

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT
En Sciences
Option : Microbiologie appliquée

THEME

**Biodégradation du diaphag à l'aide d'un biolaveur
à cellules fixées**

Présentée par: Ouartsy Nouha

Directeur de thèse : Djeribi Ryad

Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury:

Président : M. Branes Zidane

Professeur, Université d'Annaba

Examineurs : M. Benouareth Djamel Eddine

Professeur, Université de Guelma

M. Mechai Abdelbasset

Maître de conférences A, Université de
Tébessa

N° DBCH...../2019

Année universitaire : 2018/2019

Dédicace

Je dédie ce travail à

A mes parents

A mes frères

Qui ont toujours été présents lorsque j'en ai eu besoin

« Sans votre soutien, ce travail n'aurait jamais été possible »

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu de m'avoir accordé la puissance et la volonté pour terminer ce travail.

Je remercie très chaleureusement monsieur le Professeur **Djeribi Ryad**, toute ma gratitude et ma reconnaissance pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Je le remercie infiniment pour ses précieux conseils qui m'ont beaucoup aidé dans cette présente recherche.

Je remercie vivement monsieur le Professeur **Branes Zidane** pour avoir accepté de me faire le privilège et l'honneur de présider ce jury.

Je remercie les membres des jurys monsieur le Professeur **Benouareth Djamel Eddine** et monsieur **Mechai Abdelbasset**, Maître de conférences A, pour avoir accepté de juger ce travail. Je tiens ici à leur exprimer ma profonde reconnaissance.

Je tiens à exprimer mon éternel reconnaissance envers monsieur **Sbartai Mohamed Rochdi** qui m'a fait l'honneur de m'accepter au sein de l'unité pharmaceutique SAIDAL. Une gratitude sans limites à monsieur **Boukachabia Abdelmalek** et madame **Gasmie karima**.

Ma profonde gratitude, je l'exprime à mes parents et mes frères qui m'ont toujours encouragé. Qu'ils trouvent, ici, le témoignage de leur aide et leur soutien constant.

RESUME

Le diaphag est un produit pharmaceutique utilisé pour le traitement du diabète de type 2. Sa présence dans le milieu naturel représente une sérieuse menace pour l'environnement et la santé humaine. L'objectif de cette présente étude est de tester *in vitro* la biodégradation du diaphag utilisé comme seule source de carbone et d'énergie en présence d'un consortium microbien collecté à partir d'une eau usée et d'un sol agricole. La biodégradation du diaphag a été étudiée, d'une part, en culture batch et, d'autre part, en culture continue dans un biolaveur à cellules fixées garnis d'un support en pierres ponce. Après une période d'adaptation de cinq mois en culture batch, deux souches bactériennes ont été isolées et identifiées, à savoir, *Aeromonas hydrophila* et *Serratia odorifera*. En présence d'une concentration initiale de diaphag de 0.5 g/L, *Aeromonas hydrophila* et *Serratia odorifera* ainsi que leur culture mixte dégradent le diaphag avec une vitesse spécifique de 22.3, 24.1 et 19.2 ng/mg.h et un rendement de 88.88%, 82.94% et 95.88%, respectivement. Après 120 jours de fonctionnement, les résultats expérimentaux ont révélé que la capacité d'élimination du diaphag dans le biolaveur à cellules fixées atteint 40.96 g/L.h avec un rendement de 98.904% pour une concentration du diaphag à l'entrée du réacteur estimée à 5 g/L et un débit de 14 L/h. Le rendement maximal de biolaveur à cellules fixées est de 99.6% a été obtenu lorsque la concentration du diaphag à l'entrée est de 0.5, 1 et 5 g/L et le débit est maintenu à 6.3 L/h. Par ailleurs, après 12 mois de fonctionnement du réacteur, les deux souches dominantes sont différentes de celles présentes dans l'inoculum initial et sont identifiées comme *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, les rendements d'élimination élevés obtenus dans cette présente étude révèlent l'intérêt de l'utilisation, pour la première fois, d'un biolaveur à cellule fixées pour l'étude de la biodégradation du diaphag. L'obtention d'un consortium microbien fortement adapté à ce substrat peut s'avérer une alternative intéressante pour une application éventuelle dans le traitement, avant le rejet, des eaux usées contenant cette molécule ou d'autres molécules apparentées, en particulier dans l'industrie pharmaceutique.

Mots clés : acclimatation, biodégradation, biolaveur à cellules fixées, diaphag, produit pharmaceutique, xénobiotique

Abstract

Diaphag is a pharmaceutical product used in the treatment of type 2 diabetes. However, this drug is considered to be highly undesirable when present in the environment. We tested in vitro the biodegradation of diaphag as the sole source of carbon and energy by a microbial consortium collected from wastewater and agricultural soil. This biodegradation was investigated by means of batch cultures and continuous biotrickling filtration. After a 5-month adaptation period in batch culture, two bacterial strains were isolated and identified, namely, *Aeromonas hydrophila* and *Serratia odorifera*. With an initial concentration of diaphag at 0.5 g/L, these two bacteria and their combined culture degraded diaphag with a specific activity of 22.3, 24.1, and 19.2 ng/mg.h and a yield of 88.88, 82.94, and 95.88%, respectively. The experimental results reveal that after a 120-day run, the biodegradation capacity of diaphag in the biotrickling filter reached 40.96 g/L.h, with a removal efficiency of 98.904% at an inlet concentration of 5 g/L and a flow rate of 14 L/h. The maximum removal efficiency of the biotrickling filter was 99.6%, at a diaphag inlet concentration of 0.5, 1, and 5 g/L and a flow rate of 6.3 L/h. Interestingly, it was observed that after a period of 12 months, the two dominant strains differed from those present in the initial inocula and were identified as *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa*. Thus, the high elimination efficiencies obtained in this study reveal the interest of the use, for the first time, of a biotrickling filter for the study of the biodegradation of diaphag. Obtaining a microbial consortium strongly adapted to this substrate may prove to be an interesting alternative for a possible application in the treatment, before discharge, of wastewater containing this molecule or other related molecules, especially in the pharmaceutical industry.

Keywords: acclimation, biodegradation, biotrickling filter, diaphag, pharmaceutical product, xenobiotic

الملخص

ديافاج هو منتج صيدلاني يستخدم في علاج مرض السكري من النوع الثاني. ومع ذلك، يعتبر هذا الدواء غير مرغوب فيه للغاية عند وجوده في البيئة. قمنا باختبار التحلل البيولوجي للديافاج في المختبر كمصدر للكربون والطاقة في وجود كونسورتيوم ميكروبي تم جمعه من مياه الصرف والتربة الزراعية. تمت دراسة التحلل البيولوجي للديافاج، من ناحية، بالتخمير الدفعة، ومن ناحية أخرى، بالتخمير المستمرة في biotrickling filter. بعد فترة تكيف مدتها خمسة أشهر، تم عزل اثنين من سلالات بكتيرية، وهما *Aeromonas hydrophila* و *Serratia odorifera*. في وجود تركيز أولي من ديفاج يبلغ 0.5 غرام/لتر، فإن هذين النوعين من البكتيريا و اتحادهم تحلل ديفاج بسرعة محددة قدرها 22.3، 24.1، و 19.2 نانوغرام/مليغرام/ساعة و مردود قدره 88.88، و 82.94 و 95.88%، على التوالي. بعد 120 يوماً من التشغيل، كشفت النتائج التجريبية أن قدرة إزالة الديافاج في biotrickling filter بلغت 40.96 غرام/لتر/ساعة مع مردود قدره 98.904% للتركيز عند المدخل biotrickling filter مقدر بـ 5 غرام/لتر ومعدل تدفق 14 لتر/ساعة. تم الحصول على أقصى مردود من biotrickling filter بنسبة 99.6% عندما يكون تركيز ديفاج في المدخل 0.5، 1 و 5 غرام/لتر ويتم الحفاظ على معدل التدفق عن 6.3 لتر/ساعة. ومن المثير للاهتمام، أنه لوحظ أنه بعد 12 شهراً، اختلفت السلالتان السائدتان عن السلالات الموجودة في الأولي وتم تحديدهما على أنهما *Aeromonas hydrophila* و *Pseudomonas aeruginosa*. وبالتالي، فإن كفاءة الإزالة العالية التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة الحالية تكشف عن اهتمام باستخدام، لأول مرة biotrickling filter لدراسة التحلل الحيوي للديافاج. قد يثبت أن الحصول على كونسورتيوم ميكروبي تم تكيفه بقوة مع هذا الجزيء هو بديل مثير للاهتمام لتطبيق محتمل في معالجة المياه العادمة التي تحتوي على هذا الجزيء أو جزيئات أخرى ذات صلة، قبل تصريفها، وخاصةً في صناعة الأدوية.

الكلمات المفتاحية: أجنبي بيولوجيا، التكيف، الديافاج، biotrickling filter، التحلل البيولوجي، منتج صيدلاني

Sommaire

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

NOMENCLATURE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCTION | 1 |
| 2. GENERALITES | 3 |
| 2.1. Les composés xénobiotiques..... | 3 |
| 2.1.1. Définition et effets sur l'environnement..... | 3 |
| 2.1.2. Le devenir dans l'environnement..... | 6 |
| 2.1.3. Le mécanisme de la récalcitrance..... | 8 |
| 2.1.4. Problématique des composés pharmaceutiques dans l'environnement..... | 11 |
| 2.1.4.1. Les produits pharmaceutiques..... | 11 |
| 2.1.4.2. Présence dans l'environnement..... | 12 |
| 2.1.4.3. Source de pollution de l'environnement par les produits pharmaceutiques..... | 16 |
| 2.1.4.4. Risques liés à la présence des composés pharmaceutiques dans l'environnement.. | 18 |
| 2.2. La biodégradation des composés xénobiotiques..... | 20 |
| 2.2.1. Le rôle des microorganismes..... | 20 |
| 2.2.1.1 Généralités..... | 20 |
| 2.2.1.2. Acclimatation des microorganismes aux composés xénobiotiques..... | 21 |
| 2.2.1.3. Le métabolisme fortuit..... | 25 |
| 2.2.2. Importance des cultures mixtes..... | 25 |
| 2.2.2.1 Les interactions entre les microorganismes..... | 25 |
| 2.2.2.2 Le rôle des cultures mixtes dans la biodégradation..... | 26 |
| 2.2.2.3. Le cométabolisme..... | 27 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.3. Les biofilms..... | 29 |
| 2.2.3.1. Généralités sur les biofilms..... | 29 |
| 2.2.3.2. La biodégradation par les biofilms..... | 30 |
| 2.2.3.3. Modèles de biofilms de réacteurs à garnissage utilisés pour le traitement de composés xénobiotiques..... | 31 |
| 2.3. Les procédés physico-chimiques de traitement des composés xénobiotiques..... | 33 |
| 2.3.1. Procédés d'adsorption..... | 33 |
| 2.3.2. Procédés d'oxydation classiques..... | 34 |
| 2.3.3. Procédés d'oxydation avancée..... | 35 |
| 2.3.3.1 Ozonation..... | 36 |
| 2.3.3.2. Procédé Fenton..... | 37 |
| 2.3.3.3. Procédés photochimiques..... | 38 |
| 2.3.3.3.1. Photolyse de H ₂ O ₂ | 38 |
| 2.3.3.3.2. Procédé photo-Fenton..... | 38 |
| 2.3.4. Procédés membranaires..... | 39 |
| 2.4. Le procédés biologiques de traitement des composés xénobiotiques..... | 40 |
| 2.4.1. Introduction..... | 40 |
| 2.4.2. Les biofiltres..... | 42 |
| 2.4.3. Les biolaveurs à cellules fixées (biofiltre trickling)..... | 45 |
| 2.4.4. Les biolaveurs (bioscrubbers)..... | 47 |
| 2.4.5. Paramètres opératoires..... | 49 |
| 2.4.5.1. Besoins en eau..... | 49 |
| 2.4.5.2. Influence de la température..... | 50 |
| 2.4.5.3. Contrôle de l'évolution du pH..... | 50 |
| 2.4.5.4. Prétraitement des effluents..... | 51 |
| 2.4.6. Choix d'une technologie de traitement..... | 52 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. MATERIELS ET METHODES | 55 |
| 3.1. Screening et sélection des microorganismes..... | 55 |
| 3.1.1. Origine du consortium microbien..... | 55 |
| 3.1.2. Le diaphag..... | 56 |
| 3.1.3. Le milieu de base saline (MBS)..... | 60 |
| 3.1.4. Sélection et acclimatation du consortium microbien en culture batch..... | 61 |
| 3.2. Méthodes analytiques..... | 62 |
| 3.2.1. Mesure de la densité optique (DO)..... | 62 |
| 3.2.2. Mesure du poids sec..... | 62 |
| 3.2.3. Mesure du pH..... | 62 |
| 3.2.4. Mesure de l'adhérence cellulaire..... | 63 |
| 3.2.5. Dosage du diaphag..... | 63 |
| 3.3. Etude de l'effet de la concentration du diaphag sur la croissance du consortium microbien en culture batch..... | 64 |
| 3.4. Isolement et identification du consortium sélectionné..... | 64 |
| 3.5. Biodégradation de diaphag en culture batch..... | 65 |
| 3.6. Biodégradation du diaphag en culture continue..... | 66 |
| 3.6.1. Le réacteur : biolaveur à cellules fixées (biotrickling filter)..... | 66 |
| 3.6.2. Le garnissage utilisé..... | 68 |
| 3.6.3. Essais de biodégradation..... | 69 |
| 3.6.4. Isolement et identification des souches microbiennes composant le biofilms..... | 71 |
| 4. RESULTATS ET DISCUSSION | 72 |
| 4.1. Résultats d'Acclimatation et de sélection du consortium microbien en culture batch.... | 72 |
| 4.2. Etude en batch de l'effet de la concentration du diaphag sur la croissance du consortium acclimaté | 78 |
| 4.3. Etude de l'hydrophobicité du consortium microbien..... | 81 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.5. Etude microbiologique du consortium dégradant le diaphag..... | 82 |
| 4.6. Essai de biodégradation du diaphag en culture batch..... | 88 |
| 4.6.1. Détermination des souches aptes à dégrader le diaphag..... | 88 |
| 4.6.2. Etude cinétique | 93 |
| 4.7. Etude de la biodégradation du diaphag en culture continue..... | 96 |
| 4.8. Identification du consortium microbien présent dans le réacteur..... | 105 |
| 5. CONCLUSION..... | 111 |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Origines des composés chimiques organiques retrouvés dans l'environnement (Hutzinger et Veerkamp, 1981).

Figure 2. Devenir des composés xénobiotiques dans l'environnement (Leisinger, 1983).

Figure 3. Sources de pollution de l'environnement aquatique par les produits pharmaceutiques (Soufan, 2011).

Figure 4. Influence de l'acclimatation sur la minéralisation de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique par un inoculum non acclimaté (jour 0) ou acclimaté (jour16), d'après Wiggins *et al.*, 1987.

Figure 5. Effet du bouillon de culture sur l'élimination du 3,5-dichlorobenzoate par une culture acclimatée (Kim et Maier, 1986).

Figure 6. Minéralisation complète du dodécylcyclohexane par l'attaque synergique de deux bactéries (Slater et Bull, 1982).

Figure 7. Structure chimique du gliclazide (Şenkardeş *et al.*, 2017).

Figure 8. Culture en batch du consortium microbien en présence du diaphag.

Figure 9. Dispositif expérimental du biolaveur à cellules fixées (biotrickling filter).

Figure 10. Biodégradation du diaphag en culture continue dans un biolaveur à cellules fixées.

Figure 11. Croissance du consortium microbien en présence du diaphag (0.1 gramme/L).

Figure 12. Evolution de la biomasse du consortium microbien en culture batch en présence de diaphag (0.1 g/L).

Figure 13. Croissance du consortium sur la surface de la gélose nutritive (GN) après 24 h d'incubation à 30 °C.

Figure 14. Evolution de la biomasse du consortium microbien acclimaté en culture batch.

Figure 15. Evolution de la croissance du consortium microbien en culture batch.

Figure 16. Evolution du pH du milieu lors de la croissance du consortium microbien en culture batch.

Figure 17. Isolement du consortium incriminé dans la dégradation du diaphag sur MBS solide après 7 jours d'incubation.

Figure 18. Isolement de la souche bactérienne 1 sur Mueller Hinton après une série de repiquages.

Figure 19. Isolement de la souche bactérienne 2 sur Mueller Hinton après une série de repiquages.

Figure 20. Observation microscopique du premier type d'isolat après coloration de Gram (Gross. $\times 100$).

Figure 21. Observation microscopique du second isolat après coloration de Gram (Gross. $\times 100$).

Figure 22. Résultats de l'identification biochimique de *Serratia odorifera* à l'aide de la galerie API 20E.

Figure 23. Résultats de l'identification biochimique d'*Aeromonas hydrophila* à l'aide de la galerie API 20NE.

Figure 24. Dégradation du diaphag par *Serratia odorifera* en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d'agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Figure 25. Croissance de *Serratia odorifera* en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d'agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Figure 26. Dégradation du diaphag par *Aeromonas hydrophila* en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d'agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Figure 27. Croissance d'*Aeromonas hydrophila* en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d'agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Figure 28. Dégradation en batch du diaphag (0.5 g/L) par culture mixte (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Figure 29. Croissance de la culture mixte en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d'agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Figure 30. Formation du biofilm sur la surface des pierres ponce après deux mois du fonctionnement du réacteur.

Figure 31. Isolement de la souche bactérienne 1 sur Mueller Hinton après une série de repiquages.

Figure 32. Isolement de la souche bactérienne 2 sur Mueller Hinton après une série de repiquages.

Figure 33. Observation microscopique de la souche bactérienne 1 isolée après coloration de Gram (Gross. ×100).

Figure 34. Observation microscopique de la souche bactérienne 2 isolée après coloration de Gram (Gross. ×100).

Figure 35. Résultats de l'identification biochimique d'*Aeromonas hydrophila* à l'aide de la galerie API 20NE.

Figure 36. Résultats de l'identification biochimique de *Pseudomonas aeruginosa* à l'aide de la galerie API 20NE.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Facteurs augmentant la récalcitrance d'une molécule (Hutzinge, 1981).

Tableau 2. Exemples de concentrations de composés pharmaceutiques en ng/L, dans les eaux (eaux usées traitées, eaux de surface et eaux potables) (Kolpin *et al.*, 2002 ; Heberer *et al.*, 2004 ; Paffoni *et al.*, 2006 ; Tamtam *et al.*, 2008b ; Togola et Budzinski, 2008 ; Guo et Krasner, 2009 ; Rosal *et al.*, 2010 ; Yu et Wu, 2011 ; Al-Qaim *et al.*, 2016).

Tableau 3. Les différents types d'interactions entre les microorganismes (Grady, 1985).

Tableau 4 .Types de procédés biologiques (Martin *et al.*, 1987).

Tableau 5. Avantages et inconvénients des différents procédés biologiques (Edwards et Nirmalakhandan, 1996 ; Delhoménie et Heitz, 2005).

Tableau 6. Propriétés physico-chimiques du gliclazide (Jones *et al.*, 2002 ; Khan et Ongerth, 2004).

Tableau 7. Les propriétés écotoxiques du gliclazide (Sarkar *et al.*, 2011).

Tableau 8. Composition du milieu minéral MBS (El Aalam *et al.*, 1993).

Tableau 9. Composition élémentaire des bactéries (Penaud, 1989).

Tableau 10. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches isolées.

Tableau 11. Résultats de la lecture de la galerie biochimique API 20E pour la souche *Serratia odorifera* après 24 h d'incubation à 37 °C.

Tableau 12. Résultats de la lecture de la galerie biochimique API 20NE pour la souche *Aeromonas hydrophila* après 24 h d'incubation à 30 °C.

Tableau 13. Activités spécifiques de la culture mixte et des cultures pures.

Tableau 14. Caractéristiques et performance du biolaveur en présence d'une concentration de diaphag de 0.5 g/L (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions)

Tableau 15. Caractéristiques et performance du biolaveur en présence d'une concentration de diaphag de 1 g/L (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Tableau 16. Caractéristiques et performance du biolaveur en présence d'une concentration de diaphag de 5 g/L (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Tableau 17. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches isolées du fermenteur.

Tableau 18. Résultats de la lecture des galeries biochimiques API 20NE pour les souches isolées après 24 h d'incubation à 30°C.

NOMENCLATURE

CE50 : Concentration provoquant 50 % d'effet d'inhibition

Cl₂ : Dichlore

COD : Carbone organique dissous

COT : Carbone organique total

COV : Composés organiques volatiles

4-CP : 4-Chlorophénol

DCO : Demande chimique en oxygène

DL50 : Dose létale 50

DT50 : Demi-vie

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

H₂S : Sulfure d'hydrogène

NaCl : Chlorure de sodium

NO₂ : Dioxyde d'azote

q_{max} : Taux maximal d'élimination du substrat

SO₃H : Acide sulfonique

SO₄²⁻ : Sulfate

UV: Ultra-violet

1. INTRODUCTION

Pendant longtemps, les produits pharmaceutiques humains et vétérinaires ont été utilisés pour prévenir et guérir les maladies. Les produits pharmaceutiques sont utiles pour améliorer la santé et le bien-être des patients (Hughes *et al.*, 2017; Hale *et al.*, 2018). Cependant, des quantités significatives de produits pharmaceutiques consommés sont excrétés sous des formes inchangées ou partiellement métabolisées, atteignant l'environnement via des stations d'épuration comprenant de l'eau, du sol et des sédiments (Archana *et al.*, 2017 ; Vidal *et al.*, 2018). La contamination environnementale la plus répandue provient de l'utilisation de médicaments contre le diabète, dont le glibenclamide, la metformine, l'alpha-glucosidase et le gliclazide (Mrozik et Stefańska, 2014). En effet, avec des millions de patients diabétiques dans le monde, il existe des quantités importantes de molécules antidiabétiques utilisées pour contrôler la maladie (Goswami *et al.*, 2014), certains niveaux de ces molécules étant libérées dans l'environnement.

L'élimination des médicaments non utilisés provenant des soins médicaux humains et animales et par les usines de fabrication de produits pharmaceutiques directement dans l'environnement, constitue aussi une source importante de pollution (Heberer, 2002 ; Esplugas *et al.*, 2007 ; Trovó *et al.*, 2008 ; Mompelat *et al.*, 2009). La présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement est devenue une préoccupation croissante ces dernières années (Ratola *et al.*, 2012). Les produits pharmaceutiques sont connus pour avoir des effets potentiellement nocifs sur l'environnement et la santé publique (cancérogène, mutagène, perturbateur endocrinien) (Heberer, 2002 ; Kolpin *et al.*, 2002).

Face à ces problèmes récurrents, de nombreuses stratégies sont actuellement mises en œuvre pour la gestion et la remédiation de l'environnement contaminé par les produits pharmaceutiques. Il s'agit le plus souvent de traitements biologiques (Biofilter, biolaveur et biolaveur à cellules fixées) ou physicochimiques (adsorption sur charbon actif, filtration membranaire et procédés d'oxydation variés) (Salgado *et al.*, 2012). Les procédés physicochimiques sont, non seulement, coûteux mais produisent souvent des produits indésirables qui sont toxiques, nécessitant ainsi des actions de traitements supplémentaires (Sridevi *et al.*, 2011). Les traitements biologiques entraînent la consommation par biodégradation des substances polluantes par une biomasse capable d'utiliser le produit pharmaceutique comme source nutritive (Cheriaa *et al.*, 2012 ; Panchenko *et al.*, 2017).

L'utilisation des microorganismes est largement reconnue comme une méthodologie relativement économique, prédominante et efficace pour réaliser la dégradation des composés pharmaceutiques (Quintana *et al.*, 2005 ; Salgado *et al.*, 2012).

Afin d'être plus efficaces et fiables, les biotechnologies nécessitent des procédés adaptés. En effet, la biodégradation des produits pharmaceutiques requiert des événements spécifiques comme la présence de microorganismes adéquats et des conditions physico-chimiques favorables pour que les réactions enzymatiques aient lieu (pH, température, concentration d'oxygène). Ainsi, l'acclimatation des microorganismes devient une étape essentielle pour réaliser la biodégradation des composés xénobiotiques. Cette adaptation microbienne peut survenir à la suite de phénomènes tels que :

- l'induction d'enzyme spécifiques chez certaines souches de la communauté
- la croissance des souches capables de dégrader le substrat
- la sélection des mutants qui ont acquis de nouvelles activités métaboliques (Wiggings *et al.*, 1987 ; Rittmann & McCarty, 2001).

Le produit pharmaceutique auquel nous nous sommes intéressés dans cette étude est le diaphag. Ce médicament est une sulfonilurée de seconde génération dont le principal mode d'action est de stimuler la sécrétion d'insuline (Smith, 1990 ; Campbell *et al.*, 1991). Il est utilisé pour le traitement du diabète de type 2 et également dans la stimulation de l'expression des transporteurs de glucose (Jacobs *et al.*, 1989). Il a été détecté à une concentration allant jusqu'à 130 ng/L dans l'influent d'une station de traitement des eaux usées et jusqu'à 15 ng /L dans les eaux de surface (Al-Qaim *et al.*, 2016). A l'instar de tous les composés xénobiotiques, l'introduction de ce médicament dans l'environnement contribue sans aucun doute à sa pollution.

L'objectif de ce présent travail est de tester *in vitro* la biodégradation du diaphag utilisé dans le milieu comme seule et unique source de carbone et d'énergie. Cette recherche vise dans un premier temps à sélectionner et à isoler des microorganismes spécifiques capables de dégrader le diaphag en culture batch. Dans un deuxième temps, nous tenterons d'évaluer la biodégradation du diaphag à l'aide d'une culture mixte préalablement isolée, dans un biolaveur à cellules fixées utilisant des pierres ponce comme support. L'évolution de la culture mixte dans le temps sera également étudiée.

2. GENERALITES

2.1. Les composés xénobiotiques

2.1.1. Définition et effets sur l'environnement

Le terme xénobiotique (étranger à la vie) provient des mots grecs *xenos* : étranger et *bios* : vie. Pour les chimistes de l'environnement, xénobiotique signifie usuellement «étranger à la biosphère». Les composés xénobiotiques sont des composés qui ne sont pas synthétisés par un système enzymatique naturel, ou bien qui contiennent un groupement chimique n'existant pas dans les structures naturelles. Ils sont en majeure partie constitués de produits de synthèse (Greń, 2012).

Plus de 1000 nouveaux composés sont produits chaque année (Fewson, 1988). Dans les années quatre vingt, la production mondiale de produits chimiques synthétiques a été estimée à 300 millions de tonnes. Actuellement plus de 10 millions de composés sont décrits dans le Chemical Abstract. Les composés xénobiotiques sont répartis en plusieurs groupes (Gienfrada et Rao, 2008 ; Sinha *et al.*, 2009) :

- ✓ Les médicaments
- ✓ Les pesticides
- ✓ Les solvants
- ✓ Les carburants
- ✓ Les alcanes
- ✓ Colorants azoïques synthétiques
- ✓ Les hydrocarbures aromatiques polycycliques
- ✓ Les composés aromatiques nitrochlorés
- ✓ Les polychlorobiphényles

Produits par l'activité domestique ou industrielle, ces composés sont introduits dans l'écosystème naturel où elles seront à l'origine de conséquences plus ou moins graves (figure 1). Dans ce cas ils sont considérés comme polluants (Gienfrada et Rao, 2008). Ils peuvent alors avoir plusieurs impact sur :

- Nous pouvons mentionner le cas où la concentration du xénobiotique augmente anormalement dans l'environnement suite à un accident. Il peut alors perturber l'équilibre naturel, comme par exemple, une concentration élevée en phosphate entraînant l'eutrophisation (Barroin, 1990), la présence de sels NaCl en eau douce ou encore la présence de métaux lourds (mercure, plomb). De plus, la contamination des eaux par les antibiotiques peut inhiber l'activité des communautés bactériennes fonctionnelles et/ou produire des microorganismes résistants, causant de sérieux problèmes pour la santé publique (Bailón *et al.*, 2008).

- Ou bien encore "l'environnement non vivant" avec l'attaque des matériaux par les polluants acides de l'air, effets des fluorocarbures et des oxydes d'azote sur la couche d'ozone, impacts du dioxyde de carbone, des aérosols et de plusieurs gaz en traces sur l'effet de serre et la formation de brouillard.

- Sur l'homme avec la santé humaine (effets toxiques, carcinogènes, mutagènes, tératogènes), aussi provoque des effets psychologiques, psycho-physiologiques, sur le goût d'eau, l'odeur de l'air. Il faut noter aussi que le phénol agit comme des perturbateurs endocriniens (Nagao, 1998 ; Borgeest *et al.*, 2002). Les bêta-lactamines telle que la pénicilline G ou la méthicilline entraîne des réactions allergiques, d'autres antibiotiques sont néphrotoxiques telle que la gentamicine (Kümmerer, 2009).

- Et enfin sur les autres organismes avec des effets sur les espèces individuelles (généralement commerciales comme les poissons, oiseaux, le blé et le maïs etc.) (Ghisalba, 1983). Mimeault *et al.* (2005) ont montré que le gemfibrozil (Régulateur lipidique) s'accumule dans les poissons rouges générant des perturbations du système endocrinien. De même, les antidépresseurs, sertraline et fluoxétine, et leurs métabolites ont été retrouvés dans des poissons vivant dans des eaux recevant des eaux d'égouts (Brooks *et al.*, 2005).

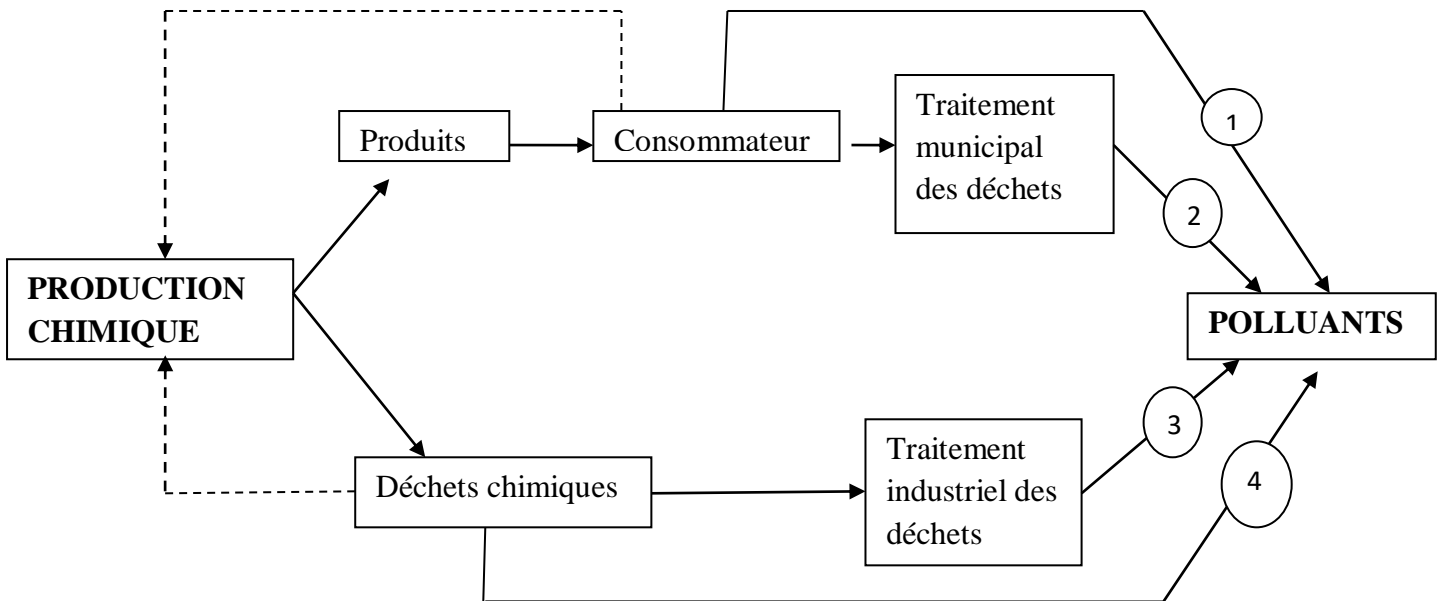


Figure 1. Origines des composés chimiques organiques retrouvés dans l'environnement (Hutzinger et Veerkamp, 1981).

(1) Produits dont l'usage contribue à leur entrée dans l'environnement (aérosols, pesticides, fertilisants).

(2) Polluants entrant dans l'environnement via les systèmes de traitement des déchets municipaux (détergents, solvants).

(3) Produits chimiques résistants à la dégradation biologique dans les systèmes de traitement des déchets industriels.

(4) Décharges directes, pertes, accidents, incidents.

2.1.2. Le devenir dans l'environnement

Le rejet dans l'environnement de solvants, de pesticides, de produits pharmaceutiques et d'agents plastifiants par les industries, l'agriculture, les activités médicales et domestiques ont engendré de sérieux problèmes de pollution (Varsha *et al.*, 2011). Introduits dans les écosystèmes terrestres ou aquatiques, les composés xénobiotiques font alors l'objet de plusieurs processus (figure 2) :

- Les composés xénobiotiques subissent une dégradation biologique (actions enzymatiques). La transformation de la structure chimique dans la nature est souvent assurée par l'activité des microorganismes. En fonction du patrimoine génétique microbien et des conditions physico-chimiques environnementales la biodégradation peut être complète ou partielle. Toutefois, il est possible qu'au cours d'une dégradation biologique, la toxicité du produit transformé soit plus importante que celle du produit de départ.
- Ou bien encore, ils peuvent subir des transformations abiotiques (action non enzymatique), qui sont d'origine physico-chimique. Ces processus correspondent l'ensemble des mécanismes abiotiques comme l'action d'agents chimiques (acides, bases, radicaux), l'adsorption, l'évaporation ou les réactions photochimiques. Cependant, ces mécanismes modifient très rarement la structure chimique de la molécule.
- Et enfin les molécules xénobiotiques peuvent résister à toute transformation dans la nature que se soit chimique ou biologique. Ils peuvent, par conséquent, s'accumuler dans les eaux superficielles ou souterraines et causer des détériorations des systèmes vivants. De tels composés sont souvent appelés non-dégradables ou récalcitrants (Leisinger, 1983).
- Il n'est possible d'affirmer que la protection de l'environnement nécessite la minéralisation complète des composés xénobiotiques dans des délais relativement faibles, afin de prévenir leur accumulation (Reshma *et al.*, 2011). Afin de réduire leur accumulation, il serait intéressant de synthétiser des molécules facilement biodégradables.

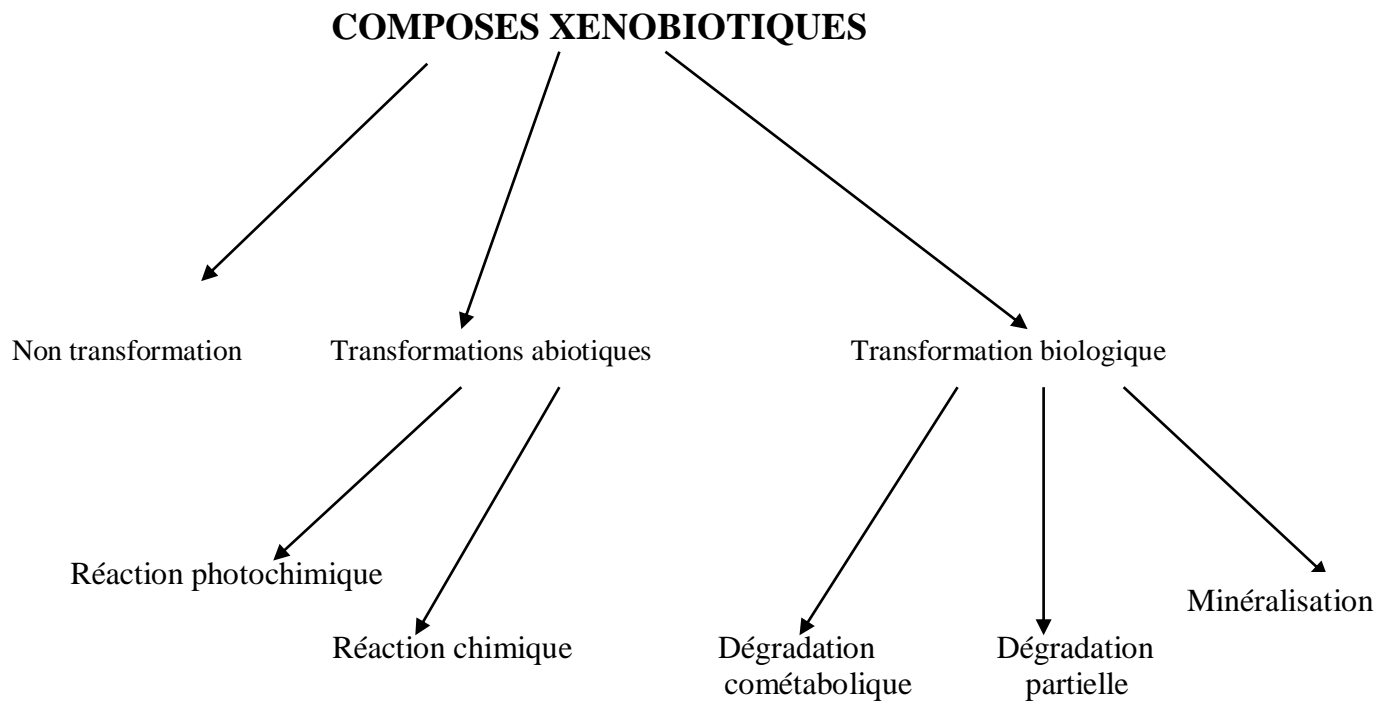


Figure 2. Devenir des composés xénobiotiques dans l'environnement (Leisinger, 1983).

2.1.3. Le mécanisme de la récalcitrance

La récalcitrance a été défini comme la résistance intrinsèque d'un composé chimique à la biodégradation (Sinha *et al.*, 2009, Abirami, 2013). Les molécules récalcitrantes ont été très étudiées (Grady, 1985 ; Janssen *et al.*, 1989 ; López *et al.*, 2002 ; Ortega-Clemente *et al.*, 2009 ; Mascolo *et al.*, 2010 ; Majeau *et al.*, 2010 ; Chapparo *et al.*, 2010 ; Jagadevan *et al.*, 2011 ; Maszenan *et al.*, 2011 ; Chan *et al.*, 2012).

En réalité, les composés récalcitrants se divisent en trois groupes (Alexander, 1973) :

- Les composés résistants à toute attaque microbienne et ne sont métabolisés sous aucune condition connue (polymères synthétiques, polyéthylène, chloropolyvinyl).
- Les composés généralement métabolisés très lentement dans la nature, mais qui peuvent être dégradés rapidement dans une culture dense de microorganismes appropriés (les pesticides).
- Les composés pouvant être dégradés par des microorganismes en culture, mais qui persistent occasionnellement (les hydrocarbures pétrochimiques).

Dans l'environnement, la dégradation des composés chimiques synthétiques est principalement due à l'activité microbienne. La connaissance des raisons de leur récalcitrance faciliterait donc la dépollution des sols et de l'eau. D'une manière générale, les causes susceptibles d'engendrer la récalcitrance d'un composé sont les suivantes (Fewson, 1988 ; Van Ginkel et Kolvenbach, 1991) :

- La concentration en substrat est soit trop élevée (toxique), soit trop faible (Goldstein *et al.*, 1985 ; Zaidi *et al.*, 1988). Boethling et Alexander (1979) expliquent que pour les concentrations trop faibles de substrat, l'énergie de réaction est libérée trop lentement pour satisfaire la demande microbienne. Ainsi les microorganismes, étant incapables de se multiplier, leur densité reste trop faible pour dégrader plus activement et de manière appréciable le composé.
- Le substrat s'adsorbe ou se lie de manière covalente à l'argile ou l'humus. Il peut aussi être physiquement inaccessible aux microorganismes (sous forme gazeuse par exemple) (Hamsavathani *et al.*, 2015).

- La température, le pH, la pO₂ (pression partielle en oxygène) ou les conditions ioniques sont inadéquats pour la réaction biochimique requise (Zaidi *et al.*, 1988 ; Leys *et al.*, 2005 ; Shahgoli et Ahangar, 2014).

- L'absence de nutriments et de cométabolites nécessaires à la croissance microbienne (Boethling et Alexander, 1979 ; Swindoll *et al.*, 1988 ; Wiggins et Alexander, 1988 ; Hindumathy et Gayathri, 2013).

- La molécule est de grande taille et insoluble, ou encore les enzymes extracellulaires susceptibles de l'attaquer font défaut (Janssen *et al.*, 1989 ; Aislabie et Lloyd-Jones, 1995 ; Esteve-Nunez *et al.*, 2001).

- L'absence des microorganismes adéquats pour cause, par exemple, de prédation, de parasitisme ou d'une faible viabilité dans le milieu.

- Le substrat (Alexander, 1994) :

- n'est pas transporté dans la cellule
- n'est pas le substrat des enzymes disponibles
- n'induit pas la synthèse d'enzymes et de facteurs de transport appropriés
- est converti en produits toxiques.

Tableau 1. Facteurs augmentant la récalcitrance d'une molécule (Hutzinger, 1981).

| Types de composés ou de substituants | Plus facilement biodégradable | Moins facilement biodégradable |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Hydrocarbures | Alkanes à faible poids moléculaire Alkanes linéaires Hydrocarbures paraffiniques | Alkanes à poids moléculaire élevé Alkanes ramifiés Hydrocarbures aromatiques |
| Substituants des noyaux aromatiques | -OH- -COOH- -NH ₂ - | -F-CL- NO ₂ - SO ₃ H |
| Composés aliphatiques chlorés | Cl branché à plus de 6 atomes de carbone du carbone terminal | Cl branché à 6 atomes ou moins du carbone terminal |

La compréhension des mécanismes de récalcitrance permettrait de modifier ces composés lors de leurs synthèses afin de faciliter leur dégradation (Balaz *et al.*, 1989). Afin de réduire les coûts de ces modifications, il serait intéressant de synthétiser directement des molécules facilement biodégradables (tableau 1).

Il n'est pas possible d'affirmer qu'une molécule considérée actuellement comme étant récalcitrante le restera toujours. En effet, ces composés ont un passé trop récent par rapport aux microorganismes pour pouvoir être définitivement classés comme étant récalcitrants. De nombreux composés considérés comme récalcitrants il y a quelques années sont maintenant facilement biodégradables (Cook *et al.*, 1983). Ceci démontre les facultés d'adaptation des microorganismes au cours du temps (que ce soit par mutation spontanée, ou par échange de matériel génétique au sein d'une communauté microbienne) (Greń, 2012).

2.1.4. Problématique des composés pharmaceutiques dans l'environnement

2.1.4.1. Les produits pharmaceutiques

Le terme «produits pharmaceutiques» couvre une classe complexe des composés largement utilisés. Actuellement des milliers de molécules actives sont utilisées pour traiter ou pour prévenir les maladies. Chaque année des centaines de nouvelles molécules synthétisées remplacent les composés obsolètes (Zuccato *et al.*, 2005).

La notion de médicament est précisément définie en France par l'article L5111-1 du code de la santé publique : On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. Sont notamment considérés comme des médicaments les produits diététiques qui renferment dans leur composition des substances chimiques ou biologiques ne constituant pas elles-mêmes des aliments, mais dont la présence confère à ces produits, soit des propriétés spéciales recherchées en thérapeutique diététique, soit des propriétés de repas d'épreuve. Les produits utilisés pour la désinfection des locaux et pour la prothèse dentaire ne sont pas considérés comme des médicaments. Lorsque, eu égard à l'ensemble de ses caractéristiques, un produit est susceptible de répondre à la fois à la définition du médicament prévue au premier alinéa et à celle d'autres catégories de produits régies par le droit communautaire ou national, il est, en cas de doute, considéré comme un médicament.

Dans la pratique, les médicaments peuvent être fabriqués par différents laboratoires. Ils portent alors un nom différent bien qu'ils contiennent la même substance dite « matière active » ou « principe actif ». C'est cette dernière qui est responsable des propriétés pharmacologiques du médicament, et c'est cette molécule chimique qui est étudiée lorsque sont mises en œuvre des analyses chimiques pour observer la contamination de l'environnement. On emploie alors le terme de « molécules pharmaceutiques » plutôt que celui de médicaments.

Les produits pharmaceutiques, qui sont conçus pour être des substances biologiquement actives, peuvent aussi être source de préoccupation par leurs interactions possibles avec les organismes non ciblés dans l'environnement mais aussi pour les humains (Klavarioti *et al.*, 2009 ; Isidori *et al.*, 2009). Ils sont généralement lipophiles et résistants à la biodégradation, ayant ainsi le potentiel d'accumulation et de persistance dans l'environnement (Klavarioti *et al.*, 2009).

En outre, les produits pharmaceutiques peuvent être stables dans l'environnement ou soumis à des transformations biotiques et/ou abiotiques, et parmi les transformations abiotiques, la photodégradation est le processus d'élimination le plus important, ce qui conduit parfois à la formation de produits beaucoup plus toxiques que les composés parentaux (Isidori *et al.*, 2009).

2.1.4.2. Présence dans l'environnement

Les produits pharmaceutiques en tant que contaminants dans l'environnement n'ont pas reçu une attention immédiate de la part de la communauté scientifique et des autorités. Il aura fallu attendre qu'un lien ait pu être établi entre la présence d'éthinylœstradiol et la présence d'effets délétères chez des populations de poissons (Jobling, 2004 ; Kim *et al.*, 2007) pour que la problématique des rejets de composés pharmaceutiques soit prise en considération. En parallèle, les progrès des techniques analytiques physico-chimiques ont permis la détection de traces de substances médicamenteuses et de leurs dérivés ou métabolites à l'échelle mondiale. Leur présence a été mise en évidence dans :

- Les rejets industriels (industrie pharmaceutique) : Larsson *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2008c ; Phillips *et al.*, 2010.
- Les eaux usées des centres de soin (hôpitaux, maison de retraite, hôpitaux psychiatriques) : Steger-Hartmann *et al.*, 1996 ; Kümmerer *et al.*, 1997 ; Steger-Hartmann *et al.*, 1997 ; Hartmann *et al.*, 1998 ; Lindberg *et al.*, 2004 ; Gómez *et al.*, 2006 ; Mahnik *et al.*, 2007 ; Catastini *et al.*, 2009 ; Mullot, 2009 ; Watkinson *et al.*, 2009 ; Chang *et al.*, 2010.

- Les eaux usées brutes et traitées (entrée et/ou sortie de station d'épuration) : Steger-Hartmann *et al.*, 1996 ; Kümmerer *et al.*, 1997 ; Ternes, 1998 ; Hirsch *et al.*, 1999 ; Golet *et al.*, 2001 ; Sedlak et Pinkston, 2001 ; Golet *et al.*, 2002a ; Andrezzi *et al.*, 2003 ; Huggett *et al.*, 2003 ; Ferrari *et al.*, 2004 ; Huschek *et al.*, 2004 ; Wiegel *et al.*, 2004 ; Bendz *et al.*, 2005 ; Cha *et al.*, 2006 ; Gagne *et al.*, 2006 ; Gros *et al.*, 2006 ; Pomati *et al.*, 2006 ; Vieno *et al.*, 2006 ; Piram *et al.*, 2008 ; Coetsier *et al.*, 2009 ; Watkinson *et al.*, 2009 ; Chang *et al.*, 2010 ; Gabet-Giraud *et al.*, 2010 ; Nieto *et al.*, 2010a ; Prasse *et al.*, 2010.

- Les boues de station d'épuration : Golet *et al.*, 2002b ; Lindberg *et al.*, 2005 ; Thomas *et al.*, 2007 ; Díaz-Cruz *et al.*, 2009 ; Jelić *et al.*, 2009 ; Nieto *et al.*, 2010b.

- Les effluents d'élevages (lisiers, fumiers, etc.) : Hamscher *et al.*, 2002 ; Pierini *et al.*, 2004 ; Martínez-Carballo *et al.*, 2007 .

- Le sol après épandage des boues de station d'épuration ou des déchets d'élevage : Golet *et al.*, 2002b ; Hamscher *et al.*, 2002 ; Jacobsen *et al.*, 2004 ; Martínez-Carballo *et al.*, 2007 ; Kemper *et al.*, 2008 ; Weiss *et al.*, 2008 ; Homem et Santos, 2011.

- Sédiments : Zuccato *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2010a.

Les eaux de lessivage des sols enrichis avec les boues de station d'épuration ou les déchets d'élevage (lixiviat) : Kemper, 2008 ; Weiss *et al.*, 2008.

- Les eaux de surface (ruisseau, rivière, fleuve, lac, estuaire, mer, océan) : Buser *et al.*, 1998 ; Ternes, 1998 ; Hirsch *et al.*, 1999 ; Zuccato *et al.*, 2000 ; Lindsey *et al.*, 2001 ; Golet *et al.*, 2002a ; Kolpin *et al.*, 2002 ; Weigel *et al.*, 2002 ; Calamari *et al.*, 2003 ; Ashton *et al.*, 2004 ; Stackelberg *et al.*, 2004 ; Bendz *et al.*, 2005 ; Cha *et al.*, 2006 ; Hao *et al.*, 2006 ; Pomati *et al.*, 2006 ; Vieno *et al.*, 2006 ; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2007 ; Focazio *et al.*, 2008 ; Nageswararao *et al.*, 2008 ; Tamtam *et al.*, 2008a ; Vulliet *et al.*, 2009 ; Watkinson *et al.*, 2009 ; Chang *et al.*, 2010 ; Prasse *et al.*, 2010 ; Palaniyappan *et al.*, 2013. Gros *et al.* (2010) ont constaté la présence d'une quarantaine de produits pharmaceutiques au long du bassin fluvial Ebro au nord-est de l'Espagne. Markiewicz *et al.* (2017b), quant à eux, ont détecté la présence d'antidiabétiques oraux dans les eaux de surface.

- Les eaux souterraines : Zuccato *et al.*, 2000 ; Kümmerer, 2001 ; Heberer, 2002 ; Ferrari *et al.*, 2003 ; Carlsson *et al.*, 2006 ; Gros *et al.*, 2006.

- Les eaux potables (en sortie de station de potabilisation, eau du robinet, eau embouteillée) : Zuccato *et al.*, 2000 ; Heberer, 2002 ; Reddersen *et al.*, 2002 ; Wenzel *et al.*, 2003 ; Stackelberg *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2006 ; Stackelberg *et al.*, 2007 ; Ye *et al.*, 2007 ; Zuehlke *et al.*, 2007 ; Togola et Budzinski, 2008 ; Garcia-Ac *et al.*, 2009 ; Vulliet *et al.*, 2009 ; Watkinson *et al.*, 2009 ; Yiruhan *et al.*, 2010.

- Les animaux (traités ou non) : poissons (Dasenaki et Thomaidis, 2010), crevettes (Furusawa, 2008), vautours (Oaks *et al.*, 2004).

- Les plantes : Hu *et al.*, 2010.

- La nourriture suite aux traitements des animaux (antibiotiques) : lait bovin (Keever *et al.*, 1998) ; muscles et lait bovins (Becker *et al.*, 2004), miel (Hammel *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, plus de 300 produits pharmaceutiques de différentes classes thérapeutiques (antibiotiques, des analgésiques, des anti-inflammatoires, des normolipémiants, des antihypertenseurs, des agents de contraste, anticancéreux, antidiabétiques, etc.) sont retrouvés dans l'environnement (Ternes, 2001). Ces résidus s'ajoutent aux nombreuses substances non médicamenteuses liées aux activités humaines et également présentes dans l'environnement, telles que les produits phytosanitaires, détergents, hydrocarbures, métaux, etc. (Heberer, 2002 ; Gros *et al.*, 2006).

D'une manière générale, les concentrations en produits pharmaceutiques retrouvées dans l'environnement varient d'un composé à l'autre, mais également d'un site à l'autre. Les concentrations rapportées dans les effluents de stations d'épuration ou dans l'eau de surface vont de quelques nano-grammes par litre à quelques centaines de microgrammes par litre (tableau 2). Les différences régionales d'utilisation des médicaments ainsi que la biodégradabilité des produits pharmaceutiques et de leurs métabolites pourraient expliquer ces différences de concentrations retrouvées dans l'environnement (Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

Tableau 2. Exemples de concentrations de composés pharmaceutiques en ng/L, dans les eaux (eaux usées traitées, eaux de surface et eaux potables) (Kolpin *et al.*, 2002 ; Heberer *et al.*, 2004 ; Paffoni *et al.*, 2006 ; Tamtam *et al.*, 2008b ; Togola et Budzinski, 2008 ; Guo et Krasner, 2009 ; Rosal *et al.*, 2010 ; Yu et Wu, 2011 ; Al-Qaim *et al.*, 2016).

| Produits pharmaceutiques | Concentration dans l'eau usée traitée (ng/L) | Concentration dans l'eau de surface (ng/L) | Concentration dans l'eau potable (ng/L) | Pays |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|------------|
| Antibiotiques | | | | |
| Tétracycline | 66 | | | France |
| | | 110 | | États-Unis |
| Sulfaméthoxazole | 205 | 21 | | France |
| | | 544 | | États-Unis |
| | | 1900 | | États-Unis |
| Des analgésiques et anti-inflammatoires | | | | |
| Paracétamol | 11308 | 72.3 | 210 | France |
| | 180 | 10000 | | États-Unis |
| Ibuprofène | 219 | 4.5 | 0.6 | France |
| | 60 | 1000 | | États-Unis |
| | | | 8.5 | Finlande |
| Des normolipémiants | | | | |
| Gemfibrozil | 17.2 | 2.3 | | France |
| | 650 | 790 | | États-Unis |
| Bézafibrate | 840 | 48 | | France |
| | 280 | | | Espagne |
| Des antihypertenseurs et β-bloquants | | | | |
| Aténolol | 570 | 36 | | France |
| | 2438 | | | Espagne |
| Des antiépileptiques | | | | |
| Primidone | 95 | | | États-Unis |
| | | 635 | 40 | Allemand |
| Carbamazépine | 293 | 80 | 43.2 | France |
| | | | 258 | États-Unis |
| Des antidiabétiques | | | | |
| Gliclazide | 130 | 15 | | Malaisie |

2.1.4.3. Source de pollution de l'environnement par les produits pharmaceutiques

La pollution de l'environnement par les produits pharmaceutiques proviendrait principalement des effluents domestiques et également des effluents hospitaliers ou encore les usines de fabrication et de conditionnement des médicaments (Besse et Garric, 2007). On peut toutefois noter que la situation est très inégale selon les pays et qu'elle dépend de leur développement socioéconomique, de l'accès de leurs populations aux soins ou encore de leurs réglementations.

Les principales sources de pollution de l'environnement par les produits pharmaceutiques sont : les sources diffuses issues principalement des excréctions humaines et animales, et représentant la plus grande partie des médicaments rejetés dans l'environnement, et les sources ponctuelles qui sont à l'origine d'émissions beaucoup plus concentrées mais limitées sur le plan géographique. On retrouve, parmi les sources diffuses :

- le stockage et l'élimination inappropriés des médicaments périmés ou inutilisés (Zuccato *et al.*, 2000),

- l'excrétion métabolique par la voie urinaire ou digestive, des médicaments consommés par les hommes et les animaux (Halling-Sorensen *et al.*, 1998 ; Zuccato *et al.*, 2000),

et parmi, les sources ponctuelles :

- le rejet direct des médicaments (et des produits chimiques utilisés au cours de la fabrication des médicaments) dans les eaux résiduaires des industries pharmaceutiques et chimiques fines (Zuccato *et al.*, 2000),

- l'élimination directe ou indirecte des agents pharmaceutiques utilisés dans les établissements de soins (laboratoires, hôpitaux, etc.),

- la dispersion directe des médicaments vétérinaires dans l'environnement en aquaculture ou lors de traitement des animaux d'élevage, ou la dispersion indirecte en cas d'épandage des lisiers et des purins dans les sols destinés à l'agriculture,

- la dispersion directe des molécules thérapeutiques sous formes de compléments alimentaires versées directement dans les bassins de pisciculture (Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

La figure 3 présente les voies possibles de la présence des produits pharmaceutiques dans l'environnement aquatique susceptible de contaminer à terme les eaux de boisson.

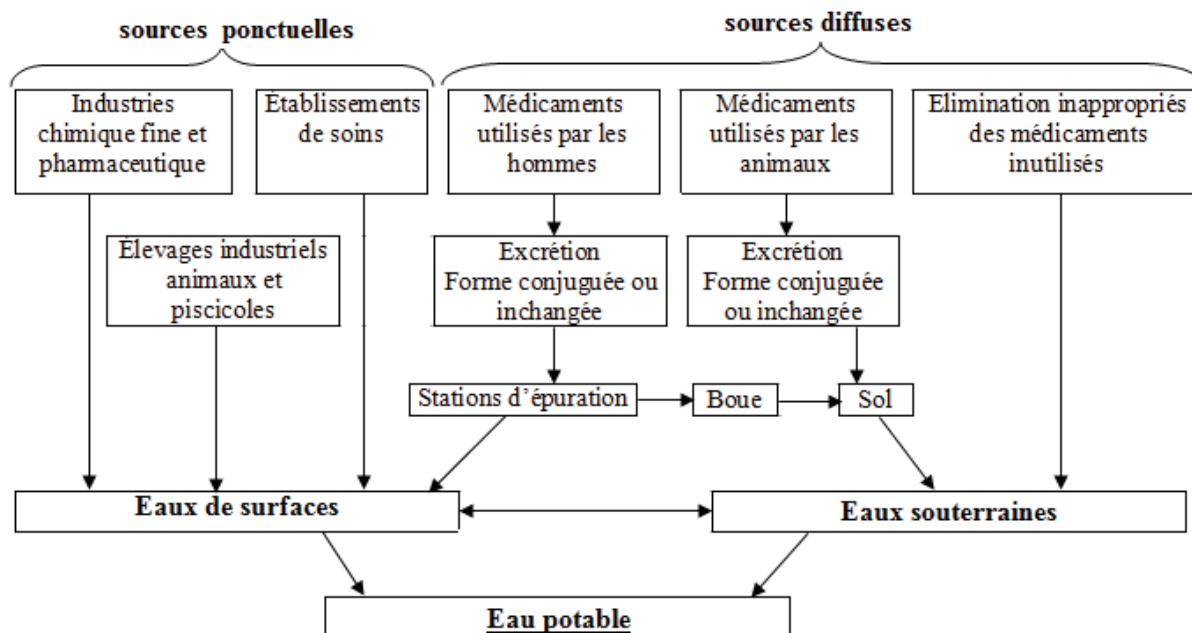


Figure 3. Sources de pollution de l'environnement aquatique par les produits pharmaceutiques (Soufan, 2011).

Parmi ces sources de micropollution, l'excrétion métabolique constitue la cause principale de pollution des eaux. En effet, même si l'élimination de médicaments sous forme inchangée ou sous forme de métabolites actifs est minoritaire, celle sous forme de métabolites conjugués ou très peu modifiés pouvant être ultérieurement hydrolysés dans l'environnement pour redonner la molécule initiale rentre en compte dans la pollution. Ils constituent par conséquent, une source indirecte de libération de médicaments dans l'environnement (Benz *et al.*, 2005).

Pour un certain nombre de produits pharmaceutiques, le rejet dans l'environnement s'effectue *via* les stations d'épuration. Dans de nombreux sites en effet, les produits pharmaceutiques ont été détectés dans les effluents d'eaux usées traitées à des concentrations de l'ordre de quelques nano-grammes par litre à quelques centaines de microgrammes par litre. L'élimination de nombreux de ces produits au cours de traitement des eaux usées est

donc incomplète. Au sein des stations d'épuration, en plus de l'adsorption possible sur les boues et les sédiments, la principale étape d'élimination des polluants organiques pharmaceutiques semble être la biodégradation (Joss *et al.*, 2006). Toutefois, comme les produits pharmaceutiques peuvent posséder des propriétés physicochimiques très différentes, d'autres voies d'élimination (volatilisation, photo-transformation, ...) peuvent être observées dans les stations d'épuration. Les concentrations des composés pharmaceutiques dans l'eau de sortie de stations d'épuration dépendent donc des concentrations en entrée et des technologies utilisées dans ces stations.

2.1.4.4. Risques liés à la présence des composés pharmaceutiques dans l'environnement

Les substances médicamenteuses sont spécifiquement conçues pour avoir des effets biologiques (pharmacologiques). Bien que ces substances soient retrouvées dans l'environnement aquatiques à de très faibles concentrations et bien en-dessous des doses thérapeutiques utilisées (Hirsch *et al.*, 1999 ; Stumpf *et al.*, 1999 ; Zuccato *et al.*, 2000), elles sont souvent persistantes. De plus elles ont souvent un caractère lipophile leur permettant de se bioaccumuler, et apparaissent suffisantes pour pouvoir engendrer des effets néfastes sur les écosystèmes aquatiques et la santé humaine *via* les eaux de boisson par exemple (Daughton et Ternes, 1999 ; Jorgensen et Halling-Sorensen, 2000 ; Hernando *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2008 ; Rowney *et al.*, 2009 ; Zegura *et al.*, 2009).

Toutefois, plusieurs études ont révélé des cas de féminisation de certains poissons dans les eaux douces et les milieux marins. Ces phénomènes de perturbation du système endocrinien pourraient provenir de l'exposition de certains poissons à des hormones de synthèse féminines (Schlenk, 2008). Ils comprennent des phénomènes d'induction de vitellogénine, et/ou de synthèse de protéines chorioniques chez des animaux mâles ou immatures, ainsi que des modifications pathologiques au sein des organes de reproduction (comme les testicules, les ovules) ou la réduction de la motilité ou du nombre de spermatozoïdes (Lye *et al.*, 1997 ; Lye *et al.*, 1998 ; Lye *et al.*, 1999). Par exemple, en Australie, une réduction de la taille du gonopode de Mosquitofish mâles, exposés à des effluents d'eaux usées, a été observée (Batty et Lim, 1999). De même, aux Etats-Unis, des cas d'intersexualité caractérisés par des phénomènes de testis-ova ont été relevés chez des Esturgeons, exposés à des composés organochlorés (Harshbarger *et al.*, 2000).

De plus, l'exposition des bactéries à des résidus d'antibiotiques pourraient générer l'apparition de phénomènes de résistance bactérienne aux antibiotiques (Amenu, 2014). En

effet, des bactéries résistantes aux antibiotiques ont été détectées dans plusieurs sources d'eaux usées et eaux usées traitées. Par exemple, Alcaide et Garay (1984), ont étudié la résistance à plusieurs antibiotiques (tétracycline, ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, kanamycine et amoxicilline) de 865 espèces de *Salmonelle*, isolées à partir de différentes sources d'eau. Ces auteurs ont montré dans leur travail que, 12.7 % des bactéries étaient résistantes à un ou plusieurs composés. Parmi ces bactéries, 63.4 % étaient multi-résistantes. De même, dans une autre étude, effectuée par Guardabassi *et al.* (1999), une augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les eaux usées prélevées d'amont en aval d'un point de rejet d'usine de fabrication de produits pharmaceutiques a été mise en évidence.

Concernant l'homme, le risque d'exposition aux substances pharmaceutiques est lié à la consommation des eaux de boisson. Budzinski et Togola (2006) ont révélé que la présence d'antidépresseurs et de psychotropes dans l'eau potable pouvait activer l'expression de gènes associés à l'autisme. Leur consommation ayant augmenté de façon spectaculaire ces 25 dernières années, des scientifiques américains ont cherché à savoir si les faibles concentrations retrouvées dans l'eau potable pouvaient affecter le développement du fœtus. Ils ont ainsi exposé des poissons d'eau douce à un mélange d'antiépileptiques et d'antidépresseurs à de très faibles doses pendant 18 jours. À l'issue de cette expérience, ils ont constaté que pas moins de 324 gènes, associés à l'autisme humain, avaient été altérés par ces petites doses de médicaments. Les poissons exposés avaient aussi tendance à paniquer et se comportaient différemment de ceux non exposés. Un autre risque pour l'homme est l'ingestion de résidus d'antibiotiques par les poissons et coquillages commercialisés avec le risque de perturber la flore intestinale normale (McDermot *et al.*, 2002 ; Greenless, 2003; Cabello, 2004 ; Salyers *et al.*, 2004) . Cette ingestion concerne aussi les viandes et peut aussi générer des problèmes d'allergie et de toxicité qui sont difficiles à diagnostiquer (Alderman et Hastings., 1998; Cabello, 2004; Cabello, 2006). Un des problèmes posés est celui de la sécurité alimentaire car il peut se produire une colonisation du tube digestif humain par des bactéries résistantes aux certains antibiotiques. Le danger principal est bien la sélection des bactéries résistantes susceptibles de se transmettre à l'homme par l'alimentation ou du transfert des gènes de résistance, comme en témoignant les décès observés au Danemark avec une souche de *S. typhimurium* DT104 provenant d'une viande de porc contaminée ou l'épidémie d'infections à *Campylobacter* résistants aux quinolones aux Etats-Unis (Haguenoer, 2010). Cette nocivité indirecte a déjà eu pour conséquence une restriction drastique de l'utilisation des antibiotiques en aquaculture dans de nombreux pays (Haguenoer, 2010).

2.2. La biodégradation des composés xénobiotiques

2.2.1. Le rôle des microorganismes

2.2.1.1. Généralités :

La biodégradation est le processus naturel d'élimination des composés xénobiotiques de l'environnement par les microorganismes (Singh, 2008). Ce procédé biologique, dont les microorganismes sont le moteur, a été utilisé efficacement pour le traitement du sol, de l'eau et de l'air. De nombreux travaux ont été réalisés sur la biodégradation des composés xénobiotiques (Austin *et al.*, 1977 ; Chaudhry et Chapalamadugu, 1991 ; Zhang et Bennet, 2005 ; Chatterjee *et al.*, 2008 ; Chauhan *et al.*, 2008 ; Prescott *et al.*, 2008).

Le terme de biodégradation définit les mécanismes biologiques transformant un composé organique en un autre de structure différente (Grady, 1985). Ce procédé peut donc convertir un composé inoffensif en composé toxique, changer une substance immédiatement métabolisable en substance difficile à détruire ou altérer la toxicité du composé (Tropel et Van der Meer, 2004 ; Chowdhury *et al.*, 2008 ; Varsha *et al.*, 2011).

Cependant, lorsqu'on dit qu'un composé est biodégradable, cela signifie habituellement qu'il peut être minéralisé (transformation en dioxyde de carbone et eau). La biodégradation primaire, quant à elle, est utilisée pour indiquer une simple transformation alors que le terme de biodégradation partielle signifie n'importe quelle transformation entre la biodégradation primaire et la minéralisation (Labrecque, 2003).

Les microorganismes ont besoin de nutriments, de carbone et d'énergie pour se développer. Certains microorganismes ne sont pas capables de synthétiser quelques produits très importants pour leur métabolisme, ceux-ci doivent alors exister dans leur proche environnement. Les microorganismes les plus couramment utilisés dans les procédés biologiques sont les bactéries (Tropel et Van der Meer, 2004).

La biodégradation des composés xénobiotiques peut être aérobie ou anaérobie. Parmi les bactéries aérobies reconnues pour leur pouvoir de dégradation, nous pouvons citer celles appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* et *Micrococcus*. Pour les bactéries anaérobies, nous pouvons citer *Pelatomaculum*, *Desulfotomaculum*, *Syntrophobacter* et *Methanospirillum* (Gibson et Harwood, 2002 ; Chowdhury *et al.*, 2008).

2.2.1.2. Acclimatation des microorganismes aux composés xénobiotiques

L'acclimatation des microorganismes aux composés xénobiotiques est le premier problème à résoudre dans le processus de biodégradation. L'isolement des microorganismes adaptés présentant des capacités de dégradation requises est généralement précédé par une période d'acclimatation. L'acclimatation est généralement réalisée par un enrichissement en culture batch ou continu (Cook *et al.*, 1983 ; Grady, 1985).

L'acclimatation est l'intervalle de temps pendant lequel la biodégradation d'une molécule n'est pas détectée (figure 4). Pendant cette période il va se produire, chez les microorganismes, des ajustements physiologiques, morphologiques ou/et génétiques aux nouvelles conditions environnementales. Ceci laisse les micro-organismes plus aptes à se développer sous le nouvel environnement (Kim et Maier, 1986 ; Wiggins *et al.*, 1987 ; Wiggins et Alexander, 1988).

La durée de cette phase peut varier de quelques heures à plusieurs semaines, voire quelques mois et va dépendre de la nature et concentration du polluant (Hickman et Novak, 1984 ; Kim et Maier, 1986 ; Aelion *et al.*, 1989).

L'utilisation de constantes cinétiques pour prédire la concentration d'un composé dans un environnement et le temps d'exposition des populations potentiellement affectées, peut donner de faux résultats si la phase d'acclimatation n'a pas été prise en compte (Robertson et Button, 1987).

Plusieurs mécanismes ont lieu durant l'acclimatation :

- ❖ Stephenson *et al.* (1984) ont proposé que le temps d'acclimatation corresponde à l'induction enzymatique. Les enzymes peuvent être divisées en deux groupes selon leur présence ou leur apparition chez les micro-organismes : celles qui sont présentes en permanence dans la cellule sont appelées constitutives, et celles synthétisées lors de la présence d'un substrat sont appelées enzymes inductives. Ainsi, la phase d'acclimatation a été aussi nommée phase d'induction (Pitter et Chudoba, 1990).
- ❖ Des changements dans les caractéristiques génétiques ou des mutations ont été associés à certains phénomènes d'acclimatation (Subba-Rao *et al.*, 1982 ; Schmidt *et al.*, 1983). L'acclimatation peut être phénotypique ou génotypique. Dans le premier cas, l'information génétique dans la cellule reste inchangée ; seulement le degré

d'expression des gènes est altéré. Dans le processus génotypique il y a des modifications génétiques et les gènes modifiés sont transmis aux cellules filles.

Les changements dus à la mutation induite sont fréquemment associés aux longues périodes d'acclimatation. Néanmoins, l'échange des matériaux extrachromosomiques (plasmides) a été décrit comme un mécanisme relativement rapide (Reineke et Knackmuss, 1979). Fujita *et al.* (1991) ont montré que quelques espèces manipulées génétiquement présentaient une activité de dégradation supérieure à celle développée par des espèces banales.

- ❖ D'autres explications possibles pour la phase d'acclimatation font appel au manque de nutriments inorganiques suffisants (Lewis *et al.*, 1986 ; Jones et Alexander, 1988). Pitter et chudoba (1990) ont signalé l'effet du dioxyde du carbone sur la durée de la phase d'acclimatation. Les bactéries hétérotrophes ont la possibilité de fixer le CO₂. Celui-ci sert à la construction des unités utilisées lors de la biosynthèse et comme unité constructrice pendant la synthèse de molécules plus complexes (purines, pyrimides, acides aminés,...). Ainsi le CO₂ étant un nutriment essentiel pour les micro-organismes hétérotrophes, il doit absolument être présent aux concentrations requises dans le milieu de culture.

L'effet du CO₂ sur la durée de la phase d'acclimatation augmente avec la réduction de la concentration de l'inoculum. En effet, aux faibles concentrations d'inoculum la quantité de CO₂ produite par la respiration endogène est très faible. Aux fortes concentrations d'inoculum une quantité suffisante de CO₂ est produite et donc la croissance bactérienne et l'élimination du substrat ne sont pas affectées.

L'acclimatation a été aussi expliquée par des processus tels que :

- ❖ L'utilisation préférentielle d'autres composés organiques avant que le composé chimique d'intérêt ne soit dégradé, comme le montre la figure 5 (Kim et Maier, 1986 ; Wiggins et Alexander, 1988 ; Aelion *et al.*, 1989).
- ❖ L'adaptation des micro-organismes aux toxines ou à la destruction des inhibiteurs présents dans l'environnement.
- ❖ La perturbation de la croissance des organismes responsables de la dégradation par la prédation due aux protozoaires (Alexander, 1981).

Un autre mécanisme explique la phase d'acclimatation comme le temps nécessaire pour la multiplication d'une population initialement faible d'organismes actifs (Ventullo et Larson, 1986 ; Wiggins *et al.*, 1987).

Quand les micro-organismes acclimatés sont soumis aux différents environnements et/ou substrats, ils ont tendance à s'acclimater au nouvel environnement. Simultanément à l'acclimatation aux nouvelles conditions, il se produit quelque fois la disparition ou la perte de l'habilité des micro-organismes à se développer sous les conditions précédentes. Le temps nécessaire pour la «désacclimatation» varie selon le type de micro-organisme, le facteur responsable de l'acclimatation initiale et le type d'acclimatation (Senthilnathan et Ganczarczyk, 1988).

L'acclimatation phénotypique est temporaire et peut être perdue rapidement quand le facteur d'induction est éliminé. Arbuckle et Kennedy (1989) ont trouvé que les boues activées acclimatées à la dégradation des composés phénoliques, perdaient leur aptitude dégradante quand elles ont été privées du substrat auquel elles avaient été acclimatées. Chudoba *et al.* (1986), en travaillant avec un système en semicontinu ont observé, pendant la phase endogène de la dégradation, une augmentation suivie d'une diminution du taux maximal d'élimination du substrat, q_{\max} . Ils ont expliqué l'augmentation de q_{\max} par la multiplication des organismes, et la diminution par une inactivation des enzymes due à une longue absence du substrat exogène.

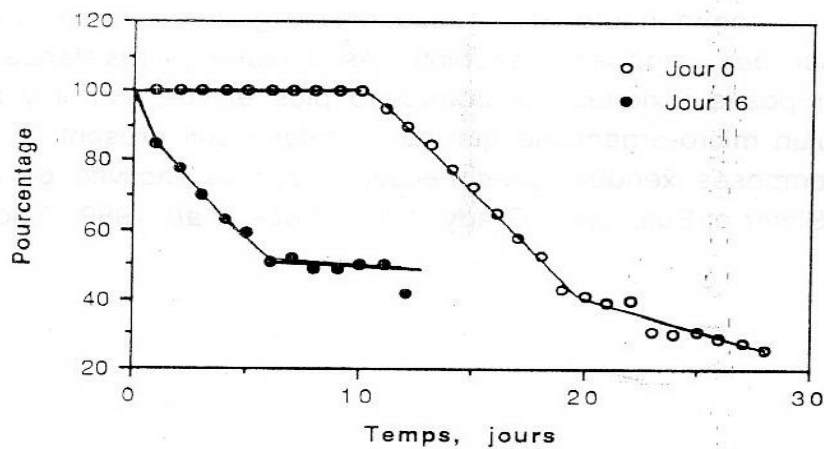


Figure 4. Influence de l'acclimatation sur la minéralisation de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique par un inoculum non acclimaté (jour 0) ou acclimaté (jour 16), d'après Wiggins *et al.*, 1987.

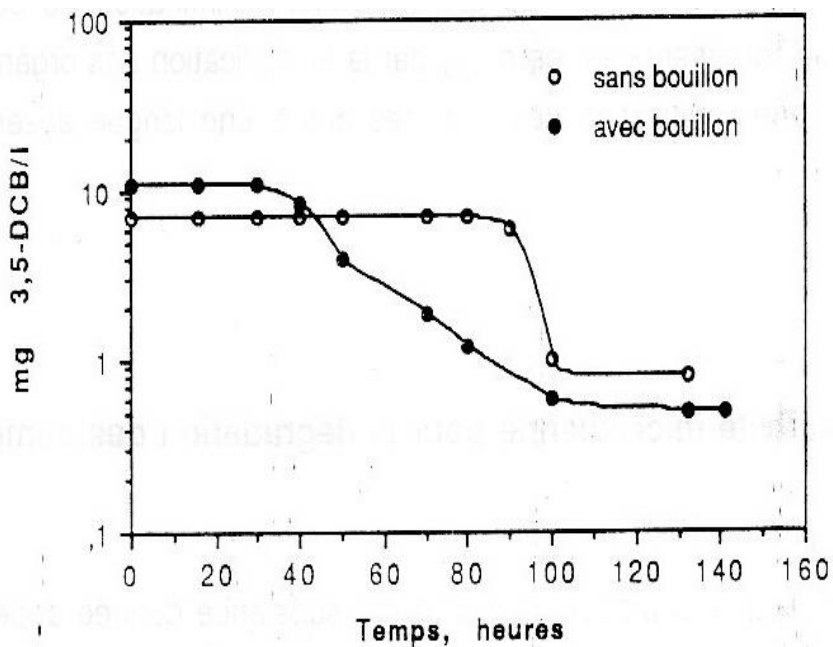


Figure 5. Effet du bouillon de culture sur l'élimination du 3,5-dichlorobenzoate par une culture acclimatée (Kim et Maier, 1986).

2.2.1.3. Le métabolisme fortuit

Dans ce type de métabolisme, le composé chimique supporte la croissance et sert comme source de carbone et d'énergie aux microorganismes (Bending et Rodríguez-Cruz 2007).

Le succès de ce type de métabolisme dépend entre autre de la capacité du composé à induire la synthèse de l'enzyme requise. On met souvent l'emphase sur la spécificité des enzymes comme catalyseurs. Cependant, il n'est pas rare pour les enzymes de se lier à des substrats contenant des groupements fonctionnels xénobiotiques analogues aux substrats naturels. Cela dépend du degré de similarité de la structure entre le composé xénobiotique et le substrat naturel (Alexander, 1973). Si le composé xénobiotique est incapable d'induire l'enzyme nécessaire, alors la biodégradation se produira seulement en présence de l'inducteur naturel. Cela peut sévèrement limiter les applications de la capacité enzymatique.

Pour que les microorganismes d'une seule espèce effectuent continuellement la dégradation du composé organique en tant que seule source de carbone et d'énergie, ils doivent être absolument en mesure de soutirer cette énergie. S'ils en sont incapables, ils ne pourront pas maintenir leur intégrité cellulaire causant ainsi la mort éventuelle de la culture. Dans cette situation, la seule façon pour que les microorganismes puissent dégrader constamment le composé xénobiotique est l'utilisation d'une source additionnelle de carbone, ajoutée au milieu ou l'action d'autres organismes dans une communauté mixte (Aislabie et Lloyd-Jones, 1995).

2.2.2. Importance des cultures mixtes

2.2.2.1. Les interactions entre les microorganismes

La dégradation d'un composé xénobiotique et à priori sa dégradation complète est souvent réalisée par une population mixte de microorganismes (Feinberg *et al.*, 1980 ; Slater, 1981 ; Slater et Bull, 1982 ; Slater et Lovah, 1982 ; Grady, 1985 ; Kilpi *et al.*, 1988).

Parmi les interactions possibles entre microorganismes on peut trouver la compétition pour un même substrat, mais aussi le mutualisme avec par exemple la dégradation du parathion (Daughton et Hsieh, 1977), ou le commensalisme lors de la dégradation du dalapon (Senior *et al.*, 1976).

Le tableau 3, montre les différents types d'interactions pouvant exister entre différents microorganismes.

Tableau 3. Les différents types d'interactions entre les microorganismes (Grady, 1985).

| | | Effet de l'organisme A sur l'organisme B | | |
|------------------------------------------|---------|------------------------------------------|---------------|--------------------------|
| | | Positif | Nul | Négatif |
| Effet de l'organisme B sur l'organisme A | Positif | Mutualisme | Commensalisme | Parasitisme et prédation |
| | Nul | Commensalisme | Neutralisme | Amensalisme |
| | Négatif | Parasitisme et prédation | Amensalisme | Compétition |

2.2.2.2. Le rôle des cultures mixtes dans la biodégradation

Les cultures mixtes semblent plus performantes vis-à-vis de la dégradation des composés xénobiotiques que les cultures pures. Ce phénomène semble avoir plusieurs causes. Les microorganismes en culture mixte s'adaptent mieux dans l'écosystème, lequel est sujet à de multiples variations (Slater et Bull, 1982). Dans une culture pure, l'adaptation ne peut provenir que d'une mutation (or les mutations sont rares, et celles ayant un effet bénéfique encore plus). Les cultures mixtes possèdent par contre un pool génétique plus grand et donc peuvent réaliser un plus grand nombre de réactions enzymatiques (Alexander, 1981). Enfin, la minéralisation des composés xénobiotiques nécessite parfois l'activité concertée d'espèces multiples (Slater et Bull, 1982 ; Grady, 1985 ; Block *et al.*, 1989 ; Thouand, 1993)

Divers composés xénobiotiques sont dégradés par l'activité de plusieurs microorganismes. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer la minéralisation complète du dodécylcyclohexane par l'attaque synergique de deux bactéries (figure 6).

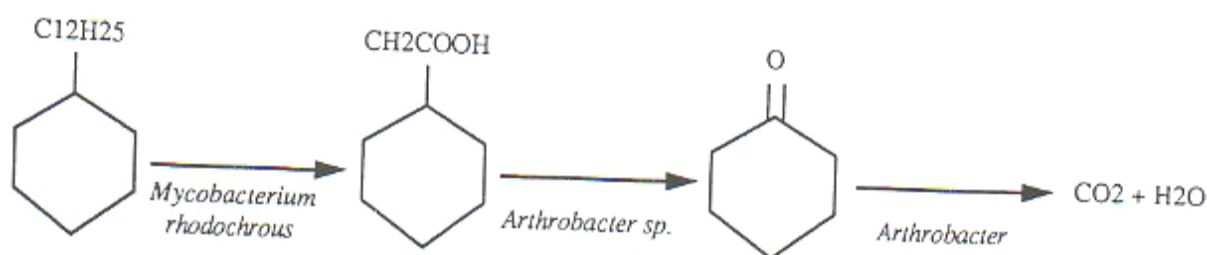


Figure 6. Minéralisation complète du dodécylcyclohexane par l'attaque synergique de deux bactéries (Slater et Bull, 1982).

Concernant la biodégradation des composés xénobiotiques, les microorganismes se divisent en deux types (Bull et Slater, 1982) :

- les consommateurs primaires utilisent le composé disponible dans le milieu comme source de carbone et d'énergie,
- les consommateurs secondaires sont incapables d'assimiler le substrat carboné mais dépendent des métabolites relargués par les consommateurs primaires.

2.2.2.3. Le cométabolisme

Le cométabolisme, souvent impliqué dans la dégradation de composés xénobiotiques (Martinelli, 1999). Dans ce processus, les microorganismes dégradant un substrat ne servant pas à la division cellulaire en présence obligatoire d'un substrat de croissance ou d'autres composés assimilables (Bocard, 2006). Cet aspect de présence obligatoire d'un substrat pour la croissance a été ajouté pour faire une distinction entre le cométabolisme et le métabolisme fortuit (Dalton et Stirling, 1982).

Le cométabolisme résulte du large spectre d'activité des enzymes impliquées qui, en plus de leur fonction normale dans le métabolisme, sont capables de transformer d'autres composés (Nex, 2004). Dans certaines conditions, si ces systèmes enzymatiques sont peu spécifiques, ils pourront fonctionner gratuitement en modifiant d'autres composés qui ne sont pas impliqués dans le métabolisme du microorganisme (Vandecasteele, 2005). Le caractère essentiel du cométabolisme, qui peut revêtir des formes multiples, est le caractère fortuit de la réaction qui n'apporte aucun gain identifié, énergétique, nutritionnel (source de carbone ...etc.), ou autre, au microorganisme qui le met en œuvre (Han et *al.*, 2007).

Le cométabolisme permet à une culture mixte de dégrader des molécules, qu'aucune des souches n'aurait pu dégrader toute seule (Knackmuss, 1996). Le composé cométabolisé l'est avec une vitesse de réaction beaucoup plus faible que le substrat qui sert de source de carbone et d'énergie (Alexander, 1981). Le taux de croissance n'est pas affecté par le cométabolisme.

Le cométabolisme a été très étudié (Yatome *et al.*, 1993 ; Stolz, 2001 ; Aranda *et al.*, 2003 ; Ziajova et Liakopoulou-Kyriakides, 2007 ; Powell *et al.*, 2011). Les travaux de Baker et Herson (1994) ont mis en évidence que la plupart des polluants organochlorés sont dégradés par voie cométabolique. Un exemple de cyclohexane cométabolisé par *Mycobacterium austroafricanum* (Marchal *et al.*, 2003).

Le cométabolisme demeure toutefois un phénomène complexe. En effet, cette complexité a été soulignée par Ye *et al.* (1996), ils ont trouvé que différents co-substrats (glucose, xylose, glycérol, acétate) avaient des effets différents sur la transformation du xylène par *Pseudomonas aeruginosa*.

Oh *et al.* (1994) ont mis en évidence que la capacité à éliminer le p-xylène de la souche pp01 et d'un consortium bactérien provenant de boues activées nécessitait la présence de toluène et/ou de benzène. D'autre part, Greene *et al.* (2000) et Du Plessis *et al.* (2001) ont respectivement montré que la présence d'ortho-xylène (o-xylène) augmente la dégradation du toluène et du benzène sur milieux de culture et que la présence de toluène améliore celle du p-xylène dans un biofiltre.

Hormis le phénomène de cométabolisme, d'autres paramètres peuvent expliquer l'amélioration de la dégradation d'un composé en présence d'un autre. Bhattacharya et Baltzis (2000) ont mis en évidence une augmentation de la dégradation de l'ortho-dichlorobenzène de 70 à 90% en présence d'éthanol. Les auteurs ont relié cette amélioration à l'augmentation de la densité bactérienne en présence d'éthanol, ce qui favoriserait ensuite la dégradation de l'ortho-dichlorobenzène.

2.2.3. Les biofilms

2.2.3.1. Généralités sur les biofilms:

Un biofilm est défini comme un ensemble de microorganismes englués dans leurs propres exopolymères et fixés sur une surface solide (Jouenne, 2008). Il peut être constitué d'une seule espèce bactérienne mais, le plus souvent, plusieurs espèces coexistent au sein de la structure.

Les bactéries se trouvent dans le biofilm sous forme de colonies séparées par des vides correspondant à des canaux assurant la diffusion de nutriments. Ces canaux servent également à l'évacuation des débris et des métabolites (Lewandowski *et al.*, 1994 ; Lewandowski, 2000 ; Ivleva *et al.*, 2010).

L'activité bactérienne au sein même du biofilm n'est pas homogène : les cellules se trouvant à la surface peuvent être soumises à une plus grande concentration d'oxygène. Ainsi, l'analyse de la diffusion de l'oxygène dans des biofilms développés en milieu aérobie, montre que l'oxygène est rapidement consommé par les bactéries superficielles, et de fait, les cellules au niveau des couches basales adoptent une activité anaérobie (Costerton, 1999 ; Lewandowski, 2000 ; Donlan, 2002 ; Kokare *et al.*, 2009).

La formation du biofilm procure aux bactéries concernées un microenvironnement différent avec des conditions fortes d'osmolarité, une limitation nutritive et une forte densité cellulaire et se comportent différemment en ce qui concerne le taux de croissance et la transcription des gènes (Burmolle *et al.*, 2006 ; Goller et Romeo, 2008). Différents facteurs sont susceptibles d'avoir un impact sur leur formation dont : la matière organique présente, le lieu de formation, le caractère hydrophobe de la bactérie ainsi que les interactions microbiennes (Burmolle *et al.*, 2006 ; Schaule *et al.*, 2007 ; Goller et Romeo, 2008 ; Liang *et al.*, 2010 ; Flemming et Wingender, 2010 ; Simões *et al.*, 2010).

Les biofilms ont la propriété de se développer sur une multitude de surfaces tant naturelles (roches), qu'artificielles (cathéter, sonde, prothèse) ainsi que sur des tissus vivants (plaque dentaire). De plus, certains microorganismes ont la propriété de décomposer les matières organiques, processus appelé biodégradation (McRae *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2009).

2.2.3.2. La biodégradation par les biofilms

Les biofilms sont très utilisés dans les procédés comportant des microorganismes fixés sur un support. De ce fait le biofilm est un milieu complexe adsorbé sur un matériau, constituant un biotope et se comportant comme un réacteur polyphasique. L'intérêt attendu d'un bioréacteur à biomasse fixée par rapport à un bioréacteur à boue activée (culture liquide uniquement) est (Zhang *et al.*, 2002 ; Kahn *et al.*, 2003 ; Jou et Huang, 2003) :

- La possibilité de pouvoir traiter des charges organiques élevées dans des volumes réduits (grande concentration de microorganismes et réalisation d'installations compactes) (Lewandowski *et al.*, 1991) .
- Une robustesse accrue vis-à-vis de variations environnementales transitoires (lors d'un stress par exemple), le biofilm servant de «réservoir biologique» (Mörsen et Rehm, 1987 ; Karamanev et Nikolov, 1988 ; Diekman *et al.*, 1990) pouvant efficacement et rapidement réensemencer le milieu en limitant le risque de contamination extérieure et les coûts associés à la relance des cultures.
- Il a l'avantage de protéger la biomasse des phénomènes de lessivage, de créer des niches protectrices et d'offrir une grande concentration en biomasse (Picard *et al.*, 2012).
- Constitue une barrière pour les composés néfastes à la croissance bactérienne (Wanner *et al.*, 2006).
- Enfin, il est envisageable de moduler le métabolisme bactérien pour diversifier la production d'actifs.

De nombreux travaux ont été réalisés sur les biofilms et notamment sur leurs caractéristiques (Djeribi *et al.*, 2005 ; Elain *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2008a ; Lin et Hsien, 2009 ; Farrokhi *et al.*, 2014 ; Muñoz Sierra *et al.*, 2014 ; Sabba *et al.*, 2016). Les supports de biofilms peuvent être très différents, de plus, chacun possède ses propres caractéristiques spécifiques qui vont jouer sur le comportement du processus (Elain *et al.*, 2006) .

2.2.3.3. Modèles de biofilms de réacteurs à garnissage utilisés pour le traitement de composés xénobiotiques

De nombreux modèles de biofilms ont été développés pour le traitement du sol, eau et air. Ces modèles sont souvent compliqués et varient d'un procédé biologique à un autre. Parmi eux on peut citer :

Le modèle de biofilm développé par Rittman *et al.* (Rittman and Mc Carty, 1980a ; Rittman and Mc Carty, 1980b) ne concerne que les biofilms mono-espèce (existants souvent dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique où les procédés se réalisent souvent en conditions stériles), mais dans de nombreux cas, les biofilms sont formés de plusieurs espèces ce qui est souvent le cas dans les procédés de dépollution.

Wanner et Gujer (1986) ont développé un modèle de biofilm à plusieurs espèces. Ils sont partis de deux postulats :

- D'une part les propriétés du biofilm ne change que dans la direction perpendiculaire à l'interface film-support.
- D'autre part la biomasse est homogène tout au long du biofilm.

Rittman et Manem en 1992 ont proposé un modèle de biofilm voisin du précédent, mais tenant compte en plus de :

- la perte de biomasse par détachement du biofilm
- la formation de biomasse inerte
- du concept de concentration minimale en substrat pour la formation du biofilm.

Mowla et Ahmadi (2007) ont développés un modèle de biofilm lors d'un traitement aérobie d'une eau polluée par les hydrocarbures dans un bioréacteur à lit fluidisé. Ils ont observé que l'épaisseur du biofilm a un effet significatif sur l'élimination des hydrocarbures.

Harris et Hansford ont développé en 1976 un modèle de biofilm pour le traitement de l'eau en établissant dix suppositions :

- il existe deux parties dans un biofilm, une aérobie et l'autre anaérobie
- la dégradation du substrat dans la partie anaérobie et dans la phase liquide est négligeable

- le film liquide est laminaire et il n'y a pas d'effet dû à l'âge
- les substrats limitants sont l'oxygène et le carbone organique
- la consommation d'oxygène dans le biofilm est proportionnelle à celle du substrat
- la densité, le rendement, le taux de croissance maximale, les constantes de saturation et les diffusivités du substrat et de l'oxygène, les coefficients de transfert de masse sont constants
- le détachement du biofilm et la respiration n'affecte pas le comportement global du biofilm
- la vitesse de réaction est fonction de la saturation des réactifs.
- la phase liquide est toujours saturée en oxygène.

Tian *et al.* (2016) ont développé un modèle de biofilm lors de l'élimination de l'ammonium dans des réacteurs à biofilm aéré sur membrane. Ils ont observé que le biofilm était stratifié en deux couches, d'une part une zone aérobie propice à la nitrification, et d'autre part une zone anoxique propice à la dénitrification.

2.3. Les procédés physico-chimiques de traitement des composés xénobiotiques

2.3.1. Procédés d'adsorption

L'adsorption est un processus de séparation au cours duquel des molécules d'un fluide (liquide ou gaz) viennent se fixer sur la surface d'un matériau solide, appelé adsorbant (Crini et Badot, 2007). Le charbon actif est le composé le plus utilisé (capacité d'adsorption élevée), mais on trouve aussi d'autres composés comme les gels de silice, l'alumine et les zéolites (Lambert *et al.*, 1997).

Actuellement, l'adsorption est une des techniques de séparation les plus utilisées pour séparer, complexer et purifier des liquides et des gaz dans des domaines variés, allant des industries chimiques et pharmaceutiques, aux applications environnementales.

L'adsorption liquide-solide est l'un des traitements les plus répandus dans la dépollution des eaux. La séparation par adsorption est basée sur une adsorption sélective (thermodynamique et/ou cinétique) des polluants (appelés adsorbats) par un adsorbant grâce à des interactions spécifiques entre la surface du matériau adsorbant et les polluants adsorbés : c'est un simple transfert de masse à partir de la phase liquide vers la surface du solide. La capacité d'adsorption de l'adsorbant dépend de la surface spécifique du matériau (surface de contact interne et externe) et de la concentration du polluant en solution (Crini et Badot, 2007).

Ahmed et Theydan (2014) ont étudié l'adsorption sur charbon actif de la ciprofloxacine et de la norfloxacine, les pourcentages d'élimination atteints sont respectivement de 96 et 98%. Par ailleurs, Putra *et al.* (2009) ont comparé la capacité d'adsorption de la bentonite et du charbon actif, en utilisant l'amoxicilline ; comme pour le cas précédent, ils ont obtenu des taux d'élimination élevés, à savoir 88% pour la bentonite et 95% pour le charbon actif. Chen et Huang (2010) ont étudié l'adsorption de trois antibiotiques de la classe des tétracyclines, à savoir la tétracycline, la chlorotétracycline et l'oxytétracycline, sur l'oxyde d'aluminium ; ils ont conclu que plus que 50% de ces composés sont adsorbés. L'ensemble des études effectuées montrent que l'adsorption demeure une méthode efficace pour le traitement des effluents contenant des antibiotiques. Cependant, dans ce procédé les contaminants sont

transférés de la phase liquide à la phase solide, produisant ainsi un nouveau résidu solide, ou les contaminants sont concentrés (Homem et Santos, 2011).

Toutefois, cette technique ne résout pas le problème, elle ne fait que déplacer la pollution de l'état liquide à l'état solide. De plus, ces techniques, non destructives, nécessitent des opérations postérieures onéreuses de régénération et de post traitement des déchets solides (Bouafia, 2010).

2.3.2. Procédés d'oxydation classiques

Les procédés d'oxydation classiques utilisent des réactifs chimiques fortement oxydants pour dégrader jusqu'au stade de la minéralisation des composés organiques toxiques. Les agents oxydants fortement utilisés sont le chlore, l'ozone, le permanganate, l'hypochlorite de sodium et l'eau oxygénée (Robinson *et al.*, 2001 ; Gogate et Pandit, 2004 ; Crini et Badot, 2007).

Le chlore, obtenu en utilisant de l'hypochlorite de sodium, des solutions de chlorure de sodium ou du dioxyde de chlore, est un puissant oxydant et désinfectant. Ce procédé de désinfection (chloration) était très utilisé dans le traitement de l'eau potable par exemple. Cependant, la formation de dérivés organo-halogénés (dont la toxicité a été mise en évidence) limite de plus en plus son utilisation, ce qui a poussé à son remplacement par l'ozone dont les sous-produits d'oxydation ont l'avantage d'être biodégradables (Crini et Badot, 2007).

Adams *et al.* (2002) ont étudié la dégradation des sulfonamides et du triméthoprime à une concentration de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ avec 1 mg.L^{-1} de Cl_2 . Ils ont conclu que l'oxydation par le chlore est efficace pour l'élimination des antibiotiques considérés (>90%). Cependant, les auteurs ont détecté la formation des sous-produits chlorés, qui pouvaient avoir une toxicité plus élevée que les composés cibles. Une conclusion semblable a été obtenue par Stackelberg *et al.* (2007) qui ont étudié la dégradation des macrolides et des sulfonamides, en utilisant l'hypochlorite de sodium.

2.3.3. Procédés d'oxydation avancée

Les procédés de destruction des polluants reposent sur des réactions chimiques d'oxydation. L'oxydation chimique est de plus en plus utilisée dans le traitement des eaux (Elmolla et Chaudhuri, 2010a ; Elmolla et Chaudhuri, 2010b). Elle devient nécessaire lorsque la solution à traiter contient des polluants non biodégradables réfractaires aux traitements conventionnels de dépollution (Pereira *et al.*, 2011). L'oxydation peut être réalisée, soit par des procédés classiques (oxydation chimique, catalytique ou électrochimique) mettant en œuvre par exemple un oxydant tel que le chlore ou l'ozone, soit par des procédés d'oxydation avancée qui font intervenir une espèce fortement oxydante telle que le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) (Crini et Badot, 2007 ; Hammami, 2008).

Le concept des procédés d'oxydations avancées a été initialement mis en place par Glaze *et al.* (1987). Les procédés d'oxydations avancées sont des processus physicochimiques qui produisent des changements profonds dans la structure des espèces chimiques (Ambuludi, 2012). Cependant, lors de l'oxydation avancée, des produits pharmaceutiques métabolites sont formés qui peuvent également être des composés nocifs. Par conséquent, les intermédiaires générés doivent également être éliminés de l'eau. Par conséquent, la minéralisation devrait être l'objectif principal de ces processus (Beltran *et al.*, 2008). Ces deux dernières décennies, de nombreux travaux de recherche ont été focalisés sur les procédés d'oxydations avancées (Haddou, 2010).

Les procédés d'oxydation avancée sont basés sur la production et l'utilisation in situ d'un oxydant très fort, le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) (Iboukhoulef, 2014), obtenu par quatre procédés, à savoir la photolyse de l'eau, l'irradiation en présence d'un oxydant (photolyse de H_2O_2), la réaction Fenton, et la photocatalyse (Crini et Badot, 2007). L'utilisation des radicaux hydroxyles dans la dépollution des eaux contaminées est justifiée par un certain nombre d'avantages, tels que, la non-toxicité de ces radicaux, ils sont simples à produire et à utiliser, très réactifs vis-à-vis des polluants à éliminer, ne sont pas rejetés dans l'environnement et ne sont pas corrosifs pour le matériel utilisé (Crini et Badot, 2007).

Les procédés d'oxydations avancées sont utilisés pour oxyder des composés minéraux toxiques, tel que l'oxydation des cyanures provenant des effluents de traitement de surface. Ils permettent d'oxyder aussi des composés toxiques ou inhibiteurs vis-à-vis des microorganismes; ils assurent également la minéralisation des polluants organiques dans le cas des effluents à forte teneur en DCO. En outre, les procédés d'oxydations avancées peuvent

être utilisés comme prétraitement avant un traitement biologique afin d'augmenter la biodégradabilité de l'effluent à dépolluer (Crini et Badot, 2007). Il existe de nombreux procédés d'oxydations avancées qui utilisent des méthodes chimiques ou photochimiques tels que le procédé Ozonation, procédé Fenton, le procédé photo-Fenton et photolyse de H₂O₂ (Yang *et al.*, 2010b ; Loaiza-Ambuludi *et al.*, 2013).

2.3.3.1. Ozonation

L'ozone est un oxydant très puissant capable de transformer des composés difficilement dégradables en produits plus faciles à épurer par un traitement biologique ultérieur. Il est produit *in situ* à partir d'oxygène pur par décharge électrique. Cependant, l'ozone est relativement instable dans l'eau et subit une décomposition très rapide (Von Gunten, 2003). Ainsi, à 20 °C, le temps de demi-vie de l'ozone dans l'eau est de 20-30 minutes (Crini et Badot, 2007).

L'oxydation des composés organiques par ozonation peut se faire selon deux voies, soit une oxydation directe par l'ozone moléculaire dissous en solution aqueuse (dans ce cas ce n'est pas un procédé d'oxydation avancée), soit une oxydation indirecte par les radicaux hydroxyles, générés lors de la décomposition de l'ozone moléculaire (Hoigné et Bader, 1983 ; Hoigne et Bader, 1979 ; Muñoz, 2003).

La réaction d'oxydation par l'ozone est sélective et relativement lente (Goi, 2005 ; Rosal *et al.*, 2010), alors que celle réalisée par les radicaux hydroxyle est non sélective et très rapide. Les sous-produits formés seront éventuellement différents selon la voie d'oxydation.

L'emploi de l'ozone pour la dégradation de certains médicaments a été étudié, ainsi l'efficacité de cette méthode varie d'une molécule à une autre. Pour certains antibiotiques, le taux de minéralisation est dans l'ordre de 30% après plusieurs heures de traitement (Andreozzi *et al.*, 2003). Dans le cas d'amoxicilline, par exemple, la minéralisation est faible malgré une longue durée de traitement (Andreozzi *et al.*, 2005).

Nasuhoglu *et al.* (2012) se sont intéressés au traitement de la lévofloxacine, un antibiotique de la famille des fluoroquinolones, par ozonation; une réduction de 59% de la DCO a été mesurée. Pareillement, Gómez-Pacheco *et al.* (2011) ont appliqué l'ozonation au traitement d'un antibiotique, à savoir la tétracycline; les pourcentages de réduction de la DCO obtenus, varient entre 39 et 58%. Zwiener et Frimmel (2000) ont observé que l'oxydation de l'ibuprofène par ozonation conduit à un taux de dégradation de l'ordre de 99.4%. Sharma et

Mishra (2006), Buffle *et al.* (2006), Esplugas *et al.* (2007) et Sharma (2008) ont montré que l'ozonation est un procédé très efficace pour éliminer des produits pharmaceutiques de l'eau.

2.3.3.2. Procédé Fenton

L'oxydation par le procédé Fenton des composés organiques miscibles ou solubles dans l'eau est l'une des réactions les plus connues parmi les réactions d'oxydations catalysées par un métal (Tekin *et al.*, 2006). En raison de rendement élevé de réaction, offre une source rentable de radicaux hydroxyles et il est facile à utiliser et à entretenir (Papic *et al.*, 2009), le réactif de Fenton peut être utilisé pour le traitement de la micropollution causée par les produits pharmaceutiques résiduels dans les eaux de surface, ainsi que des effluents industriels (Ay et Kargi, 2010).

D'autre part, les réactifs utilisés (le fer et le peroxyde d'hydrogène) sont très abondants et non toxiques et facile à manipuler et sans danger pour l'environnement (Papic *et al.*, 2009). Le mélange de Fe_2SO_4 ou d'autre complexe ferreux (le réactif de Fenton) et H_2O_2 à faible pH, favorisant la décomposition de H_2O_2 via une série des réactions catalytiques par l'ion Fe^{2+} qui produisent des radicaux hydroxyles, généralement connus par leur capacité d'oxydation très élevée et peuvent oxyder les composés organiques récalcitrants dans un temps plus au moins court (Tekin *et al.*, 2006). La réaction globale est :



Le procédé Fenton a été appliqué au traitement de différents polluants organiques persistants dont les colorants synthétiques et les antibiotiques. Des travaux antérieurs, menés sur la dépollution des effluents de colorants ont conduit à la décoloration totale ainsi que la réduction de la DCO de 79% (Kuo, 1992 ; Lin *et al.*, 1999). Elmolla et Chaudhuri (2010a) se sont intéressés au traitement de solutions aqueuses d'antibiotiques contenant l'amoxicilline, l'ampicilline et la cloxacilline, les résultats obtenus montrent une diminution de la DCO de 80% et une élimination du COD de 53%.

Cependant, le procédé Fenton présente un certain nombre de limitations tels que la difficulté d'oxyder certaines classes de composés organiques, ce qui nécessite des doses élevées de réactifs, et surtout la production importante de boues d'hydroxydes ferriques lors de la neutralisation de l'eau. Ces inconvénients peuvent être surmontés en faisant assister la réaction de Fenton par photochimie (procédé photo-Fenton), soit par électrochimie (procédé électro-Fenton). Ces couplages permettent d'utiliser une faible quantité de fer par la mise en

place de processus catalytiques qui suppriment, d'une part, la formation de boues, et d'autre part diminuent le coût de fonctionnement tout en augmentant l'efficacité du traitement (Crini et Badot, 2007).

2.3.3.3. Procédés photochimiques

2.3.3.3.1. Photolyse de H₂O₂

Ce procédé est basé sur la photolyse de H₂O₂ par la lumière UV, qui conduit à la formation de radicaux hydroxyle (équation 1) (Dore, 1989 ; Legrini *et al.*, 1993) avec un rendement quantique de 2•OH formés par photon absorbé (Ambuludi, 2012 ; Chebli, 2012). Les radicaux hydroxyles formés réagissent ensuite avec les polluants organiques.

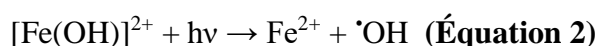


L'inconvénient majeur de la photolyse de H₂O₂ est la très faible valeur du coefficient d'absorption molaire de H₂O₂ (18.6 L.mol⁻¹.cm⁻¹), ce qui engendre un rendement quantique faible de formation des radicaux hydroxyles. Il est donc nécessaire d'utiliser une forte concentration du peroxyde d'hydrogène afin d'assurer une oxydation efficace des polluants organiques (Crini et Badot, 2007).

Yuan *et al.* (2011) ont examiné l'efficacité du traitement par UV/H₂O₂ sur la minéralisation de trois antibiotiques, à savoir l'oxytétracycline, la doxycycline et la ciprofloxacine ; les taux d'élimination du COT obtenus ne dépassent pas les 10%. D'autre part, Jung *et al.* (2012) ont appliqué cette méthode pour le traitement de l'amoxicilline, le résultat obtenu montre une diminution du COT égale à 50%.

2.3.3.3.2. Procédé photo-Fenton

Le procédé photo-Fenton est basé sur la catalyse photochimique de la réaction de Fenton. La solution à traiter contient à la fois du peroxyde d'hydrogène et des ions ferreux ; l'irradiation du système Fenton par rayonnement UV/visible permet d'augmenter considérablement la vitesse de formation des radicaux hydroxyle par rapport au procédé Fenton (Aaron et Oturan, 2001 ; Fdil *et al.*, 2003 ; González *et al.*, 2007) (équation 2). La régénération catalytique des ions ferreux a pour avantage de limiter l'ajout du sel de fer et d'éviter la formation de boues d'hydroxyde ferrique.



Plusieurs études antérieures ont été menées sur l'application du procédé photo-Fenton au traitement des eaux contaminées par des résidus d'antibiotiques. Dans ce cadre, la dégradation de l'amoxicilline par ce procédé a été examinée par Trovó *et al.* (2011), ils ont noté une élimination totale de ce composé ainsi qu'une réduction du COT variant entre 73 et 81%. Rozas *et al.* (2010) ont étudié le traitement de l'ampicilline par photo-Fenton, leur travaux ont conduit à une dégradation totale de l'antibiotique considéré et un taux de minéralisation de 50%. Par ailleurs, Yamal-Turbay *et al.* (2013) ont réussi à dégrader totalement la tétracycline et ont atteint un pourcentage de minéralisation qui dépasse les 77%.

Le procédé photo-Fenton est généralement inapplicable aux eaux usées très chargées en matière organique (DCO élevé, tels que les effluents hospitaliers, les effluents des usines pharmaceutiques et les eaux résiduaires urbaines), puisque la turbidité empêche la pénétration du rayonnement UV. Il est plutôt applicable aux matrices caractérisées par de faibles DCO (Homem et Santos, 2011).

2.3.4. Procédés membranaires

Les procédés membranaires se sont fortement développés ces dernières années et constituent une avancée majeure dans les procédés de séparation. Une membrane permet de contrôler le transport des espèces chimiques entre deux phases fluides qu'elle sépare. La séparation des polluants est essentiellement fondée sur l'affinité des espèces chimiques pour la membrane, sur la taille et/ou sur la charge électrique des molécules et ions.

Les procédés membranaires sont au nombre de quatre : la microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse (Crini et Badot, 2007). Parmi ces quatre types de procédés, la nanofiltration et l'osmose inverse sont les plus adaptées à l'élimination des composés pharmaceutiques de faible poids moléculaire tels que les antibiotiques (Michael *et al.*, 2013).

Plusieurs chercheurs se sont intéressés au traitement des antibiotiques par nanofiltration et par osmose inverse. Dans la plupart des études, les pourcentages d'élimination, obtenus pour les différents types de membrane, dépassent les 90% et ce pour plusieurs antibiotiques, y compris les quinolones, les tétracyclines et le triméthoprime antibiotiques (Michael *et al.*, 2013). Koyuncu *et al.* (2008) ont obtenu les taux d'élimination les plus faibles pour les tétracyclines (50-80%) ainsi que pour les sulfonamides (11-20%).

2.4. Les procédés biologiques de traitement des composés xénobiotiques

2.4.1. Introduction

À la différence des technologies physico-chimiques qui transfèrent parfois simplement le contaminant d'une phase à une autre, les technologies biologiques de traitement des composés xénobiotiques offrent l'avantage de dégrader complètement le polluant en produits inoffensifs ou moins contaminants (Kennes et Thalasso, 1998). Ces technologies, qui utilisent des microorganismes comme oxydant, offrent à rendement comparable, des coûts d'investissement et d'opération moins élevés ainsi qu'une simplicité d'opération (Michel, 1997). Actuellement, on estime à plus de 15000 le nombre d'installations de traitement biologique en fonction à travers le monde, dont plus de la moitié en Europe (Van Groenestijn, 2005).

Le principe de la bioépuration est basé sur la capacité de certains microorganismes (bactéries et moisissures essentiellement) à dégrader les composés indésirables (organiques ou minéraux) en composés atoxiques (Brandy, 1997 ; Burgess *et al.*, 2001). Par contre, pour être accessibles aux microorganismes, les polluants doivent d'abord diffuser dans la phase liquide. L'élimination de ces composés passe ensuite soit par les processus anaboliques, pour la production de biomasse, ou par les voies cataboliques, pour servir comme source d'énergie (Turgeon, 1998 ; Delhoménie et Heitz, 2005).

Les taux d'épuration sont généralement fonction des performances de transfert du polluant dans la phase liquide, de la concentration en biomasse viable disponible et de son activité métabolique spécifique. Ajoutons à ceci d'éventuelles inhibitions qui vont agir sur la viabilité et/ou l'activité des microorganismes (parfois par les polluants eux-mêmes). Les cinétiques apparentes (transfère du polluant dans la phase liquide, dégradation biologique) sont généralement du premier ordre lorsque la concentration en polluant est faible (la vitesse de réaction dépend de la concentration en polluant, régime physique) et d'ordre zéro à de plus fortes concentrations (la vitesse de réaction est constante et ne dépend pas de la concentration en polluant, régime biologique) (Edwards et Nirmalakhandan, 1996).

Les microorganismes sont responsables de la dégradation des polluants et conditionnent l'efficacité du procédé. Le plus souvent, ce sont des cultures mixtes qui sont utilisées. En effet, ceci apporte une facilité de mise en œuvre (pas de contrainte de stérilité à l'échelle industrielle) et augmente les potentialités du procédé en termes de dégradation d'un mélange de polluants (présence de plusieurs genres et espèces de microorganismes) (Andrews et Noah, 1995). La biomasse utilisée provient généralement d'unités de traitement d'effluents urbains ou industriels (boues activées) puisqu'il s'agit d'une source aisément disponible caractérisée par une importante hétérogénéité de microorganismes.

A chaque mise en fonctionnement d'un procédé biologique de traitement, il faut faire face à une période de mise en régime pendant laquelle l'efficacité d'épuration va augmenter pour atteindre une valeur stable. Cette période correspond à l'étape d'acclimatation des microorganismes aux polluants rencontrés et peut s'étendre de quelques semaines à plusieurs mois (Juneson *et al.*, 2001 ; Dehghanzadeh *et al.*, 2005). L'inoculation d'un procédé avec des populations microbiennes précédemment acclimatées aux polluants permet de réduire sensiblement cette durée (Shareefdeen et Baltzis, 1994 ; Acuña *et al.*, 1999 ; Jorio *et al.*, 2000). L'acclimatation préalable consiste à enrichir la population en microorganismes les plus aptes à dégrader le xénobiotique visé (sélection d'organismes spécifiques, induction d'enzymes spécifiques, modification du potentiel génétique d'un organisme) (Le Cloirec, 1998). La stabilité apparente de telles populations au sein d'un processus d'épuration biologique est une condition de son efficacité. L'équilibre au sein du consortium sélectionné est dynamique : les interactions complexes existant dans de telles populations hétérogènes modifient constamment la distribution de genres et d'espèces sous la pression de sélection exercée par le milieu extérieur (fluctuations de débit, de concentration,...). Le développement des souches dégradant le polluant le plus rapidement est alors favorisé, ce qui contribue à un traitement plus efficace. Les conditions environnementales (température, pH, ajout de nutriments,...) sont aussi primordiales pour favoriser la croissance des souches désirées (Andrews et Noah, 1995). Par exemple, dans le cas de la dégradation de la méthyl éthyl cétone dans un biofiltre tubulaire (Agathos *et al.*, 1997), le biofilm bactérien initial composé essentiellement d'*Alcaligenes denitrificans* est rapidement contaminé par 2 champignons (*Geotrichum candidum* et *Fusarium oxysporum*), dont la présence contribue à favoriser l'élimination du polluant. Effectivement, les microorganismes s'implantant spontanément sur un milieu contenant un substrat spécifique sont les plus aptes à le dégrader (Spigno *et al.*, 2005).

L'utilisation de procédés de traitement biologique exige la connaissance et la maîtrise des conditions environnementales favorables à la croissance des microorganismes. La mise en œuvre de bioprocédés doit répondre à des impératifs chimiques et physiques tels que le respect de l'équilibre nutritionnel (apports équilibrés en carbone, en azote, en phosphore et en autres éléments) (Egli et Fiechter, 1981 ; Deshusses, 1997), l'humidité (Prechel et Sabo, 2005), la température et le pH (Ottengraf, 1987 ; Bohn, 1992 ; Ceccaldi *et al.*, 1993 ; Le Cloirec, 1998).

Plusieurs modes de mise en œuvre peuvent être envisagés en fonction du caractère statique ou mobile de la phase aqueuse et de la biomasse. Les procédés les plus utilisés sont les biofiltres, Biolaveurs à cellules fixées et les biolaveurs (tableau 4).

Tableau 4 .Types de procédés biologiques (Martin *et al.*, 1987).

| Flore microbienne | Phase aqueuse | |
|-------------------|-------------------------------|--------------|
| | Mobile | Stationnaire |
| En suspension | -Biolaveurs | |
| Immobilisée | -Biolaveurs à cellules fixées | -Biofiltres |

2.4.2. Les biofiltres

Ce sont les procédés de traitement biologique qui ont été développés les premiers (Pomeroy, 1957). Ils font aujourd'hui partie des plus étudiés et des plus utilisés du fait de leur facilité de mise en œuvre. Ils sont constitués d'un support organique ou inorganique (compost, bois, tourbe ou encore charbon actif) au sein de laquelle sont immobilisés les microorganismes qui constituent un biofilm humide (Malhautier *et al.*, 2005 ; Delhoménie et Heitz, 2005). Ce lit filtrant, de 0.2 m à 2.4 m d'épaisseur (Iranpour *et al.*, 2005), sert à la fois de support aux microorganismes pour la formation d'un biofilm et de source de nutriments nécessaires à leur croissance. La taille des particules formant le biofiltre doit être relativement uniforme afin d'éviter la présence de zones plus denses et l'apparition de chemins

préférentiels pour l'effluent gazeux. Un compromis doit être trouvé pour que la résistance au flux soit limitée et que la surface spécifique soit suffisamment élevée pour fournir une bonne surface d'adsorption (Andrews et Noah, 1995). Les particules doivent aussi présenter une certaine capacité tampon afin de maintenir le pH dans une zone optimale pour les microorganismes (variations de pH induites par la production d'acides organiques lors de la croissance) (Burgess *et al.*, 2001).

Les polluants à traiter doit traverser ce lit filtrant. Ils s'adsorbent sur le biofilm et sont ensuite dégradés par les microorganismes (Edwards et Nirmalakhandan, 1996). Les surfaces spécifiques de ce type de procédé sont de l'ordre de 500 à 1000 m².m⁻³.

Les biofiltres possèdent généralement une hauteur inférieure à 1 m (Ottengraf et Diks, 1992). La vitesse de passage du gaz est dans la plupart des cas de l'ordre de 150 m/h. Elle était de 5 à 10 m/h dans les premiers biofiltres, et peut atteindre plus de 300 m/h si on utilise un mélange de compost et d'écorce (Don, 1985 ; Leson et Winer, 1991).

Le temps de séjour du gaz dans le lit filtrant est généralement compris entre 15 et 60 s. Cette grandeur détermine le volume de filtre nécessaire pour le traitement d'un débit de gaz donné. Les biofiltres actuels sont basés sur une valeur de 4.2 à 16.7 m³ de filtre par Nm³.h⁻¹ d'air à traiter (Adler, 2001).

Le paramètre clé du fonctionnement de ces dispositifs est l'humidité puisqu'elle est indispensable à la survie et au métabolisme des microorganismes et contribue au pouvoir tampon du procédé (Van Lith *et al.*, 1997). Une humidité trop élevée aboutit à l'apparition de zones d'anaérobiose (transfert limité, apparition d'odeurs) et à une augmentation de la perte de charge alors qu'une valeur trop faible induit le dessèchement et le craquellement de la couche filtrante provoquant l'apparition de passages préférentiels et/ou un tassement du biofiltre avec traitement partiel des gaz (Kennes et Thalasso, 1998). Pour un fonctionnement optimal, la teneur en eau du filtre doit être maintenue entre 30 et 60% en poids du matériau filtrant (Gostomski *et al.*, 1997 ; Auria *et al.*, 1998 ; Auria *et al.*, 2000).

La durée de vie d'un biofiltre à compost est comprise entre 1 et 5 années (car il est biodégradable), celle des biofiltres dont le lit est composé de sol est plus longue (un biofiltre installé par exemple à Washington depuis 1964 fonctionnait toujours en 1992 sans aucune maintenance) (Bohn, 1992).

Malgré les nombreux avantages que ce type de procédé possède (faible coût d'installation, facilité d'utilisation, peu de maintenance) (Dawson, 1993 ; Sabo *et al.*, 2005), il présente de nombreux inconvénients (Weckhuysen *et al.*, 1993 ; Kleinheinz et Bagley, 1998 ; Prechel et Sabo, 2005 ; Morgan-Sagastume et Noyola, 2006) :

- accumulation de produits de dégradation potentiellement nocifs (toxique pour les microorganismes),
- Les problèmes d'encombrement liés aux faibles vitesses de réaction,
- le colmatage et le tassement des filtres,
- la présence de zone d'anaérobiose,
- les faibles vitesses de passage et la hauteur du lit qui ne peut pas dépasser 1 m imposent des surfaces importantes des filtres.

Pour résoudre l'une des limitations essentielles des biofiltres, à savoir la nature organique du support, qui favorise la formation d'agglomérat et de boues et nécessite un contrôle permanent des conditions opératoires (humidité, pH), de nouveaux matériaux ont été développés et testés (Cioci *et al.*, 1997 ; Gaudin *et al.*, 2005 ; Ramirez *et al.*, 2005). Il s'agit, par exemple, d'une matrice inorganique poreuse recouverte de charbon actif qui permet d'améliorer les capacités du procédé. Ce nouveau matériau est composé d'un cœur hydrophile qui contient les microorganismes et d'une couche extérieure qui assure la protection des microorganismes et permet l'adsorption des COV contenus dans le gaz. Les composés adsorbés diffusent dans la couche de charbon actif et sont ensuite dégradés par les microorganismes. 80 à 99.9% de l'éthanol contenu dans un effluent gazeux a pu être éliminé par biofiltration en utilisant ce support.

Les biofiltres peuvent être utilisés pour traiter de nombreux composés comme l'isoprène, le sulfure de diméthyle, le chloroforme, le benzène, le trichloréthylène, le toluène, le *m*-xylène et le *o*-xylène (Yoon et Park, 2002), le sulfure d'hydrogène (Rattanapan *et al.*, 2009), le n-hexane (Cheng *et al.*, 2016), le styrène (Dehghanzadeh *et al.*, 2005), le α -pinène (Miller et Allen, 2005), le phénol (Spigno *et al.*, 2004), les alcools (Dastous *et al.*, 2008), les hydrocarbures aromatiques (Torkian *et al.*, 2003) et les produits pharmaceutiques (Zhang *et al.*, 2015).

2.4.3. Les biolaveurs à cellules fixées (biofiltre trickling)

Le premier biolaveur à cellules fixées (biofiltre trickling) a été utilisé pour le traitement de l'eau. C'est un chimiste allemand Alexandre Müller qui en 1868 a été le premier à reconnaître le potentiel de ce système. La première installation a été réalisée en 1887 à la station expérimentale de Lawrence (USA) (Bishop et Kinner, 1986). Ce n'est qu'en 1934 en Allemagne que le premier brevet utilisant un biofiltre à cellules fixées pour le traitement biologique des gaz a été déposé. Dans ce système, la population microbienne est cultivée sur des supports qui sont arrosés avec de l'eau. Depuis, la conception de ce type de procédé n'a pas beaucoup évolué, c'est en fait la connaissance des aspects physiques des garnissages qui s'est développé (Chen, 1984 ; Diks, 1992 ; Reitzig *et al.*, 1995).

Le biofiltre trickling utilise un biofilm fixé sur un support immobile généralement inorganique avec une phase aqueuse qui circule en continu. Il se distingue du laveur biologique par le fait que l'absorption et la dégradation des polluants ont lieu simultanément au sein du lit (Brandy, 1997 ; Deshusses et Gabriel, 2005).

Les biolaveurs à cellules fixées consistent en une colonne remplie d'un garnissage inerte (verre, céramique, plastiqued'une surface spécifique de 100 à 400 m²/m³) sur lequel les bactéries vont se fixer (Hartmans, 1990 ; kirchner *et al.*, 1991 ; Paca et koutsky, 1994 ; Smits *et al.*, 1995 ; Gerards *et al.*, 1995 ; Iranpour *et al.*, 2005 ; Revah et Morgan-Segastume, 2005). Le garnissage utilisé peut être structuré (plaques ondulées) ou aléatoire (anneaux de Raschig ou de Pall), mais selon Brandy (1997), il doit répondre à plusieurs critères :

- ✓ posséder un degré de vide suffisant pour éviter les risques de colmatage liés au développement du biofilm,
- ✓ permettre une distribution uniforme de l'eau dans la colonne,
- ✓ être inerte biologiquement et chimiquement,
- ✓ être mécaniquement stable.

La recirculation de la phase aqueuse peut permettre en outre d'éliminer les produits de dégradation potentiellement toxique qui pourraient inhiber la croissance bactérienne, d'assurer un contrôle sur les conditions physiologiques optimales pour l'activité des bactéries (pH, température et nutriment....) (Okkerse *et al.*, 1999 ; Koutinas *et al.*, 2005 ; Xue *et al.*, 2010 ; López *et al.*, 2013).

Le problème le plus important du biofiltre trickling est qu'il nécessite une dissolution des polluants dans la phase aqueuse. C'est pourquoi il est efficace seulement pour les composés qui ont un coefficient de partition air/eau de moins de 0.1 (Ottengraf, 1987 ; Bentz, 1987 ; Schippert, 1987 ; Bueb et Melin, 1987 ; Kennes et Thalasso, 1998).

De plus, si la vitesse de croissance des microorganismes est assez élevée, il peut y avoir des problèmes de colmatage du garnissage (Diks *et al.*, 1994). Ceci cause une augmentation des pertes de charge et peut même aller jusqu'à obstruer complètement le lit (Iliuta *et al.*, 2005). Deux situations prépondérantes peuvent influencer le colmatage (Jol *et al.*, 1994) :

- ✓ d'une part le type de microorganismes présents, ceux-ci pouvant se développer sous forme de filament ou de colonies isolées ; les filaments ayant tendances à colmater beaucoup plus facilement,
- ✓ d'autre part, la charge organique entrant dans le réacteur va déterminer la quantité de biomasse qui peut se former ; plus elle est importante, plus il peut se former un excès de biomasse qui ne peut être éliminé par le système.

Il est possible de limiter la formation en ajoutant des sels dans la phase aqueuse (Mulligan, 2002). Cette limitation peut s'effectuer sans observer de diminution importante de l'efficacité du biofiltre. Le niveau optimal de la concentration saline (sel de sodium, de calcium, de magnésium ou d'aluminium...) varie en fonction de chaque cas. En contrôlant la croissance et la minéralisation de la biomasse à l'aide de l'addition de sel, il devient possible d'éviter le colmatage et la production d'un surplus de boues. Les ions polyvalents positifs sont les plus efficaces, on peut mieux contrôler le colmatage à l'aide de calcium ou de magnésium qu'avec du sodium. Toutefois, pour des raisons économiques, on utilise généralement des sels de sodium (Chlorure de sodium, sulfate de sodium, carbonate de sodium ou hydroxyde de sodium) (Jol *et al.*, 1994 ; Weber et Hartmans, 1994).

Un autre moyen de limiter la formation de la biomasse et donc le colmatage c'est de carencer les bactéries en azote. Quand des composés azotés et autres minéraux sont présents en quantité suffisante dans le liquide de recirculation, une formation de biomasse importante peut entraîner un colmatage et donc un arrêt du système pendant plusieurs jours. Si on limite l'apport en azote on observe une diminution de la formation de biomasse. Toutefois, si la carence est trop importante, la capacité de dégradation du biofiltre diminue considérablement. La carence en azote et l'augmentation de la force ionique peuvent être utilisées en même

temps pour limiter le colmatage. Une force ionique trop faible conduit à la formation d'un biofilm non stable qui favorise le colmatage (Weber et Hartmans, 1994).

2.4.4. Les biolaveurs (bioscrubbers)

Les biolaveurs sont utilisés depuis plusieurs années dans de nombreuses branches de l'industrie pour l'élimination de polluants ayant un faible coefficient de partition ($<0.001-0.05$) et une grande solubilité (Bueb et Melin, 1987 ; Paul, 1987 ; Schippert, 1987 ; Tholander, 1987 ; Humeau *et al.*, 2000 ; Van Groenestijn, 2001 ; Delhoménie et Heitz, 2005 ; Singh *et al.*, 2005).

Le procédé de lavage biologique utilise un système en deux étapes distinctes, soit l'absorption du polluant vers une phase liquide et la régénération de la solution de lavage dans un réacteur biologique parfaitement agité où la biomasse est en suspension (dégradation des composés absorbés). La première étape se fait dans une colonne d'absorption habituellement remplie d'un garnissage (Kraakman, 2005 ; Mudliar *et al.*, 2010).

Le garnissage, qui sert à augmenter la surface de contact pour favoriser l'échange entre le liquide et le gaz, est souvent constitué de matériaux inertes comme des anneaux Raschig, des plateaux ou des billes de verre recyclé (Michel, 1997 ; Van Groenestijn, 2001). Le débit de liquide qui s'écoule à travers la colonne est un paramètre important puisqu'il doit être suffisant pour atteindre une épuration acceptable, sans toutefois être trop élevé pour causer l'engorgement dans la colonne. Il faut aussi prendre en compte les risques de colmatage du garnissage, qui réduisent la surface d'échange.

La deuxième étape du procédé se fait dans une unité semblable à un réacteur de boues activées. La biomasse qui est en suspension dans le réacteur permet de dégrader les polluants et ainsi régénérer la solution de lavage pour qu'elle puisse être retournée à la colonne. La concentration de la biomasse est généralement comprise entre 1 et 60 g par litre. Cette étape est très importante, car elle a un gros impact sur l'efficacité du système. En effet, s'il n'est pas possible d'enlever tout le polluant du courant liquide, l'étape d'absorption, qui exploite le gradient de concentrations, va être limitée. Le réacteur comprend généralement un agitateur pour maintenir la biomasse en suspension et parfois même un système d'aération pour conserver un taux d'oxygène favorable à la croissance des microorganismes (Mudliar *et al.*, 2010). Le temps de séjour dans le réacteur doit être suffisant pour assurer à la fois l'oxydation

des composés absorbés et la croissance microbienne. Il en résulte qu'un compromis doit souvent être trouvé entre le débit de la solution de lavage, qui assure de bonnes performances de transfert, et le temps de séjour des composés dans le bassin pour obtenir leur complète dégradation biologique (Le Cloirec, 1998).

Dans certains procédés de biolavage il y a un décanteur qui sépare la biomasse de la phase liquide pour obtenir une solution de lavage sans matière en suspension (éviter l'accumulation de sous-produits toxiques et de la biomasse). L'efficacité de cette unité dépend principalement de la décantabilité des boues du réacteur d'oxydation (Kennes *et al.*, 2009).

Pour assurer le bon fonctionnement d'un système de lavage biologique, il y a quelques paramètres importants à suivre : le pH, la température et les pertes de charge. Le pH et la température interviennent dans les deux étapes principales du système en influençant la solubilité des polluants dans la phase liquide et en créant des conditions optimales pour la croissance des microorganismes. Le suivi de la perte de charge à travers le garnissage permet de déceler la présence d'un colmatage dans la colonne d'absorption (Humeau *et al.*, 2000).

Si l'on veut traiter des composés possédant une faible solubilité ou un grand coefficient de partage (> 0.02) on peut utiliser une phase organique pour solubiliser le polluant (Cesario *et al.*, 1992 ; Cesario *et al.*, 1993 ; Cunnah et Woodley, 1993 ; Lebeault *et al.*, 1995 ; Lebeault *et al.*, 1996). Cette phase organique doit être non biodégradable, non miscible à l'eau, avoir un grand coefficient de partage avec le polluant, posséder une faible tension de vapeur et ne pas être toxique pour les microorganismes. L'huile de silicone correspond bien à tous ces paramètres (Penaud, 1989).

Le principal avantage des biolaveurs est la possibilité notamment de contrôler la composition de la phase liquide en recirculation, par ajout par exemple de nutriments appropriés et élimination simultanée des produits inhibiteurs ou toxiques. Par ailleurs, les possibilités de variation du débit d'eau circulante et de sa composition rendent ces outils très flexibles et autorisent dans une certaine limite des fluctuations de charges à l'entrée. De plus, la réaction biologique étant effectuée dans un réacteur distinct, ces procédés sont moins sensibles aux phénomènes de colmatage dus à la prolifération bactérienne (Migaud, 1996). Le principal inconvénient des biolaveurs est la restriction de leur champ d'application au traitement de composés plutôt fortement hydrosolubles. De plus la nécessité de traiter les boues produites. Enfin, il faut souligner que du fait de l'agitation et de l'aération, ces

systèmes, comparés aux autres procédés de traitement biologiques, consomment beaucoup d'énergie (Singh *et al.*, 2005 ; Mudliar *et al.*, 2010).

2.4.5. Paramètres opératoires

2.4.5.1. Besoins en eau

La présence d'eau dans le milieu bioréactif est une condition indispensable de survie pour les micro-organismes. Dans les biolaveurs à cellules fixées et les biolaveurs, il est aisé de maintenir une teneur en eau suffisante grâce à la circulation du courant liquide dans le système. En revanche, le biofiltre est seulement à circulation de gaz. Or, l'air évacué entraîne de l'eau. Pour empêcher le dessèchement du filtre qui bloque le processus biologique, on peut soit humidifier l'air pollué à l'entrée, soit placer au dessus du lit un système d'arrosage séquencé (Sun *et al.*, 2002). Bien qu'une humidité des effluents à l'entrée supérieure à 95% puisse parfois suffire, un apport d'eau d'appoint peut quand même être nécessaire en raison de l'élévation de la température due à l'exothermicité des réactions biologiques. L'élévation de température dépend de la nature du/des composés traités ainsi que de leur concentration. Elle peut-être de l'ordre de 2 à 4 °C, parfois dépasser 10 °C (Wani *et al.*, 1997). Auria *et al.* (1996) reportent ainsi une élévation de température allant jusqu'à de 4.2 °C lors de la consommation de toluène dans un biofiltre.

Pour réguler l'apport d'eau nécessaire, des capteurs peuvent être placés à différents niveaux du lit permettant de suivre l'évolution de la masse du filtre (Rozich, 1995).

Les systèmes d'arrosage employés doivent permettre une répartition uniforme de l'humidité dans le filtre afin d'éviter l'apparition de zones de support localement sèches. Celles-ci peuvent en effet créer des fissures ou cassures qui forment des chemins préférentiels du gaz. Des courts-circuits du gaz peuvent alors apparaître et la surface d'échange active est réduite. Dans les biolaveurs et les biolaveurs à cellules fixées, l'apport d'eau fraîche se fait via une dilution du courant liquide associée à une purge permanente. Le renouvellement périodique de la solution permet, en outre, d'effectuer un lavage du système biologique en éliminant les sels ou métabolites potentiellement toxiques pour le processus de biodégradation.

S'il faut veiller à un apport d'eau suffisant pour assurer le bon fonctionnement de l'unité, celui-ci ne doit néanmoins pas être excessif. En effet, une quantité d'eau trop importante dans le garnissage peut avoir des effets néfastes sur la cinétique de transfert des composés et de l'oxygène dans la phase aqueuse. Dans un biofiltre, cela peut favoriser la formation de zones anaérobies, sources d'émissions malodorantes et de baisse d'efficacité (Rozich, 1995).

2.4.5.2. Influence de la température

Les micro-organismes impliqués dans les biodégradations étant généralement mésophiles, il est nécessaire d'ajuster la température de travail à une valeur optimale pour la croissance microbienne, comprise entre 20 et 40 °C. En effet, pour des températures trop basses, la croissance des bactéries est fortement ralentie, tandis que des températures trop élevées deviennent létales pour les micro-organismes. De plus, de trop grandes variations thermiques peuvent aussi induire un déséquilibre du système biologique, se traduisant par une baisse de l'efficacité globale du procédé. Arnold *et al.* (1997), ont obtenu une amélioration de la dégradation du styrène de 66 à 92% avec l'augmentation de la température de 12 à 23 °C.

Enfin, il faut aussi prendre en compte l'effet de ce paramètre sur la solubilité des composés, car celle-ci diminue lorsque la température augmente. Pour toutes ces raisons, le maintien de la température à une valeur stable est souhaitable pour garantir les performances de l'unité.

Dans un biofiltre, la température de travail est en premier lieu contrôlée par celle du courant gazeux à l'entrée. Dans les biolaveurs à cellules fixées et les biolaveurs, la température du milieu siège des réactions biologiques dépend aussi du débit de recirculation de la phase aqueuse. D'un point de vue économique, le coût du contrôle de la température de l'air d'alimentation est un facteur qui détermine le choix d'une technologie de bioépuration par rapport à un autre mode de traitement. En effet, si les effluents à traiter sont portés à une forte température, supérieure à 100 °C, le coût de l'opération de refroidissement devient prohibitif, et oriente vers le choix d'une technologie plus conventionnelle, telle que l'oxydation thermique (Perry et Green, 1997).

2.4.5.3. Contrôle de l'évolution du pH

Pour que tous les nutriments essentiels au développement des micro-organismes soient présents et biodisponibles, il est nécessaire de contrôler l'évolution du pH du milieu. La

plupart des systèmes de traitement biologique opèrent à un pH allant de 5 à 9. La valeur optimale du pH dépend de la souche de micro-organismes employée. Dans un biolaveur, le pH doit aussi être compatible pour l'absorption des polluants (Le Cloirec *et al.*, 1998). En biofiltration, les supports organiques utilisés présentent généralement des pH compris entre 6 et 8 (Fanlo *et al.*, 2006).

La stabilité de ce paramètre est une condition de bon fonctionnement du procédé car toute modification de sa valeur a une influence sensible sur l'activité microbienne. Or, l'oxydation aérobie des composés organiques conduit à la formation de dioxyde de carbone qui est un acide faible. Son accumulation dans le système tend ainsi à abaisser le pH du milieu provoquant une diminution de la diversité microbienne (Sercu *et al.*, 2005 ; Soupramanien *et al.*, 2012). L'oxydation du sulfure d'hydrogène, de composés organo-halogénés, de composés contenant de l'azote, peut également induire de fortes variations du pH en raison de la formation de métabolites acides ou basiques.

L'emploi d'un agent tampon solide ajouté au garnissage peut être un moyen efficace de contrôle du pH (Wani *et al.*, 1997). Jager *et al.* (1993) reportent ainsi que l'emploi de solution de chaux à une teneur de 1% dans un biofiltre traitant H₂S permet non seulement d'éviter les baisses de pH dues à la formation d'acides secondaires, mais accroît aussi la durée de vie du matériau.

Le lavage à l'eau peut constituer un autre moyen de ramener le pH à une valeur compatible avec le processus de dégradation biologique. Par exemple, dans le cas du traitement d'H₂S dans un biofiltre, Edwards et Nirmalakhandan (1996) préconisent ce moyen pour épurer le lit des produits d'oxydation (SO₄²⁻).

2.4.5.4. Prétraitement des effluents

Le fonctionnement d'un procédé biologique peut être affecté par la présence de particules dans l'effluent (poussières, graisses ou résines), à l'origine de problèmes de colmatage du matériau filtrant dans le cas du biofiltre ou du biolaveur à cellules fixées ou du système de distribution de l'effluent (Dharmavaran *et al.*, 1993). Dans de tels cas, il est nécessaire d'envisager une préfiltration de l'effluent, plus particulièrement lorsque la concentration de particules est élevée.

2.4.6. Choix d'une technologie de traitement

Il est évident que le choix d'un système de traitement du polluant est multicritères et qu'en fonction de paramètres prépondérants objectifs, un traitement sera retenu par le biotechnologiste. Ces critères reposent sur les avantages et inconvénients des différents procédés ainsi que leurs coûts d'investissement et de fonctionnement.

Au travers de la description des conditions d'application des procédés de bioépuration conventionnels, il apparaît que l'un des critères majeurs à prendre en compte pour effectuer le choix d'une technologie est l'hydrosolubilité du ou des composés à dégrader.

Kok (1992) propose ainsi un diagramme préconisant le bioprocédé adapté en fonction du coefficient de partage air-eau du composé et de sa concentration. Dès lors, on constate que parmi les trois biotechnologies traditionnelles, la biofiltration est communément employée à l'échelle industrielle, car elle peut être appliquée à des composés faiblement solubles. En particulier, cette technologie est appropriée pour traiter des effluents contaminés par des mélanges de composés organiques volatiles et composés volatils soufrés qui possèdent une faible solubilité dans l'eau. Bien que les technologies plus récentes comme les bioréacteurs à membrane ou les biolaveurs avec utilisation de solvant soient prometteuses pour l'abattement des composés organiques soufrés, il n'y a pas eu à notre connaissance d'exemple d'utilisation dans ce domaine (Herrygers, 2000).

D'autres considérations techniques sont également à prendre en compte. En particulier, il existe souvent un compromis à définir entre la possibilité de contrôle des paramètres opératoires (température, pH et humidité) qui optimise les performances du système, et la simplicité de mise en œuvre. Le tableau 5 rassemble pour les trois traitements biologiques, le biofiltre, le biolaveur à cellules fixées et le biolaveur, leurs avantages et inconvénients spécifiques.

En plus, la nécessité d'effectuer des opérations de traitement des effluents en amont, destinées par exemple à humidifier le filtre ou à abaisser la concentration d'un composé toxique pour l'activité microbienne ou faiblement hydrosoluble, doivent être inclus dans les critères de choix. Il en est de même pour les traitements en aval des eaux usées ou des boues excédentaires générées par les laveurs biologiques et les biolaveurs à cellules fixées.

Tableau 5. Avantages et inconvénients des différents procédés biologiques (Edwards et Nirmalakhandan, 1996 ; Delhoménie et Heitz, 2005).

| Procédé biologique | Avantages | Inconvénients |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biofiltre | <ul style="list-style-type: none"> -Faibles coûts d'investissement et de fonctionnement. - Simplicité de mise en œuvre. - Bonne capacité dépurative à faibles concentrations de polluants. - Dégradation des composés faiblement solubles. -Pas d'effluents liquides générés | <ul style="list-style-type: none"> - Installations de grande taille. - Remplacement du média filtrant tous les 2 à 5ans. - Performances moindres dans le cadre du traitement de concentrations élevées en polluants. -Humidité et pH plutôt difficiles à contrôler. - Risque de colmatage par des fines particules. |
| Biolaveur à cellules fixées | <ul style="list-style-type: none"> -Coûts de fonctionnement faibles. - Bonnes capacités d'épuration, même à fortes concentrations. -Traitement efficace de composés acides grâce au contrôle de pH. | <ul style="list-style-type: none"> -Coûts d'investissement plus élevés. - Equipement et maintenance plus complexes. - Risque de colmatage du garnissage résultant d'un excès de nutriments ou lors du traitement de gaz contenant de fortes concentrations en polluants. |
| Biolaveur | <ul style="list-style-type: none"> - Contrôle commande possible. - Transfert de masse important. - Bonnes capacités épuration à haute concentration en polluant. - Système stable. -Addition possible de substrat. | <ul style="list-style-type: none"> -Maintenance et traitement aval. -Production de biomasse. -Nettoyage du garnissage. |

Les coûts d'investissement et de fonctionnement des procédés de biolavage sont généralement supérieurs à ceux d'un biofiltre ou d'un biolaveur à cellules fixées. Pour un biofiltre en effet, le coût d'exploitation est faible puisqu'il correspond seulement à celui de l'électricité nécessaire aux équipements mécaniques pour la circulation des gaz et le brassage, et au changement du matériau filtrant, tous les 2 à 5 ans. Leson et Winer (1991) ainsi que Diks (1992) rapportent que le coût d'investissement pour le traitement de l'air par un biofiltre est entre de 2 à 5 euro/m³/h, alors que par un biolaveur il est entre de 5 à 20 euro/m³/h.

3. MATERIELS ET METHODES

Notre présente étude sur la biodégradation du diaphag à l'aide d'un biolaveur à cellules fixées a été réalisée au niveau du Laboratoire de Recherche du Département de Biochimie de l'Université Badji Mokhtar- Annaba pendant une période de deux années (septembre 2015-septembre 2017).

3.1. Screening et sélection des microorganismes

3.1.1. Origine du consortium microbien

Deux écosystèmes différents ont été ciblés dans le but d'isoler une biomasse microbienne diversifiée qui est destinée à la biodégradation du diaphag.

Le premier échantillon a été récolté, dans les bassins de traitement biologique d'eaux usées (STEP) de Lallelick situés au sud-est de la ville d'Annaba (Algérie). Cette station est la troisième à l'échelle nationale. Elle assure l'épuration des eaux avec un débit moyen de 83620 m³ d'eau/j. Le deuxième échantillon a été, quant à lui, prélevé à partir d'un sol à caractère agricole situé dans la région de Ben-Mhidi (est Algérien).

Le choix de ces deux différents écosystèmes se trouve être justifié. En effet, les boues activées, contenues dans les échantillons d'eau usées, ainsi que le sol agricole renferment une grande diversité de micro-organismes qui sont potentiellement aptes à dégrader une large diversité de polluants d'où le diaphag. Par ailleurs, ces deux écosystèmes, longuement et périodiquement en contact avec une diversité de xénobiotiques, ont plus de chance, de renfermer dans leur communauté microbienne, une multitude de microorganismes préalablement adaptés et acclimatés à des structures analogues au xénobiotique utilisé dans cette présente recherche.

Les échantillons d'eaux usées ont été prélevés dans des flacons en verre de 250 ml à raison de 200 ml d'eau par échantillon. Ceux du sol, ont été prélevés dans des sacs en plastique à raison de 200 grammes par échantillon. Les prélèvements ont été immédiatement transportés au laboratoire sans aucune mesure particulière.

Pour une première mise en contact avec le xénobiotique, chaque prélèvement a été inoculé à 100 ml de milieu MBS stérile contenu dans des erlenmeyers de 250 ml, à raison de 50 ml pour les eaux usées et de 10 grammes pour le sol. Les erlenmeyers ont été incubés dans un agitateur modèle »ping-pong« pendant une semaine à 30 °C avec une agitation avoisinant les 200 rpm.

A l'issus de cette première mise en contacte, chaque biomasse provenant des deux prélèvements (eau et sol) a été récupérée par centrifugation à 5000 rpm puis un mélange des deux biomasses a été réalisé aléatoirement avant son inoculation de nouveau à du milieu MBS neuf.

Cette biomasse combinée va servir comme inoculum microbien unique destiné à l'acclimatation du consortium microbien ainsi qu'à la biodégradation du diaphag.

3.1.2. Le diaphag

Le diaphag est un produit pharmaceutique commercialement très important. Il est un hypoglycémiant oral. Il est utilisé pour le traitement du diabète de type 2 (non insulino-dépendant). Chez l'adulte, il est prescrit lorsque le régime alimentaire et l'exercice physique seuls ne sont pas suffisants pour rétablir l'équilibre glycémique. Il appartient à la famille chimique des sulfonylurées, des agents stimulants de la sécrétion d'insuline par la cellule bêta du pancréas (Nirupama *et al.*, 2014). Le diaphag possède également une activité antiplaquettaire et réduit les niveaux de radicaux libres, prévenant ainsi les complications vasculaires. Il a également été rapporté qu'il réduisait les taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides après une administration répétée (Tripathi., 2004 ; Brunton *et al.*, 2006).

Le diaphag est un produit pharmaceutique fabriqué en Algérie par le groupe industriel pharmaceutique SAIDAL. Il se présente sous forme d'un comprimé quadri sécable, de couleur blanche, dosé à 80 mg de gliclazide. Il est composé d'un principe actif qui est le gliclazide et des excipients qui sont : gomme arabique, lactose, stéarate de magnésium, talc, eau purifiée. Il est contre indiqué chez les diabètes insulino-dépendant, diabètes infantile et juvénile et chez les personnes qui présente des allergies aux sulfamides.

Les principales caractéristiques du gliclazide sont décrites dans le tableau 6. Il s'oxyde si on l'expose à lumière ou à l'air. Il doit être stocké dans un endroit sec, à une température inférieur de 25 °C et à l'abri de la chaleur et la lumière directe.

- **Formule brute** : $C_{15}H_{21}N_3O_3S$

- **Formule chimique** : 1-(hexahydrocyclopenta [c]pyrrol-2(1*H*)-yl)-3-[(4-méthyl-phényl) sulfonyl] urée (Rao and Nikalje, 2011).

-**Structure chimique** : la structure chimique du gliclazide est représentée par la figure 7.

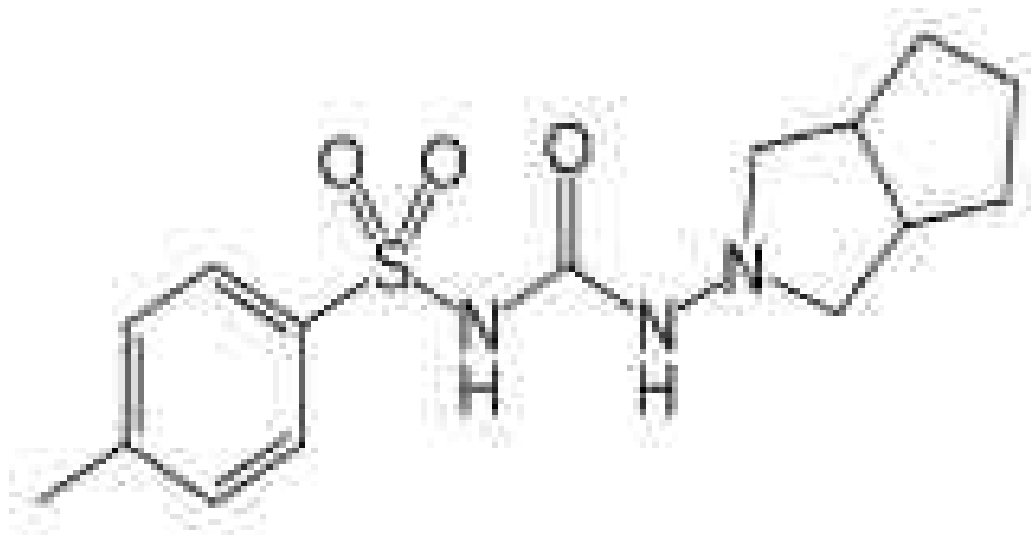


Figure 7. Structure chimique du gliclazide (Şenkardeş *et al.*, 2017).

Tableau 6. Propriétés physico-chimiques du gliclazide (Jones *et al.*, 2002 ; Khan et Ongerth, 2004).

| | |
|----------------------------------------------------------------|--------------------|
| État physique | Solide |
| Apparence | Poudre |
| Couleur | Blanche |
| Masse molaire | 323.4 g/mol |
| Solubilité dans l'eau | ≤1% |
| Solubilité dans les solvants organiques : | |
| Chlorure de méthylène | Facilement soluble |
| Acétone | Assez soluble |
| Ethanol à 96% | Peu soluble |
| Point de fusion | 163-171 °C |
| Constante de dissociation pKa | 5.8 |
| Coefficient de partage n-octanol/eau | 2.12 |
| Coefficient de distribution entre l'eau et l'éthanol au pH 7.4 | 0.4 |
| Coefficient de partage carbone organique/eau | 1.27e+004 |
| DT50 par biodégradation aérobie à 2000 mg.L ⁻¹ | 49 h |

Le tableau 7, montre les propriétés écotoxiques du gliclazide sur différents organismes de l'environnement.

Tableau 7. Les propriétés écotoxiques du gliclazide (Sarkar *et al.*, 2011).

| Toxicité du sur les animaux | Valeurs |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------|
| Souris- toxicité aiguë par voie orale DL50 du gliclazide (mg/kg) | > 4000 |
| Rat mal- toxicité aiguë par voie orale DL50 du gliclazide (mg/kg) | 3733 |
| Rat femelle- toxicité aiguë par voie orale DL50 du gliclazide (mg/kg) | 3407 |
| Cobaye - toxicité aiguë par voie orale DL50 du gliclazide (mg/kg) | 2068 |
| Chien- toxicité aiguë par voie orale DL50 du gliclazide (mg/kg) | > 3000 |
| Daphnia magna- toxicité aiguë CE50 du gliclazide (mg/L) | > 150 |

3.1.3. Le milieu de base saline (MBS)

Le milieu MBS (milieu de base saline), est utilisé en tant que milieu de base, siège de la biodégradation. Le milieu MBS utilisé dans cette présente étude pour la sélection et l'acclimatation d'un consortium microbien en présence du diaphag comme unique source de carbone et l'étude des cinétiques de croissance.

Le MBS sera aussi employé sous sa forme solide (20 g/litre d'agar) complété du diaphag pour l'isolement et la purification des souches sélectionnées. Ce dernier est directement introduit dans la boîte de pétri à la concentration choisie avant gélification. La composition du milieu est la suivante (voir tableau 8).

Tableau 8. Composition du milieu minéral MBS (El Aalam *et al.*, 1993).

| Composant | Quantité |
|-------------------------------------------------|----------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1.75 g |
| K ₂ HPO ₄ | 4 g |
| MgSO ₄ -7H ₂ O | 0.5 g |
| CaCl ₂ | 0.15 g |
| NaCl | 1 g |
| FeCl ₃ | 5 mg |
| MnCl ₂ -H ₂ O | 1 mg |
| CuSO ₄ | 1 mg |
| Na ₂ MoO ₄ | 1 mg |
| ZnCl ₂ | 1 mg |
| H ₂ O | 1 litre |

Le milieu de culture est stérilisé avant utilisation à 121°C pendant 15 minutes.

3.1.4. Sélection et acclimatation du consortium microbien en culture batch

L'acclimatation ainsi que la sélection du consortium microbien apte à biodégrader le diaphag comme unique source de carbone et d'énergie ont été réalisées en batch (culture discontinue). Les fermentations ont été menées dans des erlenmeyers à baffles de 250 ml contenant 100 ml de milieu minéral MBS. Le milieu minéral a été inoculé avec 20 ml de l'inoculum microbien (biomasse) préalablement préparé. Le diaphag (substrat), seule source de carbone et d'énergie, est ajouté au milieu à une concentration de 0.1 gramme/L. Les erlenmeyers, hermétiquement scellés à l'aide de bouchons en silicone (figure 8), sont incubés à 30 °C et agités à 200 rpm sur un agitateur de type « ping-pong » pendant une semaine. A l'issue de ces premières fermentations, les cultures sont arrêtées, puis centrifugées à 5000 rpm pendant 20 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de type SIGMA 2-16PK (Germany). Les culots obtenus sont lavés avec une quantité minimale de tampon phosphate (pH 7), puis recentrifugés une seconde fois à 5000 rpm. La biomasse ainsi recueillie est mise en suspension dans du tampon phosphate et servira d'inoculum pour les prochaines fermentations qui seront menées dans les mêmes conditions de culture. Des tests de viabilités sont effectués régulièrement, par ensemencement sur de la gélose nutritive, afin de s'affranchir de la viabilité des microorganismes.

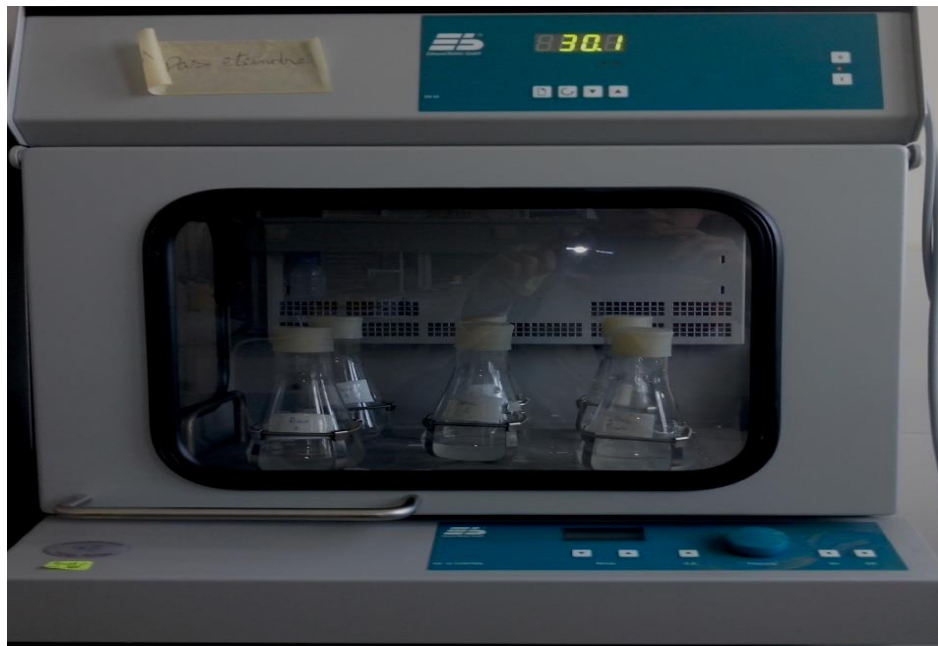


Figure 8. Culture en batch du consortium microbien en présence du diaphag.

3.2. Méthodes analytiques

Au cours de la période d'acclimatation et d'adaptation du consortium microbien en présence du diaphag, présent dans le milieu comme unique source de carbone et d'énergie, les fermentations sont suivies régulièrement par des mesures de densités optiques des cultures, mesures du pH du milieu de croissance, par la détermination des poids sec des cultures et également par le dosage du substrat. En outre, des tests de viabilité sont réalisés afin de s'affranchir de la viabilité des microorganismes.

3.2.1. Mesure de la densité optique (DO)

L'évolution de la croissance cellulaire du consortium microbien en présence du diaphag est suivie en mesurant la densité optique de la culture à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre modèle « SECOMAM Prim ».

3.2.2. Mesure du poids sec

L'évolution de la biomasse au cours de la fermentation est également suivie par la mesure du poids sec de la culture microbienne. Ainsi, 5 ml de la culture sont centrifugés à 5000 rpm pendant 20 minutes à l'aide d'une centrifugeuse modèle SIGMA 2-16PK (Germany). Les culots obtenus sont suspendus dans 5 ml d'eau distillée stérile et centrifugés une seconde fois à 5000 rpm. Après un deuxième lavage à l'eau distillée stérile, les culots sont repris encore une fois dans 5 ml d'eau distillée stérile qui seront placés dans des coupelles préalablement tarées. Après une première pesée des coupelles, celles-ci sont déposées dans une étuve à 110 °C. Après une nuit de séchage, les coupelles sont retirées et pesées une seconde fois. La différence de poids obtenue entre les poids initiaux et après séchage constitue le poids de la biomasse microbienne contenue dans l'échantillon de culture.

3.2.3. Mesure du pH

La variation du pH du milieu de culture est un indicateur de la croissance de la biomasse microbienne. La détermination de ce paramètre est réalisée par le biais d'un pH mètre modèle « INOLAB WTW ».

3.2.4. Mesure de l'adhérence cellulaire

L'adhérence des cellules microbiennes est mesurée selon le protocole **BATH** (bacterial adherence to hydrocarbon) développé par **Rosenberg (1984)**. Une quantité minimale de la culture microbienne est prélevée et centrifugée une première fois à l'aide d'une centrifugeuse SIGMA 2-16PK à 5000 rpm pendant 15 minutes. Le culot obtenu est lavé avec du tampon phosphate (0.1 M), puis centrifugé une seconde fois. Il est remis en suspension dans du tampon phosphate et la DO est déterminée à 600 nm (**DO₁**). Puis 0.2 ml de xylène sont ajoutés à 2.5 ml de la suspension microbienne. Le mélange est agité au vortex pendant 1 minute. Après 15 minutes de repos, la phase aqueuse est récupérée et la DO est déterminée de nouveau (**DO₂**). Le pourcentage d'adhérence des cellules est donné par la formule suivante :

$$A(\%) = [(DO_1 - DO_2) / DO_1] \times 100$$

3.2.5. Dosage du diaphag

Le dosage du diaphag a été réalisé à l'aide d'une chromatographie en phase liquide (HPLC) (Waters, e 2695, Singapour). Les caractéristiques et les conditions d'analyse sont les suivantes (Sasi Kiran Goud *et al.*, 2012) :

Colonne : C18 (250 mm×4.6 mm ; 5μ) (waters)

Température de la colonne : 30 °C

Température du four : 25°C

Détecteur : UV visible (2489)

La longueur d'onde du détecteur : 261 nm

Phase mobile : mélange tampon phosphate pH 6.6 et acétonitrile (60 : 40 v/v)

Débit de la phase mobile : 1ml/minute

Un échantillon de 10 ml est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur puis centrifugé à 5000 rpm pendant 15 minutes. La phase aqueuse est recueillie et filtrée sur un filtre à seringue millipore 0.2 μm. 100 μl de cet échantillon sont ensuite injectés dans le chromatographe.

3.3. Etude de l'effet de la concentration du diaphag sur la croissance du consortium microbien en culture batch

L'étude de l'effet de la concentration du diaphag sur la croissance du consortium préalablement acclimaté pendant une période de cinq mois a été réalisée en batch. Les cultures ont été menées dans des erlenmeyers à baffles de 250 ml contenant 100 ml de milieu minéral MBS. Le milieu minéral a été inoculé avec 10 ml d'un inoculum constitué du consortium préalablement acclimaté au diaphag. Ce dernier a été ajouté au milieu à différentes concentrations 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 et 1 g/L.

Les erlenmeyers, hermétiquement scellés, sont incubés pendant une semaine à 30 °C sous une agitation avoisinant les 200 rpm obtenue à l'aide d'un agitateur de type « ping-pong ». L'évolution de la culture a été suivie par mesure de la densité optique (**DO**), par mesure du poids sec (**PS**) et par mesure du pH. Après six jours d'incubation, la biomasse est récupérée par centrifugation, et le milieu de culture (MBS) est remplacé par du milieu neuf pour un nouveau batch.

3.4. Isolement et identification du consortium sélectionné

A l'issus de cinq mois d'acclimatation et de sélection du consortium microbien en présence du diaphag, des tentatives d'isolements, de purifications et d'identifications des microorganismes composant la biomasse acclimatée ont ainsi été effectuées.

Les isolements ont été effectués, dans un premier temps, sur milieu MBS solide coulé en boîte de pétri. Ainsi, 0.1 g/L sont soigneusement incorporés, comme unique source de carbone et d'énergie, dans le milieu gélosé juste avant son refroidissement. 1 ml de l'inoculum prélevé à partir de la culture microbienne est aseptiquement étalé sur la surface de la gélose. Les boîtes sont ensuite mises en incubation à 30 °C pendant 1 semaine.

A l'issus d'une semaine d'incubation en présence du xénobiotique sur milieu MBS solide, les colonies obtenues sont soigneusement prélevées et individuellement repiquées sur de la gélose nutritive coulée en boîtes de pétri. Après incubation à 30 °C pendant 24 h, des

examens macroscopiques sont réalisés et la pureté des colonies obtenues est contrôlée à l'aide d'examens microscopiques après coloration de Gram.

L'identification préliminaire des souches isolées sur milieu MBS solide a été réalisée, en plus des examens macroscopiques et microscopiques, par la mise en évidence des enzymes : oxydase et catalase. La mobilité cellulaire a également été testée. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, une colonie isolée est prélevée et soigneusement ensemencée par simple piqûre centrale dans le milieu mannitol mobilité. Après 24 h d'incubation à 30 °C, l'apparition d'un voile autour de la piqure centrale indique la présence d'une mobilité. La dégradation du mannitol est mise en évidence par virage de la couleur du milieu (du rouge au jaune).

L'identification des espèces bactériennes à l'aide des galeries biochimiques **API 20E** et **API 20NE** (Bio Mérieux, France), a également été réalisée après purification des différentes colonies bactériennes obtenues sur gélose nutritive.

3.5. Biodégradation de diaphag en culture batch

Les cinétiques de dégradation du consortium microbien dégradant le diaphag ont été menées en culture batch. Le diaphag a constitué l'unique source de carbone et d'énergie pour les microorganismes. Les fermentations ont été menées dans des erlenmeyers à baffles de 250 ml contenant 100 ml de milieu minéral MBS. Le milieu minéral a été inoculé avec de la biomasse prélevée à partir de cultures réalisées sur gélose nutritive et incubées pendant 24 heures. Le diaphag a été ajouté au milieu à une concentration de 0.5 g/L.

L'incubation est effectuée à 30 °C avec agitation à 250 rpm sur un agitateur de type « ping-pong ». Les fermentations ont été suivies par la mesure de la densité optique à 600 nm, la mesure du poids sec de la culture et également par l'évolution du pH du milieu. L'élimination du diaphag dans le milieu a été suivie par le dosage de sa concentration dans la phase aqueuse.

Au cours des essais, les activités spécifiques de la culture mixte et de chacune des souches pures (AS en ng/mg.h) ont été déterminées. L'activité spécifique correspond à la quantité de substrat (ng) dégradé par unité de biomasse (mg) et par unité de temps (h).

3.6. Biodégradation du diaphag en culture continue

3.6.1. Le réacteur : biolaveur à cellules fixées (biotrickling filter)

Le biolaveur à cellules fixées ou biotrickling filter (figure 9) utilisé dans cette présente étude est constitué d'une colonne en verre d'une hauteur de 45 cm, d'un diamètre interne de 8.5 cm et d'une surface interne de 56.75 cm². Le fond de celle-ci est garni avec 1.55 Kg de pierres ponce comme support sur une hauteur de 30 cm. La phase aqueuse est composée de 0.3 litre d'une suspension de biomasse bactérienne et 0.7 litre de milieu minéral MBS, est contenue dans un flacon en verre de 2 litres dans lequel un agitateur est incorporé. La recirculation de la phase aqueuse sur du lit bactérien est assurée par une pompe péristaltique (MasterFlex, Cole-Parmer, USA) de débits variables. La température ambiante du réacteur est maintenue constante à 30 °C grâce à un circuit d'eau thermo statée par un thermoplongeur modèle polystat (Polystat24, Fisher Scientific, France). Le débit d'aération, constant, est contrôlé par un débitmètre (AALBORG, USA) alimenté avec de l'air du compresseur. La phase liquide est homogène du fait que le débit d'air et liquide sont importants. Toute la tuyauterie utilisée pour l'installation est en tygon qui est une matière compatible avec le diaphag. Les échantillons à analyser sont prélevés dans le flacon de soutirage situé en dessous de la colonne en verre.

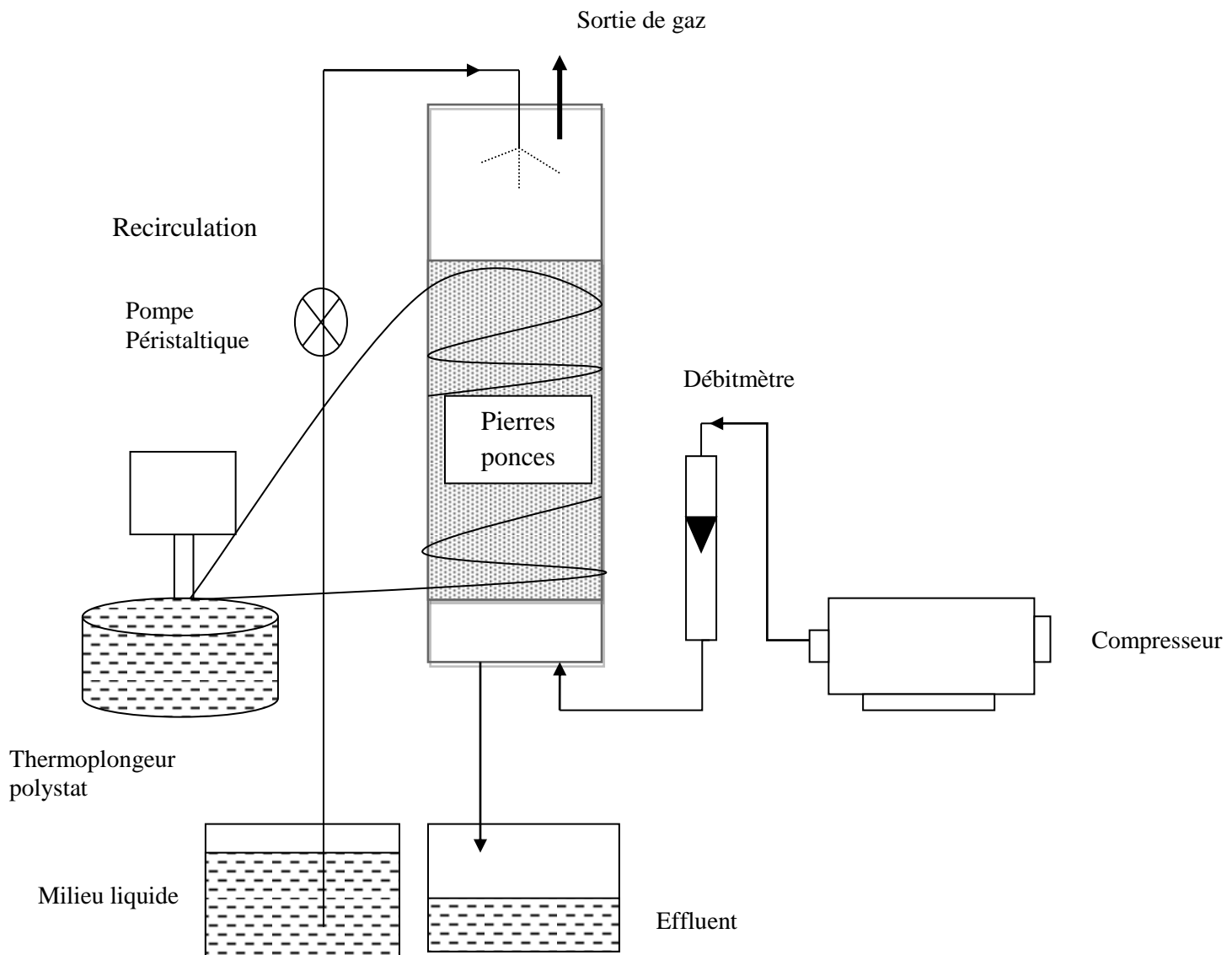


Figure 9. Dispositif expérimental du biolaveur à cellules fixées (biotrickling filter).

3.6.2. Le garnissage utilisé

Plusieurs types de supports ont été testés et utilisés dans les procédés biotechnologiques, lors de travaux sur la biodégradation des composés xénobiotiques, à savoir (Soupramanien, 2012) :

- les anneaux de Raschig ou de hiflow
- la pouzzolane
- plaques ondulées
- l'argile expansée à chaud
- la pierre ponce

Le garnissage doit répondre à plusieurs critères (Liu et Wang, 2012):

- assurer avant tout une rétention convenable des microorganismes
- posséder un degré de vide suffisant pour éviter les risques de colmatage liés au développement du biofilm
- permettre une distribution uniforme de l'eau dans la colonne
- être inerte biologiquement et chimiquement
- être mécaniquement stable
- être d'un accès commercial facile.

Seule la pierre ponce a été retenue dans cette présente étude comme support pour le biolaveur à cellules fixées. C'est une roche volcanique poreuse capable d'absorber des liquides. Ses caractéristiques sont les suivantes (Djeribi *et al.*, 2005) :

- Forme irrégulière arrondie
- Poreuse
- Masse volumique apparente : 660 g/L
- Diamètre moyen : 9 mm

La pierre ponce a été lavée deux fois à l'eau distillée stérile et séchée pendant 24 heures dans une étuve à 105 °C avant utilisation.

3.6.3. Essais de biodégradation

Le suivi de la dégradation du diaphag par le consortium préalablement sélectionné a été réalisé en culture continue. Les fermentations ont été menées dans un réacteur de deux litres, alimenté avec un volume liquide total de 1 litre composé de 0.7 litre du milieu MBS et 0.3 litre d'un inoculum constitué de la culture mixte capable de dégrader le diaphag, préalablement sélectionnée et acclimatée pendant plusieurs mois en batch (figure 10).

La concentration du diaphag à l'entrée du réacteur varie de 0.5 à 5 g/L. Le milieu de culture d'alimentation est apporté à l'aide d'une pompe péristaltique à des débits variables allant de 3.24 jusqu'à 14 L/h. Le débit d'air est de 20 L/min, maintenue constant durant toute l'expérimentation.

Le suivi de la croissance microbienne a été réalisé par la mesure du poids sec des pierres ponce. L'élimination du diaphag dans le milieu a été suivie par le dosage de sa concentration dans la phase aqueuse à la sortie du réacteur. Les essais sont réalisés en triplicata. Les paramètres cinétiques sont calculés pendant 120 jours du fonctionnement du réacteur par les formules suivantes:

-Temps de passage (h) = V/F

-Vitesse (m/h) = H/T_p

-Charge en diaphag (g/h) = $C_i \times F$

-Vitesse de charge en diaphag (g/L.h) = $(C_i/V) \times F$

-Élimination du diaphag (g/h) = $(C_i - C_f) \times F$

-Capacité d'élimination du diaphag (g/L.h) = $[(C_i - C_f)/V] \times F$

-Rendement de dégradation du diaphag (%) = $[(C_i - C_f)/C_i] \times 100$

F est le débit (L/h), **V** est le volume du garnissage (L), **H** est la hauteur du lit (m), **T_p** est le temps de passage (h), **C_i** est la concentration du diaphag à l'entrée (g/L), **C_f** est la concentration du diaphag à la sortie (g/L).



Figure 10. Biodégradation du diaphragme en culture continue dans un biolaveur à cellules fixées.

3.6.4. Isolement et identification des souches microbiennes composant le biofilms

A l'issus d'une année du fonctionnement du réacteur des tentatives d'isolements, de purifications et d'identifications des souches microbiennes composant le biofilms ont ainsi été effectuées.

Les isolements des souches microbiennes ont été effectués sur milieu MBS solide coulé en boîte de pétri. A l'aide d'une pince stérile quelques pierres ponces sont prélevées et soigneusement déposées dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu MBS stérile. L'erlenmeyer est agité au vortex pendant 20 minutes afin de libérer les cellules adsorbées. La suspension microbienne ainsi obtenue a étéensemencée sur milieu MBS solide contenant 0.1 g/L de diaphag comme unique source de carbone et d'énergie. Les boîtes sont ensuite mises en incubation à 30 °C pendant une semaine.

A l'issus d'une semaine d'incubation en présence du xénobiotique sur milieu MBS solide, les colonies obtenues sont soigneusement prélevées et individuellement repiquées sur de la gélose nutritive coulée en boîtes de pétri. Après incubation à 30 °C pendant 24 h, des examens macroscopiques sont réalisés et la pureté des colonies obtenues est contrôlée à l'aide d'examens microscopiques après coloration de Gram.

Une fois que la population est devenue stable, c'est -à-dire que l'on retrouve les mêmes espèces microbiennes après une série d'isolements et de repiquages, les différentes souches microbiennes sont isolées à nouveau et identifiées à l'aide des galeries biochimiques **API 20NE** (Bio Mérieux, France).

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Résultats d'Acclimatation et de sélection du consortium microbien en culture batch

La sélection d'un consortium microbien en présence du diaphag comme seule et unique source de carbone et d'énergie a été réalisée en culture batch (culture discontinue). Le milieu de culture est un milieu minéral (milieu de base saline) apportant les sels minéraux et les oligoéléments nécessaires à la croissance des microorganismes. Le milieu minéral a été inoculé avec 20 ml de l'inoculum microbien (biomasse) constitué de la culture mixte, préalablement collectée à partir d'une station d'épuration des eaux usées et un sol agricole. La sélection est réalisée à une température ambiante. Le diaphag est soigneusement ajouté à la concentration initiale de 0.1 g/L. La concentration du xénobiotique est maintenue très faible tout au long de la période d'acclimatation afin d'éviter l'inhibition de la croissance microbienne par excès de substrat. L'évolution de la culture a été suivie par mesure de la densité optique (DO) et par mesure du poids sec (PS). La biomasse est périodiquement récupérée par centrifugation et inoculée dans un milieu neuf toutes les semaines afin d'éviter le vieillissement du milieu et une éventuelle limitation en sels minéraux et oligoéléments. En se basant sur la composition bactérienne élémentaire (tableau 9), nous nous sommes assurés que le milieu minéral MBS couvre assez largement les besoins cellulaires. Ainsi, nous ne pouvons pas limiter la croissance bactérienne en sels minéraux (azote, phosphore) ou en oligoéléments. Seule la source de carbone représente le facteur limitant de la croissance.

Tableau 9. Composition élémentaire des bactéries (Penaud, 1989).

| Elément | Pourcentage du poids sec (%) |
|-----------|------------------------------|
| Carbone | 50-53 |
| Hydrogène | 7 |
| Azote | 12-15 |
| Phosphore | 2-3 |
| Soufre | 0.2-1 |
| Potassium | 1-4.5 |
| Sodium | 0.5-1 |
| Calcium | 0.01-1.1 |
| Magnésium | 0.1-0.5 |
| Chlore | 0.5 |
| Fer | 0.02-0.2 |

A l'issus de cinq mois d'acclimatation du consortium en présence du diaphag, les résultats obtenus suite aux différents batch réalisés sont représentés par les figures 11 et 12.

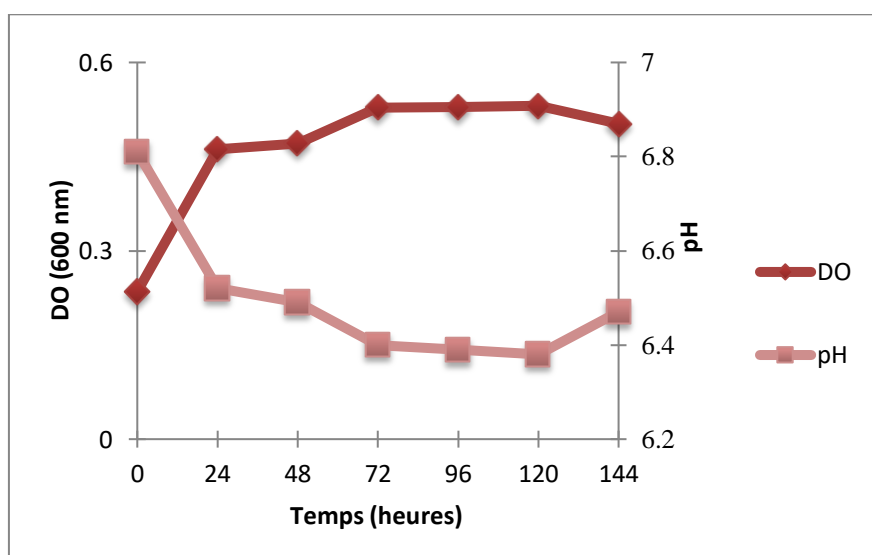


Figure 11. Croissance du consortium microbien en présence du diaphag (0.1 gramme/L).

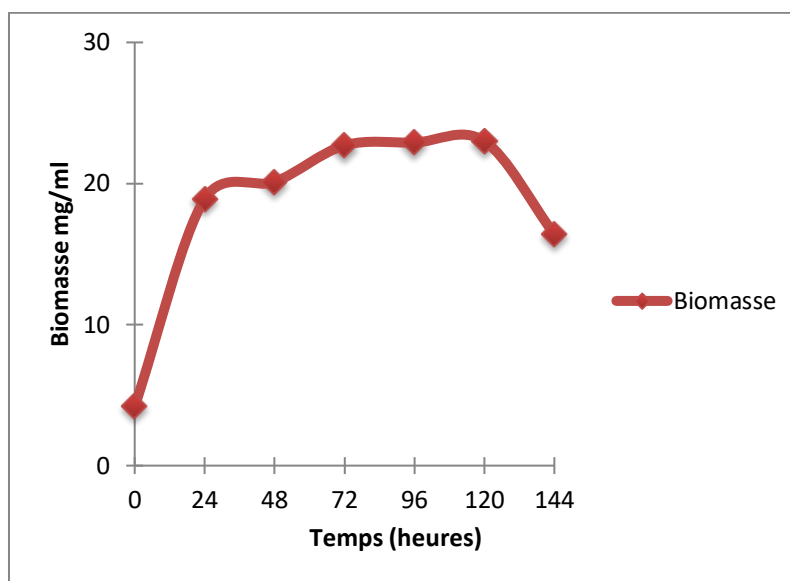


Figure 12. Evolution de la biomasse du consortium microbien en culture batch en présence de diaphag (0.1 g/L).

L'allure des courbes obtenues, a permis de mettre en évidence quatre phases de croissance assez distinctes. La première phase révèle, sur la base des densités optiques et des poids sec mesurés, un dédoublement de la biomasse microbienne après seulement 24 h de croissance en présence du xénobiotique. Cette première phase de croissance correspond en réalité à la phase d'accélération durant laquelle le consortium microbien semble avoir réussi à utiliser le diaphag, en absence de tout effet inhibiteur visible de ce dernier, comme unique source de carbone et d'énergie. L'absence, remarquée, d'une phase de latence au niveau de la courbe de croissance semble justifier le comportement assez intéressant du consortium. Au-delà des premières 24 h, l'allure de la courbe révèle une augmentation assez ralentie et progressive de la croissance jusqu'à atteindre une DO et une biomasse maximales au bout de 72 h d'incubation. Cette seconde phase, qui est une preuve supplémentaire du phénomène d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de croissance, correspond en réalité à la phase exponentielle de croissance proprement dite durant laquelle il y a diminution de la quantité de substrat disponible pour les microorganismes dans le milieu de culture.

Une troisième phase de croissance est amorcée dès la 72^{ème} heure et s'étend jusqu'à la 120^{ème} heure d'incubation de la culture. Il s'agit de la phase stationnaire de croissance qui révèle un ralentissement assez marqué de la croissance cellulaire en raison d'une quasi-disparition du substrat dans le milieu en plus de l'accumulation des produits de dégradation.

Par ailleurs, le suivi de la variation du pH a révélé une acidification progressive du milieu de culture. Cette nette diminution du pH, qui semble s'étendre jusqu'à la 120^{ème} heure d'incubation, est sans aucun doute liée à l'activité cellulaire présente dans le milieu de culture.

Dés la 120^{ème} heure d'incubation, une chute de la densité optique et du poids sec est amorcée. Il s'agit de la phase de déclin cellulaire. Cette phase correspond à une décroissance cellulaire consécutive au phénomène de lyse entraînant une libération des protéines dans le milieu. La présence de ces composés azotés justifie l'augmentation du pH de la culture.

Les résultats obtenus à l'issue des tests d'acclimatation du consortium microbien, révèlent l'absence d'effet toxique encore moins inhibiteur du diaphag. Bien au contraire, il semble que le consortium microbien a pu se développer en présence du xénobiotique additionné au milieu de culture comme seule et unique source de carbone et d'énergie. Cela semble confirmer une fois encore la forte adaptation et la très grande acclimatation des souches microbiennes à celui-ci. L'absence de phase de latence révèle quant à elle l'excellente adaptation des enzymes microbiennes à ce xénobiotique durant la période d'acclimatation ou bien encore dans leurs environnements originaires. Pitter et Chudoba (1990) ont nommé la phase d'acclimatation par une phase d'induction enzymatique.

L'acclimatation du consortium microbien en présence du diaphag a sans aucun doute permis non seulement de diminuer la durée de la phase de latence et d'accélérer le processus de dégradation mais également d'atténuer l'effet inhibiteur du xénobiotique sur la croissance souvent constaté en début de période d'adaptation.

Ces observations ont été faites par González *et al.* (2001) suite à leurs travaux sur la biodégradation du phénol, dans un bioréacteur à lit fluidisé avec des cellules immobilisées de *Pseudomonas putida*. Ils ont observé un taux de dégradation du phénol très élevé (capacité d'élimination maximale) lors de l'utilisation d'un consortium fortement adapté à celui-ci. Cependant, aucune dégradation n'a été constatée pour les souches non acclimatées. Chong et Lin (2007), ont obtenu eux aussi, lors de leurs travaux sur la biodégradation de l'acide 2,4-

dichlorophénoxyacétique (2,4-D), une capacité d'élimination maximale du xénobiotique par une biomasse acclimatée. Une fois encore, ces observations ont été faites par Aelion *et al.* (1987) lors de la biodégradation d'un mélange de composés xénobiotiques. Sahinkaya et Dilek (2005) ont observé, quant à eux, une diminution remarquable de l'effet toxique du 4-chlorophénol (4-CP) sur la culture après l'acclimatation des bactéries.

Lewis *et al.* (1986), Aamand *et al.* (1989) et Chong et Nguyen (2016) ont réussi à démontrer qu'il existe une corrélation entre l'acclimatation de la biomasse microbienne en présence des composés xénobiotiques à dégrader et la longueur de la phase de latence. En général, plus l'acclimatation de la biomasse augmente, moins la durée de la phase de latence diminue.

Plusieurs autres auteurs Buitrón (1993), El Fantroussi *et al.* (1998), Zhuang *et al.* (2005) et Hoppe-Jones *et al.* (2012) ont montré qu'afin d'accélérer le processus biologique, il est apparu intéressant d'ajouter des microorganismes acclimatés dans le milieu de réaction. Chong *et al.* (2014) ont montré, que la biodégradation de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique en présence de boue activée préalablement acclimatée démarrera plus vite et avec un taux élevé comparée à celle obtenue avec un consortium non acclimaté. Les travaux de Moreno-Andrade et Buitrón (2004) sur la biodégradation du 4-Chlorophénol par un procédé discontinu de type SBR (Sequencing Batch Reactor), ont montré quant à eux, au cours de l'acclimatation pour une concentration initiale de 50 mg/L du 4-CP que le temps de dégradation a été réduit de 40 heures à 50 minutes après 10 cycles.

L'efficacité de l'utilisation des procédés adaptés a été largement étudiée par Díaz (2004) au cours des travaux menés sur la biodégradation des polluants aromatiques, Ferro Orozco *et al.* (2013) sur la biodégradation du Bisphénol A, Katipoglu *et al.* (2010) sur la biodégradation de l'acide 2,6-dihydroxybenzoïque et peptone, Movahedyan *et al.* (2008) sur la biodégradation du 4-chlorophénol en utilisant un procédé discontinu de type SBR (Sequencing Batch Reactor), Swindoll *et al.* (1988) sur la biodégradation du phénol et du toluène. Truong et Nguyen (2016) sur la biodégradation du 2,4-D par boue activée en culture batch, Almeida *et al.* (2013) sur la biodégradation des produits pharmaceutiques par boue activée et culture pure et Jalayeri *et al.* (2013) sur la biodégradation du phénol en culture batch.

Dans le souci de s'acquiescer de la viabilité des microorganismes en présence du xénobiotique, des tests de viabilité cellulaire ont donc été réalisés, une fois par semaine, par

simple étalement d'une öse, prélevée dans la culture, sur la surface d'une gélose nutritive. Au bout de 24 h d'incubation seulement, une croissance microbienne est régulièrement révélée à la surface de la gélose, ce qui témoigne d'une réelle viabilité des microorganismes (figure 13).



Figure 13. Croissance du consortium sur la surface de la gélose nutritive (GN) après 24 h d'incubation à 30 °C.

4.2. Etude en batch de l'effet de la concentration du diaphag sur la croissance du consortium acclimaté

Après environ cinq mois de sélection et d'acclimatation du consortium incriminé dans la biodégradation du diaphag, nous avons étudié ici l'impact de la variation de la concentration initiale du diaphag sur la croissance de la population mixte en culture batch. L'intérêt de cette étude comparative vise à déterminer l'effet de la concentration du diaphag non seulement dans le processus de dégradation mais également à l'égard de la viabilité du consortium impliqué dans ce processus. Les essais de dégradation du diaphag ont été conduits dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu MBS et inoculé avec 10 ml de la biomasse préalablement acclimatée. Le diaphag est ajouté dans le milieu, comme seule source de carbone et d'énergie, à différentes concentrations de 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 et 1 g/L. Les erlenmeyers sont agités à raison de 200 rpm sur un agitateur à 30 °C. La croissance des cultures a été suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm et du poids sec. La variation du pH du milieu a été mesurée régulièrement au cours de l'incubation.

Les résultats des différents essais de biodégradation obtenus après environ une semaine d'incubation sont illustrés par les figures 14, 15 et 16. En effet, la comparaison des allures des courbes obtenues révèle nettement l'absence totale d'effet inhibiteur des différentes concentrations du diaphag sur la croissance du consortium microbien préalablement acclimaté. Au contraire nous assistons à un dédoublement de la biomasse microbienne au bout de 24 heures d'incubation en plus de la diminution du pH du milieu. Le maximum de croissance est obtenu après 120 h d'incubation à 30 °C. Le consortium microbien préalablement acclimaté est visiblement capable de croître en présence des différentes concentrations du diaphag comme seule source de carbone et d'énergie. Celui-ci semble s'être adapté pour dégrader et résister à de fortes concentrations du diaphag.

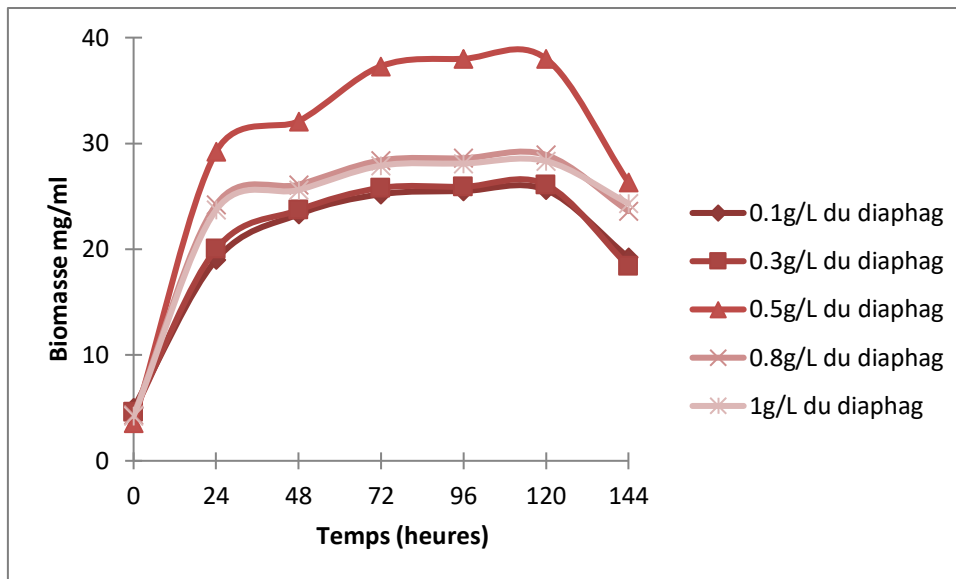


Figure 14. Evolution de la biomasse du consortium microbien acclimaté en culture batch.

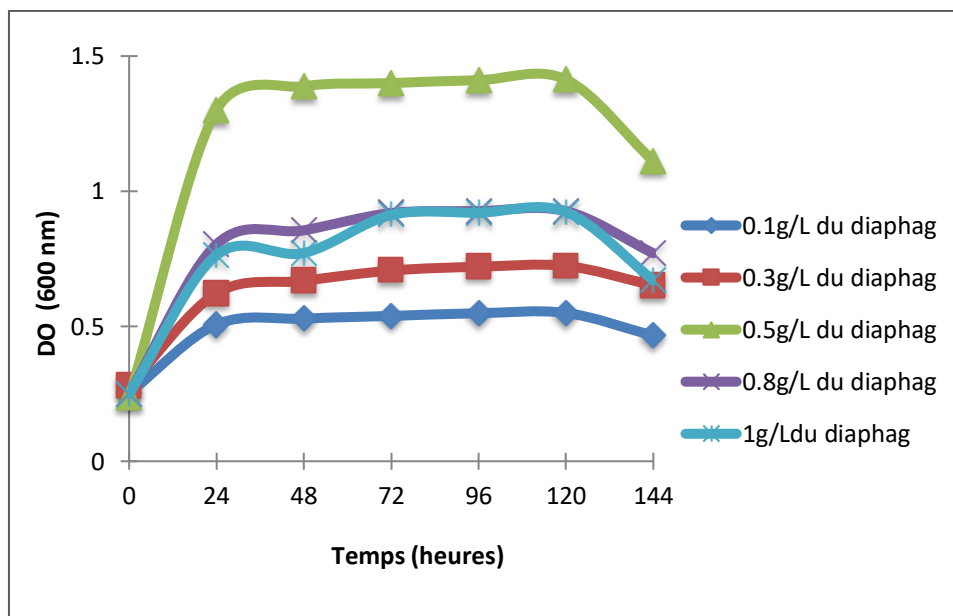


Figure 15. Evolution de la croissance du consortium microbien en culture batch.

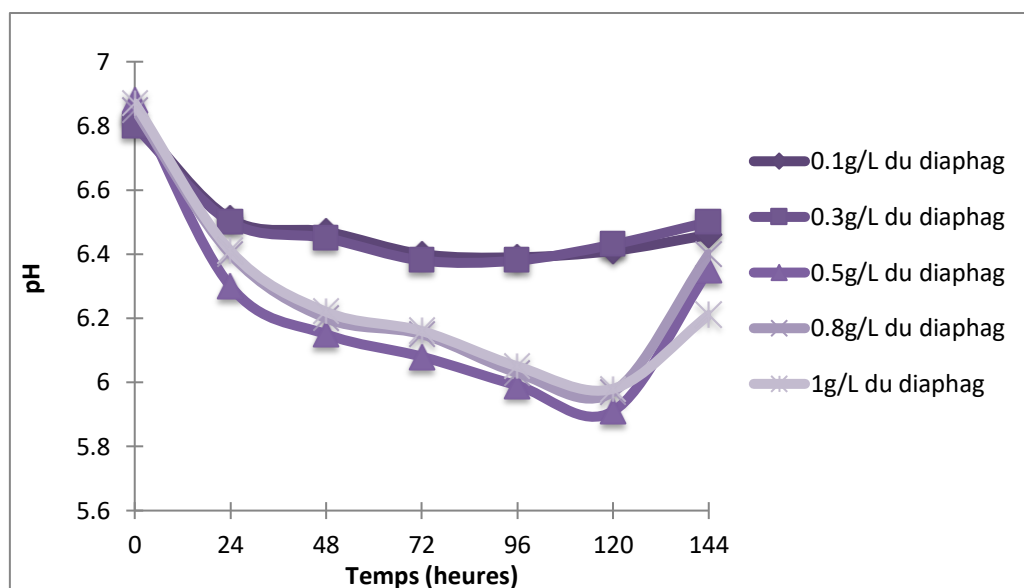


Figure 16. Evolution du pH du milieu lors de la croissance du consortium microbien en culture batch.

Cependant, ces différentes concentrations du substrat ne semblent pas avoir les mêmes effets sur l'activité microbienne. En effet, pour des concentrations de 0.1 g/L et 0.3 g/L la biomasse du milieu a atteint, en moyenne, un maximum estimé à 25.6 mg et 26.1 mg après 120 h d'incubation, respectivement. Alors que la biomasse de la culture pour une concentration de 0.5 g/L a atteint un maximum de 38.01 mg. Pour des concentrations supérieures à 0.5 g/L, la biomasse de la culture mixte est de 28.91 mg et 28.33 mg pour des concentrations de 0.8 g/L et 1 g/L, respectivement (figures 14). Ces observations ont également été constatées pour les variations de la densité optique (figure 15) et les variations du pH (figure 16). D'après ces résultats, nous constatons que la croissance maximale du consortium microbien a été observée pour une concentration en diaphag de 0.5 g/L. Les concentrations supérieures à cette valeur ont révélé des croissances moins importantes. En effet, la croissance commence à diminuer, et cela est dû probablement à une inhibition de la culture mixte en présence de fortes concentrations en diaphag (phénomène de toxicité). Ainsi il est clair que les souches microbiennes exhibent, sans aucun doute, une meilleure activité lorsque le xénobiotique est additionné, à une concentration de 0.5 g/L comme seule source de carbone et d'énergie. Ces résultats sont confortés par ceux obtenus par Markiewicz *et al.* (2017b). Ils ont rapporté à partir de leurs travaux de biodégradation, que les souches

microbiennes sélectionnées exhibent une très faible activité lorsque le diaphag est additionné au milieu à une concentration de 70 mg/litre.

Ainsi, suite à ces résultats, il nous a été possible d'estimer la concentration optimale du diaphag pouvant donner lieu à une croissance maximale et qui est de 0.5 g/L. Elle a donc été retenue pour la suite des expérimentations.

4.3. Etude de l'hydrophobicité du consortium microbien

La mesure de l'hydrophobicité du consortium microbien réalisée selon le protocole BATH (Bacterial Adherence To Hydrocarbon) (Rosenberg, 1984), a révélé que le consortium microbien acclimaté au diaphag exhibe une affinité non négligeable vis-à-vis du solvant apolaire utilisé (xylène). En effet un pourcentage d'hydrophobicité de **35 %** a été obtenu chez les cellules microbiennes ce qui révèle une adhérence moyenne des cellules. Des observations similaires ont été rapportées par Ascon-Cabrera et Lebeault (1993) et Gauthier *et al.* (2003) lors de travaux sur la dégradation d'hydrocarbures par des souches bactériennes. Ascon-Cabrera et Lebeault (1995) ont montré que l'augmentation globale de l'hydrophobicité de la biomasse est un facteur clé orientant vers une meilleure sélection de micro-organismes compétents au cours de leurs travaux sur la dégradation du 2,4,6- trichlophénol par une culture mixte.

4.5. Etude microbiologique du consortium dégradant le diaphag

L'étude microbiologique consiste en l'isolement et la caractérisation des microorganismes composant le consortium après une période d'acclimatation et d'adaptation de cinq mois en présence du diaphag comme seule et unique source de carbone et d'énergie.

Au bout d'une semaine d'incubation des boîtes de pétri ensemencées à l'aide d'une suspension du consortium mise en présence avec le diaphag, les résultats des observations macroscopiques préliminaires sont illustrées par la figure 17.

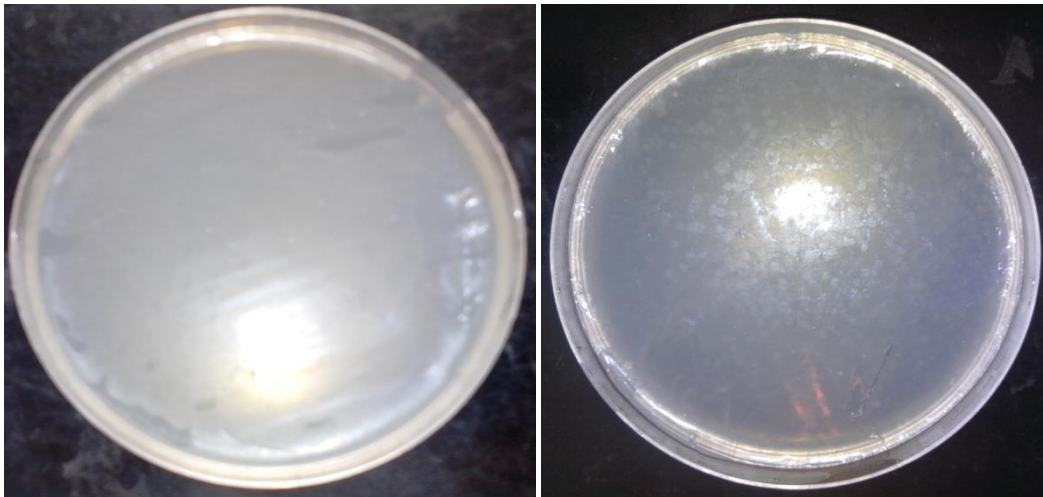


Figure 17. Isolement du consortium incriminé dans la dégradation du diaphag sur MBS solide après 7 jours d'incubation.

Des colonies d'apparence assez homogènes se sont développées et utiliser ainsi le xénobiotique comme seule source de carbone disponible dans le milieu. La présence du substrat dans le milieu MBS solide ne semble pas avoir eu un quelconque effet inhibiteur sur la croissance cellulaire.

Une série de repiquages, sur Mueller Hinton coulé en boîte, des colonies obtenues ont donc été réalisés dans le but de s'acquérir de la nature ainsi que du degré de pureté de la biomasse présente à la surface du milieu.

Les résultats obtenus suite aux examens macroscopiques effectués, ont révélé la présence de deux types de colonies à la surface du milieu de culture. Le premier type de colonies sont de nature opaque, rondes et de couleur rouge (figure 18). Le deuxième type, quant à lui, sont petites, de nature opaque, rondes de couleur beige (figure 19).



Figure 18. Isolement de la souche bactérienne 1 sur Mueller Hinton après une série de repiquages.

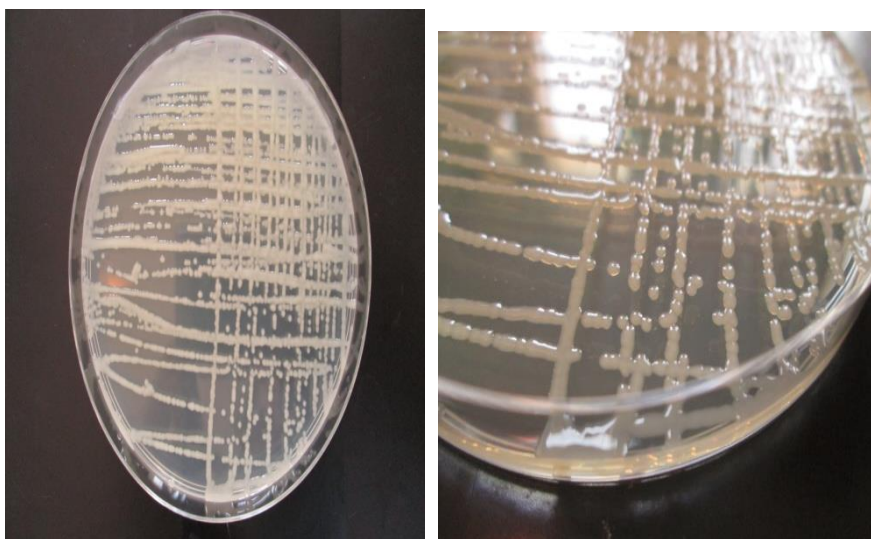


Figure 19. Isolement de la souche bactérienne 2 sur Mueller Hinton après une série de repiquages.

L'examen microscopique de quelques colonies prises aléatoirement à la surface du milieu gélosé, a révélé, après coloration différentielle de Gram, la présence de coccobacilles colorés en rose (Gram -) pour le premier type d'isolat, tandis que le second isolat indique la présence de courts bacilles colorés en rose (Gram -) (figure 20 et 21).

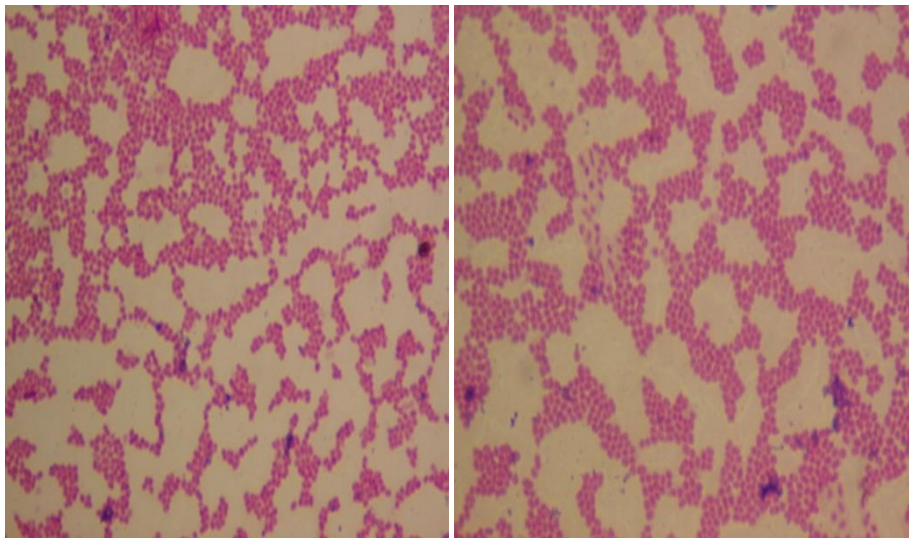


Figure 20. Observation microscopique du premier type d'isolat après coloration de Gram (Gross. $\times 100$).

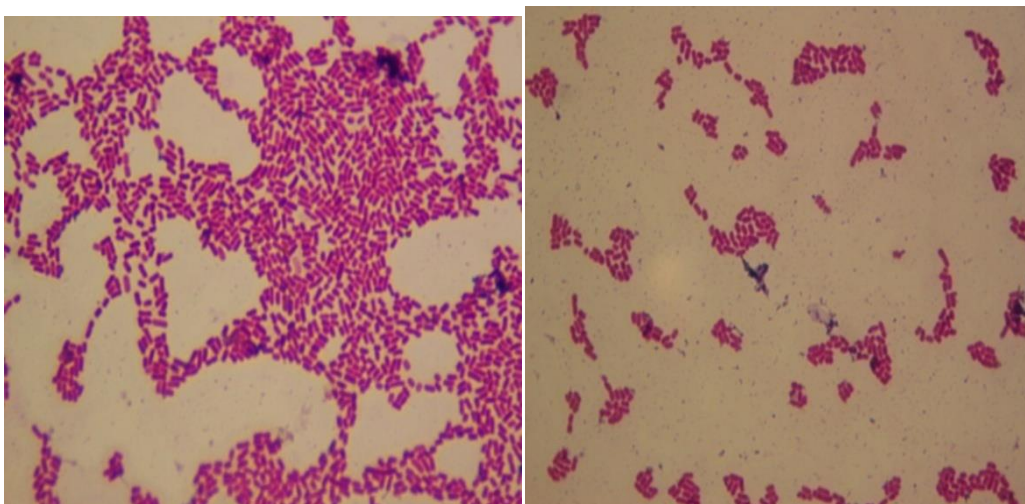


Figure 21. Observation microscopique du second isolat après coloration de Gram (Gross. $\times 100$).

Les résultats obtenus suite aux examens macroscopiques, microscopiques suivis des tests de la catalase et de l'oxydase sont regroupés dans le tableau 10. Le test de la mobilité cellulaire a révélé, quant à lui, une mobilité chez les souches isolées et purifiées.

Tableau 10. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches isolées.

| Caractères | Souche 1 | Souche 2 |
|--------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Forme des colonies | Petites colonies rondes, opaques et de couleur rouge | Petites colonies rondes, opaques et de couleur beige |
| Forme des cellules | Coccobacilles | De courts bacilles |
| Gram | Négative | Négative |
| Catalase | Positive | Positive |
| Oxydase | Négative | Positive |
| Mobilité | Mobile | Mobile |

L'identification des espèces bactériennes incriminées dans la biodégradation du diaphag a été rendue possible grâce à l'utilisation des galeries biochimiques API 20E et API 20NE (Bio Mérieux, France). Les résultats ainsi obtenus sont révélés par les figures 22 et 23 et regroupés dans le tableau 11 et 12. L'ensemble des caractéristiques biochimiques à partir des deux types de galeries a permis d'identifier, ainsi, l'espèce *Aeromonas hydrophila* et *Serratia odorifera* comme étant les seules souches bactériennes présentes dans le milieu et capable de métaboliser le xénobiotique comme unique source de carbone disponible.

Tableau 11. Résultats de la lecture de la galerie biochimique API 20E pour la souche *Serratia odorifera* après 24 h d'incubation à 37°C.

| API 20E | | | |
|------------------|-----------|------------|-----------|
| Caractères | Résultats | Caractères | Résultats |
| ONPG | + | GEL | + |
| ADH | + | GLU | + |
| LDC | + | MAN | + |
| ODC | + | INO | + |
| CIT | + | SOR | + |
| H ₂ S | - | RHA | + |
| URE | - | SAC | + |
| TDA | + | MEL | + |
| IND | + | AMY | + |
| VP | - | ARA | + |



Figure 22. Résultats de l'identification biochimique de *Serratia odorifera*

à l'aide de la galerie API 20E.

Tableau 12. Résultats de la lecture de la galerie biochimique API 20NE pour la souche *Aeromonas hydrophila* après 24 h d'incubation à 30 °C.

| API 20NE | | | |
|-----------------|-----------|------------|-----------|
| Caractères | Résultats | Caractères | Résultats |
| NO ₃ | + | MNE | + |
| TRP | + | MAN | + |
| GLU | + | NAG | + |
| ADH | - | MAL | + |
| URE | - | GNT | + |
| ESC | + | CAP | + |
| GLE | + | ADI | + |
| PNPG | + | MLT | - |
| GLU | + | CIT | + |
| ARA | + | PAC | - |

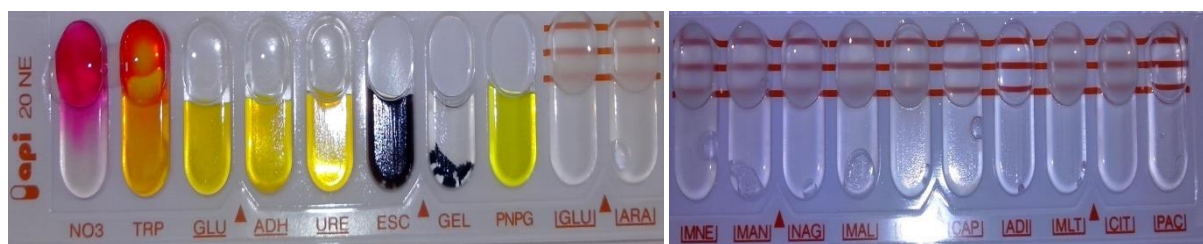


Figure 23. Résultats de l'identification biochimique d'*Aeromonas hydrophila* à l'aide de la galerie API 20NE.

Aeromonas hydrophila, une espèce bactérienne anaérobie facultative, appartient à la famille des Aeromonadaceae (Colwell *et al.*, 1986). Elle est ubiquitaire des environnements aquatiques (Hazen *et al.*, 1978), et peut être trouvée dans les eaux potables, d'égouts et douces (Schubert, 1975 ; Rippey et Cabelli, 1980 ; Burke *et al.*, 1984). Elle a été trouvée incriminée dans la biodégradation du bromuconazole en système biphasique MBS/huile de silicone (Ouartsy, 2010), dans la biodégradation du Carbendazime (Kalwasińska *et al.*, 2008) et dans la biodégradation de chlorure du benzyldiméthylalkylammonium (Patrauchan et Oriol, 2003).

Serratia odorifera, quant elle, a été trouvée incriminée dans la biodégradation du tributylphosphate (Berne *et al.*, 2004), ainsi que d'autres xénobiotiques (Khleifat, 2006 ; Ebrahimi *et al.*, 2012).

4.6. Essai de biodégradation du diaphag en culture batch

4.6.1. Détermination des souches aptes à dégrader le diaphag

La biodégradation du diaphag par chacune des souches pures préalablement isolées et identifiées et également de la culture mixte a été réalisée en culture batch. Les essais de dégradation du diaphag ont été conduits dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml du milieu MBS et inoculé avec 10 ml de la biomasse isolées et identifiées. Le diaphag est additionné dans le milieu de culture à la concentration initiale de 0.5 g/L. Les erlenmeyers sont agités à raison de 250 rpm sur un agitateur ping-pong à 30 °C. La disparition du xénobiotique dans le milieu a été suivie pendant une semaine. Parallèlement, l'évolution de la biomasse bactérienne a été, quant à elle, suivie par la détermination du poids sec et la densité de la culture à 600 nm. Les essais sont réalisés en triple pour chacune des souches bactériennes.

Les résultats de biodégradation par *Serratia odorifera* obtenus après environ une semaine d'incubation sont illustrés par les figures 24 et 25. Ainsi, les allures des courbes indiquent une disparition progressive du xénobiotique dans le milieu et une augmentation de la biomasse et de la DO de la culture pure. Le maximum de croissance, estimé en poids sec et en DO, a été atteint après 120 h (06 jours) d'incubation. La dégradation maximale du diaphag semble avoir eu lieu lors des premières heures de la culture. Ce qui est en parfaite corrélation avec l'évolution de la croissance des souches bactériennes qui, une fois encore, a atteint son maximum (phase exponentielle) aux alentours des 3 premiers jours de culture. Ces résultats révèlent que *Serratia odorifera* est capable de métaboliser et utiliser de façon quasi-certaine le diaphag comme unique source de carbone et d'énergie. La capacité de *Serratia odorifera* de dégrader le diaphag révèle sa réelle adaptation et sa grande affinité vis-à-vis du xénobiotique.

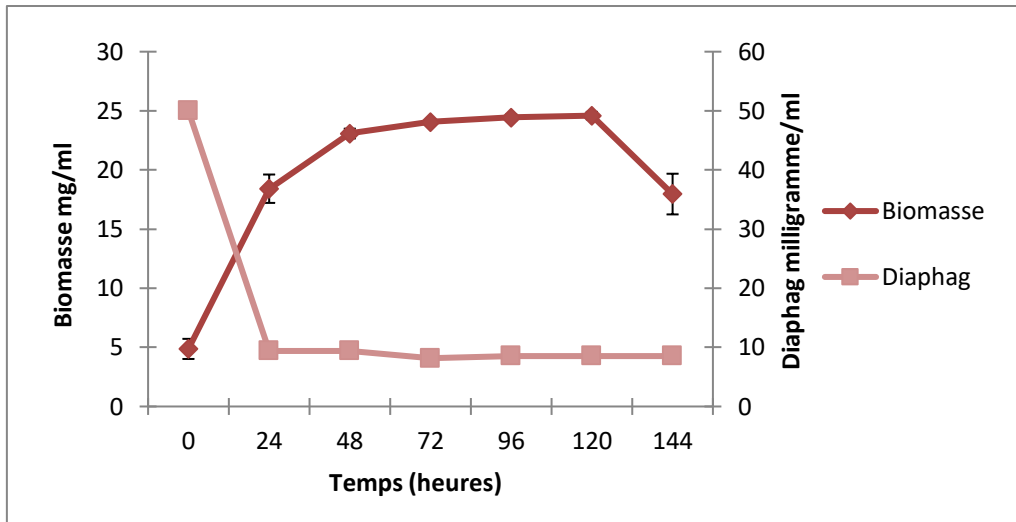


Figure 24. Dégradation du diaphag par *Serratia odorifera* en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d'agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

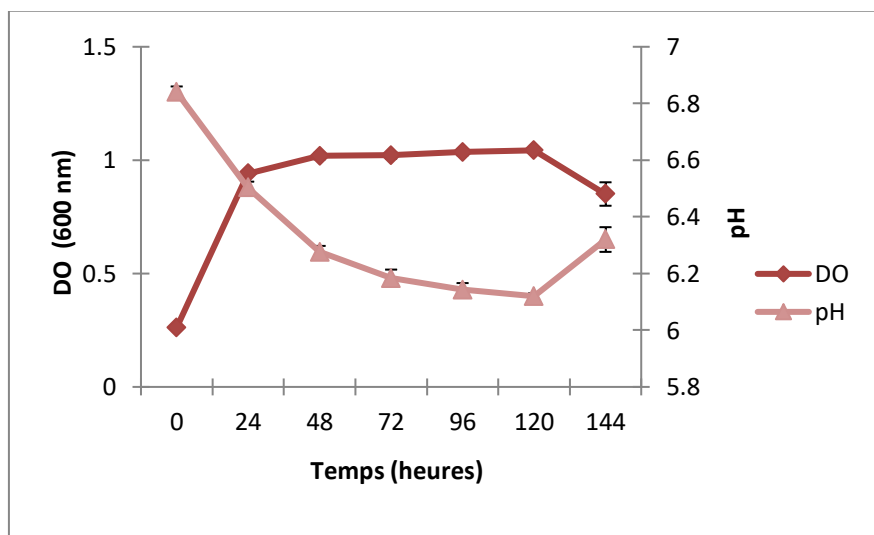


Figure 25. Croissance de *Serratia odorifera* en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d'agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Les résultats de la biodégradation du diaphag par *Aeromonas hydrophila* en batch sont représentés par les figures 26 et 27. L'allure des courbes de croissance révèle l'absence d'effet toxique du diaphag sur la croissance de la souche bactérienne. En effet, une croissance typique est ainsi obtenue avec une augmentation de la DO et de la biomasse de la culture suivie d'une acidification du milieu (diminution du pH). Le maximum de croissance est obtenue après 120 heures d'incubation à 30 °C. En plus, la concentration du diaphag diminue progressivement dans le milieu pour atteindre un minimum estimé à 5.93 mg/L au bout de 96 d'incubation. *Aeromonas hydrophila* est également capable de métaboliser et utiliser le diaphag comme unique source de carbone et d'énergie.

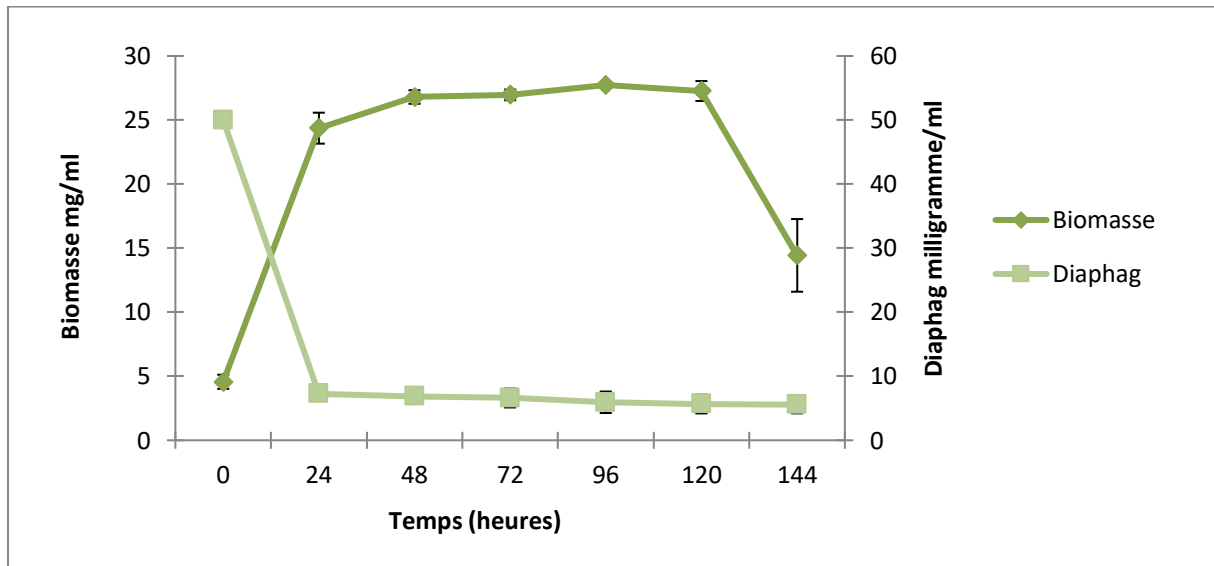


Figure 26. Dégradation du diaphag par *Aeromonas hydrophila* en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d'agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

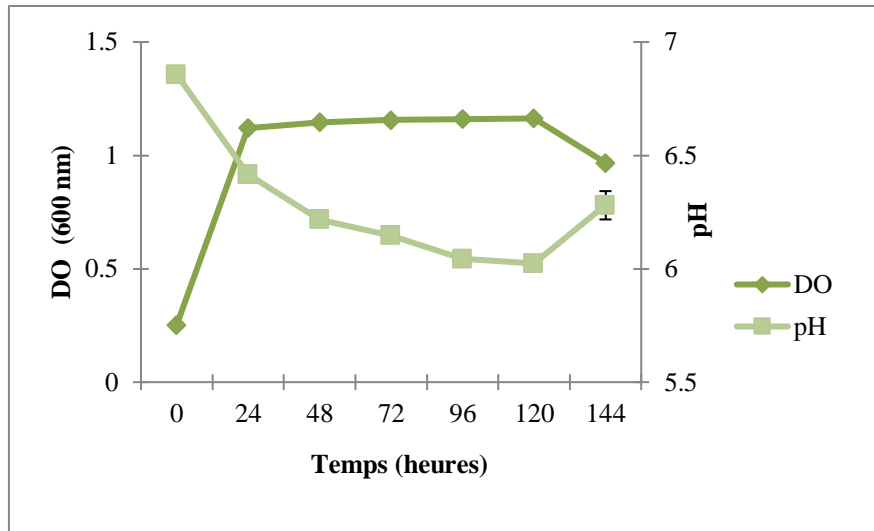


Figure 27. Croissance d’*Aeromonas hydrophila* en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d’agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Les figures 28 et 29 représentant la biodégradation du diaphag par le consortium mixte, illustrent une courbe de croissance typique c'est-à-dire avec une croissance exponentielle (augmentation de la DO et de la biomasse), une diminution du pH du milieu et une disparition totale du diaphag dans le milieu au bout de 72 heures d’incubation. La population mixte est donc capable de dégrader le diaphag comme unique source de carbone et d’énergie présent dans le milieu à une concentration de 0.5 g/L. Ce phénomène observé témoigne une fois de plus, d’une forte adaptation et une très grande acclimatation des souches bactériennes au xénobiotique.

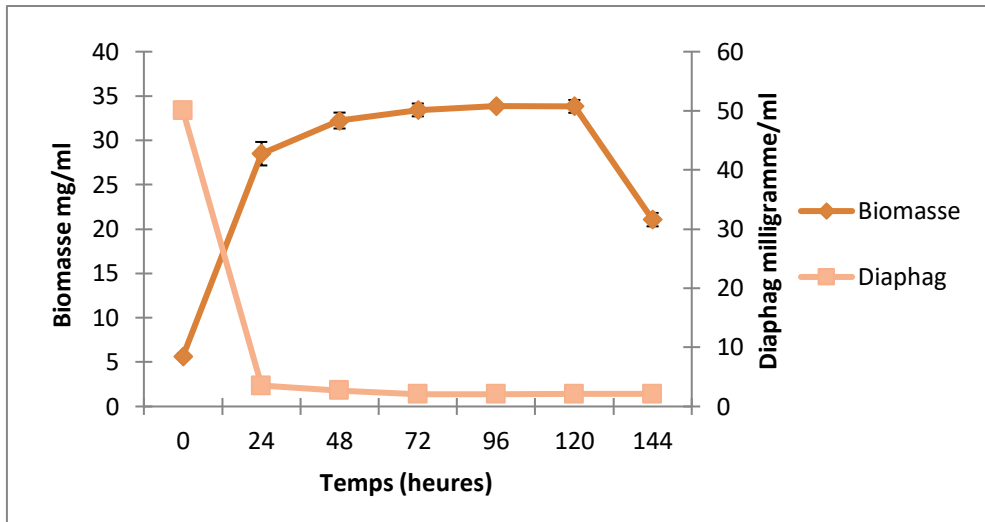


Figure 28. Dégradation en batch du diaphag (0.5 g/L) par culture mixte (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

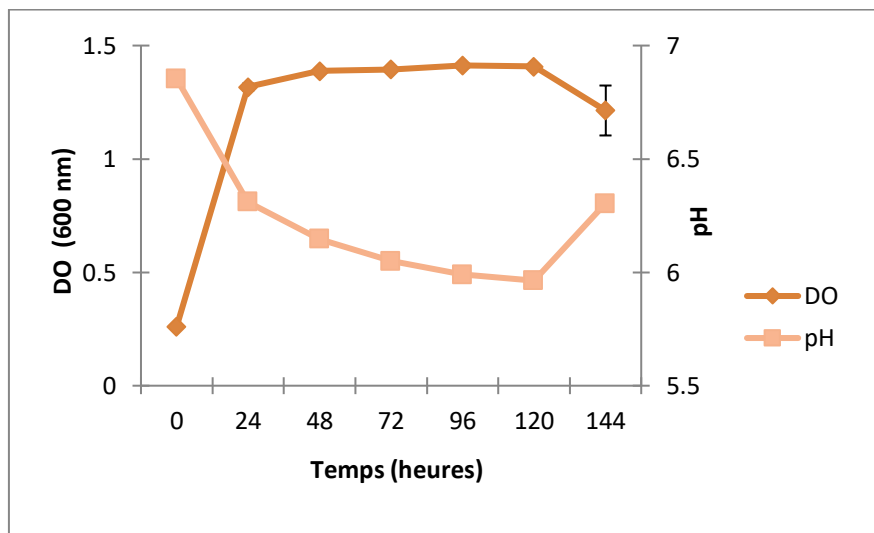


Figure 29. Croissance de la culture mixte en présence du diaphag (0.5 g/L), à 30 °C et une vitesse d'agitation de 250 rpm (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

Les résultats de cette présente étude montrent qu'au sein du consortium bactérien, les deux souches bactériennes : *Aeromonas hydrophila* et *Serratia odorifera*, sont capables de croître sur le diaphag comme seule source de carbone et d'énergie en culture pure.

Ce test réalisé en milieu liquide a été repris en cultures solides sur boîtes de pétri. Chacune des souches pures préalablement isolées et identifiées, a été mise en suspension dans une quantité minimale d'eau physiologique stérile puis ensemencée sur milieu MBS solide coulé en boîte de pétri. Le diaphag seule source de carbone et d'énergie a été ajouté à une concentration de 50 mg/L. Après 48 h d'incubation à 30 °C, une croissance microbienne est révélée à la surface de la gélose. Ce-ci confirme une fois encore que les souches bactériennes *Aeromonas hydrophila* et *Serratia odorifera* ont la capacité de croître en dégradant le diaphag.

4.6.2. Etude cinétique :

La détermination de l'activité spécifique de la biomasse microbienne (AS en ng/mg_{biomasse}.h) a été réalisée pour chacune des souches pures dégradant le diaphag et également pour la culture mixte. Elle correspond à la quantité de substrat (ng) dégradé par unité de biomasse (mg) et par unité de temps (h). Les activités ont été mesurées pendant la phase exponentielle de croissance. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 13.

Des différences remarquables existant entre les deux souches bactériennes ont été constatées. En effet, *Serratia odorifera* possède la plus forte vitesse de dégradation du diaphag estimée à 24.1 ng/mg.h.

La détermination du rendement de dégradation montre que 95.88% du diaphag a été dégradé par la culture mixte et environ 85% par chacune des cultures pures (voir tableau 13). Cependant, une faible prolifération du consortium a été constaté en milieu (figure 24, 26 et 28) ce qui peut constituer en réalité un avantage pour l'épuration industrielle. Les résultats obtenus peuvent être comparés avec ceux de Mroziak et Stefańska (2014) qui ont utilisé un consortium bactérien isolé d'un sol agricole pour la dégradation du diaphag. Ces auteurs ont établi une moyenne de biodégradation du diaphag estimée à environ 85%, dans des conditions différentes à celles utilisées dans ce présent travail. Par ailleurs ces résultats sont en contradiction avec ceux de Reis *et al.* (2014) qui ont montré dans leurs travaux que la dégradation du diaphag par *Achromobacter denitrificans* menait à une faible minéralisation

estimée à seulement 19% et ceux de Mrozik et Stefańska (2014) qui ont constaté, que le rendement de biodégradation par un consortium mixte prélevé d'un sol brun pouvait atteindre 30% sous des conditions anaérobies. Par ailleurs, Markiewicz *et al.* (2017a) ont rapporté que le rendement de minéralisation (biodégradation ultime) par une biomasse microbienne prélevée dans une station d'épuration municipale est estimé à 18% sous des conditions aérobies et une température de 20 °C. En outre, les travaux de Markiewicz *et al.* (2017b), utilisant une culture mixte prélevée à partir d'une boue activée provenant d'un bassin d'aération d'une station d'épuration municipale, ont obtenu eux aussi un rendement de dégradation nettement inférieur à celui obtenu dans cette présente étude estimé à seulement 3%.

Tableau 13. Activités spécifiques de la culture mixte et des cultures pures.

| Souches | Activités spécifiques (ng/mg biomasse.h) | Biodégradation du diaphag (%) |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Culture mixte | 19.2 | 95.88 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 22.3 | 88.88 |
| <i>Serratia odorifera</i> | 24.1 | 82.94 |

Cependant, la culture mixte semble être plus performante et plus active dans la dégradation du diaphag que les cultures pures. Ainsi, une combinaison des deux souches bactériennes acclimatées s'est révélée nécessaire pour la dégradation quasi-complète du diaphag. Ces résultats ont ainsi révélé une possible interaction complémentaire entre les deux souches du consortium. Cette compétence des cultures mixtes est fréquemment rencontrée dans les études de biodégradation des composés xénobiotiques. Zhang *et al.* (2013) ont sélectionné une culture mixte de *Stenotrophomonas maltophilia* et de deux souches de *Pseudomonas sp.* capable de dégrader le paracétamol. Ils ont trouvé que la dégradation était significativement plus élevée avec l'utilisation du consortium par rapport à l'utilisation de souches individuelles. Carvalho *et al.* (2002) ont rapporté, quant à eux, que l'utilisation d'une population mixte de trois espèces bactériennes différentes était nécessaire pour la

minéralisation complète du fluorbenzène. Jiang *et al.* (2006) ont utilisé une culture mixte bactérienne pour augmenter le taux de dégradation du phénol alors que Sørensen *et al.* (2008) pour augmenter le taux de dégradation du diuron. Kim *et al.* (2009) ; Ha *et al.* (2016) ont trouvé que les cultures mixtes microbiennes sont potentiellement efficaces dans la biodégradation des composés récalcitrants.

La dégradation du diaphag est réalisée par chacune des souches pures, mais elle est fortement stimulée par une interaction synergique du consortium obtenu à partir de la même culture dégradant le diaphag.

4.7. Etude de la biodégradation du diaphag en culture continue

La biodégradation du diaphag en culture continue a été réalisée dans un biolaveur à cellules fixées de deux litres. Le fermenteur est alimenté avec un volume liquide de 1 litre composé de 0.7 litre du milieu MBS et 0.3 litre d'un inoculum constitué de la culture mixte capable de dégrader le diaphag, préalablement acclimatée en culture batch et identifiée. Le milieu est aéré à 20 L/min et agité afin de permettre une parfaite homogénéité du milieu. Le fermenteur est maintenu à une température ambiante de 30 °C (Montes *et al.*, 2010). Le débit d'alimentation est de 3.24 L/h. Le diaphag, seule source de carbone et d'énergie, a été ajouté à la concentration initiale de 0.5 g/L. Durant les premiers mois du fonctionnement du réacteur, la concentration du diaphag est maintenue faible afin de permettre la fixation de l'inoculum sur la pierre ponce (formation de biofilm) et d'éviter une éventuelle toxicité induite par le xénobiotique lui-même. Après deux mois de fonctionnement du réacteur, l'absence de biomasse dans la phase liquide a été constatée. La formation du biofilm est devenue visible sur la surface des pierres ponces (figure 30). L'attachement des bactéries augmente progressivement avec l'augmentation du temps de démarrage. La mesure du poids sec indique que 45 g de biomasse ont été immobilisés sur la pierre ponce du biolaveur. Le biofilm s'est développé avec succès pendant la période de démarrage de bioréacteur. De plus, la durée d'immobilisation des bactéries et d'acclimatation s'emble être raisonnable (2 mois). En outre, les résultats obtenus indiquent que l'inoculation du réacteur avec un consortium préalablement acclimaté au diaphag a permis d'accélérer la formation du biofilm et également de réduire la période de démarrage du réacteur. Veiga et Kennes (2001) ont rapporté que l'inoculation d'un biolaveur à cellules fixées pour l'élimination d'un mélange de polluants par des communautés microbiennes adaptées à ces contaminants a considérablement réduit la période de démarrage du réacteur. Moussavi et Mohseni (2008) ont effectué eux aussi, les mêmes observations lors de ces travaux sur la biodégradation du phénol par un consortium acclimaté à l'aide d'un biolaveur à cellules fixées. De même, les recherches de Guang-hui *et al.* (2007) ont démontré que l'ensemencement d'un réacteur à cellules fixées avec des cultures mixtes adaptées pouvait souvent améliorer les performances du réacteur ou raccourcir la période d'acclimatation ou de démarrage.



Figure 30. Formation du biofilm sur la surface des pierres ponce après deux mois du fonctionnement du réacteur.

A l'issus de la période de démarrage du biolaveur, la concentration en diaphag à l'entrée du réacteur a été progressivement augmentée de 0.5 g/L à 5 g/L. Le débit d'alimentation variant de 3.24 L/h à 14 L/h. La concentration du diaphag a été mesurée et le rendement de dégradation calculé pendant les 120 jours de fonctionnement du réacteur.

Le tableau 14 présente les résultats des caractéristiques ainsi que les performances du réacteur obtenus pour une concentration du diaphag à l'entrée du réacteur maintenue à 5 g/L et une gamme de débit variant de 3.24 à 14 L/h. Le réacteur a donc pu démarrer avec succès. Un comportement stable du réacteur a été observé dans ces conditions de culture sans aucun problème de colmatage apparent. De plus, le rendement de dégradation du diaphag est supérieur à 96%.

Pour une alimentation moyenne du réacteur en diaphag de 0.5 g/L à un débit de 6.3 L/h, soit une vitesse approximative de 1.15 m/h, ce qui correspond à une vitesse de charge de 1.86 g/L.h, un rendement de dégradation maximal de 99.6% a été obtenu et une capacité d'élimination de 3.14 g/L.h. La concentration du diaphag à la sortie du réacteur est de 0,00196 g/L. Au-delà de ce débit, on observe une diminution du rendement d'élimination du diaphag jusqu'à atteindre un rendement estimé à 96.66% pour un débit de 14 L/h ce qui correspond à une vitesse de 2.5 m/h, après quatre-vingt-huit jours du fonctionnement du réacteur. Ce résultat correspond à une capacité d'élimination maximale de 4.003 g/L.h. La concentration maximale en diaphag à la sortie du réacteur est de 0.0167 g/L. La diminution du rendement d'élimination du diaphag dans cette gamme de débits peut être expliquée comme étant due à des problèmes de transfert de masse vers le biofilm (limitation de la diffusion). Ainsi, les bactéries n'ont pas eu suffisamment de temps pour dégrader toute la quantité de diaphag présente dans le réacteur (le temps de passage à diminuer car le débit d'alimentation à augmenter). Des observations similaires ont été constatées par An *et al.* (2010) sur la biodégradation de l'éthanethiol et par Li *et al.* (2008 b) sur la biodégradation du toluène par *Bacillus cereus* à l'aide d'un biolaveur à cellules fixées. Cependant, pour un débit d'alimentation faible de 3.24 L/h, soit une vitesse de 0.57 m/h et un temps de passage de 0.52 h, le rendement de dégradation est de 98.62%, ce qui correspond à une capacité d'élimination de 0.94 g/L.h, avec une concentration de diaphag en sortie du réacteur de 0.00686 g/L. La biodégradation du diaphag est assez satisfaisante même pour un débit faible. Les résultats obtenus ont indiqué que le rendement d'élimination du diaphag dans le réacteur à cellules fixées est considérablement affecté par les variations du débit. Chou et Wang (2007) ont observé que les performances du biolaveur à cellules fixées ont été affectées par les

variations du débit au cours de leurs travaux sur la biodégradation de l'ammonium. Luvsanjamba *et al.* (2008) rapportent que le temps de résidence de l'effluent est l'un des paramètres les plus importants dans le processus de biolaveurs à cellules fixées. Liu *et al.* (2013) montrent eux aussi, que le temps de résidence est l'un des facteurs clés les plus importants affectant l'efficacité d'élimination dans le biolaveur à cellules fixées. Moussavi et Mohseni (2008) rapportent également que les performances du réacteur sont affectées par la variation du temps de résidence lors de ces travaux sur la biodégradation du phénol.

Tableau 14. Caractéristiques et performance du biolaveur en présence d'une concentration de diaphag de 0.5 g/L (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

| | | | | | | | |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|--------|
| Jours | | 1-7 | 8-15 | 16-23 | 44-73 | 74-81 | 82-88 |
| Débit d'alimentation | (L/h) | 3.24 | 4.42 | 6.3 | 9.03 | 11.66 | 14 |
| Vitesse | (m/h) | 0.57 | 0.78 | 1.15 | 1.66 | 2.14 | 2.5 |
| Temps de passage | (h) | 0.52 | 0.38 | 0.26 | 0.18 | 0.14 | 0.12 |
| | | | | | | | |
| Concentration du diaphag à l'entrée | (g/L) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Charge en diaphag | (g/h) | 1.62 | 2.21 | 3.15 | 4.51 | 5.83 | 7 |
| Vitesse de charge en diaphag | (g/L.h) | 0.95 | 1.30 | 1.86 | 2.67 | 3.44 | 4.14 |
| | | | | | | | |
| Concentration du diaphag à la sortie | (g/L) | 0.00686 | 0.00266 | 0.00196 | 0.00976 | 0.013 | 0.0167 |
| Elimination du diaphag | (g/h) | 1.59 | 2.19 | 3.13 | 4.42 | 5.67 | 6.76 |
| Capacité d'élimination du diaphag | (g/L.h) | 0.94 | 1.3 | 3.14 | 2.61 | 3.36 | 4.003 |
| Rendement de dégradation | (%) | 98.62 | 99.46 | 99.6 | 98.04 | 97.4 | 96.66 |

Tout en maintenant la concentration en diaphag à l'entrée du réacteur de 1 g/L, le débit d'alimentation a été progressivement augmenté de 3.24 jusqu'à 6.3 L/h. Les caractéristiques ainsi que les performances du réacteur durant cette période de l'expérimentation sont représentées dans le tableau 15.

Pour une alimentation maximale du réacteur en diaphag de 1 g/L à un débit de 6.3 L/h, soit une vitesse approximative de 1.15 m/h, ce qui correspond à une vitesse de charge de 3.72 g/L.h, nous avons obtenu un rendement de dégradation maximal de 99.6%. Ce résultat correspond à une capacité d'élimination maximale de 3.71 g/L.h. La concentration maximale en diaphag à la sortie du réacteur est de 0.004 g/L. Cependant, pour un débit d'alimentation de 3.24 L/h et une vitesse de passage de 0.57 m/h, le rendement de dégradation obtenu est de 98.55% seulement et une capacité d'élimination de 1.88 g/L.h. La concentration du diaphag à la sortie du réacteur est de 0.0145 g/L. Apparemment, le réacteur semble répondre différemment aux variations des débits d'alimentation.

Tableau 15. Caractéristiques et performance du biolaveur en présence d'une concentration de diaphag de 1 g/L (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

| | | | | |
|--------------------------------------|---------|--------|---------|-------|
| Jours | | 24-29 | 30-36 | 37-43 |
| Débit d'alimentation | (L/h) | 3.24 | 4.42 | 6.3 |
| Vitesse | (m/h) | 0.57 | 0.78 | 1.15 |
| Temps de passage | (h) | 0.52 | 0.38 | 0.26 |
| | | | | |
| Concentration du diaphag à l'entrée | (g/L) | 1 | 1 | 1 |
| Charge en diaphag | (g/h) | 3.24 | 4.42 | 6.3 |
| Vitesse de charge en diaphag | (g/L.h) | 1.91 | 2.61 | 3.72 |
| | | | | |
| Concentration du diaphag à la sortie | (g/L) | 0.0145 | 0.00753 | 0.004 |
| Elimination du diaphag | (g/h) | 3.19 | 4.38 | 6.27 |
| Capacité d'élimination du diaphag | (g/L.h) | 1.88 | 2.59 | 3.71 |
| Rendement de dégradation | (%) | 98.55 | 99.24 | 99.6 |

Durant les 31 derniers jours du fonctionnement du biolaveur, la concentration du diaphag à l'entrée du réacteur est maintenue à 5 g/L. A cette concentration, le débit a été progressivement augmenté de 6.3 jusqu'à 14 L/h. Les caractéristiques ainsi que les performances du réacteur obtenues durant cette période de l'expérimentation sont représentées par le tableau 16.

Pour un débit d'alimentation de 6.3 L/h soit une vitesse approximative de 1.15 m/h, ce qui correspond à une vitesse de charge de 18.63 g/L.h, le rendement de dégradation du diaphag atteint un maximum de 99.6%, ce qui correspond à une capacité d'élimination de 18.56 g/L.h. La concentration en diaphag à la sortie du réacteur est de 0.0197 g/L. Cependant pour des débits supérieurs à 6.3 L/h, le rendement de dégradation diminue progressivement pour atteindre un rendement estimé à 98.904% à un débit de 14 L/h et à un temps de passage de 0.12 h, après 120 jours de fonctionnement du réacteur. Ce résultat correspond à une capacité d'élimination de 40.96 g/L.h. En effet sur la base des résultats obtenus, la variation du débit d'alimentation affecte faiblement le rendement de dégradation du diaphag.

Tableau 16. Caractéristiques et performance du biolaveur en présence d'une concentration de diaphag de 5 g/L (chaque valeur correspond à une moyenne obtenue à partir de trois répétitions).

| Jours | | 89-96 | 97-104 | 105-112 | 113-120 |
|--------------------------------------|---------|--------|--------|---------|---------|
| Débit d'alimentation | (L/h) | 6.3 | 9.03 | 11.66 | 14 |
| Vitesse | (m/h) | 1.15 | 1.66 | 2.14 | 2.5 |
| Temps de passage | (h) | 0.26 | 0.18 | 0.14 | 0.12 |
| | | | | | |
| Concentration du diaphag à l'entrée | (g/L) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Charge en diaphag | (g/h) | 31.5 | 45.15 | 58.3 | 70 |
| Vitesse de charge en diaphag | (g/L.h) | 18.63 | 26.71 | 34.49 | 41.42 |
| | | | | | |
| Concentration du diaphag à la sortie | (g/L) | 0.0197 | 0.043 | 0.0432 | 0.0548 |
| Elimination du diaphag | (g/h) | 31.37 | 44.76 | 57.79 | 69.23 |
| Capacité d'élimination du diaphag | (g/L.h) | 18.56 | 26.48 | 34.19 | 40.96 |
| Rendement de dégradation | (%) | 99.6 | 99.14 | 99.136 | 98.904 |

L'élimination complète du diaphag immédiatement après le démarrage du réacteur peut être attribuée à la présence de biofilm actif et acclimaté sur une grande surface du support. En outre, la variation de la concentration initiale en diaphag n'a pas affecté le rendement d'élimination du diaphag dans le biolaveur un rendement d'élimination élevé maintenu pour toute les concentrations utilisées. Le diaphag a été dégradé pour atteindre un rendement maximal de 99.6%. Ces résultats sont supérieurs à ceux rencontrés dans la littérature. Matsuo *et al.* (2011), ont rapporté que le rendement d'élimination du diaphag est supérieur à 80% pendant le traitement des eaux usées à grande échelle et pour des quantités de diaphag rejetées faibles de l'ordre de 9 ng/L. Khan et Ongerth (2004), ont rapporté, quant à eux, un rendement d'élimination du diaphag de 29% seulement pendant le traitement des eaux usées à grande échelle à une température de 20 °C et pour des concentrations de l'ordre de 3 µg/L.

Il est évident que le biolaveur à cellules fixées est un procédé très efficace pour la dégradation du diaphag. La grande performance du biolaveur à cellules fixées utilisée dans cette présente étude pourrait être due à plusieurs paramètres incluant la surface spécifique élevée du garnissage et la présence d'une phase liquide mobile qui permet le transfert du diaphag vers le biofilm et le contrôle de l'épaisseur et l'humidité du biofilm. En plus, de la présence d'une population mixte active dégradant efficacement le diaphag. Liu *et al.* (2010) révèlent que les performances du biolaveur à cellules fixées reposent principalement sur les microorganismes fixés sur le support. Une autre explication possible de la haute performance du réacteur est la structure de la pierre ponce et sa distribution uniforme dans la colonne qui a probablement réduit le court-circuit et a permis la distribution uniforme de l'eau, des nutriments et de la biomasse (biofilm) dans la colonne (bonnes conditions de transfert). Ces observations ont été également constatées par Lee *et al.* (2010) lors de ces travaux sur la biodégradation de l'éthylène à l'aide d'un biolaveur à cellules fixées. Ils ont observé que la performance du réacteur dans l'élimination de l'éthylène est due en grande partie à la structure du garnissage. Les travaux de Yang *et al.* (2011), sur la biodégradation du toluène à l'aide d'un biolaveur à cellules fixées, ont constaté eux aussi que le choix de la structure appropriée du garnissage affecte les performances du réacteur. Kim *et al.* (2005), Paca *et al.* (2007) et Sempere *et al.* (2010) révèlent que les biolaveurs à cellules fixées sont souvent préférés pour le traitement des émissions de gaz résiduaux de l'industrie pharmaceutique en raison de leurs faibles investissements, de leur fonctionnement stable, de leurs taux d'élimination élevés et de leurs meilleurs contrôles du pH. Dorado *et al.* (2008) et Schiavon *et al.* (2016) rapportent également que le biolaveur à cellules fixées est un procédé très efficace, rentable et assure une

minéralisation complète du polluant. Balasubramanian *et al.* (2012) ont révélé que l'utilisation de biolaveur à cellules fixées pour le traitement des émissions de gaz résiduaire de l'industrie pharmaceutique conduit à une élimination complète des polluants. Ramírez *et al.* (2009) ont obtenu eux aussi, lors de leurs travaux sur la biodégradation de l'ammoniaque par *Nitrosomonas europaea* à l'aide d'un biolaveur à cellules fixées, une dégradation complète du polluant avec un rendement de 100%. L'efficacité de l'utilisation du biolaveur à cellules fixées a été également rapportée par Schmidt et Anderson (2017) au cours de ces travaux sur la biodégradation du butanol, Jiang et Tay (2010) sur la biodégradation du sulfure d'hydrogène et Moussavi et Mohseni (2008) sur la biodégradation de phénol.

Un rendement de dégradation de l'ordre de 99.6% laisse supposer que la culture mixte conduit à la biodégradation complète du diaphag. En plus, une faible production de biomasse a été constatée dans le réacteur. Ce résultat est très intéressant si l'on considère le traitement biologique du diaphag à grande échelle (formation de boue moins importante, dégradation quasiment complète du polluant). En effet, il indiquerait que le processus n'en génère pas de composés encore plus toxiques que le diaphag ou bien des produits de réaction susceptibles de s'accumuler dans le système.

De plus, la culture mixte sélectionnée utilise le diaphag comme unique source de carbone et d'énergie dans un milieu minéral. Nous n'avons pas eu recours à l'enrichissement du milieu (addition de co substrat, de vitamines, d'extrait de levure ou d'un autre facteur de croissance) pour faciliter l'acclimatation des microorganismes au diaphag comme cela est très fréquemment pratiqué dans la biodégradation de composés xénobiotiques (Penaud, 1989 ; Wiggins et Alexandre, 1988). Ces conditions de croissance font que la culture mixte est une culture résistante et peu exigeante. Cette stratégie nous paraît bien adaptée à une application industrielle ultérieure pour le traitement d'effluent chargé en diaphag issus de certaines industries pharmaceutiques.

En outre, la culture mixte sélectionnée est plus active et plus performante en culture continue qu'en culture batch. En effet, la culture mixte atteint un rendement maximal de dégradation en culture continue estimé à 99.6%, alors qu'il est estimé à seulement 95.88 % en culture batch. La culture mixte reste efficace en culture continue car dans ce type de culture le milieu est constamment renouvelé, favorisant ainsi la dilution des produits de réactions. La culture mixte perd ses performances en batch car elle est inhibée par l'accumulation des métabolites intermédiaires. D'autre part, en culture batch la population mixte se trouve en

suspension, or en culture continue, elle se trouve en biofilm ce qui la rend plus robuste (limite le risque de contamination extérieure, constitue une barrière pour les composés néfastes à la croissance bactérienne), plus stable au cours du temps et conduit à la biodégradation complète du diaphag. Zhang *et al.* (2002) ont fait des observations similaires concernant la biodégradation quinoléine par *Burkholderia pickttii* à l'aide d'un réacteur à cellules immobilisées. Ils ont observé que *Burkholderia pickttii* a montré une meilleure stabilité dans son métabolisme et de sa prolifération et de la dégradation de la quinoléine en culture continue qu'en culture batch.

4.8. Identification du consortium microbien présent dans le réacteur

Le réacteur à cellules fixées a été inoculé avec la culture mixte prélevée dans les erlenmeyers alimentés en batch. Cette population microbienne a été préalablement acclimatée, sélectionnée pour la dégradation du diaphag. Ce consortium était composé de deux souches bactériennes *Aeromonas hydrophila* et *Serratia odorifera*.

Après une année de fonctionnement du réacteur, nous avons tenté d'isoler les microorganismes présents dans le consortium, de les identifier et d'étudier leur résistance au diaphag ainsi que le développement de la culture mixte préalablement inoculée dans le biolaveur.

Une suspension de biomasse a été préparée à partir de différentes pièces de pierres ponces prélevées dans le réacteur. La suspension microbienne ainsi obtenue a étéensemencée sur milieu MBS solide en présence de diaphag. Au bout d'une semaine d'incubation des boîtes, les résultats des observations macroscopiques, ont révélé le développement de colonies d'apparence assez homogènes. La présence du substrat dans le milieu MBS solide ne semble pas avoir eu un quelconque effet inhibiteur sur la croissance cellulaire.

A l'issue des repiquages successifs des colonies obtenues effectués sur gélose Mueller Hinton, les examens macroscopiques réalisés sur une culture de 24 h suivis des examens microscopiques après coloration de Gram, ont permis d'identifier deux types d'isolats bactériens **i.** des colonies rondes blanchâtres dont l'examen microscopique révèle des cellules en forme de court bacilles **ii.** de grandes colonies présentant une pigmentation verte dont l'examen microscopique révèle, cette fois-ci, des cellules en forme de long bâtonnets isolées (figures 31, 32, 33 et 34).

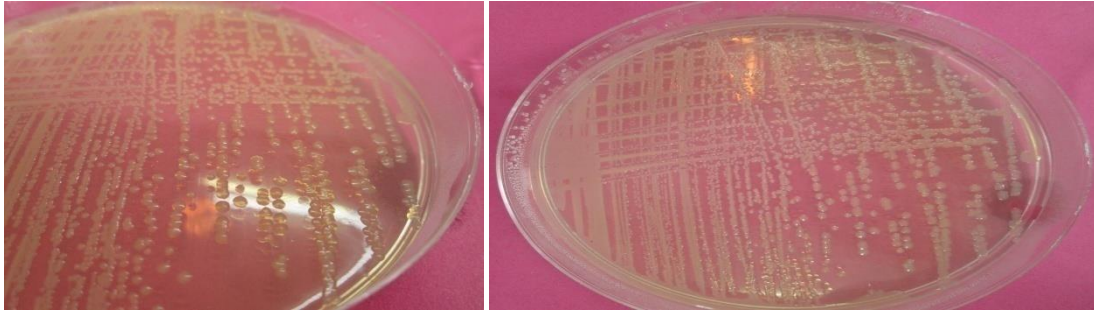


Figure 31. Isolement de la souche bactérienne 1 sur Mueller Hinton après une série de repiquages.

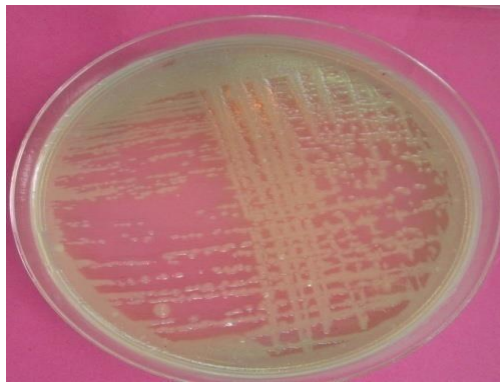


Figure 32. Isolement de la souche bactérienne 2 sur Mueller Hinton après une série de repiquages.

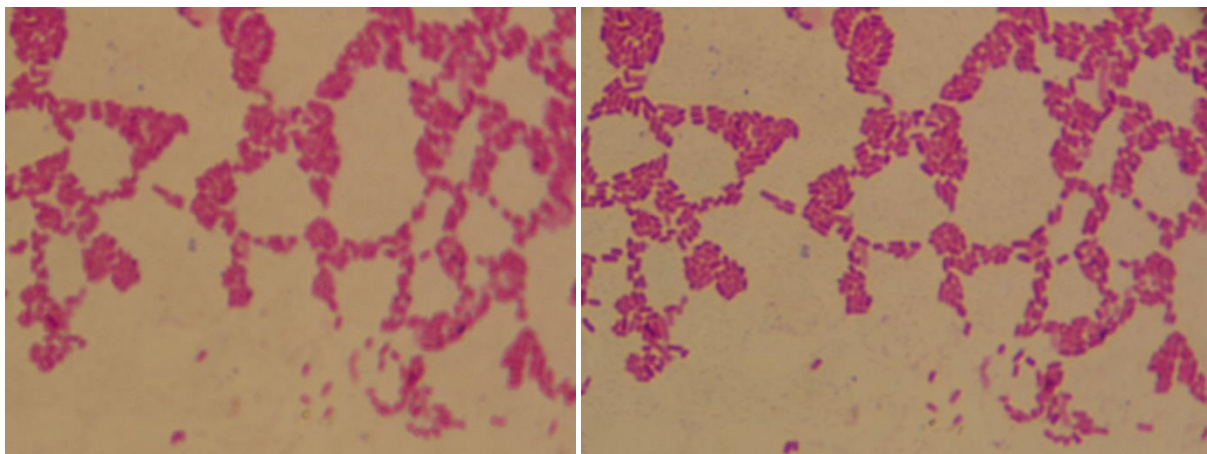


Figure 33. Observation microscopique de la souche bactérienne 1 isolée après coloration de Gram (Gross. $\times 100$).

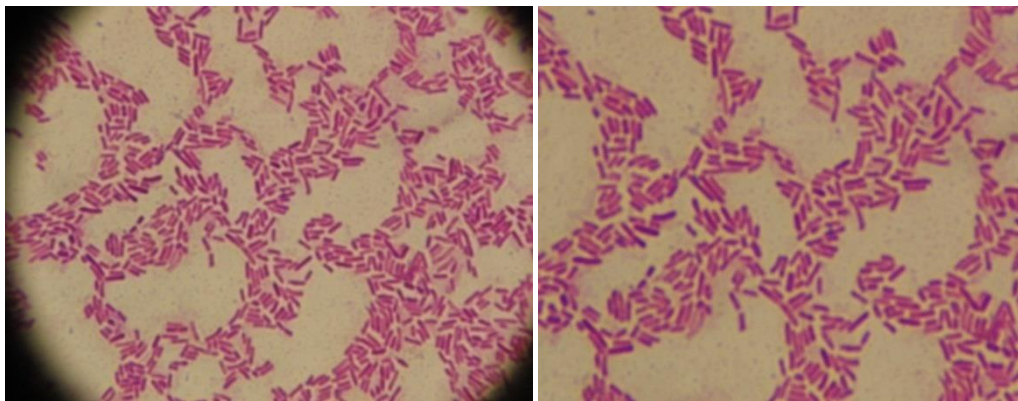


Figure 34. Observation microscopique de la souche bactérienne 2 isolée après coloration de Gram (Gross. $\times 100$).

Les résultats obtenus suite aux examens macroscopiques, microscopiques suivis des tests de la catalase, de l'oxydase et de la mobilité sont regroupés dans le tableau 17.

Tableau 17. Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches isolées du fermenteur.

| Caractères | Souche 1 | Souche 2 |
|--------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Forme des colonies | Petites colonies rondes, opaques et de couleur beige | Grande colonies, opaques et de couleur beige |
| Forme des cellules | Courts bacilles | Longs bacilles |
| Gram | Négative | Négative |
| Pigments | Pas de pigments | Vert |
| Catalase | Positive | Positive |
| Oxydase | Positive | Positive |
| Mobilité | Mobile | Mobile |

Les tests d'identifications réalisés grâce aux galeries biochimiques API 20NE, ont permis d'identifier les espèces *Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas aeruginosa* (tableau 18 et figures 35 et 36).

Tableau 18. Résultats de la lecture des galeries biochimiques API 20NE pour les souches isolées après 24 h d'incubation à 30 °C.

| API 20NE | | |
|-----------------|----------|----------|
| Caractères | Souche 1 | Souche 2 |
| NO ₃ | + | + |
| TRP | + | - |
| GLU | + | - |
| ADH | - | - |
| URE | - | - |
| ESC | + | + |
| GLE | + | + |
| PNPG | + | - |
| GLU | + | + |
| ARA | + | - |
| MNE | + | - |
| MAN | + | + |
| NAG | + | + |
| MAL | + | - |
| GNT | + | + |
| CAP | + | + |
| ADI | - | + |
| MLT | + | + |
| CIT | + | + |
| PAC | - | - |



Figure 35. Résultats de l'identification biochimique d'*Aeromonas hydrophila* à l'aide de la galerie API 20NE.



Figure 36. Résultats de l'identification biochimique de *Pseudomonas aeruginosa* à l'aide de la galerie API 20NE.

Pseudomonas aeruginosa une espèce bactérienne, aérobie, appartient à la famille des Pseudomonadaceae. Elle préfère le milieu aquatique et survit pauvrement dans les sols, particulièrement les sols secs. Elle est aussi un agent pathogène opportuniste répandu dans les milieux hospitaliers et bénéficie, de ce fait, d'une plus grande attention, ce qui en fait l'espèce de ce genre la plus étudiée (Knirel, 1990 ; Abdallah, 1991). Elle présente, en outre, l'avantage de former des biofilms sur des surfaces humides comme celles des roches et du sol, propriété technologique intéressante dans notre cadre d'application (Ahearn *et al.*, 1999 ; Costerton *et al.*, 1999). Elle a été trouvée incriminée dans la biodégradation du siloxane à l'aide d'un biolaveur à cellules fixées (Li *et al.*, 2014), dans la biodégradation du Bisphénol à l'aide d'un bioréacteur à lit fluidisé (Mita *et al.*, 2015), dans la biodégradation du Méthomyl (Kulkarni et Kaliwal, 2015) et dans la biodégradation de l'hexane (Munõz *et al.*, 2006).

Les résultats de l'identification du consortium microbien présent dans le réacteur ont révélé une évolution au niveau de la population mixte. En effet, l'espèce *Serratia* identifiée lors des essais en batch et qui a servi à inoculer le réacteur, n'a pas été retrouvée dans le nouveau consortium. Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* a été retrouvé dans le nouveau consortium, une bactérie connue pour être très contaminante et omniprésente. Ainsi, la disparition de *Serratia* au profit de *Pseudomonas aeruginosa* peut être expliquée par deux phénomènes :

- d'une part le réacteur a longtemps fonctionné en conditions non stériles (conditions évidentes pour une éventuelle utilisation industrielle),
- d'autre part les souches présentes dans le consortium initial avaient été sélectionnées au départ pour une utilisation en milieu liquide, or dans le réacteur, elles se trouvent fixées sur

des supports. Le changement de type d'environnement (passage d'un environnement liquide à un environnement solide) peut être à l'origine d'une compétition entre les souches préexistantes et les nouvelles souches qui se sont mieux acclimatées aux fortes charges et aux concentrations élevées de diaphag. Il n'est pas exclu que l'espèce bactérienne identifiée au départ soit toujours présente dans le réacteur mais à des niveaux qui ne permettent pas de la détecter par les techniques d'isolement classiques.

Des résultats similaires ont été rapportés par Djeribi *et al.* (2005) au cours de ces travaux sur la biodégradation du styrène à l'aide d'un biolaveur à cellules fixées. Il a trouvé que les sept souches dominantes identifiées, à l'issue de la période de fonctionnement, sont complètement différentes de celles qui étaient présente au moment de l'inoculation du réacteur.

5. CONCLUSION

A l'issus de cinq mois d'adaptation et d'acclimatation en culture batch et en présence du diaphag présent dans le milieu de culture comme unique et seule source de carbone et d'énergie disponible, les espèces *Aeromonas hydrophila* et *Serratia odorifera* ont donc été isolées, purifiées et identifiées à partir d'un consortium initialement inoculé au milieu MBS en présence du xénobiotique. L'étude de l'hydrophobicité des souches incriminées dans le métabolisme du diaphag, a donc permis de révéler une adhérence moyenne des cellules vis-à-vis du solvant utilisé estimé à 35%. En culture batch, la culture mixte dégrade le diaphag avec un rendement supérieur estimé à 95.88%, à celui obtenu pour chacune des souches *Aeromonas hydrophila* et *Serratia odorifera* qui est estimé à environ de 85%. Ce résultat confirme diverses études (Zhang *et al.*, 2013) qui montrent que la culture mixte est plus performante dans la dégradation des composés pharmaceutiques.

L'utilisation d'un biolaveur garni d'un support à base de pierres ponce nous a permis d'obtenir d'excellents rendements d'élimination du diaphag pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration en diaphag à l'entrée du réacteur de 5 g/L et avec un débit de 14 L/h, 40.96 g/L.h peuvent être éliminés avec un rendement moyen de 98.904%. Cependant, le rendement d'élimination maximal du diaphag et qui est de 99.6%, a été obtenu en maintenant le débit à 6.3 L/h et des concentrations initiales de 0.5, 1 et 5 g/L. Toutes ces valeurs obtenues sont nettement supérieures à celles rencontrées dans la littérature et peuvent donc mener à la mise en place d'un véritable procédé de dépollution en milieu industriel.

Au bout d'une année de fonctionnement du biolaveur, le consortium microbien est différent de celui inoculé au départ. La souche *Serratia odorifera* initialement inoculée n'a pas été retrouvée dans le réacteur. Cependant, une nouvelle souche bactérienne a été isolée et identifiée, il s'agit de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. La disparition de *Serratia* au profit de *Pseudomonas* semble être un phénomène tout à fait normal sachant que le biolaveur a été conduit en conditions non stériles.

Cette recherche éclaire l'importance des bactéries impliquées pour l'efficacité de l'élimination du diaphag. Cependant, une étude plus approfondie est nécessaire après cette étude préliminaire pour une meilleure compréhension du lien entre la composition d'une communauté microbienne et l'efficacité du réacteur et l'élimination des polluants à partir du

système adapté. De plus, la dynamique de la population bactérienne peut fournir des informations supérieures pour assurer le succès du système du biolaveur à cellules fixées. En outre, le biolaveur à cellules fixées pourrait être efficace pour décontaminer la surface de sols contaminés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aamand, J., Jorgensen, C., Arvin, E. et Jensen, B.K., 1989. Microbial adaptation to degradation of hydrocarbons in polluted and unpolluted groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology* 4, 299-312.

Aaron, J.J. et Oturan, M.A., 2001. New Photochemical and Electrochemical Methods for the Degradation of Pesticides in Aqueous media. *Environmental Applications, Turk. J. Chem.* 25, 509-520.

Abdallah, M., 1991. Transport du fer et rôle des pyoverdines dans la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*. Incidences thérapeutiques. *Path. Biol.* 39, 600-605.

Abirami, B., 2013. Current approaches on the biodegradation of recalcitrant compounds from various industrial effluents. *Scientia Biologia* 1(1), 22-28.

Acuña, M.E., Pérez, F., Auria, R. et Revah, S., 1999. Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnology and Bioengineering* 63, 175-184.

Adams, C., Wang, Y., Loftin, K. et Meyer, M., 2002. Removal of Antibiotics from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Processes. *J. Environ. Eng.* 128, 253-260.

Adler, S.F., 2001. Biofiltration - a primer. *Chemical Engineering Progress* 97, 33-41.

Aelion, C.M., Dobbins, D.C. et Pfaender, F.K., 1989. Adaptation of aquifer microbial communities to the biodegradation of xenobiotic compounds: influence of substrate concentration and preexposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 75-86.

Aelion, C.M., Swindoll, C.M. et Pfaender, F.K., 1987. Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2212-2217.

Agathos, S.N., Hellin, E., Ali-Khodja, H., Deseveaux, S., Vandermesse, F. et Naveau, H., 1997. Gas-phase methyl ethyl ketone biodegradation in a tubular biofilm reactor: microbiological and bioprocess aspects. *Biodegradation* 8, 251-264.

Ahearn, D.G., Borazjani, R.N., Simmons, R.B. et Gabriel, M.M., 1999. Primary adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to inanimate surfaces including biomaterials. *Methods Enzymol.* 310, 551-557.

Ahmed, M.J. et Theydan, S.K., 2014. Fluoroquinolones antibiotics adsorption onto microporous activated carbon from lignocellulosic biomass by microwave pyrolysis. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45, 219-226.

- Aislabie, J. et Lloyd-Jones G., 1995.** A review of bacterial degradation of pesticides. *Aust. J. Soil Res.* 33, 925-942.
- Alcaide, E. et Garay, E., 1984.** R-Plasmid Transfer in Salmonella spp. Isolated from wastewater and Sewage-Contaminated surface water. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 435-438.
- Alderman, D.J. et Hastings, T.S., 1998.** Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science Technology* 33, 139-155.
- Alexander, M., 1973.** No biodegradable and other recalcitrant molecules. *Biotech. Bioeng.* 15, 611-647.
- Alexander, M., 1981.** Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211, 132-138.
- Alexander, M., 1994.** Biodegradation and bioremediation. Acad. Press Inc. San Francisco, Calif.
- Almeida, B., Oehmen, A., Marques, R., Brito D., Carvalho, G. et Barreto Crespo, M.T., 2013.** Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Bioresource Technology* 133, 31-37.
- Al-Qaim, F.F., Abdullah, M.P., Latip, J., Khalik, W.M.A.W.M., Tahrir, N.A., Abidin, N.A.Z. and Othman, M.R., 2016.** Detection of gliclazide in aqueous samples using liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry. *Sains Malaysiana* 45, 803-810.
- Ambuludi, S.L., 2012.** Étude cinétique mécanistique et toxicologique de l'oxydation dégradante de l'Ibuprofène par l'oxydation avancée électrochimique et photochimique. Thèse doctorat. École Doctorale SIE. Université Paris-est.
- Amenu, D., 2014.** Assessment of disinfectant and antibiotic resistant bacterian in hospital wastewater. *World Journal of Life Sciences Research* 1 (1), 1-7.
- An, T., Wan, S., Li, G., Sun, L. et Guo, B., 2010.** Comparison of the removal of ethanethiol in twin-biotrickling filters inoculated with strain RG-1 and B350 mixed microorganisms. *Journal of Hazardous Materials* 183, 372-380.
- Andreozzi, R., Canterino, M., Marotta, R. et Paxeus, N., 2005.** Antibiotic removal from waste waters : The ozonation of amoxicillin. *Journal of Hazardous Materials* 122, 243-250.
- Andreozzi, R., Raffaele, M. et Nicklas, P., 2003.** Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 50(10), 1319-1330.
- Andrews, G.F. et Noah, K.S., 1995.** Design of gas-treatment bioreactors. *Biotechnology Progress* 11, 498-509.

- Aranda, C., Godoy, F., Becerra, J., Barra, R. et Martinez, M., 2003.** Aerobic secondary utilization of a non-growth and inhibitory substrate 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Sphingopyxis-like* strain S32. *Biodegradation* 14, 265-274.
- Arbuckle, W.B. et Kennedy, M.S., 1989.** Activated sludge response to a parachlorophenol transient. *J.W.P.C.F.* 61, 476-480.
- Archana, G., Dhodapkar, R. et Kumar, A., 2017.** Ecotoxicological risk assessment and seasonal variation of some pharmaceuticals and personal care products in the sewage treatment plant and surface water bodies (lakes). *Environ. Monit. Assess.* 189, 446.
- Arnold, M., Reittu, A., Von Wright, A., Martikainen, P.J. et Suihko, M.L., 1997.** Bacterial degradation of styrene in waste gases using a peat filter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 738-744.
- Ascon-Cabrera, M. et Lebeault, J.M., 1995.** Cell hydrophobicity influencing the activity /stability of xenobiotic-degrading microorganisms in a continuous biphasic aqueous-organic system. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80, 270-275.
- Ascon-Cabrera, M. et Lebeault, J.M., 1993.** Selection of xenobiotic-degrading microorganisms in a biphasic aqueous-organic system. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1717-1724.
- Ashton, D., Hilton, M. et Thomas, K.V., 2004.** Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of Total Environment* 333(1-3), 167-184
- Auria, R., Frere, G., Morales, M., Acuña, M.E. et Revah, S., 2000.** Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnology and Bioengineering* 68, 448-455.
- Auria, R., Aycaguer, A.C. et Deviny, J.S., 1998.** Influence of water content on degradation rates for ethanol in biofiltration. *Journal of Air and Waste Management Association* 48, 65-70.
- Auria, R., Morales, M., Acuna, M.E., Perez, F. et Revah, S., 1996.** Biofiltration of toluene vapors : start-up and gaseous ammonia addition. *Proc. of 1996 Conf. On Biofiltration : an air pollution control technol.*, USC, LA, 134-141.
- Austin, B., Calomiris, J.J., Walker, J.D. et Colwell, R.R., 1977.** Numerical taxonomy and ecology of petroleum degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 60-68.
- Ay, F. et Kargi, F., 2010.** Advanced oxidation of amoxicillin by Fenton's reagent treatment. *Journal of Hazardous Materials.* 179, 622-627.

- Bailón-Pérez, M.I., García-Campaña, A.M., Cruces-Blanco, C. et del Olmo Iruela, M., 2008.** Trace determination of β -lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1185, 273-280.
- Baker, K.H. et Herson, D.S., 1994.** Bioremediation. McGraw-Hill Inc., p. 375.
- Balasubramanian, P., Philip, L. et Murty Bhallamudi, S., 2012.** Biotrickling filtration of complex pharmaceutical VOC emissions along with chloroform. *Bioresource Technology* 114, 149-159.
- Balaz, S., Wiese, M., Kansy, M., Chi, H.I et Seydel, J.K., 1989.** Model-based relationship between the microbial transformation rate of organic chemicals and their physicochemical properties. *Chemosphere* 19, 1677-1692.
- Barroin, G., 1990.** La pollution des eaux par les phosphates. *La recherche* 21 (221), 620-627.
- Batty, J. et Lim, R., 1999.** Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated water in New South Wales, Australia. *Archive Environmental contamination Toxicology* 36, 301-307.
- Becker, M., Zittlau, E. et Petz, M., 2004.** Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 520(1-2), 19-32.
- Beltran, F.J., Aguinaco, A., Garcia-Araya, J.F. et Oropesa, A., 2008.** Ozone and photocatalytic processes to remove the antibiotic sulfamethoxazole from water. *Water research* 42, 3799-3808.
- Bending, G.D. et Rodríguez-Cruz, M.S., 2007.** Microbial aspects of the interaction between soil depth and biodegradation of the herbicide isoproturon. *Chemosphere* 66, 664-671.
- Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R. et Loge, F.J., 2005.** Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study : Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* 122, 195-204.
- Bentz, D.R., 1987.** Biological waste gas treatment : Experience of a chemical company in Switzerland. *In proceeding of the International Meeting of Biological Treatment of Industrial Waste Gases*. Francfort, Allemagne, 21-24 juin.
- Berne, C., Montjarret, B., Guountti, Y. et Garcia, D., 2004.** Tributyl phosphate degradation by *Serratia odorifera*. *Biotechnol. Lett.* 26 (8), 681-686.
- Besse, J.P. et Garric, J., 2007.** Médicaments à usage humain : risque d'exposition sur les milieux récepteurs - Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales. CEMAGREF, Agence de l'Eau RMC., Lyon, p. 241.

Bhattacharya, S. et Baltzis, B.C., 2000. Removal of ortho-di-chlorobenzene in a biotrickling filter in the presence of ethanol. *In USC-TRG Conference on biofiltration*. T.R. Group (ed). University of Southern California, Los Angeles, California, USA, p. 91-98.

Bishop, P.L. et Kinner, N.E., 1986. Aerobic fixed-film processes. *In R. G. Rehm H. J. ed. Biotechnology*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Block, J.C., Férard, J.F., Flambeau, J.P., Kuenemann, P., Thouand, G. et Vasseur, P., 1989. Aspects microbiologiques de la biodégradation : une revue. Proc. Du Congrès International Evolution de la dégradation des substances organiques dans l'environnement, Paris.

Bocard, C., 2006. Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures. Enjeux environnementaux et traitement des pollutions. 1ère Ed TECHNIP, 94.

Boethling, R.S. et Alexandre, M., 1979. Effects of concentration of organic chemicals on their biodegradation by natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1211-1216.

Bohn, H., 1992. Consider biofiltration for decontaminating gases. *Chemical Engineering Progress* 88, 34-40.

Borgeest, C., Greenfeld, C., Tomic, D. et Flaws, J.A., 2002. The effects of endocrine disrupting chemicals on the ovary. *Front. Biosci.* 7, 1941-1948.

Bouafia, S., 2010. Dégradation des colorants textiles par procédés d'oxydation avancée basée sur la réaction de fenton, application a la dépollution des rejets industriels. Thèse Université Paris-Est, p. 75-101.

Brandy, J., 1997. Hydrodynamique et transfert gaz-liquide dans un bioréacteur. Application au transfert d'émissions gazeuses par lavage biologique. Thèse de l'Université de Pau et des pays de l'Adour, France.

Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D. et Lewis, R.J., 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 464-469.

Brunton, L.L., Lazo, J.S. et Parker, K.L., 2006. Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. McGraw-Hill medical publishing division, 1634-1639.

Budzinski, H. et Togola, A., 2006. Présence des résidus de médicaments dans les différents compartiments du milieu aquatique. *Environnement, Risques et Santé* 5(4), 248 -253.

Bueb, M. et Melin, T., 1987. Biological and physico-chemical waste gas treatment processes-comparison of processes and costs –chances for new technologies. *In proceeding of the International Meeting of Biological Treatment of Industrial Waste Gases*. Francfort, Allemagne, 21-24 juin.

Buffle, M-O., Schumacher, J., Salhi, E., Jekel, M. et Von Gunten, U., 2006. Measurement of the initial phase of ozone decomposition in water and wastewater by means of a continuous quench-flow system: Application to disinfection and pharmaceutical oxidation. *Water Research* 40, 1884-1894.

Buitrón, G., 1993. Biodégradation des composés xénobiotiques par un procédé discontinu de type SBR. Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Toulouse.

Bull, A.T et Slater, J.H., 1982. Microbial interactions and communities. *Eds. Academic Press*, New York 1, 13-44.

Burgess, J.E., Parsons, S.A. et Richard, M.S., 2001. Developments in odour control and waste gas treatment biotechnology: a review. *Biotechnology Advances* 19(1), 35-63.

Burke, V., Robinson, J., Gracey, M., Peterson, D. et Partridge, K., 1984. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 361-366.

Burmolle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sorensen, S.J. et Kjelleberg, S., 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 72, 3916-23.

Buser, H.R., Muller, M.D. et Theobald, N., 1998. Occurrence of the Pharmaceutical Drug Clofibrac Acid and the Herbicide Mecoprop in Various Swiss Lakes and in the North Sea. *Environmental Science Technology* 32, 188-192.

Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8, 1137-1144.

Cabello, F.C., 2004. Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health. *Revista Medica de Chile* 132, 1001-1006.

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R. et Fanelli, R., 2003. A strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1241-1248.

Campbell, D.B., Lavielle, R. et Nathan, C., 1991. The mode of action and clinical pharmacology of gliclazide: a review. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 14, S21-S36.

Carlsson, C., Johansson, A.K., Alvan, G., Bergman, K. et Kuhler T., 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part 1: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* 364, 67-86.

Carvalho, M.F., Alves, C.C.T., Ferreira, M.I.M., De Marco, P. et Castro P.M.L., 2002. Isolation and initial characterization of a bacterial consortium able to mineralize fluorobenzene. *Appl Environ Microbiol.* 68(1), 102-105.

- Catastini, C., Mullot, J.U., Mazellier, P., Castillo, L., Tordjman, I., Cervantes, P., Modelon, H., Zini, S., Levi, Y. et Ormsby, J-N., 2009.** Recherche de molécules anticancéreuses dans des effluents hospitaliers : Étude pilote. *Techniques hospitalières* 714, 56-60.
- Ceccaldi, P., Martin, G. et Lebeault, J.M., 1993.** La dépollution de l'air. *Biofutur* 20-31.
- Cesario, M.T., Beeftink, H.H. et Tramper, J., 1993.** Removal of poorly water-soluble compounds from waste gases using water-immiscible organic solvents. *In a proceeding of the 6th European Congress on Biotechnology* 2, 1207-1210.
- Cesario, M.T., Beeftink, H.H. et Tramper, J., 1992.** Biological treatment of waste gases containing poorly-water-soluble pollutants, p. 135-140. *In* V.H.J. (ed.), *Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies*. Elsevier Science Publishers.
- Cha, J., Yang, S. et Carlson, K., 2006.** Trace determination of β -lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1115(1-2), 46-57.
- Chan, K.W., Jouët, J., Heng, S., Yeung, K.L. et Schrotter, J.C., 2012.** Membrane contactor/separator for an advanced ozone membrane reactor for treatment of recalcitrant organic pollutants in water. *Journal of Solid State Chemistry* 189, 96-100.
- Chang, X., Meyer, M.T., Liu, X., Zhao, Q., Chen, H., Chen, J.A., Qiu, Z., Yang, L., Cao, J. et Shu, W., 2010.** Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. *Environmental Pollution* 158(5), 1444-1450.
- Chapparo, T.R., Botta, C.M. et Pires, E.C., 2010.** Toxicity and recalcitrant compound removal from bleaching pulp plant effluents by an integrated system: anaerobic packed-bed bioreactor and ozone. *Water Science & Technology* 61(1), 199-205.
- Chatterjee, S., Chattopadhyay, P., Roy, S. et Sen, S.K., 2008.** Bioremediation: a tool for cleaning polluted environments. *J. Appl. Biosci.* 11, 594-601.
- Chaudhry, G.R. et Chapalamadugu, S., 1991.** Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* 55, 59-79.
- Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J.G. et Jain, R.K., 2008.** Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *J. Ind. Microbiol.* 48, 95-113.
- Chen, W-R. et Huang, C-H., 2010.** Adsorption and transformation of tetracycline antibiotics with aluminum oxide. *Chemosphere.* 79, 779-785.

- Chen, M., Ohman, K., Metcalfe, C., Ikonou, M., Amatya, P. et Wilson, J., 2006.** Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada. *Water quality research journal of Canada* 41(4), 351-364.
- Chen, G.K., 1984.** Packed column internals. *Chem. Eng.* 91, 40-51.
- Cheng, Y., He, H., Yang, C., Yan, Z., Zeng, G. et Qian, H., 2016.** Effects of anionic surfactant on n-hexane removal in biofilters. *Chemosphere* 150, 248-253.
- Cheriaa, J., Khaireddine, M., Rouabhia, M. et Bakhrouf, A., 2012.** Removal of triphenylmethane dyes by bacterial consortium. *The Scientific World Journal* 2012, 1-9.
- Chong, N.M. et Nguyen, L.H., 2016.** Initial Energy Content of Cells Improve Efficiency of Activated Sludge Acclimation and Degradation of a Xenobiotic Compound. *AWSPT* 103, 1-4.
- Chong, N-M., Liang, J. et Lin, K-Y., 2014.** Bioaugmentation of Xenobiotic Treatment Activated Sludge during Start-Up and Shock Loadings. *Proc. of the Intl. Conf. on Advances In Bio-Informatics, Bio-Technology And Environmental Engineering-ABBE.*
- Chong, N.M. et Lin, TY., 2007.** Measurement of the degradation capacity of activated sludge for a xenobiotic organic. *Bioresource Technology* 98, 1124-1127.
- Chou, M.S. et Wang, C.H., 2007.** Treatment of ammonia in air stream by biotrickling filter. *Aerosol and Air Quality Research* 7, 17-32.
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M. et Sanyal, N., 2008.** Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *J. Ind. Microbiol.* 48, 114-127.
- Chudoba, J., Chudoba, P. et Cech, J.S., 1986.** Effect of the endogenous phase duration on the maximum substrate removal rate in mixed cultures. *Wat. Res.* 20, 1505-1509.
- Cioci, F., Lavecchia, R. et Ferranti, M., 1997.** High performance microbial removal of ethanol from contaminated air. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 11, 893-898.
- Colwell, R.R., Mac Donell, M.R. et De Ley, J., 1986.** Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 473-477.
- Cook, A.M., Grossenbacher, H. et Huter, R., 1983.** Isolation and cultivation of microbes with biodegradative potential. *Experientia* 39, 1191-1198.
- Coetsier, C.M., Spinelli, S., Lin, L., Roig, B. et Touraud, E., 2009.** Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? *Environment International* 35(5), 787-792.
- Costerton, J.W., 1999.** Discussion: Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 11, 217-221.

- Costerton, J.W., Stewart, P.S. et Greenberg, E.P., 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Crini, G. et Badot, P.M., 2007.** Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique. Presses universitaires de Franche-Comté.
- Cunnah, P.J. et Woodley, J.M., 1993.** Kinetic characterization of aqueous-organic biphasic enzymatic catalysis for the design of multiphasic bioreactors. *In proceeding of the 6th European Congress on Biotechnology 2*, 957-960.
- Dalton, H. et Stirling, D.I., 1982.** Co-metabolism. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 297, 481-496.
- Dasenaki, M.E. et Thomaidis, N.S., 2010.** Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. *Analytica Chimica Acta* 672(1-2), 93-102.
- Dastous, PA., Nikiema, J., Soreanu, G., Bibeau, L. et Heitz, M., 2008.** Elimination of Methanol and Ethanol by Biofiltration: An Experimental Study. *Water, Air and Soil Pollution: Focus* 8, 275-285.
- Daughton, C.G. et Ternes, T.A., 1999.** Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107 (Supplement 6), 907-938.
- Daughton, C.G. et Hsieh, D.P.H., 1977.** Parathion utilization by bacterial symbionts in chemostat. *Applied Environ. Microbiol.* 34, 175-184.
- Dawson, D., 1993.** Biological treatment of gaseous emissions. *Water Environment Research* 65, 368-371.
- Dehghanzadeh, R., Torkian, A., Bina, B., Poormoghaddas, H. et Kalantary, A., 2005.** Biodegradation of styrene laden waste gas stream using a compost-based biofilter. *Chemosphere* 60, 434-439.
- Delhoménie, M-C. et Heitz, M., 2005.** Biofiltration of Air: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 53-72.
- Deshusses, M.A. et Gabriel, D., 2005.** Biotrickling Filter Technology. *In: Biotechnology for odor and air pollution control*, Ed. by Shareefdeen Z., Singh A. Springer, Berlin Heidelberg, New York, p. 147-166.
- Deshusses, M.A., 1997.** Biological waste air treatment in biofilters. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 335-339.

Dharmavaram, S., Casey, J., Timmermans, T. et Van Lith, C., 1993. In *Proceedings of the 86th Annual Meeting and Exhibition Air & waste management association. Air & waste management association*, Pittsburgh, PA, p.13.

Díaz, E., 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.* 7, 173-180.

Díaz-Cruz, M.S., García-Galán, M.J., Guerra, P., Jelic, A., Postigo, C., Eljarrat, E., Farré, M., López de Alda, M.J., Petrovic, M. et Barceló, D., 2009. Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(11), 1263-1275.

Diekmann, R., Naujoks, M., Gerdes-Kühn, M. et Hempel, D.C., 1990. Effects of suboptimal environmental conditions on immobilized bacteria growing in continuous culture. *Bioprocess Engineering* 5, 13-17.

Diks, R.M.M., Ottengraf, S.P.P. et Vrijland, S., 1994. The existence of a biological equilibrium in a trickling filter for waste gas purification. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1279-1287.

Diks, R.M.M., 1992. The removal of dichloromethane from waste gases in a biological trickling filter. Ph.D. thesis. Technical University of Eindhoven, The Netherlands.

Djeribi, R., Dezcenclos, T., Pauss, A. et Lebeault, J.M., 2005. Removal of styrene from waste gas using a biological trickling filter. *Eng. Life Sci.* 5, 450-457.

Don, J.A., 1985. The rapid development of biofiltration for the purification of diversified waste gas streams. *VDI Berichte* 561, 63-73.

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases.* 8(9), 881-889.

Dorado, A.D., Baquerizo, G., Maestre, J.P., Gamisans, X., Gabriel, D. et Lafuente, J., 2008. Modeling of a bacterial and fungal biofilter applied to toluene abatement: kinetic parameters estimation and model validation. *Chem. Eng. J.* 140 (1-3), 52-61.

Dore, M., 1989. Chimie des oxydants et traitement des eaux. Technique et Documentation-Lavoisier, Paris.

Du Plessis, C.A., Strauss, J.M. et Riedel, K.H., 2001. BTEX catabolism interactions in a toluene-acclimatized biofilter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 122-128.

Ebrahimi, M., Sarikhani, M.R. et Fallah, R., 2012. Assessment of biodegradation efficiency of some isolated bacteria from oil contaminated sites in solid and liquid media containing oil-compounds. *Intl. Res. J. Appl. Basic. Sci.* 3 (1), 138-147.

Edwards, F.G. et Nirmalakhandan, N., 1996. Biological treatment of airstreams contaminated with VOCs: an overview. *Water Science and Technology* 34, 565-571.

Egli, T. et Fiechter, A., 1981. Theoretical analysis of media used in the growth of yeasts on methanol. *Journal of General Microbiology* 123, 365-369.

El Aalam, S., Pauss, A. et Lebeault, J.M., 1993. High efficiency styrene biodegradation in a biphasic organic/water continuous reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 696-699.

Elain, A., Vincent, P., Hadjiev, D. et Sire, O., 2006. Mise au point d'un réacteur à biofilm adhésion et réponse au stress. 12 Colloque National de la Recherche en IUT.

El Fantroussi, S., Giot, R., Naveau, H. et Agathos, S.N., 1998. Acclimation of a methanogenic consortium to a mixture of hydroxylated aromatic compounds. *Chemosphere* 36, 1575-1583.

Elmolla, E.S. et Chaudhuri, M., 2010a. Comparison of different advanced oxidation processes for treatment of antibiotic aqueous solution. *Desalination.* 256, 43-47.

Elmolla, E.S. et Chaudhuri, M., 2010b. Photocatalytic degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution using UV/TiO₂ and UV/H₂O₂/TiO₂ photocatalysis. *Desalination.* 252, 46-52.

Esplugas, S., Bila, D.M., Krause, L. et Dezotti, M., 2007. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials* 149, 631-642.

Esteve-Nenez, A., Caballero, A. et Ramos, J.L., 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 335-352.

Fanlo, J.L. et Carre, J., 2006. Pollution olfactive, sources d'odeurs, cadre réglementaire, techniques de mesures et procédés de traitement. Etat de l'art, *Recherche coopérative sur les déchets et l'environnement*, Etude n°03-0808-0809/1A.

Farrokhi, M., Ashrafi, D., roohbakhsh, E. et Yoonesi, A., 2014. Hospital Wastewater Treatment by Integrated Fixed Film Activated Sludge, Using Rice Husk as Fixed Media. *Advances in Life Sciences* 4(3), 178-183.

Fdil, F., Aaron, J., Oturan, N., Chaouch, A. et Oturan, M., 2003. Dégradation photochimique d'herbicides chlorophenoxyalcanoïques en milieux aqueux. *Rev. Sci. Eau.* 16, 123-142.

Feinberg, E.L., Ramage, P.I.N. et Trudgill, P.W., 1980. The degradation of n-alkyl-cycloalkanes by a mixed bacterial culture. *J. Gen. Microbiol.* 121, 507-511.

Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéaus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. et Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(5), 1344-1354.

- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. et Garric, J., 2003.** Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 56, 359-370.
- Ferro Orozco, A.M., Lobo, C.C., Contreras, E.M. et Zaritzky, N.E., 2013.** Biodegradation of bisphenol-A (BPA) in activated sludge batch reactors: Analysis of the acclimation process. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85, 392-399.
- Fewson, C.A., 1988.** Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Tibtech* 6, 148-153.
- Flemming, H-C. et Wingender, J., 2010.** The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623-633.
- Focazio, M., Kolpin, D., Barnes, K., Furlong, E., Meyer, M., Zaugg, S., Barber, L. et Thurman, M.E., 2008.** A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States -- II) Untreated drinking water sources. *Science of The Total Environment* 402(2-3), 201-216.
- Fujita, M., Ike, M. et Hasimoto, S., 1991.** Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered microorganisms. *Wat. Res.* 25, 979-984.
- Furusawa, N., 2008.** A Simple and Solvent-free Method for Determining Tetracyclines in Prawns. *LC-GC Europe* 21(4).
- Gabet-Giraud, V., Miège, C., Choubert, J.M., Ruel, S.M. et Coquery, M., 2010.** Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment* 408(19), 4257-4269.
- Gagne, F., Blaise, C. et Andre, C., 2006.** Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(3), 329-336.
- Garcia-Ac, A., Segura, P., Viglino, L., Fürtös, A., Gagnon, C., Prévost, M. et Sauvé, S., 2009.** On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water. *Journal of Chromatography. A* 1216(48), 8518-8527.
- Gaudin, F., Andres, Y. et Le Cloirec, P., 2005.** Odorous emission biofiltration with new synthetic packing materials: essential nutrient release. *In International Congress Biotechniques for Air Pollution Control*. La Coruna, Spain, p. 263-271.
- Gauthier, E., Déziel, E., Villemur, R., Juteau, P., Lépine F. et Beaudet, R., 2003.** Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. *Journal of Applied Microbiology* 94, 301-311.

Gerards, R., Gevaert, D. et Vriens, L., 1995. Experiences in odour and of-gas treatment with full-scale seghobioclean systems. *In proceeding of the 9th Forum for Applied Biotechnology*. Gent, Belgique, 12-14 Septembre. 2273-2278.

Gibson, J. et Harwood, C.S., 2002. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 345-369.

Gienfrada, L. et Rao, M.A., 2008. Interactions between xenobiotics and microbial and enzymatic soil activity. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 38, 269-310.

Glaze, W.H., Kwang, J.W. et Chapin, D.H., 1987. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Science and Engineering* 9, 335-352.

Gogate, P.R. et Pandit, A.B., 2004. A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Adv. Environ. Res.* 8, 553-597.

Goi, A., 2005. Advanced oxidation processes for water purification and soil remediation. *PhD Thesis*. Tallinn University of Technology.

Goldstein, R.M., Mallory, L.M. et Alexander, M., 1985. Reasons for possible failure of inoculation to inoculation enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 977-983.

Golet, E.M., Alder, A.C. et Giger, W., 2002a. Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environmental Science & Technology* 36(17), 3645-3651.

Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C. et Giger, W., 2002b. Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction. *Analytical Chemistry* 74(21), 5455-5462.

Golet, E.M., Alder, A.C., Hartmann, A., Ternes, T.A. et Giger, W., 2001. Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry* 73(15), 3632-3638.

Goller, C.C et Romeo, T., 2008. Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 37-66.

Gómez, M., Petrović, M, Fernández-Alba, A. et Barceló, D., 2006. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1114(2), 224-233.

Gómez-Pacheco, C.V., Sánchez-Polo, M., Rivera-Utrilla, J. et López-Peñalver, J., 2011. Tetracycline removal from waters by integrated technologies based on ozonation and biodegradation. *Chem. Eng. J.* 178, 115-121.

González, O., Carne, S., Santiago, E., 2007. Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates. *Journal of Hazardous Materials* 146, 459-464.

González, G., Herrera, G., Garcá, M.T. et Peña, M., 2001. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology* 80, 137-142.

Gostomski, P.A., Sisson, J.B. et Cherry, R.S., 1997. Water content dynamics in biofiltration: the role of humidity and microbial heat generation. *Journal of Air and Waste Management Association* 47, 936-944.

Goswami, G., Shinkazh, N. et Davis, N., 2014. Optimal Pharmacologic Treatment Strategies in Obesity and Type 2 Diabetes. *J. Clin. Med.* 3, 595-613.

Grady, C.P.L., 1985. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 660-674.

Greene, E.A., Kay, J.G., Jaber, K., Stehmeier, L.G. et Voordouw, G., 2000. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (12), 5282-5289.

Greenless, K.J., 2003. Animal drug human food safety toxicology and antimicrobial resistance-the square peg. *International Journal of Toxicology* 22, 131-134.

Greń, I., 2012 . Microbial transformation of xenobiotics. *CHEMIK* 66, 8, 835-842.

Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A. et Barceló, D., 2010. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International* 36, 15-26.

Gros, M., Petrović, M. et Barcelo, D., 2006. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386, 941-952.

Guang-Hui, Y., Xiao-Jun, X. et Pin-Jing, H., 2007. Isolates identification and characteristics of microorganisms in biotrickling filter and biofilter system treating H₂S and NH₃. *Journal of Environmental Sciences* 19, 859-63.

Guardabassi, L., Dalsgaard, A. et Olsen, J.E., 1999. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter spp.* Isolated from aquatic sources. *Applied Microbiology* 87, 659-667.

- Guo, Y.C. et Krasner, S.W., 2009.** Occurrence of primidone, carbamazepine, caffeine and precursor for N-nitrosodimethylamine in drinking waters sources impacted by wastewater. *Journal of the American Water Resources Association* 45, 58-67.
- Ha, H., Mahanty, B., Yoon, S. et Kim, C.G., 2016.** Degradation of the long-resistant pharmaceutical compounds carbamazepine and diatrizoate using mixed microbial culture. *J. Environ. Sci. Health A* 51(6), 467-471.
- Haddou, M., 2010.** Dégradation de dérivés de l'acide benzoïque par les procédés d'oxydation avancée en phase homogène et hétérogène : procédés Fenton, photo-Fenton et photocatalyse. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse.
- Haguenoer, J-M., 2010.** Les résidus de médicaments présentent-ils un risque pour la santé publique ? *Santé publique* 22 (3), 325-342.
- Hale, A.J., Snyder, G.M., Ahern, J.W., Eliopoulos, G., Ricotta, D. et Alston, W.K., 2018.** When are Oral Antibiotics a Safe and Effective Choice for Bacterial Bloodstream Infections? An Evidence-Based Narrative Review. *J. Hosp. Med.* 13, 328-335.
- Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lutzhoft, H.C. et Jorgensen, S.E., 1998.** Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment-A Review. *Chemosphere* 36, 357-393.
- Hammami, S., 2008.** Étude de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée, Application à la dépollution des rejets industriels. Thèse Université Tunis El Manar Faculté des Sciences de Tunis, p. 20-32.
- Hammel, Y., Mohamed, R., Gremaud, E., Lebreton, M. et Guy, P., 2008.** Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1177(1), 58-76.
- Hamsavathani, V., Aysha, O.S. et Valli, S., 2015.** Biodegradation of xenobiotics: a review on petroleum hydrocarbons and pesticide degradation. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 4 (11), 1791-1808.
- Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H. et Nau, H., 2002.** Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 74(7), 1509-1518.
- Han, Y.L., Kuo, M.C.T., Tseng, I.C. et Lu, C.J., 2007.** Semicontinuous microcosm study of aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene. *Journal of Hazardous Materials* 148, 583-591.
- Hao, C., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P. et Solomon, K., 2006.** Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384(2), 505-513.

- Harris, N.P. et Hansford, G.S., 1976.** A study of substrate removal in a microbial film reactor. *Water Res.* 10, 935-943.
- Harshbarger, J.C., Coffey, M.J. et Young, M.Y., 2000.** Intersexes in Mississippi river shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis, Missouri, USA. *Marine Environmental* 50, 247-250.
- Hartmann, A., Alder, A.C., Koller, T. et Widmer, R.M., 1998.** Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of *umuC* genotoxicity in native hospital waste water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(3), 377-382.
- Hartmans, S., 1990.** Biological waste gas treatment. In *proceeding of the 5th European Congress of Biotechnology*. Torino, Italie, 12-15 Septembre.
- Hazen, T.C., Fliermans, C.B., Hirsch, R.P. et Esch, G.W., 1978.** Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 731-738.
- Heberer, T., Mechlinski, A., Fanck, B., Knappe, A., Massmann, G., Pekdeger, A. et Fritz, B., 2004.** Field studies on the fate and transport of pharmaceutical residues in bank filtration. *Ground Water Monitoring and Remediation* 24, 70-77.
- Heberer, T., 2002.** Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5-17.
- Hernando, M.D., Mezcua, M., Fernandez-Alba, A.R. et Barcelo, D., 2006.** Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334-342.
- Herrygers, V., Van Langenhove, H. et Smet, E., 2000.** Biological treatment of gases polluted by volatile sulfur compounds. In *Environmental Technologies to treat Sulfur Compounds*, Ed Piet Lens et Look Hulshoff Pol 12, 281-304.
- Hickman, G.T. et Novak, J.T., 1984.** Acclimation of activated sludge to pentachlorophenol. *J.W.P.C.F.* 56, 364-369.
- Hindumathy, C.K. et Gayathri, V., 2013.** Effect of Pesticide (Chlorpyrifos) on Soil Microbial Flora and Pesticide Degradation by Strains Isolated from Contaminated Soil. *J. Bioremed. Biodeg.* 4, 178.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. et Kratz, K.L., 1999.** Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment* 225, 109-118.
- Hoigné, J. et Bader, H., 1983.** Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water-II. *Water Res.* 17, 185-194.
- Hoigné, J. et Bader, H., 1979.** Ozonation of Water: Selectivity and Rate of Oxidation of Solutes. *Ozone Sci. Eng.* 1, 73-85.

Homem, V. et Santos, L., 2011. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices-A review. *J. Environ. Manage.* 92, 2304-2347.

Hoppe-Jones, C., Dickenson, E.R. et Drewes, J.E., 2012. The role of microbial adaptation and biodegradable dissolved organic carbon on the attenuation of trace organic chemicals during groundwater recharge. *Science of the Total Environment* 437, 137-144.

Hu, X., Zhou, Q. et Luo, Y., 2010. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution* 158(9), 2992-2998.

Huggett, D., Khan, I., Foran, C.M. et Schlenk, D., 2003. Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in united states wastewater effluent. *Environmental Pollution* 121(2), 199-205.

Hughes, J.D., Wibowo, Y., Sunderland, B. et Hoti, K., 2017. The role of the pharmacist in the management of type 2 diabetes: current insights and future directions. *Integr. Pharm. Res. Pract.* 6, 15-27.

Humeau, P., Baléo, J.N., Bourcier, J. et Le Cloirec, P., 2000. Flow characterization in a gas-liquid column: application to a bioscrubber for the deodorization of waste gases. *Water Science and Technology* 41, 191-198.

Huschek, G., Hansen, P.D., Maurer, H.H., Kregel, D. et Kayser, A., 2004. Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations. *Environmental Toxicology* 19(3), 226-240.

Hutzinger, O. et Veerkamp, W., 1981. Xenobiotic chemicals with pollution potential. *FEMS symposium* 12, 3-45.

Iboukhoulef, H., 2014. Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydations avancées basés sur le système Fenton-like (H₂O₂/Cu). Thèse de doctorat. Université Moloud Maamri, Tizi Ouzou.

Iliuta, I., Iliuta, M.C. et Larachi, F., 2005. Hydrodynamics modeling of bioclogging in waste gas treating trickle-bed bioreactors. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44, 5044-5052.

Iranpour, R., Cox, H.H.J., Deshusses, M.A. et Schroeder, E.D., 2005. Literature review of air pollution control biofilters and biotrickling filters for odor and volatile organic compound removal. *Environ. Progress* 24(3), 254-267.

Isidori, M., Bellotta, M., Cangiano, M. et Parrella, A., 2009. Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environment International* 35, 826-829.

Ivleva, N., Wagner, M., Szkola, A., Horn, H., Neissner, R. et Haisch, C., 2010. Label-Free in situ SERS imaging of biofilms. *J. Phys. Chem. B.* 114, 10184-10194.

Jacobs, D.B., Hayes, G.R. et Lockwood, D.H., 1989. In vitro effects of sulfonylurea on glucose transport and translocation of glucose transporters in adipocytes from streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 38, 205-211.

Jacobsen, A.M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., et Honoré Hansen, S., 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1038(1-2), 157-170.

Jagadevan, S., Dobson, P. et Thompson, I.P., 2011. Harmonisation of chemical and biological process in development of a hybrid technology for treatment of recalcitrant metalworking fluid. *Bioresource Technology* 102, 8783-8789.

Jager, R.A., Lang, M.E. et Saltmarsh, K.J., 1993. Biofilter design and performance evaluation. *Proc. of 66th Annual Conf. and Expo. of the Water Environ. Fed. Anaheim*, 481-491.

Jalayeri, H., Doulati Ardejani, F., Marandi, R. et Rafiee pur, S., 2013. Biodegradation of phenol from a synthetic aqueous system using acclimatized activated sludge. *Arabian Journal of Geosciences* 6(10), 3847-3852.

Janssen, D.B., Oldenhuis, R. et Van Den Wijngaard, A.J., 1989. Degradation of xenobiotic compounds by microorganisms. *VDI Berichte* 735, 25-39.

Jelić, A., Petrović, M. et Barceló, D., 2009. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Talanta* 80(1), 363-371.

Jiang, X. et Tay, J.H., 2010. Microbial community structures in a horizontal biotrickling filter degrading H₂S and NH₃. *Bioresource Technology* 101, 1635-1641.

Jiang, H.L., Tay, J.H., Maszena, A.M. et Tay, S.T.L., 2006. Enhanced phenol biodegradation and aerobic granulation by two coaggregating bacterial strains. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6137-6142.

Jobling, S., 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 210-218.

Johnson, A.C., Jürgens, M.D., Williams, R.J., Kümmerer, K., Kortenkamp, A. et Sumpter, J.P., 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. *Journal of Hydrology* 348, 167-175.

Jol, A., Wijngaard, M.H. et Fank, H., 1994. Application of bio-trickling filters at composting and digesting plants. *Biologische Abgasreinigung* 1104, 169-180.

Jones, O.A.H., Voulvoulis, N. et Lester, J.N., 2002. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research* 36, 5013-5022.

Jones, S.H. et Alexander, M., 1988. Effect of inorganic nutrients on the acclimation period preceding mineralization of organic chemicals in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3177-3179.

Jorgensen, S.E. et Halling-Sorensen, B., 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere* 40, 691-699.

Jorio, H., Bibeau, L. et Heitz, M., 2000. Biofiltration of Air Contaminated by Styrene: Effect of Nitrogen Supply, Gas Flow Rate, and Inlet Concentration. *Environmental Science & Technology* 34, 1764-1771.

Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffman, B., Löffler, D., McArdell, C.S., Ternes, T.A., Thomsen, A. et Siegrist, H., 2006. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water Research* 40, 1686-1696.

Jou, G.-J.G. et Huang, G.G., 2003. A pilot study for oil refinery wastewater treatment using a fixed film bioreactor. *Advanced Environmental Research* 7, 463-469.

Jouenne, T., 2008. Biofilms bactériens. Techniques de l'ingénieur, BIO600.

Juneson, C., Ward, O.P. et Singh, A., 2001. Microbial treatment of a styrene-contaminated air stream in a biofilter with high elimination capacities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 196-202.

Jung, Y.J., Kim, W.G., Yoon, Y., Kang, J.-W., Hong, Y.M. et Kim, H.W., 2012. Removal of amoxicillin by UV and UV/H₂O₂ processes. *Sci. Total Environ.* 420, 160-167.

Kalwasińska, A., Kęsy, J., Donderski, W. et Lalke-Porczyk, E., 2008. Biodegradation of Carbendazim by Planktonic and Benthic Bacteria of Eutrophic Lake Chełmżyńskie. *Polish J. of Environ. Stud.* 17(4), 515-523.

Karamanev, D.G. et Nikolov, L.N., 1988. Influence of some physicochemical parameters on bacterial activity of biofilm: Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.* 31(4), 295-9.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M. et Guwy, A.J., 2007. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1161(1-2), 132-145.

Katipoglu, T., Cokgor, EU., Insel, G. et Orhon, D., 2010. Response of mixed microbial culture to 2,6-dihydroxybenzoic acid and peptone mixture at low sludge age-effect of culture history. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 45, 875-882.

- Keenes, C. et Thalasso F., 1998.** Waste Gas Biotreatment Technology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 72(4), 303-319.
- Keever, J., Voyksner, R. et Tyczkowska, K., 1998.** Quantitative determination of ceftiofur in milk by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 794(1-2), 57-62.
- Kemper, N., Färber, H., Skutlarek, D. et Krieter, J., 2008.** Analysis of antibiotic residues in liquid manure and leachate of dairy farms in Northern Germany. *Agricultural Water Management* 95(11), 1288-1292.
- Kennes, C., Rene, E.R. et Veiga, M.C., 2009.** Bioprocess for air pollution control. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84, 1419-1436.
- Khan, S.J. et Ongerth, J.E., 2004.** Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere* 54, 355-367.
- Khan, E., Babcock, R.W., Jongskul, S., Devadason, F.A. et Tuprakay, S., 2003.** Determination of biodegradable dissolved organic carbon using entrapped mixed microbial cells. *Water Research* 37, 4981-4991.
- Khleifat, K.M., 2006.** Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by a two-member facultative anaerobic bacterial consortium. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1030-1035.
- Kilpi, S., Himberg, K., Yrjälä, K. et Backström, V., 1988.** The degradation of biphenyl and chlorobiphenyls by mixed bacterial cultures. *FEMS Microbiol. Lett.* 53, 19-26.
- Kim, Y.M., Ahn, C.K., Woo, S.H., Jung, G.Y. et Park, J.M., 2009.** Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *J. Biotechnol.* 144, 293-298.
- Kim, S., Cho, J., Kim, I.S., Vanderford, B.J. et Snyder, S.A., 2007.** Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Research* 41, 1013-1021.
- Kim, D., Cai, Z. et Sorial, G.A., 2005.** Evaluation of trickle-bed biofilter performance under periodic stressed operating conditions as a function of styrene loading. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 55, 200-209.
- Kim, C.H.J. et Maier, W., 1986.** Acclimation and biodegradation of chlorinated organic compounds in the presence of alternated substrates. *J.W.P.C.F.* 58, 157-164.
- Kirchner, K., Gossen, C.A. et Rehm, H.J., 1991.** Purification of exhaust air containing organic pollutants in a trickle-bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 396-400.
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D. et Kassinos, D., 2009.** Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International* 35, 402-417.

- Kleinheinz, G. et Bagley, S., 1998.** Biofiltration for the removal and detoxification of a complex mixture of volatile organic compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20, 101-108.
- Knackmuss, H.-J., 1996.** Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *Journal of Biotechnology* 51, 287-295.
- Knirel, Y.A., 1990.** Polysaccharides antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Rev. Microbiol.* 17, 273-304.
- Kok, H.J.G., 1992.** Bioscrubbing of air contaminated with high concentration of hydrocarbons. *Studies in Environmental Science* 51, 77-82.
- Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N et Mahadik, K.R., 2009.** Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology* 8, 159-168.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. et Buxton, H.A.T., 2002.** Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology* 36, 1202-1211.
- Koutinas, M., Peeva, L.G. et Livingston, A.G., 2005.** An attempt to compare the performance of bioscrubbers and biotrickling filters for degradation of ethyl acetate in gas streams. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 1252-1260.
- Koyuncu, I., Arikan, O.A., Wiesner, M.R. et Rice, C., 2008.** Removal of hormones and antibiotics by nanofiltration membranes. *J. Membr. Sci.* 309, 94-101.
- Kraakman, A., 2005.** Biotrickling and Bioscrubber Applications to control odor and air pollutants. *Biotechnology for odor and air pollution control.* ed. Z. Shareefdeen and A. Singh. Springer. Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Kulkarni, A.G. et Kaliwal, B.B., 2015.** Bioremediation of Methomyl by Soil Isolate - *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bioremed. Biodeg.* 6, 281.
- Kümmerer, K., 2009.** Antibiotics in the aquatic environment--a review--Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.
- Kümmerer, K., 2001.** Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources -a review. *Chemosphere* 45, 957-969.
- Kümmerer, K., Steger-Hartmann, T. et Meyer, M., 1997.** Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. *Water Research* 31(11), 2705-2710.
- Kuo, W.G., 1992.** Decolorizing dye wastewater with Fenton's reagent. *Water Res.* 26, 881-886.

- Labrecque, M.H., 2003.** Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. Mémoire (M. Sc). Université Laval (Québec).
- Lambert, S.D., Graham, N.J.D., Sollars, C.J. et Fowler, G.D., 1997.** Evaluation of inorganic adsorbents for the removal of problematic textile dyes and pesticides. *Water Sci. Technol.* 36, 173-180.
- Larsson, D.G.J., de Pedro, C. et Paxeus, N., 2007.** Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* 148(3), 751-755.
- Lebeault, J.M., Nonus, M., Djeribi, R. et Dezenclous, T., 1996.** Solubilisation and biodegradation of organic pollutants in biphasic organic systems. Fortschritte bei der termischen, katalytischen, sorptiven und biologischen abgasreinigung. *VDI 1241*, 531-537.
- Lebeault, J.M., Dezenclous, T., Nonus, M. et Ascon-Cabrera, M., 1995.** Solubilisation and biodegradation of organic pollutants in biphasic aqueous-organic system. *7th European Congress on Biotechnology*. Paris, France, Novembre 7-9.
- Le Cloirec, P., 1998.** Les composés organiques volatils (COV) dans l'environnement. Lavoisier.
- Lee, S-H. et Heber, A.J., 2010.** Ethylene removal using biotrickling filters: part II. Parameter estimation and mathematical simulation. *Chemical Engineering Journal*. 158, 89-99.
- Lee, S-H., Heber, A.J. et Zheng, C., 2010.** Ethylene removal using biotrickling filters: part II. *Chemical Engineering Journal* 158, 79-88.
- Legrini, O., Oliveros, E. et Braun, A.M., 1993.** Photochemical processes for water treatment. *Chem. Rev.* 93, 671-698.
- Leisinger, T., 1983.** Microorganisms and xenobiotic compounds. *Experientia*. 39, 1183-1190.
- Leson, G. et Winer, A.M., 1991.** Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions. *J. Air Waste Manage. Assos.* 41, 1045-1054.
- Lewandowski, Z., 2000.** 1- Structure and Functions of Biofilms. *Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control*. L. V. Evans, Harwood Academic Pub.
- Lewandowski, Z., Stoodley, P., Altobelli, S. et Fukushima, E., 1994.** Hydrodynamics and kinetics in biofilm systems- Recent advances and new problems. *Wat. Sci. Tech.* 29, 223-229.
- Lewandowski, Z., Walser, G. et Characklis, W.G., 1991.** Reaction kinetics in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 38(8), 877-82.
- Lewis, D.L., Kolling, H.P. et Hodson, R.E., 1986.** Nutrient limitation and adaptation of microbial populations of chemical transformations. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 598-603.

- Leys, N.M., Bastiaens, L., Verstraete, W. et Springael, D., 2005.** Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied and Microbiology and Biotechnology* 66, 726-736.
- Li, Y., Zhang, W. et Xu, J., 2014.** Siloxanes removal from biogas by a lab-scale biotrickling filter inoculated with *Pseudomonas aeruginosa* S240. *J. Hazard. Mater.* 275, 175-184.
- Li, T., Liu, J., Bai, R. et Wong, F.S., 2008a.** Membrane-aerated biofilm reactor for the treatment of acetonitrile wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 42(6), 2099-2104.
- Li, G., He, Z., An, T., Zeng, X., Sheng, G. et Fu, J., 2008b.** Comparative study of the elimination of toluene vapours in twin biotrickling filters using two microorganisms *Bacillus cereus* S1 and S2. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 1019-1026.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, Y., Chang, H. et Jin, F., 2008c.** Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Research* 42(1-2), 307-317.
- Liang, Z., Li, W., Yang, S. et Du, P., 2010.** Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying and activated sludge. *Chemosphere* 81, 626-632.
- Lin, Y.H. et Hsien, T.Y., 2009.** Kinetics of biodegradation of phenolic wastewater in a biofilm reactor. *Water Sci. Technol.* 59(9), 1703-1711.
- Lin, S.H., Lin, C.M. et Leub, H.G., 1999.** Operating characteristics and kinetic studies of surfactant wastewater treatment by Fenton oxidation. *Water Res.* 33, 1735-1741.
- Lindberg, R.H., Wennberg, P., Johansson, M.I., Tysklind, M. et Andersson, B.A.V. 2005.** Screening of Human Antibiotic Substances and Determination of Weekly Mass Flows in Five Sewage Treatment Plants in Sweden. *Environmental Science & Technology* 39(10), 3421-3429.
- Lindberg, R., Jarnheimer, P.A., Olsen, B., Johansson, M. et Tysklind, M., 2004.** Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* 57(10), 1479-1488.
- Lindsey, M., Meyer, M. et Thurman, E.M., 2001.** Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 73(19), 4640-4646.
- Liu, C., Liu, J., Li, J., He, H., Peng, S., Li, C. et Chen, Y., 2013.** Removal of H₂S by co-immobilized bacteria and fungi biocatalysts in a biotrickling filter. *Process Saf. Environ. Prot.* 91, 145-152.

Liu, J.W. et Wang, Z.L., 2012. Research on packing materials selection for biotrickling filter to treat waste gas containing organic compounds. *Environ. Pollut. Control.* 34, 17-21.

Liu, C., Li, J., Liu, J., Peng, S. et Li, C., 2010. Rapid start-up of a high performance biotrickling filter removal of H₂S. In: *The 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, Chengdu, China.

Loaiza-Ambuludi, S., Panizza, M., Oturan, N., Özcan, A. et Oturan, M.A., 2013. Electro-Fenton degradation of anti-inflammatory drug ibuprofen in hydroorganic medium. *J. Electroanal. Chem.* 702, 31-36.

López, M.E., Rene, E.R., Malhautier, L., Rocher, J., Bayle, S., Veiga, M.C. et Kennes, C., 2013. One-stage biotrickling filter for the removal of a mixture of volatile pollutants from air: performance and microbial community analysis. *Bioresour Technol.* 138, 245-252.

López, C., Mielgo, I., Moreira, M.T., Feijoo, G. et Lema, J.M., 2002. Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. *Journal of Biotechnology* 99, 249-257.

Luvsanjamba, M., Sercu, B., Van Peteghem, J. et Van Langenhove, H., 2008. Long-term operation of a thermophilic biotrickling filter for removal of dimethyl sulfide. *Chem. Eng. J.* 142, 248-255.

Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E., Cooper, D.W. et Jones, D.M., 1999. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments and water from U.K. Tyne and Tee estuaries. *Environmental Science and Technology* 33, 1009-1014.

Lye, C.M., Frid, C.L.J. et Gill, M.E., 1998. Seasonal reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to sewage effluent. *Marine Ecology-Progress Series* 170, 249-260.

Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E. et McCormick, D., 1997. Abnormalities in the reproductive health of the flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Marine Pollution Bulletin* 34, 34-41.

Mahnik, S., Lenz, K., Weissenbacher, N., Mader, R. et Fuerhacker, M., 2007. Fate of 5-fluorouracil, doxorubicin, epirubicin, and daunorubicin in hospital wastewater and their elimination by activated sludge and treatment in a membrane-bio-reactor system. *Chemosphere* 66(1), 30-37.

Majeau, J.A., Brar, S.K. et Tyagi, R.D., 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 101, 2331-2350.

Malhautier, L., Khammer, N., Bayle, S. et Fanlo, J-L., 2005. Biofiltration of Volatile Organic Compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68(1), 16- 22.

Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F. et Vandecasteele, J.P., 2003. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP* 58(4), 441-448.

- Markiewicz, M., Jungnickel, C., Stolte, S., Bialk-Bielińska, A., Kumirska, J. et Mroziak, W., 2017a.** Ultimate biodegradability and ecotoxicity of orally administered antidiabetic drugs. *J. Hazard. Mater.* 333, 154-161.
- Markiewicz, M., Jungnickel, C., Stolte, S., Bialk-Bielińska, A., Kumirska, J. et Mroziak, W., 2017b.** Primary degradation of antidiabetic drugs. *J. Hazard. Mater.* 324, 428-435.
- Martin, G., Besson, G. et Lebeault, J.M., 1987.** Traitement de l'air, de l'eau et des déchets: Traitement biologiques des odeurs. *Techmémoires* 5, 6-8.
- Martinelli, I., 1999.** Infiltration des eaux de ruissellement pluvial et transfert de polluants associés dans le sol, urbain. Thèse de Doctorat. INSA de Lyon (France).
- Martínez-Carballo, E., González-Barreiro, C., Scharf, S. et Gans, O., 2007.** Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148(2), 570-579.
- Mascolo, G., Balest, L., Cassano, D., Laera, G., Lopez, A., Pollice, A. et Salerno, C., 2010.** Biodegradability of pharmaceutical industrial wastewater and formation of recalcitrant organic compounds during aerobic biological treatment. *Bioresource Technology* 101, 2585-2591.
- Maszenan, A.M., Liu, Y. et Ng, W.J., 2011.** Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. *Biotechnology Advances* 29, 111-123.
- Matsuo, H., Sakamoto, H., Arizono, K. et Shinohara, R., 2011.** Behavior of Pharmaceuticals in Waste Water Treatment Plant in Japan. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* 87, 31-35.
- McDermott, P.F., Zhao, S., Wagner, D.D., Simjee, S., Walker, R.D. et White, D.G., 2002.** The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal Biotechnology* 13, 71-84.
- McRae, B.M., LaPara, T.M., et Hozalski, R.M., 2004.** Biodegradation of haloacetic acids by bacterial enrichment cultures. *Chemosphere* 55, 915-25.
- Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T. et Dagot, C., Fatta-Kassinos, D., 2013.** Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Res.* 47, 957-995.
- Michel, M-C., 1997.** Traitement de l'hydrogène sulfuré par biolavage. Mémoire de maîtrise. Université Laval, Québec.
- Migaud, V., 1996.** Etude de bioprocédés (filtres percolateurs et biolaveurs) de traitement de gaz – approche des choix technologiques. Thèse de doctorat. Université de Rennes, France.
- Miller, M.J. et Allen, D.G., 2005.** Biodegradation of α -Pinene in Model Biofilms in Biofilters. *Environ. Sci. Technol.* 39 (15), 5856-5863.

Mimeault, C., Woodhouse, A., Miao, X.S., Metcalfe, C.D., Moon, T.W. et Trudeau, V.L., 2005. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish. *Carassius auratus. Aquat. Toxicol.* 73, 44-54.

Mita, L., Grumiro, L., Rossi, S., Bianco, C., Defez, R., Gallo, P, Mita, D.G. et Diano, N. 2015. Bisphenol A removal by a *Pseudomonas aeruginosa* immobilized on granular activated carbon and operating in a fluidized bed reactor. *Journal of Hazardous Materials* 291, 129-135.

Mompelat, S., Le Bot, B. et Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803-814.

Montes, M., Veiga, M.C. et Kennes, C., 2010. Two-liquid-phase mesophilic and thermophilic biotrickling filters for the biodegradation of α -pinene. *Bioresource Technology* 101, 9493-9499.

Moreno-Andrade, I. et Buitrón, G., 2004. Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology* 50(10), 251-258.

Morgan-Sagastume, J.M. et Noyola, A., 2006. Hydrogen sulfide removal by compost biofiltration: Effect of mixing the filter media on operational factors. *Bioresource Technology* 97, 1546-1553.

Mörsen, A. et Rehm, H.J., 1987. Biologically active support containing bound adsorbent particles and microorganisms for waste stream purification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 283-288.

Moussavi, G. et Mohseni, M. 2008. The treatment of waste air containing phenol vapors in biotrickling filter. *Chemosphere* 72, 1649-1654.

Movahedyan, H., Assadi, A. et Amin, M.M., 2008. Effects of 4-chlorophenol loadings on acclimation of biomass with optimized fixed time sequencing batch reactor. *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.* 5(4), 225-234

Mowla, D. et Ahmadi, M., 2007. Theoretical and experimental investigation of biodegradation of hydrocarbon polluted water in a three phase fluidized-bed bioreactor with PVC biofilm support. *Biochemical Engineering Journal* 36, 147-156.

Mrozik, W. et Stefańska, J., 2014. Adsorption and biodegradation of antidiabetic pharmaceuticals in soils. *Chemosphere* 95, 281-288.

Mudliar, S., Giri, B., Padoley, K., Satpute, D., Dixit, R., Bhatt, P., Pandey, R., Juwarkar, A. et Vaidya, A., 2010. Bioreactors for treatment of VOCs and odours- a review. *Journal of Environment Management* 91, 1039-1054.

Mulligan, C.N., 2002. Environmental Biotechnology-Technologies for Air, Water, Soil, and Wastes. ABS Consulting, États-Unis, p. 39-76.

Mullot, J.U., 2009. Modélisation des flux de médicaments dans les effluents hospitaliers. Thèse de la faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry. Université Paris-Sud 11.

Muñoz Sierra, J.D., Picioreanu, C. et Van Loosdrecht, M.C., 2014. Modeling phototrophic biofilms in a plug-flow reactor. *Water Sci. Technol.* 70(7), 1261-1270.

Muñoz, R., Arriaga, S., Hernandez, S., Guieysse, B. et Revah, S., 2006. Enhanced hexane biodegradation in a two phase partitioning bioreactor: overcoming pollutant transport limitation. *Process Biochem* 41, 1614-1619.

Muñoz, S.V.M., 2003. Coupled Advanced oxidation and biological processes for wastewater treatment. Thèse de doctorat N° 2785. Ecole polytechnique Fédérale de Lausanne.

Nagao, T., 1998. Health effects of endocrine disruptors. *Japanese J. Toxicology Environ. Health* 44, 151-167.

Nageswararao, R., Venkateswarlu, N. et Narsimha, R., 2008. Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1187(1-2), 151-164.

Nasuhoglu, D., Rodayan, A., Berk, D. et Yargeau, V., 2012. Removal of the antibiotic levofloxacin (LEVO) in water by ozonation and TiO₂ photocatalysis. *Chem. Eng. J.* 189-190, 41-48.

Nex, F., 2004. Modélisation numérique de la biodégradation des composés organochlorés dans les aquifères fondées sur des expérimentations *in situ* : Le cas des chloroéthènes. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg (France).

Nieto, A., Peschka, M., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M. et Knepper, T.P., 2010a. Phosphodiesterase type V inhibitors: Occurrence and fate in wastewater and sewage sludge. *Water Research* 44(5), 1607-1615.

Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E. et Marcé, R.M., 2010b. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(7), 1484-1489.

Nirupama, D., Venkateswara Rao, P., Thangabalan, B. et Manohar Babu, S., 2014. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of gliclazide and metformin in pure and tablet dosage form. *Int. J. Pharm. & Analytical Res.* 3, 326-333.

Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A. et Khan, A.A., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427(6975), 630-633.

Oh, Y.S., Shareefdeen, Z., Baltzis, B.C. et Bartha, R., 1994. Interactions between benzene, toluene, and p-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotech. Bioeng.* 44, 533-538.

- Okkerse, W.J.H., Ottengraf, S.P.P., Diks, R.M.M., Osinga-Kuipers, B. et Jacobs, P., 1999.** Long term performance of biotrickling filters removing a mixture of volatile organic compounds from an artificial waste gas: dichloromethane and methylmethacrylate. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 20, 49-57.
- Ortega-Clemente, A., Caffarel-Méndez, S., Ponce-Noyola, M.T., Barrera-Cortés, J. et Poggi-Varaldo, H.M., 2009.** Fungal post-treatment of pulp mill effluents for the removal of recalcitrant pollutants. *Bioresource Technology* 100, 1885-1894.
- Ottengraf, S.P.P. et Diks, R.M.M., 1992.** Process technology of biotechniques. In A. J. Dragt, Van Haam J. (eds.), *Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. 17-31.
- Ottengraf, S.P.P., 1987.** Biological systems for waste gas elimination. *Trends in Biotechnology* 5, 132.
- Ouartsi N., 2010.** Biodégradation des fongicides : cas du bromuconazole. Thèse de magister. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- Paca, J., Klapkova, E., Halecky, M., Kim, J. et Soccol, C.R., 2007.** Performance evaluation of a biotrickling filter degrading mixtures of hydrophobic and hydrophilic compounds. *Clean Technol. Environ. Pol.* 9, 69-74.
- Paca, J. et koutsky, B., 1994.** Performance characteristics of a biofilter during xylene and toluene degradation. In *proceeding of the 8th Forum for Applied Biotechnology*. Brugge, Belgique. 28-30 Septembre.
- Paffoni, C., Welte, B., Gousailles, M. et Montiel, A., 2006.** Nouvelles molécules mises en cause par les directives européennes : de la station d'épuration à l'usine de traitement d'eau potable. *Journal Europeen d'Hydrologie* 37, 21-37.
- Palaniyappan, V., Nagalingam, A.K., Ranganathan, H.P., Kandhikuppam, K.B., Kothandam, H.P. et Vasu, S., 2013.** Antibiotics in South Indian coastal sea and farmed prawns (*Penaeus monodon*). *Food Additive and Contaminant* 6(3), 196-199.
- Panchenko, L., Muratova, A. et Turkovskaya, O., 2017.** Comparison of the phytoremediation potentials of *Medicago falcata* L. And *Medicago sativa* L. in aged oil-sludge-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 3117-3130.
- Papic, S., Dinko, V., Natalija, K. et Danijel, S., 2009.** Decolourization and mineralization of commercial reactive dyes by using homogeneous and heterogeneous Fenton and UV/Fenton processes. *Journal of Hazardous Materials* 164, 1137-1145.
- Patrauchan, M.A. et Oriel, P.J., 2003.** Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophila* sp. K. *Journal of Applied Microbiology* 94, 266-272.

- Paul, D.E., 1987.** Experiences with large-scale biological scrubbers. *In proceeding of the International Meeting of Biological Treatment of Industrial Waste Gases*. Francfort, Allemagne, 21-24 juin.
- Penaud, F., 1989.** Etude en réacteur de la biodégradation de composés xénobiotiques apportés en phase liquide ou gazeuse. Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne.
- Pereira, J.H.O.S., Vítor, J.P.V., Maria, T.B., Oscar, G., Santiago, E. et Rui, A.R.B., 2011.** Photocatalytic degradation of oxytetracycline using TiO₂ under natural and simulated solar radiation. *Solar Energy*. 85, 2732-2740.
- Phillips, P.J., Smith, S.G., Kolpin, D.W., Zaugg, S.D., Buxton, H.T., Furlong, E.T., Esposito, K., et Stinson, B., 2010.** Pharmaceutical Formulation Facilities as Sources of Opioids and Other Pharmaceuticals to Wastewater Treatment Plant Effluents. *Environmental Science & Technology* 44(13), 4910-4916.
- Picard, C., Logette, S., Schrotter, J.C., Aimar, P. et Remigy, J.C., 2012.** Mass transfer in a membrane aerated biofilm. *Water Res.* 46(15), 4761-4769.
- Pierini, E., Famiglioni, G., Mangani, F. et Cappiello, A., 2004.** Fate of Enrofloxacin in Swine Sewage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(11), 3473-3477.
- Piram, A., Salvador, A., Gauvrit, J-Y., Lanteri, P. et Faure, R., 2008.** Development and optimisation of a single extraction procedure for the LC/MS/MS analysis of two pharmaceutical classes residues in sewage treatment plant. *Talanta* 74(5), 1463-1475.
- Pitter, P. et Chudoba, J., 1990.** Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. *CRC Press*, Florida.
- Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., et Calamari, D., 2006.** Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells. *Environmental Science & Technology* 40(7), 2442-2447.
- Pomeroy, R.D., 1957.** De-odorizing of gas streams by the use of microbiological growths. *In. Office, U.S.P. (ed). United States*.
- Powell, CL, Nogaro, G. et Agrawal, A., 2011.** Aerobic cometabolic degradation of trichloroethene by methane and ammonia oxidizing microorganisms naturally associated with *Carex comosa* roots. *Biodegradation* 22, 527-38.
- Prasse, C., Schlüsener, M.P., Schulz, R. et Ternes, T.A., 2010.** Antiviral Drugs in Wastewater and Surface Waters: A New Pharmaceutical Class of Environmental Relevance? *Environmental Science & Technology* 44(5), 1728-1735.
- Prechel, S. et Sabo, F., 2005.** Intelligent biofilters: new control and monitoring techniques to optimise the efficiency of biological systems. *In International Congress Biotechniques for Air Pollution Control*. La Coruna, Spain, p. 217-223.

Prescott, I.M., Harley, J.P. et Klein, D.A, 2008. Microbiology. 7th edition, McGraw-Hill, NY. p. 1075-1082.

Putra, E.K., Pranowo, R., Sunarso, J., Indraswati, N. et Ismadji, S., 2009. Performance of activated carbon and bentonite for adsorption of amoxicillin from wastewater: mechanisms, isotherms and kinetics. *Water Res.* 43, 2419-2430.

Quintana, J.B., Weiss, S. et Reemtsma, T., 2005. Pathway's and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* 39, 2654-2664.

Ramírez, M, Gómez, J.M., Aroca, G. et Cantero, D., 2009. Removal of ammonia by immobilized *Nitrosomonas europaea* in a biotrickling filter packed with polyurethane foam. *Chemosphere* 74, 1385-1390.

Ramírez, M., Gomez, J.M., et Cantero, D., 2005. Removal of hydrogen sulphide by immobilized *Thiobacillus thioparus* in a biofilter packed with polyurethane foam. *In International Congress Biotechniques for Air Pollution Control.* La Coruna, Spain, p. 135-142.

Rao, B.U. et Nikalje, A.P., 2011. Determination of gliclazide in a tablet dosage form in the presence of metformin hydrochloride by ion pair-reversed phase liquid chromatographic technique. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5(11), 1331-1337.

Ratola, N., Cincinelli, A., Alves, A. et Katsoyiannis, A., 2012. Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *J. Hazard. Mater.* 239-240, 1-18.

Rattanapan, C., Boonsawang, P. et Kantachote, D., 2009. Removal of H₂S in down-flow GAC biofiltration using sulfide oxidizing bacteria from concentrated latex wastewater. *Bioresource Technology* 100, 125-130.

Reddersen, K., Heberer, T. et Dunnbier, U., 2002. Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water. *Chemosphere* 49, 539-544.

Reineke, W. et Knackmuss, H.J., 1979. Construction of haloaromatics using bacteria. *Nature* 277, 385-386.

Reis, P.J., Reis, A.C., Ricken, B., Kolvenbach, B.A., Manaiá, C.M., Corvini, P.F. et Nunes, O.C., 2014. Biodegradation of sulfamethoxazole and other sulfonamides by *Achromobacter denitrificans* PR1. *J. Hazard. Mater.* 280, 741-749.

Reitzig, R., Pröll, F., Zich, T. et Friedl, A., 1995. Microbiological investigations in newly developed filter media for biological waste gas cleaning. 9th *Forum for Applied Biotechnology.* Gent, Belgique, 12-14 Septembre.

Reshma, S.V., Spandana, S. et Sowmya, M., 2011. Bioremediation Technologies. World Congress of Biotechnology, India.

Revah, S. et Morgan-Sagastume, M.J., 2005. Methods of Odor and VOC Control. *In: Biotechnology for odor and air pollution control*, Ed. by Shareefdeen Z., Singh A. Springer, Berlin Heidelberg, New York, p. 29-60.

Rippey, S.R. et Cabelli, V.J., 1980. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in limnetic environments: relationship of the organism to trophic state. *Microb. Ecol.* 6, 454.

Rittmann, B.E. et McCarty, P.L., 2001. Environmental biotechnology: Principles and applications. McGraw-Hill, New York.

Rittman, B.E. et Manem, J.A., 1992. Development and experimental evaluation of a steady state, multispecies biofilm model. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 914-922.

Rittman, B.E. et Mc Carty, P.L., 1980a. Evaluation of steady-state biofilm kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 2359-2373.

Rittman, B.E. et Mc Carty, P.L., 1980b. Model of steady-state biofilm kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 2343-2357.

Robertson, B.R. et Button, D.K., 1987. Toluene induction and uptake kinetics and their inclusion in the specific-affinity relationship for describing rates of hydrocarbon metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2193-2205.

Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. et Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.* 77, 247-255.

Rosal, R., Rodriguez, A., Perdigon-Melon, J.A., Petre, A., Garcia-Calvo, E., Gomez, M.J., Aguera, A. et Fernandez-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research* 44, 578-588.

Rosenberg, M., 1984. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 22, 289-295.

Rowney, N.C., Johnson, A.C. et Williams, R.J., 2009. Cytotoxic drugs in drinking water: a prediction and risk assessment exercise for the thames catchment in the United kingdom. *Environmental Toxicology Chemistry* 28, 2733-2743.

Rozas, O., Contreras, D., Mondaca, M.A, Pérez-Moya, M. et Mansilla, H.D., 2010. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions. *J. Hazard. Mater.* 177, 1025-1030.

Rozich, A., 1995. Tackle airborne organic vapors with biofiltration. *Environ. Eng. World* 1, 32-34.

Sabba, F., Picioreanu, C., Boltz, J.P. et Nerenberg, R., 2016. Predicting N₂O emissions from nitrifying and denitrifying biofilms: a modeling study. *Water Science and Technology* 75, 530-538.

Sabo, F., Prechel, S. et Schneider, T., 2005. Latest developments in high efficiency biofiltration. In *International Congress Biotechniques for Air Pollution Control*. La Coruna, Spain, p. 203-209.

Sahinkaya, E. et Dilek, F.B., 2005. Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge—Evaluation of biokinetic coefficients. *Environmental Research* 99, 243-252.

Salgado, R., Marques, R., Noronha, J.P., Carvalho, G., Oehmen, A. et Reis, M.A.M., 2012. Assessing the removal of pharmaceuticals and personal care products in a full-scale activated sludge plant. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 1818-1827.

Salyers, A.A., Gupta, A. et Wang, Y., 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiology* 12, 412-316.

Sarkar, A., Tiwari, A., Bhasin, P.S. et Mitra, M., 2011. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Gliclazide: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01(09), 11-19.

Sasi Kiran Goud, E., Reddy, V.K. et Sekhar, C.K., 2012. A New Simple RP–HPLC Method for Simultaneous Estimation of Metformin HCL and Gliclazide Tablet Dosage Form. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 2, 277-283.

Schaule, G., Moschnitschka, D., Schulte, S., Tamachkiarow, A. et Flemming, H.C, 2007. Biofilm growth in response to various concentrations of biodegradable material in drinking water. *Water Sci. Technol.* 55, 191-195.

Schiavon, M., Ragazzi, M., Rada, E.C. et Torretta, V., 2016. Air pollution control through biotrickling filters: A review considering operational aspects and expected performance. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36, 1143-1155.

Schippert, E., 1987. Chemico-biological gas scrubbing for the reduction of organic emissions. In *proceeding of the International Meeting of Biological Treatment of Industrial Waste Gases*. Francfort, Allemagne, 21-24 juin.

Schlenk, D., 2008. Are steroids really the cause for fish feminization? A mini-review of in vitro and in vivo guided TIEs. *Marine Pollution Bulletin* 57, 250-254.

Schmidt, T. et Anderson, W.A., 2017. Biotrickling Filtration of Air Contaminated with 1-Butanol. *Environments* 4(3), 57.

Schmidt, E., Hellwig, M. et Knackmuss, H.J., 1983. Degradation of chlorophenols by a defined microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1038-1044.

- Schubert, R.H.W., 1975.** The relation of aerogenic to anaerogenic aeromonads of the "*hydrophila punctata*" in river water depending on the load of waste. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe B* 160, 237-245.
- Sedlak, D. et Pinkston, K., 2001.** Factors affecting the concentrations of pharmaceuticals released to the aquatic environment. *Water Resources* 120, 56-64.
- Sempere, F., Soria, V.M., Peña-roja, J.M., Izquierdo, M., Palau, J. et Gabaldon, C., 2010.** Comparison between laboratory and pilot biotrickling filtration of air emissions from painting and wood finishing. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 364-370.
- Senior, E., Bull, A.T. et Smith, J.H., 1976.** Enzyme evolution in a microbial community growing on the herbicide Dalapon. *Nature* 263, 476-479.
- Şenkardeş, S., Özaydın, T., Uğurlu, T. et Küçükgül, Ş.G., 2017.** Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the determination of lisinopril and glimepirid in pharmaceuticals. *Marmara Pharmaceutical Journal* 21/2, 338-344.
- Senthilnathan, P.R. et Ganczarczyk, J.S., 1988.** Adaptation and deadaptation kinetics of activated sludge. *Proc. 43rd. Water Conf.* Purdue Univ. 301-307.
- Sercu, B., Nunez, D., Aroca, G., Boon, N., Verstraete, W. et Van Langenhove, H., 2005.** Inoculation and start up of a biotrickling filter removing dimethyl sulphide. *Chemical Engineering Journal* 113, 127-134.
- Shahgoli, H. et Ahangar, A.G., 2014.** Factors controlling degradation of pesticides in the soil environment: A Review. *Agriculture Science Developments* 3, 273-278.
- Shareefdeen, Z. et Baltzis, B.C., 1994.** Biofiltration of toluene vapor under steady-state and transient conditions: Theory and experimental results. *Chemical Engineering Science* 49, 4347.
- Sharma, V.K., 2008.** Oxidative transformations of environmental pharmaceuticals by Cl₂, ClO₂, O₃, and Fe(VI): Kinetics assessment. *Chemosphere* 73, 1379-1386.
- Sharma, V. et Mishra, S., 2006.** Ferrate (VI) oxidation of ibuprofen: A kinetic study. *Environmental Chemistry Letters* 3, 182-185.
- Simões, M., Simões, L. et Vieira, M., 2010.** A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* 43, 573-583.
- Singh, D.K., 2008.** Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. *Ind. J. Microbiol.* 48, 35-40.
- Singh, A., Shareefdeen, Z. et Ward, O.P., 2005.** Bioscrubber Technology. In: *Biotechnology for odor and air pollution control*, Ed. by Shareefdeen Z., Singh A. Springer, Berlin Heidelberg, New York, p. 169-190.

Sinha, S., Chattopadhyay, P., Pan, I., Chatterjee, S., Chanda, P., Bandyopadhyay, D., Das, K. et Sen, S.K., 2009. Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation. *African Journal of Biotechnology* 8(22), 6016-6027.

Slater, J.H. et bull, A.T., 1982. Environmental microbiology: biodegradation. *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 297, 575-597.

Slater, J.H. et Lovah, D., 1982. Biodegradation and the significance of microbial communities, p. 112 131. In G.D.T. (ed.), *Biochemistry of microbial degradation*. Marcel Dekker, New York.

Slater, J.H., 1981. Mixed cultures and microbial communities In S.J.H. Bushell M.E. (ed), *Mixed cultures fermentations*. Academic Press, New York. 1-24.

Smits, M.C.J., Hoek, A.P., Osinga, B., Ottengraf, S.P.P. et Wijngaard, M.H., 1995. Removal of ammonia and odour from composting facility waste gas with a bio-trickling filter. In *proceeding of the 9th Forum for Applied Biotechnology*. Gent, Belgique, 12-14 September.

Smith, R.J., 1990. Effects of the sulfonylureas on muscle glucose homeostasis. *Am. J. Med.* 89, 38S-43S.

Sørensen, S.R., Albers, C.N. et Aamand, J., 2008. Rapid mineralization of the phenylurea herbicide diuron by *Variovorax* sp. strain SRS 16 in pure culture and within a two-member consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(8), 2332-2340.

Soufan, M., 2011. Oxydation par le chlore de composés pharmaceutiques. Thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers.

Soupramanien, A., Malhautier, L., Dumont, E., Andrès, Y., Rocher, J. et Fanlo, J., 2012. Biological treatment of a mixture of gaseous sulphur reduced compounds: identification of the total bacterial community's structure. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87, 817-823.

Soupramanien, A., 2012. Traitement d'effluents gazeux malodorants issus du secteur industriel du traitement des déchets par voie biologique: étude du couplage lit percolateur/biofiltre. Thèse de doctorat de l'université Nantes Angers Le Mans.

Spigno, G., Tramelli, L., Galli, R., Pagella, C. et De Faveri, D.M., 2005. Biofiltration of dichloromethane vapours: isolation of microorganisms. In *International Congress Biotechniques for Air Pollution Control*. La Coruna, Spain, p. 345-351.

Spigno, G., Zilli, M. et Nicoletta, C., 2004. Mathematical modelling and simulation of phenol degradation in biofilters. *Biochemical Engineering Journal* 19, 267-275.

Sridevi, V., Lakshmi, M.V.V.C., Swamy, A.V.N. et Rao, M.N., 2011. Implementation of response surface methodology for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). *J. Bioremed. Biodegrad.* 2, 121.

Stackelberg, P.E., Gibs, J., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D. et Lippincott, R.L., 2007. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Sci. Total Environ.* 377, 255-272.

Stackelberg, P., Furlong, E., Meyer, M., Zaugg, S., Henderson, A. et Reissman, D., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of The Total Environment* 329(1-3), 99-113.

Steger-Hartmann, T., Kümmerer, K. et Hartmann, A., 1997. Biological Degradation of Cyclophosphamide and Its Occurrence in Sewage Water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36(2), 174-179.

Steger-Hartmann, T., Kümmerer, K. et Schecker, J., 1996. Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 726(1-2), 179-184.

Stephenson, T., Lester, J.N. et Perry, R., 1984. Acclimatisation to nitrilotriacetic acid and in the activated sludge process. *Chemosphere* 13, 1033-10470.

Stolz, A., 2001. Basic and Applied Aspects in the Microbial Degradation of Azo Dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (1-2), 69-80.

Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.D., Rodriguez, S.V. et Baumann, W., 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the Total Environment* 225, 135-141.

Subba-Rao, R.V., Rubin, H.E. et Alexander, M., 1982. Kinetics and extend of mineralization of organic chemicals at trace levels in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1139-1150.

Sun, Y., Quan, X., Chen, J., Yang, F., Xue, D., Liu, Y. et Yang, Z., 2002. Toluene vapour degradation and microbial community in biofilter at various moisture content. *Process Biochemistry* 38, 109-113.

Swindoll, C.M., Aelion, C.M. et Pfaender, F.K., 1988. Influence of Inorganic and Organic Nutrients on Aerobic Biodegradation and on the Adaptation Response of Subsurface Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 212-217.

Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, Barbara, Eurin, J., Tuc Dinh, Q., Clément, M. et Chevreuil, M., 2008a. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of The Total Environment* 393(1), 84-95.

Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Dinh, Q.T., Clement, M. et Chevreuil, M., 2008b. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Science of the Total Environment* 393, 84-95.

- Tekin, H., Okan, B., Selale, S.A., Tolga, H.B., Haluk, C., Dilek Sanin, F., Filiz, B.D. et Ulku, Y., 2006.** Use of Fenton oxidation to improve the biodegradability of a pharmaceutical wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 136, 258-265.
- Ternes, T.A., 2001.** Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 20, 419-434.
- Ternes, T.A., 1998.** Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32(11), 3245-3260.
- Tholander, J., 1987.** Biological processes for odour abatement in industrial processes. *In proceeding of the International Meeting of Biological Treatment of Industrial Waste Gases.* Francfort, Allemagne, 21-24 juin.
- Thomas, K.V., Dye, C., Schlabach, M. et Langford, K.H., 2007.** Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. *Journal of Environmental Monitoring* 9(12), 1410-1418.
- Thouand, G., 1993.** Maîtrise des inocula bactériens utilisés dans les essais de biodégradabilité aérobie. Thèse de Doctorat de l'université de Nancy I.
- Tian, H., Yan, Y., Chen, Y., Wu, X. et Li, B., 2016.** Increasing Influent Disturbances in a Membrane-Aerated Biofilm Reactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26(2), 373-384.
- Togola, A. et Budzinski, H., 2008.** Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 1177, 150-158.
- Torkian, A., Dehghanzadeh, R. et Hakimjavadi, M., 2003.** Biodegradation of aromatic hydrocarbons in a compost biofilter. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 795-801.
- Tripathi, K.D., 2004.** Essentials of Medical Pharmacology. 5th ed. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. 245-253.
- Tropel, D. et Van der Meer, J.R., 2004.** Bacterial Transcriptional Regulators for Degradation Pathways of Aromatic Compounds. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 474-500.
- Trovó, A.G., Pupo Nogueira, R.F., Agüera, A., Fernandez-Alba, A.R. et Malato, S., 2011.** Degradation of the antibiotic amoxicillin by photo-Fenton process-Chemical and toxicological assessment. *Water Res.* 45, 1394-1402.
- Trovó, A.G., Melo, S.A.S. et Nogueira, R.F.P., 2008.** Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process-Application to sewage treatment plant effluent. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 198, 215-220.
- Truong, V-H. et Nguyen, L.H., 2016.** Effects of biogenic supplementation on xenobiotic degradation. *Geo Science Engineering* 62, 9-14.

Turgeon, N., 1998. Désodorisation par biofiltration sur boues granulées: traitement simultané de l'ammoniac et de l'hydrogène sulfuré. Mémoire de maîtrise. Université Laval, Québec.

Vandecasteele, J.P., 2005. Microbiologie pétrolière-Concepts-Implications environnementales -Applications industrielles. 1ère Ed. TECHNIP, 441.

Van Ginkel, C.G et Kolvenbach, M., 1991. Relation between the structure of quaternary alkyl ammonium salts and their biodegradability. *Chemosphere* 23, 281-289.

Van Groenestijn, J.W., 2005. Biotechniques for air pollution control: past, present and future trends. In *International Congress Biotechniques for Air Pollution Control*. La Coruna, Spain, p. 3-12.

Van Groenestijn, J.W., 2001. Bioscrubbers. In: *Bioreactors for waste gas treatment*. Ed. by Kennes C, Veiga MC. Kluwer, Dordrecht, p. 133-162.

Van Lith, C., Leson, G. et Michelson, R., 1997. Evaluating design options for biofilters. *Journal of Air and Waste Management Association* 47, 37-48.

Varsha, Y.M., Naga Deepthi, C.H., et Chenna, S., 2011. An emphasis on xenobiotic degradation in environmental cleanup. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* S11, 1-10.

Veiga, M.C. et Kennes, C., 2001. *Bioreactors for Waste Gas Treatment*. Kluwer Academic Publishers, ISBN: 0-7923-7190-9.

Ventullo, R.M. et Larson, R., 1986. Adaptation of microbial communities to quaternary ammonium compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 356-361.

Vidal, A., Claeys, L., Mengelers, M., Vanhoorne, V., Vervae, C., Huybrechts, B., De Saeger, S. et De Boevre, M., 2018. Humans significantly metabolize and excrete the mycotoxin deoxynivalenol and its modified form deoxynivalenol-3-glucoside within 24 hours. *Sci. Rep.* 8, 5255.

Vieno, N., Tuhkanen, T. et Kronberg, L., 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 1134(1-2), 101-111.

Von Gunten, U., 2003. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research* 37 (7), 1443-1467.

Vulliet, E., Cren-Olivé, C. et Grenier-Loustalot, M-F., 2009. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environmental Chemistry Letters* 9(1), 103-114.

Wani, A.H., Branion, R.M.R. et Lau, A.K., 1997. Biofiltration: a promising and cost effective control technology for odors, VOCs, and air toxics. *J. Environ. Sci. Health A* 32, 2027-2055.

Wanner, O., Eberl, H., Morgenroth, E., Noguera, D., Picioreanu, C., Rittman, B. et Van Loosdrecht, M.C.M., 2006. Mathematical modeling of biofilms. IWA Scientific and Technical Report N°18, IWA Publishing, ISBN 1843390876, p. 1-199.

Wanner, O. et Guijer, W., 1986. A multispecies biofilm model. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 314-328.

Watkinson, A.J., Murby, E.J., Kolpin, D.W. et Costanzo, S.D., 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment* 407(8), 2711-2723.

Weber, F.J. et Hartmans, S., 1994. Toluene degradation in a trickle bed reactor-Prevention of clogging. *Biologische Abgasreinigung* 1104, 161-168.

Weckhuysen, B., Vriens, L. et Verachtert, H., 1993. The effect of nutrient supplementation on the biofiltration removal of butanal in contaminated air. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 395-399.

Weigel, S., Kuhlmann, J. et Huhnerfuss, H., 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *The Science of the Total Environment* 295, 131-141.

Weiss, K., Schüssler, W. et Porzelt, M., 2008. Sulfamethazine and flubendazole in seepage water after the sprinkling of manured areas. *Chemosphere* 72(9), 1292-1297.

Wenzel, A., Müller, J. et Ternes, T., 2003. Study on endocrine disrupters in drinking water, Final Report, ENV.D.1/ETU/2000/0083. Schmallenberg and Wiesbaden.

Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., Schmidt, R., Stachel, B., Von Tümpling, W. et Wanke, A., 2004. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* 57 (2), 107-126.

Wiggins, B.A. et Alexander, M., 1988. Rol of chemical concentration and second carbon sources in acclimatation of microbial communities for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2803-2807.

Wiggins, B.A., Jones, S.H. et Alexander, M., 1987. Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 791-796.

Xue, N.T., Wang, Q.H., Wu, C.F., Zhang, L.H. et Xie, W.M., 2010. Enhanced removal of NH₃ during composting by a biotrickling filter inoculated with nitrifying bacteria. *Biochem. Eng. J.* 51, 86-93.

Yamal-Turbay, E., Jaén, E., Graells, M. et Pérez-Moya, M., 2013. Enhanced photo-Fenton process for tetracycline degradation using efficient hydrogen peroxide dosage. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 267, 11-16.

- Yang, C., Yu, G., Zeng, G., Yang, H., Chen, F. et Jin, C., 2011.** Performance of biotrickling filters packed with structured or cubic polyurethane sponges for VOC removal. *Journal of Environmental Sciences* 23(8), 1325-1333.
- Yang, J-F., Ying, G-G., Zhao, J-L., Tao, R., Su, H-C. et Chen, F., 2010a.** Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC–MS/MS. *Science of The Total Environment* 408(16), 3424-3432.
- Yang, H., An, T., Li, G., Song, W., Cooper, W.J., Luo, H. et Guo, X., 2010b.** Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of environmental pharmaceuticals in aqueous suspension of TiO₂: A case of β -blockers. *J. Hazard. Mater.* 179, 834-839.
- Yatome, C., Yamada, S., Ogawa, T. et Matsui, M., 1993.** Degradation of Crystal Violet by *Nocardia coralline*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38(4), 565-569.
- Ye, Z., Weinberg, H. et Meyer, M., 2007.** Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated Drinking Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 79(3), 1135-1144.
- Ye, D., Siddiqui, M.A., Maccubbin, A.E., Kumar, S. et Sikka, H.C., 1996.** Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* 30, 136-142.
- Yiruhan, Wang, Q.J., Mo, C.H., Li, Y.W., Gao, P., Tai, Y.P., Zhang, Y., Ruan, Z.L., et Xu, J.W., 2010.** Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao. *Environ. Pollut.* 158, 2350-2358.
- Yoon, I.K. et Park, C.H., 2002.** Effects of gas flow rate, inlet concentration and temperature on biofiltration of volatile organic compounds in a peat-packed biofilter. *J. Biosci. Bioeng.* 93(2), 165-169.
- Yu, Y. et Wu, L., 2011.** Comparison of four extraction methods for the analysis of pharmaceuticals in wastewater. *Chromatography A* 1218, 2483-2489.
- Yuan, F., Hu, C., Hu, X., Wei, D., Chen, Y. et Qu, J., 2011.** Photodegradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H₂O₂ process. *J. Hazard. Mater.* 185, 1256-1263.
- Zaidi, B.R., Stucki, G. et Alexander, M., 1988.** Low chemical concentration and pH as factors limiting the success of inoculation to enhance biodegradation. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 143-151.
- Zegura, B., Heath, E., Cernosa, A. et Filipic, M., 2009.** Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere* 75, 1453-1460.
- Zhang, Y., Zhu, H., Szewzyk, U. et Geissen, S.U., 2015.** Removal of pharmaceuticals in aerated biofilters with manganese feeding. *Water Res.* 72, 218-226.

Zhang, L., Hu, J., Zhu, R., Zhou, Q. et Chen, J., 2013. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3687-3698.

Zhang, P., Lapara, T.M., Goslan, E.H., Xie, Y., Parsons, S.A. et Hozalski, R.M., 2009. Biodegradation of haloacetic acids by bacterial isolates and enrichment cultures from drinking water systems. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3169-75.

Zhang, C. et Bennett, G.N., 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 600-618.

Zhang, Y., Han, L., Wang, J., Yu, J., Shi, H. et Qian, Y., 2002. An internal airlift loop bioreactor with *Burkholderia pickettii* immobilized onto ceramic honeycomb support for degradation of quinoline. *Biochemical Engineering Journal* 11, 149-157.

Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Yi, S. et Tay, S.T., 2005. Microbial adaptation to biodegradation of tert-butyl alcohol in a sequencing batch reactor. *J. Biotechnol.* 118, 45-53.

Ziagova, M. et Liakopoulou-Kyriakides, M., 2007. Comparison of cometabolic degradation of 1,2-dichlorobenzene by *Pseudomonas sp.* and *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1244-1250.

Zuccato, E., Castiglioni, S. et Fanelli, R., 2005. Identification of pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 122, 205-209.

Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M. et Fanelli R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355, 1789-1790.

Zuehlke, S., Duennbier, U. et Heberer, T., 2007. Investigation of the behavior and metabolism of pharmaceutical residues during purification of contaminated ground water used for drinking water supply. *Chemosphere* 69(11), 1673-1680.

Zwiener, C. et Frimmel F.H., 2000. Oxidative Treatment of Pharmaceuticals in water. *Water Res.* 34, 1881-1885.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de culture et des solutions

Milieux de culture

Gélose nutritive

Composition :

| | |
|-------------------------|--------|
| Extrait de viande | 1 g/L |
| Extrait de levure..... | 2 g/L |
| Peptone | 5 g/L |
| Chlorure de sodium..... | 15 g/L |
| pH à 37 °C..... | 7.4 |

Préparation : 28 g par litre d'eau distillée. Autoclavage classique.

Milieu Mannitol mobilité

Composition :

| | |
|----------------------------------|------|
| Peptone tryptique de viande..... | 20 g |
| Gélose | 4 g |
| Mannitol | 12 g |
| KNO ₃ | 1 g |
| Rouge de phénol à 1% | 4 ml |

Préparation : 22 g par litre d'eau distillée. Autoclavage classique.

Solutions

Tampon phosphate à pH 7

Composition:

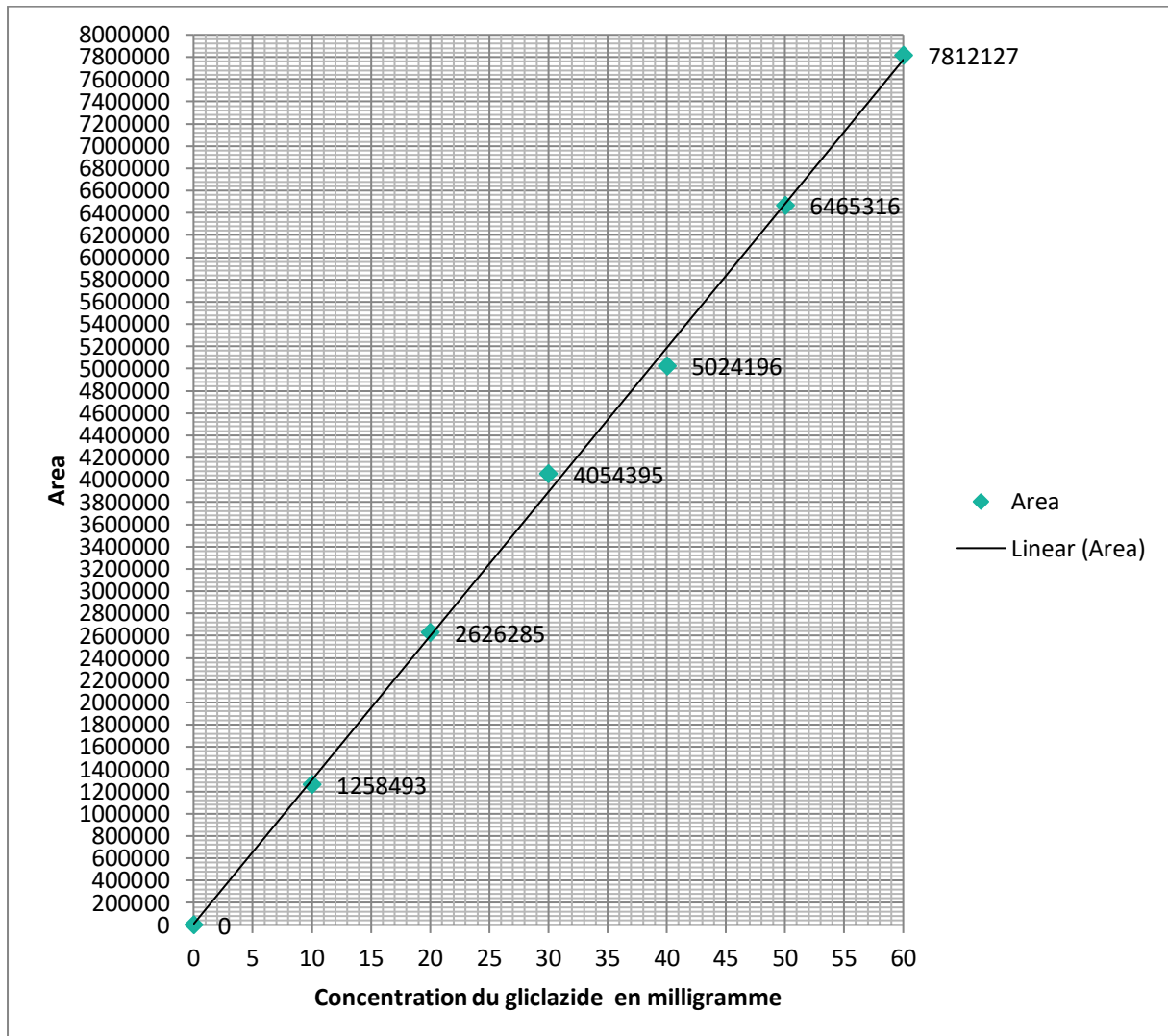
| | |
|----------------------------------------|---------|
| NaH ₂ PO ₄ | 1.2 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.885 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |

Tampon phosphate sodium (PBS)

Composition :

| | |
|--------------------------------|-------------|
| KH_2PO_4 | 0.29 g |
| K_2HPO_4 | 1.19 g |
| NaCl | 4.93 g |
| Eau distillée..... | 1000 ml |
| pH..... | 7.2 ± 2 |

Annexe 2 : Courbes d'étalonnage du gliclazide par chromatographie en phase liquide (HPLC) (Waters, e 2695, Singapour).



Courbe d'étalonnage du gliclazide