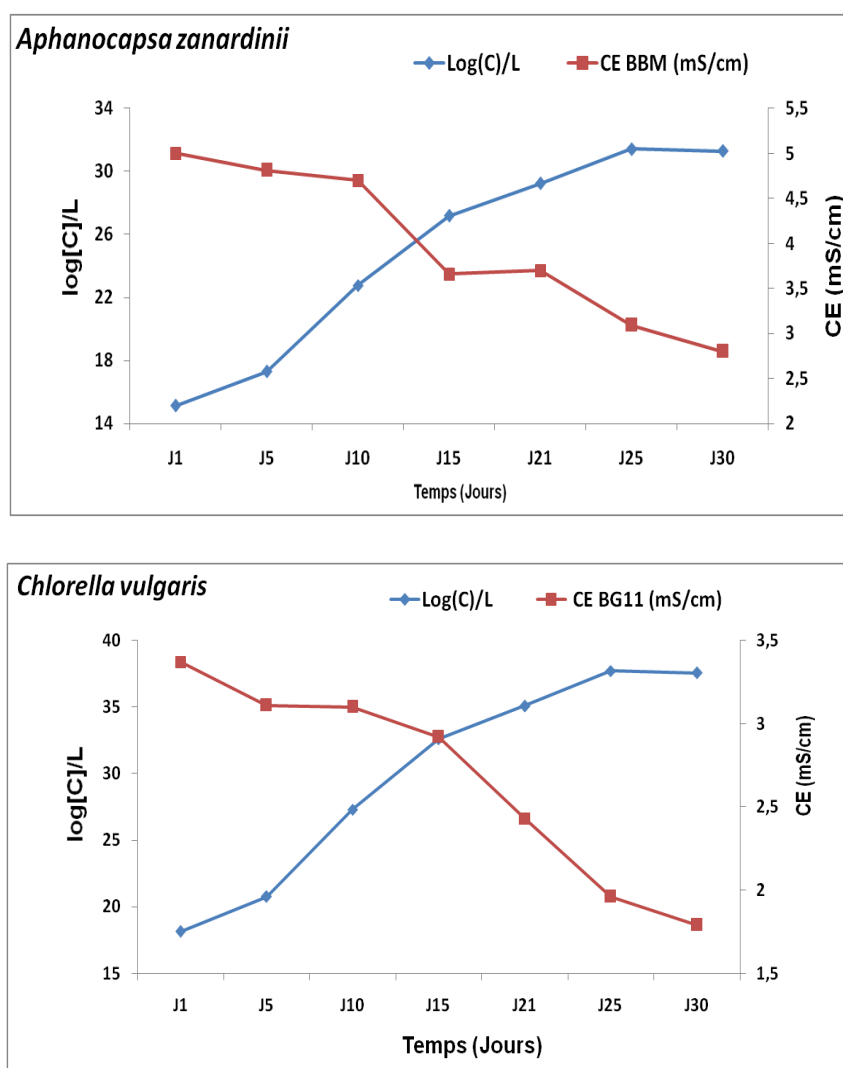
Temps (Jours)	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>			<i>Chlorella vulgaris</i>		
	Log(C)/L	O <sub>2</sub> dis BBM (mg/L)	CE BBM (mS/cm)	Log(C)/L	O <sub>2</sub> dis BG11 (mg/L)	CE BG11 (mS/cm)
<b>J1</b>	15,12±0,35	7,2±0,16	5,00±0,28	18,14±0,26	7,66±0,08	3,37±0,06
<b>J5</b>	17,3±0,26	6,45±0,20	4,81±0,10	20,76±0,19	7,59±0,23	3,11±0,10
<b>J10</b>	22,75±0,32	6,33±0,21	4,70±0,88	27,3±0,24	7,36±0,09	3,10±0,08
<b>J15</b>	27,17±0,26	6,12±0,23	3,66±0,51	32,6±0,19	7,01±0,06	2,92±0,02
<b>J21</b>	29,22±0,33	5,72±0,22	3,70±0,75	35,07±0,25	6,86±0,05	2,43±0,09
<b>J25</b>	31,41±0,25	5,26±0,25	3,09±0,53	37,7±0,18	6,57±0,30	1,96±0,03
<b>J30</b>	31,29±0,25	5,15±0,21	2,86±0,22	37,54±0,19	6,34±0,11	1,79±0,22

Pour la culture des diatomées (*Nitzschia sp.*) nous avons atteint un volume estimé à 8,5 L, après une durée de 55 jours car nous avons utilisées ces espèces microalgales pour la dépollution de l'eau usée synthétique (élimination de la pollution carbonée, azotée et phosphorée) dans notre photobioréacteur de traitement (PBRT). Mais pour les deux autre espèces (*A. zanardinii* et *C. vulgaris*) nous avons abouti un volume de culture égal à 1,5 L, après une période de 30 jours qui nous a servi pour la bio-élimination des métaux lourds (cadmium) et la dégradation du pétrole brute.

### IV.3.1. Suivi de la cinétique de la croissance en biomasse avec la CE

Les résultats de l'évolution de la concentration en biomasse et de la conductivité électrique du milieu de culture en fonction du temps sont représentés dans la **figure (IV.13)**.





**Figure IV. 11 : Evolution de la croissance en biomasse des trois espèces de microalgues (*Nitzschia sp. A. zanardinii* et *C. vulgaris*) et de la conductivité du milieu de culture (WC, BBM et BG11) respectivement en fonction du temps .**

D'après les résultats trouvés, nous avons observé que la croissance en biomasse des nos espèces dépend considérablement de la conductivité, il y a une diminution remarquable de cette dernière dans le milieu en fonction du temps lorsque le nombre des microalgues augmentent. A la fin de la culture, la valeur de la conductivité est abattue à  $1,36 \pm 0,02$  mS/cm par rapport à une valeur initiale de  $4,2 \pm 0,05$  mS/cm mesurée le premier jour pour les espèces de *Nitzschia sp* et atteint  $2,86 \pm 0,22$  et  $1,79 \pm 0,22$  mS/cm par rapport à une valeur initiale de  $5,00 \pm 0,28$  et  $3,37 \pm 0,06$  mS/cm pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* respectivement.

La diminution de la conductivité est traduite par une diminution des sels dissous dans le milieu de culture, ce qui prouve l'utilisation de ces sels par les microalgues pour leur multiplication.

IV.3.2. Suivi de la cinétique de la croissance en biomasse avec l'O<sub>2</sub>dissous

Le suivi de la variation de la concentration en biomasse et de l'oxygène dissous en fonction du temps sont regroupées dans la figure (IV.12).

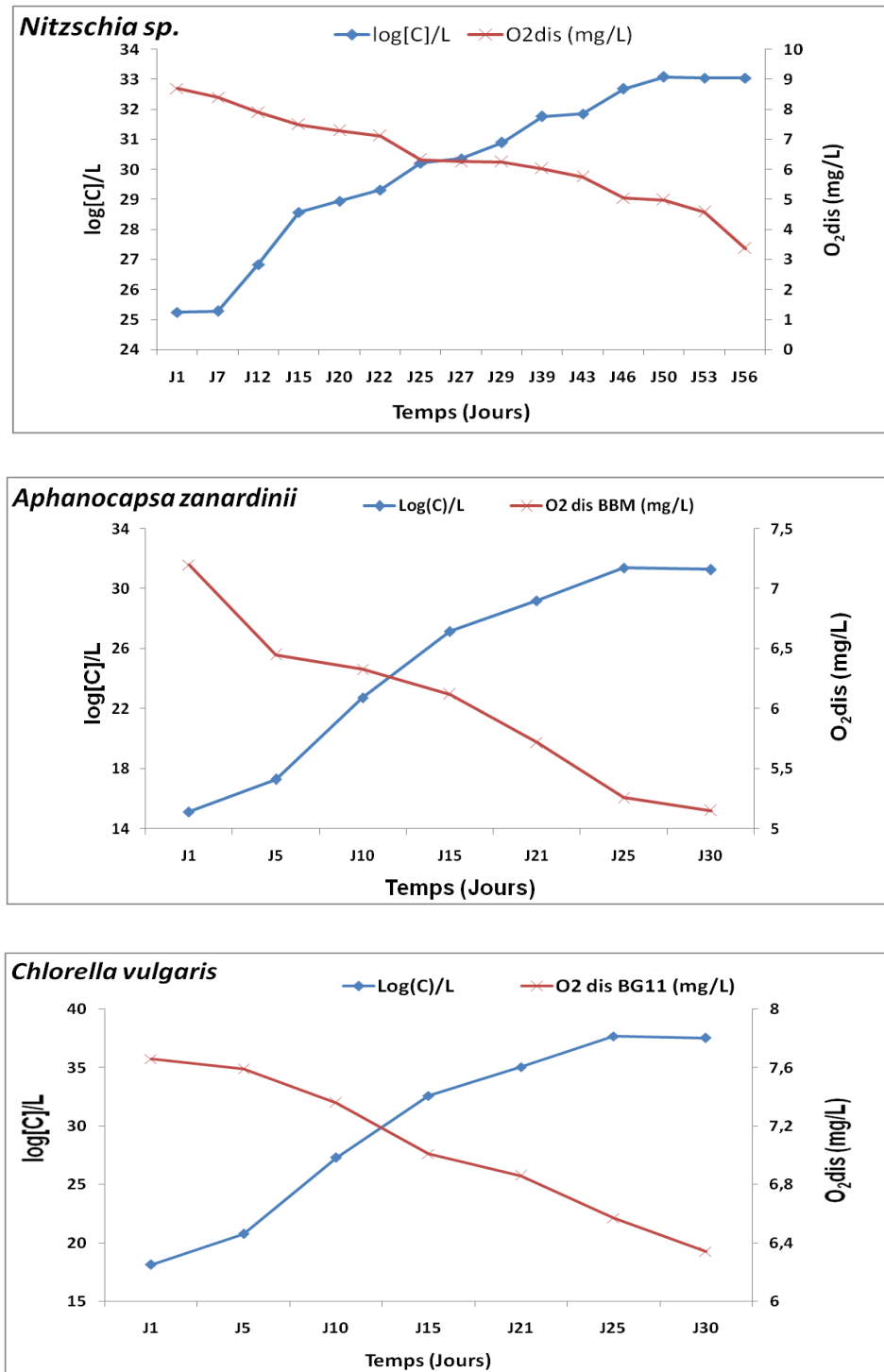


Figure IV. 12: Evolution de la croissance en biomasse des trois espèces de microalgues (*Nitzschia sp.*, *A. zanardinii* et *C. vulgaris*) et de la concentration en O<sub>2</sub> dissous du milieu de culture (WC, BBM et BG11) respectivement en fonction du temps.

Nous remarquons une diminution de la concentration en O<sub>2</sub> dissous dans le milieu de culture (BBM et BG11) de chaque espèce de microalgue de dans l'intervalle de 7,2±0,16 à 5,15±0,21 mg/L et de 7,66±0,08 à 6,34±0,11 mg/L pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris*. Nous avons la même allure de la courbe pour *Nitzschia sp.*, l'oxygène dissous a connu une diminution depuis le début de la mise en culture de 8,7±0,09 à 3,37±0,01 mg/L à la fin de culture. Cette diminution de l'O<sub>2</sub> dissous est corrélée à une augmentation de la concentration en biomasse, ce qui prouve leur utilisation par les microalgues pour leur réaction de respiration.

#### IV.4. CARACTERISATION DE L'EAU USEE SYNTHETIQUE

Une évaluation de la qualité physico-chimique a été réalisée pour notre échantillon d'eau usée synthétique avant traitement afin de connaître ses caractéristiques et dans le but de savoir, également, sa capacité de biodégradabilité pour subir un traitement biologique (**Tableau IV.5**).

**Tableau IV. 5 : Résultats des différents paramètres effectués avant traitement.**

Paramètres	Eau usée synthétique	Normes algériennes des rejets des eaux usées
pH	6,8±0,39	6,5 – 8,5
T (°C)	21±0,03	< 30 °C
O <sub>2</sub> dissous (mg/L)	7±0,08	
DCO (mg d'O <sub>2</sub> /L)	177,39±11,35	< 90 mg/L
DBO <sub>5</sub> (mg d'O <sub>2</sub> /L)	95±1,85	< 30 mg/L
DCO/DBO <sub>5</sub>	1,86	
CE (mS/cm)	6,3±0,26	
[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mg/L)	5,58±0,06	
[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (mg/L)	28,26±0,36	
[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] (mg/L)	4,09±0,10	
[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ] (mg/L)	5,34±0,06	< 2 mg/L

La mesure du pH avant traitement était de pH = 5,80 (milieu acide), d'où il a été nécessaire de le corriger, en ajoutant une base (NaOH) afin d'avoir une solution neutre (pH = 6,8±0,39), car ce paramètre influe beaucoup sur la croissance de nos microalgues qui ont fait l'objet de notre traitement biologique. La conductivité électrique (CE), a été mesurée avant traitement et sa valeur est de 6,3±0,26 (mS/cm). Il s'agit d'une valeur assez élevée qui indique une eau usée synthétique minéralisée. La somme des valeurs des différents composés azotés (ammonium, nitrites et nitrates) présente la concentration en azote total (NT) à éliminer par le traitement biologique en utilisant les diatomées. Cette valeur est égale à 37,93 mg/L.

La valeur de la concentration en  $[\text{PO}_4^{3-}]$  qui a été mesurée par spectrophotométrie à UV visible après filtration sous vide de l'échantillon était de  $5,34 \pm 0,06$  mg/L. Cette concentration très élevée représente le phosphore total (PT) d'où la nécessité de l'éliminer.

#### IV.4.1. Détermination des rapports de biodégradabilité de l'eau usée synthétique

Le calcul d'un rapport de biodégradabilité d'une eau usée a pour but d'identifier s'il s'agit d'un effluent facilement, moyennement ou difficilement biodégradable. Le tableau suivant présente les principaux caractères de biodégradabilité de notre eau usée synthétique.

Le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> est appelé aussi '**Indice de biodégradabilité**' : cet indice a été calculé dans le but de décider si cette eau peut être soumise à un procédé de traitement biologique. Autrement dit, le calcul du rapport sert généralement à juger les chances de réussite de l'épuration de notre eau usée par un procédé biologique.

En appliquant ce rapport à nos résultats présentés dans le **tableau (IV.6)**, nous obtenons :

$$\text{DCO/DBO}_5 = 1,86$$

Le résultat est compris dans l'intervalle  $1,5 < \text{DCO/DBO}_5 < 2,5$  (voir chapitre III, p.94). En conclusion notre eau usée synthétique préparée au laboratoire, est moyennement biodégradable et donc susceptible de subir un traitement biologique.

**Tableau IV. 6: Rapports de biodégradabilité de l'eau usée synthétique**

Eau usée		Interprétation
<b>DCO/DBO<sub>5</sub></b>	1,86	Moyennement biodégradable : dégradation de la pollution carbonée
<b>DBO<sub>5</sub>/P</b>	17,79	Matières organiques phosphorées dominantes
<b>DBO<sub>5</sub>/N</b>	2,51	Faible pollution organique azotée
<b>DCO/N</b>	6,37	Faible pollution minérale azotée
<b>DCO/P</b>	45,01	Matières minérales phosphorées dominantes
<b>MES/DBO<sub>5</sub></b>	0,26	Concentration en matières en suspension représente environ le ¼ de la DBO <sub>5</sub>

En conclusion de ce tableau, notre eau usée synthétique peut être classée suivant le caractère moyennement biodégradable, avec une pollution phosphorée dominante.

#### IV.4.2. Traitement de l'eau usée synthétique par la culture de *Nitzschia sp.*

A partir de la culture en phase exponentielle des *Nitzschia sp.* dans le milieu de culture WC, nous avons repiqué un prélèvement pour l'ensemencer dans l'eau usée synthétique pendant 33 jours. Cette étape a pour but de vérifier l'efficacité d'abattement des matières organiques carbonées, azotées et phosphorées de notre eau usée en favorisant la croissance unique de *Nitzschia sp.* Le pH et la température ont été maintenus toujours dans les intervalles optimaux de croissance des diatomées.

Tableau IV. 7 : Résultats de la culture de *Nitzschia sp.* dans l'eau usée synthétique

Dates	pH	T (C°)	Conductivité (mS/cm)	O <sub>2</sub> dis1 (mg/L)	Log[C]/L
J1	8,2±0,19	22,3±0,64	6,30±0,01	7,4±0,06	24,45±0,07
J3	8±0,05	22,0±0,88	5,70±0,06	7,0±0,04	24,48±0,08
J6	6,75±0,14	21,1±0,12	5,31±0,09	7,2±0,21	24,89±0,06
J9	7,79±0,04	21,8±0,11	5,03±0,06	7,0±0,20	25,29±0,09
J12	6,54±0,18	21,0±0,12	4,94±0,03	6,8±0,08	25,54±0,25
J15	7,6±0,17	22,8±0,18	4,55±0,07	6,4±0,04	25,82±0,37
J18	7,7±0,05	21,0±0,48	4,50±0,01	5,6±0,09	26,41±0,25
J21	6,76±0,21	22,0±0,24	4,30±0,07	5,5±0,15	26,52±0,10
J24	6,55±0,02	22,3±0,31	3,90±0,11	5,0±0,18	26,52±0,38

##### IV.4.2.1. Evolution de la concentration en biomasse et de la CE de l'eau usée synthétique en fonction du temps

L'étude de l'évolution de la concentration en biomasse de *Nitzschia sp.* cultivées dans l'eau usée synthétique et de sa conductivité électrique en fonction du temps est présentée par la figure suivante.

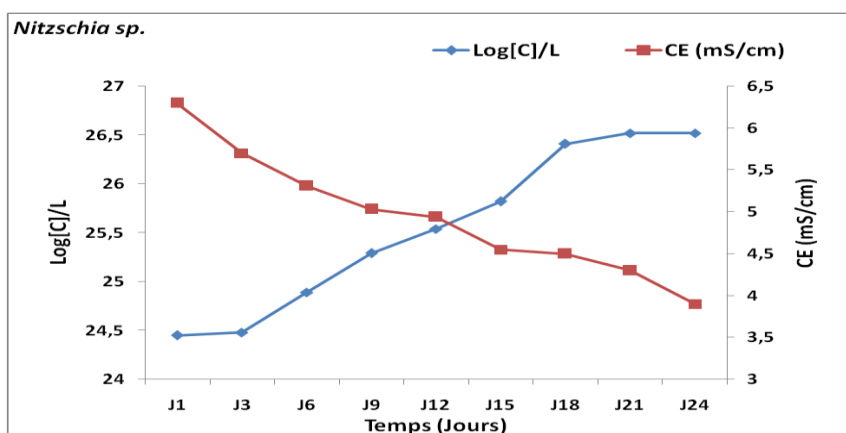
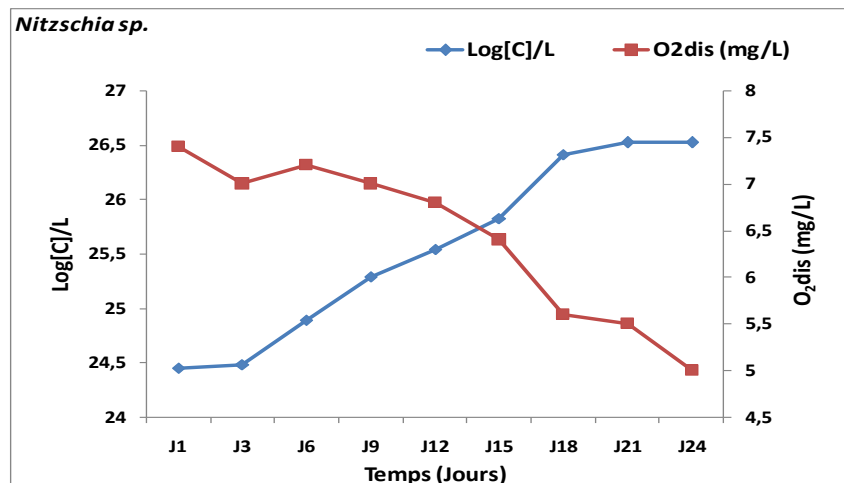


Figure IV. 13: Evolution de la concentration en biomasse de *Nitzschia sp.* et de la conductivité électrique de l'eau usée synthétique en fonction du temps

Une diminution de la valeur de la conductivité électrique de  $6,3\pm 0,01$  à  $3,90\pm 0,11$  mS/cm, avec une augmentation de concentration en biomasse  $\log [C]$  de  $24,45\pm 0,07/L$  à  $26,52\pm 0,38/L$  sur une période de 33 jours de culture dans l'eau usée synthétique stérile. Le taux maximum de multiplication de nos diatomées a été atteint au bout du 18<sup>ème</sup> jour de la culture.

#### IV.4.2.2. Evolution de la concentration en biomasse et de l'O<sub>2</sub> dissous de l'eau usée synthétique en fonction du temps

Comme nous l'avons fait dans le milieu de culture WC, nous avons suivi la variation de la concentration en O<sub>2</sub> dissous pendant la période de culture de *Nitzschia sp.* dans l'eau usée synthétique, qui nous a permis de tracer la courbe suivante :



**Figure IV. 14: Evolution de la concentration en biomasse de *Nitzschia sp.* et de la concentration en O<sub>2</sub> dissous de l'eau usée synthétique en fonction du temps.**

Nous remarquons une variation de la concentration en O<sub>2</sub> dissous dans l'eau usée dans l'intervalle de  $7,4\pm 0,06$  à  $5,0\pm 0,18$  mg/L. L'oxygène dissous a connu une diminution depuis le début de l'expérience de dépollution de l'eau usée synthétique. Cette diminution de l'O<sub>2</sub> dissous est corrélée à une augmentation de la concentration en biomasse au cours du traitement biologique de l'eau usée synthétique.

La diminution de l'O<sub>2</sub> dissous se déroule suivant trois principales étapes. D'après la **figure (IV.14)**, on distingue :

- Une première phase de saturation du milieu en oxygène correspondant à une adaptation et début de croissance des diatomées ;
- Une deuxième phase de diminution de la concentration en oxygène corrélée à une croissance en biomasse exponentielle ;

- Une troisième phase de diminution de l'O<sub>2</sub> dissous correspondant à une phase de stabilisation de la croissance en biomasse des diatomées.

#### IV.5. EVALUATION DE L'EFFICACITE DE TRAITEMENT BIOLOGIQUE PAR LES DIATOMEES (NITZSCHIA)

Le suivi du traitement biologique de l'eau usée synthétique par une culture de diatomées (*Nitzschia sp.*) en vue de l'élimination de la pollution carbonée, azotée et phosphorée, nous a permis de vérifier l'efficacité du traitement.

Le rendement d'efficacité est calculé par la formule suivante :

$$R \% = ([C]_i - [C]_f) / [C]_i \times 100$$

Avec:

[C]<sub>i</sub> = concentration (ou valeur) initiale (avant traitement)

[C]<sub>f</sub> = concentration (ou valeur) finale (après traitement)

Le **tableau (IV.8)** présente les résultats des différents paramètres mesurés avant et après traitement biologique dans le PBRT et leurs rendements :

- Les valeurs enregistrées avant traitement sont celles mesurées sur l'eau usée synthétique brute (Bassin 1).
- Les valeurs enregistrées après traitement ont été mesurées à partir de l'eau épurée dans le bassin secondaire (clarificateur) (Bassin 3).

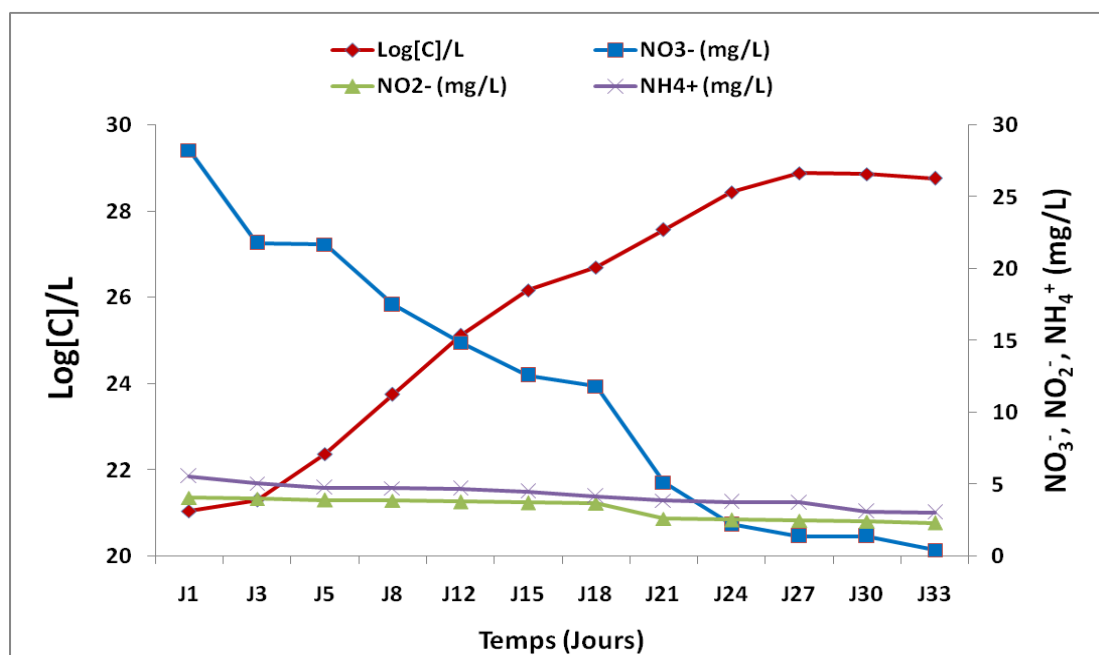
**Tableau IV. 8: Comparaison des résultats de caractérisation des deux bassins de traitement du photobioréacteur Bassin1 (eau usée) et bassin3 (eau épurée)**

	Eau usée synthétique	Eau épurée	Rendement (%)
T°C	21±0,03	22,2±0,38	/
pH	6,8±0,39	6,6±0,11	/
CE (mS/cm)	6,3±0,26	3,8±0,20	/
O <sub>2</sub> dissous (mg/L)	7±0,08	6,4±0,41	/
MES (mg/L)	25±0,19	6,2±0,40	<b>75,20</b>
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	95±1,85	39,9±0,56	<b>58,00</b>
DCO (mg/L)	177,39±11,35	35±0,58	<b>80,27</b>
Phosphate (mg/L)	5,34±0,06	1,50±0,08	<b>71,91</b>
Ammonium (mg/L)	5,58±0,11	3,04±0,27	45,51
Nitrate (mg/L)	28,26±0,36	0,43±0,04	<b>98,47</b>
Nitrite (mg/L)	4,09±0,10	2,32±0,06	43,27
Silice (mg/L)	450,13±12,89	230,66±2,04	48,75

#### IV.5.1. Elimination de la pollution azotée par les diatomées (*Nitzschia sp.*)

L'azote, après le carbone, est le constituant cellulaire majeur des microalgues. Sa quantité varie en fonction des espèces et des conditions du milieu, mais elle correspond en moyenne à environ 7% de la matière sèche de la cellule. Cet élément est constitutif de différentes protéines comme les peptides, les enzymes, la chlorophylle et le matériel génétique des microalgues. La disponibilité de cette source dans le milieu affecte fortement la productivité et la composition biochimique des microalgues. Il peut être fourni sous différentes formes inorganiques ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ). De nombreuses études se sont penchées sur l'effet de la concentration de cet élément dans le milieu de culture.

Le suivi des concentrations en azote ammoniacal, nitrite et nitrate au cours du traitement biologique a pour objectif de déterminer la dégradation de la pollution azotée à l'aide de notre photobioréacteur (PBRT) en favorisant la croissance unique de *Nitzschia sp.*

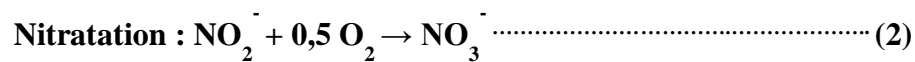
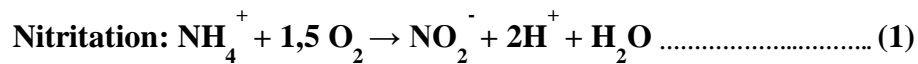


**Figure IV. 15: Evolution de la concentration en biomasse de *Nitzschia sp.* et de la concentration en ammonium, nitrites et nitrates de l'eau usée pendant 33 jours**

Nous remarquons d'après cette représentation graphique, une diminution des valeurs de la concentration en ammonium de l'eau usée pendant 33 jours de  $5,58 \pm 0,11$  mg/L au début du traitement jusqu'à  $3,04 \pm 0,27$  mg/L à la fin du traitement avec un rendement égal à 45,51%, et un taux d'élimination de 43,27% pour les nitrites, d'une concentration initiale de  $4,09 \pm 0,10$  mg/L à une concentration finale de  $2,32 \pm 0,02$  mg/L, Mais pour les nitrates, l'abattement est presque total avec un rendement égal à 98,47 % (**Tableau IV.8**).

Le suivi de la concentration de l'azote ammoniacal dans les conditions aérobie assure le processus de nitrification par les diatomées autotrophes, qui transforment ce dernier en nitrite puis en nitrate, pour trouver une forme de l'azote assimilable pour la croissance.

L'élimination de l'azote des eaux usées est principalement effectuée par nitrification et dénitrification biologique. **Metcalf & Eddy (2003)** rappelant que les processus de traitements biologiques sont généralement plus économiques que les processus de traitements physico-chimiques (barbotage de l'ammoniac à l'air ou à la vapeur, chloration et échange d'ions). Les procédés de nitrification consistent premièrement à l'oxydation de l'azote ammoniacal en nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), à un état intermédiaire, puis finalement cette dernière forme d'azote ( $\text{NO}_2^-$ ) est rapidement oxydée en nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Cette conversion, qui est réalisée en présence d'oxygène par des bactéries autotrophes nitrifiantes, se divise en deux étapes, la première étant assurée par des bactéries *Nitrosomonas* et la deuxième par des bactéries *Nitrobacter* :



Selon **Aubry (2003)**, le procédé à culture fixée immergée BIO-FOSSE a atteint 96% de nitrification, atteignant régulièrement des valeurs inférieures à 2 mg de  $\text{NH}_4^+$ /L. Sous aération intermittente du réacteur, l'efficacité de l'enlèvement de  $\text{NH}_4^+$  et de  $\text{NO}_3^-$  dépend de la durée des périodes aérobie et anoxie. Avec un cycle de 24 h comptant 75% d'aération, les concentrations en azote de l'effluent ont varié de 0,4 à 7,4 mg de  $\text{NH}_4^+$ /L et de 10 à 21 mg de  $\text{NO}_3^-$ /L. Les taux maximaux de nitrification et de dénitrification s'élèvent à 58 g de  $\text{NH}_4^+$ /m. jour et 52 g de  $\text{NO}_3^-$ /m. jour, respectivement

La croissance des microalgues comporte quatre phases différentes, à savoir : la phase d'adaptation, la phase de croissance exponentielle, la phase stationnaire, et la phase de mort (**Blair et al., 2014**). **Wang et al. (2014)** ont rapporté que lorsque le milieu de culture est pauvre en azote N, la densité cellulaire d'*Isochrysis zhangjiangensis* a légèrement augmenté jusqu'à 3 jours puis a diminué. A faible concentration d'azote (36 mg/L), le taux de croissance d'*I. galbana* était remarquablement faible (**H. T. Wang et al., 2014; J. Wang et al., 2014**). Selon **Xie et al. (2017)** diminuant la concentration en azote (3 mmol/L de nitrate de sodium ou 40 mg/L d'azote) était un facteur de réduction de la croissance de *Chlorella vulgaris*. Ils ont conseillé que 12 mmol/L ou 164 mg/L d'azote est la concentration suffisante pour alimenter *I. galbana* a très bien poussé dans les unités expérimentales avec 72, 144 et 288 mg/L d'azote. A ces concentrations d'azote, la croissance en biomasse de la microalgue a augmenté de façon exponentielle jusqu'au

neuvième jour. La phase d'arrêt a été observée à des concentrations d'azote de 144 mg/L. Les résultats ont révélé que *I. galbana* peut bien se développer dans des concentrations modérées d'azote de (72 et 144 mg/L); mais la croissance était limitée à 0 et 36 mg/L d'azote dans les milieux de culture. **Zhu et al. (2014)** ont démontré que le taux de croissance spécifique et les valeurs de la productivité de la biomasse de *Chlorella zofingiensis* étaient de 0,48 jour<sup>-1</sup> et 0,2 g/L.jour sous manque d'azote, et de 1,02 jour<sup>-1</sup> et 0,52 g/L.jour, sous réplétion en azote, respectivement. L'effet de différentes concentrations d'azote sur la teneur des principaux pigments a également fait l'objet d'une enquête. Les résultats de **Pancha et al. (2014)** sont en accord avec des découvertes antérieures, qui démontrant que la diminution des concentrations d'azote de 123 à 0 mg/L a fortement diminué la teneur en pigment de 7,13 (mg/ml) à 1,89 (mg/ml) chez *Scenedesmus sp.*, **Zhang et Liu (2016)** ont rapporté que dans des conditions normales de culture, la teneur en chlorophylle est passée de 6,2 à 8,9 mg/L chez *I. galbana*; mais sous privation d'azote, il a diminué de 5,9 à 3,9 mg/l. Ils ont conclu que le stress azoté pourrait diminuer la lumière de récolte et l'efficacité de l'activité du photosystème. Les glucides des microalgues, en particulier la cellulose dans la paroi cellulaire et l'amidon dans le cytoplasme, sont des substrats prometteurs pour le bioéthanol (**Yuan et al., 2018**). De plus, ils peuvent être facilement hydrolysés en raison du manque de lignine dans leurs structures cellulaires (**Markou et al., 2012**). Pour obtenir une biomasse microalgale avec une teneur en glucides et en lipides, la concentration optimale de l'azote dans le milieu de culture doit être déterminée. La variante de la teneur en glucides n'a montré aucune différence significative entre des unités expérimentales avec différentes concentrations d'azote, de 36 à 288 mg/L. En accord avec les présentes constatations, **Guihéneuf & Stengel (2015)** ont montré que la teneur de glucide cellulaire en *Porphyridium purpureum* cultivé sous privation d'azote, augmentée pendant la phase logarithmique de la culture et atteint le niveau maximum de 40%, en accord avec **El-Kassas (2013)** qui a signalé que la privation d'azote augmentait la teneur relative en glucides du *Picochlorum*. L'effet de la concentration d'azote sur la teneur en protéines a également été étudiée. **Pancha et al. (2014)** ont démontré que la culture de *Scenedesmus sp.* dans un milieu de culture avec différentes concentrations de nitrates, de 247 à 0 mg/L, entraîne une diminution du pourcentage de protéines de 47,75 à 16,87 %. À des concentrations d'azote plus élevées, la teneur en protéines a légèrement diminué. Selon **Tam et Wong (1996)**, augmenter la concentration d'azote dans une culture ne peut pas causer de la synthèse des protéines et l'augmentation de la valeur protéique. Une étude similaire a été menée par **Xie et al. (2017)** dans laquelle la teneur maximale en protéines en *Chlorella vulgaris* était de 38,6 % et en augmentant encore la teneur en nitrate de sodium à 2 g/L, les protéines ont diminué. Comme l'azote est nécessaire et le

précurseur le plus important pour la synthèse des protéines, une diminution de la teneur en protéines est une réponse physiologique courante des microalgues sous privation d'azote. Il a également été démontré que la privation d'azote augmente la disponibilité du carbone et conduit à un changement du flux de carbone de la synthèse des protéines aux glucides ou la synthèse des lipides (Zhu et al., 2015).

Selon Xing et al. (2018), la culture de *Nitzschia sp.* dans les eaux usées de l'aquaculture d'holothuries élimine différents nutriments à des degrés divers. Le taux d'élimination de NT était le plus élevé (54,58 %) dans 30 % des eaux usées d'aquaculture, suivi (39,79 %) dans 10 % des eaux usées aquacoles. Le taux de suppression des nitrates était le plus élevé (51,08 %) dans 0 % des eaux usées d'aquaculture, et moins de 50% dans les autres concentrations de eaux usées et de milieu f/2. Le taux d'élimination des nitrites était le plus élevé (56,43 %) dans 80 % des eaux usées d'aquaculture. Le taux d'élimination de l'ammonium était supérieur à 90 % dans chaque concentration d'eaux usées d'aquaculture et de milieu f/2.

#### IV.5.2. Elimination du phosphate $\text{PO}_4^{3-}$ par les diatomées (*Nitzschia sp.*)

D'après les résultats indiqués dans la figure (IV.16) nous constatons que lorsque nous avons une augmentation de la biomasse, la valeur moyenne des ortho phosphates varie d'un maximum de  $5,34 \pm 0,06$  mg/L le premier jour de traitement à un minimum de  $1,50 \pm 0,26$  mg/L à la fin du traitement avec un rendement égal 71,91%.

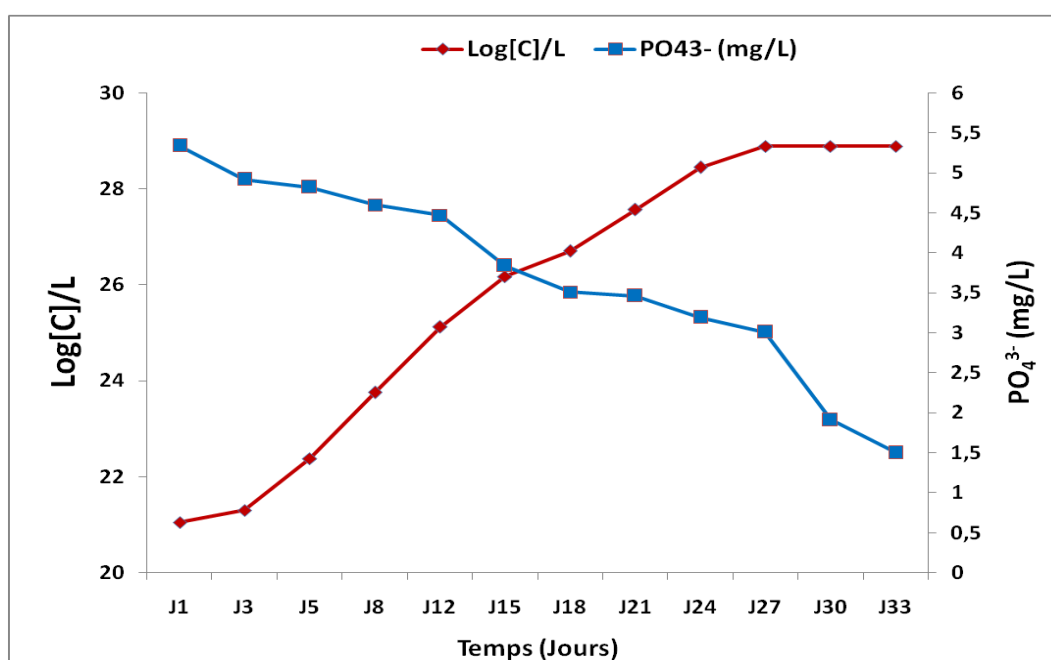


Figure IV. 16: Evolution de la concentration en biomasse de *Nitzschia sp.* et de la concentration en phosphate de l'eau usée pendant 33 jours.

Les diatomées ont utilisé les ortho phosphates  $\text{PO}_4^{3-}$  qui représentent l'élément majeur de leur croissance, ce qui explique la diminution de sa concentration au cours du traitement.

Le phosphore (P) est un élément essentiel pour tous les organismes vivants. C'est un composant du squelette de l'ADN et de l'ARN, est également un facteur important dans la transmission de l'énergie chimique par l'adénosine triphosphate (ATP). De plus, le P est également présent dans les phospholipides et un constituant majeur des membranes cellulaires (**Brembu et al., 2017**).

Malgré les différents efforts fournis pour améliorer les conditions de déphosphatation biologique, une partie du phosphore des eaux usées reste encore difficilement traitable. Selon **Benisch et al. (2012)**, les limites de phosphore récalcitrant au traitement ont été évaluées entre 0,011 à 0,015 mg P/L lors d'une étude pilote réalisée avec dosage de sulfate d'aluminium ou du chlorure ferrique.

Le traitement biologique, au sens large, englobe d'une part l'assimilation du phosphore par la biomasse pour ses besoins métaboliques minimaux, et d'autre part la suraccumulation du phosphore par des bactéries déphosphatantes au-delà de leurs besoins métaboliques. Par convention, on parle de traitement biologique du phosphore (au sens strict) lorsqu'il s'opère une suraccumulation du phosphore (**Deronzier & Choubert, 2004**).

Dans notre étude de laboratoire avec *Nitzschia sp.* il a été trouvé que l'élimination du phosphate de l'effluent primaire doit être de 0,11 mg/L.jour qui est moins faible comparable au taux enregistré dans l'étude de **Selvaratnam et al. (2014)** qui est de 1,21 mg/L.jour en mode discontinu. Encore une fois, en utilisant les données de laboratoire rapportées par **Wang et al. (2010)** pour *Chlorella sp.*, nous avons estimé que le taux d'élimination des phosphates doit être de 3,0 mg/L.jour pour l'échantillon d'eaux usées étiré après décantation primaire. Une étude en laboratoire de **Lodi et al. (2003)** évaluée l'élimination du phosphore par la *spiruline platensis* à partir d'un milieu de croissance standard et le taux d'élimination volumétrique rapportée de 0,312 à 0,623 mg/L.jour, soit environ la moitié du taux observé dans l'étude actuelle.

Dans l'étude de **Selvaratnam et al. (2014)**, l'élimination des éléments nutritifs des effluents d'eaux usées primaires a été testée à l'aide de *Galdieria sulphuraria*, une algue acidophile modérément thermophile. Le rendement était de 95,5 % pour les phosphates ; le taux d'élimination correspondant était de 1,21 mg/L.jour. Bien que ces taux soient inférieurs aux valeurs moyennes de la littérature pour d'autres souches (1,34 mg/L.jour). Le taux d'élimination

volumétrique des phosphates était en moyenne  $1,41 \pm 0,57$  mg/L.jour dans le réacteur 1 et  $1,39 \pm 0,59$  mg/L.jour dans le réacteur 2.

### IV.5.3. Rendement d'abattement des valeurs de DBO<sub>5</sub> et de DCO

La mesure de la DBO<sub>5</sub> et la DCO avant et après traitement renseigne sur l'élimination de la pollution organique et inorganique de notre eau usée synthétique (**Tableau IV.8**).

Nous remarquons une diminution de la concentration de la DCO et de la DBO<sub>5</sub> avant et après traitement à des rendements de 80,27% pour la DCO et de 58% pour la DBO<sub>5</sub>. D'après le tableau précédent on constate pour la DBO<sub>5</sub> une diminution remarquable après traitement avec des valeurs de ( $95 \pm 1,86$  à  $39,9 \pm 0,56$  mg/L). En comparant aux normes algériennes des rejets des eaux usées (< 30 mg/L), on peut conclure qu'il s'agit d'une eau épurée qui convient d'être recyclée ou rejetée dans le milieu naturel récepteur sans nuisance pour la faune et la flore.

Tous les traitements ont indiqué une diminution de la DCO du premier au 18<sup>ème</sup> jour en raison de l'activité photosynthétique accrue des microalgues, des valeurs plus élevées de biomasse algale ont été obtenues en milieu aérobie obtenue avec l'aération de la culture. Ainsi, plus d'oxygène a été généré, aidant à réduire la DCO et rendre le traitement plus efficace. Les résultats ont révélé que l'augmentation continue et progressivement du nombre de cellules dans des eaux usées stériles jusqu'à la fin de l'expérience. Simultanément, les eaux usées non stérile ont montré une diminution du nombre de cellules aux neuvième et dixième jours, ce qui peut être attribuée à la consommation de nutriments par d'autres organismes (**Dumas et al., 1998**).

*Nitzschia palea* a montré une forte sensibilité à la réduction de la demande chimique en oxygène dans les eaux usées. La demande chimique en oxygène a été réduite de 84 à 112 mg/L avant traitement à 33 et 19 mg/L pour le milieu stérile et non stérile, respectivement, le dixième jour. D'un autre côté, le taux de suppression au premier jour était de 6 % et 22,4 % dans les modèles stériles et non stériles, respectivement. Il est passé à 60,8% et 83,1% le dixième jour, respectivement (**Al-Hassany et al., 2021**).

## IV.6. ELIMINATION DU CADMIUM PAR LES MICROALGUES *CHLORELLA* ET *APHANOCAPSA*

Dans cette partie d'étude nous avons visé à éliminer le cadmium au moyen de deux microalgues isolées *A. zanardinii* et *C. vulgaris*. Les microalgues isolées ont été cultivées dans le milieu de culture avec différentes concentrations de cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ), dans des conditions aseptiques stériles afin d'éviter toute contamination bactérienne ou fongique par l'addition de gentamicine (antibiotique) et du cycloheximide (antifongique). Un inoculum de chaque souche a été prélevé à partir de la phase de croissance exponentielle afin d'assurer une croissance continue (courte phase de latence) des microalgues dans le milieu contaminé par le cadmium.

### IV.6.1. Evolution de la biomasse en fonction des concentrations en Cd

La croissance en biomasse est l'une des mesures les plus importantes, mais aussi l'une des plus difficiles. Le nombre de cellules d'algues vivantes a subi une transformation logarithmique en une distribution presque normale. Les mesures DO et MS ne fournissent pas une véritable mesure du nombre de cellules algales vivantes. En effet, la méthode DO est basée sur la distribution de la lumière et non sur l'absorbance.

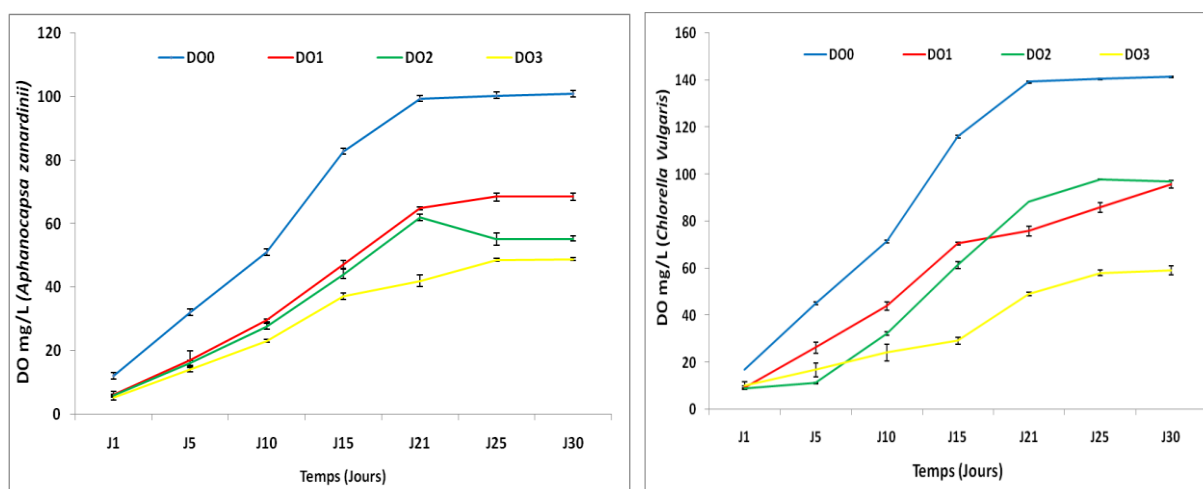
La méthode de la matière sèche échoue si l'échantillon contient d'autres particules insolubles. De même, la mesure de la densité optique est d'une utilité limitée si la solution n'est pas claire. De plus, ces méthodes ne distinguent pas les cellules viables des cellules mortes. En revanche, le comptage des cellules algales à l'aide d'une cellule de numération Thoma peut détecter des cellules viables parmi d'autres particules solides. Cependant, cette méthode implique des préparations importantes et nécessite chaque 24 à 48 heures pour incuber et compter les cellules. Par conséquent, le comptage des cellules est principalement utilisé pour recouper d'autres mesures, telles que la densité optique et la matière sèche.

Les résultats obtenus à partir de la DO nous ont permis d'estimer les quantités de *A. zanardinii* et *C. vulgaris* respectivement ( $68,53 \pm 1,12$ ) mg/L et ( $95,73 \pm 1,61$ ) mg/L pour  $[\text{Cd}] \sim 50$  mg/L, ( $55,30 \pm 0,80$ ) mg/L et ( $97,07 \pm 0,06$ ) mg/L pour  $[\text{Cd}] \sim 100$  mg/L, et ( $48,84 \pm 0,45$ ) mg/L et ( $59,13 \pm 1,96$ ) mg/L pour  $[\text{Cd}] \sim 250$  mg/L (**Figure IV.17**). Ces résultats ont été comparés à la  $\text{DO}_0$  (densité optique initiale) pour les deux espèces de ( $12,10 \pm 0,13$ ) mg/L et ( $16,94 \pm 0,05$ ) mg/L à ( $101,00 \pm 0,52$ ) mg/L et ( $141,40 \pm 0,21$ ) mg/L, dans les mêmes conditions expérimentales sans apport de Cadmium (**Tableau IV.9**). Les valeurs initiales de DO au début des expériences étaient plus faibles pour les deux espèces pour toutes les concentrations de  $\text{Cd}^{2+}$ .

**Tableau IV. 9: Évolution de la densité optique pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* cultivés sur BBM liquide avec des concentrations croissantes de  $\text{Cd}^{2+}$ .**

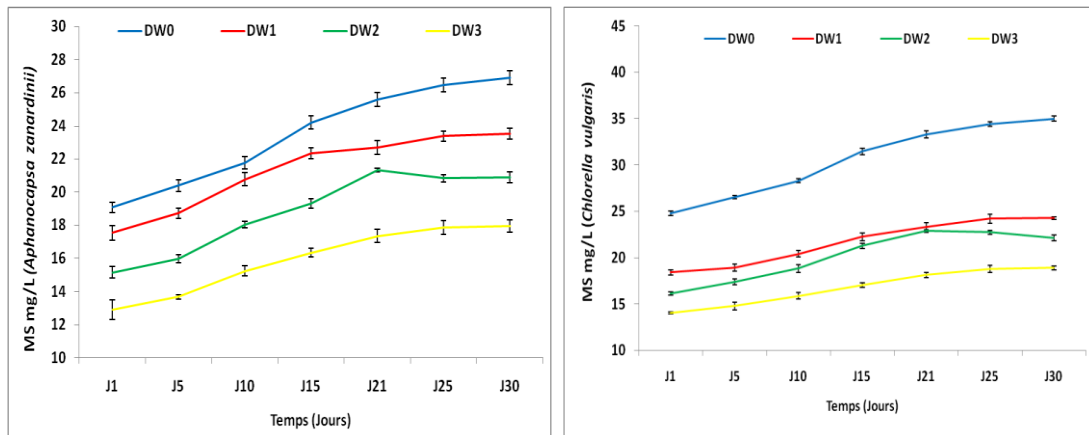
Temps (jours)	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>				<i>Chlorella vulgaris</i>			
	DO <sub>0</sub> ~ 0 mg/L	DO <sub>1</sub> ~ 50 mg/L	DO <sub>2</sub> ~ 100 mg/L	DO <sub>3</sub> ~ 250 mg/L	DO <sub>0</sub> ~ 0 mg/L	DO <sub>1</sub> ~ 50 mg/L	DO <sub>2</sub> ~ 100 mg/L	DO <sub>3</sub> ~ 250 mg/L
J1	12,10±0,13	6,28±0,88	5,91±0,42	5,18±0,73	16,94±0,05	9,30±0,69	8,93±0,12	10,03±1,62
J5	32,20±0,36	17,26±2,62	16,20±0,89	14,06±0,79	45,08±0,14	26,33±2,31	11,20±0,35	16,87±2,89
J10	51,08±0,41	29,61±0,45	27,68±0,89	23,10±0,48	71,51±0,16	44,00±1,73	32,30±0,87	24,27±3,58
J15	82,08±0,47	47,15±1,31	44,12±1,48	37,21±0,97	115,96±0,19	70,57±0,58	61,40±1,39	29,27±1,50
J21	99,44±0,50	64,83±0,51	62,04±1,02	42,09±1,76	139,22±0,20	75,87±2,02	88,50±0,00	49,13±0,64
J25	100,40±0,51	68,45±1,25	55,21±1,93	48,65±0,39	140,56±0,20	85,87±1,96	97,83±0,06	58,07±1,15
J30	101,00±0,52	68,53±1,12	55,30±0,80	48,84±0,45	141,40±0,21	95,73±1,61	97,07±0,06	59,13±1,96

Les courbes de croissance obtenues pour DO, Log (N) et MS étaient congruentes pour les deux espèces *A. zanardinii* et *C. vulgaris* en fonction du temps d'exposition pour chaque concentration de  $\text{Cd}^{2+}$ . Après une phase exponentielle de 21 jours, la biomasse algale atteint la phase stationnaire pour la quasi-totalité des courbes.



**Figure IV. 17: Évolution de la densité optique des deux microalgues en fonction du temps. (a) *A. zanardinii*, (b) *C. vulgaris*. DO<sub>0</sub>, DO<sub>1</sub>, DO<sub>2</sub> et DO<sub>3</sub> mentionnent les concentrations de  $\text{Cd}^{2+}$  (0, 50, 100 et 250 mg/L).**

Les courbes de croissance obtenues à partir des mesures MS (Figure IV.18) ont montré les mêmes apparences que les courbes obtenues pour DO.



**Figure IV. 18: Évaluation de la croissance du poids de la biomasse sèche en fonction du temps. (a) *A. zanardinii*, (b) *C. vulgaris*. MS<sub>0</sub>, MS<sub>1</sub>, MS<sub>2</sub> et MS<sub>3</sub> référencés aux concentrations de Cd<sup>2+</sup> (0, 50, 100 et 250 mg/L).**

Les biomasses obtenues à partir d'un poids sec initial (MS<sub>0</sub>) de (19,07±0,04) mg/L et (24,80±0,04) mg/L pour les deux espèces, à l'issue des expériences pour chaque concentration en ions Cd<sup>2+</sup> étaient respectivement pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* de (23,52±0,32) mg/L et (24,27±0,12) mg/L pour [Cd]~50mg/L, (20,88±0,35) mg/L et (22,13±0,33) mg/L pour [Cd]~100mg/L, (17,94±0,38) mg/L et (18,89±0,22) mg/L pour [Cd]~250mg/L (Tableau IV.10).

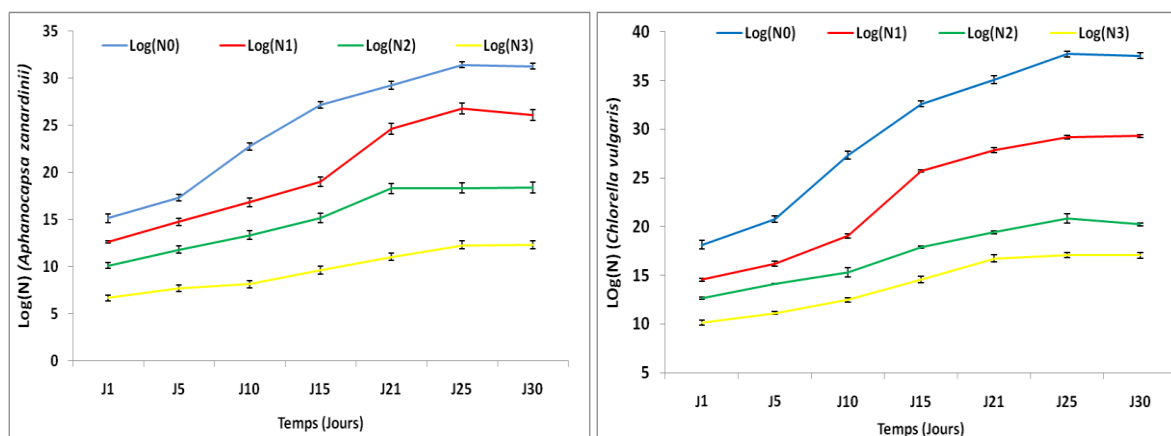
**Tableau IV. 10: Évolution du poids de la biomasse sèche des deux microalgues cultivées avec différentes concentrations de Cd<sup>2+</sup>.**

Temps (Jours)	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>				<i>Chlorella vulgaris</i>			
	MS <sub>0</sub> ~ 0 mg/L	MS <sub>1</sub> ~ 50 mg/L	MS <sub>2</sub> ~ 100 mg/L	MS <sub>3</sub> ~ 250 mg/L	MS <sub>0</sub> ~ 0 mg/L	MS <sub>1</sub> ~ 50 mg/L	MS <sub>2</sub> ~ 100 mg/L	MS <sub>3</sub> ~ 250 mg/L
J1	19,07±0,27	17,54±0,44	15,13±0,35	12,88±0,60	24,80±0,04	18,40±0,25	16,14±0,16	14,03±0,12
J5	20,40±0,31	18,71±0,32	15,96±0,24	13,66±0,13	26,51±0,01	18,95±0,38	17,38±0,33	14,77±0,40
J10	21,77±0,33	20,77±0,40	18,02±0,19	15,23±0,31	28,31±0,21	20,41±0,36	18,85±0,42	15,86±0,36
J15	24,19±0,35	22,34±0,32	19,31±0,28	16,33±0,27	31,45±0,05	22,24±0,42	21,28±0,27	17,04±0,23
J21	25,59±0,37	22,69±0,42	21,33±0,10	17,34±0,39	33,27±0,06	23,31±0,47	22,88±0,16	18,13±0,26
J25	26,47±0,38	23,37±0,31	20,82±0,22	17,84±0,43	34,41±0,22	24,20±0,50	22,75±0,20	18,81±0,38
J30	26,91±0,38	23,52±0,32	20,88±0,35	17,94±0,38	34,99±0,06	24,27±0,12	22,13±0,33	18,89±0,22

La numération cellulaire des espèces à l'aide d'une cellule de numération Thoma sous un microscope optique est moins affectée par les erreurs. En effet, les comptages de cellules algales sont plus cohérents en fonction des valeurs effectives des cellules vivantes (N) dans le milieu liquide, avec des concentrations croissantes de Cd<sup>2+</sup>. Les résultats des cellules vivantes comptées ont été transformés en Log (N) pour chaque espèce afin de simplifier la linéarisation des points

projetés sur les courbes de croissance. Dans les algues vivantes, le temps de contact a un effet plus important sur la capacité de biosorption.

Nous avons enregistré une augmentation progressive du nombre de cellules pour les deux espèces par rapport à chaque concentration de  $Cd^{2+}$  dès le premier jour de croissance pendant quatre semaines (30 jours). Les  $Log(N)$  atteignent leurs valeurs les plus élevées après 30 jours de croissance dans le milieu BBM contaminé (Figure IV.19).



**Figure IV. 19: Croissance de la population cellulaire dans les cultures de microalgues en fonction du temps. (a) *A. zanardinii*, (b) *C. vulgaris*. Log(N) : nombre de cellules transformées en log. Log(N<sub>0</sub>), Log(N<sub>1</sub>), Log(N<sub>2</sub>) et Log(N<sub>3</sub>) font respectivement référence aux concentrations en Cd<sup>2+</sup> (0, 50, 100 et 250 mg/L)**

Le  $Log(N_0)$  initial était de  $(18,14 \pm 0,26)/L$  tandis que le nombre le plus élevé était de  $(36,07 \pm 0,25)/L$  pour *C. vulgaris*, ces valeurs est plus élevé comparaison par  $Log(N_0)$  initial de *A. zanardinii*. A la fin des expériences, pour chaque concentration en ions  $Cd^{2+}$   $log(N_1)$ ,  $log(N_2)$  et  $log(N_3)$  étaient respectivement pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris*  $(26,08 \pm 0,57)/L$  et  $(29,29 \pm 0,22)/L$  pour  $[Cd] \sim 50mg/L$ ,  $(18,40 \pm 0,31)/L$  et  $(20,23 \pm 0,14)/L$  pour  $[Cd] \sim 100mg/L$ , et  $(12,33 \pm 0,25)/L$  et  $(17,07 \pm 0,29)/L$  pour  $[Cd] \sim 250mg/L$  (Tableau IV.11).

**Tableau IV. 11: Evolution de la croissance des biomasses d'algues cultivées sur BBM liquide enrichi ou non en Cd à différentes concentrations.**

Temps (Jours)	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>				<i>Chlorella vulgaris</i>			
	Log(N <sub>0</sub> ) ~0mg/L	Log(N <sub>1</sub> ) ~50mg/L	Log(N <sub>2</sub> ) ~100mg/L	Log(N <sub>3</sub> ) ~250mg/L	Log(N <sub>0</sub> ) ~0mg/L	Log(N <sub>1</sub> ) ~50mg/L	Log(N <sub>2</sub> ) ~100mg/L	Log(N <sub>3</sub> ) ~250mg/L
J1	15,12±0,35	12,60±0,14	10,10±0,13	6,65±0,13	18,14±0,26	14,54±0,16	12,66±0,08	10,13±0,25
J5	17,30±0,26	14,73±0,04	11,78±0,19	7,68±0,15	20,76±0,19	16,22±0,25	14,13±0,02	11,14±0,16
J10	22,75±0,32	16,83±0,06	13,36±0,14	8,11±0,17	27,30±0,24	19,04±0,19	15,33±0,46	12,48±0,21
J15	27,17±0,26	19,02±0,05	15,14±0,11	9,61±0,18	32,60±0,19	25,70±0,13	17,89±0,10	14,55±0,34
J21	29,22±0,33	24,61±0,06	18,31±0,14	11,02±0,14	36,07±0,25	27,85±0,23	22,42±0,14	16,75±0,39
J25	28,41±0,25	20,77±0,04	14,34±0,10	8,29±0,22	29,70±0,18	19,19±0,17	17,82±0,48	10,07±0,24
J30	24,29±0,25	16,08±0,08	12,40±0,08	5,33±0,20	26,54±0,19	16,29±0,12	14,23±0,14	6,07±0,29

La figure (IV.19) montre les mêmes résultats expérimentaux en termes de nombre de cellules vivantes dans les cultures. Cependant, la position relative des courbes de croissance exponentielle est la même que celles obtenues en fonction de la densité optique et du poids de la biomasse sèche. On remarque une diminution du nombre de cellules en fin de croissance, depuis le 21<sup>ème</sup> jour. Ce contraste apparent (la biomasse augmente alors que la population cellulaire diminue) indique que la croissance de la biomasse d'algues viables est affectée négativement par la longue durée d'exposition aux différentes concentrations de cadmium pour les deux espèces étudiées. Ainsi, c'est sur la base de ces résultats que nous pouvons évaluer le taux de croissance des cultures de la manière la plus fiable.

Bien qu'essentielle à la compréhension et à la précision de la croissance de la biomasse, la détermination du  $\mu_{\max}$  (taux de croissance maximal) est extrêmement délicate. Différents mécanismes interviennent : assimilation, variation des stocks internes, nombre de cellules, etc. avec de nombreuses rétroactions d'un facteur à l'autre, afin d'obtenir la valeur la plus précise de ce taux de croissance.

Les temps de doublement de génération  $G$  sont inférieurs à 1 jour pour les algues cultivées en BBM sans cadmium, et environ 1 jour pour la concentration initiale en cadmium (50 mg/L), et jusqu'à 3,30 jours et 1,98 jours respectivement pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* cultivé en BBM avec 250 mg/L de  $\text{Cd}^{2+}$  (Tableau IV.12).

Les taux de croissance les plus élevés correspondent aux temps de doublement de génération minimaux. En d'autres termes, la concentration optimale de cadmium serait choisie en fonction de la valeur du taux de croissance maximal atteint et du temps de génération le plus court.

**Tableau IV. 12: Taux de croissance  $\mu$  et temps de doublement de génération  $G$  déterminés pour les deux espèces *A. zanardinii* et *C. vulgaris* pour chaque concentration de Cd.**

	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>				<i>Chlorella vulgaris</i>			
	Log(N <sub>0</sub> )	Log(N <sub>1</sub> )	Log(N <sub>2</sub> )	Log(N <sub>3</sub> )	Log(N <sub>0</sub> )	Log(N <sub>1</sub> )	Log(N <sub>2</sub> )	Log(N <sub>3</sub> )
$\mu_{\max}$ (Jours <sup>-1</sup> )	0,74	0,62	0,41	0,21	0,96	0,73	0,52	0,35
$G$ (Jour)	0,93	1,12	1,7	3,32	0,72	0,95	1,34	1,98

Cela signifie que les meilleurs taux de croissance exponentiels retenus de nos résultats sont ceux de *A. zanardinii* ( $\mu=0,62$  Jour<sup>-1</sup>,  $G= 1,12$  Jour), et *C. vulgaris* ( $\mu=0,73$  Jour<sup>-1</sup>,  $G= 0,95$  Jour) pour la plus faible concentration en Cd (50 mg/L).

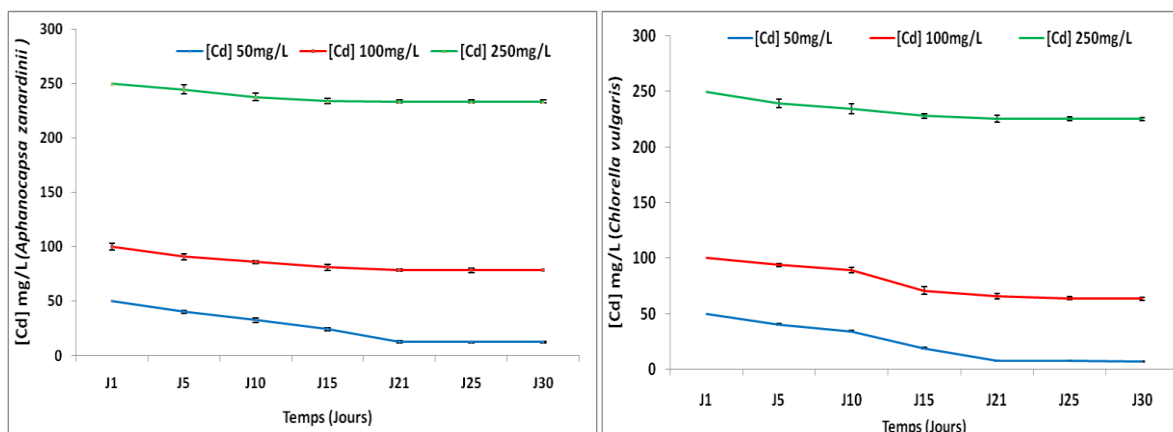
Les taux de croissance calculés (**Tableau IV.12**) pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* sont inférieurs à 2,08 Jour<sup>-1</sup> ceux qui a donné par **Findlay et al., (1994)** pour les algues vertes dans leur habitat non contaminé. Alors que l'on trouve d'autres travaux qui rapportent des taux pour *C. vulgaris* de 1,3 à 2,5 Jour<sup>-1</sup> pour des eaux non contaminées par une pollution métallique. En revanche, de faibles taux de croissance de (0,207-0,187 Jour<sup>-1</sup>) ont été enregistrés pour cette même espèce prélevée à partir de concentrations de Cu (200 et 500 µg/L), par rapport à celles sans ajout de Cu (0,216-0,203 Jour<sup>-1</sup>) (**Li et al., 2021**).

**Hockaday et al. (2022)**, ont comparé les réponses de *C. vulgaris* et *Scenedesmus obliquus* pour l'élimination de Cu/Cd et ont conclu que *Chlorella* était l'adsorbant le plus puissant puisqu'il était capable d'adsorber les métaux plus rapidement à partir d'une solution métallique unique et d'une solution mixte. *C. vulgaris* avait également une capacité de liaison plus élevée pour les deux métaux par rapport à *S. obliquus*. Lorsque les métaux sont dans une solution mixte, la présence de cuivre affecte l'adsorption du cadmium de chaque espèce d'algue. Ceci doit être pris en considération si *C. vulgaris* sera utilisé pour la bioremédiation des eaux usées, car la présence d'autres métaux peut réduire l'efficacité de l'élimination des métaux. Cependant, les taux de croissance obtenus à partir de nos conditions expérimentales sont comparables à ceux trouvés dans la littérature.

#### IV.6.2. Taux d'élimination du cadmium

Les microalgues photosynthétiques ont la capacité de consommer des polluants comme l'ammoniac et le phosphore, ainsi que les MLs (**Morin et al., 2008, 2016**), les qualifiant ainsi de bons candidats pour l'assainissement des eaux usées. Leur utilisation dans le phycoremédiation des eaux usées a démarré récemment (**Chaib et al., 2021; Tiwari & Marella, 2019**) Ils présentent une grande adaptabilité dans diverses conditions de croissance et compositions d'effluents, car ils peuvent tolérer des quantités excessives de MLs.

Les taux d'élimination ont été calculés en comparant la concentration finale enregistrée et la concentration initiale de cadmium (**Tableau IV.13**). La bio-élimination du Cd<sup>2+</sup> par *A. zanardinii* et *C. vulgaris* a été stoppée après 30 jours dans tous les flacons en atteignant la phase stationnaire minimale de [Cd<sup>2+</sup>] dès le 21<sup>ème</sup> jour (**Figure IV.20**). La baisse de la teneur en Cd<sup>2+</sup> a été améliorée par les deux espèces pour tous les traitements de bio-élimination. Les concentrations finales étaient respectivement de 11,43±0,55 et 6,97±0,28 mg/L pour [Cd]~50mg/L, 72,37±1,97 et 63,46±1,49 mg/L pour [Cd]~100mg/L, et 233,09±1,28 et 225±1,25mg/L pour [Cd]~250mg/L.



**Figure IV. 20: Élimination du Cd<sup>2+</sup> à l'aide de microalgues bleues-vertes et vertes : (a) *Aphanocapsa zanardinii*, (b) *Chlorella vulgaris***

Des taux de bio-élimination significatifs ont été enregistrés pour *C. vulgaris* 86,07 % [Cd]~50 mg/L, 36,54 % [Cd]~100 mg/L et 9,93 % [Cd]~250 mg/L. Les taux de Bioremédiation ont également été calculés pour *A. zanardinii* 75,13 % [Cd]~50 mg/L, 21,63 % [Cd]~100mg/L et 6,65 % [Cd]~250mg/L. Les taux d'élimination les plus élevés ont été obtenus pour [Cd]~50mg/L pour les deux espèces, tandis que les taux les plus faibles ont été enregistrés pour [Cd]~250mg/L (Tableau IV.13). Cela conduit à conclure que plus les concentrations de Cd<sup>2+</sup> sont élevées, plus les taux d'élimination seront faibles.

**Tableau IV. 13: Taux de bio-élimination du Cd<sup>2+</sup> à différentes concentrations en utilisant les microalgues *A. zanardinii* et *C. vulgaris*.**

Temps (Jours)	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>			<i>Chlorella vulgaris</i>		
	[Cd] 50mg/L	[Cd] 100 mg/L	[Cd] 250mg/L	[Cd] 50mg/L	[Cd] 100mg/L	[Cd] 250mg/L
J1	50,00±0,00	100,00±0,00	250,00±0,00	50,00±0,00	100,00±0,00	250,00±0,00
J5	40,11±1,52	90,89±2,82	244,68±4,32	40,33±0,52	93,58±1,27	239,33±3,90
J10	32,48±1,94	85,93±2,66	237,52±2,46	34,07±0,55	88,97±2,38	234,33±4,56
J15	24,16±1,12	81,17±1,58	233,88±2,46	19,07±0,48	70,70±3,30	228,00±2,13
J21	12,73±0,84	78,47±2,84	233,68±0,0	7,47±0,50	65,51±2,56	225,00±3,18
J25	12,48±0,59	78,40±1,27	233,38±1,31	7,37±0,34	63,66±1,37	225,25±1,68
J30	12,43±0,55	78,37±1,97	233,37±1,28	6,97±0,28	63,46±1,49	225,19±1,25
<b>Rendements (%)</b>	<b><u>75,13</u></b>	<b>21,63</b>	<b>6,65</b>	<b><u>86,07</u></b>	<b>36,54</b>	<b>9,93</b>

L'élimination des MLs par les microalgues vivantes comporte deux phases (Dwivedi, 2012); 1) l'une est rapide et la plupart du temps non affectée par l'« adsorption » du métabolisme cellulaire, et 2) la seconde est plus lente et repose sur l'« absorption » des activités métaboliques cellulaires.

Les algues prélevées sur les sites pollués sont considérées comme tolérantes ou résistantes aux MLs ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) (Zeraatkar et al., 2016). L'élimination biologique se caractérise par l'accumulation de polluants dans des solutions aqueuses à partir de biomasse d'algues vivantes ou non vivantes, permettant ainsi l'élimination de la contamination de manière respectueuse de l'environnement (Gadd, 1990) *A. zanardinii* et *C. vulgaris*, comme toutes les microalgues photosynthétiques, ont également la capacité de réduire par biosorption de grandes quantités de MLs dans l'eau. *C. vulgaris* est capable d'éliminer respectivement 69 % et 80 % des ions  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  à une concentration initiale de 2,5 ppm. Alors qu'en augmentant la concentration initiale à 10 ppm, l'efficacité d'élimination des métaux a encore été réduite à seulement 37 et 42 %, respectivement (Mehta & Gaur, 2001). L'efficacité de la bioremédiation dépend de la sélection des microorganismes (Dixit et al., 2015). Par exemple, *C. miniata* vivant a atteint un taux d'élimination de  $\text{Ni}^{2+}$  d'environ 85 % à une concentration initiale de 30 mg, tandis que *C. vulgaris* n'a atteint qu'environ 50 % (Tam et al., 2001). Dans une autre étude, *C. pyrenoidosa* a atteint une capacité d'adsorption de 70 à 98 % pour  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ , à une concentration initiale de 5 mg (Mahan et al., 1989). Ainsi, des taux de bioélimination plus élevés des métaux simples ont été comparés aux mélanges de métaux (Lin et al., 2020; Pascucci & Kowalak, 1996). Les taux d'efficacité de bioélimination des espèces de cyanobactéries comme *Anabaena variabilis* et *Tolythrix ceytonica* ont la capacité d'adsorber/absorber les MLs ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$ ), même à leurs concentrations élevées avec des préférences sélectives parmi elles (El Bestawy, 2019).

Les taux d'élimination dans la culture continue d'*Aphanocapsa* (Microcystis) sp. pour le  $\text{Cr}^{+4}$  étaient meilleures que dans les cultures discontinues (Travieso et al., 1999). Microcystis (*Aphanocapsa*) a montré un potentiel de biosorption élevé à partir d'une solution aqueuse contenant du  $\text{Pb}^{2+}$ , du  $\text{Cu}^{2+}$ , du  $\text{Cd}^{2+}$  et du  $\text{Zn}^{2+}$  (Singh et al., 2000). Cependant, Rai & Tripathi. (2007) ont constaté que les taux d'élimination du  $\text{Cd}^{2+}$  lorsqu'il était ajouté uniquement dans le milieu de croissance étaient d'environ 24 à 34,2 %. Cependant, lorsqu'il s'agit d'un mélange de  $\text{Cd}^{2+}$  et de  $\text{Cr}^{+4}$ , les taux d'élimination de  $\text{Cd}^{2+}$  étaient considérablement plus élevés (~65,2 %). Le mélange entre  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{+2}$  a également été testé (~59,7%) (Rai & Tripathi, 2007).

Shanab et al. (2012) ont montré que *Phormidium ambiguum* était le plus sensible aux trois ions métalliques testés, bien qu'à de faibles concentrations (5 et 10 mg/L), tandis que *Pseudochlorococcum typicum* et *Scenedesmus quadricauda* montraient une plus grande tolérance aux niveaux élevés de métaux atteignant des concentrations de 100 mg/L. La bio-élimination des ions de métaux lourds ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ ) à l'aide de *P. typicum* de la solution aqueuse a montré

que les taux les plus élevés se produisaient dans les 30 premières minutes de contact, enregistrant 97 % ( $\text{Hg}^{2+}$ ), 86 % ( $\text{Cd}^{2+}$ ) et 70 % ( $\text{Pb}^{2+}$ ).

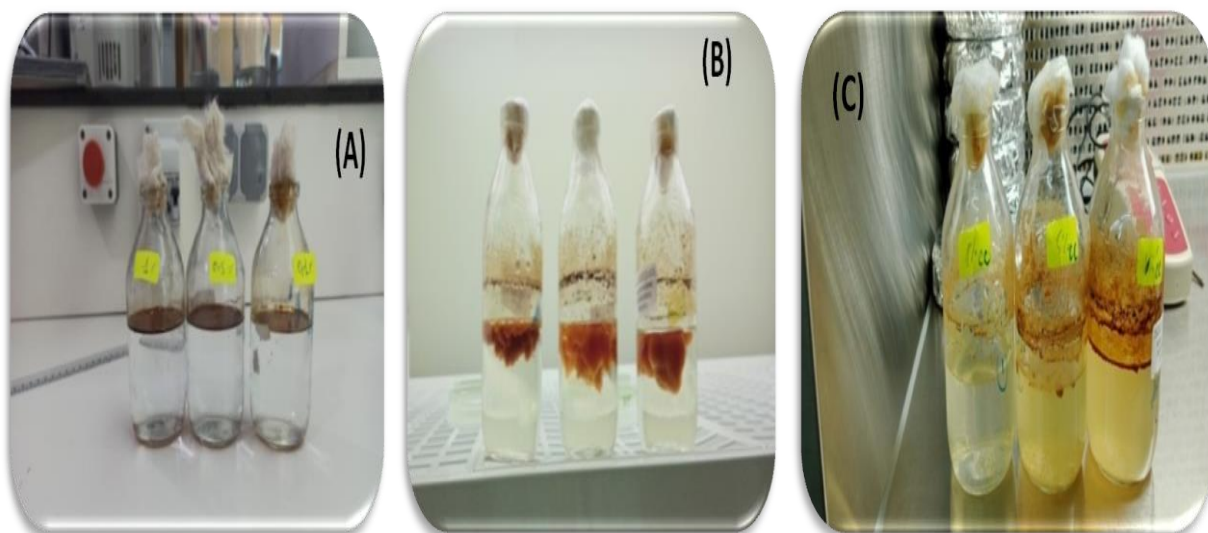
L'élimination des métaux lourds à l'aide de la biomasse microalgale dépend principalement de la teneur initiale en métaux dans le milieu de croissance. Le cadmium est le métal lourd le plus toxique résultant des eaux usées industrielles (**Danouche et al., 2021; Singh & Kumar, 2017**). Plusieurs études ont rapporté que les microalgues ont des réponses différentes au cadmium et donc différentes voies de bio-élimination. Cependant, la capacité de *Chlamydomonas reinhardtii* à éliminer le cadmium a été significativement améliorée (69,8 à 90,2 % en 6h) (**Piña-Olavide et al., 2020**). En revanche, **Ma et al. (2021)** ont étudié le potentiel d'élimination du cadmium par *Scenedesmus obliquus* en suspension et de son biofilm, et ont enregistré des efficacités d'élimination du  $\text{Cd}^{2+}$  avec une concentration initiale de 3 mg/L de 61,8 à 91,27 %, et de 87,49 % à partir de 20 mg/L comme concentration initiale.

**Ye et al., (2015)** ont démontré que la capacité de bioremédiation la plus élevée de l'ion  $\text{Cd}^{2+}$  était de 31,45 mg/g pour un poids initial de biomasse sèche de 15 g/L de *Porphyra leucosticta*, à pH~8,0 et un temps d'exposition de ~120 min à partir d'une concentration initiale de 10,0 mg/L pour le  $\text{Cd}^{2+}$  avec un taux de bio-élimination de 70 %. Par ailleurs, la capacité d'élimination pour un effluent industriel réel atteint 75 % dès 7,6 mg/L de concentration en ions  $\text{Cd}^{2+}$ .

#### **IV.7. LA DEGRADATION DU PETROLE BRUTE PAR LES MICROALGUES CHLORELLA ET APHANOCAPSA**

Les déversements de pétrole se produisent fréquemment dans une grande partie du monde, ce qui a certainement un impact négatif sur l'environnement. Une bioremédiation peu coûteuse et respectueuse de l'environnement pourrait être une alternative pour résoudre ce problème de pollution. Le pétrole brut est un mélange d'hydrocarbures, principalement toxiques pour les organismes vivants. Ces dernières années, il est devenu clair que les algues peuvent jouer un rôle important dans la biodégradation des hydrocarbures nocifs du pétrole brut par leur système di-oxygénase.

Le but de cette partie de notre recherche est de tester le pouvoir de la bioremédiation des hydrocarbures (Pétrole brut) dans les eaux usées de deux microalgues isolées *A. zanardinii* et *C. vulgaris*. Nous avons utilisé le pétrole brut comme source unique de carbone organique.



**Figure IV. 21: Dégradation du pétrole brut: A : début d'incubation. B : Emulsification du pétrole. C : Dégradation du pétrole et production de Biomasse**

Au début d'incubation les quantités de pétrole brut restent à la surface de milieu (**Figure IV.21A**), après 07 jours les microalgues produisent probablement des bio-surfactants, qui induisent l'émulsification du pétrole et facilite sa solubilité dans le milieu de culture et le rendent par conséquent plus accessible au microalgues et plus facile à être dégradé (**Figure IV.21B**). A la fin d'incubation, nous constatons une disparition du substrat dans le milieu de culture. La quantité de pétrole brut a été donc consommée par les microalgues après 28 jours d'incubation et utilisée comme seule source de carbone et d'énergie (**Figure IV.21C**).

L'émulsification est le processus qui permet la formation d'émulsion eau/huile souvent appelée « mousse » pendant les déversements du pétrole brut. Il s'agit d'un concept difficile à comprendre du sort des marées noires ainsi qu'à leur nettoyage. La formation d'émulsions modifie les caractéristiques des hydrocarbures déversés dans une large mesure. Les émulsions stables contiennent entre 60 et 80% d'eau. La densité de l'émulsion résultante peut être aussi élevée que 1,03 g/ml comparaison à une densité de départ aussi faible que 0,80 g/ml (**Fingas, 1995**).

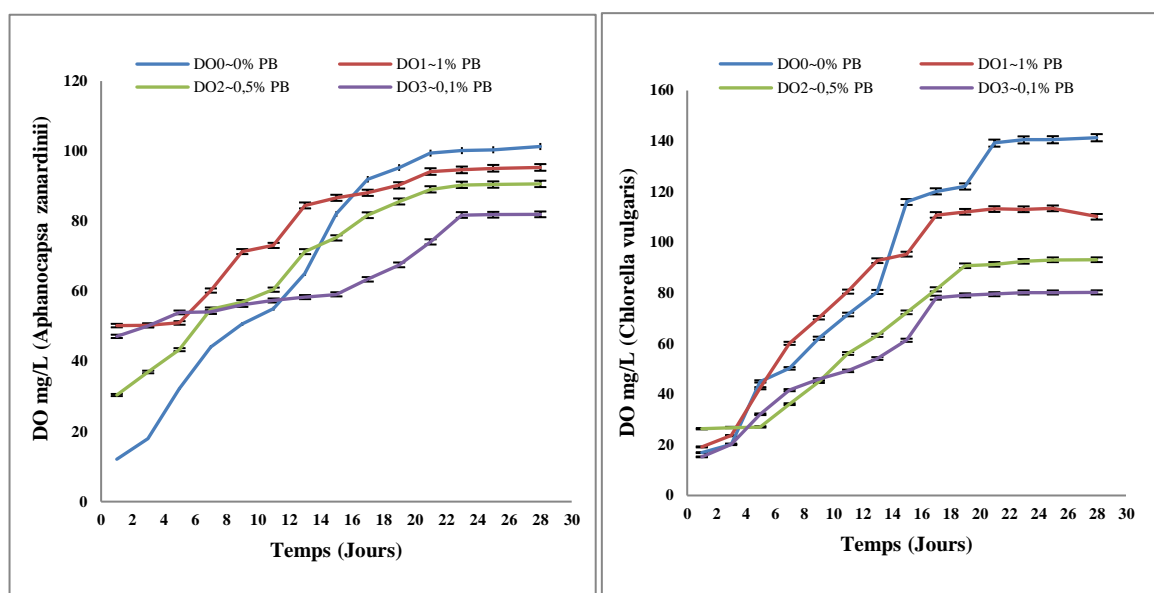
#### **IV.7.1. Suivi de la croissance en biomasse**

Les résultats de la croissance en biomasse mesurées par DO dans les cultures des espèces de microalgue *A. zanardinii* et *C. vulgaris* avec des différentes concentrations de pétrole brut (1%, 0,5% et 0,1%) sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau IV. 14: Évolution de la densité optique pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* avec des concentrations croissantes de pétrole brut.**

Temps (Jours)	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>				<i>Chlorella vulgaris</i>			
	DO <sub>0</sub> (mg/L) ~0% PB	DO <sub>1</sub> (mg/L) ~1% PB	DO <sub>2</sub> (mg/L) ~0,5% PB	DO <sub>3</sub> (mg/L) ~0,1% PB	DO <sub>0</sub> (mg/L) ~0% PB	DO <sub>1</sub> (mg/L) ~1% PB	DO <sub>2</sub> (mg/L) ~0,5% PB	DO <sub>3</sub> (mg/L) ~0,1% PB
J1	12,10±0,13	50,23±0,56	30,42±0,12	47,16±1,02	16,94±0,05	19,19±0,19	26,39±0,39	15,25±0,19
J3	18,03±0,05	50,39±0,61	36,99±0,14	50,19±0,65	20,12±0,08	23,65±0,31	26,87±0,86	20,31±0,23
J5	32,20±0,36	50,99±0,26	43,36±0,17	53,99±0,12	45,08±0,14	42,38±0,21	27,12±0,72	32,09±0,37
J7	44,18±0,33	60,23±0,09	54,85±0,16	54,09±0,14	50,22±0,11	60,11±0,05	36,09±1,01	41,62±0,13
J9	50,66±0,56	71,35±0,38	56,93±1,14	56,12±0,11	62,13±0,09	70,25±0,14	44,91±0,16	45,88±1,11
J11	55,08±0,41	83,11±0,16	60,48±0,41	57,39±1,06	71,51±0,16	80,54±0,24	56,11±0,12	49,23±0,52
J13	65,11±0,43	84,52±0,44	71,33±0,17	58,36±1,18	80,42±0,07	92,77±0,66	63,29±1,05	54,12±0,18
J15	82,08±0,47	86,69±0,72	75,25±0,18	59,15±0,89	115,96±0,19	95,35±1,02	72,36±0,19	61,33±0,84
J17	91,98±0,16	88,12±0,39	81,73±0,31	63,43±1,32	120,17±0,22	110,85±1,06	81,45±0,34	78,16±1,02
J19	95,34±0,50	90,24±0,41	85,65±0,18	67,56±0,47	122,09±0,15	112,09±1,13	90,76±0,39	79,07±0,23
J21	99,44±0,53	94,19±0,50	89,11±0,22	74,11±1,09	139,22±0,20	113,16±0,98	91,33±2,03	79,53±0,14
J23	100,16±0,51	94,66±0,50	90,39±0,43	81,79±0,37	140,49±0,19	113,09±0,83	92,52±0,56	80,20±0,05
J25	100,40±0,51	95,12±0,39	90,47±0,35	81,86±0,42	140,56±0,23	113,45±0,72	93,13±0,74	80,21±0,32
J28	101,33±0,54	95,36±0,18	90,66±0,32	81,97±0,63	141,36±0,21	110,12±0,16	93,15±0,33	80,25±0,16

La figure (IV.22) montre une progression de la densité optique de *C. vulgaris* et *A. zanardinii* du J1 à J28, d'une valeur minimale de (19,19±0,19) mg/L et (50,23±0,56) mg/L pour atteindre une valeur maximale de (110,12±0,16) mg/L et (95,36±0,19) mg/L respectivement chez les microalgues cultivées à 1% de pétrole brut, et une valeur minimale de (15,25±0,19) mg/L et (47,16±1,02) mg/L à une valeur maximale de (80,25±0,13) mg/L et (81,97±0,63) mg/L respectivement chez les microalgues cultivées dans une concentration de 0,1% de pétrole brut. Ces résultats ont été comparés à la DO<sub>0</sub> (densité optique initiale) pour les deux espèces (12,10±0,13 à 110,33±0,54) mg/L et (16,94±0,05 à 141,36±0,21) mg/L de *A. zanardinii* et *C. vulgaris* respectivement, dans les mêmes conditions expérimentales sans apport de pétrole brut (Tableau IV.14).



**Figure IV. 22: Effet de la variation de la concentration du pétrole brut sur la densité optique du *A. zanardini* et *C. vulgaris*.**

Les résultats obtenus à l'aide de la densité optique (DO) de l'effet de la variation de la concentration du pétrole brut sur la croissance de nos deux espèces de microalgues *C. vulgaris* et *A. zanardini* montrent que la concentration de la biomasse est proportionnelle à la concentration du substrat (pétrole brut) dans le milieu de culture. Nous remarquons que vers la fin de l'incubation, la croissance des microalgues commence à diminuer après une phase exponentielle de 23 jours, où la phase stationnaire commence à s'installer dans les mini fermenteurs contenant les concentrations les plus faibles en pétrole brut (0,1% et 0,5%). Alors que pour la concentration la plus élevée du pétrole (1%), elle représente la meilleure croissance en biomasse pour les deux espèces, nous remarquons un ralentissement dans la croissance des microalgues puis l'apparition de la phase stationnaire dans toutes les cultures. Cette différence est due à l'épuisement du substrat (le pétrole brut) dans le milieu de culture qui est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie.

Les résultats des cellules vivantes comptées à l'aide d'une cellule de numération de Thoma distinguent les cellules viables des cellules mortes, on donne les mêmes allures des courbes mais avec une concentration en biomasse moins élevée à la fin de l'incubation par rapport à la méthode DO. Cette comparaison entre les différentes méthodes de mesure de la croissance en biomasse sert à bien étudier la capacité de bioremédiation.

**Tableau IV. 15: Evolution de la numération cellulaire Log (N) pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* avec des concentrations croissantes de pétrole brute**

Temps (Jours)	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>				<i>Chlorella vulgaris</i>			
	Log(N <sub>0</sub> ) ~0% PB	Log(N <sub>1</sub> ) ~1% PB	Log(N <sub>2</sub> ) ~0,5% PB	Log(N <sub>3</sub> ) ~0,1% PB	Log(N <sub>0</sub> ) ~0% PB	Log(N <sub>1</sub> ) ~1% PB	Log(N <sub>2</sub> ) ~0,5% PB	Log(N <sub>3</sub> ) ~0,1% PB
<b>J1</b>	15,12±0,35	14,11±0,22	12,23±0,02	9,85±0,26	18,14±0,26	17,49±0,06	14,82±0,03	10,26±0,02
<b>J3</b>	15,15±0,04	14,13±0,01	12,66±0,04	9,93±0,08	18,29±0,25	17,73±0,12	14,89 ±0,18	10,64±0,04
<b>J5</b>	17,30±0,03	15,15±0,03	13,77±0,07	10,76±0,07	20,76±0,19	19,12±0,24	16,05±0,15	12,13±0,07
<b>J7</b>	19,34±0,01	20,42±0,08	18,79±0,06	13,12±0,06	23,17±0,13	21,39±0,36	18,55±0,07	15,34±0,10
<b>J9</b>	21,63±0,05	23,59±0,08	22,68±0,05	19,16±0,14	25,13±0,11	23,51±0,13	21,63±0,56	18,38±0,11
<b>J11</b>	23,82±0,44	27,94±0,04	26,14±0,41	21,19±0,05	28,18±0,21	25,22±0,23	24,19±0,05	19,45±0,13
<b>J13</b>	25,22±0,56	29,28±0,05	28,24±0,17	23,22±0,09	30,33±0,24	27,64±0,16	25,27±0,19	20,15±0,19
<b>J15</b>	27,17±0,26	30,27±0,11	29,15±0,18	25,31±0,03	32,60±0,19	28,35±0,08	26,23±0,25	23,64±0,22
<b>J17</b>	27,35±0,45	30,26±0,03	29,27±0,03	25,39±0,11	34,84±0,015	28,34±0,18	26,48±0,16	23,69±0,13
<b>J19</b>	28,48±0,11	30,20±0,04	29,22±0,05	25,52±0,13	35,51±0,06	28,58±0,11	26,55±0,26	23,73±0,31
<b>J21</b>	29,22±0,33	28,97±0,08	28,31±0,17	22,63±0,18	36,07±0,25	26,91±0,36	24,73±0,17	20,79±0,51
<b>J23</b>	28,83±0,22	27,21±0,02	27,32±0,19	21,66±0,15	30,16±0,25	24,43±0,52	23,78±0,09	18,18±0,21
<b>J25</b>	28,41±0,25	26,79±0,09	24,35±0,43	20,72±0,12	29,70±0,19	25,43±0,32	22,83±0,14	16,81±0,19
<b>J28</b>	25,09±0,26	23,48±0,92	22,34±0,41	20,23±0,22	26,74±0,17	21,36±0,48	20,78±0,39	16,91±0,23

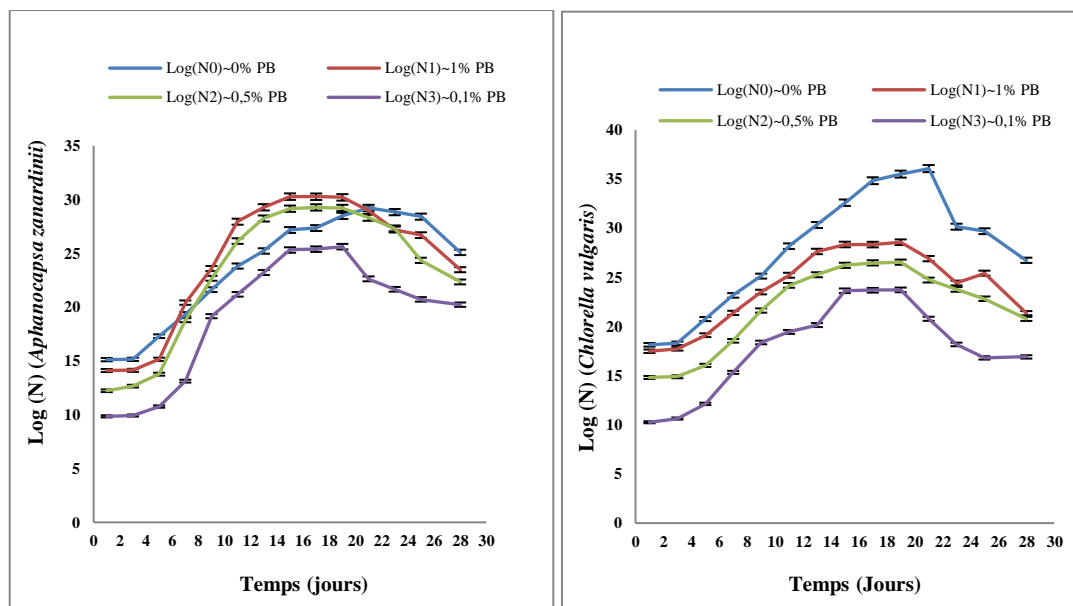
Le nombre des cellules viables le plus élevé était trouvé pour la concentration de 1% de pétrole brut pour les deux espèces. La phase de latence a duré de 3 jours et la courbe de croissance a montré une augmentation graduelle du nombre de cellules jusqu'au 2<sup>ème</sup> jour. La cellule à besoin d'un temps d'adaptation aux nouvelles conditions de culture qui lui est appliquée et la croissance est très faible durant cette phase.

Par la suite, l'augmentation était rapide du 3<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour. Les cellules ont accumulé suffisamment de composés intracellulaires et ont doublé leur matériel génétique. La population commençait à croître. Les cellules mères se divisent donc en deux cellules filles identiques contenant chacune la moitié du contenu de la cellule mère, et qui par la suite se divisera elles-mêmes en deux.

Ensuite, du 7<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour la croissance des algues présentait une allure exponentielle. La vitesse de croissance de la culture reste constante et maximale. Les conditions du milieu sont optimales pour la croissance cellulaire.

La croissance des algues a été stationnaire du 15<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour pour la concentration en PB de 1% et 0,5% pour *A. zanardinii* et du 15<sup>ème</sup> au 19<sup>ème</sup> jour *C. vulgaris* à ces mêmes deux concentrations. La vitesse de croissance diminue. Cependant tant que les cellules possèdent des produits de stockage leur permettant d'alimenter leur métabolisme, elles survivent. La quantité des cellules qui se reproduisent est égale à la quantité de cellules qui meurent ce qui conduit à une concentration cellulaire constante.

Le  $\text{Log}(N_0)$  initial était de  $(15,12 \pm 0,44)/L$  et  $(18,14 \pm 0,26)/L$  tandis que le nombre le plus élevé  $\text{Log}(N_0)$  était de  $(29,22 \pm 0,33)/L$  et  $(36,07 \pm 0,25)/L$  pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* respectivement. A la fin des expériences, pour chaque concentration en PB  $\text{log}(N_1)$ ,  $\text{log}(N_2)$  et  $\text{log}(N_3)$  étaient respectivement pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris*  $(23,48 \pm 0,92)/L$  et  $(21,36 \pm 0,48)/L$  pour [PB]~1%,  $(22,34 \pm 0,41)/L$  et  $(20,78 \pm 0,39)/L$  pour [PB]~0,5%, et  $(20,23 \pm 0,22)/L$  et  $(16,91 \pm 0,23)/L$  pour [PB] ~0,1% (**Tableau IV.15**).



**Figure IV. 23: Effet de la variation de la concentration du pétrole brut sur les nombres les cellules viable de *A. zanardinii* et *C. vulgaris*.**

Les taux de croissance maximale ( $\mu_{\text{max}}$ ) et le temps de doublement de génération  $G$  calculé au cours de cette expérience étaient regroupés dans le **tableau (IV.16)**

**Tableau IV.16: Taux de croissance  $\mu$  et temps de doublement de génération G déterminés pour les deux espèces *A. A. zanardinii* et *C. vulgaris* pour chaque concentration en PB (1%, 0,5% et 0,1%)**

	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>				<i>Chlorella vulgaris</i>			
	Log(N <sub>0</sub> )	Log(N <sub>1</sub> )	Log(N <sub>2</sub> )	Log(N <sub>3</sub> )	Log(N <sub>0</sub> )	Log(N <sub>1</sub> )	Log(N <sub>2</sub> )	Log(N <sub>3</sub> )
$\mu_{\max}$ (Jours <sup>-1</sup> )	0,97	1,23	1,83	1,52	1,19	1,04	1,41	1,03
G (Jour)	0,31	0,24	0,16	0,19	0,25	0,28	0,21	0,29

Les temps de doublement de génération sont tous inférieurs à 1 jour pour les algues cultivées dans les milieux de culture et dans les différentes concentrations en PB.

Nous avons remarqué que les meilleurs taux de croissance exponentiels retenus de nos résultats sont ceux de *A. zanardinii* ( $\mu=1,83$  Jour<sup>-1</sup>, G= 0,16 Jour), et *C. vulgaris* ( $\mu=1,41$  Jour<sup>-1</sup>, G= 0,21 Jour) pour la concentration en PB de (0,5%).

#### IV.7.2. Evaluation du rendement

Lors du calcul des rendements de l'élimination du pétrole brut pour chaque espèce nous avons trouvé les valeurs ci-dessous :

**Tableau IV.17: Taux de bio-élimination du pétrole brut à différentes concentrations en utilisant les microalgues *A. zanardinii* et *C. vulgaris*.**

[PB] mg/L	Rendement (R%)	
	<i>Aphanocapsa zanardinii</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
0,1	50,6	85,63
0,5	43,42	71,02
1	79,12	88,6
Tm	99,81	99,45

Des taux de bio-élimination significatifs ont été enregistrés pour *C. vulgaris* 85,63 % [PB]~0,1%, 71,02 % [PB]~0,5% et 88,6 % [PB]~1% et pour *A. zanardinii* 50,6 % [PB]~0,1%, 43,42 % [PB]~0,5% et 79,12 % [PB]~1%. Les taux d'élimination les plus élevés ont été obtenus pour [PB]~1% pour les deux espèces, tandis que les taux les plus faibles ont été enregistrés pour [PB]~0,5% (Tableau IV.13).

Selon Li et al. (2020), qui ont utilisé une quantité de PB initial de 2 g dans 100 mL de milieu (2%). L'huile résiduelle après biodégradation était de 1,331 g. Ainsi, le taux de dégradation du l'huile brut à l'aide des bactéries après la sixième sous-culture était de 33,5 %.

Les ratios n-C17/pristane et le n-C18/phytane ont diminué de 0,61 et 0,49 dans le pétrole brut à 0,42 et 0,32 dans l'huile résiduelle, soit une réduction de 31,1 % et 34,5 %, respectivement. Cependant, le ratio pristane/phytane n'était pas manifestement modifié. Le résultat démontre que les n-alcanes ont été dégradés préférentiellement.

Dans l'étude de **Hamouda et al. (2016)**, *Anabaena oryzae* et *Chlorella kessleri* ainsi que son consortium pourrait se développer à différentes concentrations de pétrole brut (0,5, 1 et 1,5 %) sous conditions mixotrophe et améliorer la biodégradation du pétrole brut. Cependant, 1% de pétrole brut était la concentration optimale pour leur croissance maximale. La teneur en chlorophylle-a de *C. kessleri*, *A. oryzae* et son consortium a augmenté dès le premier jour d'incubation avec 0,5 et 1% de concentration de pétrole brut jusqu'à 14<sup>ème</sup> jours. Alors que la teneur en chlorophylle-b du consortium diminué à différentes concentrations de pétrole brut après 14 jours. Tandis que les expériences d'**El-Sheekh et al. (2013)** ont été réalisées en incubant des cultures d'algues avec (0,5, 1, 1,5 et 2 %) de pétrole brut, pour période d'incubation de 15 jours dans des conditions hétérotrophes. Ils ont été constaté que *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella vulgaris* a retenu le taux de biodégradation le plus élevé du pétrole brut lorsque 0,5 et 1 % d'huile ont été appliqués (qui est similaire à que nous avons obtenu dans notre étude avec *A. zanzardinii* et *C. vulgaris*). La plus forte croissance de *S. obliquus* a été observée avec 0,5 % de pétrole brut; alors qu'il était enregistré à 2% pour *C. vulgaris*, dans les mêmes conditions hétérotrophes. Les deux algues *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella vulgaris* pourraient se développer et dégrader efficacement le pétrole lorsqu'il est incubé avec de faibles concentrations d'huile.

Sur la base des résultats obtenus par l'étude de **Ghodrati et al. (2021)**, les traitements au pétrole brut (0,02 et 1%) ont conduit à un niveau d'expression relativement élevé de lipoxgénase (lox) chez *Scenedesmus dimorphus* par rapport aux conditions témoins. De plus, le temps d'incubation a affecté de manière significative l'expression relative de ce gène dans les algues traitées à l'huile et non traitées. Les résultats de cette recherche ont indiqué que *S. dimorphus* a un potentiel élevé d'amélioration de l'activité enzymatique sous traitement au pétrole brut.

La caractérisation de la microalgue par **Ugya et al. (2021)** montre la capacité du biofilm de microalgues à adsorber les polluants dans l'eau contaminée par le pétrole, en raison de la présence de microspores et plus grande surface des cellules de la microalgue formant le biofilm ou en raison de l'efficacité d'absorption des substances polymères extracellulaires (EPS). L'analyse des paramètres phyto-chimiques du biofilm de ces microalgues montrent l'implication des composants chimiques dans la dégradation des polluants et la réponse anti-oxydante des

microalgues pour combattre l'effet oxydant résultant de l'exposition de la microalgue à l'eau contaminée.

Dans le travail de **Kuttiyathil et al. (2021)**, le taux de croissance spécifique ( $\mu_{max}$ ) de *Chlorella vulgaris* pour chaque concentration initiale d'huile a été déterminé et s'est avéré augmenté avec l'augmentation de la concentration initiale en huile. Les résultats de cette étude montrent clairement le potentiel d'utilisation des microalgues pour la remédiation de l'huile émulsionnée à des taux de concentrations relativement élevés. Par exemple, à 30 °C, le taux de croissance spécifique,  $\mu$  est passé de 0,477 à 0,784 par jour lorsque la concentration d'huile a augmenté de 57 à 222 mg/L. A 30 °C, l'effet de la concentration du substrat concorde avec celle de la croissance des microalgues, alors qu'à 40 °C, la baisse de la concentration en huile diminue avec l'augmentation de la concentration. Les résultats ont été ajustés à un modèle de cinétique Monod modifié qui utilisait une zone inter-faciale spécifique comme l'influence du substrat au lieu de la concentration réelle.

**Xaaldi Kalhor et al., (2016, 2017)** ont été mise en culture de *Chlorella vulgaris* à un environnement pollué par le pétrole brut pour la production de biodiesel. Les concentrations prévues étaient de 10 et 20 grammes par litre (pétrole brut/eau) en deux fois à deux durées expérimentales de (7 et 14 jours). Les résultats ont montré que la croissance de *C. vulgaris* était améliorée dans les eaux usées et la quantité maximale de masse sèche et d'huile a été produite dans la concentration la plus élevée de pétrole brut (0,41 g et 0,14 g respectivement). La masse sèche a été portée à environ 7% en doublant le temps et l'augmentation du rendement en huile était de 8% (**Xaaldi Kalhor et al., 2016**). Les résultats obtenus par **Xaaldi Kalhor et al. (2017)**, montrent que *C. vulgaris* possédait non seulement des quantités considérables résistance contre les polluantes, mais aussi de grandes capacités de remédiation des hydrocarbures de pétrole brut (~94% des composés légers et ~88% des composés lourds en 14 jours). Curieusement, le poids sec de *C. vulgaris* a augmenté par l'augmentation de la concentration de pétrole brut indiquant l'effet positif du pétrole brut sur la croissance des espèces d'algues. Ce processus de biodégradation est remarquablement une progression continue sur une période de temps.

**Znad et al. (2018)**, ont rapporté que le traitement des effluents pétroliers (EP) avec *Chlorella sp.*, complètement éliminé le phosphore après 13 jours, réduit l'azote de 78 % et réduit la DCO de 504 mg/L à 144 mg/L. Cependant, le traitement des effluents pétroliers avec *Chlorella sp.* augmente initialement la biomasse, mais à long terme, commence à être toxique et inhibe la croissance. La nature et la concentration du pétrole brut, ainsi que ses constituants, influencent grandement la croissance et l'élimination de *Chlorella*. Par exemple, l'utilisation de

Water-Accommodated fraction (WAF) dérivée du diesel est plus toxique pour la *Chlorella* que le diesel car elle contient de nombreux hydrocarbures de faible poids moléculaire (LMW-HC), qui peuvent endommager les cellules membranes et affectent la production de pigments protecteurs, comme rapporté par **Ramadass et al. (2017)**.

Les bactéries dominantes dégradant les hydrocarbures pétroliers ont été déplacées d'*Arcobacter* dans l'eau de production vers *Pseudomonas* après la première sous-culture, puis vers *Bacillus* après la sixième sous-culture. Les groupes hétéro-atomiques du pétrole brut ont été biodégradés simultanément avec des alcanes normaux et des alkyl-cyclohexanes. L'ajout des nutriments a entraîné une croissance microbienne, un déplacement de la communauté microbienne et une dégradation microbienne accrue (**Li et al., 2020**).

# CONCLUSION GENERALE

---

## CONCLUSION GENERALE

Cette étude s'inscrit dans une optique de la biotechnologie et du développement durable, de matériaux recyclables et de protection des milieux naturels récepteurs. L'utilisation des microalgues dans différents domaines est devenue de plus en plus large, notamment dans le domaine de traitement des eaux usées grâce à leur pouvoir de bioaccumulation des nutriments et des métaux lourds. C'est dans ce secteur que notre travail se situe, en raison de leur caractère ubiquiste, les microalgues s'offrent comme une solution biotechnologique prometteuse dans une optique de durabilité environnementale et dans la mise au point de bioprocédés, il a eu pour but de montrer l'importance des microalgues dans le domaine de traitement des eaux, dont l'objectif principal est de fournir une solution à double avantages et qui répond à la fois aux deux défis majeurs : la protection de l'environnement par la dépollution et de montrer le rôle des microalgues dans le domaine de traitement des eaux usées, en abordant des exemples d'études scientifiques sélectionnées qui nous ont permis de mettre en évidence le pouvoir bio-accumulateur des algues microscopiques étudiées car en dépit de leur faible concentration, ces éléments bioaccumulables présentent un risque de toxicité à moyen et à long terme. Il faudrait donc envisager leur élimination. Il consiste aussi à étudier l'effet du milieu de culture enrichi par les métaux lourds et les facteurs nécessaires pour la culture des microalgues sur la croissance de ces derniers.

Cette étude fournit aussi des connaissances précieuses sur les caractéristiques physicochimiques de l'écosystème aquatique du golfe de Skikda. Les paramètres physicochimiques de l'eau effectués *in situ* sur les trois sites de prélèvement sont : le pH, la Température (T), la Conductivité Electrique (CE), Oxygène dissous ( $O_2$  dis), ont été réalisés grâce à un appareil multi-paramètre portable de terrain modèle HANNAHi HI9829. Alors que les autres paramètres tels que : les Matière En Suspension (MES), la Demande Chimique en Oxygène (DCO), la Demande Biochimique en Oxygène ( $DBO_5$ ), le Carbone Organique Totale (COT), les Hydrocarbures Totaux (HT), les Phosphates ( $PO_4^{3-}$ ), les Nitrites ( $NO_2^-$ ), les Nitrates ( $NO_3^-$ ) sont analysés au niveau du laboratoire d'analyse environnementale du centre de recherche en biotechnologie (CRBt) à Constantine. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont effectués au niveau du laboratoire d'analyse de GL1K-SONATRACH-SKIKDA.

Elle a comme principale objectif d'étudier des capacités de l'élimination des différents polluants organiques et minérales tels que : les phosphates, l'azote, les métaux lourds et les hydrocarbures contenus dans les eaux usées synthétiques et industriels par un procédé biologique qui consiste dans l'utilisation des microalgues brunes (les diatomées) (*Nitzschia sp.*), des

microalgues vertes (*Chlorella vulgaris*) et des microalgues bleu-vertes (*Aphanocapsa zanardinii*), dans un photobioréacteur en mode Fed-batch conçu par nous-mêmes au laboratoire.

Dans un premier temps, nous avons cultivé les diatomées (*Nitzschia sp.*), les microalgues vertes (*Chlorella vulgaris*) et les microalgues bleu-vertes (*Aphanocapsa zanardinii*) dans un milieu de culture spécifique (WCM, BG11 et BBM) respectivement. A partir de la culture finale des diatomées (*Nitzschia sp.*) dans ce milieu de culture spécifique, nous avons repiqué un prélèvement pour l'ensemencer dans un nouveau milieu de culture qui est l'eau usée synthétique. Cette étape a pour but de sélectionner les espèces tolérantes à la pollution responsables de la dégradation des matières organiques carbonées, azotées et phosphorées de notre eau usée artificielle. Pour l'élimination du cadmium à des concentrations de (50, 100, 250) mg/L en utilisant séparément *C. vulgaris* et *A. zanardinii*. La bio-élimination du pétrole brut à (0,1, 0,5 et 1) % a été réalisée par ces deux dernières souches en utilisant le pétrole brut comme source unique de carbone et d'énergie.

Dans les trois milieux de culture spécifique (WCM, BBM, BG11) et dans l'eau usée nous avons suivi l'évolution de la concentration en biomasse de nos espèces microalgales isolées en fonction du temps, de la conductivité et de l'O<sub>2</sub> dissous. Les résultats du dénombrement des microalgues montrent que la croissance en biomasse augmente au cours du temps en fonction de l'augmentation du volume de culture et avec la diminution de la conductivité et de l'O<sub>2</sub> dissous.

Les résultats des analyses physicochimiques réalisées de notre eau usée synthétique ont montré que les valeurs obtenues de ces paramètres étaient supérieures aux normes algériennes de rejet des eaux usées urbaines et industrielles et ne conviennent pas d'être rejetées dans le milieu naturel récepteur, et doivent impérativement faire l'objet d'une épuration biologique tout à fait écologique afin d'éviter la contamination du milieu aquatique.

Les résultats des rendements épuratoires ont mis en évidence l'efficacité de notre photobioréacteur en mode Fed-batch fonctionnant avec une culture des microalgues *Nitzschia* dans les eaux usées synthétique de l'élimination de la pollution carbonée, azoté et phosphorée dans des conditions opératoires optimales. La mise au point de notre photobioréacteur a permis d'obtenir un abattement significatif des paramètres de pollution suivants : la DCO la DBO<sub>5</sub> avec des taux de rendements de 80,27% et 58 % respectivement. Les rendements de l'élimination du phosphore et de l'azote sont comme suit : pour les [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>] un rendement de 71,91%, pour les nitrites [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] un rendement de 43,27% et pour les nitrates [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] un rendement de 98,47%.

Les résultats obtenus ont montré aussi que les deux microalgues *A. zanardinii* et *C. vulgaris* ont une capacité significative à éliminer le cadmium avec des taux d'élimination significatifs en utilisant séparément *A. zanardinii* (75,13%) et *C. vulgaris* (86,07%) à la concentration en  $\text{Cd}^{2+}$  de 50 mg/L. Et d'autre part, nous avons vérifié l'efficacité des ces deux microalgues phototrophes pour éliminer le pétrole brut des eaux usées des raffineries. On obtient les bons rendements: (79,12%) et (88,6%) à la concentration en pétrole de 1% pour *A. zanardinii* et *C. vulgaris* respectivement.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que l'application du photobioréacteur en mode fed-batch dans le traitement biologique de notre eau usée synthétique par une culture de *Nitzschia sp.*, est apte à l'élimination de la charge organique. Ils ont confirmé aussi que les microalgues *C. vulgaris* et *A. zanardinii*, ont un pouvoir de biodégradation de métaux lourds et de pétrole brut très intéressant, et cela peut être expliqué par le fait que ces espèces ont été isolées à partir des sites exposés aux rejets des eaux usées de la raffinerie pétrolière de la wilaya de Skikda. Autrement dit, les espèces qui ont fait objet de culture étaient déjà des espèces adaptées à ce type de contamination.

### **PERSPECTIVES**

En perspective, cette conception de PBRT doit être optimisée pour pouvoir traiter une eau usée à une charge plus importante. Et pour être adaptée à l'échelle industrielle, en raison de son coût relativement faible par rapport à d'autres processus biologiques de traitement des eaux usées. L'avantage de cette technologie est également la récupération de la biomasse algale à la fin du processus et la production des différentes substances à valeur ajoutée. Elle peut être appliquée comme une alternative pour la plupart des procédés physiques et chimiques employés au niveau des stations d'épuration de la raffinerie de Skikda. On peut considérer que le traitement de l'eau par les microalgues est une méthode moderne, efficace et facile, et moins cher très recommandées dans le domaine de traitement des eaux usées.

# **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

**A**

- Abboud, P., & Wilkinson, K. J. (2013). Role of metal mixtures (Ca, Cu and Pb) on Cd bioaccumulation and phytochelatin production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Pollution*, 179, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.047>
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Aboul-Kassim, T. A. T., & Simoneit, B. R. T. (1995). Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Particulate Fallout of Alexandria, Egypt: Sources and Implications. *Environmental Science and Technology*, 29(10), 2473–2483. <https://doi.org/10.1021/es00010a004>
- Aboul-Kassim, T. A. T., & Simoneit, B. R. T. (1996). Lipid geochemistry of surficial sediments from the coastal environment of Egypt I. Aliphatic hydrocarbons—characterization and sources. *Marine Chemistry*, 54(1–2), 135–158.
- Adesiyan, I. M., Bisi-Johnson, M., Aladesanmi, O. T., Okoh, A. I., & Ogunfowokan, A. O. (2018). Concentrations and human health risk of heavy metals in rivers in Southwest Nigeria. *Journal of Health and Pollution*, 8(19). <https://doi.org/10.5696/2156-9614-8.19.180907>
- Adriano, D. C. (2001). Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals (Vol. 860). Springer.
- Agnello, A. C., Bagard, M., van Hullebusch, E. D., Esposito, G., & Huguenot, D. (2016). Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 563–564, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>
- Alabi-Ali, B., Isyaku Ind, I., Ameh Yaro, C., & Nasir Opis, A. (2019). Production and Characterization of Biodiesel from the Microalga, *Chlorella vulgaris* (Beijerinck 1890). *Trends in Applied Sciences Research*, 14(2), 90–97. <https://doi.org/10.3923/tasr.2019.90.97>
- Al-Hassany, J. S., Alrubai, G. H., & Jasim, I. M. (2021). The potential use of the diatom *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith for the Removal of Certain Pollutants from Al-

- Rustumeyah Wastewater Treatment Plant in Baghdad-Iraq. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 779(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/779/1/012114>
- Al-lwayzy, S. H., Yusaf, T., & Al-Juboori, R. A. (2014). Biofuels from the fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* (FWM-CV) for diesel engines. *Energies*, 7(3), 1829–1851. <https://doi.org/10.3390/en7031829>
- Al-mailem, D. M., Al-deieg, M., Eliyas, M., & Radwan, S. S. (2017). Biostimulation of indigenous microorganisms for bioremediation of oily hypersaline microcosms from the Arabian Gulf Kuwaiti coasts. *Journal of Environmental Management*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.02.054>
- Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019(Cd). <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
- Allard, B., & Templier, J. (2000). Comparison of neutral lipid profile of various trilaminar outer cell wall (TLS)-containing microalgae with emphasis on algaenan occurrence. *Phytochemistry*, 54(4), 369–380. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00135-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00135-7)
- Andrade, C. J. de, & Andrade, L. M. de. (2018). Microalgae for bioremediation of textile wastewater: An overview. *MOJ Food Processing & Technology*, 6(5), 432–433. <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2018.06.00200>
- Arias, A. H., Souissi, A., Glippa, O., Roussin, M., Dumoulin, D., Net, S., Ouddane, B., & Souissi, S. (2016). Removal and Biodegradation of Phenanthrene , Fluoranthene and Pyrene by the Marine Algae *Rhodomonas baltica* Enriched from North Atlantic Coasts. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1967-4>
- Arif, A. (2020). Water pollution and industries. *Pure and Applied Biology*, 9(4), 2214–2224. <https://doi.org/10.19045/bspab.2020.90237>
- Arris, C. (2008). Etude Expérimentale de l'Élimination des Polluants Organiques et Inorganiques par Adsorption sur des Sous Produits de Céréales ,Thèse De Doctorat ,Université de Constantine , 2008. *Thèse De Doctorat*.
- Arulazhagan, P., AL-Shekri, A., Huda, Q., Godon, J. J., Basahi, J. ., & Jeyakumar, D. (2016).

- Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an acidophilic *Stenotrophomonas maltophilia* strain AJH1 isolated from a mineral mining site in Saudi Arabia. *Extremophiles*, 21, 163–174. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0892-0>
- Asfour, N. Y. (2019). Production en masse de microalgues : optimisation des paramètres physico-chimiques. Thèse de doctorat, Université d'Oran, 2019, 10.
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1), 180–209. <https://doi.org/10.1128/membr.45.1.180-209.1981>
- Aubry, G. (2003). Enlèvement de l'azote des eaux usées par un procédé à culture fixée immergée. *Université Laval*, 36(6), 48–59.
- Aydin, S., Karaday, H. A., Shahi, A., Gökçe, S., Ince, B., & Ince, O. (2016). Aerobic and anaerobic fungal metabolism and Omics insights for increasing polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Fungal Biol. Rev.*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.12.001>
- Azeh Engwa, G., Udoka Ferdinand, P., Nweke Nwalo, F., & N. Unachukwu, M. (2019). Mechanism and Health Effects of Heavy Metal Toxicity in Humans. *Poisoning in the Modern World - New Tricks for an Old Dog?*, June. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82511>

## **B**

- Badger, M. R., Von Caemmerer, S., Ruuska, S., Nakano, H., Laisk, A., Allen, J. F., Asada, K., Matthijs, H. C. P., & Griffiths, H. (2000). Electron flow to oxygen in higher plants and algae: Rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1433–1446. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0704>
- Bajwa, K., Bishnoi, N. R., A.Kirrolia, Sharma, J., & Gupta, S. (2017). Comparison of various growth media composition for physio-biochemical parameters of biodiesel producing microalgal species (*Chlorococcum aquaticum*, *Scenedesmus obliquus*, *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella pyrenoidosa*). *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 5(6), 27–31.

- Baldantoni, A. D., Morelli, R., Prati, M. V., Alfani, A., & Nicola, F. De. (2017). Anthracene and benzo(a)pyrene degradation in soil is favoured by compost amendment: perspectives for a bioremediation approach. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.043>
- Balzano, S., Sardo, A., Blasio, M., Chahine, T. B., Dell'Anno, F., Sansone, C., & Brunet, C. (2020). Microalgal Metallothioneins and Phytochelatins and Their Potential Use in Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00517>
- Barberousse, H. (2006). *Etude de la diversité des algues et des cyanobactéries colonisant les revêtements de façade en France et recherche des facteurs favorisant leur implantation*.
- Baudelet, P. H., Ricochon, G., Linder, M., & Muniglia, L. (2017). A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Research*, 25(July), 333–371. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.008>
- Baumont, S. (2004). *Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France*. 222.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology* (Vol. 10). Cambridge University Press.
- Becker, E. W. (2013). Microalgae for human and animal nutrition. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 461–503.
- Behanzin, G., Adjou, E., Yessoufou, A., Dahouenon Ahoussi, E., & Sezan, A. (2015). Effet des sels de métaux lourds (chlorure de Cobalt et chlorure de Mercure) sur l'activité des hépatocytes. *Journal of Applied Biosciences*, 83(1), 7499. <https://doi.org/10.4314/jab.v83i1.4>
- Bellinger, E. G., & Sigeo, D. C. (2010). A Key to the More Frequently Occurring Freshwater Algae. In *Freshwater Algae* (pp. 137–244). <https://doi.org/10.1002/9780470689554.ch4>
- Ben Said, R. (1994). Culture du phytoplancton en petits volumes. *Rull. Inst. Nat. Scient. Techn. Oceanogr. Pêche. Salamhò*, 21, 30–40.
- Benisch, M., Clark, D., Neethling, J., Sid Fredrickson, H., & Gu, A. (2012). Can Tertiary Phosphorus Removal Reliably Produce 10  $\mu\text{g/L}$ ? Pilot Results from Coeur D'Alene, ID.

- Proceedings of the Water Environment Federation*, 2007(2), 1470–1491.  
<https://doi.org/10.2175/193864707787977190>
- Bertrand, J.-C., & Mille, G. (1989). Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. *Microorganismes Dans Les Écosystèmes Océaniques*. Masson (Paris), Chapitre, 13, 343–385.
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Birn, A. E., Shipton, L., & Schrecker, T. (2018). Canadian mining and ill health in Latin America: a call to action. *Canadian Journal of Public Health*, 109(5–6), 786–790. <https://doi.org/10.17269/s41997-018-0113-y>
- Birolli, W. G., Santos, D. D. A., Alvarenga, N., Garcia, A. C. F. S., Romão, L. P. C., & Porto, A. L. M. (2017). Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp . CBMAI 1237. *Marine Pollution Bulletin*, May, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.023>
- Bisson, M., Diderich, R., Houeix, N., Hulot, C., Lacroix, G., Lefevre, J. P., Leveque, S., Magaud, H., Morin, A., & Pepin, G. (2011). Cadmium et ses dérivés. *Fiche de Données Toxicologiques et Environnementales Des Substances Chimiques* 82p.[En Ligne] URL: [Http://www.ineris.fr/Hml](http://www.ineris.fr/Hml), Consulté Le, 10(04), 2012.
- Blair, M. F., Kokabian, B., & Gude, V. G. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.11.005>
- Blaby-Haas, C. E., & Merchant, S. S. (2012). The ins and outs of algal metal transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1531–1552. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.010>
- Blinda, M. (2007). Pollution tellurique du littoral nord-ouest du Maroc entre Tanger et Tétouan: Caractérisation, Impact sur l'Environnement et Proposition de Solutions. In *Thèse de doctorat* (Issue Université Mohamed V Rabat (Maroc)).

- Bobaker, A. M., Alakili, I., Sarmani, S. B., Al-Ansari, N., & Yaseen, Z. M. (2019). Determination and assessment of the toxic heavy metal elements abstracted from the traditional plant cosmetics and medical remedies: Case study of Libya. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph16111957>
- Bocard, C. (2006). *Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures: enjeux environnementaux et traitement des pollutions* (I. Publication (ed.); TECHNIP). Editions TECHNIP.
- Boileau, M.-E. (2015). Évaluation du potentiel d'utilisation d'une eau usée industriel comme substrat de culture pour des microalgues d'eau douce dans une optique de production de biocarburants 3e génération. In *Sereal Untuk* (Vol. 51, Issue 1).
- Bolisetty, S., Peydayesh, M., & Mezzenga, R. (2019). Sustainable technologies for water purification from heavy metals: review and analysis. *Chemical Society Reviews*, 48(2), 463–487. <https://doi.org/10.1039/c8cs00493e>
- Bomboi, M. T., & Hernandez, A. (1991). Hydrocarbons in urban runoff: their contribution to the wastewaters. *Water Res*, 25(5), 557–565.
- Bomboi, M. T., Hernandez, A., Marino, F., & Hontoria, E. (1990). Distribution of hydrocarbon concentrations from urban runoff. *Science of the Total Environment*, 93, 465–480.
- Bonfá, M. R. L., Grossman, M. J., Mellado, E., & Durrant, L. R. (2011). Chemosphere Biodegradation of aromatic hydrocarbons by Haloarchaea and their use for the reduction of the chemical oxygen demand of hypersaline petroleum produced water. *Chemosphere*, 84, 1671–1676. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.005>
- Boonchai, R., Seo, G. T., Park, D. R., & Seong, C. Y. (2012). Microalgae Photobioreactor for Nitrogen and Phosphorus Removal from Wastewater of Sewage Treatment Plant. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(6), 407–410. <https://doi.org/10.7763/ijbbb.2012.v2.143>
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Progress in Industrial Microbiology*, 35(C), 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80123-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80123-4)

- Bougeois, L. (2015). *Les roches carbonées. ST3 - Polytech' Paris UPMC. Sorbonne universités.*
- Boust, C. (2005). Fiche Solvant Les hydrocarbures aromatiques ED 4226. In *Inrs département expertise et conseil technique.*
- Bouziani, M. (2000). l'eau de la pénurie aux maladies. édition IBN-KHALDOUN. *Alger. P93-96.*
- Brembu, T., Mühlroth, A., Alipanah, L., & Bones, A. M. (2017). The effects of phosphorus limitation on carbon metabolism in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0406>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Bridgman Howard, A. (2001). *Encyclopedia of Global Change: Pollution. Ed. Andrew S. Goudie.* Oxford University Press.
- Brown, R. M., Larson, D. A., & Bold, H. . (1963). Airborne Algae: Their abundance and heterogeneity. *Science*, 264(1949), 583–585.
- Buono, S., Luca Langelloti, A., Martello, A., Rinna, F., & Fogliano, V. (2014). Functional ingredients from microalgae. *Food and Function*, 5, 1669–1685. <https://doi.org/10.1039/c4ja00138a>
- Burlew, J. S. (1953). *Algal culture: From laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington.* [https://doi.org/10.1016/0016-0032\(54\)90075-7](https://doi.org/10.1016/0016-0032(54)90075-7)

## C

- Cabanelas, I. T. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Chinalia, F. A., Garrido-Pérez, C., Rogalla, F., Nascimento, I. A., & Perales, J. A. (2013). Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal. *Bioresource Technology*, 131, 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.152>
- Cabral-Pinto, M. M. S., Inácio, M., Neves, O., Almeida, A. A., Pinto, E., Oliveiros, B., & Ferreira da Silva, E. A. (2020). Human Health Risk Assessment Due to Agricultural Activities and Crop Consumption in the Surroundings of an Industrial Area. *Exposure and*

*Health*, 12(4), 629–640. <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00323-x>

Cabral Pinto, M. M. S., Ordens, C. M., Condesso de Melo, M. T., Inácio, M., Almeida, A., Pinto, E., & Ferreira da Silva, E. A. (2020). An Inter-disciplinary Approach to Evaluate Human Health Risks Due to Long-Term Exposure to Contaminated Groundwater Near a Chemical Complex. *Exposure and Health*, 12(2), 199–214. <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00305-z>

Cadoret, J. P., & Bernard, O. (2008). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues: Promesses et défis. *Journal de La Societe de Biologie*, 202(3), 201–211. <https://doi.org/10.1051/jbio:2008022>

Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., & Budzinski, H. (2007). Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere*, 70(2), 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.095>

Campbell, P. G. C., & Couillard, Y. (2004). Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. *Écotoxicologie Moléculaire: Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement*, 9.

Canter-Lund, H., & Lund, J. W. G. (1995). Freshwater algae: their microscopic world explored. In *The Heythrop Journal* (Biopress, Vol. 32, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/j.1468-2265.1991.tb01136.x>

Caporgno, M. P., Clavero, E., Torras, C., Salvadó, J., Lepine, O., Pruvost, J., Legrand, J., Giralt, J., & Bengoa, C. (2016). Energy and Nutrients Recovery from Lipid-Extracted Nannochloropsis via Anaerobic Digestion and Hydrothermal Liquefaction. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(6), 3133–3139. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00151>

Carlson, O. N. (1973). Reduction of Oxides By Metals. *Prog in Extr Metall*, 1(4), 187–206.

Cauchi, H., Nakache, S., Zagury, B., Carre, C., Denis, D., Larbaigt, D., & Martigne, S. (1996). Dossier: la réutilisation des eaux usées après épuration. Techniques. *Sciences et Méthodes*, 2, 81–118.

- Cea-Barcia, G., Buitrón, G., Moreno, G., & Kumar, G. (2014). A cost-effective strategy for the bio-prospecting of mixed microalgae with high carbohydrate content: Diversity fluctuations in different growth media. *Bioresource Technology*, *163*, 370–373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.079>
- Cerniglia, C. E., & Sutherland, J. B. (2010). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4>
- Chaib, N., Dzizi, S., Kaddeche, H., & Noune, F. (2021). Performance of a Fixed-Bed Bioreactor Using Diatom Biofilms for Wastewater Bioremediation. *Clean - Soil, Air, Water*, *49*(5). <https://doi.org/10.1002/clen.202000282>
- Chan, S. M. N., Luan, T., Wong, M. H., & Tam, N. F. Y. (2006). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *25*(7), 1772–1779. <https://doi.org/10.1897/05-354R.1>
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., & Sharma, A. (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*, *63*(2), 417–431. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0543-3>
- Chandrashekharaiyah, P.S., Sanyal, D., Dasgupta, S. and Banik, A. Cadmium biosorption and biomass production by two freshwater microalgae *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa*: an integrated approach, *Chemosphere*, *269* (2021) 128755, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128755.
- Cheah, W. Y., Show, P. L., Chang, J. S., Ling, T. C., & Juan, J. C. (2015). Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. *Bioresource Technology*, *184*, 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.026>
- Chen, B., Huang, J., Yuan, K., Lin, L., Wang, X., Yang, L., & Luan, T. (2016). Direct evidences on bacterial growth pattern regulating pyrene degradation pathway and genotypic dioxygenase expression. *Marine Pollution Bulletin*, *105*(1), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.054>
- Chen, F. (1996). High Cell Density Culture of Microalgae in Heterotrophic Growth. *TibTech*, *14*, 421–426. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.102%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.20>

- 16.03.018%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.015%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.03.002%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055%0Ahttp://
- Chen, J., Wang, Y., Benemann, J. R., Zhang, X., Hu, H., & Qin, S. (2016). Microalgal industry in China: challenges and prospects. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 715–725. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0720-4>
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T. C., Ng, K. Y. S., & Salley, S. O. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1649–1655. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.062>
- Chiaramonti, D., Prussi, M., Casini, D., Tredici, M. R., Rodolfi, L., Bassi, N., Zittelli, G. C., & Bondioli, P. (2013). Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Re-thinking a traditional system is possible. *Applied Energy*, 102, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.040>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Cho, S., Lee, N., Park, S., Yu, J., Luong, T. T., Oh, Y. K., & Lee, T. (2013). Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. *Bioresource Technology*, 131, 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.176>
- Choi, H. J., & Lee, S. M. (2012). Effects of microalgae on the removal of nutrients from wastewater: Various concentrations of *Chlorella vulgaris*. *Environmental Engineering Research*, 17(S1), 3–8. <https://doi.org/10.4491/eer.2012.17.S1.S3>
- Chojnacka, K. (2010). Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications. *Environment International*, 36(3), 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.12.001>
- Chowdhury, S., Mazumder, M. A. J., Al-Attas, O., & Husain, T. (2016). Heavy metals in drinking water: Occurrences, implications, and future needs in developing countries. *Science of the Total Environment*, 569–570, 476–488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.166>
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater

- treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686–702.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>
- Christine H., F., & Graham, N. (2000). Tansley Review No . 112 Oxygen processing in photosynthesis : regulation and signalling. *New Phytologist*, 146(112), 359–388.
- Clément-Larosière, B., Filipa, L., Ana, G., Behnam, T., Marc, B., Michel, M., & Dominique, P. 1Laboratoire. (2014). Carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris* at different CO<sub>2</sub> concentrations and light intensities,. *Engineering in Life Sciences*, 1–32.  
<https://doi.org/10.1002/elsc.201200212>.This
- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 159–182.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>
- Collotta, M., Champagne, P., Mabee, W., & Tomasoni, G. (2018). Wastewater and waste CO<sub>2</sub> for sustainable biofuels from microalgae. *Algal Research*, 29(November 2017), 12–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.013>
- Colombo, J. C., Pelletier, E., Brochu, C., Khalli, M., & Catogglo, J. A. (1989). Determination of Hydrocarbon Sources Using n-Alkane and Polyaromatic Hydrocarbon Distribution Indexes. Case Study: Rio de La Plata Estuary, Argentina. *Environmental Science and Technology*, 23(7), 888–894. <https://doi.org/10.1021/es00065a019>
- Colombano S., A.Saada, E.Victoire, V.Guerin, C.Zornig, L.Amalric, M.Blessing, D.Widory, D.Hube, & et C.Blanc. (2014). Nature des produits pétroliers et origine du vieillissement : tentative de l'identification de la source via la prise en compte des impacts et l'analyse de l'âge approximatif des déversements. In *Brgm/Rp-64174-Fr*.  
<https://infoterre.brgm.fr/rapports/RP-64174-FR.pdf>
- Colvin, K. A., Lewis, C., & Galloway, T. S. (2020). Current issues confounding the rapid toxicological assessment of oil spills. *Chemosphere*, 245, 125585.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125585>
- Compaoré, E., & Nanéma, L. S. (2010). Compostage et qualité du compost de déchets urbains solides de la ville de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Tropicultura*, 28(4), 232–237.
- Council, N. R. (2003). Oil in the sea III: inputs, fates, and effects. *National Academies Press*,

Washington, DC.

Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Gilad, E., Hake, P., Salzman, A. L., & Szabó, C. (1998). Protective effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP- ribose) synthase in a carrageenan-induced model of local inflammation. *European Journal of Pharmacology*, *342*(1), 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01417-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01417-9)

## **D**

D'Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K., & Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, 133–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>

Daby, D. (2006). Coastal Pollution and Potential Biomonitors of Metals in Mauritius. *Water, Air, and Soil Pollution*, *174*(1), 63–91. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-9035-4>

Dachs, J., Bayona, J. M., Raoux, C., & Albaigés, J. (1997). Spatial, vertical distribution and budget of polycyclic aromatic hydrocarbons in the western Mediterranean seawater. *Environmental Science and Technology*, *31*(3), 682–688. <https://doi.org/10.1021/es960233j>

Daling, P. S., Leirvik, F., Almås, I. K., Brandvik, P. J., Hansen, B. H., Lewis, A., & Reed, M. (2014). Surface weathering and dispersibility of MC252 crude oil. *Marine Pollution Bulletin*, *87*(1), 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.005>

Daneshvar, E., Wicker, R. J., Show, P. L., & Bhatnagar, A. (2022). Biologically-mediated carbon capture and utilization by microalgae towards sustainable CO<sub>2</sub> biofixation and biomass valorization – A review. *Chemical Engineering Journal*, *427*, 130884. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130884>

Danouche, M., El Ghachtouli, N., & El Arroussi, H. (2021). Phycoremediation mechanisms of heavy metals using living green microalgae: physicochemical and molecular approaches for enhancing selectivity and removal capacity. In *Heliyon* (Vol. 7, Issue 7). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07609>

Danouche, M., El Ghachtouli, N., El Baouchi, A., & El Arroussi, H. (2020). Heavy metals phycoremediation using tolerant green microalgae: Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems for the management of oxidative stress. *Journal of Environmental*

- Chemical Engineering*, 8(5), 104460. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104460>
- Das, P., Lei, W., Aziz, S. S., & Obbard, J. P. (2011). Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource Technology*, 102(4), 3883–3887. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.102>
- De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611–1627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- De Carvalho, J. C., Magalhães, A. I., de Melo Pereira, G. V., Medeiros, A. B. P., Sydney, E. B., Rodrigues, C., Aulestia, D. T. M., de Souza Vandenberghe, L. P., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2020). Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels, food, and feed. *Bioresource Technology*, 300, 122719. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122719>
- De Godos, I., Mendoza, J. L., Ación, F. G., Molina, E., Banks, C. J., Heaven, S., & Rogalla, F. (2014). Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. *Bioresource Technology*, 153, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.087>
- De Villers, J., Squilbin, M., & Yourassowsky, C. (2005). *Les données de l'IBGE: "L'eau à Bruxelles."* 16.
- Dejoye, C. (2013). *Eco-Extraction et Analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant*. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- Depledge, M. H., & Rainbow, P. S. (1990). Models of Regulation and Accumulation of Trace Metals in Marine Invertebrates mini-review models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Biochem. Phy Siol*, 97(1), 1–7.
- Deronzier, G., & Choubert, J.-M. (2004). Traitement du phosphore dans les petites stations d'épuration à boues activées. Comparaisons techniques et économiques des voies de traitement biologique et physico-chimique. *Document Technique FNDAE*, 29, 49. [http://www.fndae.fr/documentation/numero\\_29.html](http://www.fndae.fr/documentation/numero_29.html).
- Derwich, E., Beziane, Z., Benaabidate, L., & Belghyti, D. (2008). Evaluation de la qualité des eaux de surface des oueds Fès et Sebou utilisées en agriculture maraichère au Maroc.

*Larhyss Journal.*, 7, 59–77.

- Dhar, K., Subashchandrabose, S. K., Venkateswarlu, K., Krishnan, K., & Megharaj, M. (2020). Anaerobic microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: a comprehensive review. *Rev. Environ. Contam.*, 238(December), 84. <https://doi.org/10.1007/398>
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U. B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B. P., Rai, J. P., Sharma, P. K., Lade, H., & Paul, D. (2015). Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability (Switzerland)*, 7(2), 2189–2212. <https://doi.org/10.3390/su7022189>
- Dixon, C., & Wilken, L. R. (2018). Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0199-3>
- Doornaert, B., & Pichard, A. (2003). Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) – Évaluation de la dose-réponse pour des effets cancérigènes : Approche substance par substance (facteurs d'équivalence toxique - FET) et approche par mélanges – Évaluation de la dose-réponse pour des effets. In *Ineris*. [http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Hydrocarbures\\_aromatiques\\_polycycliques\\_HAPs\\_.pdf](http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Hydrocarbures_aromatiques_polycycliques_HAPs_.pdf)
- Dumas, A., Laliberté, G., Lessard, P., & De La Noüe, J. (1998). Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacultural Engineering*, 17(1), 57–68. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(97\)01013-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(97)01013-3)
- Dwivedi, S. (2012). Bioremediation of Heavy Metal by Algae. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 3(3), 195–199. [www.sospublication.co.in](http://www.sospublication.co.in)

## **E**

- Ehrhardt, M., & Weber, R. R. (1991). Formation of low molecular weight carbonyl compounds by sensitized photochemical decomposition of aliphatic hydrocarbons in seawater. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 339(10), 772–776.
- El Arroussi, H., Benhima, R., El Mernissi, N., Bouhfid, R., Tilsaghani, C., Bennis, I., & Wahby, I. (2017). Screening of marine microalgae strains from Moroccan coasts for biodiesel production. *Renewable Energy*, 113, 1515–1522. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.035>

- El Bestawy, E. (2019). Efficiency of immobilized cyanobacteria in heavy metals removal from industrial effluents. *Desalination and Water Treatment*, 159, 66–78. <https://doi.org/10.5004/dwt.2019.23808>
- El-Naggar, N. E. A., Hussein, M. H., Shaaban-Dessuuki, S. A., & Dalal, S. R. (2020). Production, extraction and characterization of *Chlorella vulgaris* soluble polysaccharides and their applications in AgNPs biosynthesis and biostimulation of plant growth. *Scientific Reports*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59945-w>
- El-Sheekh, M. M., El-Naggar, A. H., Osman, M. E. H., & El-Mazaly, E. (2003). Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15(3), 159–166. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202003000300005>
- El-Sheekh, M. M., Hamouda, R. A., & Nizam, A. A. (2013). Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 82, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.12.015>
- Ewaid, S. H., & Abed, S. A. (2017). Water quality index for Al-Gharraf River, southern Iraq. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.03.001>
- Ewaid, S. H., Abed, S. A., & Ansari, N. Al. (2019). Crop Water Requirements and Irrigation Schedules for Some Major Crops in Southern Iraq. *Water*, 11(4), 1–12.
- Ewing, M., & Msangi, S. (2009). Biofuels production in developing countries: assessing tradeoffs in welfare and food security. *Environmental Science and Policy*, 12(4), 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2008.10.002>

## **F**

- Fakhru'l-Razi, A., Pendashteh, A., Abdullah, L. C., Biak, D. R. A., Madaeni, S. S., & Abidin, Z. Z. (2009). Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 170(2–3), 530–551. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.044>
- Federation, T. I. T. O. . (2022). *Fate of Oil Spills - ITOPF*. <https://www.itopf.org/knowledge-resources/documents-guides/fate-of-oil-spills/>
- Fernández-Luqueño, F., López-Valdez, F., Gamero-Melo, P., Luna-Suárez, S., Aguilera-

- González, E., Martínez, A., García-Guillermo, M., Hernández-Martínez, G., Herrera-Mendoza, R., Álvarez-Garza, M., & Pérez-Velázquez, I. (2013). Heavy metal pollution in drinking water - a global risk for human health: A review. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 7(7), 567–584. <https://doi.org/10.5897/AJEST12.197>
- Ferreira, L. S., Rodrigues, M. S., Converti, A., Sato, S., & Carvalho, J. C. M. (2010). A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation in tubular photobioreactor. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1271–1277. <https://doi.org/10.1002/btpr.457>
- Festy, B., Hartemann, P., Ledrans, M., Levallois, P., Payment, P., & Tricard, D. (2003). Qualité de l'eau. *Environnement et Santé Publique*, 332–368.
- Filali, R. (2012). Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la valorisation biologique de CO<sub>2</sub>. *Http://Www.Theses.Fr*, 1–227. <http://www.theses.fr/2012SUPL0007%0Ahttps://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00765421>
- Findlay, D. L., Kasian, S. E., Hendzel, L. L., Regehr, G. W., Schindler, E. U., & Shearer, J. A. (1994). Biomanipulation of Lake 221 in the Experimental Lakes Area (ELA): Effects on phytoplankton and nutrients. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(12), 2794–2807. <https://doi.org/10.1139/f94-279>
- Fingas, M. (1995). Water-in-oil emulsion formation: A review of physics and mathematical modelling. *Spill Science and Technology Bulletin*, 2(1), 55–59. [https://doi.org/10.1016/1353-2561\(95\)94483-Z](https://doi.org/10.1016/1353-2561(95)94483-Z)
- Florescu, D., Ionete, R. E., Sandru, C., Iordache, A., & Culea, M. (2011). The influence of pollution monitoring parameters in characterizing the surface water quality from Romania southern area. *Romanian Reports of Physics*, 56(7–8), 1001–1010.
- Francoeur, S. N., Rier, S. T., & Whorley, S. B. (2013). *Methods for Sampling and Analyzing Wetland Algae*. 1–58. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6931-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6931-1_1)
- Frangi, J.-P., & Richard, D. (1997). Heavy metal soil pollution cartography in northern France. *Science of the Total Environment*, 205(1), 71–79.
- Fraser, M. P., Cass, G. R., & Simoneit, B. R. T. (1999). Particulate organic compounds emitted

from motor vehicle exhaust and in the urban atmosphere. *Atmospheric Environment*, 33(17), 2715–2724.

- Fu, G., Kan, A. T., & Tomson, M. (1994). Adsorption and desorption hysteresis of PAHs in surface sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(10), 1559. [https://doi.org/10.1897/1552-8618\(1994\)13\[1559:aadhop\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1897/1552-8618(1994)13[1559:aadhop]2.0.co;2)
- Fu, Z., & Xi, S. (2020). The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30(3), 167–176. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>

## G

- Gaamoune, S. (2010). *Le rôle des biofilms d'algues dans les traitements biologiques des eaux*.
- Gadd, G. M. (1990). Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46(8), 834–840. <https://doi.org/10.1007/BF01935534>
- Galaf, F., & Ghannam, S. (2003). Contribution à l'élaboration d'un manuel et d'un site web sur la pollution du milieu marin. *Mémoire d'ingénieur d'état. Université HASSAN II. RABAT. ROYAUME Du MAROC*, 6.
- García-García, J. D., Olin-Sandoval, V., Saavedra, E., Girard, L., Hernández, G., & Moreno-Sánchez, R. (2012). Sulfate uptake in photosynthetic *Euglena gracilis*. Mechanisms of regulation and contribution to cysteine homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1820(10), 1567–1575. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.05.002>
- García-García, J. D., Sánchez-Thomas, R., & Moreno-Sánchez, R. (2016). Bio-recovery of non-essential heavy metals by intra- and extracellular mechanisms in free-living microorganisms. *Biotechnology Advances*, 34(5), 859–873. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.003>
- García-Sánchez, A., Contreras, F., Adams, M., & Santos, F. (2008). Mercury contamination of surface water and fish in a gold mining region (Cuyuní river basin, Venezuela). *International Journal of Environment and Pollution*, 33(2–3), 260–274. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2008.019398>
- García de Llasera, M. P., Olmos-Espejel, J. de J., Díaz-Flores, G., & Montañón-Montiel, A.

- (2016). Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3365–3375. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5576-2>
- Gaujous, D. (1995). *La pollution des milieux aquatiques: aide-mémoire* (Paris-Fra). Lavoisier.
- Gaur, J. P., & Rai, L. C. (2001). Heavy metal tolerance in algae. In *Algal adaptation to environmental stresses* (pp. 363–388). Springer.
- Gautam, R. K., Sharma, S. K., Mahiya, S., & Chattopadhyaya, M. C. (2014). CHAPTER 1. Contamination of Heavy Metals in Aquatic Media: Transport, Toxicity and Technologies for Remediation. *Heavy Metals In Water*, 1–24. <https://doi.org/10.1039/9781782620174-00001>
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E. L., & Zenk, M. H. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology*, 150(2), 197–202. <https://doi.org/10.1007/BF00425162>
- Genies, C. (2017). Génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques en melanges , une classe majeure de polluants atmosphériques. Université de Grenoble. Français.
- Gerardo, B., Pinto, M. C., Nogueira, J., Pinto, P., Almeida, A., Pinto, E., Marinho-Reis, P., Diniz, L., Moreira, P. I., Simões, M. R., & Freitas, S. (2020). Associations between trace elements and cognitive decline: An exploratory 5-year follow-up study of an elderly cohort. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176051>
- Ghodrati, M., Kosari-Nasab, M., Zarrini, G., & Movafeghi, A. (2021). Crude oil contamination enhances the lipoxygenase gene expression in the green microalga *scenedesmus dimorphus*. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(4), 11431–11439. <https://doi.org/10.33263/BRIAC114.1143111439>
- Ghorab, M. A. (2018). Environmental Pollution by Heavy Metals in the Aquatic Ecosystems of Egypt. *Open Access Journal of Toxicology*, 3(1). <https://doi.org/10.19080/oajt.2018.03.555603>
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial

- degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
- Gómez-jacinto, V., García-barrera, T., & Gómez-ariza, J. L. (2015). *Chemico-Biological Interactions Elucidation of the defence mechanism in microalgae Chlorella sorokiniana under mercury exposure . Identification of Hg – phytochelatins. June.* <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.06.013>
- González-López, C. V., Acién Fernández, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., Sánchez Fernández, J. F., & Molina Grima, E. (2012). Development of a process for efficient use of CO<sub>2</sub> from flue gases in the production of photosynthetic microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7), 1637–1650. <https://doi.org/10.1002/bit.24446>
- Goodenough, U., Heiss, A. A., Roth, R., Rusch, J., & Lee, J. H. (2019). Acidocalcisomes: Ultrastructure, Biogenesis, and Distribution in Microbial Eukaryotes. *Protist*, 170(3), 287–313. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2019.05.001>
- Gouin, C. A., Aka, N., Adiaffi, B., Bamba, B. S., & Soro, N. (2016). Pollution saisonnière des sédiments de lagune par des métaux lourds (Cu, Pb et Zn) en zone tropicale humide : cas de la lagune Mondoukou (Sud-Est de la Côte d’Ivoire). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(2), 835. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v10i2.31>
- Gourlay, C., Tusseau-Vuillemin, M. H., Garric, J., & Mouchel, J. M. (2003). Effect of dissolved organic matter of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(6), 1288–1294. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2003\)022<1288:EODOMO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2003)022<1288:EODOMO>2.0.CO;2)
- Graham, L. E., & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*—Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.
- Greenwell, H. C., Laurens, L. M. L., Shields, R. J., Lovitt, R. W., & Flynn, K. J. (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(46), 703–726. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0322>
- Guergazi, S., & Achour, S. (2005). Caractéristiques Physico-Chimiques Des Eaux D’Alimentation De La Ville De Biskra. Pratique De La Chloration. *Laboratoire de Recherche En Hydraulique Souterraine et de Surface. Larhyss Journal*, 04, 119–127.

Guihéneuf, F., & Stengel, D. B. (2015). Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. *Algal Research*, *10*, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.025>

Guillard, R.R.L. (1973). 'Division Rates', J.R. Stein, Ed., Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements, Cambridge University Press, London, 1973, pp. 289–311.

Guillard, R. L. R., & Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-Green Algae With Chlorophyllide C. *J. Phycol*, *8*, 10–14. <https://doi.org/10.1002/0471743984.vse7610>

Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire, pp. 195-198 -199.

Gupta, S., & Pathak, B. (2020). Mycoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons Shalini. In *Abatement of Environmental Pollutants*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818095-2.00006-0>

GWP. (2000). La gestion intégrée des ressources en eau Partenariat mondial pour l' eau. In *Technical Paper* (Issue 4).

## **H**

Hahn, H. H., & Pfeifer, R. (1994). The contribution of parked vehicle emissions to the pollution of urban run-off. *Science of the Total Environment*, *146*, 525–533.

Haleyur, N., Shahsavari, E., Jain, S. S., Koshlaf, E., Ravindran, V. B., Morrison, P. D., Osborn, A. M., & Ball, A. S. (2019). Influence of bioaugmentation and biostimulation on PAH degradation in aged contaminated soils: Response and dynamics of the bacterial community. *Journal of Environmental Management*, *238*(October 2018), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.115>

Hamouda, R. A. E. F., Sorour, N. M., & Yeheia, D. S. (2016). Biodegradation of crude oil by *Anabaena oryzae*, *Chlorella kessleri* and its consortium under mixotrophic conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *112*, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.001>

- Hanikenne, M., Krämer, U., Demoulin, V., & Baurain, D. (2005). A comparative inventory of metal transporters in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the red alga *Cyanidioschizon merolae*. *Plant Physiology*, *137*(2), 428–446. <https://doi.org/10.1104/pp.104.054189>
- Hanikenne, M., Merchant, S. S., & Hamel, P. (2009). Transition Metal Nutrition: A Balance Between Deficiency and Toxicity. *The Chlamydomonas Sourcebook 3-Vol Set*, *2*, 333–399. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370873-1.00018-6>
- Hankamer, B., Lehr, F., Rupprecht, J., Mussgnug, J. H., Posten, C., & Kruse, O. (2007). Photosynthetic biomass and H<sub>2</sub> production by green algae: From bioengineering to bioreactor scale-up. *Physiologia Plantarum*, *131*(1), 10–21. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00924.x>
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., & Shutsubo, K. (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *1*(1), 63–70.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Publishing Group*, *9*(3), 177–192. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2519>
- Hasyim, R., Imai, T., Reungsang, A., & O-Thong, S. (2011). Extreme-thermophilic biohydrogen production by an anaerobic heat treated digested sewage sludge culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, *36*(14), 8727–8734. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.079>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling and Behavior*, *7*(11), 37–41. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Hayward, H. R., & Stadtman, T. C. (1959). Anaerobic degradation of choline. I. Fermentation of choline by an anaerobic, cytochrome-producing bacterium, *Vibrio cholonicus* n. sp. *Journal of Bacteriology*, *78*, 557–561. <https://doi.org/10.1128/jb.78.4.557-561.1959>
- Heeg, J. S., & Wolf, M. (2015). ITS2 and 18S rDNA sequence-structure phylogeny of *Chlorella* and allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae). *Plant Gene*, *4*, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.08.001>

- Hemon-delsaux, J. (2013). *Évaluation des niveaux d ' exposition professionnelle aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et des pathologies cancéreuses associées To cite this version : HAL Id : dumas-00828187*. Université Joseph Fourier.
- Hirata, K., Tsuji, N., & Miyamoto, K. (2005). Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(6), 593–599. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.593>
- Hirata, K., Tsujimoto, Y., Namba, T., Ohta, T., Hirayanagi, N., Miyasaka, H., Zenk, M. H., & Miyamoto, K. (2001). Strong induction of phytochelatin synthesis by zinc in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(1), 24–29.
- Hockaday, J., Harvey, A., & Velasquez-Orta, S. (2022). A comparative analysis of the adsorption kinetics of Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. *Algal Research*, 64, 102710.
- Hoek, C., Mann, D., Jahns, H. M., & Jahns, M. (1995). *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge university press.
- Hoffmann, J. P. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology*, 34(5), 757–763.
- Hou, J., Yang, Y., Wang, P., Wang, C., Miao, L., Wang, X., Lv, B., You, G., & Liu, Z. (2017). Effects of CeO<sub>2</sub>, CuO, and ZnO nanoparticles on physiological features of *Microcystis aeruginosa* and the production and composition of extracellular polymeric substances. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 226–235. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7387-5>
- Hreiz, R., Sialve, B., Morchain, J. Ô., Escudié, R., Steyer, J. P., & Guiraud, P. (2014). Experimental and numerical investigation of hydrodynamics in raceway reactors used for algaculture. *Chemical Engineering Journal*, 250, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.027>
- Huang, R. ying, Tian, W. jun, Liu, Q., Yu, H. bo, Jin, X., Zhao, Y. guo, Zhou, Y. hang, & 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(1), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.044>

Huntley, M. E., & Redalje, D. G. (2007). CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal. In *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* (Vol. 12, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s11027-006-7304-1>

## I

IARC. (2010). *Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, (Internatio, Vol. 92). <https://doi.org/10.1136/jcp.48.7.691-a>

## J

Javanbakht, V., Alavi, S. A., & Zilouei, H. (2014). Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. *Water Science and Technology*, 69(9), 1775–1787. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.718>

Joffin, J. N. & Leyral, G. (2009). *Technical microbiology, Tome 1: Dictionary of techniques*, 4th Edition, Spain, 363p.

Jonker, M. T. O., & Koelmans, A. A. (2002). Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls to soot and soot-like materials in the aqueous environment: Mechanistic considerations. *Environmental Science and Technology*, 36(17), 3725–3734. <https://doi.org/10.1021/es020019x>

## K

Kaiser, J. (2001). *Bioindicators and biomarkers of environmental pollution and risk assessment*. Science Publishers, Inc.

Kan, J., Peng, T., Huang, T., Xiong, G., & Hu, Z. (2020). *NarL , a Novel Repressor for CYP108j1 Expression during PAHs Degradation in Rhodococcus sp . P14*.

Kanan, R. (2012). *Développements méthodologiques pour l ' extraction et l ' analyse des polluants organiques d ' intérêt pour l ' environnement marin: Application aux hydrocarbures aromatiques polycycliques*. 1–283.

Ke, L., Luo, L., Wang, P., Luan, T., & Tam, N. F. Y. (2010). Effects of metals on biosorption

- and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology*, 101(18), 6950–6961. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.011>
- Keffer, J. E., & Kleinheinz, G. T. (2002). Use of *Chlorella vulgaris* for CO<sub>2</sub> mitigation in a photobioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 275–280. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000313>
- Kesaano, M., & Sims, R. C. (2014). Algal biofilm based technology for wastewater treatment. *Algal Research*, 5(1), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.02.003>
- Khemili, S., Salima, T., Gana, K., & Akmoussi, S. (2015). Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity. *Extremophiles*. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0783-9>
- Kim, G. Y., Roh, K., & Han, J. I. (2019). The use of bicarbonate for microalgae cultivation and its carbon footprint analysis. *Green Chemistry*, 21(18), 5053–5062. <https://doi.org/10.1039/c9gc01107b>
- Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J. C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. In *Environment International* (Vol. 60, pp. 71–80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
- Kiran, B., Kumar, R., & Deshmukh, D. (2014). Perspectives of microalgal biofuels as a renewable source of energy. *Energy Conversion and Management*, 88, 1228–1244. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.06.022>
- Kobayashi, I., Fujiwara, S., Saegusa, H., Inouhe, M., Matsumoto, H., & Tsuzuki, M. (2006). Relief of arsenate toxicity by Cd-stimulated phytochelatin synthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Marine Biotechnology*, 8(1), 94–101. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-5092-3>
- Kraaij, R., Ciarelli, S., Tolls, J., Kater, B. J., & Belfroid, A. (2001). Bioavailability of lab-contaminated and native polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod *Corophium volutator* relates to chemical desorption. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(8), 1716–1724. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200814>

- Kucuksezgin, F., Kontas, A., Altay, O., Uluturhan, E., & Darilmaz, E. (2006). Assessment of marine pollution in Izmir Bay: Nutrient, heavy metal and total hydrocarbon concentrations. *Environment International*, 32(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.04.007>
- Kumar, K., Mishra, S. K., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2015). Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 875–885. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.033>
- Kumar, K., Sirasale, A., & Das, D. (2013). Use of image analysis tool for the development of light distribution pattern inside the photobioreactor for the algal cultivation. *Bioresource Technology*, 143, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.117>
- Kunjapur, A. M., & Eldridge, R. B. (2010). Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(8), 3516–3526. <https://doi.org/10.1021/ie901459u>
- Kuo, C. M., Jian, J. F., Lin, T. H., Chang, Y. Bin, Wan, X. H., Lai, J. T., Chang, J. S., & Lin, C. S. (2016). Simultaneous microalgal biomass production and CO<sub>2</sub> fixation by cultivating *Chlorella* sp. GD with aquaculture wastewater and boiler flue gas. *Bioresource Technology*, 221, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.014>
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y. B., Naidu, R., & Megharaj, M. (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 168, 944–968. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.115>
- Kuttiyathil, M. S., Mohamed, M. M., & Al-Zuhair, S. (2021). Using microalgae for remediation of crude petroleum oil–water emulsions. *Biotechnology Progress*, 37(2), 1–11. <https://doi.org/10.1002/btpr.3098>

## **L**

- Lam, M. K., Lee, K. T., & Mohamed, A. R. (2012). Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 10, 456–469. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2012.07.010>
- Lee, R. F. (2003). Photo-oxidation and Photo-toxicity of Crude and Refined Oils. *Spill Science and Technology Bulletin*, 8(2), 157–162. [https://doi.org/10.1016/S1353-2561\(03\)00015-X](https://doi.org/10.1016/S1353-2561(03)00015-X)

- Leong, Y. K., & Chang, J. S. (2020). Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. *Bioresource Technology*, 303, 122886. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122886>
- Leszczyszyn, O. I., White, C. R. J., & Blindauer, C. A. (2010). The isolated Cys2His2 site in EC metallothionein mediates metal-specific protein folding. *Molecular BioSystems*, 6(9), 1592–1603. <https://doi.org/10.1039/c002348e>
- Leventeli, Y., Yalcin, F., & Kilic, M. (2019). An investigation about heavy metal pollution of duden and goksu streams ( ANTALYA , TURKEY ) correlations and provided better assessment of pollution levels with HPI .” *Duden Stream f. 17*(January), 2423–2436. <https://doi.org/10.15666/aeer/1702>
- Li, C., Zheng, C., Fu, H., Zhai, S., Hu, F., Naveed, S., Zhang, C., & Ge, Y. (2021). Contrasting detoxification mechanisms of *Chlamydomonas reinhardtii* under Cd and Pb stress. *Chemosphere*, 274, 129771. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129771>
- Li, H., Lai, R., Jin, Y., Fang, X., Cui, K., Sun, S., Gong, Y., Li, H., Zhang, Z., Zhang, G., & Zhang, Z. (2020). Directional culture of petroleum hydrocarbon degrading bacteria for enhancing crude oil recovery. *Journal of Hazardous Materials*, 390(January), 122160. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122160>
- Li, N., Wei, D., Wang, S., Hu, L., Xu, W., Du, B., & Wei, Q. (2017). Comparative study of the role of extracellular polymeric substances in biosorption of Ni(II) onto aerobic/anaerobic granular sludge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 490(Ii), 754–761. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.12.006>
- Li, S., Yu, Y., Gao, X., Yin, Z., Bao, J., Li, Z., Chu, R., Hu, D., Zhang, J., & Zhu, L. (2021). Evaluation of growth and biochemical responses of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* due to exposure and uptake of sulfonamides and copper. *Bioresour Technol*, 342, 126064.
- Li, S., Li, S., Wen, N., Wei, D., & Zhang, Y. (2021). Highly effective removal of lead and cadmium ions from wastewater by bifunctional magnetic mesoporous silica. *Separation and Purification Technology*, 265. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118341>
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., & Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24(4), 815–820. <https://doi.org/10.1021/bp.070371k>

- Lin, Z., Li, J., Luan, Y., & Dai, W. (2020). Application of algae for heavy metal adsorption: A 20-year meta-analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110089>
- Liu, B., Liu, J., Ju, M., Li, X., & Yu, Q. (2016). Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.025>
- Lodi, A., Binaghi, L., Solisio, C., Converti, A., & Del Borghi, M. (2003). Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(11), 656–660. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0094-5>
- Lors, C., Damidot, D., Ponge, J., & Périé, F. (2012). Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. *Environmental Pollution*, 165, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.004>
- Lu, X. Y., Zhang, T., & Fang, H. H. P. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1357–1371. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3072-7>
- Luan, T. G., Jin, J., Chan, S. M. N., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2006). Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry*, 41(7), 1560–1565. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.020>
- Lucchetti, A. (2014). *Modélisation et conception d ' un système de culture de microalgues*. École nationale supérieure des mines de Paris Spécialité “ Énergétique et procédés .”
- Lusinier, N., Seyssiecq, I., Sambusiti, C., Jacob, M., Lesage, N., & Roche, N. (2019). Biological treatments of oilfield produced water: A comprehensive review. *SPE Journal*, 24(5), 2135–2147. <https://doi.org/10.2118/195677-PA>

## M

- Ma, J., & Zhai, G. (2012). Microbial Bioremediation in Omics era: Opportunities and Challenges. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 03(09). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000e120>

- Ma, X., Chen, Y., Liu, F., Zhang, S., & Wei, Q. (2021). Enhanced tolerance and resistance characteristics of *Scenedesmus obliquus* FACHB-12 with K3 carrier in cadmium polluted water. *Algal Research*, 55, 102267. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102267>
- Macfie, S. M., & Welbourn, P. M. (2000). The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(4), 413–419. <https://doi.org/10.1007/s002440010122>
- Mahan, C. A., Majidi, V., & Holcombe, J. A. (1989). Evaluation of the metal uptake of several algae strains in a multicomponent matrix utilizing inductively coupled plasma emission spectrometry. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 61, 624–627.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2015). Algal culture integration in conventional wastewater treatment plants: Anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. *Bioresource Technology*, 184, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.145>
- Mallick, S., Chakraborty, J., & Dutta, T. K. (2011). Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 64–90. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.512268>
- Mantzorou, A., Navakoudis, E., Paschalidis, K., & Ververidis, F. (2018). Microalgae: a potential tool for remediating aquatic environments from toxic metals. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(8), 1815–1830. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1783-y>
- Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 631–645. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
- Mason, R. P. (2013). Trace metals and organisms: Essential and toxic metals, organometallics, microbial processes, and metal bioaccumulation. *Trace Metals in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 370–421.
- Mata, T. M., Melo, A. C., Simões, M., & Caetano, N. S. (2012). Parametric study of a brewery

- effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 107, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.109>
- Mayet, J. (1994). La pratique de l'eau, Traitements aux points d'utilisation, le Moniteur. P382, Paris.
- Mehetre, G. T., Dastager, S. G., & Dharme, M. S. (2019). Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. *Science of the Total Environment*, 679, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.376>
- Mehta, S. K., & Gaur, J. P. (2001). Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 18(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(00\)00174-9](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(00)00174-9)
- Mendoza-Cózatl, D. G., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Cd 2+ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1706(1–2), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.010>
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 653–671. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.004>
- Mendoza, J. L., Granados, M. R., de Godos, I., Ación, F. G., Molina, E., Heaven, S., & Banks, C. J. (2013). Oxygen transfer and evolution in microalgal culture in open raceways. *Bioresource Technology*, 137, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.127>
- Metahri, M. (2012). Élimination simultanée de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitées, par des procédés mixtes. In *Cas de la STEP Est de la ville de Tizi-Ouzou. Thèse de Doctorat. Université de tizi-Ouzou (Algérie)*.
- Metcalf & Eddy, I. (2003). Wastewater engineering : treatment and reuse. 4e éd., révisé par G. Tchobanoglous, F.L. Burton et H.D. Stensel, McGraw-Hill Inc., New-York,. In *Handbook of Environmental Engineering*. <https://doi.org/10.1002/9781119304418.ch12>
- Mille, G., Asia, L., Guiliano, M., Malleret, L., & Doumenq, P. (2007). Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). *Marine Pollution*

- Bulletin*, 54(5), 566–575. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.12.009>
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G., Cadoret, J.-P., Morant-Manceau, A., & Schoefs, B. (2012). The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(15), 2733–2750. <https://doi.org/10.2174/138920112804724828>
- Miron, A. . S., Francisco, Garcia Camacho Antonio, Contreras Gomez Emilio, M. G., & Chisti, Y. (2000). Bubble-Column and Airlift Photobioreactors for Algal Culture - Sanchez, Garcia, Gomez - 2000.pdf. *AIChE Journal*, 46(9), 1872–1887.
- Mohammad, S., Dastgheib, M., Shavandi, M., & Ventosa, A. (2012). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium*. 789–798. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3706-4>
- Mohan, S. V., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R. A., & Shimizu, Y. (2006). Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5(4), 347–374. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-0004-1>
- Mohd Udaiyappan, A. F., Abu Hasan, H., Takriff, M. S., & Sheikh Abdullah, S. R. (2017). A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 20(September), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.09.006>
- Moheimani, N. R., & McHenry, M. P. (2013). Developments of five selected microalgae companies developing “closed” bioreactor biofuel production systems. *International Journal of Innovation and Sustainable Development*, 7(4), 367–386. <https://doi.org/10.1504/IJISD.2013.057045>
- Mokarram, M., Saber, A., & Sheykhi, V. (2020). Effects of heavy metal contamination on river water quality due to release of industrial effluents. *Journal of Cleaner Production*, 277, 123380. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123380>
- Moulin, S., Rozen-Rechels, D., & Stankovic, M. (2013). Traitement des eaux usées. Centre d’enseignement et de recherche sur l’environnement et la société. Paris. pp3.
- Molina Grima, E., Fernández Sevilla, J. M., Sánchez Pérez, J. A., & García Camacho, F. (1996).

- A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45(1), 59–69. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(95\)00144-1](https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00144-1)
- Monteiro, C. M., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X. (2011). *Microalga-Mediated Bioremediation of Heavy Metal-Contaminated Surface Waters* (Issue 289, pp. 365–385). [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1914-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1914-9_16)
- Monteiro, C. M., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, 28(2), 299–311. <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>
- Morin, S., Duong, T. T., Dabrin, A., Coynel, A., Herlory, O., Baudrimont, M., Delmas, F., Durrieu, G., Schäfer, J., Winterton, P., Blanc, G., & Coste, M. (2008). Long-term survey of heavy-metal pollution, biofilm contamination and diatom community structure in the Riou Mort watershed, South-West France. *Environmental Pollution*, 151(3), 532–542. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.04.023>
- Morin, S., Gómez, N., Tornés, E., Licursi, M., & Rosebery, J. (2016). Benthic Diatom Monitoring and Assessment of Freshwater Environments: Standard Methods and Future Challenges. *Aquatic Biofilms: Ecology, Water Quality and Wastewater Treatment, March 2017*, 111–124. <https://doi.org/10.21775/9781910190173.06>
- Moseley, J. L., Chang, C. W., & Grossman, A. R. (2006). Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 5(1), 26–44. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.26-44.2006>
- Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165(5), 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.001>
- Muangchinda, C., Rungsahiranrut, A., Prombutara, P., Soonglerdsongpha, S., & Pinyakong, O. (2018). 16S metagenomic analysis reveals adaptability of a mixed-PAH-degrading consortium isolated from crude oil-contaminated seawater to changing environmental conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 357(October 2017), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.062>

**N**

- Nagalakshmi, N., & Prasad, M. N. V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, *160*(2), 291–299. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00392-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00392-7)
- Naveed, S., Li, C., Lu, X., Chen, S., Yin, B., Zhang, C., & Ge, Y. (2019). Microalgal extracellular polymeric substances and their interactions with metal(loid)s: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *49*(19), 1769–1802. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1583052>
- Nichols, H. W., & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*, *1*(1), 34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x>
- Nicodem, D. E., Conceic, M., Fernandes, A. O. Z., L.B., C. G., & Correa, R. J. (1997). Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spill. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *39*, 121–138. <https://doi.org/10.1023/A>
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, *37*(1), 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- Noel, C. (2014). *Suivi de la biodégradation des hydrocarbures par le couplage des mesures géophysiques électriques du sol (polarisation provoquée) et des analyses des gaz (concentration du CO<sub>2</sub> et isotopie du carbone)*. Université d'Orléans.
- Notar, M., Leskovšek, H., & Faganeli, J. (2001). Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, *42*(1), 36–44. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00092-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00092-8)
- NRC. (2003). Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects, Ocean Studies Board, Marine Board, Transportation Research Board, Division on Earth and Life Studies, National Research Council, 2003. Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. In *National Academies Press, Washington, D.C.* <https://doi.org/10.17226/10388>
- Nur, M. M. A., & Buma, A. G. J. (2019). Opportunities and Challenges of Microalgal Cultivation on Wastewater, with Special Focus on Palm Oil Mill Effluent and the

Production of High Value Compounds. *Waste and Biomass Valorization*, 10(8), 2079–2097.  
<https://doi.org/10.1007/s12649-018-0256-3>

Nys, Y., Oligo-éléments, Y. N., & Productions, D. (2020). *Oligo-éléments, croissance et santé du poulet de chair, Productions animales*, 14(3), 171–180.

## O

Obasi, P. N., & Akudinobi, B. E. B. (2019). Heavy metals occurrence, assessment and distribution in water resources of the lead–zinc mining areas of Abakaliki, Southeastern Nigeria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(12), 8617–8638. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02489-y>

OFEV, O. fédéral de l'environnement. (2014). *Document de base sur la pollution azotée Air , sol , eau , biodiversité et climat*.

Ojha, N., Kumar, S., & Nilanjana, M. (2019). Enhanced degradation of indeno ( 1 , 2 , 3-cd ) pyrene using *Candida tropicalis* NN4 in presence of iron nanoparticles and produced biosurfactant : a statistical approach. *3 Biotech*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1623-x>

Okkacha, Y. (2008). Epuration des eaux usees par lagunage naturel Etude de la performance du Dispositif de traitement des eaux usées par Lagunage Naturel de Ain Ouarka Wilaya de Naama. Université d'OranFaculté des Sciences.

Olivo, E. (2007). Conception et étude d'un photobioréacteur pour la production en continu de microalgues en écloséries aquacoles [Université de Nantes]. In *Thèse de Doctorat*. [http://www.acube.org/files/3613/5328/0766/2000\\_4.pdf](http://www.acube.org/files/3613/5328/0766/2000_4.pdf)

OSPAR. (2019). Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic (OSPAR Convention). *Yearbook of International Cooperation on Environment and Development 1998–99, February 2005*, 122–123. <https://doi.org/10.4324/9781315066547-30>

Oswald, W. J. (2003). My sixty years in applied algology. *Journal of Applied Phycology*, 15(2/3), 99–106. <https://doi.org/10.1023/a:1023871903434>

## P

- Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 156, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>
- Pascucci, P. R., & Kowalak, A. D. (1996). Public health benefits of using algae for simultaneous multiple metal extraction from waters. *Reviews on Environmental Health*, 11(4), 205–211. <https://doi.org/10.1515/REVEH.1996.11.4.205>
- Patel, A. B., Mahala, K., Jain, K., & Madamwar, D. (2018). Development of mixed bacterial cultures DAK11 capable for degrading mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons ( PAHs ). *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.049>
- Patel, A. B., Singh, S., Patel, A., Jain, K., Amin, S., & Madamwar, D. (2019). Synergistic biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 284, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.097>
- Pawlik-Skowrońska, B. (2002). Correlations between toxic Pb effects and production of Pb-induced thiol peptides in the microalga *Stichococcus bacillaris*. *Environmental Pollution*, 119(1), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00280-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00280-9)
- Pedroni, P., Davison, J., Beckert, H., Bergman, P., & Benemann, J. (2003). International Network for Biofixation of CO<sub>2</sub> and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae. *Greenhouse Gas Control Technologies - 6th International Conference*, 1863–1866. <https://doi.org/10.1016/b978-008044276-1/50316-0>
- Pelmont, J. (2005). *Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement*. EDP sciences Les Ulis, France.
- Peng, T., Luo, A., Kan, J., Liang, L., Huang, T., & Hu, Z. (2019). Identification of a ring-hydroxylating dioxygenases capable of anthracene and Benz[a]anthracene oxidization from *rhodococcus* sp. P14. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 183–189. <https://doi.org/10.1159/000494384>
- Peng, X., Xu, P. F., Du, H., Tang, Y., Meng, Y., Yuan, L., & Sheng, L. P. (2018). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Applied Ecology and Environmental*

- Research*, 16(5), 6419–6440. [https://doi.org/10.15666/aeer/1605\\_64196440](https://doi.org/10.15666/aeer/1605_64196440)
- Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>
- Pérez-Rama, M., Abalde Alonso, J., Herrero López, C., & Torres Vaamonde, E. (2002). Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*, 84(3), 265–270. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00045-7)
- Phang, S. M., Miah, M. S., Yeoh, B. G., & Hashim, M. A. (2000). Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 395–400. <https://doi.org/10.1023/a:1008157731731>
- Picaud, C. (2017). *Oligo-Éléments : Excès, Carences Et Conseil Officinal*. 145.
- Piña-Olavide, R., Paz-Maldonado, L. M. T., Alfaro-De La Torre, M. C., García-Soto, M. J., Ramírez-Rodríguez, A. E., Rosales-Mendoza, S., Bañuelos-Hernández, B., & García De la Cruz, R. F. (2020). Increased removal of cadmium by *Chlamydomonas reinhardtii* modified with a synthetic gene for  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *International Journal of Phytoremediation*, 22(12), 1269–1277. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1765138>
- Pires, J. C. M. (2017). COP21: the algae opportunity? *Renew. Sustain Energy*, 79, 77–867.
- Pizon, F. X. (2005). *Evolution des risques de pollution par les hydrocarbures depuis les naufrages de l'Erika et de Prestige. Communication présentée à Hyères le 11 mars 2005 au 4ème forum Méditerranéen des risques pétroliers*.
- Podder, M. S., & Majumder, C. B. (2017). Prediction of phycoremediation of As(III) and As(V) from synthetic wastewater by *Chlorella pyrenoidosa* using artificial neural network. *Applied Water Science*, 7(7), 3949–3971. <https://doi.org/10.1007/s13201-017-0547-z>
- Podevin, M., De Francisci, D., Holdt, S. L., & Angelidaki, I. (2015). Effect of nitrogen source and acclimatization on specific growth rates of microalgae determined by a high-throughput in vivo microplate autofluorescence method. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1415–1423. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0468-2>
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). *Commercial and industrial applications of micro algae – A review*. 3(4), 89–100.

Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26(3), 1359–1377. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>

Prussi, M., Buffi, M., Casini, D., Chiaramonti, D., Martelli, F., Carnevale, M., Tredici, M. R., & Rodolfi, L. (2014). Experimental and numerical investigations of mixing in raceway ponds for algae cultivation. *Biomass and Bioenergy*, 67(0), 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.024>

## Q

QUÉBEC, C. D. E. A. E. (2016). Centre d'expertise en analyse environnementale. Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques : dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. MA. 400-HAP 1.1, Rév. 4, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 1–21.

## R

Rai, P. K., & Tripathi, B. D. (2007a). Removal of heavy metals by the nuisance cyanobacteria *Microcystis* in continuous cultures: an eco-sustainable technology . *Environmental Sciences*, 4(1), 53–59. <https://doi.org/10.1080/15693430601164956>

Rai, P. K., & Tripathi, B. D. (2007b). Removal of heavy metals by the nuisance cyanobacteria *Microcystis* in continuous cultures: an eco-sustainable technology. *Environmental Sciences*, 4(1), 53–59. <https://doi.org/10.1080/15693430601164956>

Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2017). Toxicity of diesel water accommodated fraction toward microalgae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella* sp. MM3. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142(October 2016), 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.052>

Ramade, F. (2000). *Dictionnaire encyclopédique des populations: les polluants: de l'environnement à l'homme*. Ediscience international.

Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I., & Bux, F. (2014). The optimization of biomass and lipid

- yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 168, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.064>
- Rana, A. A. (2010). A study on the effect of temperature on the treatment of industrial wastewater using *Chlorella vulgaris* alga. *Eng. Technol. J.*; 28. pp 785-792.
- Rashidi, B. & Trindade, L. M. (2018). Detailed biochemical and morphologic characteristics of the green microalga *Neochloris oleoabundans* cell wall. *Algal Research*, 35(August), 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.033>
- Rassam, A., Chaouch, A., Bourkhiss, B., & Bourkhiss, M. (2012). Performances de la dégradation de la matière organique par lagunage aéré dans la station d'épuration des eaux usées de la ville d'Oujda (Maroc oriental). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. Vol 81. pp 121-125.
- Rastoin, J. L. (2016). Le secteur des micro-algues en Méditerranée Perspectives et contribution au développement durable. *Etudes et Analyses IPEMED*. [http://www.ipemed.coop/imgedit/IPEMED\\_Etudes et Analyses\\_Rapport microalgues.pdf](http://www.ipemed.coop/imgedit/IPEMED_Etudes et Analyses_Rapport microalgues.pdf)
- Razzak, S. A., Hossain, M. M., Lucky, R. A., Bassi, A. S., & De Lasa, H. (2013). Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 622–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.063>
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture - Biotechnology and Applied Phycology* (Amos Richmond (ed.); Blackwell). Blackwell Publishing company Editorial.
- Roberts, S. M., Munson, J. W., Lowney, Y. W., & Ruby, M. V. (2007). Relative oral bioavailability of arsenic from contaminated soils measured in the cynomolgus monkey. *Toxicological Sciences*, 95(1), 281–288. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl117>
- Rodier J., B. Legube, & N. Meret, et al. (2009). *The water analyze. 9th Edition. DUNOD, Paris. (2009) 1528 p.*
- Rodrigues, M. A., & Pinto, D. S. B. E. (2011). Evaluation of chlorella (Chlorophyta) as source of fermentable sugars via cell wall enzymatic hydrolysis. *Enzyme Research*, 2011(1). <https://doi.org/10.4061/2011/405603>

- Roesijadi, G. (1994). Metal regulation in aquatic animals: Mechanism of uptake, accumulation and release. *Molecular Mechanisms in Aquatic Toxicology.*, 387–420.
- Rogers, J. N., Rosenberg, J. N., Guzman, B. J., Oh, V. H., Mimbela, L. E., Ghassemi, A., Betenbaugh, M. J., Oyler, G. A., & Donohue, M. D. (2014). A critical analysis of paddlewheel-driven raceway ponds for algal biofuel production at commercial scales. *Algal Research*, 4(1), 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.007>
- Rollin, C., & Quiot, F. (2005). Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines : Synthèse bibliographique relative aux paramètres K<sub>d</sub> (sorption) et T<sub>1/2</sub> (biodégradation). Rapport final. 108. [https://www.ineris.fr/sites/ineris.fr/files/contribution/Documents/66244-DESP-R022\\_\\_.pdf](https://www.ineris.fr/sites/ineris.fr/files/contribution/Documents/66244-DESP-R022__.pdf)
- Rosakis, A., & Köster, W. (2004). Transition metal transport in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* - Genomic sequence analysis. *Research in Microbiology*, 155(3), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.12.004>
- Rowley, W. M. (2010). Nitrogen and Phosphorus Biomass-Kinetic Model for *Chlorella vulgaris* in a Biofuel Production Scheme. 1–38.
- Roychowdhury, T., Tokunaga, H., & Ando, M. (2003). Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic-affected area of West Bengal, India. *Science of the Total Environment*, 308(1–3), 15–35. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00612-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00612-5)
- Ruiz, F. A., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govindjee, & Docampo, R. (2001). The Polyphosphate Bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* Possess a Proton-pumping Pyrophosphatase and Are Similar to Acidocalcisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46196–46203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105268200>

## S

- Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M. E., Vega, M., & Bolado, S. (2018). Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresource Technology*, 263, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>

- Sahnoun, F. (2010). *Contrôle et surveillance de la pollution par la qualité des eaux du littoral - cas de la zone industrielle d ' Arzew* *Contrôle et surveillance de la pollution par la qualité des eaux du littoral - cas de la zone industrielle d ' Arzew*. Université des sciences et de la technologie d'oran mohamed boudiaf.
- Salam, K. A. (2019). Towards sustainable development of microalgal biosorption for treating effluents containing heavy metals. In *Biofuel Research Journal* (Vol. 6, Issue 2, pp. 948–961). Green Wave Publishing of Canada. <https://doi.org/10.18331/BRJ2019.6.2.2>
- Salvarredy Aranguren, M. M. (2008). *Contamination en métaux lourds des eaux de surface et des sédiments du Val de Milluni (Andes Boliviennes) par des déchets miniers. Approches géochimique, minéralogique et hydrochimique*. 489.
- Samorì, G., Samorì, C., Guerrini, F., & Pistocchi, R. (2013). Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water Research*, 47(2), 791–801. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.006>
- Sangkharak, K., Choonut, A., Rakkan, T., & Prasertsan, P. (2020). The Degradation of Phenanthrene, Pyrene, and Fluoranthene and Its Conversion into Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate by Novel Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria. *Current Microbiology*, 77(6), 897–909. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01883-x>
- Sanz-Luque, E., Bhaya, D., & Grossman, A. R. (2020). Polyphosphate: A Multifunctional Metabolite in Cyanobacteria and Algae. *Frontiers in Plant Science*, 11(June), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00938>
- Sauer, T. C., Michel, J., Hayes, M. O., & Aurand, D. V. (1998). Hydrocarbon characterization and weathering of oiled intertidal sediments along the Saudi Arabian coast two years after the Gulf War oil spill. *Environment International*, 24(1–2), 43–60. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(97\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(97)00120-7)
- Sauret, C. (2011). *Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière: influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions*. Paris 6.
- Schuelter, A. R., Kroumov, A. D., Hinterholz, C. L., Fiorini, A., Trigueros, D. E. G., Vendruscolo, E. G., Zaharieva, M. M., & Módenes, A. N. (2019). Isolation and

- identification of new microalgae strains with antibacterial activity on food-borne pathogens. Engineering approach to optimize synthesis of desired metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, 144, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.01.007>
- Selvaratnam, T., Pegallapati, A. K., Montelya, F., Rodriguez, G., Nirmalakhandan, N., Van Voorhies, W., & Lammers, P. J. (2014). Evaluation of a thermo-tolerant acidophilic alga, *Galdieria sulphuraria*, for nutrient removal from urban wastewaters. *Bioresource Technology*, 156, 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.075>
- Serediak, N., & Huynh, M. (2011). Algae Identification Field Guide: An Illustrative Field Guide on Identifying Common Algae Found in the Canadian Prairies. In *Fluid Mechanics (Agriculture)*.
- Shah, M. P. (2014). Environmental Bioremediation: A Low Cost Nature's Natural Biotechnology for Environmental Clean-up. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 05(04). <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000191>
- Shanab, S., Essa, A., & Shalaby, E. (2012a). Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian isolates). *Plant Signaling and Behavior*, 7(3), 392–399. <https://doi.org/10.4161/psb.19173>
- Shanab, S., Essa, A., & Shalaby, E. (2012b). Bioremoval capacity of three heavy metals by somme microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signaling and Behavior.*, 7(3), 1–8. <https://doi.org/10.4161/psb.7.3.19173>
- Sharma, A., Singh, S. B., Sharma, R., Chaudhary, P., Pandey, A. K., Ansari, R., Vasudevan, V., Arora, A., Singh, S., Saha, S., & Nain, L. (2016). Enhanced biodegradation of PAHs by microbial consortium with different amendment and their fate in in-situ condition. *Journal of Environmental Management*, 181, 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.024>
- Sharma, S. S., Dietz, K. J., & Mimura, T. (2016). Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant Cell and Environment*, 39(5), 1112–1126. <https://doi.org/10.1111/pce.12706>
- Shen, F., Mao, L., Sun, R., Du, J., Tan, Z., & Ding, M. (2019). Contamination evaluation and source identification of heavy metals in the sediments from the lishui river watershed, southern China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(3).

<https://doi.org/10.3390/ijerph16030336>

- Shilton, A. (2015). Pond Treatment Technology. *Water Intelligence Online*, 5(0), 9781780402499–9781780402499. <https://doi.org/10.2166/9781780402499>
- Simosa, A. E. (2016). *Factors affecting algal biomass growth and cell wall destruction*. University of New Orleans.
- Singh, D. V., Bhat, R. A., Upadhyay, A. K., Singh, R., & Singh, D. P. (2021). Microalgae in aquatic environs: A sustainable approach for remediation of heavy metals and emerging contaminants. *Environmental Technology and Innovation*, 21, 101340. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101340>
- Singh, P., Gupta, S. K., Guldhe, A., Rawat, I., & Bux, F. (2015). Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00004-2>
- Singh, S., Pradhan, S., & Rai, L. C. (2000). Metal removal from single and multimetallic systems by different biosorbent materials as evaluated by differential pulse anodic stripping voltammetry. *Process Biochemistry*, 36(1–2), 175–182. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00211-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00211-9)
- Singh, U. K., & Kumar, B. (2017). Pathways of heavy metals contamination and associated human health risk in Ajay River basin, India. *Chemosphere*, 174, 183–199. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.103>
- Soldo, D., Hari, R., Sigg, L., & Behra, R. (2005). Tolerance of *Oocystis nephrocytioides* to copper: Intracellular distribution and extracellular complexation of copper. *Aquatic Toxicology*, 71(4), 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.011>
- Soltani, M. (2004). *Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes . Variation en fonction de la source de carbone* . Université de Pierre et Marie Curie. Français.
- Speight, J. G. (2006). *The chemistry and technology of petroleum*. CRC press.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>

- Srivastava, V., Sarkar, A., Singh, S., Singh, P., de Araujo, A. S. F., & Singh, R. P. (2017). Agroecological responses of heavy metal pollution with special emphasis on soil health and plant performances. *Frontiers in Environmental Science*, 5(OCT), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00064>
- Stout, S. A., & Wang, Z. (2016). Chemical Fingerprinting Methods and Factors Affecting Petroleum Fingerprints in the Environment. In *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics: Fingerprinting and Source Identification: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809659-8.00003-6>
- Suárez, C., Torres, E., Pérez-Rama, M., Herrero, C., & Abalde, J. (2010). Cadmium toxicity on the freshwater microalga *Chlamydomonas moewusii* Gerloff: Biosynthesis of thiol compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(9), 2009–2015. <https://doi.org/10.1002/etc.242>
- Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Venkidusamy, K., Palanisami, T., Naidu, R., & Megharaj, M. (2019). Bioremediation of soil long-term contaminated with PAHs by algal–bacterial synergy of *Chlorella* sp. MM3 and *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9 in slurry phase. *Science of the Total Environment*, 659, 724–731. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.453>
- Sukačová, K., Červený, J., Elawwad, A., Karam, A., Zaher, K., Travieso, L., Cañizares, R. O., Borja, R., Benítez, F., Domínguez, A. R., Dupeyrón, R., Valiente, Y. V., Jia, H., Yuan, Q., De, T., Sikder, J., Narayanan, C. M., Khelifaoui, F., Zouini, D., ... Hussenot, J. (2017). Contribution a l'étude de traitement des eaux par l'algue *chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Phycology*, 24(1), 10–14. <https://doi.org/10.1080/23311843.2016.1275089>
- Sumi, Y. (2009). Microalgae Pioneering the Future — Application and Utilization —. *NISTEP Science & Technology Foresight Center.*, Quarterly review No.34, 9-21. <http://data.nistep.go.jp/dspace/bitstream/11035/2825/1/NISTEP-STT034E-9.pdf>
- Suresh Kumar, K., Dahms, H. U., Won, E. J., Lee, J. S., & Shin, K. H. (2015). Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329–352. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
- Surriya, O., Saleem, S., Waqar, K., & Gul, A. (2014). *Soil Remediation and Plants*. Academic Press Cambridge, MA, USA:

Suschka, J., & Ferreira, E. (1986). Activated sludge respirometric measurements. *Water Research*, 20(2), 137–144. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(86\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90003-5)

Sutherland, D. L., Turnbull, M. H., & Craggs, R. J. (2014). Increased pond depth improves algal productivity and nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Research*, 53, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.025>

## T

Takada, H., Onda, T., & Ogura, N. (1990). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban street dusts and their source materials by capillary gas chromatography. *Environmental Science & Technology*, 24(8), 1179–1186.

Takeda, H. (1993). Chemical composition of cell walls as a taxonomical marker. *Journal of Plant Research*, 106(3), 195–200. <https://doi.org/10.1007/BF02344585>

Tam, N. F. Y., Wong, J. P. K., & Wong, Y. S. (2001). Repeated use of two *Chlorella* species, *C. vulgaris* and WW1 for cyclic nickel biosorption. *Environmental Pollution*, 114(1), 85–92. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00202-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00202-5)

Tan, M., Sudjadi, Astuti, & Rohman, A. (2018). Validation and quantitative analysis of cadmium, chromium, copper, nickel, and lead in snake fruit by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(2), 044–048. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8206>

Tátrai, E., Kováčiková, Z., Hudák, A., Adamis, Z., & Ungváry, G. (2001). Comparative *in vitro* toxicity of cadmium and lead on redox cycling in type II pneumocytes. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 21(6), 479–483.

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Molecular, clinical and environmental toxicology Volume 3: Environmental Toxicology. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (Vol. 101). <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4>

Tiwari, A., & Marella, T. K. (2019). Potential and application of diatoms for industry-specific wastewater treatment. *Application of Microalgae in Wastewater Treatment: Volume 1: Domestic and Industrial Wastewater Treatment*, 321–339.

Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., &

- Colepiccolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.009>
- Torzillo, G., Giovannetti, L., Bocci, F., & Materassi, R. (1984). Effect of oxygen concentration on the protein content of spirulina biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(9), 1134–1135. <https://doi.org/10.1002/bit.260260920>
- Tou-dallil, I. (2013). *Bioremédiation du Cd , Zn et Cu , par deux bactéries rhizosphériques*. Université des sciences et de la technologie, Houari boumediene.
- Travieso, L., Cañizares, R. O., Borja, R., Benítez, F., Domínguez, A. R., Dupeyrón, R., & Valiente, Y. V. (1999). Heavy metal removal by microalgae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62(2), 144–151. <https://doi.org/10.1007/s001289900853>
- Tredici, M. R. (2004). *Mass production of microalgae: photobioreactors*. In: Richmond A, editor. *Handbook of microalgal culture biotechnology and applied phycology* (Issue 1986).
- Tricolici, O., Bumbac, C., & Postolache, C. (2014). Microalgae-bacteria system for biological wastewater treatment. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 15(1), 268–276.
- Tripathi, S., Arora, N., Gupta, P., Pruthi, P. A., Poluri, K. M., & Pruthi, V. (2019). Microalgae: An emerging source for mitigation of heavy metals and their potential implications for biodiesel production. In *Advanced Biofuels: Applications, Technologies and Environmental Sustainability*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102791-2.00004-0>
- Tsednee, M., Castruita, M., Salomé, P. A., Sharma, A., Lewis, B. E., Schmollinger, S. R., Strenkert, D., Holbrook, K., Otegui, M. S., Khatua, K., Das, S., Datta, A., Chen, S., Ramon, C., Ralle, M., Weber, P. K., Stemmler, T. L., Pett-Ridge, J., Hoffman, B. M., & Merchant, S. S. (2019). Manganese co-localizes with calcium and phosphorus in Chlamydomonas acidocalcisomes and is mobilized in manganese-deficient conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 294(46), 17626–17641. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009130>
- Tsuji, N., Hirayanagi, N., Iwabe, O., Namba, T., Tagawa, M., Miyamoto, S., Miyasaka, H., Takagi, M., Hirata, K., & Miyamoto, K. (2003). Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, Dunaliella tertiolecta. *Phytochemistry*, 62(3), 453–459. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00559-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00559-9)

## U

- Ubando, A. T., Africa, A. D. M., Maniquiz-Redillas, M. C., Culaba, A. B., Chen, W. H., & Chang, J. S. (2021). Microalgal biosorption of heavy metals: A comprehensive bibliometric review. *Journal of Hazardous Materials*, 402(July 2020), 123431. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123431>
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021–4028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
- Ugya, Y. A., Hasan, D. B., Tahir, S. M., Imam, T. S., Ari, H. A., & Hua, X. (2021). Microalgae biofilm cultured in nutrient-rich water as a tool for the phycoremediation of petroleum-contaminated water. *International Journal of Phytoremediation*, 23(11), 1175–1183. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1882934>
- Ullah, A. K. M. A., Maksud, M. A., Khan, S. R., Lutfu, L. N., & Quraishi, S. B. (2017). Dietary intake of heavy metals from eight highly consumed species of cultured fish and possible human health risk implications in Bangladesh. *Toxicology Reports*, 4, 574–579. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.10.002>
- Umamaheswari, J., & Shanthakumar, S. (2016). Efficacy of microalgae for industrial wastewater treatment: a review on operating conditions, treatment efficiency and biomass productivity. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 15(2), 265–284. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9397-7>

## V

- Vaidya, S., Devpura, N., Jain, K., & Madamwar, D. (2018). Degradation of chrysene by enriched bacterial consortium. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01333>
- Vaidya, S., Jain, K., & Madamwar, D. (2017). Metabolism of pyrene through phthalic acid pathway by enriched bacterial consortium composed of *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Rhodococcus* (PBR). *3 Biotech*, 7(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0598-8>
- Van Iersel, S. (2009). *Algae-based Biofuels. A Review of Challenges and Opportunities for*

*Developing Countries.*

- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223(October), 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Vasudevan, P. T., & Briggs, M. (2008). Biodiesel production - Current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 421–430. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0312-2>
- Vélez-Pérez, L. S., Ramirez-Nava, J., Hernández-Flores, G., Talavera-Mendoza, O., Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo, H. M., Solorza-Feria, O., & López-Díaz, J. A. (2020). Industrial acid mine drainage and municipal wastewater co-treatment by dual-chamber microbial fuel cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(26), 13757–13766. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.037>
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., & Kim, S. K. (2015). Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. Present Trends and Future Advances. In *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00001-7>
- Viamajala, S., Peyton, B. M., Richards, L. A., & Petersen, J. N. (2007). Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions. *Chemosphere*, 66(6), 1094–1106. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.059>
- Viarengo, A. (1989). Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Rev. Aquat. Sci*, 1(2), 295–317.
- Vieira, P. A., Vieira, R. B., de França, F. P., & Cardoso, V. L. (2007). Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Materials*, 140(1–2), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.048>
- Volland, S., Lütz, C., Michalke, B., & Lütz-Meindl, U. (2012). Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquatic Toxicology*, 109, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.11.013>
- Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology* (Ben-Gurion). <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>

Vuuren, Sanet Janse van; Taylor, Jonathan ; Ginkel, Carin van; Gerber, A. (2006). A guide for the identification of algae in South African freshwaters. In *North-West University and Department of Water Affairs and Forestry* (Issue November).

## W

Wang, B., Jin, Z., Xu, X., Zhou, H., Yao, X., & Ji, F. (2019). Effect of Tenax addition amount and desorption time on desorption behaviour for bioavailability prediction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, 651, 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.097>

Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>

Wang, C., Liu, H., Li, J., & Sun, H. (2014). *Degradation of PAHs in soil by Lasiodiplodia theobromae and enhanced benzo [ a ] pyrene degradation by the addition of Tween-80.* <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3050-1>

Wang, H. T., Yao, C. H., Ai, J. N., Cao, X. P., Xue, S., & Wang, W. liang. (2014). Identification of carbohydrates as the major carbon sink of the marine microalga *Isochrysis zhangjiangensis* (Haptophyta) and optimization of its productivity by nitrogen manipulation. *Bioresource Technology*, 171(1), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.090>

Wang, J., Yang, H., & Wang, F. (2014). Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(7), 3307–3329. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0729-1>

Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>

Wang, W. X., & Dei, R. C. H. (2006). Metal stoichiometry in predicting Cd and Cu toxicity to a freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Pollution*, 142(2), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.005>

- Wang, Y., Zhang, C., Zheng, Y., & Ge, Y. (2017). Phytochelatin synthesis in *Dunaliella salina* induced by arsenite and arsenate under various phosphate regimes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *136*(November 2016), 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.002>
- Wang, Z., Gao, M., Wei, J., Ma, K., Zhang, J., Yang, Y., & Yu, S. (2016). Extracellular polymeric substances, microbial activity and microbial community of biofilm and suspended sludge at different divalent cadmium concentrations. *Bioresource Technology*, *205*, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.067>
- Wei, Y. M., Kang, J. N., Liu, L. C., Li, Q., Wang, P. T., Hou, J. J., Liang, Q. M., Liao, H., Huang, S. F., & Yu, B. (2021). A proposed global layout of carbon capture and storage in line with a 2 °C climate target. *Nature Climate Change*, *11*(2), 112–118. <https://doi.org/10.1038/s41558-020-00960-0>
- Werner, T. P., Amrhein, N., & Freimoser, F. M. (2007). Inorganic polyphosphate occurs in the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii* and accumulates during cytokinesis. *BMC Plant Biology*, *7*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-51>
- Wilson, C. ., & Jones, K. . (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, *81*, 229–249. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90289>
- Wu, J., Neimanis, S., & Heber, U. (1991). Photorespiration is More Effective than the Mehler Reaction in Protecting the Photosynthetic Apparatus against Photoinhibition. *Botanica Acta*, *104*(4), 283–291. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1991.tb00231.x>
- Wu, Y., Xu, Y., & Zhou, N. (2020). A newly defined dioxygenase system from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 endowed with an enhanced activity of dihydroxylation of high-molecular-weight polyaromatic hydrocarbons. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, *14*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11783-019-1193-5>

## X

- Xaaldi Kalhor, A., Mohammadi Nassab, A. D., Abedi, E., Bahrami, A., & Movafeghi, A. (2016). Biodiesel production in crude oil contaminated environment using *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, *222*, 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.110>

- Xaaldi Kalhor, A., Movafeghi, A., Mohammadi-Nassab, A. D., Abedi, E., & Bahrami, A. (2017). Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 123(1–2), 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.045>
- Xiao, R., & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1225–1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>
- Xie, T., Xia, Y., Zeng, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2017). Nitrate concentration-shift cultivation to enhance protein content of heterotrophic microalga *Chlorella vulgaris*: Over-compensation strategy. *Bioresource Technology*, 233, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.099>
- Xing, R. lian, Ma, W. wei, Shao, Y. wen, Cao, X. bin, Su, C., Song, H. xu, Su, Q., & Zhou, G. fei. (2018). Growth and potential purification ability of *Nitzschia sp.* benthic diatoms in sea cucumber aquaculture wastewater. *Aquaculture Research*, 49(8), 2644–2652. <https://doi.org/10.1111/are.13722>
- Xu, L., Wang, T., Wang, J., & Lu, A. (2017). Occurrence, speciation and transportation of heavy metals in 9 coastal rivers from watershed of Laizhou Bay, China. *Chemosphere*, 173, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.046>

## Y

- Yan, C., Zhang, L., Luo, X., & Zheng, Z. (2013). Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios. *Ecological Engineering*, 51, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.051>
- Yan Hui, L., Wang, S., Luan, Z., Ding, J., Xu, C., & Wu, D. (2003). Adsorption of cadmium(II) from aqueous solution by surface oxidized carbon nanotubes. *Carbon*, 41(5), 1057–1062. [https://doi.org/10.1016/S0008-6223\(02\)00440-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6223(02)00440-2)
- Yang, L. (1990). National Water Quality Inventory Report to Congress. *Chinese Journal of Neurology and Psychiatry*, 23(1), 22.
- Yang, X., Li, E., Liu, F., & Xu, M. (2020). Interactions of PAH-degradation and nitrate-/sulfate-

reducing assemblages in anaerobic sediment microbial community. *Journal of Hazardous Materials*, 388, 122068. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122068>

Ye, J., Xiao, H., Xiao, B., Xu, W., Gao, L., & Lin, G. (2015). Bioremediation of heavy metal contaminated aqueous solution by using red algae *Porphyra leucosticta*. *Water Science and Technology*, 72(9), 1662–1666. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.386>

Yu, Z., Zhang, T., Hao, R., & Zhu, Y. (2019). Sensitivity of: *Chlamydomonas reinhardtii* to cadmium stress is associated with phototaxis. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 21(6), 1011–1020. <https://doi.org/10.1039/c9em00013e>

Yuan, Y., Liu, H., Li, X., Qi, W., Cheng, D., Tang, T., Zhao, Q., Wei, W., & Sun, Y. (2018). Enhancing Carbohydrate Productivity of *Chlorella* sp. AE10 in Semi-continuous Cultivation and Unraveling the Mechanism by Flow Cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(2), 419–433. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2667-1>

## **Z**

Zaghden, H., Kallel, M., Elleuch, B., Oudot, J., & Saliot, A. (2007). Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Sfax, Tunisia, Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 105(1–2), 70–89. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.12.016>

Zeraatkar, A. K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A. F., Moheimani, N. R., & McHenry, M. P. (2016). Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management*, 181, 817–831. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.059>

Zerhouni, R. A., Bouya, D., & Cara, C. R. J. (2021). *Revue des sciences de l ' eau Journal of Water Science Étude de l ' absorption des phosphates , azote , chrome et cadmium par trois algues vertes isolées à partir d ' effluents urbains Phosphate , nitrogen , chromium and cadmium uptake by three green alga.*

Zhang, H., Zhang, X., & Geng, A. (2020). Expression of a novel manganese peroxidase from *Cerrena unicolor* BBP6 in *Pichia pastoris* and its application in dye decolorization and PAH degradation. *Biochemical Engineering Journal*, 153, 107402. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2019.107402>

Zhang, J., Zhou, F., Liu, Y., Huang, F., & Zhang, C. (2020). Effect of extracellular polymeric substances on arsenic accumulation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Science of the Total*

- Environment*, 704(xxxx), 135368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135368>
- Zhang, L., & Liu, J. (2016). Enhanced fatty acid accumulation in *Isochrysis galbana* by inhibition of the mitochondrial alternative oxidase pathway under nitrogen deprivation. *Bioresource Technology*, 211, 783–786. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.164>
- Zhang, W., Tan, N. G. J., Fu, B., & Li, S. F. Y. (2015). Metallomics and NMR-based metabolomics of *Chlorella* sp. reveal the synergistic role of copper and cadmium in multi-metal toxicity and oxidative stress. *Metallomics*, 7(3), 426–438. <https://doi.org/10.1039/c4mt00253a>
- Zhang, X., Rong, J., Chen, H., He, C., & Wang, Q. (2014). Current status and outlook in the application of microalgae in biodiesel production and environmental protection. *Frontiers in Energy Research*, 2(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00032>
- Zheng, R. F., Barpaga, D., Mathias, P. M., Malhotra, D., Koech, P. K., Jiang, Y., Bhakta, M., Lail, M., Rayer, A., Whyatt, G. A., Freeman, C. J., Zwoster, A. J., Weitz, K. K., & Heldebrant, D. J. (2020). A single-component water-lean post-combustion CO<sub>2</sub> capture solvent with exceptionally low operational heat and total costs of capture-comprehensive experimental and theoretical evaluation. *Energy and Environmental Science*, 13(11), 4106–4113. <https://doi.org/10.1039/d0ee02585b>
- Zhou, Q., Yang, N., Li, Y., Ren, B., Ding, X., Bian, H., & Yao, X. (2020). Total concentrations and sources of heavy metal pollution in global river and lake water bodies from 1972 to 2017. *Global Ecology and Conservation*, 22, e00925. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e00925>
- Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., & Yuan, Z. (2014). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 152, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.092>
- Znad, H., Al Ketife, A. M. D., Judd, S., AlMomani, F., & Vuthaluru, H. B. (2018). Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 110(September 2016), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.10.008>