



HAL
open science

Bioaugmentation fongique des boues activées : élimination de la carbamazépine persistante dans l'eau

Samer Semrany

► **To cite this version:**

Samer Semrany. Bioaugmentation fongique des boues activées : élimination de la carbamazépine persistante dans l'eau. Autre. Université de Rennes; Université Libanaise, 2014. Français. NNT : 2014REN1S184 . tel-01492960

HAL Id: tel-01492960

<https://theses.hal.science/tel-01492960>

Submitted on 20 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Libanaise

École Doctorale
Sciences et Technologies

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

En Cotutelle Internationale avec
Université Libanaise, EDST, Liban

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Chimie

Ecole doctorale Sciences de la matière

présentée par

Samer Semrany

préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6226
Institut des Sciences Chimiques de Rennes
Equipe Chimie et Ingénierie des Procédés

**Bioaugmentation
fongique des boues
activées :
Elimination de la
carbamazépine
persistante dans l'eau**

**Thèse soutenue à l'ENSCR
le 30 septembre 2014**

devant le jury composé de :

Eric DUMONT

Maître de Conférences - HDR, Université de Nantes / *rapporteur*

Christophe VIAL

Professeur, Polytech Clermont-Ferrand / *rapporteur*

Annabelle COUVERT

Professeur, ENSCR / *examinatrice*

Hayet DJELAL

Maître de Conférences, EME (Bruz) / *examinatrice*

Lidia FAVIER

Maître de Conférences, ENSCR / *examinatrice*

Fawaz EL OMAR

Professeur, Université Libanaise / *examineur*

Samir TAHA

Professeur, Université Libanaise / *directeur de thèse*

Abdeltif AMRANE

Professeur, Université de Rennes 1 / *co-directeur de thèse*

Dédicace

À Ma Vraie Famille ...

« Je suis venu non pour abolir, mais pour accomplir »

Jésus Christ, Matt 5 : 17

PREAMBULE - REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre l'École Doctorale Sciences et Technologie (EDST) de l'Université Libanaise (UL) au Liban et l'École Doctorale Sciences De La Matière (SDLM) de l'Université de Rennes 1 (UR1) en France.

Je tiens d'abord donc à remercier vigoureusement :

- les présidents successifs de l'UL, les professeurs Zouheir CHOKR et Adnan EL-SAYYED-HUSSEIN,
- le président de l'UR1, le professeur Guy CATHELINÉAU,
- les doyens successifs de l'EDST, le professeur Zeinab SAAD et le professeur Fawaz EL-OMAR,
- le directeur de la SDLM, le professeur Jean-François CARPENTIER

qui tous par leur collaboration harmonieuse ont permis la réalisation de cette thèse.

Les travaux expérimentaux associés ont été conduits essentiellement en France au sein de l'Unité Mixte de Recherche (UMR CNRS 6226), l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes, dirigé successivement par les Professeurs Jean-Yves SAILLARD et Jean-Luc ADAM, dans les locaux de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR), dirigée par le Professeur Pierre LECLOIREC, aux laboratoires de l'équipe Chimie et Ingénierie des Procédés (CIP), dirigée par le Professeur Dominique WOLBERT, mais aussi au Liban au sein du Laboratoire des Biotechnologies Appliquées (LBA3B), dirigé par le Professeur Samir TAHA et localisé au Centre Azm pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications (CARBA), dirigé par le professeur Mohammed KHALIL et du Laboratoire des Sciences de l'Eau et de l'Environnement (LSEE), dirigé par le professeur Jalal HALAWANI. Je tiens aussi donc à leur exprimer tous, toute ma gratitude pour m'avoir accueilli convenablement sur leurs locaux.

Je veux insister en particulier à remercier les professeurs WOLBERT et KHALIL pour leur présence permanente aux laboratoires malgré tous les empêchements qu'on peut imaginer.

Je n'oublie jamais à montrer ma gratitude profonde à l'Association Sociale Azm et Saadé qui par son collaboration avec l'EDST, a permis le financement des frais de mes déplacements, de mon logement et de mon subsistance en France pour la préparation de cette thèse.

Remerciements Particuliers

Que le professeur Christophe VIAL à l'Université Blaise Pascal et le docteur Eric DUMONT, habilité à diriger la recherche et maître de conférence à l'Université de Nantes soient assurés de ma profonde appréciation pour avoir être les rapporteurs avisés du rapport des travaux de cette thèse.

Que la professeur Annabelle COUVERT à l'Ecole Nationale de Chimie de Rennes soit assurée de mon grand estime pour avoir être l'examinatrice éclairée lors de la soutenance des travaux de cette thèse.

Que le professeur Fawaz EL-OMAR, le doyen de l'Ecole Doctorale Sciences et Technologie à l'Université Libanaise, soit assuré de mon sincère remerciement pour l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant d'assister comme examinateur au jury de la soutenance de cette thèse.

Que le professeur Abdeltif AMRANE à l'Université de Rennes 1 et le professeur Samir TAHA à l'Université Libanaise soient assurés de ma profonde reconnaissance pour leur co-direction judicieuse des travaux de cette thèse, pour leurs précieux conseils et surtout pour m'avoir toujours soutenu en m'accordant largement leurs confiances.

Que le docteur Hayet DJELAL, maître de conférences à l'École des Métiers de l'Environnement et le docteur Lidia FAVIER, maître de conférences à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, soient aussi assurées de ma pleine gratitude pour leur soutien inestimable qui a collaboré profondément à mener à bonne fin les travaux de cette thèse.

Que tous les membres permanents et non-permanents des équipes CIP et LBA3B, soient assurés de mon respect parfait et du plaisir que j'ai approuvé de les avoir reconnaître.

S. S.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Communications par affiche dans des congrès nationaux ou internationaux

2014

Impact of the Addition of Carbon Co-Substrates on the Aerobic Biodegradation of Carbamazepine by the Fungus *Trametes versicolor*

S. SEMRANY, L. FAVIER, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE

20th LAAS International Science Conference, Université Libanaise, EDST

27 Mars 2014 à Beyrouth, Liban

2013

Biodégradation du polluant pharmaceutique récalcitrant Carbamazépine par le champignon ligninolytique *Trametes versicolor*

S. SEMRANY, L. FAVIER, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE

3^{ème} Forum Doctoral, Université Libanaise, EDST

25 Juin 2013 à Beyrouth, Liban

Étude de la biodégradation du composé pharmaceutique réfractaire carbamazépine en réacteur batch par un plan central composite

S. SEMRANY, L. FAVIER, S. TAHA, H. DJELAL, A. AMRANE

XIV^{ème} congrès SFGP 2013 : Les sciences du génie des procédés pour une industrie durable

8 au 10 Octobre 2013, Cité - Centre de Congrès de Lyon, France

Enhancing Performance of Filamentous Fungus *Trametes versicolor* in Carbamazepine Elimination: Influence of Several Carbon Co-substrates Addition

S. SEMRANY, L. FAVIER, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE

19th LAAS International Science Conference, Lebanese American University

6 Avril 2013 à Beyrouth, Liban

Biodégradation de la carbamazépine par le champignon filamenteux *Trametes versicolor* : Effet de l'ajout de quelques co-substrats organiques

S. SEMRANY, L. FAVIER-TEODORESCU, A. SIMION, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE

Journée des Doctorants, École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, SDLM

16 Janvier 2013 à Rennes, France

2012

Biodégradation de la carbamazépine par le champignon filamenteux *Trametes versicolor* : Effet de l'ajout de quelques co-substrats organiques

S. SEMRANY, L. FAVIER-TEODORESCU, A. SIMION, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE

7ème Colloque Franco-Roumaine de Chimie Appliquée

27 - 29 Juin 2012 à Bacău, Roumanie

Enhancing Performance of Filamentous Fungus *Trametes versicolor* in Carbamazepine Elimination: Influence of Several Carbon Co-substrates Addition

S. SEMRANY, L. FAVIER, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE

5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation

24 - 28 Juin 2012 à Prague, République Tchèque

Investigating Possibilities and Limitations of Conventional Activated Sludge Process in Carbamazepine Biodegradation: Testing the Influence of Several Carbon Sources

S. SEMRANY, L. FAVIER, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE

2ème Forum Doctoral, Université Libanaise, EDST

19 Juin 2012 à Beyrouth, Liban

Investigating Possibilities and Limitations of Conventional Activated Sludge Process in Carbamazepine Biodegradation: Testing the Influence of Several Carbon Sources

S. SEMRANY, C. POPA, L. FAVIER, H. DJELAL, A. AMRANE

Journée des Doctorants, Université de Rennes 1, UMR 6226

7 Juin 2012 à Rennes, France

Investigating Possibilities and Limitations of Conventional Activated Sludge Process in Carbamazepine Biodegradation: Testing the Influence of Several Carbon Sources

S. SEMRANY, C. POPA, L. FAVIER, H. DJELAL, A. AMRANE

Congrès Polluants émergents, École des Mines de Nantes

1 - 2 Février 2012 à Nantes, France

2011

Effects of several co-substrates on the degradation of carbamazepine by aerobic non acclimated sludge

S. SEMRANY, F. E.-Z. ZREIK, L. FAVIER-TEODORESCU, H. DJELAL, S. TAHA, C. VIAL, A. AMRANE

12th European Meeting on Environmental Chemistry
7 - 10 Décembre 2011 à Clermont Ferrand, France

Enhancing the performance of activated sludge to eliminate endocrine disruptors from treated water

S. SEMRANY, L. FAVIER, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE
Anului International al CHIMIEI
9 - 11 Juin 2011 à Galati, Roumanie

Communications orales dans des congrès nationaux ou internationaux

2013

Assessment of Carbamazepine Biodegradability by Activated Sludge Using Response Surface Methodology

S. SEMRANY, S. TAHA, L. FAVIER, H. DJELAL, A. AMRANE

International Symposium on Emerging Pollutants in Irrigation Waters: Origins, Fate, Risks, and Mitigation
25-28 Novembre 2013 à Hammamet, Tunisie

Modélisation de la cinétique et optimisation des conditions opératoires pour l'élimination d'un polluant pharmaceutique

S. SEMRANY, S. TAHA, L. FAVIER, H. DJELAL, A. AMRANE
Journées SFGP Ouest - GFP Grand Ouest
16 mai 2013 à Nantes, France

2012

Investigating Possibilities and Limitations of Conventional Activated Sludge Process in Carbamazepine Biodegradation: Testing the Influence of Several Carbon Sources

S. SEMRANY, C. POPA, L. FAVIER, H. DJELAL, A. AMRANE
Congrès Polluants émergents, École des Mines de Nantes
1 Février 2012 à Nantes, France

Article et acte au congrès

2014

Bioaugmentation of activated sludge by white-rot fungus *Trametes versicolor* for Carbamazepine biodegradation

S. SEMRANY, L. FAVIER, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE

(en cours de la rédaction)

Carbamazepine biodegradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor* in liquid medium: optimising operational conditions and modelling kinetics using response surface methodology

S. SEMRANY, L. FAVIER, H. DJELAL, C. POPA, S. TAHA, A. AMRANE

(en cours de la soumission)

Influence of Stirring Speed and Gas-to-Liquid Ratio on Activated Sludge Performance in Carbamazepine Elimination Using Response Surface Methodology and Principal Component Analysis

S. SEMRANY, S. TAHA, L. FAVIER, H. DJELAL, A. AMRANE

(accepté pour publication dans Environmental Engineering and Management Journal)

Potential of newly isolated wild *Streptomyces* strains as agents for the biodegradation of a recalcitrant pharmaceutical, carbamazepine

C. POPA, L. FAVIER, R. DINICA, S. SEMRANY, H. DJELAL, A. AMRANE, G. BAHRIM

Environmental Technology **2014**, In Press, DOI:10.1080/09593330.2014.931468

2013

Étude de la biodégradation du composé pharmaceutique réfractaire carbamazepine en réacteur batch par un plan central composite

S. SEMRANY, L. FAVIER, S. TAHA, H. DJELAL, A. AMRANE

Récents Progrès en Génie des Procédés **2013**, 104, 8 pages

ISSN: 1775-335X ; ISBN: 978-2-910239-78-7, Ed. SFGP, Paris, France

2012

Bioaugmentation: Possible Solution in the Treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs)

S. SEMRANY, L. FAVIER, H. DJELAL, S. TAHA, A. AMRANE

Biochemical Engineering Journal **2012**, 69, 75-86

AVANT-PROPOS

Dans cette thèse, la partie « Résultats » est présentée dans les chapitres 3 et 4 essentiellement sous forme d'articles scientifiques. Ces articles sont conservés en anglais, exactement dans la version soumise aux journaux internationaux. Cependant, chacun de ces chapitres est introduit par un préambule permettant de localiser chaque article par rapport à la structure globale du travail.

SOMMAIRE

Préambule - Remerciements.....	3
Production Scientifique.....	5
Avant-propos.....	9
Sommaire.....	10
Liste des figures.....	13
Liste des tableaux.....	14
Introduction générale.....	16
Chapitre 1 : Étude bibliographique.....	19
1.1. Introduction.....	19
1.2. L'eau sur terre.....	21
1.2.1. Répartition inégale et disponibilité restreinte.....	21
1.2.2. Pollution de l'eau par les activités anthropiques.....	21
1.3. Focus sur les polluants émergents.....	25
1.3.1. Définition d'un polluant émergent.....	25
1.3.2. Essai d'une classification des principaux polluants émergents.....	27
1.3.2.1. Produits pharmaceutiques et de soin personnel et polluants associés.....	27
1.3.2.2. Polluants émergents d'origine purement industrielle.....	33
1.3.3. Problématique des résidus des substances pharmaceutiques dans l'eau.....	38
1.3.4. Omniprésence et persistance de la Carbamazépine.....	41
1.3.4.1. Sources de la carbamazépine et de ses métabolites.....	43
1.3.4.2. Effets sur la flore et la faune.....	47
1.4. Dépollution de l'eau.....	52
1.4.1. Traitement biologique conventionnel par les boues activées : concepts et limites.....	52
1.4.1.1. Les boues activées au sein de la chaîne de traitement d'eau.....	52
1.4.1.2. Les voies d'élimination des polluants dans les boues activées.....	55
1.4.1.3. Capacités limitées des boues activées et amélioration nécessaire.....	62
1.4.2. Utilisation des champignons ligninolytiques en dépollution.....	63
1.4.2.1. Champignons ligninolytiques et leurs systèmes enzymatiques.....	64
1.4.2.2. Effet des propriétés du MPO sur son élimination.....	65
1.4.2.3. Effet des espèces fongiques.....	72

1.4.2.4.	Élimination des micropolluants organiques par les enzymes modifiantes de la lignine extracellulaires	76
1.4.2.5.	Effet des propriétés physico-chimiques de la matrice des eaux usées	81
1.4.2.6.	Mécanismes d'élimination et voies de dégradation	83
1.4.2.7.	Essais de bioréacteurs fongiques en mode continu	87
1.4.2.8.	Conclusion concernant les champignons en bioremédiation	89
1.4.3.	Procédés biologiques avancés : biostimulation et bioaugmentation	89
1.4.3.1.	Procédés Biologiques Avancés (PBA)	90
1.4.3.2.	Différents aspects de la bioaugmentation	92
1.4.3.3.	Approche Expérimentale pour évaluer la bioaugmentation	95
1.4.3.4.	État d'art de l'utilisation de la bioaugmentation	96
1.4.3.5.	Conclusions concernant la technique de la bioaugmentation	112
Chapitre 2 : Méthodes statistiques		115
2.1.	Introduction	115
2.2.	Grandeurs statistiques de base	115
2.3.	Tests paramétriques	117
2.4.	Régression linéaire simple et multiple	118
2.5.	Modélisation de la surface de réponse et plans d'expérience	123
2.6.	Modélisation non-linéaire	125
2.6.1.	Régression après linéarisation	125
2.6.2.	Régression non-linéaire	125
2.6.3.	Analyse différentielle	126
Chapitre 3 : Dégradation de la carbamazépine par des boues activées		128
3.1.	Introduction	128
3.2.	Tests préliminaires	129
3.2.1.	Photolyse ou thermolyse	129
3.2.2.	Biosorption	130
3.2.3.	Toxicité de la carbamazépine	132
3.3.	Biostimulation	134
3.4.	Étude de la biodégradation de la CBZ en réacteur batch	136
Chapitre 4 : Dégradation de la carbamazépine par <i>Trametes versicolor</i>		156
4.1.	Introduction	156
4.2.	Tests préliminaires	156

4.2.1.	Influence des types d'agitation sur la morphologie du champignon et son pouvoir adsorbant	156
4.2.2.	Toxicité de la carbamazépine vis-à-vis de <i>T. versicolor</i>	157
4.3.	Biostimulation	158
4.4.	Optimisation des conditions expérimentales.....	161
Chapitre 5 : Bioaugmentation		190
5.1.	Introduction.....	190
5.2.	Viabilité du champignon et cohabitation avec les boues.....	190
5.2.1.	Méthode de passage de l'aérobie à l'anoxie et <i>vice versa</i>	190
5.2.2.	Viabilité de <i>Trametes versicolor</i> en anoxie.....	191
5.2.3.	Cohabitation de <i>Trametes versicolor</i> avec les boues activées	192
5.3.	Etude de l'effet des durées et des concentrations en biomasses.....	194
5.3.1.	Plan d'expérience factoriel utilisé	194
5.3.2.	Résultats et conclusions	195
5.3.3.	Essais de modélisation	196
5.4.	Synthèse des résultats et procédé intégré proposé.....	198
Conclusion générale		200
Références.....		202
Annexes		223
Abstract		248
Résumé.....		248

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Le flux des polluants chimiques dans l'environnement	22
Figure 1.2 Médicaments persistants non-antibiotiques	28
Figure 1.3 Antibiotiques (I)	29
Figure 1.4 Antibiotiques (II)	29
Figure 1.5 Substances médicamenteuses illicitement utilisées	30
Figure 1.6 Stéroïdes.....	31
Figure 1.7 Muscs, Triclosan, Triclocarban et ammonium quaternaires	31
Figure 1.8 Édulcorants artificiels	33
Figure 1.9 Composés perfluorés, polychlorés et polybromés	35
Figure 1.10 Siloxanes, bisphénol A, benzotriazole et benzothiazole	38
Figure 1.11 Les trois voies métaboliques d'oxydation de la carbamazépine (<i>Breton et al. 2005</i> [90])	44
Figure 1.12 Le bilan-masse de la CBZ observé dans les eaux usées et les boues d'épuration des STEP	46
Figure 1.13 La caractéristique des risques (MEC/PNEC) pour la carbamazépine dans différents pays	48
Figure 1.14 Schéma simplifié d'une station d'épuration d'eau usée urbaine	52
Figure 1.15 Modèle simplifiée d'un procédé de boues activées.....	59
Figure 1.16 Comparaison cellules entières vs. Enzymes extracellulaires	84
Figure 1.17 Schématisation de l'approche expérimentale utilisée pour évaluer les différentes contributions de l'atténuation naturelle, la biostimulation et la bioaugmentation dans les pourcentages observés d'abattements du polluant testé.....	96
Figure 2. 1 Exemple d'une modélisation avec trop de paramètres.....	119
Figure 3. 1 Diminution de la luminescence de <i>Vibrio fischeri</i> lors du test <i>Microtox</i> ®.....	132
Figure 3. 2 Évolution de la DBO pour des solutions de faibles concentrations en CBZ et Glucose-Glutamate.....	133
Figure 3. 3 Évolution de la DBO pour des solutions de plus fortes concentrations en CBZ et Glucose-Glutamate.....	134
Figure 3. 4 Évolutions de la concentration en carbamazépine (CBZ), de pH, de la concentration du co-substrat carboné présent et de la matière sèche en tant qu'indice de la biomasse	136
Figure 4. 1 Évolution de la DBO de la suspension fongique dans des solutions contenant différentes concentrations en CBZ	158
Figure 4. 2 Évolutions de la concentration en CBZ, de pH et de l'activité enzymatique dans les essais de biostimulation des cultures fongiques.....	160
Figure 5. 1 Cultures R@X	192
Figure 5. 2 Cultures R@X.....	193
Figure 5. 3 Diagramme de parité exposant la validité du modèle proposé.....	197
Figure 5. 4 Diagramme de parité corrigé exposant la validité du modèle proposé.....	198

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Propriétés physico-chimiques et pharmaco-toxicologiques de la CBZ	42
Tableau 1.2 Exemples représentatives des catégories de micropolluants organiques.....	69
Tableau 1.3 Taux d'élimination des MPO (%) en fonction des différentes espèces fongiques.....	74
Tableau 1.4 Taux d'élimination des MPO (%) en fonction des différents types d'enzymes	77
Tableau 1.5 Taux d'élimination des MPO (%) en fonction de différentes enzymes immobilisées	80
Tableau 1.6 Usage de la bioaugmentation dans des matrices de sol: <i>pollution par le pétrole et ses dérivés</i> 99	
Tableau 1.7 Usage de la bioaugmentation dans des matrices de sol: <i>Pollution par les HAP</i>	100
Tableau 1.8 Usage de la bioaugmentation dans des matrices de sol : <i>Autres polluants</i>	102
Tableau 1.9 Usage de la bioaugmentation dans des matrices aqueuses : <i>Polluants chlorés</i>	104
Tableau 1.10 Usage de la bioaugmentation dans des matrices aqueuses : <i>polluants industriels</i>	107
Tableau 1.11 Usage de la bioaugmentation dans des matrices aqueuses : <i>Colorants et polluants colorés</i> 108	
Tableau 1.12 Usage de la bioaugmentation dans des matrices aqueuses : <i>polluants pharmaceutiques</i>	110
Tableau 1.13 Usage de la bioaugmentation dans des sédiments	111
Tableau 2.1 Caractéristiques des plans centrés composés pour 2, 3 ou 4 variables.....	124
Tableau 3.1 Désignations des solutions et résultats des tests pour photolyse et thermolyse.....	129
Tableau 3.2 Désignation des suspensions en batch et résultats des tests de biosorption.....	131
Tableau 3.3 Répartition des solutions test de la biostimulation des boues activées	135
Tableau 4.1 Désignations des cultures et résultats des tests de biosorption.....	157
Tableau 5.1 Codage des cinq niveaux du plan d'expérience utilisé dans la dernière étude.....	194
Tableau 5.2 Pourcentages de CBZ éliminée dans chaque culture (série champignon en anoxie et aérobie)	196
Tableau 5.3 Pourcentages de CBZ éliminée dans chaque culture (série champignon en aérobie).....	196

INTRODUCTION GENERALE

En Écologie, la planète Terre est une écosphère formée par l'association de quatre « sphères » qui peuvent être différenciées par compréhension sans qu'elles soient physiquement séparables l'une de l'autre : la lithosphère formée des rochers, l'atmosphère formée de l'air, l'hydrosphère formée de l'eau et la biosphère formée de l'ensemble des êtres vivants. Si cette dernière est la partie « vivante » de la planète, c'est l'ensemble des interactions continues et harmonieuses entre les quatre compartiments qui maintient la vie sur Terre. L'hydrosphère en particulier, constitue un agent assurant le lien entre les différentes composantes du système écologique grâce au cycle de l'eau qui trouve sa voie entre le fond de l'océan et le plafond de l'atmosphère en passant par le sol, le lit de la rivière, la profondeur de la nappe phréatique et la cellule de l'être vivant.

Cet écosystème est menacé. En particulier, le développement de l'industrie agrochimique et pharmaceutique ainsi que les méthodes agricoles intensives, contribuent à la dégradation de la qualité des eaux de surface et souterraines. Des études menées dans de nombreux pays ont permis de montrer la présence de nombreux composés produits pharmaceutiques dans les eaux usées urbaines à des concentrations variant du $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ au $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. L'utilisation croissante et le stockage inadéquats de ces derniers engendrent des apports continus, conduisant à leur persistance dans les milieux écologiques. Le problème de la persistance de ces résidus médicamenteux préoccupe de plus en plus l'opinion publique et est devenu un enjeu environnemental majeur.

Ce travail de recherche a donc pour objectif de contribuer, bien modestement, à la préservation de ce système ; il s'appuie sur trois éléments essentiels :

- un milieu pollué qui est l'eau,
- un polluant qui est un médicament antiépileptique, la carbamazépine (CBZ),
- et un procédé de dépollution qui consiste en une bioaugmentation fongique des boues activées.

L'étude bibliographique présentée dans le premier chapitre justifiera donc le choix de ces trois éléments. Après l'étude de la littérature disponible, la partie expérimentale de cette thèse a été menée suivant le plan suivant :

- s'assurer de la résistance de la CBZ au traitement aux boues activées en étudiant les conditions opérationnelles influençant le processus et en essayant d'améliorer le système par biostimulation.
- étudier la performance de la souche fongique choisie, *Trametes versicolor* DSM 11269, dans l'élimination de la CBZ en déterminant les conditions opératoires optimales aboutissant au meilleur résultat.
- tester la bioaugmentation, en associant boues activées et champignon ligninolytique et en dégagant le meilleur moyen de réalisation de ce traitement couplé de la carbamazépine.

CHAPITRE 1

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Introduction

Le plan adopté pour cette revue bibliographique est le suivant.

Dans un premier temps :

Après une courte discussion sur la répartition inégale et la disponibilité restreinte de l'eau douce sur la planète, les activités anthropiques qui ont abouti à l'introduction de composés chimiques polluants, leur accumulation et leur propagation dans les milieux naturels, sont abordées. En effet, l'Homme a essayé le long des années, d'éliminer cette pollution et de contrecarrer ses effets néfastes par différents moyens de traitement.

En termes de traitement des eaux pour en éliminer les contaminants organiques, le traitement biologique est la technique de choix et en particulier, le procédé conventionnel aux boues activées est le plus utilisé. Malgré l'efficacité de ces procédés de traitement, l'apparition de nouveaux polluants dans les milieux aquatiques justifie la recherche de nouveaux procédés de dépollution pour cette ressource naturelle précieuse qui est l'eau.

Dans un deuxième temps :

Les polluants émergents qui s'accumulent jour après jour dans l'hydrosphère en rendant les eaux d'une qualité douteuse, sont regardés de près. Malheureusement, plusieurs de ces contaminants tels que les produits pétroliers, les déchets industriels, les pesticides, les médicaments et les substances hormonales semblent réfractaires vis-à-vis d'un traitement par le procédé conventionnel aux boues activées et peuvent rejoindre les différents plans d'eau en provenant d'autres milieux naturels et surtout à travers l'eau d'irrigation des sols contaminés.

Les traitements physico-chimiques poussés, en particulier les procédés d'oxydation avancée (POA), sont capables de dégrader certains de ces polluants. Cependant, la mise en place onéreuse de tels procédés, la nature et les effets mal connus des sous-produits d'oxydation dans le cas où la minéralisation complète d'une molécule n'aurait pas eu lieu, rendent leur utilisation intensive controversée.

Dans ce contexte, le choix du médicament carbamazépine (CBZ) est justifié en vue de son omniprésence dans les eaux, sa persistance exceptionnelle en aval du traitement biologique et la toxicité de ses sous-produits d'oxydation récalcitrants ; l'élimination de la CBZ constitue ainsi un double challenge à la fois pour le procédé conventionnel aux boues activées et pour les procédés d'oxydation avancée.

Dans un troisième temps, il s'agit :

- d'abord de bien examiner le procédé conventionnel de traitement des eaux aux boues activées pour en dégager les points qui en font les limitations,
- ensuite de faire l'état de l'art concernant le pouvoir dépolluant et la susceptibilité d'adaptation des champignons ligninolytiques dont l'utilisation pour la dégradation de plusieurs composés de structure moléculaire complexe semble prometteuse,
- enfin de faire le point sur deux grandes techniques biotechnologiques innovantes, renouvelées plutôt que nouvelles, récemment introduites dans le domaine de traitements des eaux pour résoudre le problème des composés récalcitrants. La première technique est la « biostimulation » qui consiste à ajouter aux boues activées des additifs physico-chimiques en s'attendant à une meilleure performance de la biomasse déjà présente. La seconde technique est la « bioaugmentation » qui consiste à ajouter aux boues activées des microorganismes supplémentaires capables de produire des enzymes à large spectre, avec pour objectif une amélioration de la biodégradabilité des composés organiques réfractaires au traitement biologique.

1.2. L'eau sur terre

1.2.1. Répartition inégale et disponibilité restreinte

L'eau est une ressource naturelle impliquée dans de multiples aspects de la vie humaine. Une grande attention est donc portée à connaître sa répartition sur la planète Terre et à étudier sa disponibilité suivant la quantité, la qualité, l'espace et le temps.

En termes de quantité, les eaux salées des océans représentent 97,6 % de l'hydrosphère, il ne reste donc que 2,4 % d'eaux douces. Les 86,3 % de ces eaux douces sont pratiquement bloqués à l'état solide dans les calottes polaires, les névés et les glaciaires, et les 11,7 % forment les eaux souterraines (à 1 km de profondeur), avec seulement 2 % d'eaux de surface se trouvant dans les rivières, les lacs, l'humidité du sol, l'humidité atmosphérique et l'eau de la biomasse [1].

En termes de qualité, l'eau est une ressource naturelle renouvelable, parce qu'elle est recyclable grâce à l'énergie solaire à travers des séquences alternatives d'évaporations et de précipitations. Ce processus est d'une part continu et permanent, mais il est d'autre part lent et inégalement réparti dans l'espace et le temps. C'est ainsi que les mesures pluviométriques diffèrent énormément d'un continent à un autre pendant une même saison, et d'une saison à une autre dans une même région. La disponibilité de l'eau pour la consommation et les besoins humains devient alors sérieusement problématique lorsque l'on observe la croissance démographique, avec les développements agricoles et industriels qui y sont associés.

1.2.2. Pollution de l'eau par les activités anthropiques

Par définition, un « polluant » est un agent physique, chimique ou biologique qui altère le bon fonctionnement d'un écosystème.

Pour les agents physiques, on peut citer l'eau de refroidissement d'une usine rejetée dans une rivière, les microondes produites par les antennes de télécommunication ou les câbles de haute tension et les bruits sonores de certains appareils à titre d'exemples.

Pour les agents chimiques, on peut distinguer des composés minéraux comme les métaux lourds, des composés organiques comme les pesticides ou des composés organométalliques comme les organostanniques.

Pour les agents biologiques, les prions viennent s'ajouter récemment à la longue liste des eucaryotes, des procaryotes et des virus pathogènes. Dans ce qui suit, seuls les polluants chimiques de l'eau seront abordés. Une classification simplifiée suivant l'usage de ces polluants est donnée dans l'**Annexe 1**.

L'Homme utilise l'eau dans trois secteurs principaux : l'agriculture (élevage animal inclus), l'industrie et l'utilisation domestique (**Figure 1.1**). Lorsque l'eau est utilisée pour ces activités anthropiques, elle est alors contaminée par de nombreux composés (minéraux et organiques) et par de nombreuses façons (directement ou par transfert à partir d'autres milieux naturels) [2].

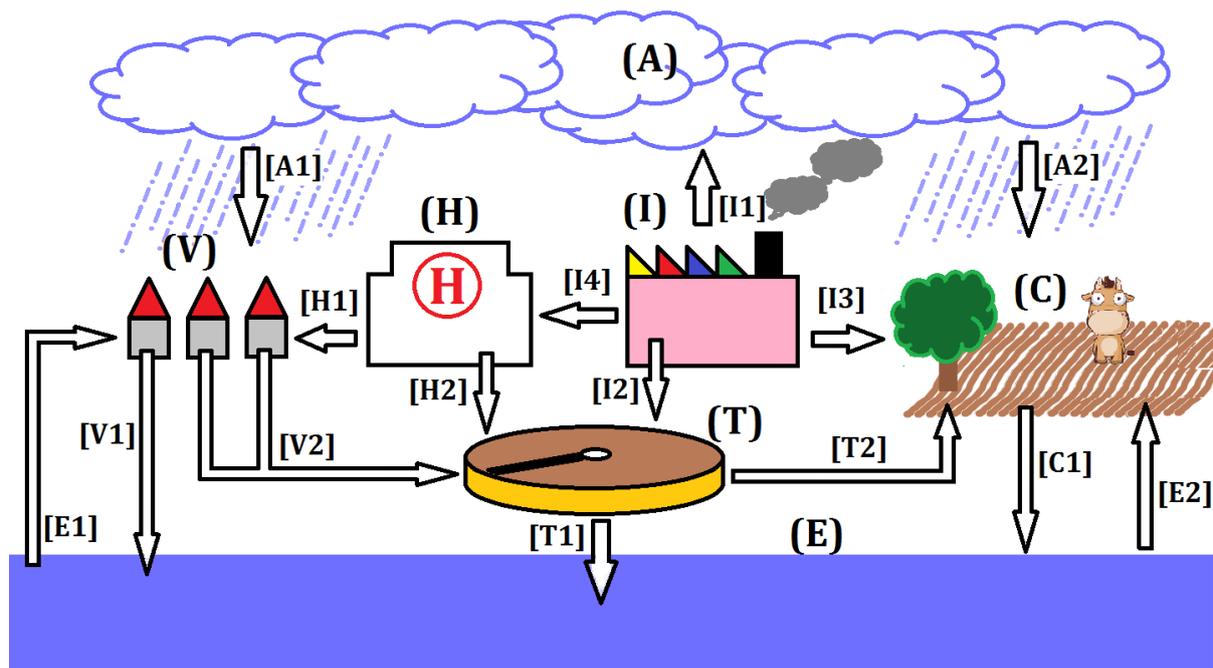


Figure 1.1 Le flux des polluants chimiques dans l'environnement

(A) : Atmosphère, (E) : Eau, (V) : Ville, (H) : Hôpital, (I) : Industrie, (C) : Sol, (T) : Station d'épuration
 [A1] : pluies acides urbaines, [A2] : pluies acides rurales, [E1] : eau douce, [E2] : eau d'irrigation,
 [V1] : eaux d'égout non traitées, [V2] : eaux usées urbaines, [H1] : prescriptions médicales,
 [H2] : eaux usées des hôpitaux, [I1] : pollution atmosphérique, [I2] : eaux usées industrielles,
 [I3] : engrais, pesticides, médicaments vétérinaires, [I4] : industrie pharmaceutique,
 [C1] : eaux de lessivage, [T1] : effluent des STEP, [T2] : épandage des boues des STEP.

Source : <http://www2.epa.gov/learn-issues/learn-about-water>

En agriculture, afin de protéger les plantes cultivées contre les parasites et d'améliorer la productivité, des engrais et des pesticides sont utilisés d'une manière intensive. L'élevage animal industrialisé nécessite aussi l'emploi de médicaments vétérinaires. Les eaux utilisées pour l'irrigation et en pisciculture, les eaux de lixiviation transportant les sédiments obtenus par l'érosion, ainsi que les déchets urinaires et fécaux d'origine animale, seront par la suite chargées avec tous types de composés accumulés dans les sols. L'eutrophisation est un phénomène essentiellement associé à une utilisation abusive des engrais azotés et phosphatés ; elle peut être décrite comme une prolifération excessive d'algues dans l'eau provoquant une carence en dioxygène dissous pouvant aboutir à troubler la respiration de la faune aquatique.

Les résidus de pesticides et de substances médicamenteuses peuvent entraîner de graves complications sur la santé de tous les êtres vivants ; les premiers étant non biodégradables, peuvent s'accumuler dans les tissus des plantes, des animaux et des humains en progressant à travers les chaînes alimentaires et les deuxièmes ayant des effets physiologiques, qui perturbent le fonctionnement des systèmes vivants qui y sont exposés [3].

En industrie, la pollution de l'air induite par la libération de gaz toxiques dans l'atmosphère est facilement transférable aux eaux de surface à travers les précipitations ; c'est le phénomène bien connu des « pluies acides » qui affectent la faune et la flore dans les lacs et les autres plans d'eau fermés. De plus, les rejets industriels de certaines usines sont une source de pollution directe du milieu aquatique récepteur. Ainsi, les rejets des usines de papeterie, des produits laitiers, des colorants textiles, des médicaments, des fertilisants et des pesticides sont regardés avec inquiétude.

L'utilisation domestique de l'eau pour boire, cuisiner, laver, nettoyer, faire sa toilette et évacuer les déchets d'origine humaine, aboutit à la formation des eaux usées municipales. La matière organique se trouvant dans ces eaux englobe des déchets alimentaires, des détergents, des produits de soins personnels, des médicaments et des métabolites excrétés. Les effluents des hôpitaux qui rejoignent habituellement ces mêmes eaux, sont particulièrement chargées de substances pharmaceutiques.

Pour résoudre le problème de la disponibilité limitée de l'eau, l'épuration des eaux contaminées pour une réutilisation éventuelle semble être la solution unique. Pendant des décennies, l'épuration des eaux usées a été la solution adoptée dans plusieurs pays développés (essentiellement en Europe et en Amérique du Nord). Souvent, les contaminants de l'eau étaient connus pour être des composés organiques banals de nature alimentaire, comme des sucres, des amidons, des huiles, des graisses et des protéines.

Le principe de base d'un traitement biologique est d'utiliser des microorganismes communément rencontrés dans la nature pour consommer les molécules polluantes afin de couvrir leurs besoins métaboliques [4]. En effet, ce traitement ne fait qu'intensifier le processus naturel aboutissant à la biodégradation de la substance organique. Les méthodes biologiques connues sont essentiellement classés en s'appuyant sur la façon dont le contact entre ces microorganismes et les polluants contenus dans l'eau est réalisé, ainsi :

- dans les procédés à biomasse fixe ou à biofilm comme les lits bactériens, les biofiltres et les disques biologiques, les microorganismes sont fixés sur un support solide,
- alors que dans les processus à biomasse libre comme le traitement conventionnel aux boues activées (voir la section **§1.4.1**), le lagunage et la technique des marais filtrants, les microorganismes sont pour la plupart en suspension dans l'eau.

Cependant, les traitements biologiques traditionnels cités ci-dessus ne sont efficaces que pour l'élimination des composés organiques facilement métabolisables. Dans les dernières années, beaucoup de nouveaux composés organiques ont atteint les eaux de surface et d'autres corps aqueuses à travers les activités humaines intensives. Ils sont alors appelés « polluants émergents » pour dire qu'ils sont apparus récemment. La section suivante **§1.3** essaie de discuter la problématique de ces composés et les soucis suscités par leur présence dans les différentes eaux.

1.3. Focus sur les polluants émergents

D'abord, il s'agit de fixer une définition bien précise qui énumère sans aucune ambiguïté les critères que doit remplir une molécule donnée pour être considérée comme un polluant émergent. À partir de cette définition va s'écouler une classification de ces molécules qui les catégorise en plusieurs groupes selon leurs familles chimiques et leurs utilisations pratiques.

Ensuite, le groupe des produits pharmaceutiques et de soin personnel étant retenu ici comme le plus inquiétant pour des raisons expliquées plus bas, une discussion des effets problématiques de la présence de ces substances médicamenteuses dans les différentes eaux est menée.

Enfin le choix de la carbamazépine au sein des produits pharmaceutiques est justifié en illustrant les propriétés inhabituelles de ce médicament antiépileptique qui en font une molécule cible convenable pour mener la présente étude.

1.3.1. Définition d'un polluant émergent

Pour bien comprendre ce qu'est un « polluant émergent », il faut d'abord bien définir ce terme et connaître l'ensemble des composés chimiques qui peuvent être décrits par cette nomination.

« Émerger » c'est l'action de sortir à la surface, de se montrer au grand jour ; pour être émergent, un polluant doit donc apparaître **récemment** alors qu'il n'apparaissait pas **avant**. Le problème soulevé par cette définition c'est la signification ambiguë des termes « **récemment** » et « **avant** » : depuis combien de temps et à partir de quel instant ?

En effet, il y a deux explications pour cette émergence :

- soit ce composé est un « nouveau polluant » qui a été introduit dans l'écosystème à un instant donné suite à un incident environnemental occasionnant la fuite de certaines molécules d'une réserve fixe ou au cours d'une transportation de produits chimiques, ou l'innovation d'un procédé industriel utilisant ces nouvelles molécules,

- soit ce composé était toujours présent dans l'écosystème mais avec une concentration faible de façon qu'on n'arriva à le détecter qu'après le perfectionnement des méthodes analytiques. Ainsi, la détection de certains de ces composés dans l'eau est désormais possible même à une concentration de quelques nanogrammes par litre, en raison des améliorations importantes des méthodes d'analyse (par exemple, le couplage chromatographie-spectrométrie de masse qui a permis l'atteinte de limites de détection extrêmement faibles) [5-8].

Si on admet que c'est principalement la deuxième explication qui entre en jeu, un polluant émergent est donc aussi d'une part un « micropolluant » et d'autre part un « polluant persistant ». En discutant la « persistance » d'un composé, on s'est rendu compte que cela doit être dû à ce que ce composé est faiblement « dégradable » lors de son passage à travers le processus naturel et/ou le procédé amélioré de dépollution. C'est le cas des produits pétroliers, des pesticides chlorés et phénoliques, des déchets industriels, de la plupart des colorants synthétiques, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des composés pharmaceutiques actifs et des perturbateurs endocriniens [5,9-11]. Différentes recherches scientifiques ont indiqué que certaines de ces molécules sont récalcitrantes et persistantes dans l'eau traitée parce qu'elles sont réfractaires au traitement biologique conventionnel vu leurs structures chimiques complexes [12-14].

Un dernier aspect de l'émergence d'un composé est relié au terme anglais « emergency » qui veut dire une « urgence » et dans cette perspective, le polluant est émergent dans le sens de faire sortir à la surface des inquiétudes environnementales et sanitaires de la communauté scientifique de fait de l'absence d'une réglementation concernant le composé en question.

La présence de ces polluants dans les eaux traitées et même dans l'eau potable est un problème très grave. Les effets indésirables de polluants émergents, sur la flore, la faune, les humains et les performances des processus biologiques, ont été intensivement examinés par plusieurs chercheurs [15-19].

De ce qui précède, il s'avère qu'un polluant émergent est un composé nouvellement apparu ou détecté dans l'eau, où il persiste à une faible concentration à cause d'un déficit au niveau du processus de sa dégradation par les voies naturelles ou par les traitements conventionnels et qui suscite une inquiétude parce que dans la plupart des cas, il manque des informations concernant sa nuisance pour avoir une réglementation fixant un seuil de risque.

La liste des polluants émergents n'est pas donc statique : un composé y entre une fois détecté dans l'eau et y sort une fois est établi un règlement concernant sa nocivité et sa quantité limite à ne pas dépasser dans l'eau. C'est ainsi que la plupart des pesticides qui sont des polluants toxiques bien connus, ne peuvent pas être désignés comme « émergents », parce que d'une part, on s'attend à les détecter dans les eaux depuis longtemps et d'autre part, il existe déjà des lois et des recommandations organisant leurs utilisations. Cependant, les métabolites des pesticides sont toujours des polluants émergents, parce qu'on ne connaît pas grande chose à propos de leurs effets toxiques.

Il est à noter qu'étant donné le perfectionnement rapide des méthodes d'analyse et la procédure lente de la mise en place des études de toxicité aboutissant à la mise au point des législations, la liste des polluants émergents se peuple donc beaucoup plus rapidement qu'elle ne se dépeuple et est par conséquent en croissance continue.

1.3.2. Essai d'une classification des principaux polluants émergents

Dans ce qui suit, sont cités les classes de polluants émergents les plus traités dans la littérature scientifiques récentes :

1.3.2.1. Produits pharmaceutiques et de soin personnel et polluants associés

Les produits pharmaceutiques et de soin personnel (PPSP) constituent un groupe fortement hétérogène de composés qui se caractérisent par des propriétés et des structures chimiques largement variées. Cependant, la formule structurale de ces composés montre dans la plupart des cas un squelette hydrocarboné non-polaire avec un groupement fonctionnel polaire qui est le plus souvent oxygéné ou azoté.

Les PPSP et leurs métabolites sont généralement considérés comme des contaminants « dérivés des effluents », présents à l'origine dans l'eau usée. Tous les antibiotiques, beaucoup d'autres composés pharmaceutiques et de soin personnel ont la tendance à persister ou à être dégradés partiellement durant le traitement ou même de court-circuiter le traitement complètement via les trop-pleins des égouts, contribuant ainsi à leur décharge dans des eaux de réception qui servent comme des sources d'eau potable ou des surfaces d'eau réservées pour des usages récréatifs [20–24].

Outre les substances médicamenteuses et les antibiotiques qui en constituent une sous-classe importante, il existe des polluants associés qui peuvent être considéré comme des sous-classes de cette grande classe de polluants émergents des PPSP.

a. Médicaments à usage légitime et antibiotiques

Les propriétés chimiques de chaque substance déterminent son comportement à travers les différentes étapes du traitement des eaux usées, sa mobilité, sa persistance et même sa biodisponibilité dans la matrice terreuse [20]. Les produits des différentes transformations physiques, chimiques ou biochimiques, naturelles ou provoquées, subies par les PPSP, peuvent être persistants dans l'environnement [20,25]. À titre d'exemple, l'acide clofibrique, le métabolite actif des principaux hypolipémiants (clofibrate, érofibrate et théofibrate), est aussi résistant à la dégradation naturelle qu'il peut persister dans l'environnement près de 21 ans [26].

Les produits pharmaceutiques (**Figure 1.2**) peuvent avoir des effets secondaires non prédits et inconnus sur différents organismes, en particulier après une exposition à long terme et à de faibles concentrations. Aussi, les effets potentiels des métabolites sur les organismes de l'écosystème, sont encore inconnus [21].

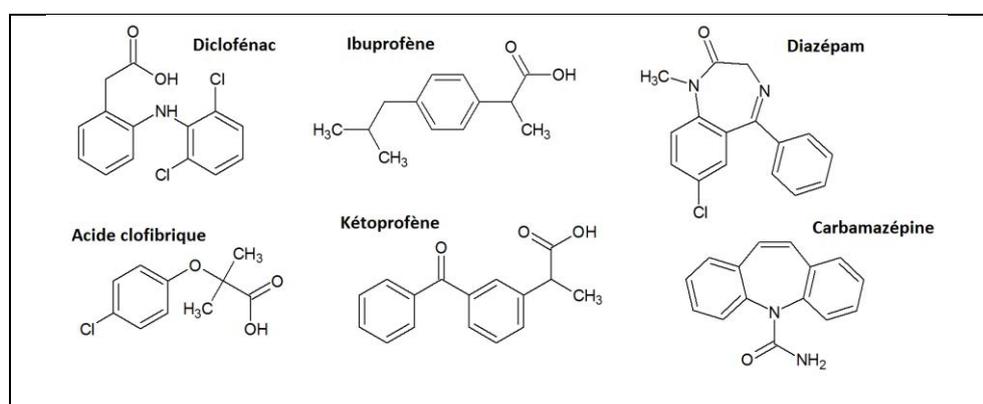


Figure 1.2
Médicaments persistants non-antibiotiques

Les antibiotiques (**Figures 1.3-1.4**) peuvent être catégorisés d'après leurs structures suivant les groupes suivants: les sulfonamides, les fluoroquinolones, les nitroimidazoles, les pénicillines, les céphalosporines, les tétracyclines et les macrolides [20,27]. En particulier, la libération des antibiotiques dans l'environnement peut provoquer l'apparition de souches bactériennes résistantes.

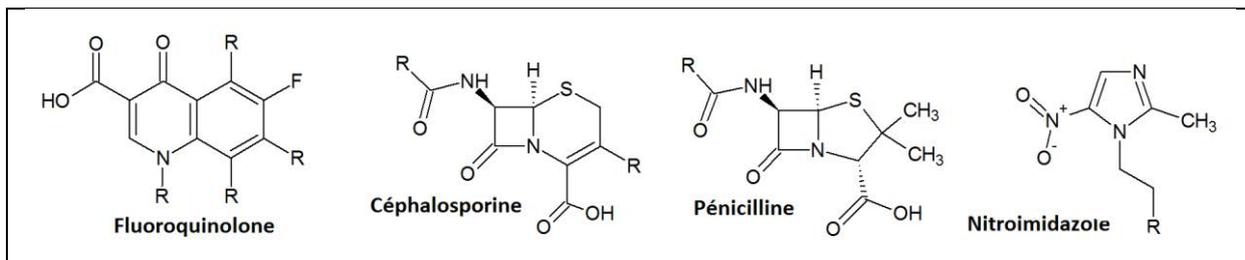


Figure 1.3 Antibiotiques (I)

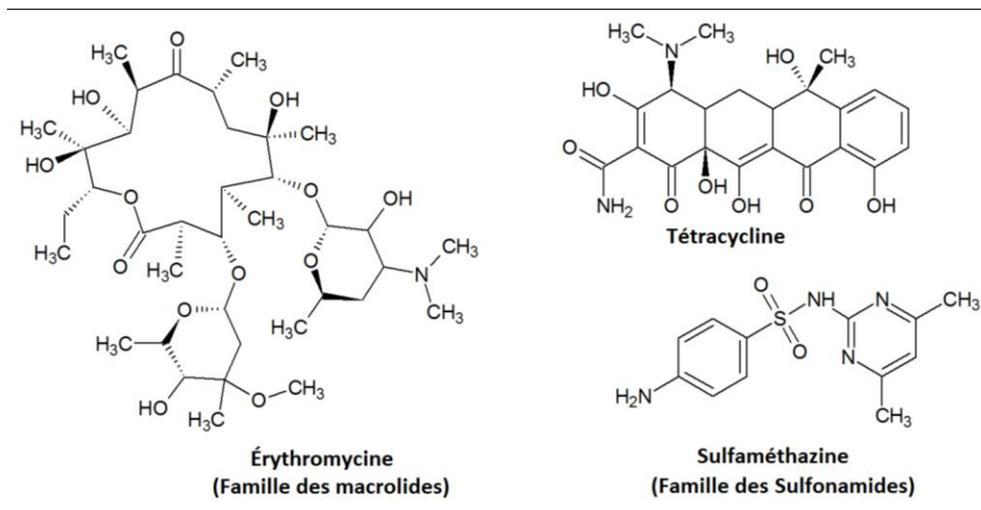


Figure 1.4 Antibiotiques (II)

b. Substances médicamenteuses illicitement utilisées

L'utilisation de substances médicamenteuses d'une façon illicite (**Figure 1.5**) a gagné une attention mondiale à cause de leurs impacts notablement nuisibles sur la santé humaine et le bien-être de la société. Ces substances sont par définition ceux dont l'utilisation non-médicale est interdite par la loi internationale. Ils appartiennent principalement aux classes des opiacés, des cocaïnes, du cannabis, des amphétamines et de leurs métabolites.

Les produits chimiques associés impliquant des précurseurs de laboratoire illégaux, des sous-produits et des médicaments synthétisés, sont le plus souvent enfouis illégalement dans le sol ou dans les installations de gestion des déchets publics, ou jetés dans l'évier ou les toilettes, après quoi ils rejoignent le réseau d'assainissement. Les recherches menées à propos de l'occurrence de ces substances médicamenteuses dans les réseaux des égouts ont montré que leur présence montre un motif dans le temps, ce qui permet de suivre leur utilisation, en retraçant l'historique et l'emplacement ; ces mêmes recherches ont montré aussi que la présence de plusieurs de ces composés est efficacement atténuée par les stations d'épuration (STEP). Les taux d'élimination de ces substances par les procédés conventionnels de traitement des eaux usées ont été généralement supérieurs à 50 %, sauf dans des stations d'épurations qui utilisent un simple traitement primaire [28–30].

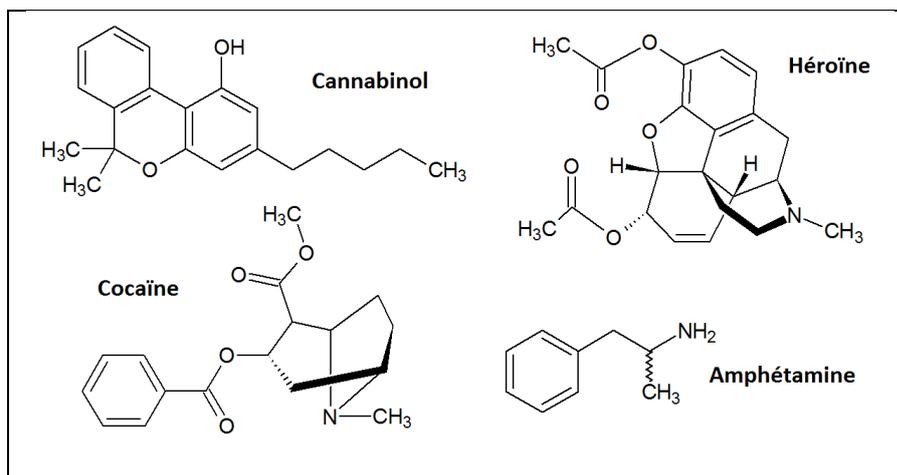


Figure 1.5
Substances médicamenteuses illicitement utilisées

c. Stéroïdes

Les stéroïdes naturels (17β -œstradiol, œstrone, œstriol) et synthétiques (17α -éthynylœstradiol, mestranol) sont excrétés à l'origine par l'Homme (**Figure 1.6**). Cependant, les effluents des STEP sont la source principale des stéroïdes synthétiques entrant dans l'environnement. L'activité œstrogénique des effluents des STEP a abouti à des effets nuisibles sur le biote environnemental. En fait, les stéroïdes naturels et synthétiques sont excrétés à partir du corps humain sous la forme de conjugués polaires et inactifs, mais sont présents dans l'affluent et l'effluent des égouts sous la forme de stéroïdes libres et actifs.

Une fois libérés par le corps, les œstrogènes liés subissent une dissociation chimique ou enzymatique dans les boues activées et reforment les œstrogènes actifs [31].

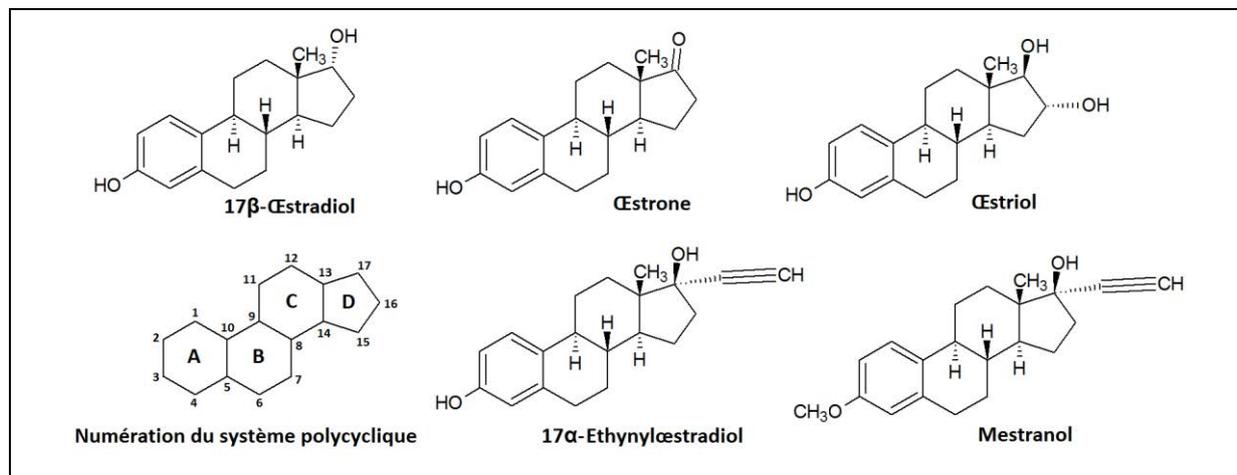


Figure 1.6 Stéroïdes

d. Muscs

Les muscs synthétiques (**Figure 1.7**) ont été utilisés depuis les années 1930 comme des arômes dans une variété de produits domestiques et industriels, par exemple des détergents, des cosmétiques, des champoings, des parfums, des aliments et des additifs de cigarette. Des études de leur bilan de masse à travers les STEP ont indiqué d'importants taux d'élimination des deux principales molécules de cette famille, à savoir la galaxolide (HHCB) et la tonalide (AHTN) [20,32]. Les muscs qui sont hautement lipophiles, tendent donc à s'accumuler dans les sédiments, les boues, et le biote.

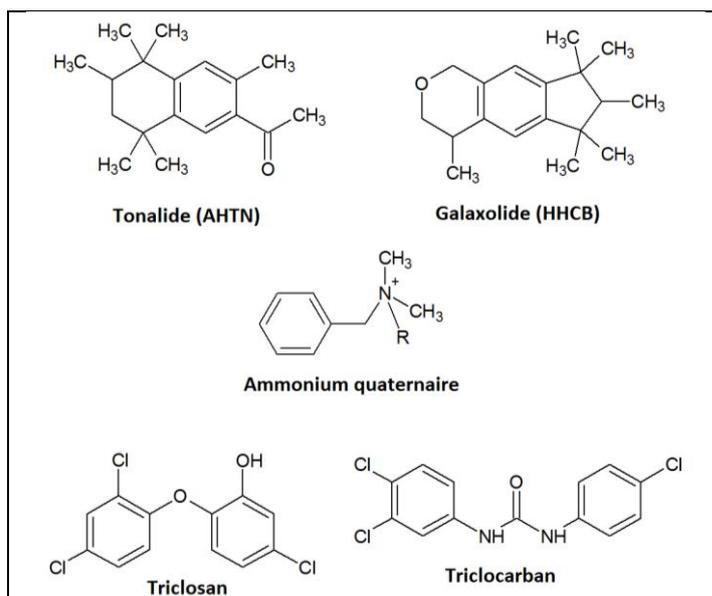


Figure 1.7 Muscs, Triclosan, Triclocarban et ammonium quaternaires

e. Composés d'ammonium quaternaire

Les composés d'ammonium quaternaire (AQ) sont des tensioactifs cationiques (**Figure 1.7**). Les molécules contiennent au moins une chaîne alkyle hydrocarbonée hydrophobe liée à un atome d'azote chargé positivement. Les autres groupes alkyle sont généralement des substituants à chaîne courte tels que des groupes méthyle ou benzyle. L'usage domestique des AQ est la principale source de ces composés entrant dans les stations d'épuration. L'élimination des AQ en matière de traitement des eaux usées peut également être attribuée à la biodégradation, où les durées nécessaires pour les dégrader sont généralement signalées pour être de quelques jours voire de quelques heures. Les rejets des stations d'épuration peuvent entraîner une contamination environnementale des sédiments marins par les AQ [20,33].

f. Triclosan et triclocarban

Le triclosan et le triclocarban (**Figure 1.7**) sont des agents antimicrobiens largement utilisés dans les produits de soins personnels, tels que les shampooings, les savons, les déodorants, les cosmétiques, les lotions et les crèmes pour soin de la peau, les bains de bouche et les dentifrices. Des études de leur bilan de masse à travers les STEP montrent une élimination incomplète du triclosan et du triclocarban pendant le traitement des eaux usées.

g. Édulcorants artificiels

Le sucralose et d'autres édulcorants artificiels (**Figure 1.8**) ont été récemment identifiés comme polluants émergents persistants [34]. Le sucralose est un édulcorant artificiel relativement nouveau. Il peut sembler bizarre qu'un tel composé soit compté parmi les contaminants émergents, mais il est maintenant largement répandu dans les eaux environnementales et est extrêmement persistant (avec une demi-vie pouvant atteindre plusieurs années).

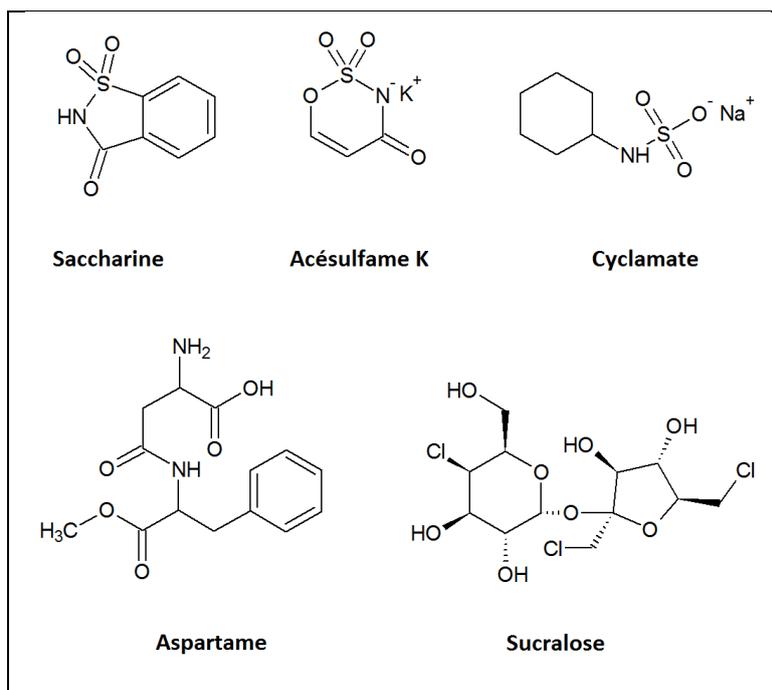


Figure 1.8 Édulcorants artificiels

Plusieurs groupes de recherche ont rapporté des mesures de sucralose dans l'environnement (y compris l'eau de la rivière, les eaux souterraines et eaux côtières), et la recherche a été élargi pour inclure d'autres édulcorants artificiels, comme l'acésulfame K, la saccharine, le cyclamate et l'aspartame [30,35].

En raison de leur résistance à la transformation, l'acésulfame K et le sucralose ont été considérés comme des marqueurs idéaux pour détecter les infiltrations éventuelles des eaux usées domestiques dans les eaux de l'environnement, en particulier les eaux souterraines [36,37].

1.3.2.2. Polluants émergents d'origine purement industrielle

En outre, il existe aussi des polluants émergents d'origine purement industrielle. À l'opposé des substances pharmaceutiques, des produits de soin personnel ou les composés utilisés dans le domaine alimentaire, les polluants énumérés dans ce paragraphe se trouvent plus fréquemment dans les eaux usées industrielles plutôt que celles domestiques et municipales.

a. Composés perfluorés

Les composés perfluorés (CPF) (**Figure 1.9**) sont des produits chimiques anthropogéniques qui ont été conçus pour fabriquer des produits résistants à la chaleur, à l'eau et aux taches des huiles et des graisses. Ils sont des composés ayant des propriétés chimiques inhabituelles, par le fait qu'ils sont à la fois hydrophobes and lipophobes, et qu'ils contiennent la liaison C–F, l'une des plus fortes liaisons chimiques connues. Les CPF sont persistants et largement dispersés dans l'environnement.

La réponse toxicologique humaine et environnementale vis-à-vis d'une exposition aux CPF est peu connue, mais on soupçonne entre autres un effet de perturbation endocrinienne [20,38]. Les structures chimiques des CPF les rendent très résistants à la dégradation dans l'environnement.

Les deux groupes de CPF les plus communément mesurés et détectés dans les matrices environnementales sont les perfluoroalkylsulfonates (PFAS) (composé-type : le perfluorooctane sulfonate (PFOS)) et les perfluoroalkylcarboxylates (PFAC) (composé-type : l'acide perfluorooctanoïque (PFOA)).

PFAS et PFAC sont des produits chimiques synthétiques qui ne se trouvent pas naturellement dans l'environnement. Les études du bilan de masse des CPF à travers les STEP rapportent communément des masses de PFOS et de PFOA plus élevées dans les effluents de la STEP que dans l'affluent brut [39]. Ceci suggère que la dégradation d'autres composés organiques fluorés (tels que des fluoropolymères) peut se dérouler durant le traitement des eaux usées pour former du PFOS et du PFOA [20].

b. Diphényléthers polybromés

Les diphényléthers polybromés (PBDE) (**Figure 1.9**) sont une classe de retardateurs de flamme bromés qui ont été utilisés dans des plastiques, des textiles, des circuits électroniques, et d'autres matériaux. Il existe 209 congénères de PBDE. Ces composés soulèvent des inquiétudes et des soucis concernant leur utilisation, à cause de leur détection fréquente dans de différents échantillons environnementaux, humains et animaux, mais aussi dans des endroits très distants de l'endroit où ils ont été produits ou utilisés.

c. Alcanes et naphthalènes polychlorés

Les mélanges techniques d'alcanes polychlorés (**Figure 1.9**) (PCA), référant d'habitude à des paraffines chlorés, sont une classe de produits chimiques industriels, comprenant des hydrocarbures chlorés à chaîne droite. Les PCA sont répartis sur trois groupes : les PCA à chaîne courte comprenant 10 à 13 atomes de carbone, les PCA à chaîne moyenne comprenant 14 à 17 atomes de carbone et les PCA à chaîne longue comprenant 18 atomes de carbone ou plus.

Le nombre total des congénères possibles est inconnu, mais dépasse de loin 10 000. Les concentrations de PCA dans les boues des égouts, mettent en évidence l'accumulation dans les tissus humains et le biote environnemental, et des concentrations aux niveaux de traces peuvent être présents dans l'effluent traité. Les données toxicologiques actuelles ne sont pas suffisantes et par suite des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer le risque que l'utilisation industrielle de ces composés chimiques pourrait faire courir à la santé humaine et l'environnement. Les mélanges techniques de naphthalènes polychlorés (PCN) ont été utilisés depuis le début des années 1900 comme des fluides diélectriques, des additifs d'huile de moteur, des composés de masquage et de préservation du bois et des lubrifiants, ainsi que pour la production de teintures et en galvanoplastie. Les PCN sont également structurellement similaires et ont des propriétés physico-chimiques similaires. Il y a 75 congénères de PCN, substitué par un à huit atomes de chlore par molécule de naphthalène. Les PCN sont des contaminants environnementaux omniprésents et plusieurs congénères de PCN présentent une toxicité du type dioxine [20].

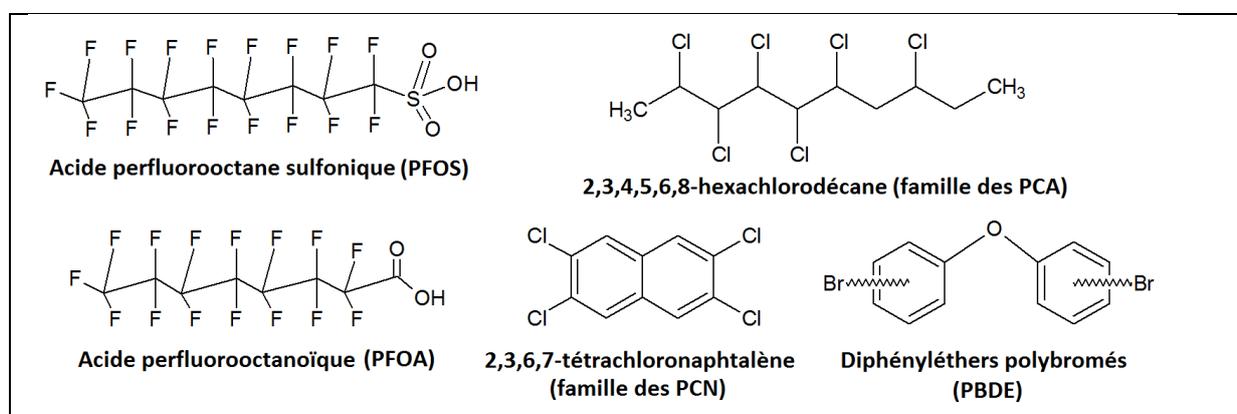


Figure 1.9 Composés perfluorés, polychlorés et polybromés

d. Siloxanes

La structure des siloxanes (**Figure 1.10**) consistent en une répétition d'une unité structurale formée d'une liaison Si—O à laquelle sont liées des chaînes organiques latérales. Il existe des siloxanes cycliques et d'autres linéaires qui forment ensemble un large groupe de composés chimiques ayant des poids moléculaires de quelques centaines à plusieurs centaines de mille de daltons.

Les siloxanes sont largement utilisés dans des produits à utilisation urbaine, comme des peintures et des cosmétiques, mais aussi dans des produits médicaux, grâce à leur haute stabilité thermique, leur texture onctueuse, leur inertie physiologique et leurs propriétés lubrifiantes. Ils sont en général, très persistants une fois libérés dans l'environnement. Dans les récentes années, des études variées ont montré que quelques siloxanes peuvent avoir des capacités de perturbation endocrinienne surtout sur la reproduction, ce qui a soulevé une inquiétude concernant leur effet sur l'Homme et l'environnement [40,41].

Les siloxanes ont été détectés dans des échantillons environnementaux, comme des eaux de surface, des sédiments et des tissus de poisson. Les siloxanes cycliques sont trouvés à des concentrations (602-2360 ng g⁻¹ de matière sèche) plus élevées que celles des siloxanes linéaires (98-3310 ng g⁻¹ de matière sèche) dans les échantillons de sédiments. Cependant, la somme des concentrations des 13 siloxanes linéaires trouvés était plus élevée que la somme des concentrations des cinq siloxanes cycliques dans les échantillons de boues [42].

Le composé-type des siloxanes est le polydiméthylsiloxane (PDMS) ; il a une faible toxicité écologique, qui ne se manifeste qu'à des concentrations beaucoup plus élevées que celles observées dans l'environnement ; de ce fait, les concentrations de PDMS aux niveaux détectés dans l'eau ne posent pas une menace écologiquement significative.

Les siloxanes ont une très faible solubilité dans l'eau et sont principalement éliminés par sorption sur les solides durant le traitement des eaux usées. Durant le traitement des eaux usées, il a été observé qu'au moins 94 % des siloxanes resteraient inchangés à cause de leurs stabilités chimique et thermique élevées.

Les siloxanes ne sont pas toxiques aux communautés microbiennes des eaux usées et n'affectent donc pas la performance du traitement. Les siloxanes, non éliminés par adsorption sur les particules solides des boues, sont présents dans l'effluent de la station de traitement des eaux usées comme un composant des solides en suspension. Les siloxanes se dégradent dans un environnement terreux, comme résultat de processus abiotiques plutôt que de la biodégradation, et ont une demi-vie estimée de 4 à 28 jours [20].

e. Bisphénol A, benzotriazoles et benzothiazoles

Le bisphénol A (**Figure 1.10**) est un plastifiant fabriqué en grande quantité et qui est utilisé principalement en tant que monomère pour la fabrication de polycarbonate, des résines époxy et du polyester insaturé. Les études du bilan de masse à travers des STEP ont détecté du bisphénol A dans l'eau brute, les boues et les effluents. Cependant, des taux d'élimination importants (jusqu'à 99 %) ont été signalés au cours du traitement des eaux usées et par la suite, la biodégradation est considérée comme le mécanisme d'élimination principale [20,43].

Les benzotriazoles (**Figure 1.10**) sont des agents complexants qui sont largement utilisés comme anticorrosifs. Les deux formes les plus courantes, le benzotriazole (*1H*-benzotriazole) et le tolyltriazole (un mélange de 4- et 5-méthyl-*1H*benzotriazole), sont solubles dans l'eau, résistants à la biodégradation, et ne sont que partiellement éliminés dans le traitement des eaux usées [30,44].

Les benzothiazoles (**Figure 1.10**) sont utilisés comme des inhibiteurs de corrosion, des herbicides, des agents algicides, des myxobactéricides, des fongicides dans la production de bois et de cuir, des photosensibilisateurs, des fluides de dégivrage et des constituants de colorants azoïques ; ils sont également utilisés en chimiothérapie et dans l'industrie des pâtes du papier [45]. Les taux d'élimination des benzothiazoles variaient de 0 à 80 % dans la station d'épuration conventionnelle d'après Matamoros et al. [46].

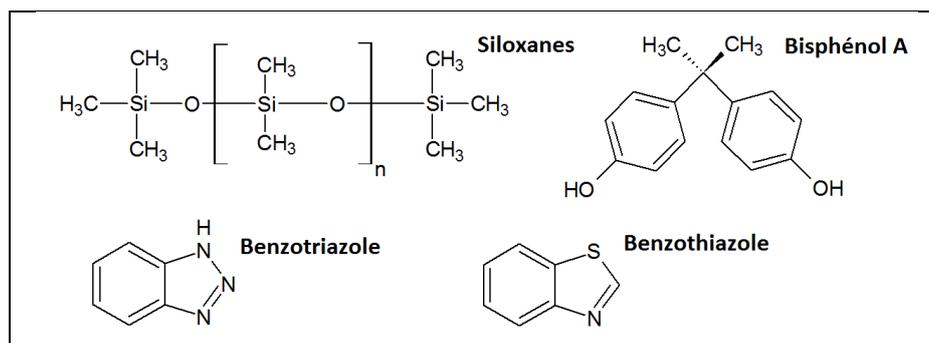


Figure 1.10 Siloxanes, bisphénol A, benzotriazole et benzothiazole.

f. Nanomatériaux

Les nanomatériaux ont des tailles de 1 à 100 nm et peuvent avoir des propriétés particulières, telles qu'une haute résistance, une stabilité thermique, une faible perméabilité et une conductivité élevée. Dans un proche avenir, les nanomatériaux devraient être utilisés dans des domaines tels que la chimiothérapie, l'administration des médicaments, et le marquage des pathogènes alimentaires. Les nanomatériaux ont des structures chimiques très variées et comprennent des fullerènes, des nanotubes, des points quantiques, des oxanes métalliques, des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂), d'argent, d'or, et de fer métalliques. La plupart des recherches dans le domaine des nanomatériaux est centrée sur le développement de nouveaux usages de ces matériaux qui sont de nouveaux produits dotés de propriétés uniques.

D'autre part, de vives inquiétudes concernant les nanomatériaux en tant que des contaminants de l'environnement sont soulevées. En tant que tel, les nanomatériaux font l'objet de différents travaux de recherche pour évaluer le sort, le transport, et les effets sur la santé [30].

1.3.3. Problématique des résidus des substances pharmaceutiques dans l'eau

De grandes quantités de produits pharmaceutiques sont utilisées pour la prévention, le diagnostic et le traitement des maladies chez les animaux et l'Homme. Les composés à activités pharmaceutiques (en anglais « Pharmaceutically Active Compound (PhAC) ») sont devenus un sujet de grand intérêt pour les chercheurs de l'environnement à travers le monde [47].

La moyenne mondiale de la consommation des produits pharmaceutiques par habitant et par an est estimée à environ 15 g ; dans les pays industrialisés, cette valeur pourrait atteindre entre 50 et 150 g [48]. En raison de leur utilisation intensive, de leur présence dans l'environnement aquatique et de leurs impacts potentiels sur la faune et les humains, les résidus de substances pharmaceutiques (RSP) posent un problème important pour l'environnement [25]. Récemment, un intérêt croissant s'est développé pour l'étude de l'identification, le destin et la distribution des RSP dans les stations d'épuration (STEP) des eaux usées municipales, où ils sont généralement trouvés à des concentrations très faibles (\leq quelques ng L^{-1}) [49,50].

De nombreux facteurs chimiques, physiques et biologiques, tels que l'adsorption sur les bio-solides, le pH, la force ionique de l'effluent, et les propriétés physico-chimiques du RSP, peuvent affecter le destin de ce RSP dans les stations d'épuration utilisant principalement un traitement biologique à base de boues activées (voir la section **§1.4.1** pour plus de détails). Parmi les propriétés physico-chimiques d'un RSP qui coopèrent à décider de son destin lors de son passage à travers la station d'épuration, le caractère hydrophile/hydrophobe est en particulier important ; ainsi, les composés hydrophiles peuvent rester sous forme dissoute dans la phase aqueuse de l'effluent de la station d'épuration, alors que les substances hydrophobes peuvent se lier par sorption aux bio-solides. Ainsi, ces deux types de composés peuvent atteindre l'environnement respectivement en solution dans les effluents des STEP qui seront rejetés dans un milieu aquatique récepteur ou en liaison avec les bio-solides qui seront déchargés dans des terres agricoles.

Le pouvoir toxique de certains RSP qui inhibe le métabolisme microbien totalement ou partiellement dans le cas des antibiotiques ou des antiseptiques, peut également perturber le processus de traitement biologique en endommageant les microorganismes des boues activées. La structure moléculaire complexe de certaines RSP d'origine synthétique telle que la carbamazépine et la naproxène peut être très différente des structures des molécules naturelles de sorte que seules de rares enzymes sont capables d'attaquer leurs liaisons chimiques.

Lorsque le traitement biologique conventionnel échoue, les méthodes physico-chimiques semblent être une solution alternative. Des méthodes simples dans cette catégorie comme la coagulation-floculation, la sédimentation, l'adsorption sur charbon actif et la filtration sont souvent utilisés dans les procédés d'épuration de l'eau potable [51,52]. Ces moyens ne font que transférer simplement les molécules problématiques d'une phase à une autre et des moyens plus poussés tels que les procédés d'oxydation avancée (POA) doivent souvent être utilisés pour éliminer complètement ces composés.

Les tendances actuelles dans ce domaine ont été bien examinées par Klavarioti et al. [52]. Principalement, les oxydations chimiques purs utilisent les oxydants réactifs tels que l'ozone (O_3) [53], le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [54], le réactif de Fenton (H_2O_2/Fe^{2+}) [55] et les différents composés de chlore (Cl_2 , ClO_2 , ClO^- , ...) [56–58].

La photolyse par irradiation par la lumière UV-visible solaire ou artificielle, est également une technique couramment utilisée. H_2O_2 est souvent ajouté dans ce processus afin d'accélérer la formation de radicaux oxygénés réactifs capables d'attaquer des liaisons organiques [54]. Tandis que l'ajout des ions ferreux ou ferriques (dans des conditions de pH faible) conduit à une réaction de photo-Fenton [59–62], la présence de dioxyde de titane (TiO_2) ou d'autres catalyseurs semi-conducteurs sous une forme solide particulaire améliore considérablement ce processus qui est alors appelé une photo-catalyse hétérogène [63–66]. L'irradiation par des ultrasons crée un point chaud dans la solution provoquant une série de réactions qui ressemblent à la pyrolyse ; ce procédé baptisé « sonolyse » produit aussi des intermédiaires radicalaires réactifs.

Une amélioration peut être réalisée alors soit par l'ajout de TiO_2 menant à un processus hétérogène [67,68], soit par l'ajout de Fe^{2+} menant à une réaction de sono-Fenton [69]. Une autre option est une oxydation électrochimique, qui peut être soit une réaction anodique directe des polluants si celui-ci est électro-chimiquement actif [70], soit une génération par électrolyse d'espèces oxydantes. Une microélectrolyse assistée par microbulles [71] ou en utilisant des électrodes spéciaux tels que du diamant dopé au bore ou une anode de TiO_2 [72] peut conduire à de meilleures performances.

L'ajout des ions ferreux ou ferrique [73] ou leur génération par des électrodes de fer sacrificielles [55] sont aussi des options possibles pour parvenir à une réaction électro-Fenton couplée ou non avec une coagulation par médiation de Fe^{3+} . D'autres POA utilisant de hautes températures et pressions ou la technologie de plasma resteront en phase expérimentale et prendront quelque temps avant de passer à l'échelle réelle.

Ces différentes méthodes peuvent représenter une bonne solution pour éliminer certains polluants, mais un nouveau type de problèmes peut apparaître durant leur implémentation. En fait, même lorsque les POA conduisent à des rendements d'élimination notables, la question sur les sous-produits générés est encore controversée lorsque la minéralisation complète n'a pas eu lieu. Il a été constaté que certains de ces résidus peuvent être aussi toxiques et voire plus toxiques et récalcitrants que les molécules mères correspondantes : par exemple, l'acridone, le sous-produit d'oxydation de la carbamazépine par ozonation, est génotoxique (sa concentration la plus faible ayant un effet observable ou Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) est de 5 nmol L^{-1}), alors qu'aucune toxicité aiguë ou chronique n'est prouvée pour la carbamazépine même [74,75]. L'utilisation des enzymes puissantes purifiées est toujours possible [76] mais cette purification implique des coûts élevés.

1.3.4. Omniprésence et persistance de la Carbamazépine

Le composé cible retenu pour ce travail de recherche est la carbamazépine (CBZ) : un principe actif pharmaceutique émergent et persistant dans les écosystèmes aquatiques. Cette molécule médicamenteuse est un antiépileptique largement prescrit à des doses élevées (100-2000 mg par jour) et par conséquent les teneurs observées dans le milieu aquatique sont importantes [13,77,78].

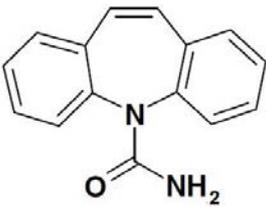
De nom systématique 5*H*-dibenzo[*b,f*]azépine-5-carboxamide, ce médicament est vendu sous le nom commercial Tegretol®. La carbamazépine (CBZ) est utilisée seule ou en combinaison avec d'autres médicaments pour contrôler certains types de convulsions. La CBZ est également utilisée pour traiter la névralgie du trijumeau (une condition qui provoque des douleurs du nerf facial).

Des capsules de CBZ à libération prolongée (marque Equetro® uniquement) sont utilisées pour traiter des épisodes de manie (une humeur frénétique, anormalement excitée ou irritée) ou des épisodes mixtes (une dépression qui se produit en même temps qu'une manie) chez les patients souffrant de troubles bipolaires (troubles maniaco-dépressive, une maladie qui provoque des épisodes de dépression, des épisodes de manie et d'autres modes anormaux) [79].

La CBZ appartient à une classe de médicaments appelés « anticonvulsivants ». Un anticonvulsivant agit en réduisant l'activité électrique anormalement élevée dans le cerveau. La CBZ est aussi parfois utilisée pour traiter les maladies mentales, la dépression, le trouble de stress post-traumatique, le sevrage de drogues et d'alcool, le syndrome des jambes sans repos, le diabète insipide, certains syndromes de douleur, et une maladie chez les enfants appelée « chorée » [80].

En termes de propriétés physico-chimiques, la CBZ est un composé peu hydrophobe ($\log K_{o/e} = 2,45$), d'où ses capacités négligeables de sorption dans le sol et les boues activées [81,82] mais également peu hydrophile vu sa faible solubilité aqueuse (valeur controversée allant de 17,7 à 112 mg L⁻¹) [83]. Avec une constante de la loi de Henry de $1,09 \cdot 10^{-5} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$, la CBZ est certainement non-volatile. Les propriétés physico-chimiques, pharmaco-toxicologiques de la CBZ sont résumées dans le **Tableau 1.1**.

Tableau 1.1 Propriétés physico-chimiques et pharmaco-toxicologiques de la CBZ

Structure		
	Formule moléculaire	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O
	N° CAS	298-46-4
	masse molaire	236,27 g mol ⁻¹
	Solubilité dans l'eau	17,7 mg L ⁻¹ (20°C)
	Log K _{o/e} (constante de partage octanol-eau)	2,45
	Constante de la loi d'Henry	1,09 10 ⁻⁵ Pa m ³ mol ⁻¹ (25°C)
	pK _a	13,90
	Point de fusion	189-193°C
	Usage	Analgésique, anticonvulsivant, agent anti-maniaque
	Apparence	poudre blanche, d'un clair jaunâtre
Toxicité	Une ingestion légère provoque des vomissements, de la somnolence, de l'ataxie, des troubles de l'élocution, du nystagmus, des réactions dystoniques et des hallucinations. Les intoxications graves peuvent produire du coma, des convulsions, une dépression respiratoire et une hypotension.	
Organismes affectés	Humains et organismes aquatiques	
Références : www.chemicalbook.com , www.SigmaAldrich.com , www.alfa.com		

Différentes études réalisées à ce sujet ont montré la résistance de la CBZ aux traitements conventionnels utilisés dans les stations d'épuration (STEP) [13,81,84]. La carbamazépine (CBZ) était le résidu pharmaceutique le plus souvent détecté dans tout genre de plans d'eau [85]. En effet, cette molécule est retrouvée dans les effluents de ces stations (jusqu'à $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$) [13,86], les eaux de surface (jusqu'à $1,1 \mu\text{g L}^{-1}$) [13,87,88] et voire dans l'eau potable (30 ng L^{-1}) [89].

Concernant l'élimination de la Carbamazépine (CBZ) par des procédés d'oxydation, la photo-dégradation solaire ou par irradiation UV (en absence ou en présence de TiO_2), l'ozonolyse (O_3), et l'oxydation par ClO_2 ont, entre autres, été testés d'après la littérature [83]. Les résultats obtenus ont mis en évidence que même si les taux d'abattement de ce composé paraissent dans certains cas élevés, sa minéralisation complète est loin d'être atteinte. En effet, sa transformation conduit le plus souvent à des produits d'oxydation qui sont généralement plus récalcitrants et plus toxiques que le composé initial [90].

Par exemple, l'acridine et l'acridone, produits de l'ozonolyse de la CBZ, sont reconnus comme étant des composés irritants, mutagènes et cancérigènes [75]. De ce fait, les procédés d'oxydation avancée ne représentent pas une solution technologique intéressante pour l'élimination de ce type de composé. Par conséquent, le développement de nouveaux procédés plus performants est justifié. Le traitement biologique le plus utilisé, est le procédé conventionnel aux boues activées. Selon la littérature recensée, l'élimination de la carbamazépine (CBZ) par ce type de traitement ne dépasse jamais les 16 % [74,84].

1.3.4.1. Sources de la carbamazépine et de ses métabolites

Chaque année, environ 1014 tonnes de carbamazépine (CBZ) sont consommés dans le monde entier, une valeur estimée conforme avec les données sanitaires de « Intercontinental Marketing Services (IMS) » qui rapportent que 942 tonnes de CBZ ont été vendus en 2007 dans 76 grands pays qui sont considérés comme correspondant à 96 % du marché mondial de produits pharmaceutiques, et cela donne plus de 30 tonnes de CBZ qui doivent être éliminés des effluents. Au Canada, environ 28 tonnes de CBZ ont été vendus d'après les prescriptions médicales délivrées en 2001 [85].

Les voies de transformation du médicament antiépileptique CBZ dans le corps humain ont été largement étudiées. Environ 72 % de la CBZ administrée par voie orale est absorbée, tandis que 25 % sont évacués inchangés dans la matière fécale et 2-3 % sont évacués dans l'urine. Des études indiquent que la concentration de CBZ dans le plasma sanguin atteint un pic environ 4 à 8 heures après l'ingestion, mais cela peut prendre jusqu'à 26 h pour que la CBZ prenne effet [91].

Une fois qu'elle est absorbée, la CBZ est fortement métabolisée par le foie, ce qui laisse seulement 1 % de la dose sous forme inchangée. La CBZ est métabolisée par le système du cytochrome P450 dans le foie produisant plusieurs métabolites [91]. Ces métabolites peuvent agir pour inhiber la forme pharmaceutique active de la CBZ ; ils subissent le cycle entéro-hépatique pour être finalement excrétés dans l'urine.

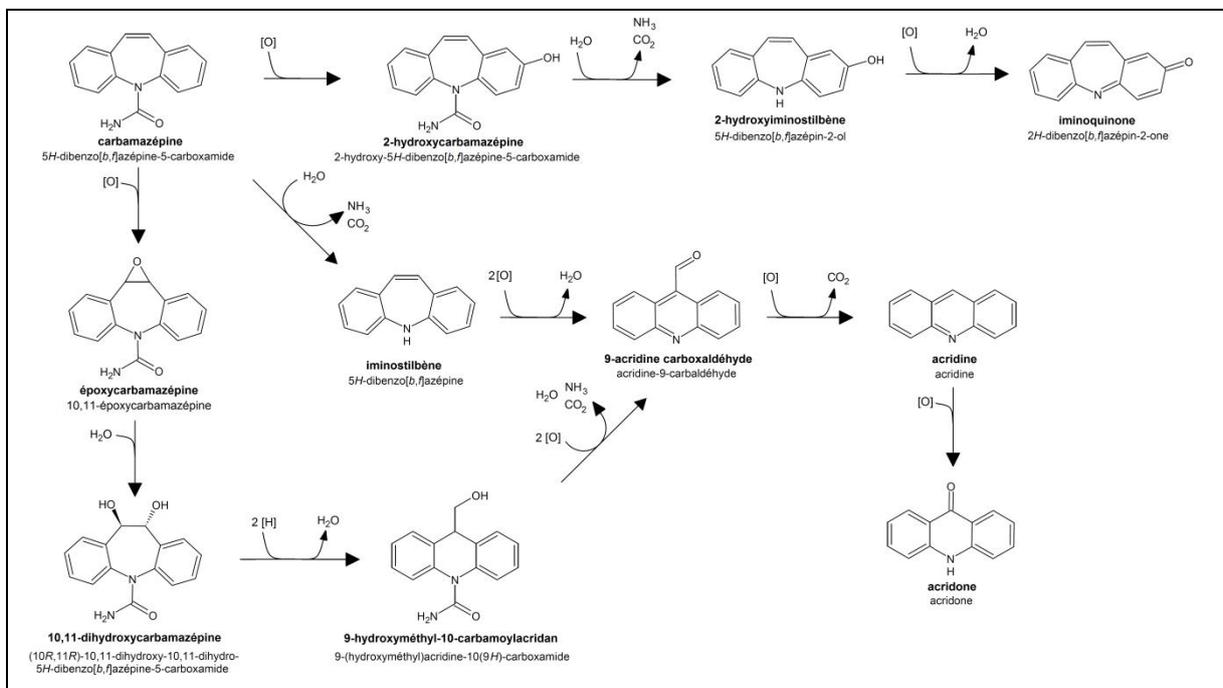


Figure 1.11 Les trois voies métaboliques d'oxydation de la carbamazépine (Breton et al. 2005 [90])

Trois voies métaboliques principales (**Figure 1.11**) ont été répertoriées [92], la voie principale étant la formation de la 10,11-époxycarbamazépine (EP-CBZ), un composé ayant toujours l'effet pharmaceutique avec des propriétés anti-convulsivantes. Ensuite, l'EP-CBZ est métabolisée en 10,11-dihydro-10,11-trans-dihydroxycarbamazépine (DiOH-CBZ). Plus tard, la DiOH-CBZ conduit à la formation du 9-hydroxyméthyl-10-carbamoylacridan.

Une deuxième voie métabolique implique la production de composés hydroxylés, tels que la 2-hydroxycarbamazépine (2-OH-CBZ) et la 3-hydroxycarbamazépine (3-OH-CBZ). La troisième voie métabolique conduit à la formation de l'imino-stilbène (IM). En outre, dans les leucocytes, la CBZ et l'IM sont métabolisés en produits d'oxydation, y compris l'acridine (AI) et l'acridone (AO), qui sont connus pour être génotoxiques [93]. D'autres médicaments peuvent également interagir avec la CBZ en affectant l'activité du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) [91]. Parmi ces interactions, on cite par exemple, le mélange siméthicone-carbamazépine fortement toxique pour les patients [91].

Grâce à l'utilisation massive de la carbamazépine (CBZ) dans la vie quotidienne, le composé-parent et certains de ses métabolites seraient par la suite libérés dans les stations d'épuration (STEP). En raison du haut niveau de production et du comportement pharmacocinétique de la CBZ lors de l'utilisation thérapeutique normale (c'est-à-dire la demi-vie, les excrétions urinaire et fécale, et le métabolisme), la CBZ ainsi que ses métabolites ont été détectés dans les STEP, ces derniers ont été considérés comme une source majeure de décharge de la CBZ dans l'environnement [85]. La carbamazépine (CBZ) a été, également, détectée dans les affluents et les effluents ainsi que les boues d'épuration à la station d'épuration et est sortie à l'environnement via les effluents des stations de traitement d'eaux usées [94]. À titre d'exemple, la concentration en CBZ dans la plupart des effluents de STEP canadiennes peut atteindre $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ [88,95]. D'après les recherches récentes, la CBZ est introduite en continu dans l'environnement et répandue à de faibles concentrations [94], qui affectent en fin de compte la qualité de l'eau et ont potentiellement un impact sur l'approvisionnement en eau potable, l'écosystème et la santé humaine [96].

Les effluents des STEP contiennent une variété de produits pharmaceutiques, y compris la CBZ, qui ne sont pas complètement enlevés par les processus de traitement et sont rejetés dans le milieu aquatique récepteur [97]. La **Figure 1.12** présente le bilan de masse de la CBZ observé dans les eaux usées et les boues d'épuration des stations d'épuration. En outre, au lieu d'être évacués, les effluents sont de plus en plus réutilisés dans de nombreuses parties du monde, notamment dans les pays arides et semi-arides.

L'irrigation et la reconstitution des aquifères des régions côtières soumis à la surexploitation sont les principales voies de réutilisations. Répandre les eaux usées sur le sol pendant la réutilisation peut entraîner le transfert de certains résidus de substances pharmaceutiques (RSP), y compris la CBZ et ses métabolites. Des études récentes ont révélé que la CBZ était présente dans le sol irrigué aux eaux usées avec des concentrations allant de 0,02 à 15 ng g⁻¹ de matière sèche [98,99].

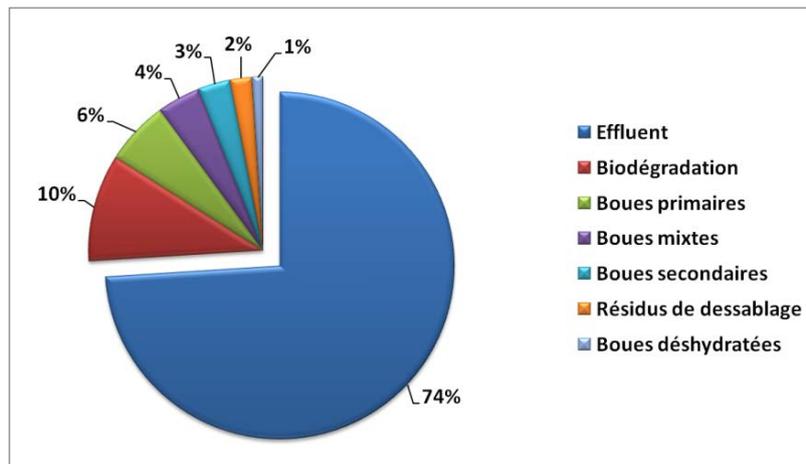


Figure 1.12 Le bilan-masse de la CBZ observé dans les eaux usées et les boues d'épuration des STEP

Références : [98,99]

En outre, il s'avère difficile d'éliminer tous les résidus de substances pharmaceutiques (RSP) via le procédé biologique conventionnel. Ceci est dû au fait que les RSP ont des caractéristiques chimiques et physiques assez différentes les uns des autres. Par conséquent, il est nécessaire de développer une méthode de traitement capable d'assurer l'élimination de ces composés avant leur rejet dans le milieu naturel.

Récemment, la dihydroxycarbamazépine, un métabolite hydroxylé de la carbamazépine (CBZ), a été détectée dans les eaux usées à des concentrations plus élevées que son composé parent [80,100]. D'autres métabolites de la CBZ, telles que l'époxy-carbamazépine et la 2-hydroxycarbamazépine ont été aussi détectées dans les effluents d'eaux usées [101]. Ces études montrent que les métabolites issus du métabolisme humain ou des activités microbiennes doivent être étudiés afin de mieux cerner le comportement des produits pharmaceutiques, y compris CBZ dans les eaux usées et le traitement des boues d'épuration. La CBZ sortante dans l'effluent vers le milieu récepteur est réduite au minimum par la mise en place dans les stations d'épuration de procédés augmentés en fonction des conditions de traitement spécifiques [102].

Le composé est réintroduit dans l'environnement par les décharges de boues d'épuration, le lessivage, l'application agricole et le processus d'incinération. Le composé sous sa forme native ou transformée peut donc entrer dans la chaîne alimentaire quand les boues d'épuration traitées ou déshydratées sont utilisées comme engrais ou conditionneur de sol.

En outre, le coefficient de partage octanol-eau de la carbamazépine ($\log K_{o/e}$) et le coefficient de distribution (K_d) entre l'eau et la boue secondaire sont 2,45 et 1,2 L kg_{ss}⁻¹, respectivement, loin de la valeur de 500 L kg_{ss}⁻¹ requise pour une sorption significative sur les boues [85]. Par conséquent, la plupart de la carbamazépine reste associée à la phase aqueuse. En plus, les chercheurs ont supposé que l'incinération des boues d'épuration peut minéraliser la petite fraction de la carbamazépine présente qui pourra être absente des résidus de cendres. Toutefois, si l'incinération a été interrompu pour utilisation finale bénéfique des boues, telles que l'application de la terre (agriculture) et l'épandage, la présence de la carbamazépine pourrait soulever la question de la réutilisation des boues comme une autre possibilité de contamination des nappes souterraines [94].

1.3.4.2. Effets sur la flore et la faune

La présence des résidus de substances pharmaceutiques (RSP), y compris la carbamazépine, et son impact potentiel sur la santé humaine et les systèmes écologiques même à des concentrations aussi faibles que ng L⁻¹, ont élevé un grand souci qui est en train de devenir un axe majeur de la recherche scientifique [103]. La majorité des produits chimiques provoque une toxicité à travers une cytotoxicité intrinsèque, tandis qu'une nette minorité entraîne une toxicité par interférence à des fonctions cellulaires spécifiques d'organes ou à des fonctions corporelles extracellulaires. Selon ce point de vue simplifié, la toxicité d'un composé peut être décomposée en un certain nombre d'éléments, dont chacun peut être identifié et quantifié dans le cadre d'un système de modèles appropriés [104]. La présence et le devenir des résidus de substances pharmaceutiques dans le milieu aquatique ont été reconnus parmi les questions les plus émergentes en chimie de l'environnement [96].

Les principes actifs pharmaceutiques étant conçus avec l'intention d'accomplir un effet biologique [105], ce concept peut être très important pour ces substances spécifiques en termes de leur devenir et de leurs effets à l'égard des organismes non-cibles dans l'environnement, même à faibles concentrations. Par conséquent, la probabilité du risque environnemental de ces composés ne peut pas être exclue, comme il a été démontré pour les polluants classiques «prioritaires», en particulier les pesticides à toxicité aiguë ainsi que des produits industriels intermédiaires affichant une persistance dans l'environnement [106].

De ce fait, il est nécessaire d'évaluer l'impact de la carbamazépine, entre autres de composés pharmaceutiques, sur les écosystèmes où elle est présente. Des essais biologiques ont généralement été utilisés pour évaluer la toxicité de la carbamazépine (CBZ) en exposant les organismes d'essai à des concentrations spécifiques de ce composé. Ces essais biologiques sont ensuite utilisés pour calculer les concentrations prédites sans effet (« Predicted No-Effect Concentrations (PNEC) ») et les résultats sont ensuite comparés aux concentrations mesurées dans l'environnement (« Measured Environmental Concentrations (MEC) ») [107,108]. La caractérisation des risques est une estimation de l'incidence des effets indésirables survenant dans un compartiment de l'environnement à la suite de l'exposition réelle ou prévue à une substance. Il s'agit généralement d'un quotient de risque calculé comme le rapport de la MEC plus élevée sur la PNEC, le niveau environnemental correspondant à aucun effet néfaste sur la fonction de l'écosystème est à prévoir [107]. Le calcul des risques (MEC/PNEC) pour la CBZ obtenus pour les différents pays est présenté dans la **Figure 1.13**.

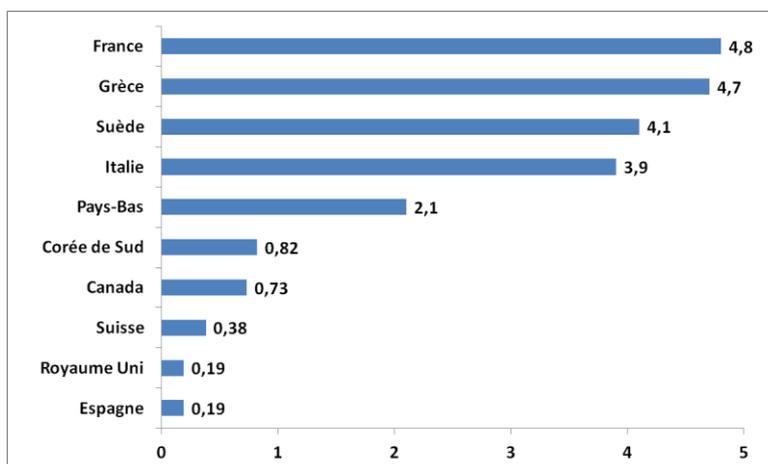


Figure 1.13 La caractéristique des risques (MEC/PNEC) pour la carbamazépine dans différents pays

Une valeur supérieure à l'unité est problématique.

MEC : Measured Environmental Concentration
PNEC : Predicted Non-Effect Concentration

Références : [107,108]

Ferrari et al. [107] ont étudié les effets toxiques de la CBZ sur les bactéries, les algues, les poissons et les micro-crustacés et ont observé que la CBZ avait une écotoxicité aiguë limitée sur les organismes testés. Kim et al. [108] ont étudié la toxicité aiguë de la CBZ par rapport à *Vibrio fischeri* (une bactérie marine), *Daphnia magna* (un invertébré d'eau douce) et *Oryzias latipes* (le poisson médaka) en utilisant l'analyse des concentrations demi-efficaces (CE₅₀). Ils ont observé que des valeurs de CE₅₀ pour *Vibrio fischeri* et *Daphnia magna* étaient de 52,5 mg L⁻¹ (5 min d'exposition) et 76,3 mg L⁻¹ (96 h d'exposition), respectivement. Les doses létales de la CBZ pour le poisson médaka ont été déterminées comme se situant entre 15 et 35 mg L⁻¹.

Dans une étude réalisée par Jos et al. [109], les auteurs ont montré que la CBZ ne devrait pas produire d'effets toxiques aigus sur le biote aquatique (CE₅₀ de 4,5 à 383,5 mg L⁻¹). Selon les résultats de leurs recherches et de la législation européenne actuelle sur la classification et l'étiquetage des produits chimiques (92/32/CEE), ils ont classé la CBZ comme « R52/53 nocif pour les organismes aquatiques et peut entraîner des effets néfastes à longs termes pour l'environnement aquatique ».

Andreozzi et al. [110] ont montré, dans leur étude, qu'il n'y a aucun effet de toxicité de la CBZ sur les algues *Ankistrodesmus braunii* et ont également constaté que la concentration de la CBZ diminue progressivement dans la culture des algues. Ils ont observé qu'après 60 jours d'expérience, plus que 50 % de la CBZ ont été éliminés du milieu. De plus, aucune CBZ n'a été observée dans les cellules d'*Ankistrodesmus braunii* au cours des expériences. L'auteur conclut que la CBZ a été prise par les cellules d'algues et est entrée dans les processus biochimiques. Dussault et al. [111] ont étudié la toxicité de la CBZ pour les insectes diptères *Chironomus tentans* et les crustacés amphipodes d'eau douce *Hyalella azteca* ; ces deux invertébrés benthiques ont été exposés à l'eau pendant 10 jours. Les résultats indiquent que les concentrations demi-létale et demi-efficace (CL₅₀ et CE₅₀) de la CBZ variaient de 9,9 à 47,3 mg L⁻¹.

D'autres études sur la toxicité de la CBZ ont montré une toxicité similaire aux espèces de divers taxons, et les valeurs mesurées de toxicité variaient d'une CE₅₀ de 25,5 mg L⁻¹ pendant 7 jours pour les macrophytes *Lemna minor* [112] à une CL₅₀ de 140 mg L⁻¹ pendant 24 h pour les crustacés *Thamnocephalus platyurus* [113].

Les expériences de toxicité aiguë de la carbamazépine (CBZ) avec des organismes aquatiques non-cibles indiquent des CE_{50} de l'ordre de $mg L^{-1}$ [107], ce qui est beaucoup plus élevé que les concentrations trouvées dans les eaux de surface ou des effluents. Cependant, des études physiologiques plus sensibles utilisant des concentrations comparables ou inférieures à celles habituellement détectées dans l'environnement ont montré que la CBZ peut nuire aux espèces exposées.

Martin-Diaz et al. [114] ont placé la moule *Mytilus galloprovincialis* dans des solutions aqueuses de CBZ à des concentrations allant de 0,1 à $10 mg L^{-1}$; ils ont rapporté des effets significatifs sur la biotransformation et la réponse aux antioxydants, ainsi que des niveaux réduits de transcription des gènes codants pour des protéines impliquées dans la résistance aux multi-xénobiotiques (RMX). La CBZ peut donc perturber la physiologie de certains organismes non-cibles, même à de faibles concentrations et des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier de tels effets potentiels.

Contardo-Jara et al. [115] ont étudié l'effet négatif de la CBZ sur les moules de l'espèce invertébrée *Dreissena polymorpha* ; ils ont observé après sept jours que le facteur de bioconcentration était le plus élevé pour les moules exposées aux concentrations les plus faibles de CBZ, avec une concentration tissulaire 90 fois plus élevée. La CBZ a provoqué une augmentation significative dans les branchies du niveau de l'acide ribonucléique messager (ARN_m) codant pour la protéine hsp70 (heat shock protein 70) fabriquée d'habitude dans le cas d'un choc thermique, après une exposition d'une journée, mettant en évidence le potentiel de CBZ à provoquer immédiatement un état de stress et un endommagement présumé des protéines dans les branchies. Après une exposition plus longue, les moules ont accusé des niveaux bas par rétrocontrôle des ARN_m codants pour la protéine hsp70 et l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) dans les branchies, ainsi que ceux codants pour la métallothionéine (MT) et la P-glycoprotéine (P-gp) dans la glande digestive, faisant allusion à un caractère inhibiteur de la CBZ.

Malarvizhi et al. [116] ont étudié le stress enzymatique induit par la CBZ dans les branchies, le foie et les muscles d'une carpe commune, *Cyprinus carpio*. Ils ont conclu que la CBZ modifie les activités des enzymes glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT) et lactate déshydrogénase (LDH) dans divers organes du poisson.

En outre, seules quelques études ont utilisé la bioactivité des algues pour évaluer l'impact éco-toxicologique de la CBZ [107,117]. Un grand nombre d'indicateurs écologiques et d'organismes d'essai ont été proposés dans les études antérieures, dont les algues vertes qui sont très sensibles à la contamination des milieux aquatiques [118]. Ces algues sont considérées comme des indicateurs de la bioactivité en présence des composés tels que les résidus de substances pharmaceutiques (RSP) [117].

Une étude récente menée par Zhang et al. [119] sur l'effet éco-toxicologique de la CBZ sur *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella pyrenoidosa* a montré que la CBZ pourrait inhiber de manière significative la croissance des deux algues dans à peu près tous les groupes de traitement. Ils ont ainsi observé d'après les valeurs trouvées de CE₅₀ que la CBZ avait un effet toxique aigu (< 6 jours) relativement limitée sur *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella pyrenoidosa*, tandis que, les essais chroniques (6 à 30 jours) ont affichés une toxicité plus élevée. La synthèse de la chlorophylle a été presque complètement inhibée par l'exposition à la CBZ. Cependant, les activités de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) dans les tests aigus des deux algues ont été nettement promues. En outre, l'effet exact de la CBZ sur l'environnement reste encore mystérieux puisque les résultats varient considérablement dans les différentes études qui ont abordé son impact toxicologique. Une étude de Cunningham et al. [103] a été menée pour évaluer les risques courus par la santé humaine à cause de la présence de la CBZ dans les eaux de surface de l'Amérique du Nord et en Europe ; ces auteurs ont conclu que la CBZ et ses principaux métabolites ont des marges élevées de sécurité (Margin Of Safety : MOS > 1) et ne devraient pas donc avoir aucun risque appréciable sur la santé humaine via des expositions environnementales. Néanmoins, des études supplémentaires sur des animaux seront nécessaires pour connaître l'effet toxique de ces contaminants sur la santé humaine, ainsi que l'élimination/dégradation de la CBZ des milieux contaminés, y compris l'eau, les eaux usées et les boues d'épuration.

1.4. Dépollution de l'eau

1.4.1. Traitement biologique conventionnel par les boues activées : concepts et limites

Le traitement biologique utilisant les boues activées est de loin, la méthode la plus utilisée dans les stations d'épuration (STEP) des eaux usées dans le but d'éliminer la matière organique polluante de ces eaux. Dans ce qui suit, l'emplacement de ce procédé conventionnel va être d'abord localisé dans la chaîne de traitement des eaux, ensuite les principales voies d'élimination de la matière organique par les boues activées sont montrées, pour finir cette section par une conclusion concernant les limites de cette méthode et le besoin de l'améliorer pour atteindre de meilleures performances.

1.4.1.1. Les boues activées au sein de la chaîne de traitement d'eau

La **Figure 1.14** ci-dessous représente schématiquement la chaîne de traitement d'eau usée urbaine dans une station conventionnelle d'épuration. Si le traitement biologique par des boues activées est le cœur de cette chaîne, il ne faut pas le regarder hors du contexte général en négligeant les étapes antérieures et ultérieures et leurs effets possibles sur la qualité finale de l'eau traitée. Les principales étapes sont donc : le grillage, le dessablage/déshuilage, le traitement primaire, le traitement secondaire biologique, le traitement tertiaire s'il est applicable, la clarification et les traitements parallèles des rejets.

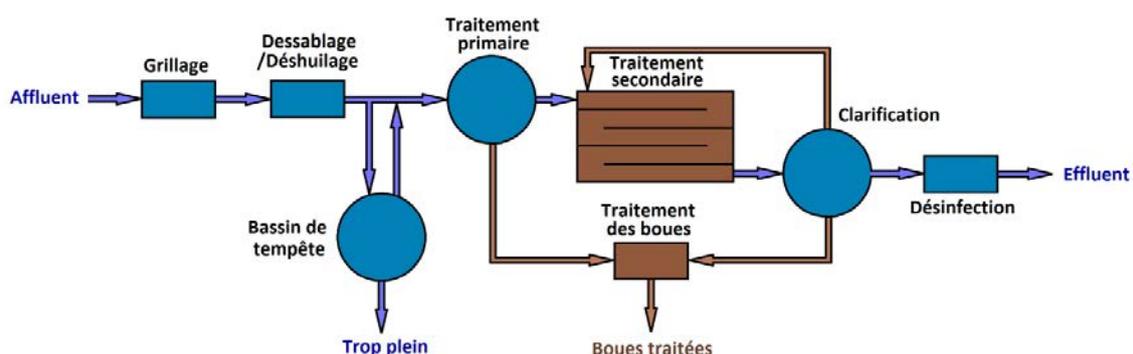


Figure 1.14 Schéma simplifié d'une station d'épuration d'eau usée urbaine
Référence : *Gernaey et al.* [120]

a. Le dégrillage

Cette étape permet de débarrasser les eaux usées de grands objets tels que des étoffes, des papiers, des plastiques ... Le but est de protéger les installations et prévenir les blocages de l'appareillage. Les eaux sont alors canalisées à travers une série de grilles ayant des mailles de plus en plus serrées qui rejettent généralement tout corps ayant une dimension minimale supérieure à 6 mm. Si le maillage se resserre jusqu'à 0,5 mm on parle plutôt d'un tamisage.

b. Le dessablage/déshuilage

Durant cette étape, l'eau circule à travers un canal à une vitesse suffisamment faible pour permettre aux particules solides (essentiellement du sable, de petits cailloux ou morceaux de verre) de sédimenter en bas et permettre aussi aux huiles, aux graisses et tout autre composé qui est moins dense que l'eau et non-miscible avec celle-ci de flotter à la surface. Cependant, la vitesse de l'eau ne doit pas être très faible pour permettre une sédimentation massive dans les canaux du grillage ce qui risque de les boucher. Un bullage d'air à travers l'eau permet d'accélérer la flottation des huiles et des graisses. La phase flottante est séparée par un système qui permet le raclage continu de la surface de l'eau dans le bassin. Dans certaines stations d'épuration, les deux étapes de dessablage et de déshuilage peuvent s'effectuer dans des étapes séparées, dans d'autres on peut se contenter d'un dessablage sans un déshuilage. L'élimination du sable à l'entrée de la STEP permet de diminuer l'usure par abrasion des systèmes de pompage utilisés en aval, alors que la séparation des huiles permet d'améliorer les échanges gazeux à la surface de l'eau traitée.

c. Le traitement primaire

Les sédiments formés dans cette étape sont appelés « boues primaires » et sont pompés continuellement en dehors d'un bassin dit « de la première décantation » pour subir ensuite le traitement des boues. Le traitement primaire de l'eau est donc une simple décantation qui permet de diminuer significativement la turbidité des eaux usées en éliminant jusqu'à 60 % des solides en suspension et environ 30 % des demandes chimiques et biochimiques en oxygène (DCO et DBO).

Le principe de la décantation discrète d'une particule supposée sphérique repose sur l'équilibre de trois forces : (1) le poids qui attire cette particule vers le bas, (2) la poussée d'Archimède exercée par le liquide déplacé qui la pousse vers le haut et (3) la résistance du fluide qui s'oppose à son mouvement (**Annexe 1**). Actuellement, la plupart des nouveaux STEP n'effectuent plus le traitement primaire et poursuivent directement vers le traitement biologique.

d. Le traitement biologique (secondaire)

L'eau usée, ayant subi le traitement primaire, contient toujours des polluants solubles (essentiellement de la matière organique mais aussi des ions minéraux) qui ne décantent pas. Le traitement secondaire biologique à base de boues activées consiste à mettre ces eaux en contact avec un consortium très diversifié de microorganismes (bactéries, champignons, protozoaires, ...) qui vont consommer les substances solubles pour couvrir leurs besoins métaboliques et débarrasser ainsi l'eau de ces polluants.

On distingue trois modes de fonctionnement des boues activées suivant les types métaboliques des microorganismes engagés (**Annexe 2**) :

(1) en mode aérobie, l'oxygène est apporté par aération intensive de l'eau ce qui permet à la biomasse du type métabolique hétérotrophe aérobie stricte ou facultative d'oxyder et de consommer la matière organique comme source de carbone et d'énergie pour former de la nouvelle biomasse et maintenir vivante la biomasse préexistante. D'autre part, la biomasse autotrophe aérobie utilise l'oxygène pour oxyder l'ammoniac en nitrate et produire de l'énergie ;

(2) en mode anoxique, l'oxygène n'est pas apporté et par suite, la biomasse hétérotrophe aérobie/anaérobie facultative continue à utiliser la matière organique mais en remplaçant l'oxygène par du nitrate comme accepteur d'électrons, le réduisant ainsi en diazote ;

(3) en mode anaérobie, il y a ni oxygène ni nitrate ; seule la biomasse hétérotrophe anaérobie stricte ou facultative peut agir en transformant la matière organique en acides gras volatils. Ce mode fermentatif a été nouvellement introduit pour permettre l'élimination des phosphates par voie biologique.

e. La clarification

C'est une deuxième étape de décantation qui permet de séparer l'eau ainsi épurée, des boues activées. Une partie des boues décantées sera récupérée par recirculation vers le bassin du traitement secondaire et les boues excessives (appelées « boues secondaires ») seront sujettes au traitement des rejets. L'eau épurée peut être libérée dans le milieu récepteur après avoir subi une éventuelle désinfection (par du chlore, de l'ozone ou de l'irradiation UV).

f. Les traitements des refus

Les différentes étapes du traitement des eaux usées présentent cinq types de refus, à savoir les refus du grillage, les sables, les huiles, les boues primaires et les boues secondaires. En gros :

- (1) les refus du grillage sont généralement incinérés,
- (2) les sables sont d'abord lavés pour éliminer la matière organique adsorbée qui peut causer de mauvaises odeurs puis utilisés comme matière de remplissage,
- (3) les huiles peuvent être valorisées en tant que source d'énergie
- (4) et les boues primaires et secondaires sont généralement mélangées pour former ce qu'on appelle des « boues mixtes » avant d'être traitées par divers procédés pour les déshydrater et réduire leur volume ou les valorisées en agriculture.

1.4.1.2. Les voies d'élimination des polluants dans les boues activées

On parle d'une biodégradation complète si les produits finaux sont tous minéraux ou d'une biotransformation si certains produits finaux sont toujours organiques. Outre le phénomène biochimique fondamental, trois voies physiques d'élimination contribuent à l'abattement d'un composé à la sortie d'un traitement biologique, ce sont l'échappement des composés volatils vers la phase gazeuse par aération, la adsorption/absorption des composés lipophiles sur/dans les boues et la précipitation des composés faiblement hydrosolubles adsorbés sur les boues en excès [6].

a. L'échappement des composés volatils

Un composé volatil peut s'échapper de l'eau vers l'air surtout lorsque le liquide est fortement aéré dans le bassin de traitement biologique. La volatilité d'un composé peut être estimée à partir de plusieurs constantes physiques caractéristiques ; ce sont principalement sa pression de vapeur saturante P_{vapeur} , sa constante de la loi de Henry H ou son coefficient de solubilité de Bunsen α (**Annexe 3**).

Dans les boues activées, un composé très volatil peut s'échapper facilement dans l'atmosphère surtout lorsque de l'air est injecté dans le bassin aérobie et le bilan masse de ce composé donnera un taux d'abattement élevé. Cependant, il y a pas une « vraie » dépollution parce qu'il y a juste un transfert du polluant de l'eau vers l'air.

b. L'adsorption/absorption des composés lipophiles sur/dans les boues

L'adsorption est l'attachement d'une molécule à la surface d'une phase solide alors que l'absorption est l'entrée d'une molécule au sein d'une phase liquide. Dans le cas des boues activées, ce sont les composés plutôt lipophiles qui vont subir ces deux phénomènes une fois se trouvant en contact avec la phase solide en suspension.

Puisque c'est difficile dans ce contexte d'étudier adsorption et absorption séparément, on parle d'un phénomène de « sorption » et on le quantifie par une constante de distribution K_d définie comme le rapport de la concentration q_e du composé ad/absorbé par unité de masse de la phase ad/absorbante sur la concentration C_e de ce composé restant par unité de volume de la phase liquide à l'équilibre :

$$K_d = \frac{q_e}{C_e}$$

Dans le cas des boues activées, si on note par $[X]$ la concentration de la matière solide en suspension, on peut calculer la proportion ad/absorbée d'une substance p_{sorption} :

$$p_{\text{sorption}} = \frac{K_d[X]}{1 + K_d[X]}$$

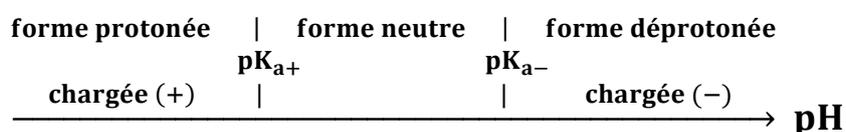
La valeur de K_d varie suivant la qualité de la matière solide en suspension et surtout sa teneur en carbone organique. On définit alors un coefficient de sorption sur carbone organique K_{co} comme le rapport de K_d sur la fraction de carbone organique f_{co} de la matière en suspension :

$$K_{co} = \frac{K_d}{f_{co}}$$

K_{co} est une constante caractéristique de chaque composé sorbé indépendante de la qualité des boues sorbantes. En plus, cette constante peut être facilement corrélée au coefficient de distribution octanol-eau $D_{o/e}$ (lui-même fonction du coefficient de partage $K_{o/e}$ et du pH) pour lequel on se dispose de bases de données et de méthodes d'estimation par des relations quantitatives structure-activité (QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship) :

$\text{Log } K_{co} = a \cdot \text{log } D_{o/e} + b$; a et b étant des coefficients empiriques

$$K_{o/e} = \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{eau}}} ; D_{o/e} = \frac{K_{o/e}}{[1 + 10^{(pK_{a+} - pH)} + 10^{(pH - pK_{a-})}]}$$



Suivant la nature acido-basique du composé, sa distribution entre octanol et eau peut dépendre différemment ou ne pas dépendre de la valeur du pH . Ainsi, les composés acides ($0 < pK_{a+} < 7$; $pK_{a-} > 14$) passent plus facilement dans l'octanol pour des valeurs de pH supérieures à celle de leur pK_{a+} , les composés basiques ($pK_{a+} < 0$; $7 < pK_{a-} < 14$) passent plus facilement dans l'octanol pour des valeurs de pH inférieures à celle de leur pK_{a-} , alors que les composés neutres ($pK_{a+} < 0$; $pK_{a-} > 14$) ont un coefficient de partage indépendant de la valeur de pH .

Dans les boues activées, si un composé est fortement sorbé tout en étant difficilement biodégradable, il va rester adhérent aux boues dont une partie sera recyclée laissant environ 25 % de ce composé dans le bassin du traitement secondaire et les 75 % restant seront éliminés avec les boues secondaires en excès.

Le taux d'abattement calculé pour ce composé à partir de son bilan masse entrée-sortie de la STEP sera très élevé sans avoir une « vraie » dépollution ; d'une part, le polluant a été juste transféré de l'eau vers les solides qui doivent alors subir un traitement postérieur convenable, et d'autre part, le polluant s'accumule peu à peu sur la matière solide dans le bassin d'aération risquant une éventuelle désorption et une libération massive dans l'effluent de la STEP à une concentration plus élevée que la concentration à l'entrée (taux d'abattement négatif).

c. La précipitation des composés faiblement hydrosolubles

Il existe certains composés qui, n'étant pas hydrophobes, montrent une faible solubilité dans l'eau : ce sont généralement des composés ioniques où l'attraction électrostatique entre les ions constitutifs est beaucoup plus forte que l'interaction des molécules d'eau avec chacun des deux ions ; par suite, l'eau n'est capable ni de réaliser la solvataion du composé, ni de rompre la liaison ionique pour ensuite réaliser la solvataion de chaque ion à part. De ce fait, un tel composé précipitera sous forme d'un solide une fois sa concentration dans l'eau atteint une limite supérieure qu'on appelle « solubilité aqueuse » ou « hydrosolubilité » de ce composé. La valeur d'une solubilité dépend fortement de plusieurs facteurs physico-chimiques, à savoir la température, le pH et la force ionique de la solution. Un changement brusque de l'un de ces paramètres peut aboutir à une précipitation massive de certains composés qui seront éliminés avec les boues en excès en se transformant ainsi d'une pollution d'eau à une pollution de sol au cas où les boues sont éliminées par épandage ou utilisées en tant que fertilisants.

d. La biodégradation proprement dite

L'élimination de la matière organique par biodégradation est le phénomène essentiel au cœur du traitement secondaire des eaux usées. Cependant, le principe est simple à expliquer : les microorganismes se trouvant dans les boues activées vont consommer la matière organique se trouvant dans les eaux usées pour couvrir leurs besoins métaboliques, à savoir la production de l'énergie permettant la survie de l'ancienne biomasse et la division cellulaire permettant la formation d'une nouvelle biomasse.

Le processus aux boues activées a été modélisé à plusieurs reprises (« Activated Sludge Model » ASM I, II, III ...): à chaque fois, un aspect supplémentaire (métabolisme de l'azote, du phosphore, ...) a été ajouté sous forme d'une nouvelle série d'équations différentielles ; le système mathématique obtenu doit être « calibré » par des mesures faites au niveau de la STEP et peut être alors résolu numériquement par un logiciel convenable pour prédire le futur fonctionnement de la STEP.

Dans ce qui suit, un modèle simplifié est présenté (**Figure 1.15**). On admet que le bassin du traitement secondaire est un réacteur continu parfaitement agité (« Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR) ») de volume V_R contenant une concentration $[X]$ de biomasse et fonctionnant en régime permanent. Ce réacteur est continuellement alimenté à un débit volumique D par une eau usée contenant une concentration $[S]_0$ d'un substrat générique. À la sortie du réacteur, l'effluent entre dans un clarificateur de volume V_C qui permet la décantation et le recyclage d'une fraction volumique α contenant de la boue décantée (remettre dans le réacteur) [120].

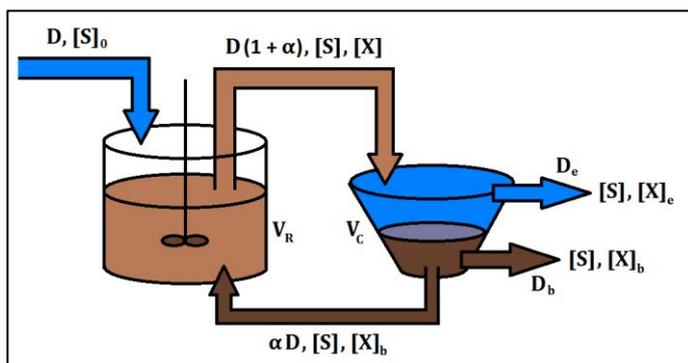


Figure 1.15 Modèle simplifiée d'un procédé de boues activées

- Bilan volumique :

$$D = D_e + D_b$$

- Bilan de la biomasse au niveau du clarificateur :

$$D(1 + \alpha)[X] = (\alpha D + D_b)[X]_b + D_e [X]_e$$

- On définit :

- l'âge des boues θ_b (« Sludge Retention Time (SRT) ») comme le temps nécessaire pour vider le système complètement de boues si leur croissance s'est arrêtée :

$$\theta_b = \frac{[X] (V_R + V_C)}{(D_b [X]_b + D_e [X]_e)}$$

- le temps de séjour hydraulique θ_h (« Hydraulic Retention Time (HRT) ») comme le temps nécessaire pour vider le système complètement d'eau si l'alimentation est coupée :

$$\theta_h = \frac{V_R + V_C}{D}$$

Pour faciliter l'écriture des formules, on définit un « temps de séjour corrigé » θ'_h par :

$$\theta'_h = \frac{\theta_h}{1 + V_C/V_R} \Rightarrow D \theta'_h = V_R$$

- le facteur de concentration des boues :

$$\beta = \frac{[X]_b}{[X]}$$

On aura en combinant toutes ces relations :

$$\theta_b = \frac{\theta_h}{1 - \alpha(\beta - 1)}$$

- Bilan de la biomasse au niveau du réacteur :

$$(\mu - \delta) [X] V_R + \alpha D [X]_b = D (1 + \alpha) [X] \Rightarrow (\mu - \delta)\theta_b = 1 + V_C/V_R$$

μ et δ sont respectivement les constantes de vitesses de croissance et de mortalité de la biomasse supposées suivre des lois de vitesse du premier ordre. Pour faciliter l'écriture des formules, on définit un « âge de boues corrigé » θ'_b par :

$$\theta'_b = \frac{\theta_b}{1 + V_C/V_R} \Rightarrow (\mu - \delta)\theta'_b = 1$$

- Loi de Monod reliant la croissance microbienne μ à la disponibilité du substrat S :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

μ_{\max} est le taux maximal de croissance et K_M est dite « constante de Monod » et qui correspond à la concentration du substrat pour laquelle le taux de croissance atteint la moitié de sa valeur maximale.

On calcule alors la concentration de sortie du substrat $[S]$:

$$[S] = K_M \times \frac{\mu}{\mu_{\max} - \mu}$$

Le taux d'élimination E du substrat S est alors :

$$E = 1 - \frac{[S]}{[S]_0} = 1 - \frac{K_M}{[S]_0} \times \frac{\mu}{\mu_{\max} - \mu} = 1 - \frac{K_M}{[S]_0} \times \frac{1 + \delta \theta'_b}{(\mu_{\max} - \delta) \theta'_b - 1}$$

Si on fait tendre θ'_b vers l'infini, on obtient l'élimination limite maximale :

$$E_{\max} = 1 - \frac{K_M}{[S]_0} \times \frac{\delta}{\mu_{\max} - \delta}$$

- Bilan du substrat au niveau du réacteur :

$$D [S]_0 + \alpha D [S] = U V_R + D (1 + \alpha) [S] \Rightarrow U \theta'_h = [S]_0 - [S] = E [S]_0$$

U est la vitesse d'utilisation du substrat par la biomasse. Il existe plusieurs approches pour modéliser U ; les deux approches les plus populaires sont présentées ici :

- Première approche : $U = k [X] [S]$

La vitesse est supposée suivre une loi de vitesse de constante k et du premier ordre par rapport à X et à S . La concentration en biomasse $[X]$ dans le réacteur est donc :

$$[X] = \frac{1}{k \theta'_h} \times \left[\frac{\mu_{\max} - \mu}{\mu} \times \frac{[S]_0}{K_M} - 1 \right]$$

On peut également exprimer le taux d'élimination E en termes de la concentration en biomasse :

$$E = \frac{k[X] \theta'_b}{1 + k[X] \theta'_b}$$

Cette approche est surtout utilisée lorsque le substrat S est transformé par la biomasse sans contribuer à sa croissance.

- Deuxième approche : $U = (\mu/Y + m) [X]$

Le « rendement en biomasse » Y est la biomasse *formée* par consommation d'une unité de masse du substrat. La « maintenance » m représente une consommation du substrat par la biomasse *préexistante* pour survivre sans qu'il y ait une croissance.

$$[X] = \frac{Y}{\theta'_h} \times \frac{K_M}{\mu_{\max} - \mu} \times \frac{\mu}{mY + \mu} \times \left[\frac{\mu_{\max} - \mu}{\mu} \times \frac{[S]_0}{K_M} - 1 \right]$$

Dans les deux approches, on peut trouver une même valeur critique de μ qui annule $[X]$:

$$\mu_{\text{critique}} = \mu_{\max} \frac{[S]_0}{K_M + [S]_0}$$

Cette valeur correspond à un débit d'entrée très élevé $D_{\text{lessivage}}$ qui aboutit à vider le système de toute biomasse :

$$D_{\text{lessivage}} = (\mu_{\text{critique}} - \delta) V_R$$

1.4.1.3. Capacités limitées des boues activées et amélioration nécessaire

Les calculs présentés ci-dessus sont faits pour un substrat générique S . En réalité, cela n'est qu'une simplification puisque c'est un mélange de plusieurs substances avec des proportions différentes et variables au cours du temps qui arrive dans la station d'épuration. Généralement, on prend la « demande chimique d'oxygène (DCO) » comme le substrat générique et on dimensionne les stations d'épuration pour avoir un taux élevé d'élimination de la DCO ; même la biomasse, les composés azotés et phosphorés sont exprimés en « équivalent-DCO » et les valeurs correspondantes sont utilisées pour faire un bilan d'oxygène nécessaire. Cependant, une bonne élimination de la DCO ne garantit pas une bonne qualité d'eau parce que c'est dans la petite proportion de la DCO non-éliminée où se trouvent généralement les composés organiques bio-récalcitrants ; la grande proportion éliminée (souvent nommée « demande biochimique en oxygène (DBO) ») correspond alors aux substrats carbonés facilement assimilables par les cellules des microorganismes formant la biomasse épuratrice des boues activées.

Malgré les limites bien connues du traitement biologique par de boues activées, ce procédé reste de loin le plus répandu et utilisé à travers le monde ; ceci est probablement dû à sa simplicité, sa mise en œuvre facile et rapide ainsi que les coûts faibles d'implémentation et d'entretien.

Pourtant, l'amélioration de ce traitement par son couplage à d'autres procédés, par des modifications introduites à ses étapes ou par l'ajout de nouvelles étapes paraît actuellement comme une nécessité urgente pour récupérer la qualité détériorée des eaux.

1.4.2. Utilisation des champignons ligninolytiques en dépollution

Les champignons de la pourriture blanche (en anglais « White-Rot Fungi (WRF) ») sont un type de champignons capables de dégrader la lignine (d'où leurs dénominations de « champignons ligninolytiques (CLL) »), un composé naturel complexe formant la couverture rigide qui protège le bois tendre, et ceci en utilisant leurs enzymes extracellulaires non spécifiques.

En plus de l'application directe de préparations de cellules fongiques entières, un procédé alternatif découplant les stades de la croissance fongique et de la bioremédiation, consiste à utiliser l'extrait extracellulaire de la culture du champignon (contenant l'enzyme brute) ou des enzymes purifiées. Les CLL et leurs enzymes modifiantes de la lignine (en anglais « Lignin Modifying Enzymes (LME) ») ont été signalés pour dégrader des polluants qui ne se prêtent pas à la dégradation bactérienne tels que les colorants azoïques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les chlorophénols, les nitrotoluènes et les diphényles polychlorés [121,122].

Plusieurs expériences récentes menées en mode batch ont montré une excellente élimination de micropolluants organiques (MPO) aussi par des cultures de cellules entières de CLL que par leur LME [123-125]. Par exemple, le traitement par de CLL a été rapporté pour réaliser la dégradation efficace d'une large gamme de PPSP et de perturbateurs endocriniens, y compris le diclofénac, la carbamazépine, le naproxène et 17 α -éthynylœstradiol [123-125], tandis que la dégradation bactérienne de ces composés a été caractérisé par des constantes cinétiques de biodégradation négligeables [126].

La performance d'élimination de MPO d'un système à champignon ligninolytique (CLL) dépend de divers facteurs, dont la structure chimique du MPO, les espèces de champignons et leurs enzymes modifiantes de la lignine (LME) spécifiques, le milieu de culture, et des méthodes pour améliorer la capacité de la dégradation fongique, mais l'interdépendance de ces facteurs n'est pas encore systématiquement documentée.

Dans leur revue de synthèse de 2013, Yang et al. [127] ont donné une analyse critique de la capacité des CLL et de leur LME à éliminer les MPO.

1.4.2.1. Champignons ligninolytiques et leurs systèmes enzymatiques

Les CLL sécrètent trois classes principales de LME : les lignine-peroxydases (LiP), les peroxydases manganèse-dépendante (MnP) et la laccase [122].

La LiP, connue sous le nom de ligninase ou diarylopropane oxygénase, a été d'abord isolée en 1983 à partir du champignon *Phanerochaete chrysosporium* [128]. La LiP a montré alors la capacité à éliminer une variété de composés aromatiques récalcitrants y compris des composés aromatiques et phénoliques polycycliques [122].

La MnP est une enzyme de nature glycoprotéique et hémique, qui a été d'abord isolée également à partir de *Phanerochaete chrysosporium* et qui a été observée pour catalyser l'oxydation de plusieurs phénols monoaromatiques et colorants aromatiques [128] ; cependant ces réactions nécessitent la présence du manganèse divalent et de certains types de tampons.

Les laccases (ou benzènediol : oxygène oxydoréductase) sont des enzymes contenant du cuivre qui peut oxyder divers produits chimiques tels que les diphénols, les monophénols méthoxy-substitués et les amines aromatiques et aliphatiques [122].

L'action catalytique de la laccase se réalise via la réduction d'O₂ en H₂O, ce qui entraîne l'oxydation des substrats donneurs d'hydrogène. Théoriquement, la laccase peut oxyder tout substrat avec des caractéristiques similaires au diphénol. Le potentiel d'oxydoréduction d'une laccase spécifique peut varier en fonction de la source fongique.

Certains laccases fongiques ayant des potentiels d'oxydoréduction assez élevés peuvent également oxyder les monophénols, alors que certaines se sont révélées être capables d'oxyder d'autres groupes de produits chimiques tels que les produits carbonylés, les benzène-thiols et les alcools benzyliques [129].

Il est intéressant de noter que même si une espèce fongique peut potentiellement sécréter les trois enzymes, à savoir, la laccase, la MnP et la LiP, une souche particulière pourrait ne pas les sécréter toutes. Par exemple, bien que *Trametes versicolor* a été associée à l'ensemble des trois enzymes [130,131], la souche ATCC 7731 sécrète principalement laccase [132]. La sécrétion des enzymes spécifiques peut également dépendre des conditions de culture, y compris la composition du milieu de croissance. En outre, les CLL sécrètent des médiateurs de faible poids moléculaire qui élargissent la gamme de composés, qu'ils sont capables de dégrader [133]. En dehors des enzymes extracellulaires, des systèmes enzymatiques intracellulaires, tels que le cytochrome P450, ont été rapportés pour jouer un rôle important dans la élimination de certains MPO [134].

1.4.2.2. Effet des propriétés du MPO sur son élimination

L'efficacité de l'élimination des MPO par un traitement aux champignons ligninolytiques (CLL) varie largement d'un composé à un autre. Les propriétés physico-chimiques des molécules cibles semblent être une des principales raisons pour une telle variation : certains MPO sont facilement biosorbés par raison de leur forte hydrophobie, certains ont des caractéristiques moléculaires qui les rendent facilement biodégradable par les CLL, tandis que d'autres sont résistants au système enzymatique des CLL par raison de certaines caractéristiques de leur structure moléculaire.

La présence de groupes fonctionnels attracteurs d'électrons (GAE) tels qu'une fonction amide ($-CONR_2$) ou carboxylique ($-COOH$), un halogène ($-X$) ou un groupe nitro ($-NO_2$) génère un déficit en électrons et donc rend les composés moins sensibles au catabolisme oxydatif. Du côté opposé, les groupes fonctionnels donateurs d'électrons (GDE) tels qu'une fonction amine ($-NH_2$), hydroxyle ($-OH$) ou alcoxy ($-OR$), un groupe alkyle ($-R$) ou acyle ($-COR$), rendent les molécules plus sujettes à l'attaque électrophile par les oxygénases des bactéries aérobies [135].

En ligne avec ce concept, le **Tableau 1.2** présente les MPO largement étudiés et représentatifs en quatre catégories en se basant sur la relation entre leurs structures chimiques (GAE et/ou GDE) et l'élimination par les champignons ligninolytiques.

a. MPO ayant des GDE forts

En général, les composés avec des groupes donneurs d'électrons forts tels que des groupes hydroxyle (- OH) et amine (- NH₂) ont été largement et efficacement éliminés. Par exemple, les CLL ont démontré leur pouvoir à réaliser l'élimination élevée de composés phénoliques tels que le nonylphénol [136,137], le bisphénol A [131,132,138-140], le bisphénol B, et le bisphénol F [141], ainsi que les hormones [131,142], qui ont tous des groupe(s) hydroxyle(s) (- OH) dans leur structure. L'effet de la fonction amine comme un GDE a été discuté plus loin à la section **§1.4.2.2. (c)**.

Le nonylphénol est un agent tensio-actif qui a été observé pour être facilement éliminé de la phase aqueuse par traitement aux champignons ligninolytiques (CLL). Plusieurs études, où la concentration initiale de nonylphénol fut variée dans une large gamme (allant de 2,9 à 3000 µg L⁻¹), ont rapporté des efficacités d'élimination élevées (allant de 85 à 100 %) par diverses espèces de champignons dont *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* et *Pycnoporus cinnabarinus* [131,136,137]. Ainsi, le bisphénol A et d'autres dérivés de bisphénols (par exemple, le bisphénol B et le bisphénol F) ont aussi été efficacement éliminés.

Au cours de plusieurs recherches indépendantes utilisant une plage de concentrations allant de 5 à 500 µg L⁻¹, plus de 95 % du bisphénol A ont été éliminés dans la majorité de ces études [124,131,132,139,141,143-145]. Le bisphénol B et de bisphénol F ont été aussi éliminés de plus de 91 % en utilisant une plage de concentration de 188 à 299 µg L⁻¹ [145]. Il est à noter que la présence et la nature des autres groupes substituants attachés sur la structure cyclique du MPO contenant un groupe - OH peuvent affecter l'efficacité d'élimination de ce MPO.

Par exemple, Cajthaml et al. [131] ont montré qu'il n'y a pas d'élimination de nonylphénol linéaire (4-*n*-nonylphénol) par *Trametes versicolor* alors qu'un nonylphénol ramifié (4-nonylphénol) a été complètement éliminée dans les mêmes conditions. Le 17 β -œstradiol et le 17 α -éthynylœstradiol ont essentiellement la même structure chimique, à l'exception du groupe éthyne (CH \equiv C -) présent dans le 17 α -éthynylœstradiol, ce qui conduit à une dégradation bactérienne médiocre de ce dernier [146].

Cependant, le 17 β -œstradiol et le 17 α -éthynylœstradiol ont été tous les deux rapportés pour être efficacement dégradés par différentes espèces de champignons ligninolytiques (CLL), y compris *Bjerkandera adusta*, *Dichomitus squalens*, *Irpex lacteus* et *Pycnoporus cinnabarinus* [131,147].

b. MPO ayant des GAE forts

Les composés contenant de forts GAE sont difficiles à éliminer (**Tableau 1.2**). Un exemple classique d'un MPO très résistant à la dégradation bactérienne est la carbamazépine [126,146] contenant un groupe amide (azépine) qui est un GAE fort. Marco-Urrea et al. [148] ont rapporté des taux d'élimination faibles voire nuls de la carbamazépine par des espèces de CLL telles que *Irpex lacteus* (2 %) et de *Phanerochaete chrysosporium* (0 %) où une concentration initiale de 10 mg L⁻¹ du composé a été mise en jeu. Le traitement en phase solide par CLL a également été montré précédemment pour être inefficace dans l'élimination de la carbamazépine (environ 50 %) [149]. Cependant, Tran et al. [150] ont observé 80 % d'élimination par *Trametes versicolor*, indiquant la différence de performance des différentes espèces de CLL, qui sera examinée plus tard à la section §1.4.2.3.

c. L'effet combiné de GDE et GAE

Il convient de noter que dans les études précédentes certains des MPO contenant à la fois des GDE et des GAE ont été signalés pour être facilement dégradables, alors que d'autres MPO ont montré une assez pauvre élimination (**Tableau 1.2**).

Pour les MPO contenant à la fois des GDE et des GAE, l'influence globale de ces groupes fonctionnels et en particulier leurs effets opposés sur la biodégradabilité du MPO en question est complexe et nécessite généralement une étude judicieuse portant sur l'application simultanée de la relation quantitative entre activité et structure (QSAR) et de l'interprétation biochimique [135]. Néanmoins, certaines conclusions générales peuvent être tirées de la littérature abondante qui a été examinée par Yang et al. [127].

Le tétrachlorobisphénol, qui est un composé phénolique (contenant-OH, un GDE fort), a été signalé pour être bien dégradé malgré ses groupes -Cl (GAE forts et toxiques) se trouvant sur le cycle aromatique [145].

L'agent antibactérien triclosan a été récemment rapporté pour être un perturbateur endocrinien potentiel. Même si c'est un composé chloré, le triclosan a également été rapporté pour être bien dégradé par la laccase [131,151], probablement en raison de la présence de GDE représentatifs à la fois des éthers et des phénols dans sa structure. Cajthaml et al. [131] a étudié plusieurs espèces différentes de champignons ligninolytiques (CLL) (*Pycnoporus cinnabarinus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete magnoliae*, *Pleurotus ostreatus*), dont la plupart ont été capable d'éliminer plus de 85 % de triclosan à une concentration initiale de 2,5 mg L⁻¹.

Le naproxène, qui contient un groupe éther (GDE), et un groupe carboxyle (GAE), a été annoncé dégradable par des préparations de cellules entières de plusieurs espèces fongiques, y compris *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* et *Phanerochaete chrysosporium* [125,133,150]. L'ibuprofène, qui contient un groupe méthyle (GDE), mais aussi un groupe carboxyle, a également été rapporté pour être aussi éliminé (80 à 100 %) par les CLL à des concentrations initiales d'ibuprofène allant de 0,01 à 10 mg L⁻¹ [125,148,150].

En outre, les antibiotiques sulfonamides tels que le sulfaméthoxazole et la sulfaméthazine qui possèdent les groupes sulfonamide (GAE) et amine (GDE), ont été éliminés efficacement par un traitement par CLL [125,149,152]. L'élimination complète de ces composés a été obtenue pour différentes concentrations initiales allant de 1 à 10 mg L⁻¹ par différentes espèces de CLL dans les essais de traitement en mode batch [125,149].

Le diclofénac, un composé pharmaceutique biologiquement persistant contenant une fonction amine (GDE), une fonction carboxylique et un atome de chlore (GAE), a été également rapporté pour être efficacement dégradé par le traitement par champignons ligninolytiques (CLL) (100 %) sur une plage de concentration de 0,01 à 5 mg L⁻¹ [76,125,132,150,153,154]. En comparant le temps nécessaire à l'élimination complète des composés mentionnés ci-dessus, il est intéressant de noter que le sulfaméthoxazole et la sulfaméthazine ont été rapportés pour être entièrement éliminés dans deux semaines, tandis que les substances de type bisphénol ont été rapportés pour être éliminés dans quatre jours [125,138,149]. L'élimination plus rapide des composés de type bisphénol peut être attribuée à l'existence d'un fort GDE (groupe -OH) dans leurs structures. D'autre part, en fonction des espèces de champignons et de les types de ses enzymes et la concentration ajoutée du composé, l'élimination de la diclofénac pourrait requérir de quelques heures [76,150,153,154] jusqu'à deux semaines [125].

Tableau 1.2 Exemples représentatives des catégories de micropolluants organiques.
(Selon la présence de groupes donneurs ou attracteurs d'électrons et leur efficacité d'élimination)

Micropolluants organiques (MPO)	Réf.
<i>Catégorie 1: composés ayant des GDE et montrant une efficacité d'élimination principalement élevée</i>	
Nonylphénol	[136,137]
Bisphénol A	[131,138,139]
Bisphénol B	[141]
Bisphénol F	[141]
Œstrone (E1)	[134]
17 α -Ethinylœstradiol (EE2)	[155]
Dibutylphthalate	[140,156]
<i>Catégorie 2: composés ayant des GAE (en absence de fort GDE) et montrant une efficacité d'élimination principalement faible</i>	
Carbamazépine	[149,150,155]
<i>Catégorie 3: composés ayant simultanément des GDE et des GAE et montrant une efficacité d'élimination principalement élevée</i>	
Triclosan	[131]
Sulfaméthoxazole	[125,152]
Sulfaméthazine	[149]
Diclofénac	[76,150,154]
Ibuprofène	[125,150,155]
Naproxène	[125,133,150]
Tetrachlorobisphénol A	[145]
<i>Catégorie 4: composés ayant simultanément des GDE et des GAE et montrant une efficacité d'élimination principalement faible</i>	
Fluoxétine	[125,157]
Acide clofibrique	[150,155]
Terbuthylazine	[130]
Diuron	[130,156]
Atrazine	[130]
Méthoxychlore	[158]
Métalaxyl	[130]

Certains MPO contenant à la fois de GDE et de GAE peuvent montrer un mauvais taux d'élimination par le traitement par champignons ligninolytiques (CLL) : c'est le cas par exemple de la fluoxétine [125,157], l'acide clofibrique [148,150], la terbuthylazine, le métalaxyl, l'atrazine [130] et le diuron [130,156]. Rodarte-Morales et al. [125] ont rapporté que les CLL *Bjerkandera adusta*, *Bjerkandera* sp. et *Phanerochaete chrysosporium* étaient en mesure d'éliminer la fluoxétine seulement aux taux de 24, 44 et 18 %, respectivement après deux semaines.

Eibes et al. [157] ont utilisé les peroxydases polyvalents disponibles dans le commerce préparées à partir de *Bjerkandera adusta* qui ont juste éliminé 10 % de 2,5 mg L⁻¹ de fluoxétine.

Des taux d'élimination négligeables ou faibles (allant de 0 à 48 %) de l'acide clofibrique ont été observés par des traitements utilisant plusieurs souches de CLL [148]. La terbuthylazine est seulement partiellement éliminée (jusqu'à environ 40 %) par plusieurs espèces (*Auricularia auricola*, *Agrocybe semiorbicularis*, *Flammulina velupites*, *Pleurotus ostreatus* et *Phanerochaete velutina*) lorsqu'une solution liquide nutritive basale a été utilisée comme milieu de croissance.

Quatre pesticides: l'atrazine, le métalaxyl [130] le diuron [130,156] et le méthoxychlore [158] ont été signalés pour être récalcitrants (< 50 % de l'élimination) vis-à-vis les traitements par CLL. Torres-Duarte et al. [156] expliquent que la raison de la faible élimination de ces pesticides halogénés était l'absence d'une forte GDE comme des groupes phénoliques ou des amines aromatiques, et la présence d'un GAE fort (Cl⁻). Cependant, Hai et al. [159] ont observé que les cultures mixtes de bactéries et de champignon peuvent éliminer efficacement (100 %) l'atrazine, alors que le champignon seul, ou les bactéries seules ne pouvaient éliminer ce composé, ce qui suggère que les bactéries et les champignons ont adopté de différentes mais complémentaires voies métaboliques pour l'atrazine.

d. L'hydrophobie du MPO

Les études relatives à des boues activées à composante bactérienne dominante ont démontré que l'hydrophobie joue un rôle important en termes de biosorption du MPO [126].

Il est intéressant de noter que plusieurs MPO, qui ont été rapportés pour être efficacement éliminés par un traitement aux cellules entières de champignons ligninolytiques (CLL), tel que le bisphénol A, le bisphénol B, bisphénol F, tétrachlorobisphénol A, l'œstrone, 17 α -éthynylœstradiol, le triclosan et le nonylphénol [131,139,142,145,160], possèdent une hydrophobie importante ($\log K_{o/e} > 3,2$).

Cependant, une omission notable dans la plupart des études disponibles c'est d'avoir principalement rapporté l'élimination du MPO dans la phase aqueuse sans avoir évalué l'étendue de la biosorption, ce qui rend difficile d'évaluer la contribution relative de la biodégradation et de la biosorption à l'élimination globale des MPO très hydrophobes. Yang et al. [132] ont mesuré séparément biosorption et biodégradation, et ont rapporté que bien que la biosorption initiale était évidente, la biodégradation est le mécanisme principal d'élimination du bisphénol A et du diclofénac de la phase aqueuse, ces deux composés étant significativement hydrophobes sous les conditions testées de pH acide.

Il est intéressant de noter que l'élimination du méthoxychlore dans une autre étude [158] n'était pas aussi élevée que le bisphénol A et le diclofénac dans l'étude de Yang et al. [132], bien que le méthoxychlore est sensiblement hydrophobe ($\log K_{o/e}$ est de 5,07 à pH 5) [158], ce qui indique qu'une partie de la molécule du méthoxychlore peut être adsorbé sur la biomasse, mais la structure résistante en outre empêcherait la biodégradation. D'autre part, certains composés ayant de faibles valeurs de $\log K_{o/e}$ ont montré des taux élevés d'élimination, par exemple, le sulfaméthoxazole [125,149], l'ibuprofène [125,148,150], le naproxène [125,133,150,161,162] et le citalopram [125,163].

En particulier, ces composés possèdent une amine (-NH₂) ou un hydroxyle (-OH) dans leurs structures, des GDE qui, selon la littérature examinée, apparaissent conduire à des composés plus sensibles au traitement fongique. Comme prévu, les composés ayant une valeur basse de $\log K_{o/e}$ ainsi qu'une structure résistante comme la carbamazépine, la fluoxétine, l'acide clofibrique et l'atrazine [130,148,157,164] montrent des taux d'élimination bas et/ou variables selon les espèces fongiques utilisées. Une discussion sur les mécanismes d'élimination est détaillée dans la section **§1.4.2.6**.

1.4.2.3. Effet des espèces fongiques

Différentes espèces de champignons ligninolytiques (CLL) ont été testées pour l'élimination des MPO dans les études précédentes. Les performances de ces différentes espèces à l'élimination du même MPO peuvent varier en fonction des différents systèmes d'enzymes portés par les différentes espèces de champignons. Le **Tableau 1.3** présente les données comparatives des taux d'élimination de certains MPO fréquemment étudiés par de différentes espèces de champignons (à cellules entières) afin de faciliter la discussion critique.

Plusieurs études ont examiné la performance d'élimination des MPO par *Trametes versicolor*, qui est également connu comme *Coriolus versicolor* [130,165]. *Trametes versicolor* sécrète généralement trois types d'enzymes : la laccase, la LiP et la MnP, mais la laccase peut être prédominante dans certaines souches. Les résultats présentés montrent, à certaines exceptions près, que *Trametes versicolor* peut aboutir à l'élimination élevée de toutes les quatre catégories de MPO présentées dans le **Tableau 1.2**, en particulier certains des composés très résistants tels que la carbamazépine, le diuron et l'acide clofibrique [125,148,150]. Cependant, tous les composés ne peuvent pas être efficacement éliminés par *Trametes versicolor*. Ainsi, le composé résistant métalaxyl a été faiblement éliminé par le traitement aux cellules entières [130,131].

Certaines études ont rapporté l'effet du milieu de croissance ou de la matrice sur l'efficacité de l'élimination. *Trametes versicolor* fournit de meilleures performances dans des milieux aqueux plutôt que sur des matrices solides [149]. Le diclofénac, l'ibuprofène et le naproxène ont été complètement éliminés dans des milieux liquides [148,150], mais ne sont que partiellement disparus (64, 75 et 47 %, respectivement) lors du traitement de boues solides [149].

Il est à noter que les données provenant de différentes études portant sur la capacité des CLL à éliminer des MPO doivent être très délicatement comparées parce que les conditions expérimentales de ces études pourraient être différentes. Toutefois, les données compilées dans le **Tableau 1.3** révèlent, en général, une meilleure efficacité de *Trametes versicolor* comparé aux autres espèces testées.

Par exemple, *Bjerkandera adusta* possède une suite d'enzymes similaire à celle de *Trametes versicolor*. Cependant, contrairement à *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* a été rapporté pour aboutir à une faible élimination du bisphénol A et du diuron [131,156]. Certains composés comme la carbamazépine [150], l'atrazine, le diuron, la terbuthylazine [130] et l'acide clofibrique [153], qui étaient résistants à d'autres espèces, ont été significativement (plus de 60 %) enlevé par *Trametes versicolor*.

Marco-Urrea et al. [148] ont rapporté plus de 80 % d'élimination de l'acide clofibrique d'une solution de 10 mg L⁻¹ par *Trametes versicolor* (ATCC 42530), comparés à seulement 45 % ou moins atteint par *Phanerochaete chrysosporium*.

Tran et al. [150] ont observé une élimination élevée de la carbamazépine (80 %) par *Trametes versicolor*, tandis que d'autres espèces telles que *Irpex lacteus* et *Phanerochaete chrysosporium* ont seulement atteint moins de 50 % d'élimination [148]. *Trametes versicolor* a montré une élimination significativement meilleure de l'atrazine, du diuron et de la terbuthylazine (plus de 60 %) [130] par rapport à celle (< 40 %) par d'autres espèces (*Dichotomitus squalens* et *Phanerochaete velutina*) [130,156], ce qui peut suggérer une action synergique des trois enzymes dans le cas de *Trametes versicolor*.

Tableau 1. 3 Taux d'élimination des MPO (%) en fonction des différentes espèces fongiques

	Espèces Fongiques											
	<i>Trametes versicolor</i> (Laccase, LiP, MnP)				<i>Bjerkandera adusta</i> (Laccase, LiP, MnP)				<i>Irpex lacteus</i> (Laccase, MnP)			
Micropolluants organiques	%	mg L ⁻¹	durée	Réf.	%	mg L ⁻¹	durée	Réf.	%	mg L ⁻¹	durée	Réf.
Carbamazépine	76-80	0,01-0,05	1-2 j	[133,150]	100	1,00	14 j	[125]	2	10,0	7 j	[148,162]
Triclosan	15	2,50	14 h	[131]	96	2,50	14 h	[131]	92	2,50	14 h	[131]
Naproxène	100	0,01-10,0	6 h-2 j	[150,162,166]	100	1,00	1 j	[125,161]				
Diclofénac	100	0,01-10,0	30 min-2 j	[132,149,150,167]	100	1,00	7 d	[125]				
Ibuprofène	100	0,01-10,0	2-7 j	[148-150]	100	1,00	14 j	[125,161]	100	10,0	7 j	[148]
Dibutylphthalate	100	28,0	6 j	[140]	85	28,0	6 j	[140]				
Nonylphénol	100	2,50	14 h	[131]	100	2,50	14 h	[131]	100	2,50	14 h	[131]
4-Nonylphénol	0	2,50	14 h	[131]	81	2,50	14 h	[131]	100	2,50	14 h	[131]
Bisphénol A	100	2,50	14 h	[131]	20	2,50	14 h	[131]	100	2,50	14 h	[131]
17 α-éthynylœstradiol	100	10,0	14 j	[160]	100	10,0	14 j	[160]	100	10,0	14 j	[160]
Diuron	99	10,0	42 j	[130]	31-47	10,0	42 j	[156]				
Atrazine												
Métalaxyl	23-44	10,0	42 j	[130,158]								
Terbutylazine	63	10,0	42 j	[130]								
Acide clofibrique	75-97	0,01-10,0	2-7 j	[148,150]					21	10,0	7 j	[148]

Suite Tableau 1. 3 Taux d'élimination des MPO (%) en fonction des différentes espèces fongiques

	Espèces Fongiques											
	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Laccase, MnP)				<i>Dichotomitius squalens</i> (Laccase, MnP)				<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (LiP, MnP)			
Micropolluants organiques	%	mg L ⁻¹	durée	Réf.	%	mg L ⁻¹	durée	Réf.	%	mg L ⁻¹	durée	Réf.
Carbamazépine	100	0,035	7 j	[134]					0	10,0	7 j	[148]
Triclosan												
Naproxène									100	1,00	14 j	[125,161]
Diclofénac									100	1,00	14 j	[125,161]
Ibuprofène									70-88	10,0	7 j	[125,148,161]
Dibutylphthalate												
Nonylphénol	100	2,50	14 h	[131]	100	2,50	14 h	[131]	100	2,50	14 h	[131]
4-Nonylphénol	100	2,50	14 h	[131]	100	2,50	14 h	[131]	100	2,50	14 h	[131]
Bisphénol A	100	2,50	14 h	[131]	100	2,50	14 h	[131]	3	2,50	14 h	[131]
17 α-éthynylœstradiol	100	10,0	14 j	[160]	100	10,0	14 j	[160]	38	10,0	14 j	[160]
Diuron	12	10,0	42 j	[130]	21	10,0	42 j	[130]				
Atrazine	58	10,0	42 j	[130]	25	10,0	42 j	[130]	86	10,0	42 j	[130]
Métalaxyl	10	10,0	42 j	[130]	10	10,0	42 j	[130]				
Terbutylazine	31	10,0	42 j	[130]	52	10,0	42 j	[130]				
Acide clofibrique									0-24	10,0	7 j	[148]

1.4.2.4. Élimination des micropolluants organiques par les enzymes modifiantes de la lignine extracellulaires

a. Effet des types des enzymes

En plus de l'approche à cellules entières de champignons ligninolytiques (CLL), l'élimination des micropolluants organiques (MPO) a été étudiée en employant soit de l'extrait brut de la culture fongique [150], soit des enzymes purifiées [124]. Afin de faciliter la comparaison critique, le **Tableau 1.4** résume les informations disponibles en ce qui concerne l'élimination de MPO par traitement par différentes enzymes fongiques individuelles.

Les études portant sur l'application de solutions de laccase purifiées ou commerciales révèlent que ces solutions peuvent dégrader efficacement des structures phénoliques tels que le bisphénol A, le triclosan, le nonylphénol, l'œstrone, et le 17 α -éthynylœstradiol [144,163,168–170]. Cependant, certaines structures complexes comme la carbamazépine et l'acide clofibrique sont résistants à la laccase [150]. Des préparations de LiP à partir de *Phanerochaete chrysosporium* ont été signalées pour éliminer efficacement le diclofénac [154], tandis que d'autres composés, à savoir le bisphénol A [171] et le 17 β -œstradiol [172] qui se prêtent à un traitement par la laccase, ne sont pas très bien éliminés par la LiP. Une solution de MnP pourrait dégrader des MPO similaires à ceux que dégrade la laccase, par exemple, des composés phénoliques (comme le bisphénol A) [139,141], et des hormones (comme le 17 β -œstradiol, le 17 α -éthynylœstradiol, la génistéine et l'œstrone) [142,147,169]. En outre, la MnP a démontré une plus grande capacité à dégrader le méthoxychlore (69 %) que la laccase et la LiP (23-28 %) [158]. Les peroxydases de raifort ont aussi été rapportées pour éliminer les œstrogènes, y compris le 17 β -œstradiol, l'œstriol et le 17 α -éthynylœstradiol [168].

Tableau 1. 4 Taux d'élimination des micropolluants organiques (%) en fonction des différents types d'enzymes

Micropolluants organiques	Types d'enzyme											
	Laccase				LiP				MnP			
	%	mg L ⁻¹	durée	Réf.	%	mg L ⁻¹	durée	Réf.	%	mg L ⁻¹	durée	Réf.
Carbamazépine	37	0,01	48 h	[150]	<10	5	2 h	[154]	14	4,7	24 h	[123,173]
Triclosan	90	144	24 h	[174]								
Naproxène	100	0,01	48 h	[150]								
Diclofénac	65-100	0,01	348 h	[76,150]	100	5	2 h	[154]				
Ibuprofène	38	0,01	48 h	[150]								
Acide clofibrique	20	0,01	48 h	[150]								
Nonylphénol	100	22,0	1 h	[170]								
Bisphénol A	59-100	0,50-27,0	1-3 h	[124,144,174]	50	22	8 h	[175]	100	50-91	11 h	[138,158]
Œstrone	64-100	5,00-27,0	1-8 h	[76,142,168,169]					100	5	8 h	[142]
17β-œstradiol	100	0,01-5,00	1-8 h	[76,147,168,169]	39	2,2	1 h	[172]	100	2,96	1 h	[147]
17α-éthynylœstradiol	100	2,96	1 h	[147]	41	22	8 h	[175]	100	2,96	1 h	[147]
Méthoxychlore	23	34,5	24 h	[158]	28	34,5	24 h	[158]	65	34,5	24 h	[158]

b. Effet de l'addition de médiateurs d'oxydoréduction

Les médiateurs sont des composés de faibles poids moléculaires qui jouent le rôle d'une « navette pour électrons » entre l'enzyme oxydant et les composés cibles, ce qui permet à une plus large gamme de composés d'être dégradés par la laccase et d'améliorer le degré d'oxydation de composés.

Plusieurs études ont démontré une amélioration des taux d'élimination des micropolluants organiques (MPO) par l'addition ou la présence de médiateurs. Le naproxène [133,162] et le triclosan [174] ont été éliminés seulement par 10 et 50 %, respectivement, par une préparation de laccase, cependant, l'addition du 1-hydroxybenzotriazole (HBT) a amélioré l'élimination jusqu'aux taux de 95 % [133] et de 90 % [176], respectivement. La présence de Tween 80 à titre de médiateur dans la solution d'essai a permis d'augmenter l'élimination de 0 à 65 % lorsque le méthoxychlore à 10 mM a été traité par une solution de MnP [158].

Lloret et al. [76] ont observé une amélioration de l'efficacité d'élimination du diclofénac et de l'œstrone (de 65 à 95 % et de 64 à 82 %, respectivement) en présence de l'HBT. En comparaison avec l'élimination négligeable par le traitement à la laccase seule, Hata et al. [173] ont rapporté 22 % d'élimination de la carbamazépine par un système laccase-HBT. Toutefois, ils ont noté plus de 90 % de baisse de l'activité de la laccase dans seulement 8 h. En ajoutant de façon répétitive de la laccase et du HBT au mélange de réaction, toutes les 8 h, ils ont atteint 60 % d'élimination dans les 48 h [173].

La capacité d'un certain médiateur à améliorer la dégradation est spécifique au composé. Par exemple, dans le cas de triclosan, l'addition du syringaldéhyde ou du (2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-yl)-oxyle (TEMPO) à la solution de laccase dérivée d'une culture de *Trametes versicolor* a donné lieu à une moins bonne performance que dans la solution sans médiateur [174]. En revanche, la syringaldéhyde était plus efficace dans l'amélioration de la dégradation du sulfaméthoxazole que l'HBT [177].

Weng et al. [178] ont testé six médiateurs différents et ont signalé l'élimination de plus de sulfadiméthoxine et de sulfamonométhoxine par la solution laccase-acide violurique qui présentait le potentiel d'oxydoréduction le plus élevé.

Une amélioration insignifiante a été observé après l'addition de quelques médiateurs tels que l'alcool vératrylique et le 2,2'-azino-bis-(3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) sur l'élimination de certains composés résistants, tels que la carbamazépine [150,154] et l'acide clofibrique [150], et d'autres facilement dégradables par la laccase, tels que le diclofénac [150,154], l'œstrone [76,168] et 17 β -œstradiol [76,147,168] ; Toutefois, l'HBT a été signalé pour influencer positivement l'efficacité de l'élimination de la plupart de ces composés par la laccase.

Il est intéressant de noter que l'amélioration de l'efficacité d'élimination du 17 β -œstradiol par addition de l'HBT a été seulement produite quand l'activité de la laccase dans le milieu d'essai était faible (inférieure à 20 UE mL⁻¹) [169], il n'y avait pas de différence significative du taux d'élimination lorsque l'activité laccase ait atteint 20 UE mL⁻¹.

c. Effet de l'immobilisation de l'enzyme

L'immobilisation de l'enzyme modifiante de la lignine (LME) sur des supports solides vise à renforcer son potentiel d'utilisation industrielle répétée [163]. L'immobilisation se traduit généralement par la stabilisation de l'enzyme contre la dénaturation thermique et chimique et par des modifications du comportement cinétique. Les approches de l'immobilisation de la LME comprennent des méthodes chimiques et des méthodes physiques. Les méthodes chimiques sont notamment : (1) l'attachement de l'enzyme à la matrice par des liaisons covalentes, et (2) la réticulation de l'enzyme par des réactifs multifonctionnels [179,180]. Les méthodes physiques sont : (1) le piégeage des molécules d'enzyme à l'intérieur d'une fibre creuse poreuse, en fibres filées à l'intérieur d'une matrice de gel insoluble et/ou (2) la capture de l'enzyme à l'intérieur d'une micelle inverse.

Le **Tableau 1.5** met en évidence les efficacités d'élimination des micropolluants organiques par des LME après différentes méthodes d'immobilisation. Une comparaison directe de la performance des différents supports ou techniques d'immobilisation en se basant sur le **Tableau 1.5** pourrait ne pas être valable parce que de différentes enzymes provenant de différents champignons ligninolytiques ont été utilisées dans ces études.

Tableau 1. 5 Taux d'élimination des micropolluants organiques (%) en fonction de différentes enzymes immobilisées

MPO	Concentration initiale	Enzyme	Source de l'enzyme	Méthode d'immobilisation	%	Durée	Réf.
Triclosan	50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	laccase	<i>Cerrena unicolor</i>	Immobilisée sur billes de silice	50	50 h	[181]
	0,04 nmol L^{-1}	laccase	<i>Coriolopsis polyzona</i>	Immobilisée sur terre de diatomées	80	16 h	[179]
	100 mg L^{-1}	laccase	<i>C. polyzona</i>	Agrégats d'enzymes réticulées	≥ 80	140 min	[143,163,180]
	10,0 mg L^{-1}	peroxydase	<i>Bjerkandera adusta</i>	Agrégats d'enzymes réticulées	25	48 h	[182]
Bisphénol A	50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	laccase	<i>C. unicolor</i>	Immobilisée sur billes de silice	90	50 h	[181]
	100 mg L^{-1}	laccase	<i>C. polyzona</i>	Agrégats d'enzymes réticulées	≥ 95	140 min	[143,163,180]
	1,00 mmol L^{-1}	laccase	<i>Trametes versicolor</i>	Immobilisée sur polyacrylonitrile	92	90 min	[145]
	10,0 mg L^{-1}	peroxydase	<i>B. adusta</i>	Agrégats d'enzymes réticulées	≥ 90	48 h	[182]
Nonylphénol	50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	laccase	<i>C. unicolor</i>	Immobilisée sur billes de silice	40	50 h	[181]
	0,04 nmol L^{-1}	laccase	<i>C. polyzona</i>	Immobilisée sur terre de diatomées	85	16 h	[179]
	100 mg L^{-1}	laccase	<i>C. polyzona</i>	Agrégats d'enzymes réticulées	≥ 95	140 min	[143,163,180]
	10,0 mg L^{-1}	peroxydase	<i>B. adusta</i>	Agrégats d'enzymes réticulées	≥ 90	48 h	[182]
17β-œstradiol	10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	laccase	<i>T. versicolor</i>	Immobilisée sur billes de silice	65	1 h	[183]
	5,00 mg L^{-1}	laccase	<i>Myceliophthora thermophila</i>	Matrice sol-gel de méthoxysilanes	80	8 h	[184]
	5,00 mg L^{-1}	laccase	<i>M. thermophila</i>	Immobilisée sur supports Eupergit	80	8 h	[185]
	10,0 mg L^{-1}	peroxydase	<i>B. adusta</i>	Agrégats d'enzymes réticulées	≥ 90	48 h	[182]
Œstrone	5,00 mg L^{-1}	laccase	<i>M. thermophila</i>	Matrice sol-gel de méthoxysilanes	60	8 h	[184]
	5,00 mg L^{-1}	laccase	<i>M. thermophila</i>	Immobilisée sur supports Eupergit	65	8 h	[185]
17α-éthynylœstradiol	5,00 mg L^{-1}	laccase	<i>M. thermophila</i>	Matrice sol-gel de méthoxysilanes	60	8 h	[184]
	5,00 mg L^{-1}	laccase	<i>M. thermophila</i>	Immobilisée sur supports Eupergit	80	8 h	[185]
	10,0 mg L^{-1}	peroxydase	<i>B. adusta</i>	Agrégats d'enzymes réticulées	≥ 90	48 h	[182]

Néanmoins, quelques observations intéressantes concernant la performance spécifique à chaque composé des options peuvent être faites. Par exemple, dans les études précédentes utilisant de la laccase libre, le bisphénol A [143,144,165], le nonylphénol [165] et le triclosan [151,165] ont été généralement éliminés avec une grande efficacité, mais dans certains cas, lorsque la laccase a été immobilisée de manière à augmenter la stabilité et de permettre un usage répété, une moindre efficacité de l'élimination du micropolluants organiques a été observée.

Par exemple, alors qu'un taux élevé d'élimination (80-95 %) du bisphénol A et du nonylphénol a été réalisé par la laccase réticulée [180] ou des agrégats de peroxydase polyvalente [182] préparés en utilisant du polyéthylène glycol, l'élimination du triclosan par la peroxydase polyvalente réticulée n'était que de 25 %. En revanche, 40 à 50 % d'élimination du nonylphénol et de triclosan a été seulement obtenue par la laccase immobilisée dans des billes de silice [181]. L'immobilisation de la laccase ou de la peroxydase polyvalent a relativement entraîné l'élimination efficace des hormones comme l'œstrone (65 %), le 17 β -œstradiol (65-80 %) et le 17 α -éthynylœstradiol (80-90 %) [76,182-185] (**Tableau 1.5**).

L'activité enzymatique peut diminuer d'une façon significative après l'immobilisation aléatoire des molécules d'enzyme sur le support en raison de différentes orientations de ces molécules par rapport au support ou en raison de points de fixation multiples. Néanmoins, puisque l'immobilisation peut rendre les enzymes plus stables et permettre leur réutilisation, il est important d'étudier de meilleurs moyens d'immobilisation des enzymes pour des opérations à grande échelle.

1.4.2.5. Effet des propriétés physico-chimiques de la matrice des eaux usées

À quelques exceptions près (par exemple, Auriol et al. [169]), la plupart des études portant sur des champignons ligninolytiques (CLL) ont été effectuées à ce jour avec des eaux usées synthétiques. Outre les facteurs décrits dans les sections précédentes, les performances d'élimination des micropolluants organiques par les cellules entières de CLL ou par leur LME peut aussi dépendre des différentes propriétés physico-chimiques des eaux usées synthétiques, à savoir, le pH, la température, la salinité et la présence des métaux ou d'autres inhibiteurs.

Par exemple, Zhang et Geißen [154] ont rapporté que le diclofénac a été complètement dégradé par la LiP sur une gamme de pH de 3,0 à 4,5. Cependant, l'efficacité de la dégradation du diclofénac a significativement diminué, en passant de 100 % à un pH de 4,5 à 10 % à un pH de 6,0 en raison de l'inactivation de la LiP à un pH plus élevé [154].

Un pH de 6 a été rapporté comme le pH optimal pour le traitement catalysé par la laccase des œstrogènes [169] et du bisphénol A [144]. Un pH de 5 semble être l'optimum pour la dégradation de triclosan par la laccase de *Trametes versicolor* [174], tandis que le pH optimal de la laccase pour dégrader les chlorophénols était d'environ 5,5 [186]. La température optimale pour l'activité de l'enzyme modifiante de la lignine (LME) peut varier considérablement d'une souche à une autre. Cependant, 25-30°C et 37-40°C sont généralement signalés comme la température optimale pour la laccase et les peroxydases, respectivement, bien que des LME thermostables montrant une performance stable à plus de 50°C ont également été rapportées [124,137,163].

Comme indiqué précédemment, l'effet de la matrice des eaux usées sur l'élimination des micropolluants organiques a été étudié dans quelques études. Les constituants de la matrice des eaux usées n'ont pas eu d'impact significatif sur le traitement catalysé par la laccase pour la conversion des œstrogènes stéroïdes dans une étude réalisée par Auriol et al. [169]. En particulier, une élimination similaire d'œstrogènes pourrait être accomplie dans des eaux usées synthétiques et des eaux usées municipales réelles avec une dose de la laccase similaire [169]. Cependant, Mao et al. [172] ont constaté que, bien que la présence de l'alcool vératrylique ait amélioré les performances catalytiques de la LiP, une telle amélioration a été inhibée en présence de la matière organique naturelle. Kim et Nicell [174] ont étudié l'effet des constituants dissous des eaux usées, y compris divers sels minéraux, des composés organiques et des ions de métaux lourds sur la dégradation du bisphénol A par la laccase.

La conversion du bisphénol A a été inhibée en présence d'anions tels que le sulfite, le thiosulfate, le sulfure, le nitrite et le cyanure. Les ions métalliques (Fe (III) et Cu (II)) et les halogènes (chlorure et fluorure) oppriment sensiblement la conversion du bisphénol A.

1.4.2.6. Mécanismes d'élimination et voies de dégradation

a. Mécanismes d'élimination

Lors de l'élimination d'un micropolluant organique (MPO) par une préparation de cellules entières, la sorption sur le mycélium fongique peut être la première étape essentielle pour la biodégradation catalysée par des enzymes intracellulaires, liées au mycélium ou extracellulaires [132]. D'autre part, des tests in vitro utilisant des solutions enzymatiques purifiées ou brutes révèlent la capacité des enzymes sélectionnées à catalyser la biodégradation du MPO en absence d'une sorption sur le mycélium fongique. Une étude utilisant un test en mode batch par Yang [177] avec des cultures de champignons ligninolytiques (CLL) vivants et inactivés, et extrait enzymatique brut, a révélé des taux d'élimination élevés des composés sensiblement hydrophobes ($\log K_{o/e} \geq 4$) par les trois options, confirmant que les composés significativement hydrophobes étaient en fait biodégradés, non seulement biosorbés. Certaines études ont rapporté des taux d'élimination comparables par un traitement aux cellules entières et par un autre utilisant de l'enzyme extracellulaire en solution et ceci pour des composés tels que le bisphénol A [131,139,141,143-145,174], le triclosan [131,151], l'œstrone [168,169] et le 17 α -éthynylœstradiol [147,168,169] (**Figure 1.16**).

Les préparations d'enzymes extracellulaires ne peuvent pas toujours aboutir à une élimination semblable à celle obtenue par des cellules entières de CLL. Par exemple, un composé résistant, la carbamazépine, a été éliminé efficacement par quelques espèces de champignons dont le *Trametes versicolor* ATCC 42530 (76 %) [150] et le *Pleurotus ostreatus* (100%) [134]. En revanche, la solution de laccase brute permettrait d'atteindre seulement 5-15 % de biodégradation [134,150]. Les composés hydrophiles, tels que le naproxène ($\log K_{o/e} = 2,82$) [125,150] et l'ibuprofène ($\log K_{o/e} = 3,36$) [125,148,150,161] ont été complètement éliminé par traitement fongique aux cellules entières. Cependant, il n'y a pas de rapports dans la littérature de niveaux similaires d'élimination de ces composés par des solutions brutes d'enzymes extracellulaires. Par exemple, la dégradation de naproxène est inférieure à 10 % avec une solution de laccase purifiée [76,133]. L'ibuprofène a été éliminé à des niveaux de 37,5 à 50 % par une solution de laccase commerciale [150], tandis que l'application des enzymes fongiques brutes (laccase et MnP) a permis d'atteindre seulement 12,5 à 15 % d'élimination.

Puisque le naproxène et l'ibuprofène sont hydrophiles et par conséquent ne sont soumis qu'à une biosorption limitée, cette observation souligne le rôle des enzymes intracellulaires et / ou associées au mycélium dans la biodégradation de ces micropolluants organiques. Le rôle des enzymes intracellulaires a été mis en évidence plus clairement par l'observation de l'efficacité d'élimination suivant l'inhibition sélective de l'activité du cytochrome P450 (**Figure 1.16**). Une inhibition sensible de la dégradation du naproxène a été observée lorsqu'un inhibiteur de cytochrome P450, le 1-aminobenzotriazole, a été ajouté aux cultures fongiques [133]. Golan-Rozen et al. [134] ont constaté que le cytochrome P450 a joué un rôle important dans l'élimination de la carbamazépine: une culture de cytochrome P450 inhibée pourrait atteindre seulement 15 % d'élimination, tandis que, en l'absence de l'inhibiteur l'élimination est améliorée pour atteindre les 100 %. Une observation similaire a été faite par Hata et al. [123] qui ont rapporté que l'élimination du diclofénac par *Phanerochaete sordida* a diminué, en passant de l'élimination complète à 60 % après l'addition d'un inhibiteur de cytochrome P450 à la solution d'essai.

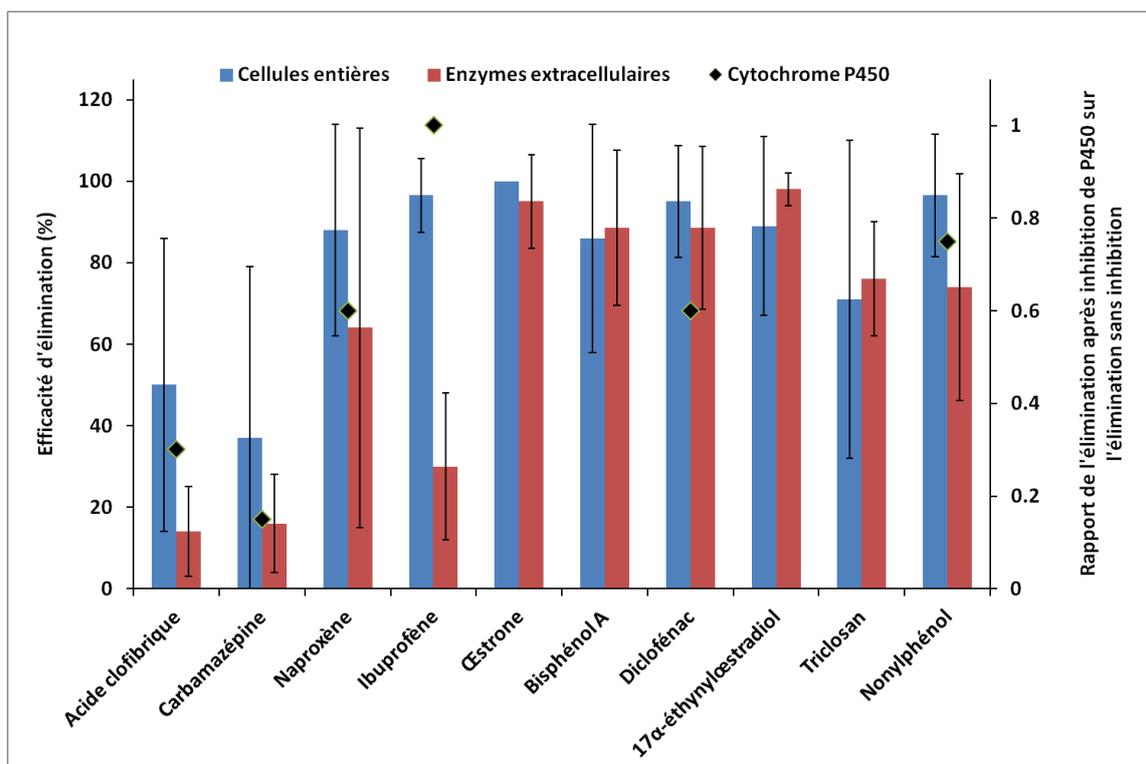


Figure 1.16 Comparaison cellules entières vs. Enzymes extracellulaires
 L'efficacité d'élimination de plusieurs composés par des cellules entières de champignons ligninolytiques (bleu), par des enzymes extracellulaires (rouge) et l'effet d'inhibition du cytochrome P450 (losange noir).
 Réf. : [131,139,141,143-145,147,151,168,169,174]

Des expériences avec la laccase purifiée et des préparations de laccase améliorée par un médiateur conduit à l'élimination presque complète de la sulfaméthazine, alors que d'autre part, l'inhibition de la dégradation de la sulfaméthazine a été observée lorsque le butoxyde de pipéronyle, un inhibiteur du cytochrome P450, a été ajouté aux cultures de champignons [187].

Avant de tirer des conclusions définitives en se basant sur la **Figure 1.16**, une attention doit être accordée au fait que la **Figure 1.16** repose sur des données compilées à partir d'un certain nombre d'études indépendantes qui peuvent ne pas avoir été menées dans les mêmes conditions. Néanmoins, la **Figure 1.16** indique que par comparaison avec le traitement enzymatique, le traitement aux cellules entières de champignons ligninolytiques est applicable à un plus large spectre de micropolluants organiques, probablement en raison de l'effet synergique des enzymes intracellulaires, associées au mycélium et extracellulaires de même que la sorption du micropolluant organique (MPO) sur la biomasse.

b. Voies de dégradation

Dans la plupart des études, l'accent a été principalement en ce qui concerne la disparition du composé parent. Seule une fraction limitée de la littérature est disponible sur les voies de dégradation et les produits de dégradation intermédiaires. Par exemple, l'hydroxy-diclofénac est formé en tant que produit intermédiaire au cours de la dégradation du diclofénac, ce qui indique qu'un groupe donneur d'électrons (groupe hydroxyle) est tout d'abord transféré au composé pour le rendre prêt à la biodégradation [123,153]. Des expériences menées *in vivo* et *in vitro* en utilisant le 1-aminobenzotriazole comme inhibiteur du cytochrome P450 et la laccase purifiée, ont suggéré qu'au moins deux mécanismes différents sont utilisés par *Trametes versicolor* pour initier la dégradation du diclofénac [153]. Alors que des métabolites hydroxylés ont été identifiés comme intermédiaires de dégradation dans les cultures fongiques dopés avec du diclofénac, la transformation catalysée par la laccase du diclofénac a conduit à la formation du 4-(2,6-dichlorophénylamino)-1,3-benzènediméthanol, qui n'a pas été détecté dans les expériences *in vivo* probablement en raison des faibles niveaux d'activité laccase observés pendant les premières heures d'incubation [153].

Le composé-parent et ses intermédiaires ont tous disparu après 24 heures, conduisant à une diminution de l'écotoxicité du liquide traité. Hata et al. [123] ont signalé que, comme pour le diclofénac, une hydroxylation catalysée par le cytochrome P450 peut également être impliquée dans l'élimination et la détoxification de l'acide méfénamique par *Phanerochaete sordida* (YK-624). Le système du cytochrome P450 a également été rapporté pour catalyser la première étape de la dégradation du kétoprofène, ce qui donne l'acide (2-[3-(4-hydroxybenzoyl)-phényl]-propanoïque par hydroxylation du noyau aromatique, et l'acide (2-[(3-hydroxy(phényl)-méthyl)-phényl]-propanoïque par réduction du groupe cétone, alors que le système d'enzyme ligninolytique (laccase) semblait jouer un rôle mineur dans la dégradation du kétoprofène [167].

Différentes voies ont été observées lors de la dégradation du naproxène par traitement aux champignons ligninolytiques. Une déméthylation par médiation du cytochrome P450 a conduit à la formation du 6-désméthylnaproxène [133,188], tandis qu'un second métabolite, le 1-(6-méthoxynaphthalén-2-yl)-éthanone, semblait être formé via la catalyse par la laccase [133]. Après 6 h d'incubation, le composé parent et les produits intermédiaires ont disparu du milieu, et il a été confirmé que le milieu traité n'était plus toxique [133]. L'hydroxylation sur le carbone primaire pour former l'hydroxy-ibuprofène est la voie de dégradation initiale et prédominante pour l'ibuprofène. Marco-Urrea et al. [148] ont étudié la dégradation de l'ibuprofène par *Trametes versicolor* et ont signalé qu'il a été transformé en 1-hydroxy-ibuprofène et 2-hydroxy-ibuprofène via l'oxydation de sa chaîne isopropyle.

Ces sous-produits ont été ensuite dégradés par le champignon en 1,2-dihydroxy-ibuprofène, qui s'est accumulé au cours de la période d'incubation (7 jours). Notamment, l'écotoxicité du milieu traité contenant de 1,2-dihydroxy-ibuprofène était plus élevée que la solution initiale, bien que toujours inférieure à celle fixée pour les eaux usées à décharger dans les zones industrielles. Ces mêmes auteurs [148], cependant, ont souligné que la concentration de l'ibuprofène utilisé dans leurs expériences (10 mg L^{-1}) a été beaucoup plus élevée que les concentrations trouvées dans l'environnement aquatique de plusieurs ordres de magnitude et ont conseillé alors d'en être vigilant en extrapolant leurs résultats.

L'acridone, l'acridine, la 10,11-dihydro-10,11-dihydroxycarbamazépine, et la 10,11-époxy-carbamazépine ont été identifiés comme les principaux métabolites stables, découlant d'un traitement de la carbamazépine par la culture de cellules entières de *Trametes versicolor*. Les tests de toxicité aiguë ont montré que les effluents terminaux des réacteurs n'étaient pas toxiques [189].

Golan-Rozen et al. [134] ont rapporté que deux familles d'enzymes, à savoir, la MnP extracellulaire (d'une manière dépendante ou indépendante des ions Mn^{2+}) et le cytochrome P450 intracellulaire, sont impliqués dans l'oxydation de la carbamazépine par la culture de cellules entières de *Pleurotus ostreatus*. Ils ont observé que la 10,11-époxy-carbamazépine était le principal métabolite stable lorsque la concentration de carbamazépine initiale était de 10 mg L^{-1} ; cependant, à une concentration compatible avec celles retrouvées dans l'environnement ($1 \mu\text{g L}^{-1}$), *Pleurotus ostreatus* peut continuer la dégradation de la 10,11-époxy-carbamazépine en son 10,11-trans-diol, qui pourrait être bio-disponible à d'autres microorganismes [134], conduisant potentiellement à la minéralisation.

D'autre part, deux produits de dégradation, à savoir, la 10,11-époxy-carbamazépine et la 9(10H)-acridone, ont été formées par l'intermédiaire d'un traitement répété avec la laccase de *Trametes versicolor* et l'HBT [173]. Eibes et al. [157] ont identifié un métabolite, à savoir le 3-amino-5-méthylisoxazole, au cours du traitement du sulfaméthoxazole avec la peroxydase polyvalente du champignon ligninolytique *Bjerkandera adusta*.

1.4.2.7. Essais de bioréacteurs fongiques en mode continu

Dans l'analyse critique réalisée par Yang et al. [127] portant sur la littérature disponible relative à l'application des champignons ligninolytiques (CLL) et de leurs systèmes enzymatiques pour l'élimination efficace d'un large éventail de micropolluants organiques (MPO) résistants dans des cultures pures réalisées en mode batch et dans des conditions de stérilité. En opposition au nombre important de rapports démontrant l'excellente capacité des CLL à dégrader les MPO persistants à une petite échelle, essentiellement dans des essais menés en mode batch et dans des conditions de stérilité, beaucoup moins d'études ont été menées dans des réacteurs continus.

Il existe plusieurs limites intrinsèques à la mise en place de réacteurs continus de champignons, en particulier dans des conditions opératoires de non-stérilité. Comme les champignons sont eucaryotes et vont croître plus lentement que les bactéries procaryotes, les bactéries peuvent dépasser les champignons en termes de compétition pour le substrat [190,191]. Ainsi, la concurrence pour le substrat par des bactéries, la colonisation bactérienne et l'endommagement du mycélium fongique sont les problèmes principaux signalés [190,191], qui conduisent à une perte progressive de l'activité enzymatique du champignon. Une autre limitation des réacteurs continus fongiques est la perte d'enzymes et de médiateurs avec les effluents traités [192,193].

En bon accord avec les études d'autres groupes de composés résistants, les quelques études disponibles sur l'élimination des MPO par des champignons ligninolytiques signalent aussi des taux d'élimination un peu plus pauvres par les réacteurs fongiques opérants dans des conditions non stériles et/ou en mode continu [188,189,194].

Rodarte-Morales et al. [188] ont rapporté une diminution de l'élimination des médicaments anti-inflammatoires après changement de la configuration opérationnelle d'un réacteur fongique du mode fed-batch au mode d'écoulement continu. En appliquant un temps de rétention hydraulique (HRT) de 3 jours, Jelic et al. [189] ont obtenu jusqu'à 54 % d'élimination de la carbamazépine dans un bioréacteur à lit fluidisé. Zhang et Geißen [194] ont rapporté une élimination de 60 % de la carbamazépine par une culture fongique fixée sur une mousse poreuse de polyéther fonctionnant en mode continu et traitant des effluents réels non stériles d'une installation de traitement des eaux usées.

Dans une étude récente menée par Yang [177] la performance d'un bioréacteur fongique à membrane fonctionnant en mode continu dépendait de la charge de l'affluent en MPO. Pour un HRT de deux jours et des charges en MPO de 475 ± 25 (bisphénol A) et 345 ± 112 (diclofénac) $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$, des taux d'élimination de 80 à 90 % du bisphénol A et d'environ 55 % du diclofénac ont été obtenus.

Par comparaison aux excellentes performances d'élimination des MPO dans les essais utilisant des cultures fongiques pures en mode batch, la présence de bactéries dans le bioréacteur fongique à membrane conduit aux deux observations suivantes : (i) une meilleure élimination du carbone organique total qui a été principalement composé de malt facilement biodégradable, (ii) et une élimination réduite du diclofénac [177].

Compte tenu des limites des bioréacteurs rapportés à ce jour, des études plus systématiques sur l'amélioration de la dégradation fongique des MPO dans les réacteurs continus dans des environnements non-stériles sont nécessaires.

1.4.2.8. Conclusion concernant les champignons en bioremédiation

Les micropolluants organiques (MPO) portant des groupes donneurs d'électrons (GDE) fort (par exemple, hydroxyle et amine) sont bien éliminés par les champignons ligninolytiques (CLL), tandis que les composés avec des groupes attracteurs d'électrons (GAE) (par exemple, halogène, nitro, azépine et triazine) sont biodégradables principalement par un CLL sécrétant les trois principales enzymes modificatrices de lignine (LME).

Les cellules entières de CLL semblent pouvoir traiter plus efficacement un large spectre de MPO que les surnageants de culture brut ou des enzymes purifiées, probablement en raison de l'effet complémentaire et/ou synergique des enzymes liées au mycélium et intracellulaires ainsi que la biosorption du MPO. En fonction de la concentration initiale de MPO, l'espèce fongique et les LME associées, l'addition de médiateurs d'oxydoréduction peut améliorer l'élimination des composés problématiques.

1.4.3. Procédés biologiques avancés : biostimulation et bioaugmentation

Plusieurs contaminants tels que des produits pétroliers, des déchets industriels, des pesticides, des médicaments et des substances hormonales semblent réfractaires vis-à-vis d'un traitement par des BAC et peuvent rejoindre les différents plans d'eau en provenant d'autres milieux naturels et surtout à travers l'eau d'irrigation des sols contaminés. Les traitements physico-chimiques, en particulier les procédés d'oxydation avancée (POA), sont capables de dégrader certains de ces polluants, mais la mise en

place onéreuse ainsi que la nature et les effets possibles des sous-produits d'oxydation resteront controversés dans le cas où une minéralisation complète n'a pas eu lieu.

Le but de cette section est de mettre de la lumière sur deux grandes techniques biotechnologiques, renouvelées plutôt que nouvelles, récemment introduites au domaine de traitements des eaux pour résoudre le problème des composés récalcitrants. La première technique est la « biostimulation » qui consiste à ajouter aux boues activées des additifs non-vivants en s'attendant à une meilleure performance de la biomasse qui y est déjà présente. La seconde technique est la « bioaugmentation » qui consiste à ajouter aux boues activées des microorganismes supplémentaires capables de produire des enzymes puissantes en s'attendant à une amélioration de la biodégradabilité des composés organiques réfractaires au traitement biologique.

1.4.3.1. Procédés Biologiques Avancés (PBA)

La recherche révolutionnaire dans le domaine de la biologie et des nouvelles biotechnologies pertinentes a mené à développer un ensemble de processus qui peuvent être rassemblées sous la dénomination générique de « procédés biologiques avancés (PBA) ». Ce sont des techniques renouvelées utilisant les mêmes outils biologiques comme les techniques classiques, mais dans une forme améliorée.

En raison de la nouveauté de ces procédés, la plupart de la terminologie utilisée n'est pas bien définie et il est fréquent de trouver plusieurs termes pour dire la même chose ou un terme qui a plusieurs significations. Par exemple, certains auteurs ont utilisé le terme « bio-enrichissement » par opposition à « bioaugmentation », mais pour décrire le même processus que la plupart des autres auteurs ont nommés "bioaugmentation" [195,196]. D'autre part, certains termes comme « acclimatation », « amélioration de la biodégradation » ou « enrichissement microbien » sont utilisés dans la littérature liée à la bioaugmentation sans explications claires. Donc il paraît nécessaire avant de revoir l'état d'art relatif à ces techniques de fixer les définitions de trois techniques principales à savoir « l'acclimatation », « la biostimulation » et « la bioaugmentation ».

a. Acclimatation

Pour survivre à une exposition à un milieu hostile, contenant un ou plusieurs polluants, un microorganisme peut réguler son métabolisme vers l'utilisation du polluant comme source de carbone et/ou d'électrons pour se procurer de l'énergie et réaliser la croissance, ou vers la tolérance du stress créé par le polluant en modifiant sa propre morphologie et/ou sa physiologie. Le processus d'acclimatation [196,197] ne s'établit pas instantanément et peut parfois prendre de longs temps de latence. Deux types de changements métaboliques peuvent être observés :

- i. Des changements temporaires qui disparaissent lorsque le microorganisme est replacé dans un autre milieu qui ne contient pas le polluant ; si celui-ci est rajouté, les changements prendraient le même temps de latence pour réapparaître : il s'agit d'une adaptation.
- ii. Des changements permanents qui réapparaissent chaque fois que le polluant est fourni en prenant un temps de latence plus court ou pas : c'est une mutation; l'information génétique codée par l'acide désoxyribonucléique (ADN) a changé et, dans certains cas, le microorganisme ne pouvait même pas survivre sans lui fournir le polluant.

b. Biostimulation

Les milieux traités, comme un procédé aux boues activées ou un sol contaminé, contiennent un consortium naturel et indigène de microorganismes appelés « autochtones ». Classiquement, la biostimulation consiste en un dopage avec des composés tels que des minéraux, des substances nutritives organiques facilement biodégradables, ou de l'oxygène, voire de l'air, ce qui peut améliorer la croissance microbienne afin que la biomasse formée puisse éliminer les contaminants en les utilisant directement en tant que sources d'énergie et de carbone, ou indirectement par le biais de co-métabolisme, où les microorganismes produisent des enzymes pour dégrader un substrat primaire, mais certaines de ces enzymes semblent être en mesure d'attaquer d'autres substrats secondaires, parmi lesquels le polluant en question. Certaines techniques récentes de bio-ingénierie peuvent être considérées comme des approches modernes de biostimulation :

- i. un ajout de biosurfactants qui rendent les polluants plus bio-disponibles, ce qui devrait aider les micro-organismes autochtones à proliférer en permettant la consommation du polluant introduit par émulsification dans la phase homogène [198–200].
- ii. L'ajout de solvants hydrophobes biocompatibles peut modérer la toxicité de certains polluants concentrés, en effet leurs concentrations sont maintenues au niveau infra-inhibiteur dans la phase aqueuse selon le coefficient de partage entre les deux phases, et les microbes prolifèrent en consommant la faible quantité de polluants contenus dans la phase aqueuse [201].

c. Bioaugmentation

Lorsqu'un microorganisme puissant ou un consortium efficace est ajoutée à la communauté microbienne indigène initiale d'un milieu contaminé, une possible amélioration de ses capacités de biopurification peut être observée. Comme il a été dit dans le cas de la biostimulation, la réduction d'un composé peut être due à son utilisation directe par le métabolisme de ces cellules, ou indirecte par le co-métabolisme via des réactions enzymatiques non spécifiques. Cette méthode a été utilisée notamment dans la bioremédiation de sols [202], lorsque des microorganismes indigènes du sol sont rares ou ne sont pas physiologiquement capables d'effectuer le processus de purification. Récemment, elle a été introduite dans les processus de traitement de l'eau comme une méthode alternative pour éliminer les composés organiques bio-récalcitrants. Par la suite, la discussion principale portera sur la bioaugmentation en tant que la stratégie essentiellement retenue dans ce travail.

1.4.3.2. Différents aspects de la bioaugmentation

Selon les intentions derrière l'adoption de la stratégie de la bioaugmentation, les microorganismes augmentés peuvent être ajoutés pour coopérer avec les autochtones ou pour les remplacer, ainsi la survie des cellules est essentielle au succès. Dans d'autres cas, de grandes quantités de biomasse sont ajoutées pour réagir momentanément comme biocatalyseur, avant de disparaître à cause des conditions ambiantes inappropriées [203]. En termes de spécificité l'inoculum de bioaugmentation peut être :

a- "Non-spécifique" comme des boues activées, du compost, du sol [204] sans étude poussée des caractéristiques microbiologiques. Dans ce cas, la quantité et la qualité de la matière fertile augmentée sont des propriétés importantes à observer.

b- "Hautement spécifique" comme une souche pure [205,206] ou un consortium microbien bien défini [207], reconnu pour ces capacités dégradants envers le polluant cible ou envers des composés de structures similaires (comme l'utilisation d'un consortium capable de « dé-chlorer » l'hexachlorobenzène pour dégrader des diphényles polychlorés [208]). En général, une approche par consortia conduira à de meilleurs résultats, dus aux complémentarités enzymatiques possibles entre différentes voies métaboliques des souches cohabitées.

En se basant sur l'origine de l'inoculum additionnel, trois approches peuvent être distinguées :

a- "la bioaugmentation autochtone (Auto-BA)" [209,210] où un ou plusieurs microorganismes sont isolés à partir du milieu contaminé, ensuite préparés dans une culture enrichie et puis réinjectés à l'environnement d'origine. En général, cette approche est utilisée si la faible biodégradation est assignée à une faible concentration en biomasse et/ou une haute concentration du polluant toxique. Comme dit plus haut, les inocula injectés dans ces cas doivent contenir une très haute concentration en biomasse pour s'assurer de la survie d'un nombre suffisant de cellules pour biocatalyser la dégradation du polluant. La différence avec la biostimulation réside dans le fait que la dernière va augmenter la concentration en biomasse de tous les autochtones alors que l'Auto-BA va augmenter cette concentration pour quelques souches autochtones possédant des capacités métaboliques spécifiques. Quelques chercheurs ont mis en place des procédés où l'Auto-BA peut se faire in situ ; au lieu de procéder par des étapes séparés d'isolation et d'enrichissement avant que les cultures résultantes soient réinjectées, cette approche étudiée par [211] utilise un vecteur moléculaire de combinaison comme un matériau de support permettant aux microorganismes de s'accumuler dans le réacteur comme expliqué plus à la section **§1.4.3.4. (b, iii)** [212] aussi ont auto-bioaugmenté un réacteur anaérobique en utilisant du stress électrochimique.

b- "La bioaugmentation allochtone (Allo-BA)" ou "le bio-enrichissement" lorsque la matière d'inoculation est isolé à partir d'un autre milieu [195]. À cause de plusieurs facteurs, l'Allo-BA est peu probablement réussite [213]. En fait, les microorganismes exogènes introduits ne sont pas nécessairement adaptés aux conditions abiotiques comme le pH, la température et la salinité. En plus, dans la plupart des fois, des conditions biotiques comme la compétition pour les nutriments avec la communauté indigènes et la présence de protozoaires prédateurs [214] fait de la survie une bataille perdue. Des immobilisations des microorganismes allochtones, par adsorption [211,215] ou dans un biofilm [216,217] ou dans des boues activées granulaires [218–221], sont des options pour maintenir l'inoculum de bioaugmentation dans un environnement hostile.

c- "La bioaugmentation génique (Gen-BA)" est une autre approche utilisant les "microorganismes génétiquement modifiés (μ -OGM)" qui sont des cellules vivantes dans lesquelles une portion spécifique d'ADN (gène) codant pour une protéine relative à une certaine fonction désirée, est introduite. En fait, il a été rapporté des essais réussis d'Allo-BA, où la souche introduite disparaît du milieu après un certain temps mais après avoir "transféré" ses capacités de dégradation à quelques souches autochtones. Ceci est expliqué par la présence des "éléments mobiles d'ADN" portant les gènes responsables de la biodégradation; ces "plasmides" peuvent être transférés entre deux bactéries via la conjugaison. La plupart du progrès en biologie moléculaire (clonage, génie génique, transmutation ...) a été essentiellement réalisée en comprenant le fonctionnement et en utilisant convenablement les plasmides. Les procédés de bioaugmentation ont été révolutionnés en utilisant des μ -OGM [222], des bactéries puissantes porteuses de plasmide [217,218,220,221,223] et dans des cas rares par une injection directe de plasmides. Des restrictions légales et sociales laissent la plupart des expériences de la Gen-BA à l'échelle du laboratoire parce que la libération des OGM dans la nature, durant des procédés in situ, n'est pas encore un comportement acceptable pour la population.

1.4.3.3. Approche Expérimentale pour évaluer la bioaugmentation

Il reste quelques points à clarifier. La bioaugmentation est souvent réalisée simultanément avec la biostimulation, parce que l'ajout de nutriments dans le milieu traité est nécessaire pour renforcer la prolifération microbienne. L'acclimatation de certains microorganismes autochtones est souvent possible au cours des expériences de bioaugmentation de longues durées comme pour des procédés dans un bioréacteur à membrane avec des âges de boues élevés. Si la remédiation réussie se produit réellement dans un processus in-situ, il y a toujours un doute sur le facteur le plus influent en termes d'élimination des polluants; est-ce que c'était l'acclimatation, la biostimulation, la bioaugmentation ou une combinaison de tous les trois ?

Dans les expériences conduites au laboratoire, cette ambiguïté est levée en suivant nécessairement les performances dans au moins trois bioréacteurs, comme illustré dans la **Figure 1.17** :

a- Bioréacteur témoin contenant les autochtones seuls avec les polluants pour quantifier le pourcentage abatement due à « l'atténuation naturelle (NA) » du polluant. Ce dernier est un phénomène ayant deux composantes: l'incidence éventuelle d'une acclimatation et/ou les pertes abiotiques. Un autre témoin additionnel où la matrice initiale est stérilisée, peut être utilisé pour évaluer séparément les pertes abiotiques [198].

b- Bioréacteur de contrôle de la biostimulation contenant autochtones, additives de biostimulation et polluants. Lorsque le résultat de cette expérience est comparé à celui du bioréacteur test de la bioaugmentation, les chercheurs sont capables d'évaluer la part de la biostimulation dans l'abatement globale. Si les additives de biostimulation contiennent des microorganismes vivants (par exemple un compost [224] ou un bio-mix d'un système de biopurification sur ferme [204]), une bioaugmentation non-intentionnelle et additionnelle peut avoir lieu et des bioréacteurs de contrôle supplémentaires contenant le matériau de biostimulation stérilisé doivent être conduits.

c- Bioréacteur test de la bioaugmentation contenant autochtones, additives de biostimulation, inoculum de bioaugmentation et polluants. L'abattement global observé ici peut être partitionné en portions de contribution entre les trois phénomènes atténuation naturelle, biostimulation et bioaugmentation. Des expériences supplémentaires, comme l'utilisation de l'inoculum de bioaugmentation avec la matrice initiale stérilisée ou vice-versa, doivent être réalisés pour déterminer les contributions apportées par d'autres concepts tel que la compétition, la synergie ou la prédation.

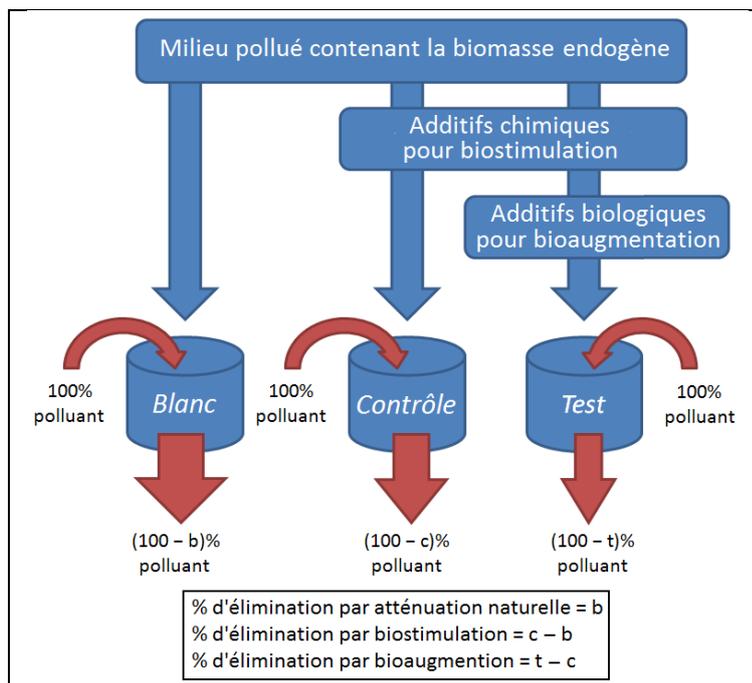


Figure 1.17 Schématisation de l'approche expérimentale utilisée pour évaluer les différentes contributions de l'atténuation naturelle, la biostimulation et la bioaugmentation dans les pourcentages observés d'abattements du polluant testé.

1.4.3.4. État d'art de l'utilisation de la bioaugmentation

De nombreux papiers scientifiques ont été publiés récemment à propos de ce sujet. Ce chapitre porte essentiellement sur les recherches les plus récentes et pertinentes, traitant de la bioremédiation en utilisant la bioaugmentation, et qui sont résumées par la suite et rassemblées dans les **Tableaux 1.6-1.13**.

En termes de matrices des milieux traités, plusieurs publications font référence à une pollution de sol [195,198,199,222-238], d'autres à une pollution d'eau [149,171,204,205,210-212,215-221,239-248] et quelques unes à des sédiments pollués [206-208,249].

a. Dans des matrices de sol

i. Pétrole et dérivés

Les hydrocarbures du pétrole sont considérés pour être des polluants dangereux des sols. Leur présence peut être considérablement nuisible pour les écosystèmes et la santé humaine [227]. La moitié des articles recensés reportant une bioaugmentation du sol, traite des cas de pollutions par le pétrole et ses dérivés et sont groupé dans le **Tableau 1.6.**

Dans la plupart de ces cas, des modèles de microcosmes (MC) ont été utilisés avec des masses de sol allant de 0,12 à 3 kg ; le travail de Łebkowska et al. [232] ainsi que celui de Kauppi et al. [231] rapportent tous les deux des procédés utilisant des bio-piles à l'échelle réelle, alors que Ju et al. [198] ont utilisé des microcosmes bourbeux formés de 25 g de sol stérile mélangés avec une boue huileuse. Les niveaux étudiés de pollution en différents gasoils et bruts étaient de 1,75 à 50 g d'hydrocarbures totaux de pétrole par kg de sol sec ; Towell et al. [238] ont évalué la dégradation de l'huile d'isolation des câbles dans l'intervalle de 0,01 à 100 g kg⁻¹ et Sprocati et al. [236] ont considéré une co-contamination avec du Zn et du Pb. Les microbes dégradeurs d'hydrocarbures utilisés sont la plupart de temps des souches bactériennes pures (*Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Luteibacter*, *Actinomycetes*, *Rhodococcus*) ou des inocula disponibles commercialement ou des isolats à partir de sites contaminés au pétrole.

L'utilisation de l'algue *Oscillatoria bornettia* [227] doit être considérée comme une nouvelle tendance en termes de remédiation des sols contaminés au pétrole. En termes des abattements évalués et les durées des expériences, Lee et al. [199] ont exposé un traitement efficace où la bioaugmentation avec *Rhodococcus* sp. EH831 a permis 63,4 % d'élimination d'hydrocarbures totaux de pétrole pendant une durée courte de 7 jours, même lorsque ceci est comparé avec les 120 jours nécessaires pour un rendement d'élimination de 95,7 % dans le travail de Taccari et al. [237] utilisant une approche au consortium naturel enrichi.

ii. *Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)*

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des polluants hautement toxiques et cancérigènes, de ce fait le besoin crucial de remédier les sols contaminés par bioaugmentation fut l'objet de plusieurs des articles recensés et groupés au **Tableau 1.7**. Les microcosmes modèles utilisés avaient des masses allant de 6 g à 2 kg avec des niveaux de pollution allant de 0,05 à 2,0 g/kg de sol sec.

Deux souches de champignons ligninolytiques, *Trametes versicolor* ATCC 42530 (souche de collection) et *Anthracophyllum discolour* (souche isolée à partir du bois pourri d'une forêt pluviale de Chili) ont été testées comme matières de bioaugmentation pour éliminer des mélanges de HAP par Sayara et al. [224] et Acevedo et al. [226] respectivement dans des microcosmes au compost et au sol. Mais, des améliorations d'abattements n'ont pas été observées dans les deux cas, en comparant les résultats à ceux obtenus lorsque les communautés bactériennes indigènes réagissent seules.

Nopcharoenkul et al. [233] ont exposé l'utilisation de la souche *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 facilement stockée sous une formulation liquide donnant 100 % abattement en pyrène à 300 mg kg⁻¹ dans du sol dopé. Dans un autre travail, *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA utilisé comme inoculum de bioaugmentation, a permis la dégradation de la phénanthrène dans des microcosmes de sol co-contaminé au chrome (VI) [230]. Une association intéressante d'un consortium bactérien de bioaugmentation avec *Miscanthus x giganteus* comme un agent de phytoremédiation a aussi été utilisée avec succès pour éliminer plus que 95 % d'un mélange de phénanthrène et de pyrène [229].

Tableau 1. 6 Usage de la bioaugmentation dans des matrices de sol: *pollution par le pétrole et ses dérivés*

Auteurs	Dispositif		Niveau de pollution ¹	Inoculum augmenté	Abattements des hydrocarbures totaux de pétrole	Réf.
	forme	masse ²				
Alvarez et al.	MC-sol	0,12	50	Trois souches <i>Actinomycetes</i> (bactéries halotolérantes)	25-51 % par BA et 16-39 % par AN/120 jours	[195]
Ju et al.	MC-bourbe	0,025	Jusqu'à 7,5	<i>Luteibacter sp.</i> (isolé à partir de sol d'un site d'épandage des boues)	Jusqu'à 51 % dans les conditions optimales de contenance en boues et en rhamnolipides	[198]
Lee et al.	MC-sol	0,2	30	<i>Rhodococcus sp.</i> EH831	63 % par BA comparé à 24 % par BS et 10 % par atténuation naturelle/7 jours	[199]
Wu et al.	MC-sol	1,2	30	<i>Enterobacter cloacae</i> (isolé d'une zone contaminée à l'essence)	25 % dans le contrôle, 44 % par BA et 56 % par BA + BS par ajout des pailles de blé / 56 jours	[225]
Łebkowska et al.	Biopile	277 ³	2,5	Réinjections répétées (Auto-BA)	82 % par BA répétée, 52 % par BA unique et 31 % dans le contrôle/25 jours	[232]
Kauppi et al.	MC-sol Biopile	0,8 840 ³	1,75 2,70	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> souche SK1, consortium dégradeur de gasoil	66 %/60 jours (BA ≈ BS par des ajouts de N et de O) 63-81 %/11 mois	[231]
Albert et Tanee	MC-sol	0,35	12,2-36,4 ⁴	<i>Oscillatoria bornettia</i> (algue)	63-67 % /14 semaines par BA face aux contrôles 23-30 %	[227]
Towell et al.	MC-sol	0,2	0,01-100	Inocula commerciaux : ABR, BioN35 et BKM	BA par BKM a montré une minéralisation de 47 % comparé à 17 % dans le contrôle/21 jours	[238]
Sprocati et al.	MC-sol	3,0	8,5 ⁴ Zn: 1 ; Pb: 0,5	Formule ENEA-LAMOSS	42-92 % par BA compare à 23-60 % dans le contrôle/105 jours	[236]
Taccari et al.	MC-sol	1,5	10	Inocula bactériens isolés à partir d'un sol contaminé au gasoil	96 % par BS-BA, 88 % part BS au compost et 58 % par AN/120 jours	[237]

¹ Concentration exprimée en grammes d'hydrocarbures totaux de pétrole par kg de solides totaux du dispositif

² Masse du dispositif exprimée en kg

³ Un volume de sol est transformé en une masse en se basant sur une masse volumique de 1400 kg m⁻³

⁴ Un volume de liquide pétrolier est transformé en une masse en se basant sur une masse volumique de 850 kg m⁻³

Tableau 1. 7 Usage de la bioaugmentation dans des matrices de sol: *Pollution par les HAP*

Auteurs	Dispositif		Niveau de pollution ¹	Inoculum augmenté	Résultats	Réf.
	forme	masse ²				
Sayara et al.	Compost	0,85	1,0	<i>Trametes versicolor</i>	L'introduction de <i>T. versicolor</i> n'a pas amélioré significativement la dégradation des HAP. La BS par le compost a été le facteur déterminant	[224]
Acevedo et al.	MC-sol	0,01	0,05	<i>Anthracozyllum discolor</i>	<i>A. discolor</i> a été capable d'éliminer fortement le mélange de HAP lorsque ajouté au sol stérilisé, mais n'a pas amélioré cette élimination lorsqu'il augmente les microorganismes indigènes du sol	[226]
Nopcharoenkul et al.	MC-sol	0,006	Pyrène: 0,3	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. RN402	Abattements: 76-100 % par BA, 24 % par BS et < 6 % en abiotique/4 semaines	[233]
Ibarrolaza et al.	MC-sol	2,0	Phénanthrène: 2,0 Cr (VI): 0,1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> 20006FA	La BA a modéré l'effet de la présence du Cr(VI), augmentant 1,54 fois la vitesse de dégradation du phénanthrène dans le MC co-contaminé	[230]
Didier et al.	MC-sol	0,6	Phénanthrène: 0,1 Pyrène: 0,1	<i>Miscanthus x giganteus</i> rhizomes Inocula bactériens isolés du site d'une mine de charbon	La BA a positivement impactée l'abattement (> 95 %) en pyrène le composé ayant la plus haute masse moléculaire, comparé au contrôle (65 %) et la phytoremédiation (85 %)	[229]

¹ Concentration exprimée en grammes de HAP par kg de solides totaux du dispositif

² Masse du dispositif exprimée en kg

iii. Autres polluants du sol

Également dans une matrice de sol, le **Tableau 1.8** expose des exemples additionnels de cas de bioaugmentation utilisée pour remédier plusieurs composés toxiques et réfractaires. La dégradation du phénol (de 1,7 à 5,0 g/kg de sol) par addition du μ -OGM *Pseudomonas* sp. JS150 a montré des cinétiques améliorées de 1,3 à 4,3 fois par rapport aux sols non-augmentés [222].

L'herbicide chloré abusivement utilisé l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D) a été complètement éliminé dans 6 jours dans un microcosme de sol bourbeux en utilisant la Gen-BA avec des bactéries porteuses de la plasmide pJP4 [223]. Jusqu'à 81 % du composé très toxique 1,2,4-trichlorobenzène ($LC_{50} < 3 \text{ mg L}^{-1}$) ont été abattus en 28 jours en utilisant la stratégie de bioaugmentation avec un consortium de sol contaminé [235].

Alors que Plangklang et Reungsang [234] ont réussi à raccourcir d'un facteur de huit, la longue durée de demi-vie du carbofurane en utilisant la bioaugmentation par des bactéries immobilisées de la souche *Burkholderia cepacia* PCL3, le champignon *Trametes versicolor* ATCC 42530 a échoué d'agir en synergie avec les microorganismes indigènes du sol pour éliminer efficacement le naproxène [228].

Tableau 1. 8 Usage de la bioaugmentation dans des matrices de sol : *Autres polluants*

Auteurs	Dispositif	Niveau de pollution ¹	Inoculum augmenté	Résultats	Réf.
Mrozik et al.	MC-sol (150 g)	Phénol (1,7-5,0)	<i>Pseudomonas</i> sp. JS150 (μ-OGM)	La BA a amélioré la vitesse de dégradation (1,3 à 4,3 fois)	[222]
Inoue et al.	MC-bourbe de sol (250 mL)	2,4-D (0,2)	Bactéries porteuses de pJP4 : <i>Pseudomonas putida</i> KT2440, <i>Escherichia coli</i> HB101	Les microcosmes BA ont montré 3 jours de latence et une dégradation totale en 6 jours alors que les contrôles ont montré 6 jours de latence et une dégradation totale en 20 jours	[223]
Song et al.	MC-sol (200 g)	1,2,4-trichlorobenzène (0,002)	Microorganismes d'un sol contaminé	BA a éliminé jusqu'à 81 % face à 64 % dans les contrôles/28 jours	[235]
Plangklang et Reungsang	portions de sol (120 kg)	Carbofurane (0,005)	<i>Burkholderia cepacia</i> PCL3	BA avec des PCL3 immobilisées ont raccourci la longue demi-vie ($t_{1/2}$) de 127 à 16 jours	[234]
Borràs et al.	MC-sol (2 mg)	Naproxène (0,0001)	<i>Trametes versicolor</i> (champignon de pourriture blanche)	Les abattements étaient 5-20 % dans un sol non-stérile et 10-45 % dans le sol stérile après 10 jours	[228]

¹ Concentration exprimée en g de polluant par kg de solides totaux du dispositif

b. Dans les matrices aqueuses

i. Composés chlorés

Les espèces organiques chlorées sont connues pour être toxiques et récalcitrants dans l'eau. Les publications révisées et groupées dans le **Tableau 1.9**, traitent des utilisations de la bioaugmentation pour l'élimination des hydrocarbures aliphatiques chlorés [240,242,245], des pesticides chlorés comme le Linuron [204] et le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) [217,218,220,221], et le composé de haute toxicité le 2,4,6-trichlorophénol [219]. Le tétrachloroéthène dans une eau souterraine a été traité en utilisant un consortium de *Dehalococcoides* KB-1 comme microorganismes augmentés [245]. La déchloration de ce polluant produit du trichloroéthène et de différents dichloroéthènes et a été réalisée en utilisant de différents additifs stimulants comme l'extrait de levure, les méthylesters de l'huile de soja et le petit lait de fromage pour améliorer la prolifération et la migration des bactéries à de différentes profondeurs et zones du panache traité.

D'autre part, Popat et al. [242] ont bioaugmenté un lit bactérien pour réorienter la déchloration du trichloroéthène vers la formation de l'éthène ; une autre souche de *Dehalococcoides* la BAV1, portant le gène *bvcA*, a été utilisée avec succès. Frascari et al. [240] ont testé la décoloration en aérobie du 1,1,2,2-tétrachloroéthane dans des bioréacteurs à bourbe et sans sol et ont trouvé que la bioaugmentation avec des souches sélectionnées conduit à de plus court temps de latence avant l'établissement de vitesses de dégradation suffisantes. Des essais en microcosmes modélisant un système de biopurification sur-ferme, contenant de la tourbe et de la paille comme « bio-mix », ont été bioaugmentés en utilisant des sols sensibilisés et non-sensibilisés et ont été irriguer avec de l'eau contenant du linuron [204]. Les résultats ont démontré une plus haute stabilité et une plus rapide purification dans les microcosmes contenant le sol sensibilisé. D'autres travaux [217,218,220,221] traitent la minéralisation du 2,4-D aqueux en utilisant l'approche Gen-BA avec de différentes bactéries portant le plasmide pJP4 (le même utilisé avec le 2,4-D dans le sol [223]). Les résultats ont été prometteurs dans des réacteurs séquentiels en batch avec des boues activées normales, granulaires, et dans des procédés en biofilm où l'abattement a atteint un niveau de 98 %.

Tableau 1. 9 Usage de la bioaugmentation dans des matrices aqueuses : *Polluants chlorés*

Auteurs	Dispositif	Niveau de pollution ¹	Inoculum primaire	Inoculum augmenté	Résultats	Réf.
Santharam et al.	Pilote	C ₂ Cl ₄ : 15	Autochtones biostimulés	<i>Dehalococcoïdes</i> KB1	Ethylènes chlorés totaux diminué de 80 %	[245]
Popat et al.	Lit bactérien	C ₂ HCl ₃ : 8-9/h	<i>Dehalococcoïdes</i> (<i>tceA</i> et <i>vcrA</i>)	<i>Dehalococcoïdes</i> BAV1	La BA a favorisé la déchloration totale en C ₂ H ₄ plutôt que partielle (C ₂ H ₂ Cl ₂ et C ₂ H ₃ Cl)	[242]
Frascari et al.	En batch (119 mL)	CHCl ₂ - CHCl ₂	Communauté microbienne de sol	Inoculum bourbeux acclimatée au polluant	Minéralisation d'environ 97 % avec de plus courte phase de latence	[240]
Sniegowski et al.	Microcosmes	Linuron: 600	Autochtones du « bio-mix »	Sols sensibilisés ou non au Linuron	Le sol sensibilisé a établi des populations minéralisatrices du pesticide plus certainement et plus rapidement	[204]
Quan et al.	En batch : agité/biofilm (1,7 à 4 L)	2,4-D: 45-500	Boues aérobies granulaires <i>E. coli</i> DH5α <i>Alcaligenes</i> sp.	<i>P. putida</i> SM1443 <i>Alcaligenes</i> sp. (p)P4	Dans le biofilm bioaugmenté, le 2,4-D a été complètement dégradé face à 86 % de dégradation dans les contrôles acclimatés. Dans le batch agité, le réacteur bioaugmenté a montré des cinétiques de dégradation supérieures aux premiers jours, mais a perdu cette supériorité avec le temps	[217,220,221]
Ma et al.	En batch (1,5 L)	2,4-D: 400 Cl _x ΦOH: 30-90	Boues aérobies granulaires	<i>P. putida</i> SM1443	2,4-D et Cl _x ΦOH ont été éliminés (> 97 %) et minéralisés (87-92 %) par les granules	[218]
Puyol et al.	Réacteur séquentiel en batch (2,5 L)	2,4,6-Cl ₃ ΦOH: 250-760 μM	Boues granulaires précédemment acclimatées au 2,4-Cl ₂ ΦOH	<i>Desulfitobacterium</i> sp.	La BA n'a pas amélioré significativement la biodégradation anaérobie du 2,4,6-Cl ₃ ΦOH. Les paramètres cinétiques mesurés étaient comparables dans les bioréacteurs augmentés et les bioréacteurs de contrôle	[219]

¹ En absence d'autre mention, les concentrations sont en mg L⁻¹.

En plus, Ma et al. [218] ont démontré la capacité de la bioaugmentation par pJP4 à dégrader des composés variés de la classe des chlorophénols, atteignant des rendements d'élimination de 97 % pour le plus toxique entre eux (2,4,6-trichlorophénol) en 30 jours. Ce dernier composé a été efficacement éliminé par des boues activées granulaires acclimatées au 2,4-dichlorophénol alors que la bioaugmentation par *Desulfitobacterium* sp. n'a pas amélioré les vitesses de dégradation [219].

ii. Polluants industriels

Les déchets industriels contiennent souvent des composés nuisibles à la vie aquatique. Le 2-chlorophénol par exemple, à une concentration de 7 mg L^{-1} dans de l'eau fraîche, peut immobiliser plus que 50 % d'une population de *Daphnia magna* en 48 heures [248]. Quelques procédés de bioaugmentation ont été menés avec des produits chimiques bien définis [211,216,243,247] (respectivement le nitrobenzène, le 2-fluorophénol, le phénol, et la quinoline) considérés comme des déchets industriels et d'autres procédés ont été menés avec des effluents indéfinis relatifs à l'industrie laitière [246] et au procédé anaérobique méthanogène [210,241] sont rapportés dans le **Tableau 1.10**. La bioaugmentation artificielle qui a été employé avec du nitrobenzène dans une eau de source [211], peut être considérée comme une nouvelle tendance du domaine par l'utilisation de vecteurs de combinaison permettant une accumulation de microorganismes dans le réacteur, alors que l'utilisation d'un disque biologique à l'échelle de laboratoire a prouvé d'être une solution bien conçue pour fixer des bactéries dégradantes du 2-fluorophénol dans un biofilm [216]. Le *Pseudomonas* JY-2 alcalino-tolérant a permis la dégradation du phénol dans une eau usée alcaline [243] et le dégradeur de la quinoléine *Bacillus* sp. Q2 qui a été isolé d'un sol contaminé au pétrole, a montré des potentiels pertinents en réalisant 100 % d'élimination en 22 heures [247].

Avec l'eau contenant les déchets laitiers, Schneider et Topalova [246] ont réussi à mettre en place un bio-filtre pour éliminer efficacement les composés organiques de l'effluent tout en montrant qu'un inoculum tiré aux eaux usées municipales était aussi efficace qu'un inoculum commercial de bioaugmentation. Un consortium microbien isolé et enrichi, avec une haute et spécifique activité méthanogénique, fut introduit par Tale et al. [210].

Le réacteur de bioaugmentation a été capable d'éliminer rapidement les acides organiques inhibiteurs de la méthanogenèse lorsqu'il a été alimenté par un effluent de lait dégraissé. Neumann et Scherer [241] ont ajouté un inoculum de compost dans un digesteur anaérobique ; la bioaugmentation a permis de plus courts temps de séjour hydraulique et de plus haute production de méthane.

iii. Teintures et polluants colorés

Les teintures et d'autres effluents colorés contenant des composés récalcitrants altèrent la qualité d'eau. Quelques uns de ces effluents ont été le sujet d'essais d'élimination utilisant les procédés de bioaugmentation montrés dans le **Tableau 1.11**. Un effluent contenant de l'acide 1-amino-4-bromo-2-anthraquinone sulfonique a été décoloré puis biodégradé par un procédé combiné utilisant respectivement une microélectrolyse et un filtre biologique aéré. Ce dernier a été inoculé par *Sphingomonas* sp. FL connu pour avoir des capacités à utiliser l'acide 1-amino-4-bromo-2-anthraquinone sulfonique comme source unique de carbone [205]. Immobilisée sous la forme de cellules complètes sur des vecteurs d'alginate de sodium dans un réacteur séquentiel en batch, la souche de *Candida rugopelliculosa* HLX-2 a été capable de décolorer le colorant « Reactive Blue 13 » [215]. Des tests supplémentaires ont confirmé des capacités étendues de la souche envers d'autres colorants : « Disperse Brown 1 », « Disperse Orange 62 », « Disperse Red 43 » et « Acid Yellow 72 ». D'autre part, « Acid Orange 7 » a été décoloré en aérobie dans un procédé à biofilm utilisant *Shewanella* sp. XB permettant une minéralisation complète pour aboutir à un effluent exempte des sous-produits récalcitrants d'oxydation [171]. Récemment, Zhang et al. [212] ont proposé un procédé combiné où la réaction électrochimique entre l'électrode de fer et l'électrode de graphite immergées dans un réacteur anaérobique a conduit à l'enrichissement des boues activées par une communauté microbienne capable d'éliminer 84,7 % du colorant azoïque « Reactive Brilliant Red X-3B » à une concentration de 1200 mg L⁻¹.

Tableau 1. 10 Usage de la bioaugmentation dans des matrices aqueuses : *polluants industriels*

Auteurs	Échelle	Niveau de pollution	Inoculum augmenté	Résultats	Réf.
Xu et al.	Échelle de pilote	Nitrobenzène (219 ng L ⁻¹)	μ-organismes accumulés dans des vecteurs de combinaison	Le rendement de la dégradation a atteint les 100 % lorsque le temps de séjour hydraulique est de 7 d	[211]
Duque et al.	Disque biologique à l'échelle du laboratoire	2-fluorophénol (50 mg L ⁻¹)	Souche bactérienne isolée et libellée « souche FP1 »	Une biodégradation complète a été observée	[216]
Qu et al.	Réacteur séquentiel en batch (200 mL)	Phénol en milieu alcalin (550 mg L ⁻¹)	<i>Pseudomonas</i> JY-2 (isolé à partir de boues activées)	90 % du phénol ont été dégradés pendant un jour et demi dans le système bioaugmenté, alors que 65 % du phénol seulement ont été dégradés dans le système non-bioaugmenté	[243]
Tuo et al.	Réacteur à secousse en batch (100 mL)	Quinoline (500 mg L ⁻¹)	<i>Bacillus</i> sp. Q2 isolé d'un sol contaminé au pétrole	100 % d'élimination en 22 h face à < 5 % en 45 h pour les boues non-augmentées	[247]
Schneider et Topalova	Procédé en biofiltre à l'échelle réelle	Polluants des eaux usées laitières	Inocula commerciaux : HydroPacks, Bilikuk et Laktazym	La bioaugmentation par des inocula commerciaux n'a pas amélioré les taux d'élimination du biofiltre par rapport aux inocula d'un STEP d'eaux usées municipales	[246]
Tale et al.	Digesteurs anaérobiques de laboratoire (50 mL)	Acides organiques inhibiteurs de la méthanogenèse	Communauté à activité méthanogénique hautement spécifique isolée et enrichie	Lorsque surchargés jusqu'à 5000 mg _{DCOS} L ⁻¹ , les digesteurs bioaugmentés ont eu besoin de 25 jours de moins que le contrôle pour fournir un effluent à 1000 mg _{DCOS} L ⁻¹	[210]
Neumann et Scherer	Fermenteurs anaérobiques de laboratoire (5,7 L)	Ensilage de betterave fourragère	Compost	La BA a permis au fermenteur de fonctionner à des temps de séjour hydrauliques 2 à 4 fois plus courts avec 6 % d'amélioration au niveau de la production du méthane	[241]

DCOS: demande chimique en oxygène soluble.

Tableau 1. 11 Usage de la bioaugmentation dans des matrices aqueuses : *Colorants et polluants colorés*

Auteurs	Dispositif	Niveau de pollution	Inocula augmentés	Résultats	Réf.
Fan	traitement combiné : microélectrolyse/biofiltre aéré	acide 1-amino-4-bromo- 2-anthraquinone sulfonique (ABAQSA)	La souche <i>Sphingomonas</i> FL	Après un contact à long terme avec de l'eau usée contenant ABAQSA, la souche FL est devenue une des espèces prédominantes dans le biofiltre aéré	[205]
Zhang et al.	bioréacteur anaérobique de 9,42 L avec des électrodes Fe-graphite	Brillant Red X-3B (1200 mg L ⁻¹)	Le lessivage électrochimique de Fe ²⁺ a augmenté spécifiquement la croissance de quatre souches bactériennes avec des capacités élevés d'abattement du colorant	La décoloration et l'élimination de la DCO pour une eau usée contenant le colorant azoïque, ont atteint respectivement 83,4 et 84,7 %	[212]
Liu et al.	réacteurs séquentiels en batch de 2 L à l'échelle du laboratoire	Reactive Blue 13 (50-250 mg·L ⁻¹)	<i>Candida rugopelliculosa</i> HXL-2 (Immobilized on sodium-alginate)	Le rendement de la décoloration dans le réacteur séquentiel en batch bioaugmenté était plus élevé (100 % dans 48 h) que les réacteurs de contrôle (< 25 % dans 48 h), même sous un plus long temps d'opération	[215]
Wang et al.	réacteur aéré à biofilm et à membrane de 2 L	Acid Orange 7 (50-200 mg L ⁻¹)	<i>Shewanella</i> sp. XB (réducteur de quinone)	Décoloration a atteint 98 % dans 6 h avec un effluent incolore contre seulement 57,8 % avec un effluent jaune par la méthode conventionnelle	[171]

iv. Composés pharmaceutiques actifs

Les composés pharmaceutiques actifs sont peut-être entre les polluants émergents, les plus vus d'un œil inquiet par la population. Les travaux traitant les éliminations de produits pharmaceutiques en milieux aqueux utilisant la bioaugmentation sont groupés dans le **Tableau 1.12**. L'acétaminophène (plus connu sous le nom de paracétamol) est l'un des pharmaceutiques humains les plus utilisés dans le monde. L'élimination des quantités croissantes trouvées dans l'eau a été étudié dans un réacteur à membrane alimenté par le pharmaceutique cible comme la source unique de carbone, deux souches bactériennes (*Delftia tsuruhatensis* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont été isolées à partir d'une culture nitrifiante enrichie. *Delftia tsuruhatensis* a été trouvée capable de survivre sur l'acétaminophène comme unique source de carbone et de minéraliser le métabolite toxique hydroquinonéine [239]. Un autre travail relatif à une bioaugmentation dans l'eau rapporte l'élimination d'un produit pharmaceutique perturbateur endocrinien : le 17 β -œstradiol [244]. L'expérience a été conduite dans un réacteur séquentiel en batch utilisant la souche KC8 de *Sphingomonas* comme agent de bioaugmentation dans des boues activées nitrifiantes. Les taux d'élimination touchent à 78 % et des microorganismes dégradeurs d'œstradiol, autres que ceux de l'inoculum augmenté, se sont avérés être présents dans les boues initiales. La biodégradabilité de 14 produits pharmaceutiques trouvés dans les boues des égouts a été testée utilisant la souche fongique *Trametes versicolor* ATCC 42530 et les résultats variaient entre un abattement faible de 42 % dans le cas de l'antiépileptique carbamazépine et une élimination totale pour plusieurs autres médicaments [149].

c. Dans des matrices de sédiments

Les sédiments sont des particules solides retrouvées aux bords ou au fond des surfaces aquatiques. Les polluants hydrophobes initialement rejetés dans le courant d'eau vont s'accumuler dans les sédiments suivant l'équilibre de partage entre les deux phases. En plus, des pesticides comme les diphényles polychlorés et la tributylétain ont été traités dans de différents sédiments par la stratégie de bioaugmentation et quelques résultats sont collectés dans le **Tableau 1.13**.

Tableau 1. 12 Usage de la bioaugmentation dans des matrices aqueuses : *polluants pharmaceutiques*

Auteurs	Dispositif	Niveau de pollution	Inoculum augmenté	Résultats	Réf.
De Gusseme et al.	Réacteur à membrane (20 L)	Acétaminophène ($100 \mu\text{g L}^{-1}$)	<i>Delftia tsuruhatensis</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 99,9 % d'abattelements ont été observé et isolation d'une souche de <i>Delftia tsuruhatensis</i> capable d'utiliser l'acétaminophène comme source unique de carbone	[239]
Roh et Chu	Réacteur séquentiel en batch (1,5 L)	17β -œstradiol (1 mg L^{-1})	<i>Sphingomonas</i> souche KC8	Haute élimination du 17β -œstradiol (atteignant 78 % de biodégradation)	[244]
Rodriguez-Rodriguez et al.	Tubes (24 mm × 150 mm)	14 composés pharmaceutiques actifs retrouvés dans les boues des égouts (intervalle: $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ pour le Fénofibrate jusqu'à $85,9 \mu\text{g L}^{-1}$ pour l'Ibuprofène)	<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	Phénazone, bézafibrate, fénofibrate, cimétidine, clarithromycine, sulfaméthazine et aténolol ont été complètement éliminés, alors que des taux d'élimination entre 43 % (pour la carbamazépine) et 75 % (pour l'ibuprofène) ont été obtenus pour les sept médicaments restants	[149]

Tableau 1. 13 Usage de la bioaugmentation dans des sédiments

Auteurs	Dispositif	Niveau du polluant	Inoculum augmenté	Résultats	Réf.
Payne	2 L de sédiments en suspension	PCB exposés aux intempéries (1,3 mg kg ⁻¹ à 4,76 Cl/diphényle)	La souche DF-1 de <i>Dehalobium chlorocoercia</i>	BA avait un effet stimulant de la déchloration des PCB exposés aux intempéries : diminution de 0,6-0,7 Cl/diphényle dans 120 jours face à une non-diminution pour les contrôles	[206]
Fagervold	microcosmes de 1,5 g de sédiments	PCB exposés aux intempéries (< 2 mg kg ⁻¹ à 6,5 Cl/diphényle)	La bactérie o-17, <i>Dehalobium chlorocoercia</i> souche DF-1 et les phylotypes DEH10 et SF1	BA a diminué le temps de latence de l'activité de déhalogénéation et redirige les réactions de déchloration: diminution de 2 en BA, et de seulement 1,2 Cl/diphényle dans les contrôles/300 jours	[207]
Sudjarid	microcosmes de sédiments bourbeux	PCB	Le consortium d'un sédiment contaminé à l'hexachlorobenzène	Accélération de la déchloration des PCB	[208]
Sakultantimetha	microcosmes de 2 kg de sédiments dopés	Tributylétain (100 µg kg ⁻¹)	La souche TISTR1971 d' <i>Enterobacter cloacae</i>	Pas de différence significative a été observée par BA face à BS marquant tout deux 45 % d'abattement contre < 5 % dans le contrôle	[249]

Pendant que Payne et al. [206] ont utilisé *Dehalobium chlorocoercia* DF-1 pour bioaugmenter un sédiment suspendu contenant des diphényles polychlorés lessivés dans une expérience de 120 jours, Fagervold et al. [207] ont employé la même souche dans un consortium avec trois autres souches bactériennes envers les mêmes polluants, dans des microcosmes à sédiments à travers 300 jours. Dans les deux cas, les résultats ont montré de plus courts temps de latence lors de la bioaugmentation et des améliorations des activités de déchloration touchant les deux atomes de chlore par diphényle. Sudjarid et al. [208] ont utilisé la bioaugmentation par un consortium bactérien précédemment isolé d'un sédiment contaminé par de la hexachlorobenzène et ont obtenu des performances prometteuses de déchloration pour les PCB dans les microcosmes. Finalement, Sakultantimetha et al. [249] ont traité le tributylétain dans des microcosmes à sédiment en ajoutant du succinate, du glycérol et de la L-arginine pour biostimuler et la souche *Enterobacter cloacae* TISTR1971 pour bioaugmenter. Des vitesses améliorées d'élimination de le tributylétain ont été aussi bien observées en biostimulation seule et en association biostimulation-bioaugmentation, montrant que l'addition de la souche bactérienne n'a pas significativement contribué au procédé de purification.

1.4.3.5. Conclusions concernant la technique de la bioaugmentation

La bioaugmentation, comme une technique prometteuse, est de plus en plus utilisée pour éliminer la pollution par des composés organiques bio-récalcitrants dans différentes matrices. Les avantages de la méthode sont une simplicité opérationnelle, un cout faible et une capacité à permettre dans la plupart des cas, une minéralisation totale des composés cibles et une détoxification d'effluents variés, surtout lorsque comparée aux POA. D'autre part, des efforts supplémentaires ont été conduits pour surmonter l'aspect empirique de la bioaugmentation en étudiant les paramètres opératoires a l'échelle du laboratoire avant de commencer des essais consommateurs de temps à l'échelle du champs sans avoir l'assurance suffisante de l'obtention de résultats satisfaisants.

Bien que la bioaugmentation soit une approche purement biotechnologique, de nouveaux procédés innovés par couplage avec des techniques physico-chimiques vertes peut être une bonne idée vers l'accélération de la performance et la mise sur la bonne voie vers l'efficacité complète.

La bioaugmentation en tant qu'une solution possible dans le traitement des composés organiques bio-réfractaires a fait l'objet d'une synthèse de littérature (*Review article*) [250] publiée en décembre 2012 dans le cadre de cette thèse (voir **Annexe 5**), dans le journal international *Biochemical Engineering Journal*.

CHAPITRE 2

METHODES STATISTIQUES

CHAPITRE 2 : METHODES STATISTIQUES

2.1. Introduction

Dans ce chapitre, les méthodes de traitement statistiques des résultats sont explicitées. En ce qui concerne la partie « matériel et méthodes analytiques », elle sera incluse au cours des chapitres 3, 4 et 5 dans les articles scientifiques présentant les résultats expérimentaux. Cependant, le principe théorique des méthodes analytiques et les courbes d'étalonnage sont donnés dans l'**Annexe 6**.

2.2. Grandeurs statistiques de base

On considère un ensemble de N valeurs observées d'une certaine grandeur X notées de x_1 jusqu'à x_N . On définit la moyenne arithmétique de X noté par \bar{X} (**X barre**) et couramment nommée « **valeur moyenne** » par :

$$\bar{X} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

La valeur moyenne est une grandeur statistique associée avec l'idée du centre d'un cercle entourant les valeurs x_i assimilées à des points dispersés dans un plan.

On définit la variance de X noté par S_X^2 par :

$$S_X^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{X})^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i^2 - (\bar{X})^2 = \overline{X^2} - (\bar{X})^2$$

La racine carrée de la variance est alors appelée « **écart-type** » et notée S_X . L'écart-type s'exprime avec la même unité de mesure que la valeur moyenne ; cette grandeur statistique est associée avec l'idée du rayon d'un cercle entourant les valeurs x_i assimilées à des points dispersés dans un plan.

Le « coefficient de variation » est le rapport de l'écart-type sur la valeur moyenne généralement exprimé en pourcentage :

$$CV = \frac{S_X}{\bar{X}}$$

Lorsque les valeurs x_1, \dots, x_N sont le résultat d'une mesure répétée d'une seule valeur, l'écart-type et le coefficient de variation expriment alors respectivement l'erreur absolue et l'erreur relative de mesure.

On exprime généralement le résultat sous la forme $X = \bar{X} \pm S_X$ pour dire que la plupart des valeurs mesurées de X appartiennent à l'intervalle $[\bar{X} - S_X ; \bar{X} + S_X]$.

Dans le but de comparer la distribution statistique des résultats avec une distribution de référence, on calcule une variable linéairement liée à X ayant une moyenne nulle et un écart-type unitaire ; on l'appelle « variable centrée réduite » et on la note par Z :

$$Z = \frac{X - \bar{X}}{S_X}$$

La distribution de référence la plus utilisée est la distribution normale définie par :

$$f(z) = \frac{e^{-\frac{z^2}{2}}}{\sqrt{2\pi}}$$

Lorsque le nombre des valeurs est très petit ($N < 30$) on utilise l'écart-type corrigé σ_x pour calculer la variable centrée réduite T :

$$\sigma_x = S_X \sqrt{\frac{N}{N-1}} \quad ; \quad T = \frac{X - \bar{X}}{\sigma_x}$$

La distribution de référence est dans ce cas la distribution de *Student* définie par :

$$f(t, N-1) = \frac{(N-2)(N-4) \dots}{(N-3)(N-5) \dots} \cdot \frac{\left(1 + \frac{t^2}{N-1}\right)^{-\frac{N}{2}}}{k \sqrt{N-1}}$$

$k = 2$ (ou π) si N est impair (ou pair)

$$\text{Pour } N = 2 : f(t, 1) = \frac{(1+t^2)^{-1}}{\pi}$$

$$\text{Pour } N = 3 : f(t, 2) = \frac{\left(1 + \frac{t^2}{2}\right)^{-\frac{3}{2}}}{2\sqrt{2}}$$

$$\text{Pour } N = 4 : f(t, 3) = \frac{2\left(1 + \frac{t^2}{3}\right)^{-2}}{\pi\sqrt{3}}$$

$$\text{Pour } N = 5 : f(t, 4) = \frac{3\left(1 + \frac{t^2}{4}\right)^{-\frac{5}{2}}}{8}$$

Une fois la distribution de référence adéquate choisie, on peut déterminer la confiance qu'on peut donner à l'intervalle $[\bar{X} - S_X; \bar{X} + S_X]$ de contenir les valeurs mesurées de X ; cette confiance est de **68 %** pour une distribution normale, de **50 ; 58 ; 61** et **63 %** pour une distribution de *Student* respectivement pour $N = 2 ; 3 ; 4$ et **5** valeurs mesurées.

On peut aussi élargir l'intervalle pour devenir $[\bar{X} - mS_X; \bar{X} + mS_X]$; m étant un facteur multiplicatif choisi pour que l'intervalle ait une confiance désirée. Ainsi, une valeur $m = 1,96$ pour une distribution normale, une valeur $m = 12,7 ; 4,30 ; 3,18$ et **2,78** pour une distribution de *Student* respectivement pour $N = 2 ; 3 ; 4$ et **5** valeurs mesurées, assure une confiance suffisante de **95 %**.

2.3. Tests paramétriques

Ces tests ont pour but de comparer deux valeurs G_A et G_B d'une grandeur G obtenue par deux voies différentes A et B ; ils se déroulent en plusieurs temps qui sont :

- 1) Formuler l'hypothèse nulle (H_0): $G_A = G_B$ et l'hypothèse alternative (H_1).
L'hypothèse (H_1) peut être $G_A \neq G_B$; $G_A < G_B$ ou $G_A > G_B$.
- 2) Formuler l'écart-type ET convenable au problème et calculer la variable centrée réduite V adéquate : $V = (G_A - G_B)/ET$.
- 3) Fixer une probabilité seuil p_0 séparant (H_0) et (H_1).
- 4) Déterminer la valeur p correspondante à la variable centrée réduite calculée pour une distribution de référence adéquate.
- 5) Décider : si $p > p_0$ on accepte (H_0) sinon on la rejette et on admet (H_1).
Généralement, il est commun de dire que si $p < p_0$ alors G_A et G_B sont significativement différentes.

On considère à titre d'exemple une simple expérience où on a mis une substance dans un milieu réactionnel à une concentration initiale de C_0 et on a mesuré la concentration de cette substance se trouvant dans ce milieu chaque jour pendant **10** jours. On désire voir si la concentration a diminuée significativement durant l'expérience ou pas :

- 1) L'hypothèse nulle est $(H_0) : C = C_0$ et l'hypothèse alternative est $(H_1) : C < C_0$.
- 2) C est la valeur moyenne et σ est l'écart-type définies par :

$$C = \frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} C_i \quad ; \quad \sigma = \sqrt{\frac{1}{9} \sum_{i=1}^{10} (C_i - C)^2}$$

On calcule aussi la variable centrée réduite T définie par :

$$T = \frac{C - C_0}{\sigma}$$

- 3) On fixe la probabilité seuil **0,05** séparant (H_0) et (H_1) .
- 4) On regarde la distribution de *Student* $f(t; 9)$ pour trouver la valeur p qui correspond à T pour la comparer à **0,05**. On peut également trouver la valeur T_0 de t correspondant à **0,05** soit dans ce cas $T_0 = -2,3$ et comparer T et T_0 ; si $T < T_0$ on rejette (H_0) et on accepte (H_1) (la concentration a diminuée significativement pendant les **10** jours) sinon on n'aura aucune raison de rejeter (H_0) .

2.4. Régression linéaire simple et multiple

On considère un ensemble de N points expérimentaux $P_i (x_i ; y_i)$ et on cherche dans un premier temps à trouver une fonction $y = f(x)$ dont le graphe (G_f) passe par tous ces points. Dans la plupart des cas, cela n'est possible qu'en utilisant une fonction à N paramètres qui tout en étant complexe, aura généralement un graphe d'allure serpentine. En plus, la capacité prédictive de cette équation sera souvent très faible puisque les valeurs x_i et y_i qui sont des grandeurs mesurées expérimentalement renferment certainement des erreurs de mesure qui interviendront dans la détermination des paramètres (**Figure 2.1**).

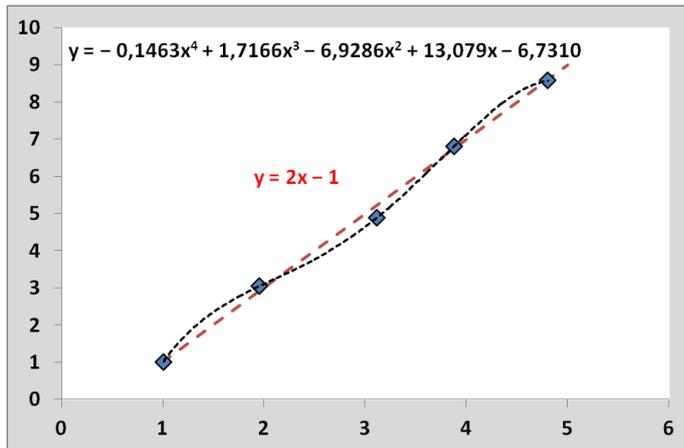


Figure 2. 1 Exemple d'une modélisation avec trop de paramètres

En partant de $y = 2x - 1$ comme relation théorique, les valeurs des coordonnées de 5 points choisis ont été légèrement modifiées en y introduisant une erreur aléatoire de $\pm 5\%$. Une fonction polynômiale de 4^{ème} degré $y = -0,14630x^4 + 1,7166x^3 - 6,9286x^2 + 13,079x - 6,7310$ a été nécessaire pour avoir un graphe passant par tous les points qui paraît nettement de valeur prédictive faible en serpentant autour du graphe exacte en le touchant juste 4 fois.

Pour corriger ces défauts, il faut être moins exigeant dans la formulation du problème : au lieu que le graphe passe par tous les points, on demande juste qu'il s'approche au maximum de ces points. Dans ce cas, $f(x)$ aura certainement un nombre p de paramètres strictement inférieur au nombre N des points, soit donc $p < N$. La différence $(N - p) > 0$ est appelée « degré de liberté » et exprime comme le montre son nom, à quel degré le graphe (G_f) est-il libéré des points expérimentaux. Il faut noter que dans ce cas, on a presque toujours $y_i \neq f(x_i)$ et on appelle « résidus » ou « erreurs » les différences $\epsilon_i = y_i - f(x_i)$; un modèle est autant « bon » que les ϵ_i sont faibles. Pour déterminer les paramètres, on a recours à des techniques mathématiques connues sous le nom de « calculs de régression ». Si $f(x)$ est la fonction affine $f(x) = ax + b$, on parle d'une « régression linéaire simple ». Il existe beaucoup de méthodes pour calculer a et b , mais la méthode dite « droite des moindres carrés » minimisant la somme des carrés des erreurs (SCE) est la plus populaire :

$$\begin{aligned} SCE &= \sum_{i=1}^N \epsilon_i^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - ax_i - b)^2 = \sum_{i=1}^N (y_i^2 + a^2x_i^2 + b^2 - 2ax_iy_i - 2by_i + 2abx_i) \\ &= \sum_{i=1}^N y_i^2 + a^2 \sum_{i=1}^N x_i^2 + Nb^2 - 2a \sum_{i=1}^N x_iy_i - 2b \sum_{i=1}^N y_i + 2ab \sum_{i=1}^N x_i \end{aligned}$$

Si on divise cette somme par N et on note par \bar{U} la moyenne arithmétique d'une grandeur u_i définie par $\bar{U} = \sum u_i / N$ on aura :

$$\frac{SCE}{N} = \bar{Y}^2 + a^2 \bar{X}^2 + b^2 - 2a \bar{X}\bar{Y} - 2b \bar{Y} + 2ab \bar{X}$$

On calcule les dérivées partielles de **SCE/N** par rapport à **a** et **b** :

$$\frac{1}{N} \cdot \frac{\partial(\text{SCE})}{\partial a} = 2a \bar{X}^2 - 2 \bar{X}\bar{Y} + 2b \bar{X}$$

$$\frac{1}{N} \cdot \frac{\partial(\text{SCE})}{\partial b} = 2b - 2 \bar{Y} + 2a \bar{X}$$

La fonction **SCE** passe par un minimum lorsque ces dérivées partielles sont nulles et on aura après simplification le système d'équation suivant :

$$\begin{cases} a \bar{X}^2 + b \bar{X} = \bar{X}\bar{Y} \\ a \bar{X} + b = \bar{Y} \end{cases}$$

Soit en notation matricielle :

$$\begin{bmatrix} \bar{X}^2 & \bar{X} \\ \bar{X} & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a \\ b \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \bar{X}\bar{Y} \\ \bar{Y} \end{bmatrix}$$

Ainsi, les valeurs de **a** et **b** sont facilement calculées :

$$a = \frac{\bar{X}\bar{Y} - \bar{X} \cdot \bar{Y}}{\bar{X}^2 - (\bar{X})^2} ; b = \frac{\bar{X}^2 \cdot \bar{Y} - \bar{X}\bar{Y} \cdot \bar{Y}}{\bar{X}^2 - (\bar{X})^2} = \bar{Y} - a \bar{X}$$

Il reste à évaluer la qualité du modèle obtenu. Cela se fait grâce à un test connu sous le nom ANOVA (de l'anglais « ANalysis Of Variance ») et qui veut dire « analyse de la variance ». Pour exposer cette méthode brièvement, on reprend l'expression de **SCE/N** en y remplaçant **b** en termes de **a** :

$$\frac{\text{SCE}}{N} = [\bar{Y}^2 - (\bar{Y})^2] - a^2 [\bar{X}^2 - (\bar{X})^2]$$

Les quantités $\bar{Y}^2 - (\bar{Y})^2$ et $\bar{X}^2 - (\bar{X})^2$ sont appelées les variances de **y** et **x** respectivement. D'après le modèle **y = ax + b**, le terme $a^2 [\bar{X}^2 - (\bar{X})^2]$ est la variation de **y** due à la variation de **x**. La somme des carrés totale (**SCT**) et la somme des carrés de régression (**SCR**) sont définies par :

$$\bar{Y}^2 - (\bar{Y})^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{Y})^2 = \frac{\text{SCT}}{N}$$

$$a^2 [\overline{X^2} - (\overline{X})^2] = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (ax_i - a\overline{X})^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \overline{Y})^2 = \frac{SCR}{N}$$

Soit enfin : **SCT = SCR + SCE** qui veut dire que la variation totale de y est la somme de la variation expliquée par la régression et de la variation due à l'erreur.

On définit le « coefficient de détermination » **R²** comme la proportion de la variation expliquée par le modèle dans la variation totale :

$$R^2 = \frac{SCR}{SCT} = \frac{a^2 [\overline{X^2} - (\overline{X})^2]}{[\overline{Y^2} - (\overline{Y})^2]} = \frac{[\overline{XY} - \overline{X} \cdot \overline{Y}]^2}{[\overline{X^2} - (\overline{X})^2][\overline{Y^2} - (\overline{Y})^2]}$$

La racine carré **R** est appelée « coefficient de corrélation de Pearson » et a le même signe que la pente **a**. Une valeur de **R²** qui s'approche de **1** montre que l'erreur du modèle est faible :

$$R^2 = \frac{SCR}{SCT} = 1 - \frac{SCE}{SCT}$$

Malheureusement, l'expression de **R²** ne prend en considération ni le nombre des points expérimentaux **N**, ni le nombre des paramètres **p** du modèle. Or, il est évident que si deux modèles ont même **R²**, celui ayant plus de points et moins de paramètres, sera un meilleur modèle ; de ce fait, on a défini un coefficient de détermination ajusté **R²_{aj}** où la **SCE** et la **SCT** sont divisées chacune par le nombre de degrés de liberté respectifs (**N - p**) et (**N - 1**) :

$$R_{aj}^2 = 1 - \frac{SCE/(N - p)}{SCT/(N - 1)} = 1 - (1 - R^2) \frac{N - 1}{N - p} \quad ; \quad 1 - R_{aj}^2 = (1 - R^2) \frac{N - 1}{N - p}$$

Le facteur $\frac{N-1}{N-p}$ est appelé « facteur d'ajustement » ; il est toujours supérieur à **1**. Si ce facteur devient de plus en plus grand, on aura l'exigence que **R²** soit de plus en plus grande afin d'avoir un ajustement suffisant du modèle.

Si R^2 exprime tout le signal de sortie du modèle, R^2_{aj} exprime la partie du signal qui correspond à la vraie réponse. Par suite, la différence ($R^2 - R^2_{aj}$) peut être vue comme le bruit de fond du modèle. La statistique de Fisher F est calculée par :

$$F = \frac{SCR/(p - 1)}{SCE/(N - p)} = \frac{R^2}{R^2 - R^2_{aj}} = \frac{\text{signal}}{\text{bruit de fond}}$$

Pour valider le modèle et être sûr qu'aucun des points expérimentaux n'est aberrant, on calcule un « coefficient de détermination de la prédiction » généralement noté Q^2 .

En écartant un à un les points expérimentaux, la régression permet de prédire (\check{y}_i) la valeur écartée (y_i) en utilisant les ($N - 1$) points restants ; Q^2 est alors le R^2 de l'équation $\check{y} = py + q$.

Un exemple simple permet de fixer les idées :

Soient les 5 points $A_1 (0 ; 1)$, $A_2 (1 ; 3)$, $A_3 (2 ; 5)$, $A_4 (3 ; 4)$ et $A_5 (4 ; 6)$

- La régression donne : $\hat{y} = 0,9x + 2,2$ avec $R^2 = 81\%$
- Puisque le nombre de points $N = 5$ et le nombre de paramètres $p = 2$, le coefficient ajusté de détermination :

$$R^2_{aj} = 1 - (1 - R^2)(N - 1)/(N - p) = 1 - (1 - 0,81)(5 - 1)/(5 - 2) = 74,67\%$$

et par suite le rapport signal/bruit $F = 0,81/(0,81 - 0,7467) = 12,79$

- La régression sans A_1 donne : $\check{y}_1 = 0,8x + 2,5$ soit donc $\check{y}_1 = 2,5$;
 - La régression sans A_2 donne : $\check{y}_2 = 0,886x + 2,257$ soit donc $\check{y}_2 = 3,143$;
 - La régression sans A_3 donne : $\check{y}_3 = 0,9x + 1,95$ soit donc $\check{y}_3 = 3,75$;
 - La régression sans A_4 donne : $\check{y}_4 = 1,029x + 2,2$ soit donc $\check{y}_4 = 5,287$;
 - La régression sans A_5 donne : $\check{y}_5 = 0,8x + 2,3$ soit donc $\check{y}_5 = 5,5$;
- Soit enfin la droite $\check{y} = 0,6607y + 1,3932$ avec $Q^2 = 62,84\%$

La « régression linéaire multiple » est l'extension des mêmes principes illustrés ci-dessus mais avec plusieurs variables d'entrée :

$$y = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \dots + a_kx_k + a_0.$$

Puisque la régression n'exige pas que les variables d'entrée soient indépendantes, on peut former des variables par multiplication des variables entre elles. Si par exemple on a deux variables d'entrée x_1 et x_2 , et on désire modéliser la variable de sortie y par un polynôme de second degré, on peut exprimer y de la façon suivante :

$$y = a_1x_1 + a_2x_2 + a_{1,2} x_1 x_2 + a_{1,1} x_1^2 + a_{2,2} x_2^2 + a_0$$

Pour comparer les effets des différentes variables d'entrée sur la variable de réponse, on a l'habitude d'utiliser des variables centrées en 0 et ayant des échelles normalisées entre -1 et $+1$. Par exemple, si on désire tester x_1 entre 100 et 300 ainsi que x_2 entre 25 et 65 , on les remplace par deux variables X_1 et X_2 co-centrées en 0 et de même échelle :

$$X_1 = \frac{x_1 - \frac{300 + 100}{2}}{\frac{300 - 100}{2}} = \frac{x_1 - 200}{100} \quad ; \quad X_2 = \frac{x_2 - \frac{65 + 25}{2}}{\frac{65 - 25}{2}} = \frac{x_2 - 45}{20}$$

2.5. Modélisation de la surface de réponse et plans d'expérience

La méthodologie de la surface de réponse (RSM) (de l'anglais « Response Surface Methodology ») consiste à modéliser le résultat ou « variable de sortie Y » d'une expérience appelé « réponse » par une « fonction de transfert » des « variables d'entrée X_i » correspondant généralement à des conditions expérimentales. En général, la fonction de transfert la plus utilisée pour v variable d'entrée est la suivante :

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^v b_i X_i + \sum_{\substack{i=1 \\ j \geq i}}^v b_{i,j} X_i X_j$$

Le nombre de paramètre à déterminer est $p = \frac{(v+1)(v+2)}{2}$ (pour $v = 2 ; 3$ et 4 on a respectivement $p = 6 ; 10$ et 15) ; le nombre N de points expérimentaux nécessaires pour déterminer ces p paramètres doit donc en être supérieur ou égal ($N \geq p$). Pour un point expérimental, on peut choisir librement les variables d'entrée X_i et déterminer la réponse Y correspondante et ensuite utiliser la régression linéaire multiple pour calculer les coefficients.

Cependant, il est pratiquement avantageux de choisir les X_i d'une façon systématique : cette façon est appelée la technique des « plan d'expériences ».

Un plan d'expérience (DOE) (de l'anglais « Design Of Experiments ») est donc une distribution systématique des coordonnées X_i dans l'espace des v variables d'entrée. Il existe plusieurs type de plans d'expériences ; le type de plan utilisé dans ce travail est appelé « plan centré composite » (CCD) (de l'anglais « Central Composite Design »). Ce plan est d'abord « centré » parce que les variables d'entrée seront toutes transformées pour être co-centrées en un point central O qui constituera l'origine commune des v axes dans l'espace de ces v variables.

Ce plan est ensuite « composite » car il est l'association d'un « plan factoriel » et de « points axiaux ». Un plan factoriel est l'ensemble de points expérimentaux ayant tous les coordonnées égales à ± 1 , et d'après cette définition il y aura 2^v points de ce type (pour $v = 2 ; 3$ et 4 on a respectivement $2^v = 4 ; 8$ et 16).

Un point axial est tel que toutes ses coordonnées sont zéro sauf une ; d'habitude, on prend deux points axiaux symétriques par rapport à l'origine sur chacun des v axes et il y aura $2v$ points de ce type (pour $v = 2 ; 3$ et 4 on a respectivement $2v = 4 ; 6$ et 8). Le nombre total des points expérimentaux factoriels et axiaux est donc $(2^v + 2v) = 8 ; 14$ et 24 pour $v = 2 ; 3$ et 4 , déjà suffisant pour déterminer les p paramètres de la fonction de transfert de second degré. Si en plus, on mène l'expérience centrale 4 fois, le nombre de points expérimentaux total est donc $N = 2^v + 2v + 4$ et on aura suffisamment de degrés de liberté $(N - p) = 6 ; 8$ et 13 pour $v = 2 ; 3$ et 4 .

Tableau 2.1 Caractéristiques des plans centrés composés pour 2, 3 ou 4 variables

nombre des variables	nombre des paramètres	nombre de points factoriels	nombre de points axiaux	nombre total de points	facteur d'ajustement	exigence que R^2 soit supérieure à
v	$p = \frac{(v+1)(v+2)}{2}$	2^v	$2v$	$N = 2^v + 2v + 4$	$\frac{N-1}{N-p}$	
2	6	4	4	12	1,833	89,3 %
3	10	9	6	19	2,000	90,9 %
4	15	16	8	28	2,077	91,5 %

2.6. Modélisation non-linéaire

On considère dans ce qui suit le modèle non-linéaire le plus utilisé dans ce travail qui est le modèle logistique définie comme ci-dessous :

$$G(t) = A + \frac{B}{1 + e^{\alpha(t-\tau)}}$$

Il existe trois méthodes pour déterminer les quatre paramètres **A**, **B**, α et τ qui sont la régression après linéarisation, la régression non-linéaire et l'analyse différentielle.

2.6.1. Régression après linéarisation

Il s'agit d'abord de déterminer approximativement **A** et **B** à partir des données expérimentales ; en effet, la limite $G(t \rightarrow +\infty) = A$ et la limite $G(t \rightarrow -\infty) = A + B$ ce qui permet de prendre $A = G_f$ (G_f est la valeur finale de **G**) et $B = G_i - G_f$ (G_i est la valeur initiale de **G**).

L'équation du modèle logistique est donc réécrite :

$$G(t) = G_f + \frac{G_i - G_f}{1 + e^{\alpha(t-\tau)}} \Rightarrow \frac{G_i - G_f}{G(t) - G_f} = 1 + e^{\alpha(t-\tau)} \Rightarrow \frac{G_i - G(t)}{G(t) - G_f} = e^{\alpha(t-\tau)}$$

La linéarisation est réalisée en appliquant la fonction logarithmique à cette dernière égalité qui devient :

$$\ln \left(\frac{G_i - G(t)}{G(t) - G_f} \right) = \alpha(t - \tau) = \alpha t - \alpha \tau$$

Il suffit alors de prendre $y = \ln \left(\frac{G_i - G(t)}{G(t) - G_f} \right)$ en ordonnées et le temps **t** en abscisses et déterminer par régression les coefficients α et **c** de l'équation $y = \alpha \cdot t + c$ et déduire finalement $\tau = -c / \alpha$.

2.6.2. Régression non-linéaire

Il s'agit de tester un grand nombre de valeurs pour les paramètres **A**, **B**, α et τ et choisir les valeurs qui minimisent la somme des carrés des écarts **SCE** défini par :

$$\sum_{i=1}^n \left(G(t_i) - A + \frac{B}{1 + e^{\alpha(t_i-\tau)}} \right)^2$$

Cette méthode est réalisée en utilisant un ordinateur qui peut tester un nombre énorme de valeurs en un temps assez court.

2.6.3. Analyse différentielle

Il s'agit de déterminer une équation différentielle qui ne contient pas la variable indépendante t ; ainsi :

$$G(t) = A + \frac{B}{1 + e^{\alpha(t-\tau)}} \Rightarrow \frac{G(t) - A}{B} = \frac{1}{1 + e^{\alpha(t-\tau)}} \Rightarrow e^{\alpha(t-\tau)} = \frac{A + B - G(t)}{G(t) - A}$$

$$G(t) = A + \frac{B}{1 + e^{\alpha(t-\tau)}} \Rightarrow G'(t) = -\frac{\alpha B e^{\alpha(t-\tau)}}{(1 + e^{\alpha(t-\tau)})^2} = \frac{\alpha}{B} [G(t) - (A + B)][G(t) - A]$$

$$G'(t) = \frac{\alpha}{G_i - G_f} [G(t) - G_i][G(t) - G_f]$$

On peut alors prendre la dérivée G' en ordonnées et G en abscisses et déterminer par régression les coefficients de l'équation de second degré $G' = p \cdot G^2 + q \cdot G + r$. On arrive alors à déterminer G_i et G_f comme les racines de cette équation et $\alpha = p (G_i - G_f)$. Enfin, on détermine le paramètre τ comme la moyenne quadratique suivante :

$$\tau = \frac{1}{\alpha} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[\alpha t - \ln \left(\frac{G_i - G(t_i)}{G(t_i) - G_f} \right) \right]^2}$$

CHAPITRE 3

DEGRADATION DE LA CARBAMAZEPINE PAR LES BOUES ACTIVEES

CHAPITRE 3 : DEGRADATION DE LA CARBAMAZEPINE PAR DES BOUES ACTIVEES

3.1. Introduction

D'après la littérature scientifique examinée dans le premier chapitre, le procédé conventionnel utilisant les boues activées (BA) dans les stations d'épuration (STEP) n'était pas capable d'éliminer la carbamazépine (CBZ) avec une efficacité acceptable : des taux d'élimination inférieurs à 20 % et voire quelques fois négatifs sont rapportés. De ce fait, il faudrait examiner de près ce procédé pour en tirer le maximum de profit en essayant de le perfectionner autant que possible avant de passer à d'autres procédés plus sophistiqués ; le procédé BA est en effet le système le plus simple et le moins onéreux envisageable dans le domaine du traitement des eaux.

Les expériences menées pour examiner la performance des BA vis-à-vis de l'élimination de la CBZ ont été réalisées en trois temps :

- des tests préliminaires pour caractériser et quantifier d'éventuelles photolyse, thermolyse, biosorption et toxicité de la CBZ dans les boues activées. Les résultats de ces tests feront l'objet de la section §3.2.
- des essais de « biostimulation », c'est-à-dire examiner l'effet de l'ajout de différents co-substrats carbonés sur les boues activées et évaluer leur impact sur le taux d'élimination de la carbamazépine ; les résultats correspondants seront présentés dans la section §3.3.
- une « optimisation » des conditions opératoires ; on s'intéressera tout particulièrement aux vitesses d'agitation et d'aération. Ces aspects seront explicités dans la section §3.4.

3.2. Tests préliminaires

3.2.1. Photolyse ou thermolyse

Pour réaliser ces tests, des solutions de volume **250 mL** de **CBZ** à **1** et **10 mg L⁻¹** sont préparées soit dans l'eau ultra-pure (**EUP**), soit dans le milieu minéral de base (**MMB**) pour comparer et voir si les sels minéraux peuvent affecter la cinétique de ces phénomènes (**Tableau 3.1**).

Tableau 3.1 Désignations des solutions et résultats des tests pour photolyse et thermolyse

Prétraitement [CBZ] / mg·L ⁻¹	Photolyse		Thermolyse	
	1	10	1	10
Dans l'EUP	E ₁ P	E ₁₀ P	E ₁ T	E ₁₀ T
Dans le MMB	M ₁ P	M ₁₀ P	M ₁ T	M ₁₀ T

La concentration [CBZ]/(mg L⁻¹) est suivie pendant **14 jours** (**n = 14**), la moyenne est calculée et le test de *Student* (**t > -2,16**) permet de conclure que toute diminution est non-significative (**p > 0,05**).

(H₀) : m = m₀ ; hypothèse acceptée

(H₁) : m < m₀ ; hypothèse rejetée

Solution testée moyenne (m) ± écart-type (σ)	E ₁ P	E ₁₀ P	E ₁ T	E ₁₀ T
	0,989 ± 0,031 t = -1,28 ; p = 0,11	9,93 ± 0,38 t = -0,68 ; p = 0,25	1,001 ± 0,031 t = 0,13 ; p = 0,45	10,01 ± 0,28 t = 0,15 ; p = 0,44
t de <i>Student</i> ; signifiante p	M ₁ P	M ₁₀ P	M ₁ T	M ₁₀ T
	1,006 ± 0,024 t = 0,93 ; p = 0,18	10,03 ± 0,33 t = 0,33 ; p = 0,37	1,010 ± 0,032 t = 1,12 ; p = 0,14	9,96 ± 0,30 t = -0,54 ; p = 0,30

Pour évaluer la photolyse, quatre solutions (**E₁P**, **M₁P**, **E₁₀P** et **M₁₀P**) sont mises dans des récipients en verre transparent fermés par des bouchons pour empêcher l'évaporation, et ont été placées à la lumière naturelle et à température ambiante, et sont mis sous agitation à **300 tr min⁻¹** pendant **14 jours**.

Pour évaluer la thermolyse, quatre autres solutions (**E₁T**, **M₁T**, **E₁₀T** et **M₁₀T**) sont préalablement passées à l'autoclave pendant **20 minutes** à **121°C** avant d'être traitées suivant le protocole adopté pour examiner un possible impact de la photolyse.

Le dosage de la **CBZ** durant la durée de l'expérience montre des concentrations invariables à l'incertitude expérimentale près pour toutes les configurations testées : la conclusion est donc qu'il y a ni photolyse ni thermolyse de la carbamazépine dans les conditions de ces expériences.

3.2.2. Biosorption

Pour réaliser ce test, des solutions de volume **250 mL** de **CBZ** à **5 mg L⁻¹** sont préparées dans le milieu minéral de base (**MMB**) et stérilisées à l'autoclave.

Des boues activées lavées (**BAL**) sont soumises à l'autoclavage pour inactiver les microorganismes ; ces boues seront ajoutées à raison de **0,8 ; 1,6 et 2,4 g L⁻¹** de solides en suspension (**MS**) à trois des solutions stérilisées ci-dessus (**T₁, T₂ et T₃**), et agitées à **300 tr min⁻¹** pendant **14 jours** à la température ambiante pour évaluer la biosorption sur biomasse thermiquement désactivée.

À trois autres des solutions stérilisées (**C₁, C₂ et C₃**), de l'azoture de sodium **NaN₃** est d'abord ajouté à **0,2 g L⁻¹** avant que des boues activées lavées à biomasse vivante ne soient ajoutées aux mêmes concentrations en **MS** que ci-dessus. Ces solutions sont alors agitées à **300 tr min⁻¹** pendant **14 jours** à température ambiante pour évaluer une éventuelle biosorption sur biomasse chimiquement désactivée. En effet, la présence de **NaN₃** entraîne un arrêt de la respiration cellulaire et de ce fait inactive les cellules.

Afin de servir comme des témoins de comparaison, trois autres solutions stérilisées (**V₁, V₂ et V₃**) sont égalementensemencées par des **BAL**, mais non inactivées, agitées de même et suivies pendant seulement les trois premières heures de culture (une durée suffisamment courte pour pouvoir négliger toute éventuelle biodégradation) (**Tableau 3.2**).

Pour les suspensions de biomasse inactivée, le pourcentage de la **CBZ** ad/absorbée (**p**) est sensiblement proportionnel à la concentration en solide **[X]** ; en effet si le terme **K_d [X]** est négligeable devant l'unité, la relation devient pratiquement linéaire :

$$p = K_d [X] / (1 + K_d [X]) \approx K_d [X]$$

On calcule donc $K_d = 8,3 \text{ L kg}^{-1}$ pour ce type de biomasse, ce qui permet de calculer approximativement la fraction en carbone organique $f_{co} \approx 0,083$ des boues activées utilisées en considérant une valeur $\log K_{co} \approx 2$ d'après la littérature [251]. Cette fraction est très faible ce qui laisse supposer une minéralisation de la biomasse lors de sa désactivation thermique.

Pour les suspensions de biomasse inactivées chimiquement par du NaN_3 , le pourcentage de **CBZ** ad/absorbée (**p**) augmente d'abord d'un facteur **1,73** lorsque la concentration en solide **[X]** double de **0,8** à **1,6 g L⁻¹**, puis diminue ensuite de ce même facteur pour une nouvelle augmentation de **[X]** à **2,4 g L⁻¹**; une interprétation possible de cette diminution du pouvoir adsorbant pour des concentrations élevées en biomasse est que dans ce cas, les microorganismes n'ont pas été totalement inactivés par le traitement chimique et peuvent donc produire des polymères assurant leur floculation en des amas de diamètres importants, ce qui aboutit à une diffusion difficile de la molécule dans la phase solide. On calcule alors respectivement :

$$[X] = 0,8 ; 1,6 \text{ et } 2,4 \text{ g L}^{-1} \text{ on a : } K_d = 32,5 ; 28,1 \text{ et } 10,8 \text{ L kg}^{-1}$$

Si on considère que la constante K_d est inversement proportionnelle au volume moyen des floccs supposés sphériques de rayons **R**, on peut donc calculer :

$$R_{([X] = 1,6)} = 1,05 R_{([X] = 0,8)} \text{ et } R_{([X] = 2,4)} = 1,44 R_{([X] = 0,8)}$$

Tableau 3. 2 Désignation des suspensions en batch et résultats des tests de biosorption

	Biomasse thermiquement tuée			Biomasse chimiquement désactivée			Biomasse vivante (témoin)		
Prétraitement	autoclave			azoture de sodium			aucun		
[MS] / (g L⁻¹)	0,8	1,6	2,4	0,8	1,6	2,4	0,8	1,6	2,4
Désignation	T ₁	T ₂	T ₃	C ₁	C ₂	C ₃	V ₁	V ₂	V ₃
% de la CBZ biosorbée	0,67	1,3	2,0	2,6	4,5	2,6	aucune biosorption n'est observée pendant les premières 3 h		
Rayon des floccs									

Le dosage de la **CBZ** durant l'expérience montre des pourcentages de **CBZ** ad/absorbée tous inférieurs à l'erreur expérimentale de **5 %** : la conclusion est donc que dans les conditions de ces expériences, toute sorption de la carbamazépine sur les boues activées est négligeable et que par la suite tout abattement notable durant les cultures peut être considéré comme dû exclusivement à de la biodégradation.

3.2.3. Toxicité de la carbamazépine

Pour réaliser ce test, deux méthodes différentes sont employées : le test *Microtox*® et la mesure de la **DBO₅**.

a- Le test *Microtox*® : une solution-mère de carbamazépine à **100 mg L⁻¹** contenant de l'éthanol à **10 %** est diluée au $\frac{1}{3}$ avec de l'eau distillée stérile, puis est utilisée dans le test *Microtox*® après filtration à travers des filtre-seringues stériles (**0,2 µm**) en suivant les dilutions standards de ce test qui aboutissent à mesurer la diminution de la luminescence de *Vibrio fischeri* pour les quatre concentrations en **CBZ** suivantes : **15 ; 7,5 ; 3,75 et 1,875 mg L⁻¹**.

La **Figure 3.1** montre qu'un simple modèle linéaire est suffisant pour décrire la faible variation du pourcentage d'inhibition observée dans le domaine de concentrations testées. La toxicité de la **CBZ** vis-à-vis de la bactérie *Vibrio fischeri* est donc très faible dans le domaine de concentrations considérées dans la présente étude (**[CBZ] < 10 mg L⁻¹**).

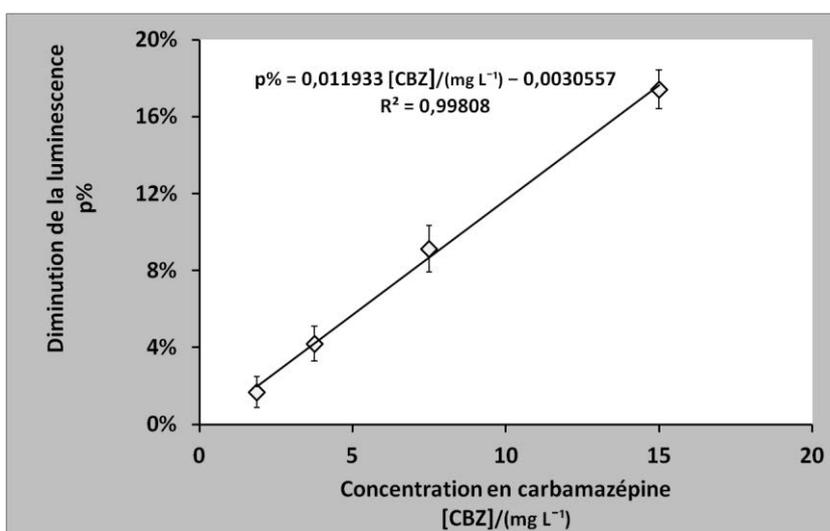


Figure 3. 1 Diminution de la luminescence de *Vibrio fischeri* lors du test *Microtox*®

Chaque point représente la moyenne de six valeurs résultantes de trois lectures dupliquées après **5 ; 15 et 30 minutes** de contact.

b- Mesure de la DBO_5 : la demande biochimique en oxygène pendant **5 jours** est d'abord mesurée en utilisant une concentration d'ensemencement en boues activées de $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Les essais suivants sont réalisés :

- 1- En présence de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de **CBZ** comme unique source de carbone.
- 2- En présence de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de **CBZ** et du glucose-glutamate à $21,53 \text{ mg L}^{-1}$ chacun.
- 3- En présence de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de **CBZ** et du glucose-glutamate à $21,53 \text{ mg L}^{-1}$ chacun.
- 4- En présence de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de **CBZ** et du glucose-glutamate à $21,53 \text{ mg L}^{-1}$ chacun.

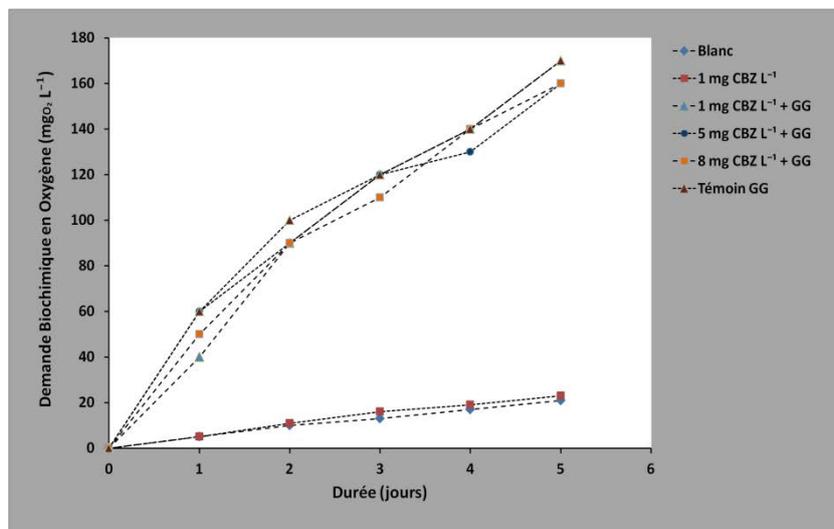


Figure 3.2 Évolution de la DBO pour des solutions de faibles concentrations en CBZ et Glucose-Glutamate

La présence de la **CBZ** avec les co-substrats glucose-glutamate n'affecte pas significativement la demande biochimique en oxygène ; les « **expériences 2, 3 et 4** » ci-dessus présentent toutes un profil de **DBO** similaire au profil d'une expérience effectuée avec le mélange glucose-glutamate seul. Par ailleurs, la DBO_5 de l'**expérience 1**, c'est-à-dire en présence de **CBZ** comme unique source de carbone, est différente de la DBO_5 d'un blanc analytique ne contenant aucune substance carbonée ; cependant, l'analyse de la **CBZ** présente dans la **bouteille 1** après les **5 jours** ne montre aucune consommation de cette substance. L'oxygène supplémentaire consommé correspond donc à une intensification de la respiration endogène de la biomasse en présence de **CBZ**. Ce résultat est en accord avec celui d'Aubenneau et al. [252] montrant une consommation supplémentaire d'oxygène lorsque la carbamazépine est ajoutée dans un bioréacteur de boues activées en batch consommant de l'éthanol comme substrat organique principal.

Une deuxième mesure de la DBO_5 est menée en utilisant une concentration d'ensemencement en boues activées de 5 g L^{-1} . Les essais suivants sont réalisés :

- 5- En présence de 1 mg L^{-1} de **CBZ** comme unique source de carbone.
- 6- En présence de 1 mg L^{-1} de **CBZ** et du glucose-glutamate à 130 mg L^{-1} chacun.
- 7- En présence de 5 mg L^{-1} de **CBZ** et du glucose-glutamate à 130 mg L^{-1} chacun.
- 8- En présence de 8 mg L^{-1} de **CBZ** et du glucose-glutamate à 130 mg L^{-1} chacun.

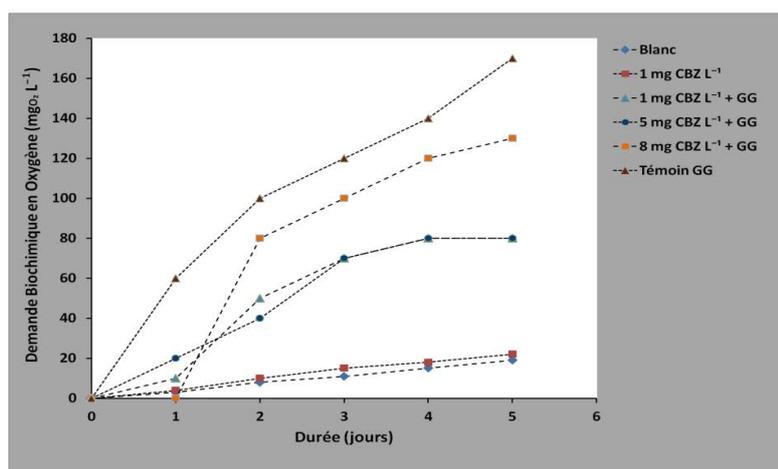


Figure 3.3 Évolution de la DBO pour des solutions de plus fortes concentrations en CBZ et Glucose-Glutamate

La différence entre le blanc et la bouteille 5 ($1 \text{ mg}_{\text{CBZ}} \text{ L}^{-1}$ comme unique composé carboné) est négligeable ; l'ensemencement à une concentration dix fois plus élevée en boues activées aboutit donc à une augmentation de la respiration endogène de façon à ce que l'effet de la **CBZ** sur cette respiration observée pour la bouteille 1 n'est plus ici appréciable. D'autre part, la différence entre le témoin **GG** et les bouteilles 6, 7 et 8 contenant respectivement 3, 5 et $8 \text{ mg}_{\text{CBZ}} \text{ L}^{-1}$ en plus des substrats carbonés glucose-glutamate (**GG**) est claire ; la **CBZ** a donc inhibé partiellement la respiration exogène de la biomasse qui oxyde alors moins de glucose-glutamate.

3.3. Biostimulation

Le but de cette partie de l'étude est de tester les performances d'élimination de la carbamazépine par des boues activées, en présence ou non d'un co-substrat carboné. À cette fin, différentes cultures sont conduites en mode batch dans des fioles coniques de volume de **500 mL**. Un milieu de culture minéral modifié à partir de celui proposé par Bajaj et al. [253], réparti à raison de **250 mL** par flacon est utilisé. Les cultures sont réalisées à un **pH** initial de **7**, à **22°C** et à une vitesse d'agitation de **210 tr min⁻¹**.

Trois co-substrats carbonés, à savoir le glucose, le tryptophane et le phénol, sont testés à une même concentration initiale de 2 g L^{-1}). Pour chaque co-substrat testé, les cultures sont effectuées en absence ou en présence du composé cible. La concentration initiale en **CBZ** ajoutée est de 10 mg L^{-1} . Des prises d'échantillons sont effectuées régulièrement pendant **21 jours**. Les principales variables mesurées sont : le **pH** du milieu, la turbidité à **600 nm** ainsi que les concentrations en carbamazépine et en co-substrats carbonés. Ces derniers sont analysés par chromatographie liquide haute performance.

Le principal travail expérimental réalisé est l'étude de l'évolution en batch d'une culture des boues activées mises en contact avec **CBZ** et en présence de différents sources de carbone. Pour ce faire, huit réacteurs (notés **R0, R0+, R1, R1+, R2, R2+, R3 et R3+**) sont mis en œuvre. Ils contiennent tous le même volume aqueux d'un milieu minéral exempt de carbone et la même concentration initiale en matière sèche provenant des mêmes boues activées ; ils diffèrent par la source de carbone ajoutée et/ou la présence de **CBZ** ou non (comme le montre le **Tableau 3.3**) :

Tableau 3.3 Répartition des solutions test de la biostimulation des boues activées

		Source de carbone ajoutée			
		<i>Aucune</i>	<i>Glucose</i>	<i>Phénol</i>	<i>Tryptophane</i>
Présence de CBZ	<i>Non</i>	R0	R1	R2	R3
	<i>Oui</i>	R0+	R1+	R2+	R3+

Des échantillons pris de chaque réacteur pendant **25 jours** ont permis de suivre l'évolution en matière sèche (MS), **pH**, **COT** et **NT** (dans les huit réacteurs), en **CBZ** (dans **R0+, R1+, R2+** et **R3+**), en glucose (dans **R1** et **R1+**), en phénol (dans **R2** et **R2+**) et en tryptophane (dans **R3** et **R3+**). Les résultats obtenus (**Figure 3.4**) ont montré que l'élimination de la CBZ est pratiquement négligeable en présence de boues activées non acclimatées quel que soit le milieu de culture testé. Il est important de noter que la présence du co-substrat carboné conduit uniquement à une augmentation de la concentration en biomasse dans ces milieux et que la présence du composé cible n'affecte pas l'activité métabolique des boues. De plus, il a été mis en évidence que selon la nature du co-substrat ajouté le comportement métabolique diffère. La métabolisation du glucose conduit à la formation de métabolites ayant un caractère acide tandis que le tryptophane conduit à des métabolites à caractère basique.

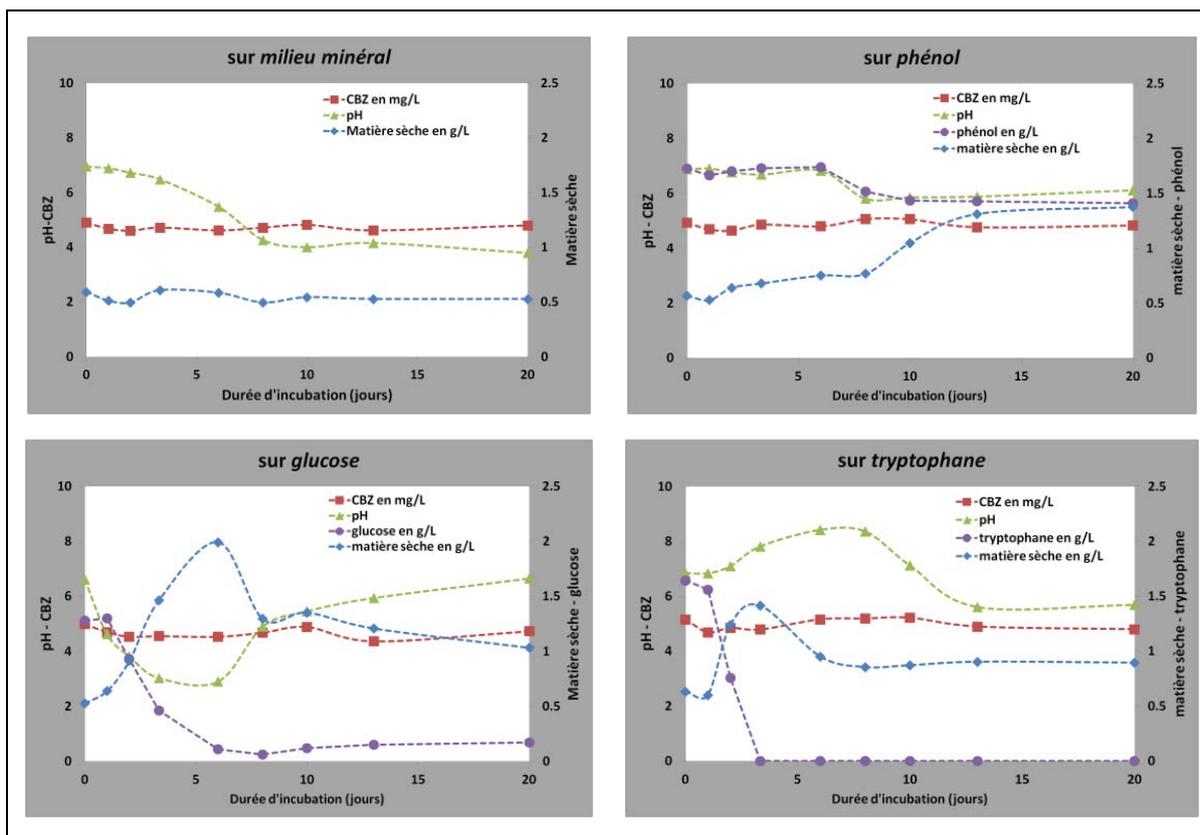


Figure 3. 4 Évolutions de la concentration en carbamazépine (CBZ), de pH, de la concentration du co-substrat carboné présent et de la matière sèche en tant qu'indice de la biomasse

Ces résultats sont en accord avec la littérature, c'est-à-dire que la carbamazépine est résistante au traitement biologique par des boues activées et ceci indépendamment du co-substrat carboné ajouté.

3.4. Étude de la biodégradation de la CBZ en réacteur batch

D'une manière générale, la biodégradation par des boues activées d'un composé dépend étroitement de plusieurs paramètres opératoires tels que la vitesse d'agitation, la température, la concentration en polluant et la teneur en oxygène dissous. Le but de cette étude est d'évaluer à l'échelle du laboratoire l'influence de deux paramètres ; le ratio en volume des phases (gazeuse et liquide) et la vitesse d'agitation sur la biodégradation de la carbamazépine par des boues activées. Une approche de modélisation de type plan d'expériences par un plan centré composite est utilisée. Des cultures en mode batch sont menées en fioles Erlenmeyer contenant un milieu minéral, à température ambiante, pendant **21 jours**.

Ces essais sont tous réalisés à un **pH** initial de **7**, une concentration en carbamazépine de **5 mg L⁻¹** et avec le même taux d'inoculation en boues activées. Les expériences ont été conduites pour des vitesses d'agitation comprises entre **80** et **320 tr min⁻¹** et des rapports de volume entre la phase gazeuse et la phase liquide allant de **0,2** à **5**. Des prélèvements sont périodiquement effectués pour suivre l'évolution du **pH**, de l'absorbance (à **600 nm**) et de la concentration en carbamazépine dans le milieu.

Les résultats obtenus lors de la modélisation statistique ont montré que les pourcentages d'abattement en carbamazépine restent faibles pour toutes les conditions opératoires testées. Toutefois, il est à remarquer qu'une limitation par l'oxygène a un effet positif sur l'élimination du polluant. De plus, il a été mis en évidence que pour de faibles rapports de volume entre la phase gazeuse et la phase liquide la vitesse d'agitation influe peu sur la biodégradation de ce composé. Dans le cas contraire, il est observé que la vitesse d'agitation a un effet négatif sur le taux d'élimination de cette molécule. Ceci peut s'expliquer d'une part, par l'inhibition de l'activité cellulaire due au phénomène de cisaillement et d'autre part par une dégradation difficile de la carbamazépine en milieu fortement oxygéné.

INFLUENCE OF STIRRING SPEED AND GAS-TO-LIQUID RATIO ON ACTIVATED SLUDGE PERFORMANCE IN CARBAMAZEPINE ELIMINATION USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY AND PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS

Samer Semrany^{1,2,3}, Samir Taha¹, Hayet Djelal^{2,3,4}, Lidia Favier^{2,3}, Abdeltif Amrane^{2,3*}

¹ Centre Azm pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, LBA3B, EDST Université Libanaise, Al-Mitein Street, Tripoli, Lebanon

² École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, Université de Rennes 1, Chimie et Ingénierie des Procédés, CNRS UMR 6226, 11 Allée de Beaulieu, CS 50837, 35708 Rennes Cedex 7, France

³ Université Européenne de Bretagne, 5 Boulevard Laënnec, 35000 Rennes, France

⁴ Ecole des Métiers de l'Environnement, Campus de Ker Lann, 35170 Bruz, France

Abstract

Activated sludge (AS) is the mainly used biological process in water treatment; therefore, it is relevant to assess the influence of various operational conditions on this process. This study aimed to evaluate at laboratory-scale the influence of the gas-to-liquid in-volume ratio ($R_{G/L}$) and the stirring speed (SS) on the biodegradation of carbamazepine (CBZ) by activated sludge. For this purpose, a central composite design (CCD) was used in association with response surface methodology (RSM). Batch cultures were carried out at room temperature for 21 days in a mineral medium of initial pH 7, containing CBZ at an initial concentration of 5 mg L^{-1} and a given amount of AS (achieving 0.05 AU at 600 nm). The two parameters SS and $R_{G/L}$ have been varied in the ranges of 80 to 320 rpm and 0.2 to 5, respectively. The pH, the (600 nm)-absorbance and the concentration of CBZ in the medium were monitored and their kinetics were modeled and linked to operational conditions using principal component analysis (PCA). The obtained results showed that a low content of oxygen has a high positive effect, while an extreme stirring speed has a tiny negative effect on the process yield.

Keywords: activated sludge, carbamazepine, composite central design, principal component analysis

* Author to whom all correspondence should be addressed: E-mail: abdeltif.amrane@univ-rennes1.fr;

Phone: + 33 (0)2 23 23 81 55; Fax: + 33 (0)2 23 23 81 99

1. Introduction

Activated sludge (AS) process is widely used in conventional biological treatment of wastewater. The organic compounds are degraded in activated sludge, aerobically or anaerobically. In fact, a consortium of microorganisms, mainly bacteria, is the basis of all current biological purification treatments. Biodegradation may be either complete (the pollutant is destroyed giving water, carbon dioxide and inorganic ions) or incomplete (the pollutant is degraded or partially transformed into organic metabolites), depending on the treated effluent (type and concentration of pollutants) and on the type of the involved microorganisms (Crini and Badot, 2008).

The presence of carbamazepine (CBZ), the main antiepileptic drug, was repeatedly reported in various waters (Ternes, 1998; Jones et al., 2002; Ferrari et al., 2004). This pharmaceutical is a slightly hydrophobic compound ($\log K_{o/w} = 2.45$), with negligible sorption capacities to the suspended solid particles of the activated sludge (Clara et al., 2004; Scheytt et al., 2005). Moreover, it is characterized by a weak solubility in water 17.7 mg L^{-1} to 112 mg L^{-1} (Ternes et al., 2002).

Concerning the elimination of carbamazepine (CBZ) by advanced oxidation processes (AOPs), the photodegradation by solar or UV irradiation (in absence/presence of TiO_2), the ozonolysis (O_3), and the oxidation by ClO_2 have been tested by Ternes et al. (2002). In some cases, the results showed a high yield of elimination of CBZ; unfortunately, some of these oxidation by-products are more recalcitrant or toxic than their parent compound. For example, acridine and acridone, the by-products of the ozonolysis of CBZ are irritating, mutagenic and carcinogenic compounds (Rizzo, 2011). For that reason, AOPs are not appropriate for the elimination of this compound (Rehman et al., 2013). Therefore, the search for new and efficient solutions for their treatment remains a topic of interest.

On the other hand, various studies have shown the CBZ resistance to conventional treatments used in wastewater treatment plants (WWTPs) (Ternes, 1998; Clara et al., 2004; Gebhardt and Schröder, 2007). Indeed, this molecule was found in the effluents of these plants (up to $6.3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) (Ternes, 1998; Öllers et al., 2001), in surface water (up to $1.1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) (Ternes, 1998; Andreozzi et al., 2003; Metcalfe et al., 2003) and even in drinking water (30 ng L^{-1}) (Ternes, 2001).

According to the reviewed literature, the elimination of carbamazepine (CBZ) through an activated sludge process at WWTP scale did not exceed 16% (Gebhardt and Schröder, 2007; Kosjek et al., 2009). However, it would be interesting to assess the influence of the different operating conditions on this process in order to understand the source of this limited degradation.

In fact, several operating parameters can affect the elimination yield of a given pollutant at both the large WWTP's scale and the laboratory's scale where the study usually starts in batch mode. The following four parameters appear to be the most influential: temperature, pollutant concentration, aeration rate, contact duration and spatial proximity between the purifying biomass in the AS and the pollutant.

The temperature, if moderately elevated, can accelerate the physical transfer phenomena and the rate of chemical and biochemical reactions. So the temperature appears to be the parameter of choice to optimize in laboratory study. Unfortunately, it is easy to control the temperature of a batch culture, but difficult at large scale such as in a WWTP, given the seasonal variations and the high cost of a system able to regulate and control this parameter for large volumes. Thus, optimizing the temperature at laboratory-scale is almost irrelevant since not really transposable to a WWTP.

Regarding the CBZ concentration, very low amounts ($\approx 5 \mu\text{g L}^{-1}$) are found in WWTP influents; infinity of other organic compounds that can be used by microorganisms for their metabolic needs are found in the treated water. Therefore, a recalcitrant pollutant such as CBZ will not be preferentially assimilated. For that reason, and to clearly highlight CBZ biodegradation trends, batch experiments carried out in this study were performed on a mineral medium, which did not contain organic matter other than the pollutant, to promote the consumption of carbamazepine. In addition, CBZ was added at a level one thousand fold above the concentrations usually observed in WWTPs in order to have enough material for a potential biomass growth in the absence of other readily biodegradable carbon source.

The contact between the purifying biomass and the pollutant is highly dependent on the biomass concentration, the residence time of the treated water in the basin, but also on the agitation speed. In a batch culture, this contact depends primarily on the stirring speed of the magnetic bar easily controlled at laboratory-scale. The aeration rate depends on the agitation but also on the intake of air blown by bubblers at the activated sludge basins. In the laboratory, and to simplify the design of batch cultures, no aeration system was used.

However, the rate of aeration in a reactor which is close to the atmosphere can be easily correlated to the volume of the gaseous phase (the headspace of the culture).

Therefore, two parameters were chosen in order to explore the operating conditions influencing the yield of CBZ degradation by AS, the stirring speed (*SS*) and the gas-to-liquid volume ratio (*R_{GL}*). An approach of central composite design (CCD) was used to find the individual effect of each of these factors and the effect of their interaction. Three parameters (pH, absorbance at 600 nm and CBZ residual concentration) were monitored during 21 days, and their kinetics was modeled. In a second step, the modeling of a polynomial response surface of second degree was considered to find the couples of conditions (*SS*; *R_{GL}*) leading to extreme (maximum and minimum) CBZ biodegradation. Principal component analysis (PCA) has been performed to visualize different correlations among the system parameters. Finally, the whole kinetics of the system was linked to operational conditions via multiple-linear regression, and a simplified mechanistic model was proposed in order to explain the system behavior.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Approach

The used mineral culture medium contained in one liter of ultra-pure water (Milli-Q, United States) the following minerals (Riedel-de-Haën, Germany): 1 g of NaH₂PO₄, 2 g of NH₄Cl and 4 g of KNO₃. The target compound, carbamazepine (CBZ) in powder form (99 % purity) was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). Stock solution of CBZ at 1 g L⁻¹ was prepared in pure ethanol and kept cool (4°C) until use. An adequate volume of this solution was spiked in the mineral medium to reach an initial concentration of 5 mg L⁻¹. The mixture pH was adjusted to 7. The culture medium was then sterilized in an autoclave (Raypa, Spain) at 121°C during 15 minutes to eliminate ethanol through volatilization. No thermal degradation of CBZ was observed during the sterilization process.

The used activated sludge was collected from a local WWTP (Tripoli, Lebanon) and maintained under aeration in a reactor of 10 L. A volume of 100 mL of sludge was centrifuged (4000 rpm, 5 min) and the supernatant containing organic matter was removed.

The sludge was subsequently washed three times with distilled water and then re-taken in suspension in 20 mL of distilled water. The culture medium was inoculated with an adequate volume of this suspension in order to obtain an initial (600 nm)-absorbance of 0.05 absorbance unit (AU).

The inoculated culture medium was then distributed into 12 Erlenmeyer flasks of identical capacity 500 mL following various volumes repartition ($V_L = 100, 220, 300, 380$ and 500 mL). These volumes corresponded to different gas-to-liquid volume ratios ($R_{G/L} = 0.2, 0.579, 1, 1.73$ and 5) respectively. Indeed, when a culture of liquid volume V_L is placed in a closed container of total volume $V_T = 600$ mL, the headspace representing the gaseous phase volume is $V_G = (V_T - V_L)$ (Fig. 1-a) and hence the gas-to-liquid volume ratio is $R_{G/L} = V_G/V_L$.

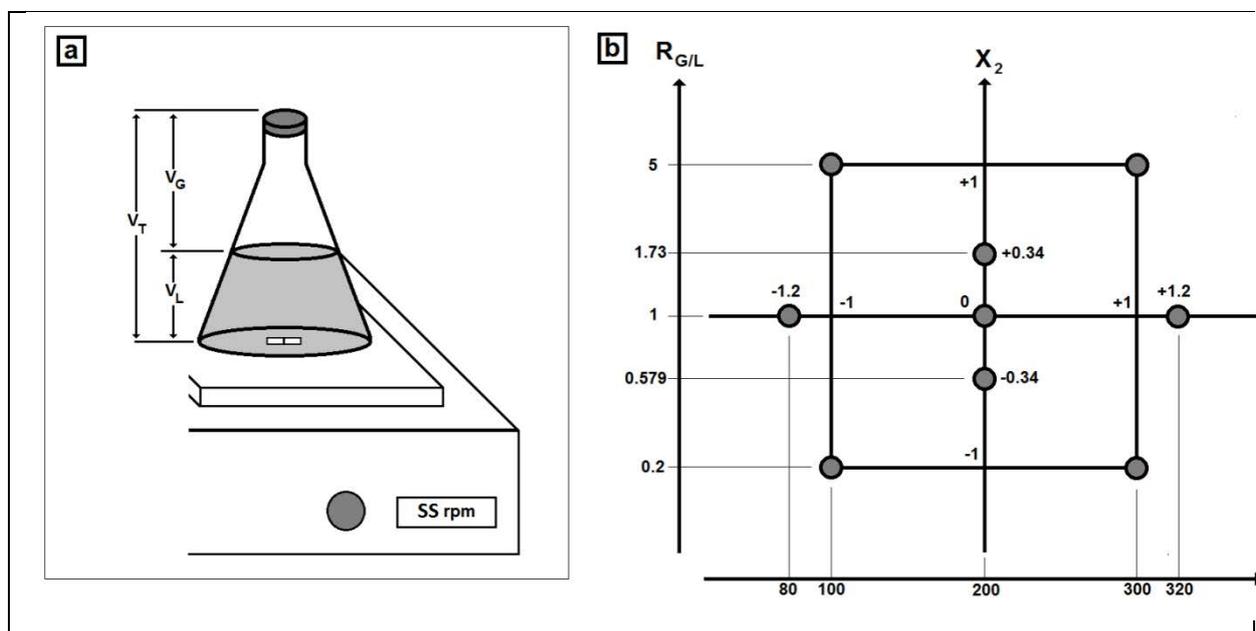


Fig. 1. (a) Schema explaining the operating conditions of a culture. (b) The central composite design of experiments used in this study.

Regarding the stirring speed, various rates were considered ($SS = 80, 100, 200, 300$ and 320 rpm) (WiseStir SMHS, Germany), in order to deal with the points of the design of experiments represented in Fig. 1-b. Samples were periodically taken during 21 days (at instants $t = 0, 3, 7, 10, 14, 17$ and 21 days) to monitor changes in the pH (pH-meter Orion 5 Star, Thermo Scientific, Germany), the (600 nm)-absorbance (spectrophotometer Evolution 60, Thermo Scientific, Germany) and the concentration of CBZ in the medium. The latter was determined by high pressure liquid chromatography (Hystar Agilent 1200 Series, Germany):

Zorbax Eclipse C₁₈ column (15 cm × 4.6 mm × 1.8 μm), isocratic elution [60% water : 40% acetonitrile] at 1 mL min⁻¹, injected volume 50 μL, retention time of 7 minutes and UV-absorption detection at 285 nm. The quantification was achieved through a calibration with a series of external standards ranging from 2 to 10 mg L⁻¹.

2.2 Design of Experiments

A central composite design (CCD) of experiments approach of five levels (Fig. 1-b) was adopted (Leustean et al., 2012). It permitted to quickly determine the individual and the combined effects of the two operating conditions (the stirring speed (*SS*) and the gas-to-liquid volume ratio (*R_{G/L}*)) and to determine their critical values leading to extreme (maximum and minimum) performance of the system. Each point of this design corresponded to one combination *SS* × *R_{G/L}* verified by one of the cultures (except the central point (0; 0) corresponding to a four times repeated culture). The *SS* was coded by variable *X₁* and the *R_{G/L}* by variable *X₂*. The mathematical relationships linking the real variables values to the coded variables were:

$$SS/rpm = 100 X_1 + 200 \quad (1)$$

$$R_{G/L} = (5)^{X_2} \quad (2)$$

3. Results and discussion

3.1. Modeling Results

Variation time courses of three parameters (the pH of the medium, the (600 nm)-absorbance and the concentration of CBZ) were modeled (Deriase et al., 2013) for each culture respectively by the three functions *pH(t)*, *A(t)* and *C(t)*.

Concerning *pH(t)*, because the observed values presented a weak fluctuation, a linear function of time was chosen to fit it:

$$pH(t) = a_{pH} t + pH_0 \quad (3)$$

While *pH₀* was the initial pH value already prefixed to 7, the slope *a_{pH}* indicates the average daily change of pH during the 21 days of culture. A positive or negative value of *a_{pH}* indicates the formation of alkaline or acidic products respectively.

The variation over time of the (600 nm)-absorbance was noted as $A(t)$ and modeled by an exponential saturation function (Mason et al., 2006), describing gradual move towards an upper limit:

$$A(t) = (A_{21} - A_0)(1 - e^{-\alpha t}) + A_0 \quad (4)$$

where A_0 and A_{21} were the measured values of (600 nm)-absorbance at instants $t = 0$ and $t = 21$ days, respectively. A_0 was already prefixed to 0.05 AU when seeding the culture medium. The parameter α is a pseudo-first order kinetic constant, describing the evolution of the medium (600 nm)-absorbance. This absorbance is conventionally used as an indicator of the medium turbidity correlated to biomass concentration. The accuracy of this conventional expectation is discussed through the obtained results.

The decrease in time of the CBZ concentration $C(t)$ was modeled by a bounded negative exponential function of parameter β describing the gradual evolution towards a lower limit:

$$C(t) = C_{21} + (C_0 - C_{21})e^{-\beta t} \quad (5)$$

The concentrations C_0 and C_{21} , measured respectively in the beginning and in the end of the culture duration, allowed to calculate the CBZ abatement percentage noted $Y\%$ as:

$$Y\% = \left(1 - \frac{C_{21}}{C_0}\right) \times 100\% \quad (6)$$

For each of the 12 cultures performed, the values of kinetic parameters a_{pH} , α and β , obtained using the models shown in equations (3), (4) and (5) respectively, were calculated and collected in Table 1. By plotting the parity graph (Fig. 2) representing the modeled values of pH, (600 nm)-absorbance and CBZ concentration versus the corresponding experimental values, a good alignment of the points on the $y = x$ bisector was noticed. Therefore, the considered models adequately described the experimental results with coefficients of determination $R^2 > 0.90$.

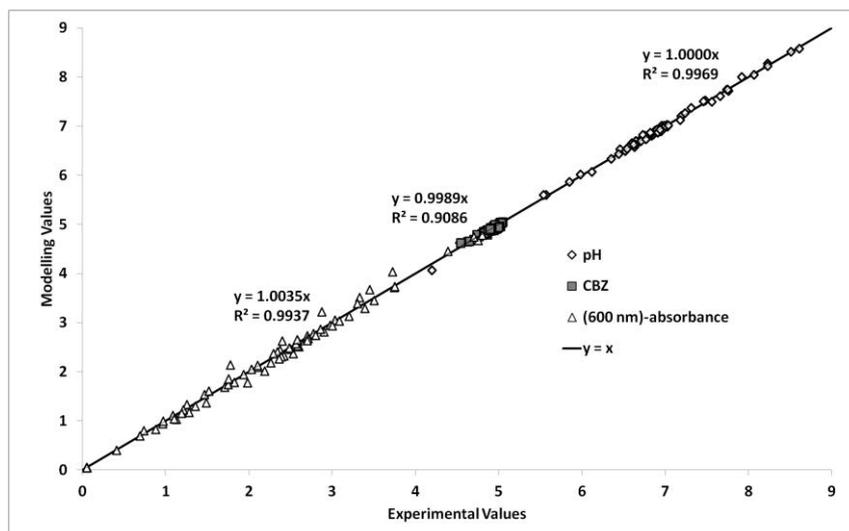


Fig. 2. Parity diagram representing the modeling values versus the experimental values.

Table 1. Results of modeling obtained for the different points of the central composite design (CCD)

<i>Real coordinates</i>		<i>Coded coordinates</i>		<i>pH model</i>	<i>(600 nm)-absorbance model</i>		<i>CBZ degradation model</i>		<i>Abatement Y%</i>	
<i>SS / rpm</i>	<i>R_{G/L}</i>	<i>X₁</i>	<i>X₂</i>	<i>a_{pH} / (10⁻³ day⁻¹)</i>	<i>A₂₁</i>	<i>α / (10⁻³ day⁻¹)</i>	<i>C₂₁ / (mg L⁻¹)</i>	<i>β / (10⁻³ day⁻¹)</i>	experimental	modeled
100	0.200	-1.00	-1.00	75.8	1.82	185	4.54	112	9.3	9.2
100	5.00	-1.00	1.00	-66.9	3.75	277	4.86	46.6	2.9	2.8
200	1.00	0.00	0.00	-20.1	2.60	162	4.82	56.1	3.5	3.5
200	1.00	0.00	0.00	-23.3	2.50	190	4.81	47.8	3.7	3.5
300	0.200	1.00	-1.00	72.6	3.20	180	4.54	116	9.2	9.4
300	5.00	1.00	1.00	-140	4.80	261	4.93	23.0	1.4	1.4
200	1.73	0.00	0.34	-16.0	2.90	168	4.89	32.5	2.2	2.6
200	0.579	0.00	-0.34	34.3	3.00	184	4.74	67.8	5.1	5.1
200	1.00	0.00	0.00	-15.7	2.80	187	4.81	52.3	3.7	3.5
200	1.00	0.00	0.00	-18.1	2.70	180	4.82	53.9	3.5	3.5
80	1.00	-1.20	0.00	-14.9	1.10	135	4.87	32.5	2.5	2.7
320	1.00	1.20	0.00	-27.7	3.50	200	4.89	30.5	2.1	2.0

The experimental CBZ abatement percentages during the 21 days of culture $Y\%$ (calculated from equation (6)) are also shown in the penultimate column of Table 1. A response surface was modeled (RSM) by a second degree transfer equation to express $Y\%$ depending on the linear terms X_1 and X_2 , the interaction term $X_1 X_2$ and the quadratic terms X_1^2 and X_2^2 . The variance analysis presented in Table 2, indicated that the fitted model was statistically meaningful with p -values < 0.05 for all terms, showing the significance of all terms. The lack of fit was not significant and the equation could be used to navigate the design space. Moreover, $R^2 = 99.5\%$ and Adjusted $R^2 = 99.1\%$, the determination coefficients were high, implying that in the studied domain more than 99% of the response variability was explained by the mathematical expression. Prediction $R^2 = 94.4\%$ was also high indicating a high predictive capacity of the model. The modeled values of $Y\%$ are shown in the last column of Table 1.

Pareto chart of the regression model is presented in Fig. 3. As it can be seen in this figure, the gas-to-liquid ratio represents with its linear X_2 and quadratic X_2^2 terms 95.0% of the response variability. On the other hand, the stirring speed represents with its linear X_1 and quadratic X_1^2 terms, together with the interaction term $X_1 X_2$ the remaining 4.5% of the response variability. Consequently, R_{GL} effect was considered highly significant and SS effect was found non-significant.

Table 2. Analysis of variance and regression results.

Total variance		Regression					Determination coefficients		
df^a	SS^b	df	SS	MS^c	F^d	p^e	R^2	Adjusted R^2	Prediction R^2
11	73.99	5	73.63	14.73	243.9	0.000	0.9951	0.9910	0.9438
Total error		Lack of fit							
df	SS	MS	df	SS	MS	F	p		
6	0.3622	0.0604	3	0.3222	0.1074	8.056	0.060		
Pure Error									
df	SS	MS							
3	0.0400	0.0133							
Equation									
	Intercept	Stirring speed		Interaction	G/L phases ratio				
		X_1	X_1^2	$X_1 X_2$	X_2	X_2^2			
Coefficient	+ 3.50 ± 0.25	- 0.30 ± 0.23	- 0.82 ± 0.33	- 0.35 ± 0.30	- 3.59 ± 0.29	+ 3.01 ± 0.43			
p -value	0.000	0.018	0.001	0.029	0.000	0.000			

^a degree of freedom; ^b Sum of squares; ^c Mean of squares; ^d Fisher means of squares ratio; ^e Significance (p -value).

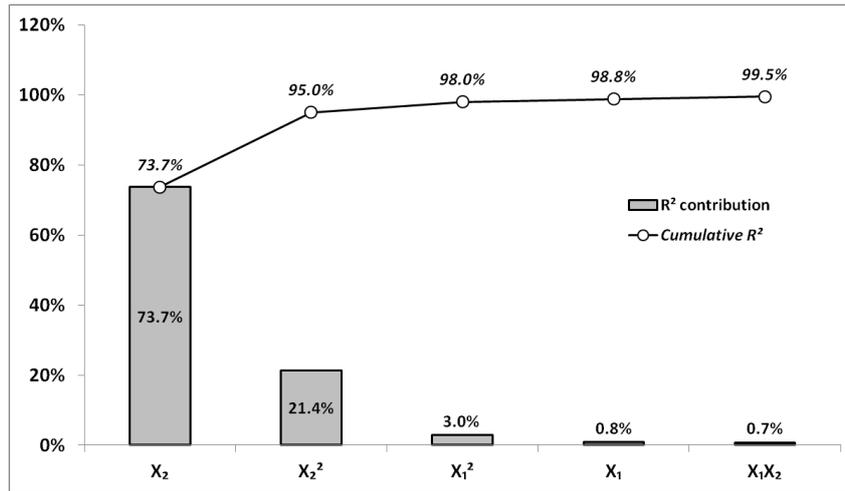


Fig. 3. Pareto chart illustrating the contribution to the determination coefficient R^2 of the stirring speed coded by X_1 and the gas-to-liquid ratio coded by X_2 , their squares and interaction.

The modeled equation of the response surface was re-written in terms of the real coordinates SS and $R_{G/L}$ in equations (7) and (7'):

$$Y\% = 10.1 - \left(\frac{SS - 203}{110.43}\right)^2 - \left[\frac{SS}{459.84} + \ln\left(\frac{23.4}{R_{G/L}}\right)^{1.16} \right] \ln\left(\frac{R_{G/L}}{0.2}\right) \quad (7)$$

$$= 0.62 + \ln^2\left(\frac{R_{G/L}}{2.92}\right)^{1.078} + \left[\ln\left(\frac{R_{G/L}}{0.2}\right) + \frac{SS - 85.3}{26.52} \right] \left(\frac{320 - SS}{459.84}\right) \quad (7')$$

Considering equation (7), it can be observed that the two negative variable terms will vanish if the values $SS = 203$ rpm and $R_{G/L} = 0.2$ are plugged in, maximizing $Y\%$ to 10.1%. This maximum degradation yield was consistent with those observed in other studies (Gebhardt and Schröder, 2007; Kosjek et al., 2009). Moreover, a higher gas-to-liquid ratio $R_{G/L}$ will decrease notably the elimination of CBZ. On the other hand, considering equation (7'), it can be observed that the two positive variable terms will vanish if the values $SS = 320$ rpm and $R_{G/L} = 2.92$ are plugged in, minimizing $Y\%$ to 0.62% of degradation. This negligible yield of degradation showed that the high stirring speed has a negative effect on the CBZ elimination especially when the ratio $R_{G/L}$ is high. This could be due to the high content of dissolved oxygen but also to the shear suffered by the biomass cells under the effect of the rotating magnetic bar in a small volume.

It is however noteworthy that in this study, the concentration of seed used for inoculation was very low compared to biomass concentrations usually observed in real activated sludge. This allows to expect better degradation yields if operating at usual biomass concentrations of AS. In addition, the original and positive aspect of this study was to show that the critical operating condition, which led to the best CBZ degradation yield, was to operate in an oxygen deficient atmosphere.

3.2. Results of the Principal Component Analysis

In a second step, Principal Component Analysis (PCA) was applied on seven variables: the design coded variables X_1 and X_2 (stirring speed and gas-to-liquid ratio), the directly read parameters C_{21} and A_{21} (final CBZ concentration and final 600 nm-absorption), and the three modeling kinetic parameters a_{pH} , α and β (pH, 600 nm-absorbance and CBZ evolution) in order to explore and visualize their mutual correlation by reduction of the system dimensionality.

The first three principal components $PC1$, $PC2$ and $PC3$ explain respectively 61.56, 23.73 and 12.80% of the total variability and thus, the system could be adequately observed in a three dimensional space with losing only 1.91% of the information (Fig. 4).

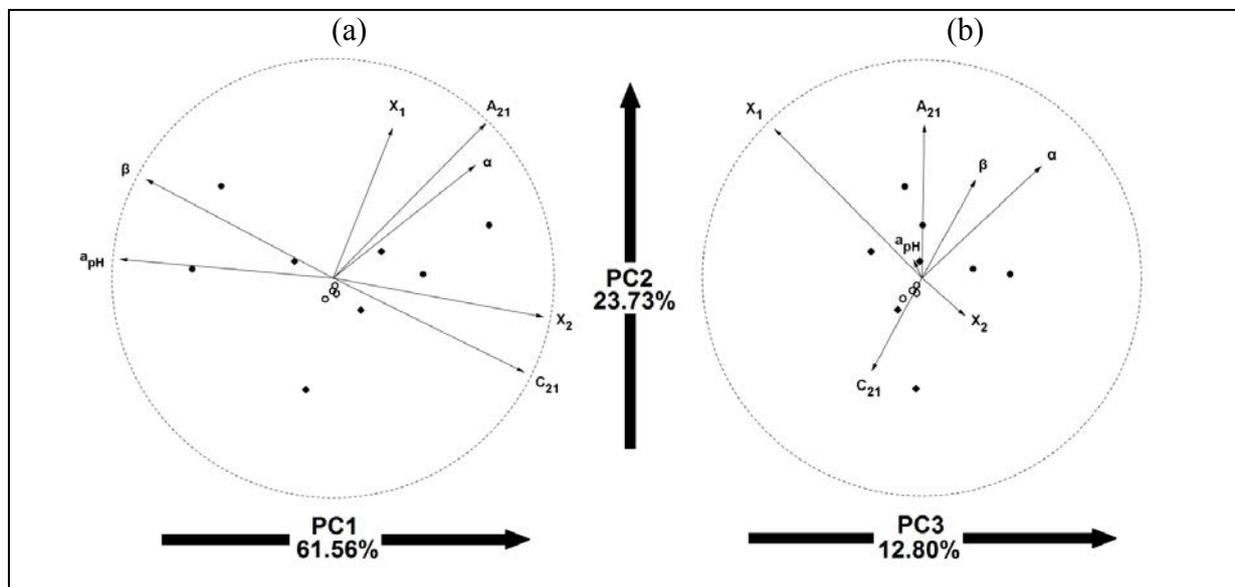


Fig. 4. Principal component analysis biplots presenting the 7 variables as vectors and the 12 points of the CCD (black circles (●) represent factorial points, white circles (○) represent central points and black rhombuses (◆) represent axial points) (a) in ($PC1$, $PC2$) plan (b) in ($PC3$, $PC2$) plan.

The seven parameters were then presented in the principal component plans and the observed correlations were visualized in Fig. 4 as follows:

- a. The vector representing the stirring speed factor (coded as X_1), is almost perpendicular to the vectors representing C_{21} and β so, it has no important influence on CBZ elimination kinetics.
- b. The factor gas-to-liquid ratio (coded as X_2) is positively correlated to C_{21} and negatively correlated to a_{pH} and β (X_2 - and C_{21} -vectors are pointing in the direction of positive PCI , while a_{pH} - and β -vectors are pointing in the direction of negative PCI), which means that a low $R_{G/L}$ lead to an increase in pH (alkaline metabolism) and a better elimination kinetics of CBZ, contrarily, a high $R_{G/L}$ lead to a decrease of pH (acid metabolism) and a poor elimination kinetics of CBZ.
- c. The parameter α describing the increase rate of the (600 nm)-absorbance was represented by a short vector in both biplots and so it is not significantly correlated to any operating (X_1 and X_2) or kinetic factor (a_{pH} and β). However, certain negative correlation could be observed with the kinetic parameter a_{pH} and so, the (600 nm)-absorbance was increasing simultaneously with the medium acidity. Because CBZ elimination had remained low in acidic conditions, so the increased absorbance observed in this case could not be explained by biomass growth as conventionally expected. The formation of a pigment with a highly absorbent acidic form could be hypothesized.
- d. The final absorbance A_{21} is presented by a vector almost pointing in the direction of the bisector of the axes PCI and $PC2$ and shows some positive correlations with its kinetic parameter α and X_1 ; consequently, high stirring speed induces high (600 nm)-absorbance.

3.3. Building a global kinetic model using stepwise-multiple linear regression

Stepwise-multiple linear regression was used to determine the following relationships:

$$10^3 \times a_{pH} = -13.3 - 13.3 X_1 - 88.0 X_2 - 17.5 X_1 X_2 \quad ; R^2 = 95.4\% \quad (8)$$

$$10^2 \times A_{21} = 271 + 77.2 X_1 + 82.6 X_2 + 98.1 X_1^2 - 29.2 X_2^2 \quad ; R^2 = 93.5\% \quad (9)$$

$$10^2 \times C_{21} = 482 + 1.37 X_1 + 18.0 X_2 + 1.75 X_1 X_2 + 4.08 X_1^2 - 14.3 X_2^2 \quad ; R^2 = 99.4\% \quad (10)$$

$$10^2 \times \alpha A_{21} = 46.4 + 16.2 X_1 - 32.1 X_2 - 33.8 X_2^2 \quad ; R^2 = 92.4\% \quad (11)$$

$$10^3 \times \beta C_{21} = 243 - 15.4 X_1 - 177 X_2 - 32.8 X_1 X_2 - 60.6 X_1^2 + 160 X_2^2 \quad ; R^2 = 98.0\% \quad (12)$$

With these equations, the pH, the 600 nm-absorbance and the residual CBZ concentration of every culture at every instant can be calculated by only knowing the stirring speed (80-320 rpm), the gas-to-liquid ratio (0.2-5) and the time (0-21 days). In fact, the system is completely described by the following set of non-dimensional differential equations:

$$\frac{1}{a_{pH}} \times \frac{dpH(t)}{dt} = \frac{1}{\alpha A_{21}} \times \frac{dA(t)}{dt} + \frac{A(t)}{A_{21}} = \frac{1}{\beta C_{21}} \times \frac{dC(t)}{dt} + \frac{C(t)}{C_{21}} = 1 \quad (13)$$

As a confirmation, the obtained model was used to simulate the evolution of the activated sludge culture pH, the (600 nm)-absorbance (noted as A) and the CBZ concentration (noted as C) in two sets of conditions. The results are displayed in Fig. 5.

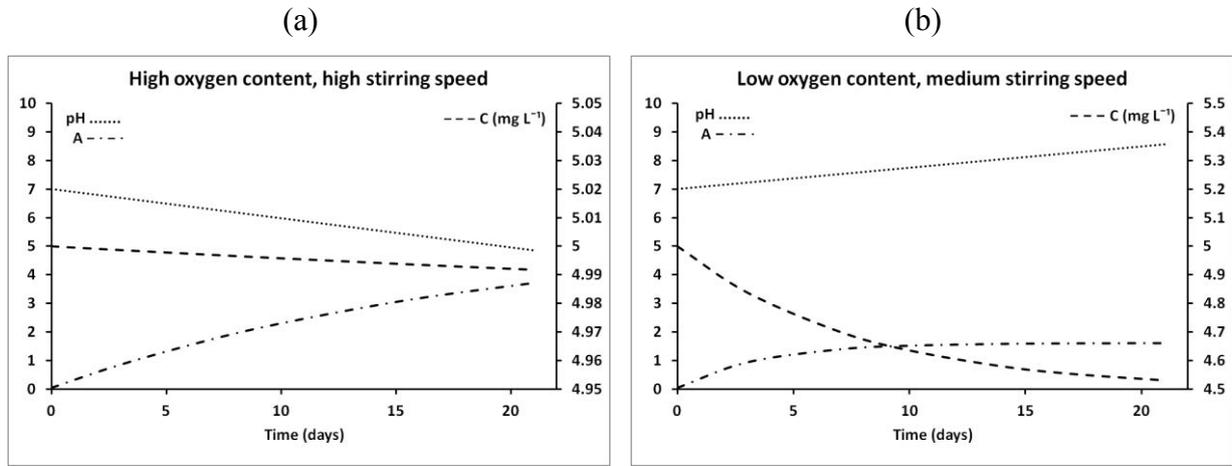


Fig. 5. Simulation of the evolution of the pH, the (600 nm)-absorbance (noted as A), the CBZ concentration (noted as C) in two sets of conditions. (a) $R_{GL} = 2.92$ and 320 rpm leading to the minimal elimination yield, and (b) $R_{GL} = 0.2$ and 203 rpm leading to the maximal elimination yield.

3.4. Proposing a simplified mechanistic model

Toward to explain the negative effect of abundant oxygen on CBZ elimination accompanied with acidification of the medium, the following thermodynamically possible oxidation reactions were written:



Despite the high potential of reaction (14), it is not kinetically possible because of the absence of an adequate catalyst/enzyme allowing the transformation of carbamazepine (CBZ) into epoxy-carbamazepine (EP-CBZ) directly by adding molecular oxygen to the double bond. Moreover, no significant elimination of CBZ was observed in the presence of abundant oxygen and the acidification of the medium in this case could be explained by reaction (15) where two hydrogen ions are formed. On the other hand, when no abundant oxygen is available, the slow reaction (16) would occur and explain the alkalization of the medium in this case thanks to the formation of two hydroxide ions.

In order to explain the increased (600 nm)-absorbance in acidic medium where no CBZ significant usage by the biomass allowing its growth, the following mechanism was supposed:

- a. The energy produced by CBZ degradation allow the growth of new biomass BIO with a yield ρ :

$$[BIO]_{(t)} = \rho(C_0 - C_{(t)}) + A_0 \quad (17)$$

- b. The biomass release a pigment PIG which has an acidity constant pK_a describing its repartition into two forms PIG_{acid} and PIG_{basic} depending on pH :

$$pH_{(t)} = pK_a + \log \frac{[PIG_{basic}]_{(t)}}{[PIG_{acid}]_{(t)}} \Rightarrow [PIG]_{(t)} = [PIG_{acid}]_{(t)}(1 + 10^{pH-pK_a}) \quad (18)$$

- c. The (600 nm)-absorbance is the resultant of the biomass concentration and the acid form of the pigment PIG_{acid} absorbance; u is a constant accounting for different extinction coefficient:

$$\begin{aligned} A_{(t)} &= [BIO]_{(t)} + u [PIG_{acid}]_{(t)} \\ \Rightarrow [PIG]_{(t)} &= \frac{(A_{(t)} - A_0) - \rho(C_0 - C_{(t)})}{u} \times (1 + 10^{pH-pK_a}) \end{aligned} \quad (19)$$

Several combinations of values were tested for the three constants ρ , pK_a and u , and the following combination was chosen as the most logical: $\rho \approx 0$, so no significant biomass growth but only usage of the energy for basal maintenance; $pK_a = 10$, so the acidic form of the pigment (which is the form absorbing at 600 nm) is always the predominant form; and $u = 100$, so the amount of the formed pigment is consistently in the same magnitude as the amount of present biomass.

The proposed model succeeded to explain the controversial increase in (600 nm)-absorbance when no carbon substrate utilization was observed, by assuming that the acidic form of the pigment produced by the biomass in stress situation, was able to absorb light in the same wavelengths range as the biomass. However, the model also showed stable biomass concentration even when some carbamazepine was consumed; biomass was not able to use all the available CBZ to grow maybe because the accumulation of degradation products inhibited the microbial metabolism.

4. Conclusions

The resistance of carbamazepine to treatment by activated sludge was confirmed (Kujawa-Roeleveld et al., 2008). However, this study has allowed identifying the major limiting factor that result in the poor elimination of CBZ in WWTP: intensive aeration. Anoxic oxidation of CBZ by nitrate was more efficient than the direct reaction with oxygen. Another limiting factor was the slow kinetics due to the absence of the adequate enzymes; a possible solution would be to find microbial strains able to produce such enzymes and add them to the activated sludge to achieve a bioaugmentation process (Semrany et al., 2012).

Abbreviations

CBZ: carbamazepine / $K_{o/w}$: distribution coefficient octanol-water / **WWTP**: wastewater treatment plant / **UV**: ultraviolet / **AS**: activated sludge / **SS**: stirring speed / $R_{G/L}$: gas-to-liquid ratio / **CCD**: central composite design / **AU**: absorbance unit / **RSM**: response surface methodology / **PCA**: principal component analysis / **PIG**: pigment / **BIO**: biomass.

Acknowledgements

This paper is published as part of the PhD thesis of the first author (S. Semrany) which is supported by both the Lebanese university and the Lebanese social association Azm and Saadeh.

References

Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas P., (2003), Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere*, **50**, 1319-1330.

- Clara M., Strenn B., Kreuzinger N., (2004), Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration, *Water Res.*, **38**, 947-954.
- Crini G., Badot P.-M., (2008), *Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: Procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique*. Presses Univ. Franche-Comté.
- Deriase S.F., Younis S.A., El-Gendy N.S., (2013) , Kinetic evaluation and modeling for batch degradation of 2-hydroxybiphenyl and 2, 2'-dihydroxybiphenyl by *Corynebacterium variabilis* Sh42, *Desalination Water Treat.*, **51**, 4719–4728.
- Ferrari B., Mons R., Vollat B., Fraysse B., Paxéaus N., Giudice R.L., Pollio A., 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?, *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**, 1344-1354.
- Gebhardt W., Schröder H.F., (2007), Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation, *J. Chromatogr. A*, **1160**, 34-43.
- Jones O.A.H., Voulvoulis N., Lester J.N., (2002), Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals, *Water Res.*, **36**, 5013-5022.
- Kosjek T., Andersen H.R., Kompore B., Ledin A., Heath E., (2009), Fate of Carbamazepine during Water Treatment, *Environ. Sci. Technol.*, **43**, 6256-6261.
- Kujawa-Roeleveld K., Schuman E., Grotenhuis T., Kragić D., Mels A., Zeeman G., (2008), *Biodegradability of human pharmaceutically active compounds (PhAC) in biological systems treating source separated wastewater streams*. The IWA international conference Sanitation Challenge, Wageningen, The Netherland, 19–21 May, 19–21.
- Leustean I., Coman G., Bahrim G., (2012), Statistical optimisation of ethanol production from a cellulosic mixture based on paper residues, *Environ. Eng. Manag. J.*, **11**, 1037–1044.
- Mason I.G., McLachlan R.I., Gérard D.T., (2006), A double exponential model for biochemical oxygen demand, *Bioresour. Technol.*, **97**, 273–282.
- Metcalf C.D., Miao X.-S., Koenig B.G., Struger J., (2003), Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada, *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 2881-2889.

- Öllers S., Singer H.P., Fässler P., Müller S.R., (2001), Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water, *J. Chromatogr. A*, **911**, 225-234.
- Rehman M.S.U., Saif A., Rashid A., Mahmood T., (2013), Chemometric classification of advanced oxidation processes for the degradation of pharmaceuticals and personal care products, *Environ. Eng. Manag. J.*, **12**, 475–481.
- Rizzo L., (2011), Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment, *Water Res.*, **45**, 4311-4340.
- Scheytt T., Mersmann P., Lindstädt R., Heberer T., (2005), Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments, *Chemosphere*, **60**, 245-253.
- Semrany S., Favier L., Djelal H., Taha S., Amrane A., (2012), Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs), *Biochem. Eng. J.*, **69**, 75-86.
- Ternes T.A., (1998), Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Res.*, **32**, 3245-3260.
- Ternes T.A., (2001), *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment*. American Chemical Society, New York. 39–54.
- Ternes T.A., Meisenheimer M., McDowell D., Sacher F., Brauch H.-J., Haist-Gulde B., Preuss G., Wilme U., Zulei-Seibert N., (2002), Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment, *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 3855-3863.

CHAPITRE 4

DEGRADATION DE LA CARBAMAZEPINE PAR *TRAMETES VERSICOLOR*

CHAPITRE 4 : DEGRADATION DE LA CARBAMAZEPINE PAR *TRAMETES VERSICOLOR*

4.1. Introduction

Dans ce chapitre, la démarche expérimentale utilisée dans le chapitre précédent avec les boues activées est reprise en remplaçant les boues activées par la souche de collection DSM#11269 du champignon ligninolytique *Trametes versicolor*. Ainsi, après des tests préliminaires pour évaluer l'adsorption et la toxicité de la carbamazépine sur le champignon (§4.2), la biostimulation de ce dernier par les trois co-substrats carbonés retenus (glucose, phénol et tryptophane) est testée (§4.3). L'optimisation des conditions de culture pour aboutir à une meilleure dégradation est réalisée par la méthodologie de la surface de réponse via un plan d'expérience centré composite à quatre paramètres (température, vitesse d'agitation, pH initial et concentration initiale en carbamazépine). Une modélisation de la cinétique observée a permis de simuler le déroulement de cette dégradation pour différentes conditions expérimentales, afin de dégager un mécanisme expliquant les performances obtenues (§4.4).

4.2. Tests préliminaires

4.2.1. Influence des types d'agitation sur la morphologie du champignon et son pouvoir adsorbant

La méthode utilisée pour cultiver le champignon *Trametes versicolor* afin d'obtenir des pelotes mycéliennes est expliquée en détail dans la partie « Matériel et Méthodes » de l'article exposé à la fin de ce chapitre. Il convient de noter que pour arriver à cultiver le champignon, il a été nécessaire d'utiliser une agitation orbitale et un milieu riche en extrait de malt.

Des pelotes mycéliennes du champignon *Trametes versicolor* sont soumises à l'autoclavage pour inactiver la biomasse fongique. Ces pelotes sont utilisées à raison de 1 g L^{-1} de matière sèche, pour inoculer des solutions de volume **250 mL** contenant la **CBZ** à 10 mg L^{-1} dans un milieu minéral de base (**MMB**) soumis à l'autoclavage.

L'inoculation s'effectue soit directement, sans aucun traitement des pelotes (inoculum **P** pour pelote), soit après fragmentation des pelotes à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turrax® (inoculum **S** pour suspension).

Les cultures sont agitées à **100 tr min⁻¹** pendant **10 jours** à la température ambiante pour évaluer une éventuelle biosorption sur la biomasse thermiquement inactivée. Les cultures mises sous agitation orbitale (**O**) sont notées **P_O** et **S_O**, et celles mises sous agitation magnétique (**M**) seront notées **P_M** et **S_M**. Les résultats sont regroupés dans le **Tableau 4.1.**

Tableau 4. 1 Désignations des cultures et résultats des tests de biosorption

	Pelote mycélienne		Suspension mycélienne	
Type d'agitation	orbitale		magnétique	
Désignation	P _O	S _O	P _M	S _M
% de la CBZ biosorbée	9,3	1,4	5,6	1,2

La conclusion est donc que dans les conditions de ces expériences, la sorption de la carbamazépine sur les pelotes fongiques est supérieure à celle observée pour une suspension fongique. De plus, l'agitation magnétique favorise la dispersion du mycélium en détruisant la morphologie sphérique des pelotes et empêche de ce fait une sorption appréciable sur la biomasse fongique.

4.2.2. Toxicité de la carbamazépine vis-à-vis de *T. versicolor*

Pour réaliser ce test, une mesure de la **DBO₅** est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment (§3.2.3), mais en remplaçant la suspension de boues activées par une suspension fongique :

- 1- En présence de **1 mg L⁻¹** de **CBZ** comme unique source de carbone.
- 2- En présence de **1 mg L⁻¹** de **CBZ** et du glucose-glutamate à **130 mg L⁻¹** chacun.
- 3- En présence de **5 mg L⁻¹** de **CBZ** et du glucose-glutamate à **130 mg L⁻¹** chacun.
- 4- En présence de **8 mg L⁻¹** de **CBZ** et du glucose-glutamate à **130 mg L⁻¹** chacun.

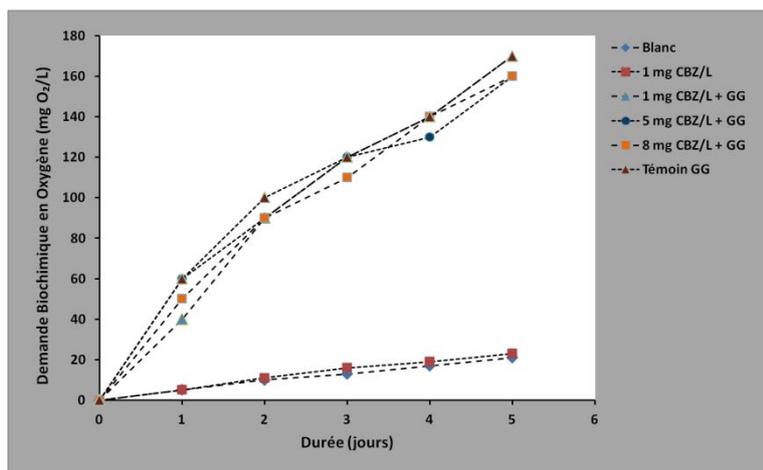


Figure 4. 1 Évolution de la DBO de la suspension fongique dans des solutions contenant différentes concentrations en CBZ

La différence entre le blanc et la bouteille 1 ($1 \text{ mg}_{\text{CBZ}} \text{ L}^{-1}$ comme unique composé carboné) d'une part, et la différence entre le témoin **GG** et les bouteilles **2**, **3** et **4** contenant respectivement **3**, **5** et **8** $\text{mg}_{\text{CBZ}} \text{ L}^{-1}$ en plus des substrats carbonés glucose-glutamate (**GG**) d'autre part, sont négligeables. Cela permet de conclure que la présence de la CBZ n'affecte ni la respiration endogène, ni la respiration exogène pour consommer le substrat carboné **GG**. La conclusion est donc que dans les conditions testées, il n'y a pas d'effet toxique de la carbamazépine sur *Trametes versicolor*.

4.3. Biostimulation

Pendant la dernière décennie, les résidus des substances pharmaceutiques (RSP) se sont révélés comme étant une classe majeure parmi les polluants des eaux. Actuellement, des efforts supplémentaires sont menés pour trouver des méthodes efficaces permettant d'éliminer de tels composés de l'eau. De nombreux travaux ont mis en évidence que ces molécules sont susceptibles de perturber le bon déroulement du processus physiologique chez les humains et les autres êtres vivants, et ceci même lorsqu'ils sont présents à de faibles concentrations, de l'ordre de quelques nanogrammes par litre.

Parmi les RSP, la carbamazépine (CBZ), un médicament antiépileptique largement utilisé, s'est avéré être l'un des plus récalcitrants. En effet, ce composé persiste dans les eaux même après un traitement biologique conventionnel par des boues activées (BA).

Cette résistance peut s'expliquer d'une part par la structure chimique particulière de la molécule, qui entraîne une faible adéquation des sites actifs des enzymes microbiennes présentes dans les BA pour cette molécule, et d'autre part par les propriétés physico-chimiques comme sa double neutralité acido-basique et électrique, sa faible solubilité aqueuse et son adsorption négligeable sur les solides en suspension.

Malgré leur usage croissant en traitement des eaux, les procédés d'oxydation avancés (POA) tel que l'ozonation et la réaction de Fenton ne sont pas envisageables pour l'élimination de la CBZ, car ils peuvent conduire à la formation des sous-produits plus récalcitrants et plus toxiques que la molécule-mère [74]. Des recherches récentes ont montré que des champignons filamenteux, susceptibles de produire des enzymes ligninolytiques (telles que laccases, manganèse et lignine peroxydases) ayant une activité oxydative non spécifique, permettent dans certaines conditions la dégradation de composés organiques ayant une structure chimique complexe (naproxène) connus pour être bio-récalcitrants (acide clofibrique).

Le but de la cette étude est de tester les performances d'élimination de la carbamazépine par un champignon filamenteux, *Trametes versicolor* DSM 11269, en présence ou non d'un co-substrat carboné. À cette fin, différentes cultures ont été conduites en mode batch dans des fioles coniques de volume de **500 mL**. Un milieu de culture minéral [253], réparti à raison de **250 mL** par flacon est utilisé. Les cultures sont réalisées à un pH initial de **7**, à **22°C** et à une vitesse d'agitation de **210 tr min⁻¹**. Trois co-substrats carbonés, à savoir le glucose, le tryptophane et le phénol, sont testés à des concentrations initiales identiques en carbone organique (c.a. **400 mg C L⁻¹**). Pour chaque co-substrat testé, les cultures sont effectuées en absence ou en présence du composé cible. La concentration initiale en CBZ ajoutée est de **5 mg L⁻¹**. Des prises d'échantillons ont été effectuées régulièrement durant une période de **21** jours.

Les principales variables mesurées sont : le pH du milieu, la turbidité à **600 nm** ainsi que les concentrations en CBZ et en co-substrats carbonés. Ces derniers sont analysés par chromatographie liquide haute performance. Afin d'évaluer la production de la laccase, l'activité enzymatique est également déterminée.

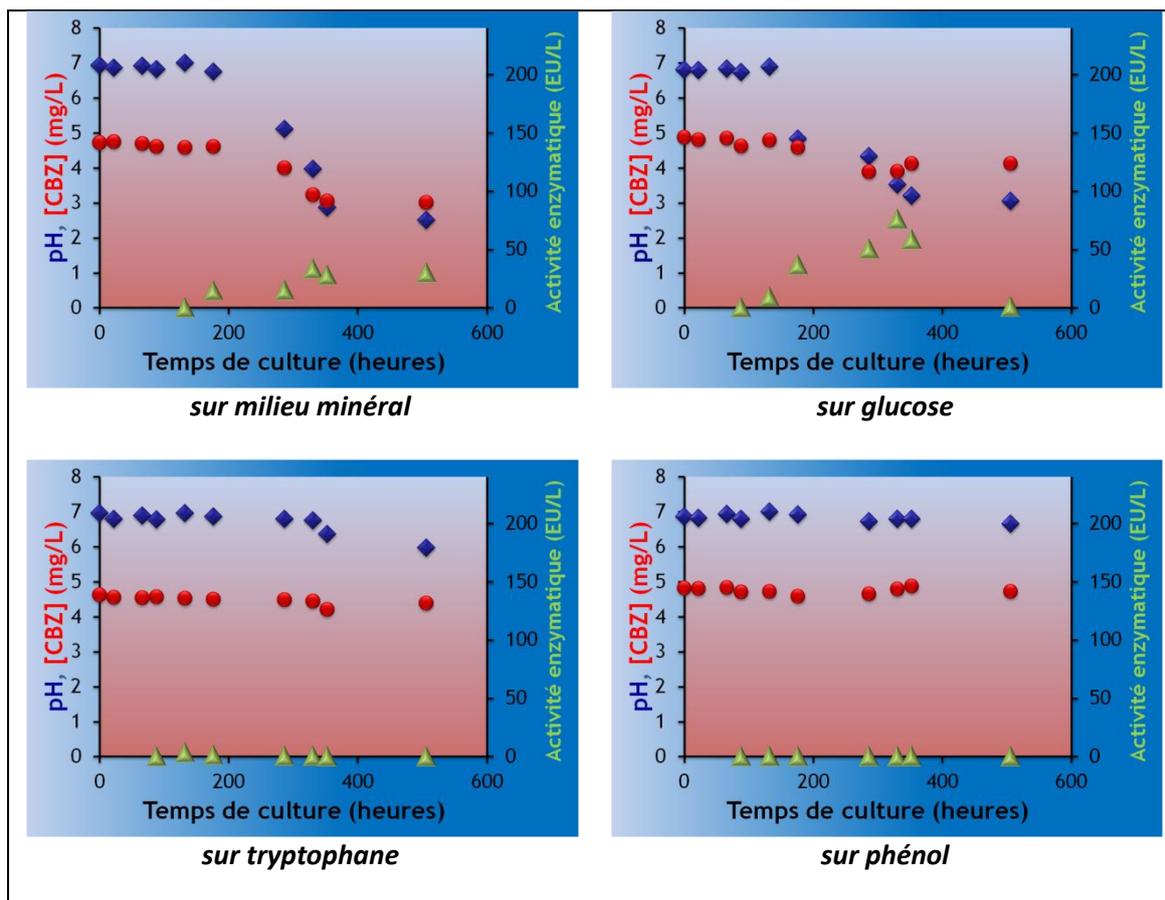


Figure 4. 2 Évolutions de la concentration en CBZ, de pH et de l'activité enzymatique dans les essais de biostimulation des cultures fongiques

Les résultats obtenus (**Figure 4.2**) montrent que dans les conditions testées (en présence de *Trametes versicolor*) :

- 1- Un meilleur taux d'abattement (que dans le cas des BA) atteignant 30-35 % est observé lorsque la CBZ est l'unique source de carbone organique dans le milieu de culture considéré.
- 2- Une augmentation notable de la concentration en biomasse grâce à l'ajout d'un co-substrat carboné facilement métabolisable. L'examen visuel de cette croissance microbienne montre qu'elle correspond à une formation, une propagation et une agrégation progressive de petits agglomérats mycéliens ; elle n'a pas pu être corrélée à la variation de l'absorbance à 600 nm comme dans le cas des BA. Cependant, le suivi du pH de la phase aqueuse montre qu'il constitue un meilleur indicateur pour l'évaluation de la prolifération fongique. Cependant, cette amélioration de l'activité métabolique du microorganisme :

- a) n'est pas affectée par la présence du composé cible. Ceci montre que la carbamazépine ne perturbe pas le processus physiologique des cellules fongiques (absence de toxicité).
- b) n'est pas associée à une amélioration du taux d'abattement du composé cible. Ceci montre que le champignon utilise préférentiellement la source de carbone supplémentaire se trouvant en excès dans le milieu de culture pour couvrir ses besoins énergétiques ; le microorganisme utilisé ne consomme la carbamazépine que lorsque le milieu de culture devient pauvre en une source carbonée facilement métabolisable.
- 3- L'activité enzymatique de la laccase est détectée dans le cas d'une culture sur glucose seul, carbamazépine seul, glucose et CBZ simultanément, mais par contre très faiblement en présence du phénol ou du tryptophane, qu'ils soient présents seuls ou en association avec la CBZ. La présence de glucose et/ou de CBZ induit donc la production de l'enzyme ligninolytique. Cependant, une concentration élevée en enzyme dans les cultures sur glucose n'a pas abouti à une meilleure élimination de la molécule cible.

4.4. Optimisation des conditions expérimentales

L'élimination de la CBZ en utilisant *Trametes versicolor* étant confirmée, l'étape suivante de l'étude est de trouver les conditions optimales (à savoir la température, la vitesse d'agitation, le pH initial et la concentration initiale en CBZ) pour la conduite de cultures afin d'aboutir à un meilleur taux d'abattement du composé cible. Pour ce faire, une approche d'optimisation par un plan d'expérience à $k = 4$ paramètres est choisie. Au total, 28 cultures ($2^k = 16$ points factoriels, $2k = 8$ points axiaux et $k = 4$ répliques du point central) sont menées et la modélisation des surfaces de réponses permet d'analyser l'influence individuelle et combinée des paramètres considérés sur la biodégradation du composé cible. Les résultats obtenus lors de cette étude ont fait le sujet d'une publication soumise.

Carbamazepine biodegradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor* in liquid medium: operating conditions optimization and kinetic modeling using response surface methodology

Samer Semrany ^{a, b, c}, Lidia Favier ^{a, b}, Hayet Djelal ^{b, d}, Claudia Popa ^e, Samir Taha ^c and Abdeltif Amrane ^{a, b} *

^a *École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, Université de Rennes 1, Chimie et Ingénierie des Procédés, UMR CNRS 6226, 11 Allée de Beaulieu, CS 50837, 35708 Rennes Cedex 7, France*

^b *Université Européenne de Bretagne, 5 Boulevard Laënnec, 35000 Rennes, France*

^c *Centre Azm pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, LBA3B, EDST, Lebanese University, El-Mitein Street, 1300 Tripoli, Lebanon*

^d *École des Métiers de l'Environnement, Campus de Ker Lann, 35170 Bruz, France*

^e *Dunarea de Jos University, Faculty of Food Science and Engineering, 47 Domneasca Street, 800008 Galati, Romania*

* Corresponding author. Tel.: + 33 (0)2 23 23 81 55; Fax: + 33 (0)2 23 23 81 99

E-mail address: abdeltif.amrane@univ-rennes1.fr

ABSTRACT

This study aimed to closely examine the biodegradation process of carbamazepine using a white-rot fungus. For this purpose, 28 liquid cultures of *Trametes versicolor* (DSM#11269) were conducted in batch mode according to a design of experiments to determine the influence of each of four parameters (temperature, stirring speed, initial pH, and carbamazepine concentration) on the target compound degradation.

80-86% of carbamazepine removal may be achieved using the optimal set of parameters (pH 7, 25°C, 0.32 - 1.17 mg_{CBZ} L⁻¹, 0-80 rpm) calculated according to the response surface methodology. Furthermore, kinetic data derived using advanced calculations could be used to simulate this biodegradation process in different operational conditions toward to suggest a possible mechanism for the observed behavior of the system.

Because carbamazepine is recalcitrant to conventional biological treatments, these interesting results, obtained with an extracellular ligninolytic enzymes producer fungus, confirmed recent researches results and revealed that further investigations are needed in order to reliably understand the used remediation process.

Keywords: Carbamazepine; Filamentous fungi; Optimization; Biodegradation; Response surface methodology; Modeling.

1. Introduction

As for the most of the emerging organic water micro-pollutants, the detection of Carbamazepine (CBZ) became possible by virtue of the improvement of analytical techniques and equipments achieved in the last decades [1–7]. Classified among Pharmaceutically Active Compounds (PhACs), CBZ is not an antibiotic nor a steroid but an antiepileptic drug, omnipresent at concentrations ranging from nanograms to micrograms per liter in different waters and other natural matrices [8–12].

According to the available literature, CBZ is non-volatile with a Henry-law constant of $1.08 \cdot 10^{-5} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$, has a poor aqueous solubility but with controversial reported values ranging from 17.7 to 112 mg L^{-1} and has extreme pK_a values (< 0 and > 13) showing that CBZ is not ionized at usual pH-values [13]. CBZ is also quite hydrophobic with an octanol-to-water partition coefficient $\log K_{o/w} = 2.45$ and is weakly adsorbed to or absorbed by suspended solids (SS) with a solid-to-aqueous phases distribution coefficient $K_d = 1.2 \times 10^{-3} \text{ L g}_{\text{SS}}^{-1}$ [13,14]. All these characteristics explain the observed high resistance of CBZ to degradation through conventional activated sludge process [13] and its classification among Persistent Organic Pollutants (POPs). Consequently, many of the recent researches paid more attention to this molecule in order to find a new strategy contributing to its elimination from polluted waters. In fact, carbamazepine (CBZ) had become the main representative molecule of both non-antibiotic non-steroidal PhACs and non-ionizable non-biodegradable POPs.

Moreover, advanced oxidation processes such as ozonation and photolytic degradation, lead to more than 90% of CBZ degradation but with the serious problem of hazardous by-products generation. One of these by-products, the mutagen acridone is more resistant to eventual natural attenuation and more dangerous to the population health than the initial compound [10,15,16].

White-rot fungi (WRF) are eukaryotic microorganisms naturally living as parasites on woody substances. WRF produce many extracellular enzymes able to attack the polymeric molecules of lignin producing smaller molecules that are easily absorbed and metabolized by the cells. Previous studies showed that, ligninolytic enzymes as laccase (EC 1.10.3.2), lignin, versatile and manganese peroxidases (EC 1.11.1.x) are non-specific oxidative enzymes [17,18] that may attack several molecules with structures different from lignin [17,19–24]. Consequently, carbamazepine (CBZ) is susceptible to be bio-transformed by enzymes of WRF species [24–26]. The WRF strain *Trametes versicolor* ATCC#42530 has been used for its high performance in xenobiotics degradation [20–26].

In their 2012 publication, Jelic et al. [27] described CBZ biodegradation by *T. versicolor* ATCC#42530 pre-grown pellets in 50 mL cultures agitated at 135 rpm in 250 mL erlenmeyer flasks under 25°C. These researchers reported removal percentages of 94% by six days and 61% by seven days when starting flask cultures respectively at 9 mg_{CBZ} L⁻¹ and 50 µg_{CBZ} L⁻¹. These results allowed thinking about initial CBZ concentration as an influential parameter on the degradation yield of this molecule. The same study reported that the 8 g L⁻¹ glucose content of the culture medium was completely depleted by the second day so the most of the CBZ degradation occurred when no other carbon source was available in the medium. Besides, 17% of the observed removal yield where due not to biodegradation but simply to biosorption of CBZ on the mycelial matter. The initial pH of the medium was set at 4.5 and never regulated or monitored through the cultures evolution. In the same paper, the removal of 95.6% of 200 µg_{CBZ} L⁻¹ by the second day was obtained in a 1.5 L bioreactor with continuous pH regulation and aeration operating in pseudo-batch mode (continuous addition of glucose and ammonium tartrate during ten days). Consequently, this result would not be compared with those obtained in erlenmeyer flasks.

In another 2012 research, Zhang and Geißen [28] used another type of WRF *Phanerochaete chrysosporium* grown on polyether foam to eliminate CBZ in a non-sterile plate bioreactor reporting 60 to 80% removal yields. The main point discussed in this study was the benefits of using WRF in conditions similar to those found in its natural habitat (fixed on the surface of rotted wood, in humid and aerated environment, and with sufficient nutrients supply). Curiously, this experiment demonstrated that supplying glucose to a pre-established fungal culture would lessen its ability to eliminate CBZ. Moreover, the percentage of CBZ adsorbed to the foam ranged between 18% and 45%.

In the present study, a different experimental approach was adopted: instead of using pre-grown pellets of white-rot fungus, fragmented pellets of *Trametes versicolor* DSM#11 269 were added at a low concentration and CBZ was the sole carbon source in the culture medium. This decision was motivated by several observations and reflections: firstly, the primarily tests had shown that fragmented pellets has lesser sorption ability than the pre-grown ones; secondly, the using of magnetic stirring instead of the orbital shaking did not allow to keep the fungus in spherical large pellets form; thirdly, the assumption that in these stressing conditions, the fragmented fungus had no additional carbon source to grow noticeably and have to try to use the pollutant as necessary cellular material and energy source to grow.

Because this study was the first using of DSM#11 269 *T. versicolor* strain (versus the large use of ATCC #42 530 optimally growing at 25°C and pH 4.5) in the bioremediation field, the optimal temperature and optimal pH allowing this specific strain of microorganism survival had to be determined. The results of Zhang and Geißen [28] were encouraging to test probable low agitation speeds to mimic the fungus natural habitat. The results of Jelic et al.[27] were encouraging to test the effect of different CBZ concentrations on the biodegradation yield.

Consequently, the main objective of this work was to simultaneously investigate how four operating parameters (i.e. temperature, agitation speed, initial pH and initial concentration of CBZ) will influence the CBZ biodegradation by the white-rot fungus.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Carbamazepine powder (99% purity) was purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). ABTS powder, as 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt ($\geq 98\%$ HPLC purity) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). All mineral reagents used in this study were at least of analytical grade and were acquired indifferently from Acros Organics or Sigma Aldrich providers cited above. Eluents used in chromatographic analysis were of HPLC grade; acetonitrile provided by Fisher Scientific (Illkirch, France) and ultrapure water (resistivity $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, $< 0.1 \text{ CFU mL}^{-1}$) produced in an Elga Purelab Option-Q7 device from Veolia Water Solutions and Technologies (Antony, France).

2.2. Fungus propagation and inoculums preparation

The fungal strain *Trametes versicolor* DSM # 11 269 was supplied in active form by the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures in an agar slant tube. The microorganism was firstly plated on solid Medium-90 Petri dishes containing 3% (w/w) malt extract, 0.3% (w/w) soya peptone and 1.5% (w/w) agar (pH = 5.6) following the provider's recommendations. Then, the grown mycelia on the surfaces of Petri dishes were roughly washed with sterilized distilled water and the obtained suspension was added under aseptic conditions to conical flasks containing beforehand sterilized liquid Medium-90 (same content as the solid medium without agar addition). Flasks were then aseptically incubated at 25°C and under orbital shaking conditions (100 rpm) for one week to obtain

roughly spherical *T. versicolor* pellets. After the propagation stage, pellets were left to settle down by gravity. Residual culture medium was withdrawn and pellets were recuperated aseptically and were disintegrated in sterilized water using an IKA T25 Ultra-Turrax homogenizer (Staufen, Germany). The resulting mycelial suspension was analyzed for dry weight content (DW) according to the Standard Method 2450 D [29] and adequate volumes were used to inoculate the biodegradation essays.

2.3. Mineral culture medium preparation

The mineral culture medium used in the biodegradation essays was adapted from the publication of Bajaj et al. [30] and slightly modified to allow the addition of sodium ion at an adequate amount; it had the following composition (per 1 L): KH_2PO_4 , 0.2 g; Na_2HPO_4 , 0.2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g; NH_4NO_3 , 3 g and 1 mL of a trace metal solution. This trace metal solution contained (per 1 L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.36 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.24 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.58 g; $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.11 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.01 g and 1 mL of H_2SO_4 to prevent metallic hydroxides precipitation.

2.4. Central composite design of experiments

This study used a central composite design of experiments methodology to screen the effects of four cultivation parameters on the CBZ biodegradation by *Trametes versicolor* DSM # 11 269 in batch reactors. This methodology is usually used in process optimization approach because it requires fewer experiments compared with conventional practice of a single factor optimization. Four culture factors (temperature, stirring speed, initial pH and initial pollutant concentration) have been known to affect the growth and the biodegradation efficiency. Thus, these factors were chosen in this work as the four independent parameters of the design of experiment: the temperature (**T**), the stirring speed (**S**) and the initial pH of the culture medium (**pH₀**) and the initial concentration of carbamazepine in the culture (**C₀**). The value of

each parameter was selected among five levels: the temperature varied from 20 to 40°C (**20, 25, 30, 35** or **40°C**) by using an Aqualytic AL-658 thermostatic cabinet (Dortmund, Germany). The cultures were magnetically stirred at the desired speed (**0, 100, 150, 200** or **300 rpm**) by using a Thermo VarioMag multipoint HP 15 Stirrers (Villebon-sur-Yvette, France). All essays were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL of the mineral culture medium (described in section 2.3). The initial pH was adjusted to the desired value (**pH 3, 4, 5, 6** or **7**) and CBZ was added to the desired initial concentration (**0.1, 0.32, 1, 3.16** or **10 mg L⁻¹**). These values were chosen to be within the range of usual operating conditions, since interpretation of results would be valid only within the experimental limits. All flasks were sterilized at 121°C during 20 min in a Subtil Crépieux ALV-1061 autoclave (Chassieu, France), inoculated at 50 mg_{DW} L⁻¹ with an adequate volume of the *T. versicolor* suspension (described in section 2.2.) and monitored during 21 days.

A total of 28 essays were conducted in batch according to the used design of experiments which included sixteen factorial points, eight axial points and four replications of the central point as reported in **Table 1**.

2.5. Analytical methods

Samples were taken aseptically from each flask during 21 days. The pH values were measured using a Eutech Instruments Cyberscan pH 510 (Nijkerk, Netherlands) connected to a VWR Gelplas probe pH-electrode (Fontenay-sous-Bois, France). Then, samples were centrifuged at 4000 rpm for five minutes at room temperature (25°C) using a Jouan C4.12 Centrifuge (Saint-Herblain, France) to separate solid debris and recover supernatants for enzymatic activity and CBZ concentration assays.

Table 1. Natural parameters and coded variables values for each of the 28 runs of the biodegradation experiment.

Essay	Temperature		Agitation Speed		Initial pH		Initial CBZ		CBZ elimination yield	
	#	T/°C (X_T)	S/rpm (X_S)	pH ₀ (X_{pH})	C_0 /mg · L ⁻¹ (X_C)	Y% (Residual)				
Type	#	$X_T = 0.1 T - 3$	$X_S = 0.02 S - 3$	$X_{pH} = 0.5 pH_0 - 2.5$	$X_C = \log_{10} C_0$	Y% ($Y\% - \hat{Y}\%$)				
Factorial points	1	20 (-1)	100 (-1)	3 (-1)	0.10 (-1)	18.8 (+0.4)				
	2	20 (-1)	100 (-1)	3 (-1)	10.0 (+1)	13.0 (-0.8)				
	3	20 (-1)	100 (-1)	7 (+1)	0.10 (-1)	62.7 (+0.7)				
	4	20 (-1)	100 (-1)	7 (+1)	10.0 (+1)	45.6 (+1.6)				
	5	20 (-1)	200 (+1)	3 (-1)	0.10 (-1)	18.0 (-0.1)				
	6	20 (-1)	200 (+1)	3 (-1)	10.0 (+1)	17.8 (+1.7)				
	7	20 (-1)	200 (+1)	7 (+1)	0.10 (-1)	56.0 (-1.9)				
	8	20 (-1)	200 (+1)	7 (+1)	10.0 (+1)	20.9 (-2.1)				
	9	40 (+1)	100 (-1)	3 (-1)	0.10 (-1)	27.5 (-0.6)				
	10	40 (+1)	100 (-1)	3 (-1)	10.0 (+1)	17.7 (+0.3)				
	11	40 (+1)	100 (-1)	7 (+1)	0.10 (-1)	22.1 (+1.8)				
	12	40 (+1)	100 (-1)	7 (+1)	10.0 (+1)	18.5 (+0.6)				
	13	40 (+1)	200 (+1)	3 (-1)	0.10 (-1)	14.3 (+1.0)				
	14	40 (+1)	200 (+1)	3 (-1)	10.0 (+1)	20.2 (+0.7)				
	15	40 (+1)	200 (+1)	7 (+1)	0.10 (-1)	25.9 (-2.9)				
	16	40 (+1)	200 (+1)	7 (+1)	10.0 (+1)	22.8 (-1.0)				
Axial points	17	25 (-½)	150 (0)	5 (0)	1.00 (0)	16.5 (+0.8)				
	18	35 (+½)	150 (0)	5 (0)	1.00 (0)	10.4 (-0.0)				
	19	30 (0)	0 (-3)	5 (0)	1.00 (0)	23.7 (-0.3)				
	20	30 (0)	300 (+3)	5 (0)	1.00 (0)	18.7 (+2.7)				
	21	30 (0)	150 (0)	4 (-½)	1.00 (0)	22.4 (-5.4)				
	22	30 (0)	150 (0)	6 (+½)	1.00 (0)	42.3 (+6.2)				
	23	30 (0)	150 (0)	5 (0)	0.32 (-½)	21.8 (+3.0)				
	24	30 (0)	150 (0)	5 (0)	3.16 (+½)	12.2 (-2.2)				
Central point replications	25	30 (0)	150 (0)	5 (0)	1.00 (0)	21.2 (+1.2)				
	26	30 (0)	150 (0)	5 (0)	1.00 (0)	17.4 (-2.6)				
	27	30 (0)	150 (0)	5 (0)	1.00 (0)	17.7 (-2.3)				
	28	30 (0)	150 (0)	5 (0)	1.00 (0)	19.1 (-0.9)				

2.5.1. Laccase activity determination

Laccase enzymatic activity was determined according to Bourbonnais et al. [31]: 200 μL of the supernatant recovered above was mixed with 1600 μL of 0.1 M acetic buffer (pH = 5.0), and 200 μL of a 0.55 mM ABTS solution. A Thermo Spectronic Genesys 20 visible spectrophotometer was tuned at 420 nm to measure the increase of the absorbance of the mixture observed during the measuring time of 30 min. Enzymatic unit (EU) of activity was defined as the quantity in μmol of oxidized ABTS (extinction coefficient $\epsilon = 36\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) formed per min. The laccase enzymatic activity was finally expressed in enzymatic units per liter (EU L^{-1}) of culture medium.

2.5.2. Carbamazepine analysis

CBZ analysis was performed using liquid chromatography. 2 mL of the supernatant recovered as described above was transferred and mixed for 10 s with 2 mL of acetonitrile using vortex agitator. The mixture was left to rest for 15 min allowing the precipitation of proteins and salts which are not soluble in acetonitrile. After centrifugation, 2 mL of supernatant were then filtered through 2 μm Pall[®] Acrodisc[®] GHP-membrane syringe-filters prior to analysis by ultra-high pressure liquid chromatography. Acquity UPLC[®] H-Class system from Waters Corporation (Guyancourt, France) was used to monitor the CBZ concentration in the culture media. Empower[™] software controlled the system and acquired the data. 10 μL of each of the samples prepared above was injected into a Waters[®] BEH-C₁₈ column (10 cm \times 2.1 mm \times 1.7 μm , 45°C). Carbamazepine (CBZ) in the sample was eluted after 1.75 min in isocratic mode (60% water, 40% acetonitrile) under a flow rate of 0.4 mL min⁻¹, and detected with an Acquity UPLC[®] PDA e λ at 285 nm. Concentration of CBZ was deduced from peak areas according to an external standards calibration. The limit of quantification of the method was 20 $\mu\text{g}_{\text{CBZ}}\text{ L}^{-1}$ with relative errors of $\pm 2\%$.

2.6. Kinetics modeling

As reported in section 2.5, three parameters were monitored in each of the 28 cultures: pH, concentration of CBZ and laccase enzymatic activity of the liquid phase. The evolutions of these parameters as functions of time were noted $\text{pH}_{(t)}$, $C_{(t)}$ and $E_{(t)}$, and were fitted as follows:

2.6.1. pH and CBZ concentration time-evolutions

Both of the pH and the CBZ concentration showed to be decreasing functions of time with sigmoid-allure graphs. So, a logistic model was used to fit the decrease ratios of pH (R_{pH}) and of CBZ concentration (R_C) as follows:

$$R_{\text{pH}} = 1 - \text{pH}_{(t)} / \text{pH}_0 = K_{\text{pH}} / [1 + e^{-\alpha_{\text{pH}}(t - \tau_{\text{pH}})}] \quad \text{(Equation 1)}$$

$$R_C = 1 - C_{(t)} / C_0 = K_C / [1 + e^{-\alpha_C(t - \tau_C)}] \quad \text{(Equation 2)}$$

K_{pH} and K_C were the carrying capacities for pH and CBZ concentration decrease ratio models, τ_{pH} and τ_C were the time constants indicating the instant when the rates of pH decrease and CBZ removal were maximal; α_{pH} and α_C were the kinetic parameters used to enhance correlation between the predicted values and the experimental ones. Theoretically, the logistic model is characterized by the carrying capacity K_i which is the value of R_i reached at infinite time, the time constant τ_i which is the abscissa of the inflexion point, and the kinetic parameter α_i which controls the allure of the representative graph of R_i versus time.

2.6.2. Enzymatic activity time-evolutions

Laccase enzymatic activity showed an increase followed by a decrease when the culture time progress with a bell shaped graph. The anti-derivative function of the enzymatic activity variation ($E_{(t)}$) was fitted using a logistic model as follows:

$$\int E_{(t)} dt = K_E / [1 + e^{-\alpha_E(t - \tau_E)}] \quad \text{(Equation 3)}$$

The kinetic parameter α_E also controls the allure of the graph. The time constant τ_E is the abscissa of the maximum enzymatic activity calculated as $E_{\max} = K_E \alpha_E / 4$.

2.7. Response Surface Methodology approach

In Response Surface Methodology, an output of the experiment named “response” is expressed in terms of the input variables which are in general the operational conditions sets of the experiment. In this study, the main modeled response was the percentage of degraded CBZ in solution after 21 days of culture calculated as follows:

$$Y\% = (1 - C_{(21\text{ d})} / C_0) \times 100\% \quad \text{(Equation 4)}$$

The RSM model used to express this percentage (the response) was a full factorial quadratic transfer function:

$$\begin{aligned} Y\% = & \mathbf{b}_0 + \mathbf{b}_T X_T + \mathbf{b}_S X_S + \mathbf{b}_{pH} X_{pH} + \mathbf{b}_C X_C + \mathbf{b}_{T,S} X_T X_S + \mathbf{b}_{T,pH} X_T X_{pH} + \mathbf{b}_{T,C} X_T X_C \\ & + \mathbf{b}_{S,pH} X_S X_{pH} + \mathbf{b}_{S,C} X_S X_C + \mathbf{b}_{pH,C} X_{pH} X_C + \mathbf{b}_{T,S,pH} X_T X_S X_{pH} + \mathbf{b}_{T,S,C} X_T X_S X_C \\ & + \mathbf{b}_{T,pH,C} X_T X_{pH} X_C + \mathbf{b}_{S,pH,C} X_S X_{pH} X_C + \mathbf{b}_{T,S,pH,C} X_T X_S X_{pH} X_C + \mathbf{b}_{T,T} X_T^2 \\ & + \mathbf{b}_{S,S} X_S^2 + \mathbf{b}_{pH,pH} X_{pH}^2 + \mathbf{b}_{C,C} X_C^2 \end{aligned} \quad \text{(Equation 5)}$$

The coefficients were determined using linear regression and then some insignificant terms were eliminated to enhance the predictive ability of the equation. This RSM approach was also used to express the other experimental responses (K_{pH} , τ_{pH} , α_{pH} , K_C , τ_C , α_C , E_{\max} , τ_E and α_E) obtained from kinetics modeling.

2.7.1. Statistical processing of data

Microsoft® Office Excel 2007 was used to statistically process experimental results, to calculate correlations and coefficients for both of the kinetic models and the transfer functions used in response surface methodology (RSM) and to generate scatters plots. MATLAB 7.8.0 (R2009a) was used to generate the 3D plots of the response surfaces.

3. Results and Discussion

2.1. Finding optimal CBZ degradation using RSM

A maximum abatement of CBZ of **80** to **86%** could be reached according to Response Surface Methodology (RSM). The best transfer function was obtained by eliminating some insignificant terms of the full-quadratic model as shown in **Table 2**. A detailed analysis of variance (ANOVA) table for the best model is given in **Table 3**. The total determination coefficient of **96.9%** was partitioned into **R²** contribution for each term of the equation and presented as a Pareto chart in **Figure 1**. Significant adjusted and predicted determination coefficients were respectively **Q² = 93.0%** and **P² = 79.8%**.

Table 2. Coefficients of the three models represented with corresponding standard errors and p-values.

Model (a): Full-factorial, non-quadratic ^a				Model (b): Full-quadratic ^a				Model (c): Enhanced partially quadratic ^a			
Coefficients		Standard Error	p-value	Coefficients		Standard Error	p-value	Coefficients		Standard Error	p-value
b_0	= 23.757	1.515	0.000**	b_0	= 19.748	1.239	0.000**	b_0	= 20.001	1.003	0.000**
b_T	= -5.2636	1.9732	0.021*	b_T	= -5.2640	0.9215	0.000**	b_T	= -5.2640	0.8199	0.000**
b_S	= -1.3235	1.3746	0.355	b_S	= -1.3240	0.6419	0.062	b_S	= -1.3240	0.5712	0.039*
b_{pH}	= 8.3121	1.9732	0.001**	b_{pH}	= 8.3121	0.9215	0.000**	b_{pH}	= 8.3121	0.8199	0.000**
b_C	= -4.4606	1.9732	0.043*	b_C	= -4.4610	0.9215	0.000**	b_C	= -4.4610	0.8199	0.000**
$b_{T,S}$	= 1.5500	2.0038	0.454					$b_{T,S}$	= 1.5500	0.8326	0.087
$b_{T,pH}$	= -6.7500	2.0038	0.006**	$b_{T,pH}$	= -6.7500	0.9358	0.000**	$b_{T,pH}$	= -6.7500	0.8326	0.000**
$b_{T,C}$	= 2.9750	2.0038	0.163	$b_{T,C}$	= 2.9750	0.9358	0.008**	$b_{T,C}$	= 2.9750	0.8326	0.004**
$b_{S,pH}$	= -1.0375	2.0038	0.614								
$b_{S,C}$	= 0.2375	2.0038	0.908								
$b_{pH,C}$	= -3.0625	2.0038	0.152	$b_{pH,C}$	= -3.0630	0.9358	0.007**	$b_{pH,C}$	= -3.0630	0.8326	0.003**
$b_{T,S,pH}$	= 3.3875	2.0038	0.117	$b_{T,S,pH}$	= 3.3875	0.9358	0.004**	$b_{T,S,pH}$	= 3.3875	0.8326	0.002**
$b_{T,S,C}$	= 1.7875	2.0038	0.390	$b_{T,S,C}$	= 1.7875	0.9358	0.080	$b_{T,S,C}$	= 1.7875	0.8326	0.053
$b_{T,pH,C}$	= 2.7125	2.0038	0.201	$b_{T,pH,C}$	= 2.7125	0.9358	0.013*	$b_{T,pH,C}$	= 2.7125	0.8326	0.007**
$b_{S,pH,C}$	= -2.4250	2.0038	0.249	$b_{S,pH,C}$	= -2.4250	0.9358	0.024*	$b_{S,pH,C}$	= -2.4250	0.8326	0.013*
$b_{T,S,pH,C}$	= 0.5250	2.0038	0.798								
				$b_{T,T}$	= -27.775	8.659	0.008**	$b_{T,T}$	= -27.809	7.704	0.004**
				$b_{S,S}$	= 0.1594	0.3232	0.631				
				$b_{pH,pH}$	= 47.825	8.659	0.000**	$b_{pH,pH}$	= 47.791	7.704	0.000**
				$b_{C,C}$	= -13.575	8.659	0.143	$b_{C,C}$	= -13.609	7.704	0.103
$R^2 = 0.820$; $Q^2 = 0.595$; SE = 8.0 ; F = 3.65 ; LOF = 28.2				$R^2 = 0.961$; $Q^2 = 0.912$; SE = 3.7 ; F = 19.6 ; LOF = 5.89				$R^2 = 0.969$; $Q^2 = 0.930$; SE = 3.3 ; F = 25.0 ; LOF = 4.59			

^a Lesser is a p-value greater is the significance of the corresponding term; because p-value is the probability that the observed influence of the term is due to random. Some terms were highly significant ($p < 1\%$) and were marked with double star**, and other were fairly significant ($p < 5\%$) and were marked with one star*. The shaded p-values indicated the less significant terms of the model. The determination coefficient R^2 , the adjusted determination coefficient Q^2 , the global standard error SE, the Fisher statistic F (signal-to-noise ratio) and the lack-of-fit LOF (model error-to-pure error ratio) of each model were represented below each table. The model (a) was enhanced to the model (b) by substituting the four less significant terms with the greatest p-values with the four quadratic terms. The model (b) was also enhanced to the final model (c) by eliminating a non-significant quadratic term X_S^2 with high p-value and retrieving the term $X_T \cdot X_S$ with smaller p-value. Enhancement can be tracked by looking to increasing values of R^2 , Q^2 and F, and the decreasing of p-values, SE, LOF and the difference ($R^2 - Q^2$).

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) of enhanced Model (c) of **Table 2**.

	Degree of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F-ratio	p-value
Regression	15	4151	276.7	24.95	9.6×10^{-6}
Residuals	12	133	11.1		
Lack of fit	9	124	13.8	4.591	0.1184
Pure error	3	9	0.3		
Predicted residuals		865		predicted R²: P² = 0.798	
Total	27	4284			

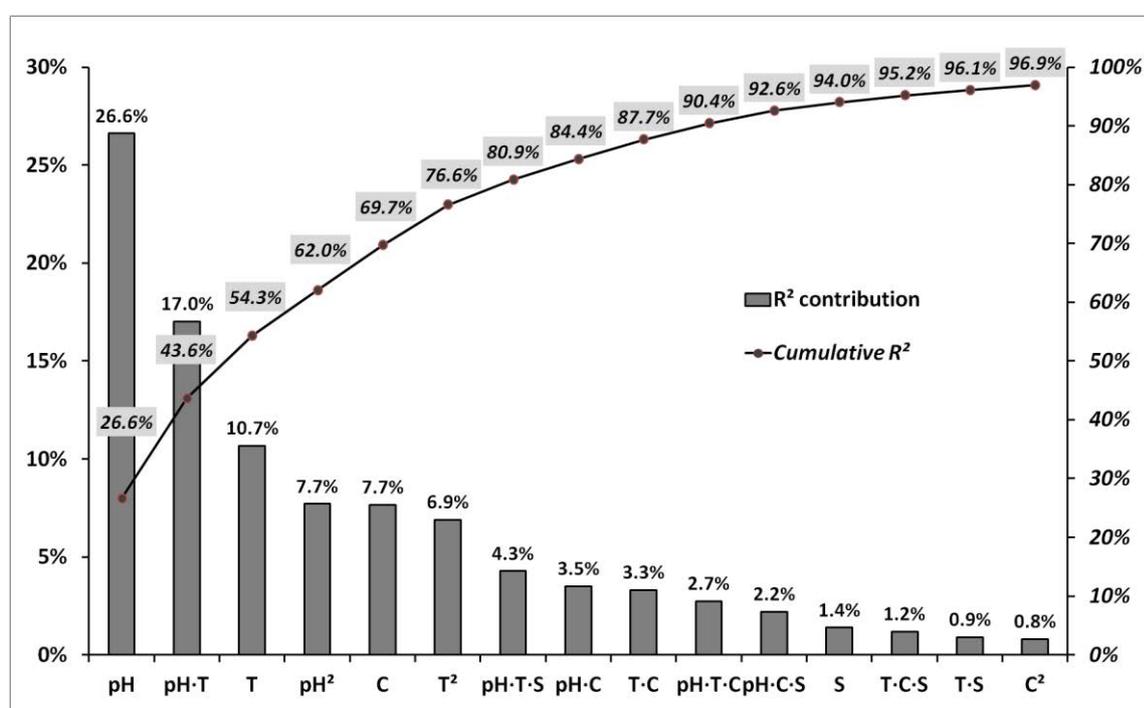


Figure 1. Pareto chart presenting the R² contribution of each term as bars and the cumulative R² as solid line. Initial pH and pH² contribute with 34.3%, temperature T, T² and interaction pH·T contribute with 34.6%, initial CBZ concentration C, C², interactions pH·C, T·C and pH·T·C contribute with 18.0%, and finally the stirring speed S, interactions T·S, T·C·S, pH·T·S and pH·C·S contribute with the remaining 10.0%.

Moreover, the parity diagram (**Figure 2**) which represents the predicted values of the response **Y** versus the experimental ones shows a satisfactory alignment of points with the first bisector of axis.

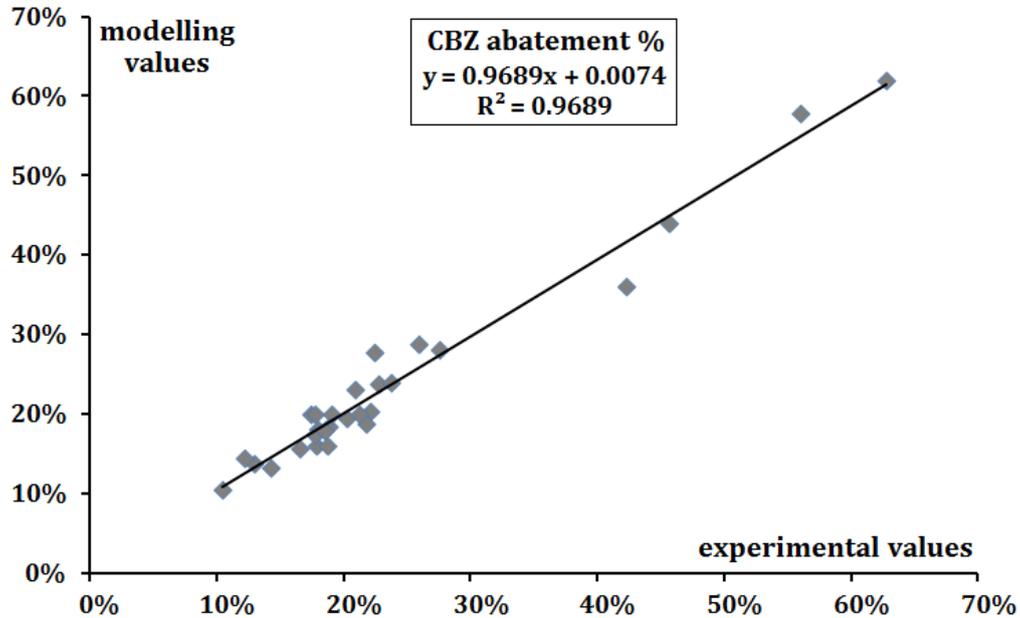


Figure 2. Parity diagram presents the modelling values “y” for CBZ abatement percentages versus experimental values ”x”. Points alignment with $y = x$ line showed that the model fitted accurately the experimental data.

The final equation was rewritten using the real variables as follows:

$$\begin{aligned}
 Y\% = & 12 (\text{pH}_0 - 7)^2 + (\text{pH}_0 - 7) (1.1 \log C_0 - 0.17 S - 0.024 S \log C_0 + 56) \\
 & - 0.28 (T - 25)^2 + (T - 25) (0.033 \log C_0 + 0.0099 S + 0.0036 S \log C_0 + 0.098) \\
 & + (\text{pH}_0 - 7) (T - 25) (0.14 \log C_0 + 0.034 S - 0.85) - 13.6 \log^2 C_0 \\
 & - (0.0664 S + 0.412) \log C_0 - 0.0759 S + 86.5 \qquad \qquad \qquad \text{(Equation 6)}
 \end{aligned}$$

When looking to **Equation 6** it is obvious that all variable terms will vanish by plugging in it the values $\text{pH}_0 = 7$, $T = 25^\circ\text{C}$, $C_0 = 1 \text{ mg}_{\text{CBZ}} \text{ L}^{-1}$ and $S = 0 \text{ rpm}$, leaving only the constant term **86.5%** corresponding to a high abatement of CBZ.

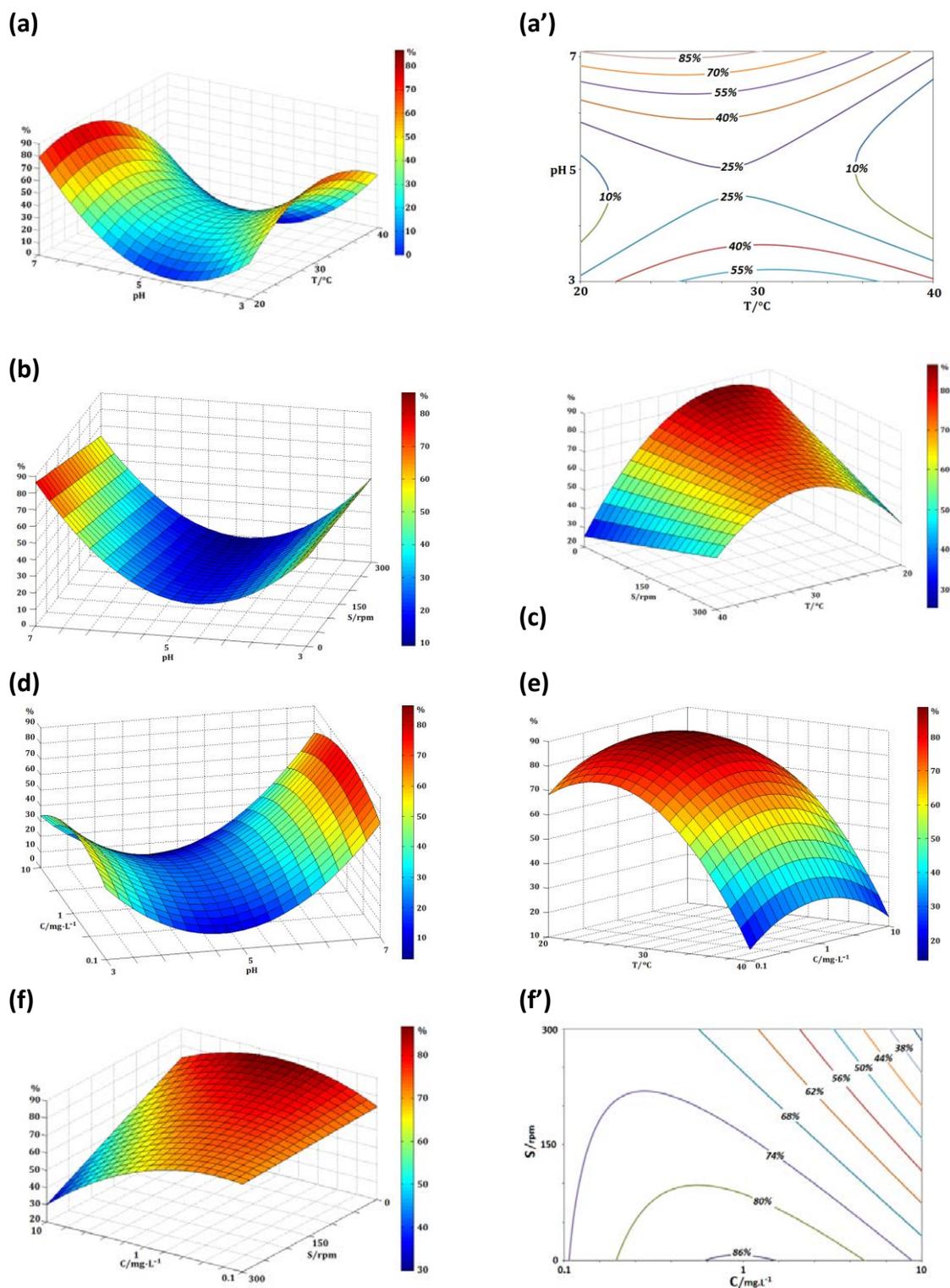


Figure 3. 3D plots representing the abatement percentage of CBZ obtained by varying two of the four parameters temperature T , initial concentration C of CBZ, agitation speed S and initial pH: (a) T , C varied and $pH = 7$, $S = 0$; (b) T , S varied and $pH = 7$, $C = 1 \text{ mg.L}^{-1}$; (c) pH , C varied and $T = 25^\circ\text{C}$, $S = 0 \text{ rpm}$; (d) pH , S varied and $T = 25^\circ\text{C}$, $C = 1 \text{ mg.L}^{-1}$. (a') and (d') are corresponding contour plots of (a) and (d) respectively.

The 3D-presentation and contour diagrams of the response surfaces of the CBZ removal yield were plotted by setting two variables at their optimal values and varying the other two (**Figure 3**). Topological analysis of the obtained surfaces permitted to extend the optimal region of experimental space around the punctual optimum: working at initial pH 7 and 25°C, under no agitation or moderate stirring speeds < 80 rpm would lead to eliminate 80 to 86% of an initial CBZ concentration ranging from 0.324 to 1.17 mg_{CBZ} L⁻¹.

2.2. Effect of the operating conditions

2.2.1. The effect of the initial pH

As it is seen in **Figure 1**, the initial pH of the culture medium had the most tremendous effect (**R²** contribution of 34.3% for **pH₀** and **pH₀²**) on the achieved yield of carbamazepine (CBZ) elimination. **Figure 3 (a, a', b, d)** shows that for an optimal **pH₀** of 7, high CBZ elimination yields > 85% could be achieved. This result suggested that the fungi was able to survive when it has been put in a neutral medium and failed to do so when it has been put in a hostile acidic medium. However, a closer look at the way the yields vary when the pH increase from 3 to 7 permitted to identify local minima (10%) around a pH value of 4.7, and some good yields (reaching 55%) are even noticed when initial pH was 3. This behavior is commonly faced in biological systems where a key protein (probably an enzyme) involved in the process has its isoelectric point at **pH_i = 4.7** where the total electric charge of all of its ionic forms is zero. This electric neutrality would cause a precipitation of this protein leading to a decreasing affinity to CBZ.

2.2.2. The effect of the temperature and interaction with initial pH

The Pareto chart (**Figure 1**) shows that the temperature was also an influential factor with a **R²** contribution of 17.6% (**T** and **T²** terms) on the CBZ elimination yield. The interaction with initial pH, contributed with an additional 17.0% (**T*pH₀** term) to the determination

coefficient. **Figure 3 (a, a', c, e)** indicate that the CBZ elimination yield increased toward a maximum (> **85%**) when the temperature was increased from **20** to **25°C** (its optimal value) but then the yield decreased tremendously (about **10%**) when temperature increased to **40°C**. This behavior is typical for biological systems where high temperatures inhibit the cellular metabolism; it is said to follow an anti-Arrhenius kinetic trend. In the case of the CBZ elimination reaction by the fungus *Trametes versicolor* DSM#11269, the inversion temperature, where the rate is maximal, appeared to be $T_{inv} = 25^{\circ}\text{C}$. Smaller temperatures imply smaller rates, but higher temperatures could denaturize some enzymes leading to smaller rates as well.

2.2.3. The effect of the initial concentration of CBZ and interactions with T and pH_0

The initial concentration of CBZ degradation was also an influential factor of the process with a R^2 contribution of **8.5%** by terms C_0 and C_0^2 (**Figure 1**); additional **9.5%** are the contribution to the determination coefficient of interactions of C_0 with T and pH_0 . **Figure 3 (e, f, f')** shows that when the initial concentration of CBZ was increased to an optimal value around **1 mg_{CBZ} L⁻¹**, the CBZ elimination yield increased toward a maximum but then the yield decreased when the initial concentration of CBZ increased to **10 mg_{CBZ} L⁻¹**.

This behavior could be explained by a Haldane-Andrews kinetic trend where high concentration of substrate inhibits its utilization by the microorganisms. The specific growth coefficient μ is described by the following equation:

$$\mu = \mu_{\max} (C/K_C + 2C/C_{\max}) / [1 + C/K_C + (C/C_{\max})^2] \quad \text{(Equation 7)}$$

The maximum specific growth coefficient μ_{\max} can be reached when the concentration C of the substrate carbamazepine is equal to C_{\max} where K_C is the dissociation constant of the active association biomass-substrate. The value of C_{\max} in the present case might be around **1 mg_{CBZ} L⁻¹**.

2.2.4. The effect of the stirring speed and interactions with T , pH and C_0

The stirring speed was among the four first order terms, the less influential factor with a R^2 contribution of only **1.4%** for term S in the CBZ degradation process. Interactions of stirring speed with the other factors contributed with an additional **8.6%** to the determination coefficient. **Figure 2 (c, f, f')** shows that increased stirring speeds lead to decreased yields of carbamazepine elimination. In the literature, the way the stirring speed affects reactions' kinetics is rarely discussed quantitatively. Every chemist will agree that more the solution is vigorously agitated, more is the probability that the reactants' molecules will be near to each other to undergo the reaction. On the other hand, biologists will argue that the high stirring speeds could damage the suspended cells of the involved microorganism and decrease the efficiency of the biocatalyst. The kinetic energy of particles is due to their agitation at microscopic scale and is proportional to the absolute temperature T ; however, at macroscopic scale this energy is proportional to the squared stirring speed S^2 . Using this analogy, the influence of stirring speed can be treated as a "supplementary temperature". An augmented temperature T^* is then defined as the sum of the absolute temperature T and an additional term βS^2 proportional to the squared stirring speed as $T^* = T + \beta S^2$. According to **Equation 6**, if the values $pH_0 = 7$, $T = 25^\circ\text{C}$, $C_0 = 1 \text{ mg}_{\text{CBZ}} \text{ L}^{-1}$ and $S = 300 \text{ rpm}$ or the values $pH_0 = 7$, $T = 34^\circ\text{C}$, $C_0 = 1 \text{ mg}_{\text{CBZ}} \text{ L}^{-1}$ and $S = 0 \text{ rpm}$ are plugged, a yield of **63.8%** of eliminated **CBZ** is calculated; so increasing stirring speed from **0** to **300 rpm** has the same effect as increasing the temperature from **25** to **34°C** and the coefficient β is approximately equals to $10^{-4} \text{ }^\circ\text{C rpm}^{-2}$.

2.3. Modeling approach

The obtained values of the determination coefficients R^2 values of the extracted models were satisfactory (**> 99%**) indicating that the considered equations fitted the experimental results

with high accuracy. Moreover, this fact was graphically confirmed by the parity diagrams (Figure 4) where a high alignment of the points cloud with the axis first bisector is observed.

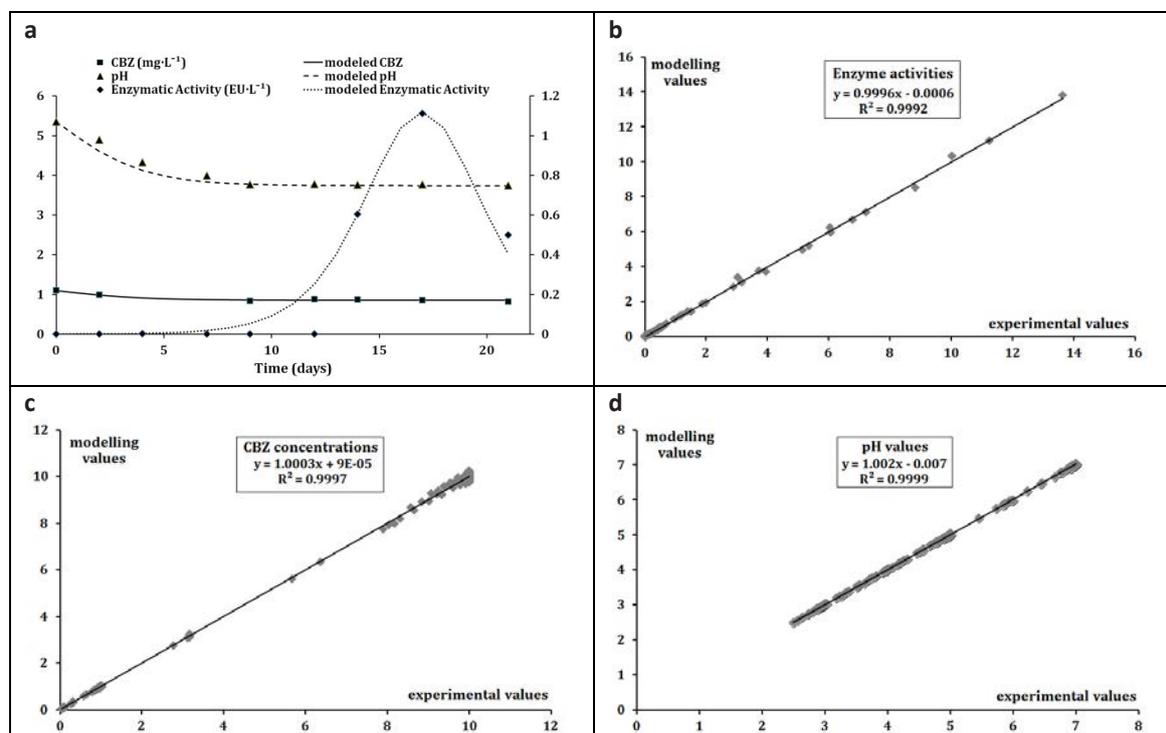


Figure 4. In panel (a): An example of the modeled kinetic curves for the central point of the design. In panels (b), (c) and (d): Parity diagrams presenting respectively the modelling values “y” for pH, CBZ concentration and Laccase enzymatic activity versus their experimental values ”x”. Points alignment with $y = x$ line showed that the model fitted accurately the experimental data.

The same response surface methodology used above to model the percentage of abatement of carbamazepine was used again to express the nine parameters K_{pH} , τ_{pH} , α_{pH} , K_C , τ_C , α_C , E_{max} , τ_E and α_E in terms of coded variables X_T , X_S , X_{pH} and X_C . The coefficients of the quadratic transfer functions are shown in Table 4.

Table 4. Coefficients of RSM equations for the evolution models parameters. $R^2 < 80\%$ marked with “a” were too small indicating poorly predictive model. F-values < 9 marked with “b” were too small indicating noisy model.

	α_{pH}	τ_{pH}	K_{pH}	α_c	τ_c	K_c	α_E	τ_E	E_{max}
b_0	0.5632	17.33	0.3391	0.6350	18.89	0.2005	0.5854	18.56	5.525
b_T	-0.2800	1.542	-0.1467	0.1052	0.4909	-0.0558	-0.2646	-0.4303	-4.667
b_S	0.0915	0.2382	-0.0224	-0.0324	0.1294	-0.0141	-0.0359	0.0971	
b_{pH}	-0.1209	-1.267	0.1200	0.0667	-0.7273	0.0891	-0.0282	0.5667	4.906
b_c	0.1079	-0.1333	0.0146		0.4212	-0.0455	-0.0321	0.0606	
$b_{T,S}$				-0.1744	-0.2188		-0.0494	0.5563	
$b_{T,pH}$	0.1213	1.306	-0.1263		0.7563	-0.0588		-0.7813	-4.586
$b_{T,c}$				0.1694	-0.2563	0.0338		0.5563	
$b_{S,pH}$				-0.1394			0.0569		
$b_{S,c}$	-0.0825			-0.0781			0.0544	-0.5438	
$b_{pH,c}$	-0.1213			-0.0656	0.3313	-0.0263			
$b_{T,S,pH}$					-0.3688	0.0363			
$b_{T,S,c}$				0.1794	-0.2063			0.9188	2.008
$b_{T,pH,c}$	0.1100			-0.0831	-0.3063	0.0238			
$b_{S,pH,c}$					0.2563	-0.0213	0.1394		
$b_{T,S,pH,c}$							-0.1169		
$b_{T,T}$		2.389	-0.2195	-1.215	3.663	-0.2730			
$b_{S,S}$		-0.0700	0.0079	-0.0357					
$b_{pH,pH}$		-2.611	0.2605	1.405	-4.337	0.4870		-9.316	
$b_{C,c}$		2.189	-0.2195			-0.1530		5.684	
R^2	0.8223	0.8728	0.8739	0.8556	0.9136	0.9546	0.8823	0.7577 ^a	0.4256 ^a
F	10.99	13.73	13.86	6.380 ^b	9.823	22.65	14.99	4.548 ^b	4.261 ^b

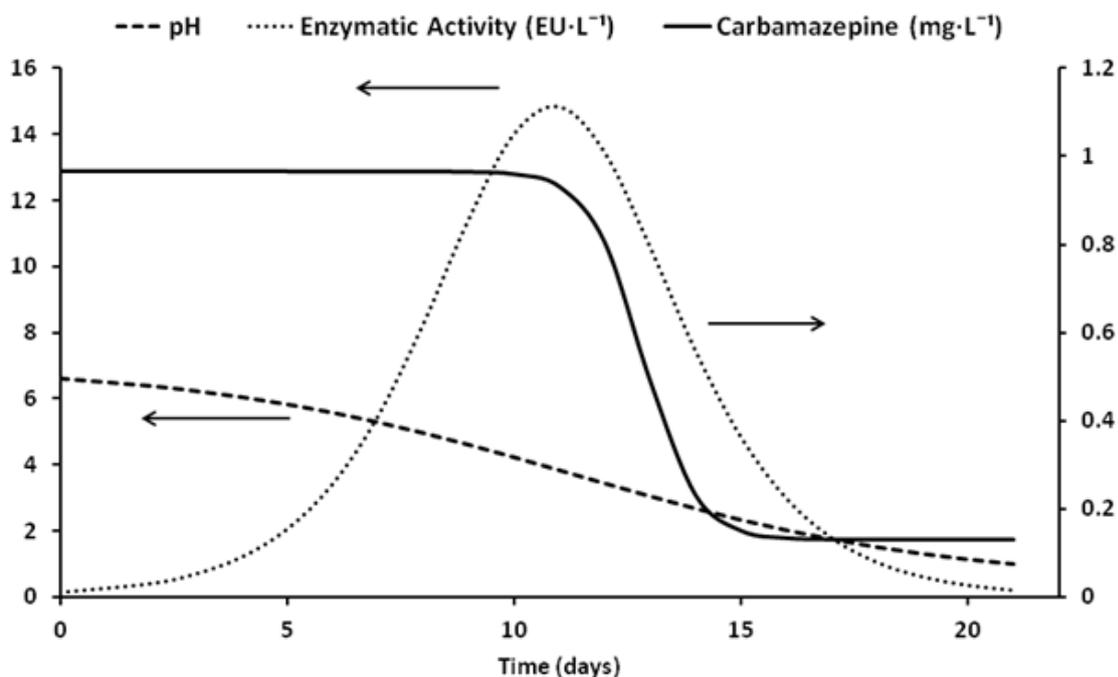


Figure 5. Plots of simulated pH, enzymatic activity and concentration of carbamazepine evolutions in time if the optimal set of operating conditions found by RSM: temperature 25°C, no agitation, initial pH 7 and initial concentration of CBZ = 0.966 mg/L would be used. Degradation of CBZ would begin when the enzyme activity would reach its maximum value; this is an extracellular reaction and will not lead to any fungal growth.

The values of the determination coefficients R^2 and of the signal-to-noise ratios F were acceptable and allowed to use the models to predict more than 80% of the variation of all these kinetic parameters with noises smaller than 10% ($F > 9$) except for τ_E and E_{max} poorly predictive ($R^2 = 0.75$ and 0.42) and noisy models ($F = 4.5$ and 4.2) and for the α_C noisy model ($F = 6.3$). So the whole modeling approach succeeds to predict the pH decreasing and carbamazepine removal but failed to predict maximum enzyme activity. The modeling approach also succeeded to determine the evolution curve profile for pH but failed to do so with the curve allures of C- and E-evolutions, and succeeded completely to determine all the time constants accurately.

As a confirmation test, the set of parameters leading to the maximum degradation of CBZ was plugged in the transfer functions of the kinetic parameters to obtain the evolution models, which allowed simulating the pH, the CBZ concentration and the laccase enzymatic activity variations versus time (**Figure 5**). The simulation results suggested that the concentration of CBZ would decrease (from 966 to 132 $\mu\text{g L}^{-1}$) dealing exactly with the predicted 86% of abatement, the time constants were in the order $\tau_{\text{pH}} < \tau_{\text{E}} < \tau_{\text{C}}$ so pH decrease would accelerate first, then maximum enzymatic activity would be reached and then the CBZ degradation would accelerate. A possible interpretation of these behaviors is that *Trametes versicolor* was first in a stress situation: part of its mycelium was decaying producing acid compounds (pH decrease) and then the fungus began to produce its extracellular enzymes to try to decompose supposed macromolecules in the medium in order to assimilate the produced small molecules.

When the enzymatic activity reached a maximum, the degradation of carbamazepine began and would stop when no enough enzymes remained in the medium and pH had become very low inhibiting all metabolic activities of *Trametes versicolor*.

4. Conclusions

Elimination of carbamazepine by the white-rot fungus *Trametes versicolor* was achieved and optimized through response surface methodology. The suggested 86% of CBZ abatement found here confirmed the results of recent researches using similar processes [27,28]. On the other hand, it was the first time that the strain DSM # 11269 has been used in a bioremediation process, without carbon co-substrate addition and in a configuration minimizing biosorption and promoting biodegradation. Operating conditions optimizing using response surface methodology and kinetic modeling permitted better understanding of the fungus behavior through the biodegradation process.

Abbreviations

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt; **BEH:** Ethylene Bridged Hybrid; **CBZ:** Carbamazepine; **DW:** Dry Weight content; **EU:** Enzymatic Unit; **HPLC:** High Pressure Liquid Chromatography; **PDA:** Photodiode Array Detector; **PhACs:** Pharmaceutically Active Compounds; **POPs:** Persistent Organic Pollutants; **RSM:** Response Surface Methodology; **SE:** Global Standard Error; **SS:** Suspended Solids; **S:** Squared Stirring Speed; ***T. versicolor:*** *Trametes versicolor*; **UPLC:** Ultra-high Pressure Liquid Chromatography; **WRF:** White-Rot Fungi; **3D:** Three-dimensional

Acknowledgements

The Lebanese social association Azm and Saadeh is gratefully acknowledged by the first author for the support during his PhD thesis works.

References

- [1] Richardson SD. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analy Chem* 2003;75:2831–57.
- [2] Richardson SD, Ternes TA. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal Chem* 2005;77:3807–38.
- [3] Richardson BJ, Lam PKS, Martin M. Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. *Mar Pollut Bull* 2005;50:913–20.
- [4] Richardson SD. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal Chem* 2006;78:4021–46.
- [5] Richardson SD. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal Chem* 2007;79:4295–324.
- [6] Öllers S, Singer HP, Fässler P, Müller SR. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *J Chromatogr A* 2001;911:225–34.
- [7] Gebhardt W, Schröder HF. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *J Chromatogr A* 2007;1160:34–43.
- [8] Jones OA, Lester JN, Voulvoulis N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends Biotechnol* 2005;23:163–7.

- [9] Jones OAH, Voulvoulis N, Lester JN. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res* 2002;36:5013–22.
- [10] Kosjek T, Andersen HR, Kompare B, Ledin A, Heath E. Fate of Carbamazepine during Water Treatment. *Environ Sci Technol* 2009;43:6256–61.
- [11] Metcalfe CD, Miao X-S, Koenig BG, Struger J. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ Toxicol Chem* 2003;22:2881–9.
- [12] Ternes TA, Meisenheimer M, McDowell D, Sacher F, Brauch H-J, Haist-Gulde B, et al. Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment. *Environ Sci Technol* 2002;36:3855–63.
- [13] Clara M, Strenn B, Kreuzinger N. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res* 2004;38:947–54.
- [14] Scheytt T, Mersmann P, Lindstädt R, Heberer T. Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. *Chemosphere* 2005;60:245–53.
- [15] Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere* 2003;50:1319–30.
- [16] Rizzo L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. *Water Res* 2011;45:4311–40.
- [17] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Caminal G, Vicent T. Dechlorination of 1, 2, 3-and 1, 2, 4-trichlorobenzene by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *J Hazard Mater* 2009;166:1141–7.
- [18] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Cruz-Morató C, Caminal G, Vicent T. White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC–DAD–MS and NMR. *Chemosphere* 2010;78:474–81.
- [19] García-Galán MJ, Rodríguez-Rodríguez CE, Vicent T, Caminal G, Díaz-Cruz MS, Barceló D. Biodegradation of sulfamethazine by *Trametes versicolor*: Removal from sewage sludge and identification of intermediate products by UPLC–QqTOF-MS. *Sci Total Environ* 2011;409:5505–12.
- [20] Borràs E, Llorens-Blanch G, Rodríguez-Rodríguez CE, Sarrà M, Caminal G. Soil colonization by *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic materials: Substrate selection and naproxen degradation. *Int Biodeterior Biodegrad* 2011;65:846–52.

- [21] Rodríguez-Rodríguez CE, Jelić A, Llorca M, Farré M, Caminal G, Petrović M, et al. Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. *Bioresour Technol* 2011;102:5602–8.
- [22] Badia-Fabregat M, Rodríguez-Rodríguez CE, Gago-Ferrero P, Olivares A, Piña B, Díaz-Cruz MS, et al. Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. *J Environ Manage* 2012;104:114–20.
- [23] Nyanhongo GS, Gubitz G, Sukyai P, Leitner C, Haltrich D, Ludwig R. Oxidoreductases from *Trametes* spp. in biotechnology: a wealth of catalytic activity. *Food Technol Biotechnol* 2007;45:250.
- [24] Zhang Y, Geißen S-U, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 2008;73:1151–61.
- [25] Marco-Urrea E, Radjenović J, Caminal G, Petrović M, Vicent T, Barceló D. Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibric acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Water Res* 2010;44:521–32.
- [26] Rodríguez-Rodríguez CE, Marco-Urrea E, Caminal G. Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresour Technol* 2010;101:2259–66.
- [27] Jelic A, Cruz-Morató C, Marco-Urrea E, Sarrà M, Perez S, Vicent T, et al. Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Res* 2012;46:955–64.
- [28] Zhang Y, Geißen S-U. Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor. *Bioresour Technol* 2012;112:221–7.
- [29] Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD. Method 2540 D. Standard methods for the examination of water & wastewater. 20th ed., American Public Health Association; 1998.
- [30] Bajaj M, Gallert C, Winter J. Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. *Bioresour Technol* 2008;99:8376–81.
- [31] Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1876–80.

CHAPITRE 5

BIOAUGMENTATION

CHAPITRE 5 : BIOAUGMENTATION

5.1. Introduction

Dans ce chapitre, l'approche optimisée au chapitre 3 avec les boues activées et l'approche optimisée au chapitre 4 avec la souche de collection DSM#11 269 du champignon ligninolytique *Trametes versicolor*, se voient couplées en une approche unique permettant de profiter de l'économie avantageuse de la première et de la capacité épuratrice de la deuxième : c'est-à-dire la bioaugmentation.

Ceci n'est pas facile étant données les conditions de culture contradictoires des deux biomasses mises en jeu : les microorganismes des boues activées éliminant mieux la carbamazépine en condition d'anoxie alors que le champignon ligninolytique est connue pour être un organisme vivant en aérobie.

Ainsi, après un premier test pour évaluer la viabilité du champignon en anoxie, la possibilité de cohabitation des deux types de biomasse, et l'influence de ces différentes conditions sur l'élimination de la carbamazépine (§5.2), l'optimisation des durées relatives des phases en anoxie et en aérobie, ainsi que celle du rapport en inoculum des deux biomasses sont réalisées (§5.3). La synthèse de tous ces résultats permet de proposer un procédé intégrant les deux techniques d'élimination (§5.4).

5.2. Viabilité du champignon et cohabitation avec les boues

5.2.1. Méthode de passage de l'aérobie à l'anoxie et *vice versa*

Le milieu de culture utilisé ici est celui ne contenant que de sels minéraux et de la carbamazépine à $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Toutes les cultures sont agitées à raison de 100 tr min^{-1} et menées à température ambiante (25°C). La méthode utilisée pour faire passer une culture de l'aérobie à l'anoxie (culture R@X) est la suivante :

- La culture de volume **250 mL** est d'abord menée dans un erlenmeyer de capacité totale **600 mL** ; l'espace de tête est donc de $(600 - 250) = 350 \text{ mL}$ et par la suite, le ratio volumique gaz-liquide est de $(350/250) = 1,4$ indiquant des conditions d'aérobie.
- Pour passer aux conditions d'anoxie, il suffit alors d'ajouter au moment désiré **250 mL** de milieu de culture fraîche ; l'espace de tête devient $(600 - 500) = 100 \text{ mL}$ et le ratio volumique gaz-liquide devient $(100/500) = 0,2$ indiquant des conditions d'anoxie.

Pour réaliser l'inverse et faire passer une culture initialement en anoxie vers l'aérobie (culture **X@R**), la méthode est peu plus compliquée :

- La culture de **250 mL** est d'abord menée dans un erlenmeyer de capacité totale **300 mL** ; l'espace de tête est de $(300 - 250) = 50 \text{ mL}$ avec un ratio volumique gaz-liquide de $(50/250) = 0,2$ indiquant bien des conditions d'anoxie.
- Au moment voulue, la culture est transvasée dans un Erlenmeyer de capacité totale **1200 mL** contenant **250 mL** de milieu de culture fraîche ; l'espace de tête devient $(1200 - 500) = 700 \text{ mL}$ avec un ratio volumique gaz-liquide de $(700/500) = 1,4$ indiquant le passage aux conditions d'aérobie.

5.2.2. Viabilité de *Trametes versicolor* en anoxie

La culture **R@X** notée **(I)** (**Figure 5.1**), contenant *Trametes versicolor* à $1 \text{ g}_{\text{ss}} \text{ L}^{-1}$, est réalisée pour tester la viabilité de ce champignon dans les conditions d'anoxie. Ainsi, la culture a évolué en aérobie pendant cinq jours, puis pendant cinq autres jours en anoxie.

Le pourcentage de la carbamazépine éliminée pendant la première phase est **5,8 %** contre **6,0 %** pendant la deuxième phase. Le champignon ligninolytique conserve bien son pouvoir épurateur en condition d'anoxie.

5.2.3. Cohabitation de *Trametes versicolor* avec les boues activées

La culture R@X notée (II) (Figure 5.1), contenant *Trametes versicolor* à $1 \text{ g}_{\text{ss}} \text{ L}^{-1}$, est réalisée pour tester la cohabitation de ce champignon avec les boues activées dans les conditions d'anoxie. Ainsi, la culture a évolué en aérobie pendant cinq jours, puis des boues activées sont ajoutées à cette culture fongique à raison de $1 \text{ g}_{\text{ss}} \text{ L}^{-1}$ pendant les cinq autres jours réalisés en anoxie. Le pourcentage de la carbamazépine éliminée pendant la première phase est **5,8 %** (comme la culture (I)), contre seulement **0,6 %** pendant la deuxième phase. L'introduction des boues activées a un effet nettement négatif sur le pouvoir épurateur en condition d'anoxie du champignon ligninolytique.

La dernière culture R@X notée (III) (Figure 5.1) est réalisée, cette fois en introduisant dès le début la biomasse fongique et la biomasse des boues activées à raison de $1 \text{ g}_{\text{ss}} \text{ L}^{-1}$ chacune. Cette culture mixte a évolué en aérobiose pendant cinq jours, puis pendant cinq autres jours en anoxie.

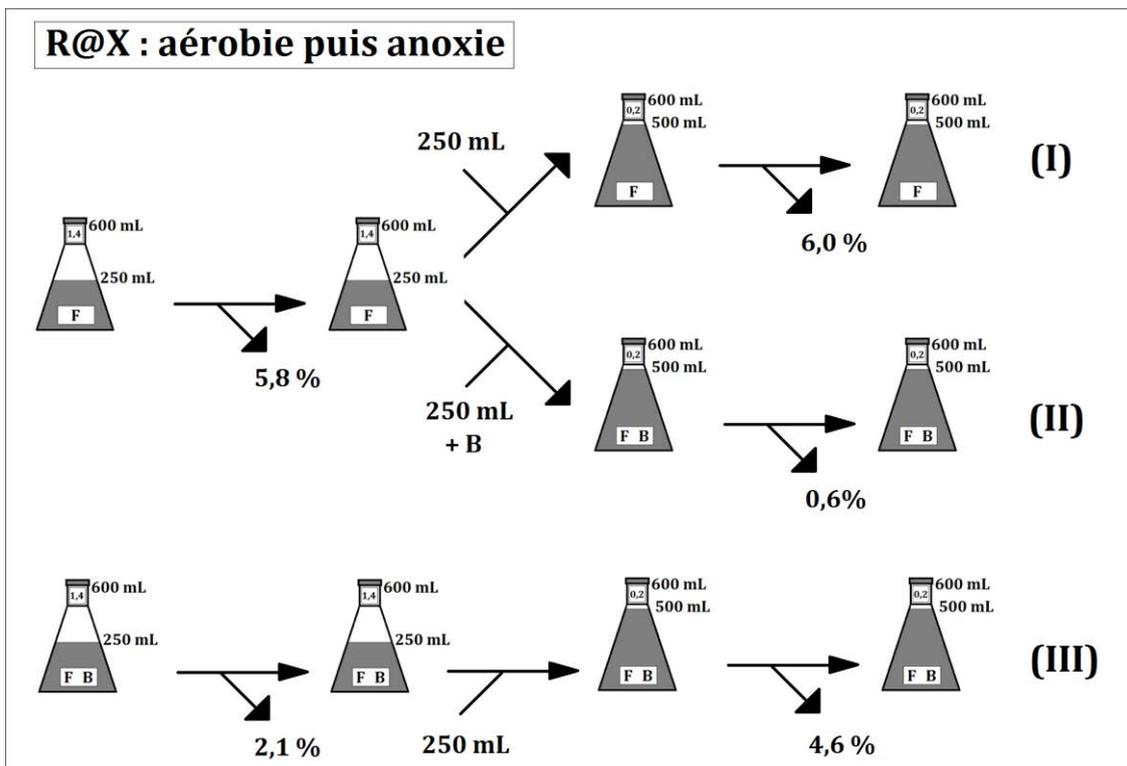


Figure 5. 1 Cultures R@X

Le pourcentage de carbamazépine éliminée pendant la première phase est **2,1 %** contre **4,6 %** pendant la deuxième phase. Si la culture mixte en phase aérobie a un pouvoir épurateur (**2,1 %**) inférieur à celui d'une culture fongique pure (**5,8 %**) dans ces mêmes conditions, elle a certainement un pouvoir supérieur à celui d'une culture mixte réalisée au début de la deuxième phase menée en anoxie (**0,6 %**). De même en phase d'anoxie, cette culture mixte précoce, en atteignant **4,6 %**, dépasse de loin les **0,6 %** de la culture mixte tardive, tout en restant inférieure aux **6,0 %** du champignon seul en anoxie.

De même, trois cultures **X@R** sont réalisées (**Figure 5.2**) : la première (notée **(IV)**) ne contient que de boues activées à raison de **1 g_{ss} L⁻¹** pendant les deux phases et sert comme témoin ; la deuxième (notée **(V)**) contient de boues activées à raison de **1 g_{ss} L⁻¹** pendant la première phase d'anoxie et **1 g_{ss} L⁻¹** de biomasse fongique est ajouté au début de la deuxième phase aérobie ; et la troisième culture (notée **(VI)**) contient dès le début la biomasse fongique et la biomasse des boues activées à raison de **1 g_{ss} L⁻¹** chacune.

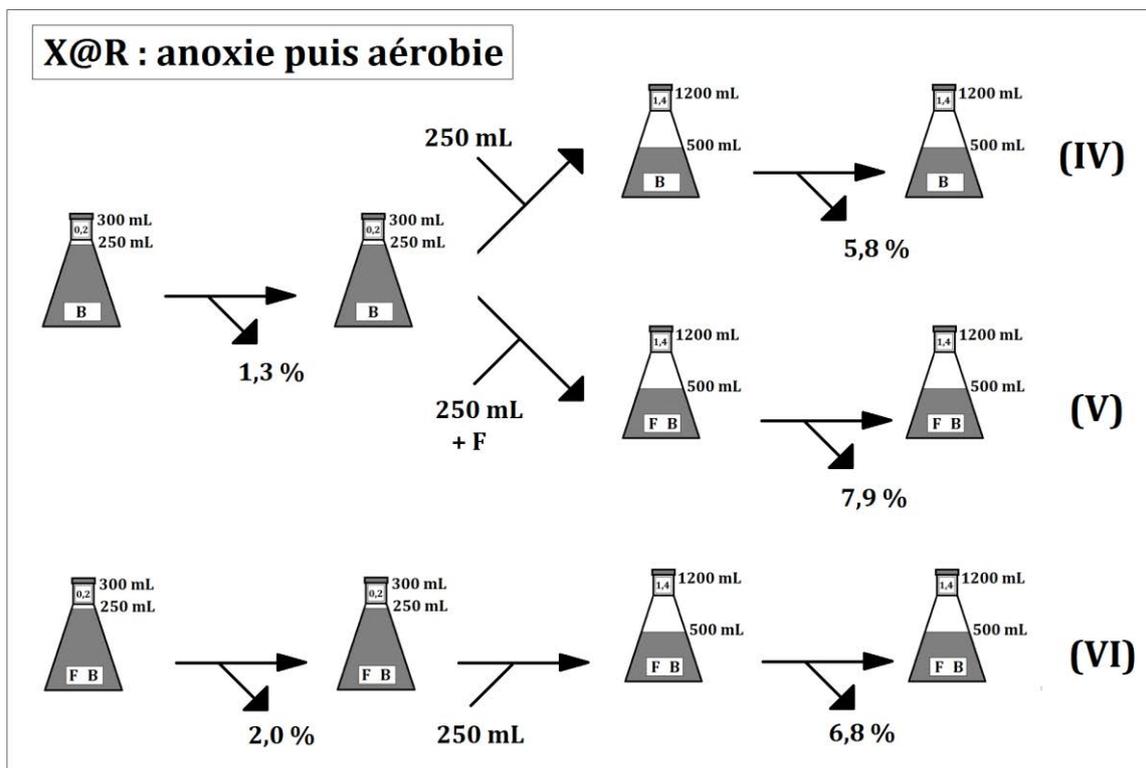


Figure 5. 2 Cultures R@X

Les résultats montrent que les boues activées, mises seules en anoxie précoce au contact de la carbamazépine, sont capables d'en éliminer **1,3 %** contre **2,0 %** pour la culture mixte dans les mêmes conditions. Le pourcentage de la carbamazépine éliminée pendant la phase tardive en aérobie est de **5,8 %** pour les boues activées seules, **7,9 %** lorsque le champignon est introduit en tête de cette phase, et **6,8 %** pour la culture mixte précoce.

Une lecture minutieuse de tous ces résultats permet de dégager les deux conclusions suivantes :

- (1) la stratégie **X@R** donne de meilleurs résultats que la stratégie **R@X** pour les cultures mixtes ;
- (2) les cultures mixtes précoces aboutissent à des taux d'élimination en carbamazépine sensiblement supérieurs à ceux obtenus par les cultures mixtes tardives.

Par la suite, il est décidé de rejeter la stratégie **R@X** et de commencer toujours les cultures en phase d'anoxie suivie d'une phase tardive en aérobie. Cependant, la petite différence observée entre l'introduction précoce ou tardive du champignon pour former une culture mixte ne permet pas de rejeter l'une ou l'autre de ces deux stratégies qui seront toutes les deux testées dans l'expérience suivante.

5.3. Etude de l'effet des durées et des concentrations en biomasses

5.3.1. Plan d'expérience factoriel utilisé

Pour étudier l'effet des deux facteurs « durée en anoxie/durée en aérobie » et « biomasse boues activées/biomasse de fongique », un plan d'expérience à cinq niveaux est utilisé. Les cinq niveaux codés **(--)**, **(-)**, **(0)**, **(+)** et **(++)** sont groupés dans le **Tableau 5.1**. Ainsi, les dix jours de cultures sont répartis entre anoxie et aérobie de cinq façons **(0/10 ; 3/7 ; 5/5 ; 7/3** ou **10/0)** et le **1 g_{SS} L⁻¹** en biomasse totale est réparti entre boues activées et champignon de cinq façons **(0,0/1,0 ; 0,3/0,7 ; 0,5/0,5 ; 0,7/0,3** ou **1,0/0,0)**.

Tableau 5. 1 Codage des cinq niveaux du plan d'expérience utilisé dans la dernière étude

Codage des niveaux	(--)	(-)	(0)	(+)	(++)
Durées : jours d'anoxie/jours d'aérobie	0/10	3/7	5/5	7/3	10/0
Biomasses : g _{SS} L ⁻¹ de boues activées/g _{SS} L ⁻¹ <i>Trametes versicolor</i>	0,0/1,0	0,3/0,7	0,5/0,5	0,7/0,3	1,0/0,0

5.3.2. Résultats et conclusions

Les résultats obtenus pour chaque culture sont représentés comme des pourcentages d'élimination de la carbamazépine dans le **Tableau 5.2** ; les colonnes grisées représentent la première étape réalisée en anoxie et les colonnes blanches la deuxième étape réalisée en aérobiose. Au total, ce plan d'expérience contient neuf points. De plus, un troisième facteur est étudié : l'ajout du champignon dès le début pour évoluer en anoxie et en aérobiose contre l'ajout tardif du champignon juste en aérobiose. De ce fait, sept parmi les neuf expériences du plan sont répétées mais en décalant l'ajout du champignon au début de la phase menée en aérobiose, et lorsque l'expérience ne comprend pas deux étapes, l'ajout du champignon est fait le cinquième jour. Les résultats obtenus pour chaque culture sont représentés comme des pourcentages d'élimination de la carbamazépine dans le **Tableau 5.3**. Les résultats des deux expériences où il ne s'agit pas d'une culture mixte (les niveaux **(--)** et **(++)** du **Facteur Biomasses**) sont reproduits exactement comme dans le **Tableau 5.2**.

Une comparaison des résultats dans les deux séries permet de conclure que :

- (1) les taux d'élimination observés en aérobiose sont presque les mêmes dans les deux séries et par la suite l'introduction précoce ou tardive du champignon dans la culture n'a pas de grand effet sur le pouvoir épuratoire de *Trametes versicolor* en aérobiose ;
- (2) les taux d'élimination observés en anoxie dans la première série sont toujours supérieurs à ceux obtenus en anoxie dans la deuxième série, c'est-à-dire que lorsque le champignon est présent dès le début dans la phase d'anoxie, il participe à l'élimination de la CBZ pendant cette étape ;
- (3) les taux totaux d'élimination d'une culture augmentent lorsque la durée de la phase en aérobiose augmente et lorsque la concentration en biomasse fongique augmente.

On recommande donc de prolonger au maximum la phase d'aération et de maximiser la concentration en biomasse fongique qu'il faut introduire dès la phase d'anoxie.

Tableau 5. 2 Pourcentages de CBZ éliminée dans chaque culture (série champignon en anoxie et aérobie)

Champignon en anoxie et en aérobie		Facteur durées							
		(--)	(-)		(0)		(+)	(++)	
		aérobie 10	anoxie 3	aérobie 7	anoxie 5	aérobie 5	anoxie 7	aérobie 3	anoxie 10
Facteur biomasses	(--)	0,0/1,0			4,0	40,0			
	(-)	0,3/0,7		2,7	43,3		6,4	17,5	
	(0)	0,5/0,5	23,5		4,5	21,3			28,0
	(+)	0,7/0,3		2,9	19,8		6,9	7,8	
	(++)	1,0/0,0			5,0	0,5			

Tableau 5. 3 Pourcentages de CBZ éliminée dans chaque culture (série champignon en aérobie)

Champignon juste en aérobie		Facteur durées							
		(--)	(-)		(0)		(+)	(++)	
		aérobie 10	anoxie 3	aérobie 7	anoxie 5	aérobie 5	anoxie 7	aérobie 3	anoxie 10
Facteur biomasses	(--)	0,0/1,0			4,0	40,0			
	(-)	0,3/0,7		0,9	40,6		2,1	17,4	
	(0)	0,5/0,5	21,5		2,5	21,3			26,0
	(+)	0,7/0,3		2,1	18,5		4,9	7,9	
	(++)	1,0/0,0			5,0	0,5			

5.3.3. Essais de modélisation

D'après les résultats obtenus, il est légitime de supposer que le pourcentage d'élimination obtenu dans une culture est en première approximation la somme des pourcentages d'élimination réalisés par chaque biomasse séparément. En plus, le pourcentage d'élimination d'une biomasse individuelle est considéré proportionnel à la concentration de cette biomasse et à la durée du traitement. Ces hypothèses peuvent être exprimées mathématiquement par :

$$\begin{cases} P_1 \% = (\beta_1[X_b] + \phi_1[X_f]) \cdot t & \text{en anoxie} \\ P_2 \% = (\beta_2[X_b] + \phi_2[X_f]) \cdot t & \text{en aérobie} \end{cases}$$

Où P_1 et P_2 % sont les pourcentages d'élimination en anoxie et aérobie respectivement, $[X_b]$ et $[X_f]$ sont les concentrations en biomasses de boues activées et fongiques respectivement, t est la durée et β_1 , β_2 , ϕ_1 et ϕ_2 sont des coefficients du modèle.

En considérant que dans les phases ayant une durée courte de 3 jours, les concentrations en biomasse sont presque invariables avec le temps, on peut déterminer :

$$\beta_1 = 1,02 ; \beta_2 = 0,175 ; \phi_1 = 0,850 \text{ et } \phi_2 = 8,26$$

En utilisant ces coefficients, on essaie de recalculer les taux d'élimination et les comparer aux taux d'élimination obtenus expérimentalement pour évaluer la validité du modèle. Le diagramme de parité représentant les valeurs calculées à partir du modèle en fonction des valeurs réelles obtenues expérimentalement est donné **Figure 5.3**.

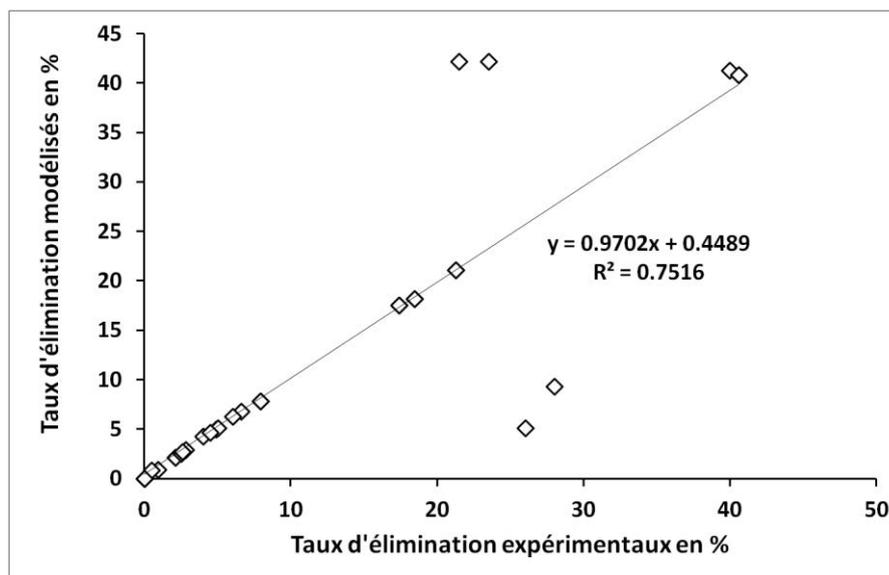


Figure 5. 3 Diagramme de parité exposant la validité du modèle proposé

On remarque que toutes les points sont bien alignés près de la bissectrice des axes sauf quatre points qui paraissent aberrants ; ces points correspondent en effet aux cultures des niveaux (--) et (++) du **Facteur Durées**, c'est-à-dire aux expériences menées complètement en aérobiose ou en anoxie. On peut alors conclure que le modèle n'est valable que pour les cultures menées en une succession anoxie / aérobie.

Si les quatre points aberrants sont écartés, le diagramme de parité corrigé (**Figure 5.4**) montre un alignement presque parfait des points avec la bissectrice des axes.

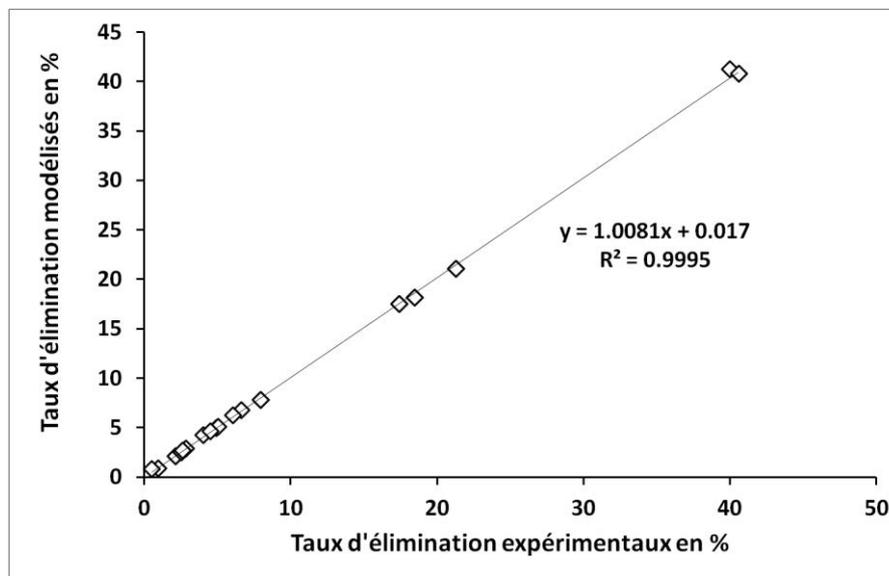


Figure 5. 4 Diagramme de parité corrigé exposant la validité du modèle proposé

5.4. Synthèse des résultats et procédé intégré proposé

L'efficacité du champignon ligninolytique *Trametes versicolor* DSM#11 269 utilisé dans cette étude dans le domaine de traitement de l'eau est confirmée ; la carbamazépine est en effet un des composés pharmaceutiques les plus récalcitrants et qui résiste au traitement biologique conventionnel utilisant des boues activées. D'après les résultats des essais de bioaugmentation exposés dans ce chapitre, on peut confirmer :

- (1) la possibilité de bioaugmenter un procédé de boues activées par le champignon étudié qui arrive à cohabiter avec la biomasse des boues activées ;
- (2) la capacité du champignon à éliminer la carbamazépine et par suite beaucoup d'autres molécules polluantes du fait que la plupart de ces molécules sont moins récalcitrantes que l'antiépileptique sujet de cette étude.

Cependant, pour pouvoir réussir cette bioaugmentation on propose :

- (1) d'ajouter la culture fongique de forte concentration dans le bassin de boues activées fonctionnant en anoxie ; l'ajout direct aux boues activées en aérobie peut

aboutir à une compétition entre la biomasse fongique et les boues activées pour le dioxygène et de ce fait à une perte rapide des cellules du champignon ;

- (2) de dimensionner les bassins pour que le séjour du champignon après sa sortie vers le bassin d'aérobie dure le plus longtemps possible ;
- (3) de prévoir une agitation modérée de la biomasse fongique et un ajout périodique de nouvelles cultures pour compenser la perte incontournable des cellules de *Trametes versicolor* à cause de la compétition avec les cellules endogènes des boues activées qui se multiplient beaucoup plus rapidement.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif premier de ce travail de thèse est de contribuer à l'élimination des micropolluants émergents de l'eau en essayant d'élaborer un couplage entre le procédé conventionnel aux boues activées et un autre procédé permettant d'améliorer le rendement final de l'opération de traitement d'eau.

L'étude a commencé par le choix d'une molécule représentative des micropolluants émergents, le médicament antiépileptique « carbamazépine » ; cette substance s'avère résistante aux traitements biologiques classiques surtout les boues activées. De plus, les procédés d'oxydation avancée s'ils parviennent à dégrader la carbamazépine, aboutissent à la formation de sous-produits d'oxydation problématiques.

Les procédés biologiques avancés utilisés en bioremédiation des sols ont gagné en intérêt ces derniers temps comme utilisables aussi en traitement des eaux ; c'est ainsi que la biostimulation (ajout de nutriments au milieu pollué pour accélérer la croissance de la biomasse endogène) et la bioaugmentation (ajout de la biomasse supplémentaire au milieu pollué) sont choisies ici pour être le procédé à coupler aux boues activées.

La biostimulation a d'abord été testée en ajoutant aux boues activées des co-substrats carbonés (à savoir le glucose, le phénol et le tryptophane). Les résultats n'étant pas encourageants, la bioaugmentation a pris alors la plus grande part des travaux qui ont suivi.

La biomasse supplémentaire qu'il faut ajouter en bioaugmentation doit correspondre à un organisme possédant un important pool enzymatique, c'est-à-dire capable de produire des enzymes permettant la dégradation de molécules aux structures complexes. Le choix d'un champignon ligninolytique est donc justifié par sa production connue d'enzymes d'oxydation non spécifiques comme la laccase et différents types de peroxydases ; la souche DSM# 11 269 de *Trametes versicolor* a alors été testée pour sa capacité à dégrader la carbamazépine en déterminant les conditions optimales aboutissant au meilleur taux d'élimination.

Enfin, pour réaliser la bioaugmentation dans les meilleures conditions, des séries de culture mixtes ont été étudiées de manière approfondie pour en dégager les recommandations nécessaires au bon déroulement d'une opération de bioaugmentation fongique d'un procédé aux boues activées.

Beaucoup de travail reste à faire, comme tester la bioaugmentation à une plus grande échelle avec un cocktail de substances médicamenteuses en plus de la carbamazépine ; ce qui peut être un challenge permettant de bien mettre en pratique les résultats de ce travail reposant sur des expériences à l'échelle de laboratoire.

RÉFÉRENCES

- [1] HANSLMEIER A. *Water in the universe*. Dordrecht; New York : Springer, 2010. ISBN : 9789048199839.
- [2] DAUGHTON C. G., JONES-LEPP T. L. *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: scientific and regulatory issues*. Washington, DC : American Chemical Society, 2001. ISBN : 0841237395 9780841237391.
- [3] MURRAY K. E., THOMAS S. M., BODOUR A. A. « Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment ». *Environ. Pollut.* 2010. Vol. 158, n°12, p. 3462-3471.
- [4] SEVIOUR R. J., NIELSEN P. H. *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing, 2010. ISBN : 9781843390329.
- [5] GRACIA-LOR E., SANCHO J. V., SERRANO R., HERNÁNDEZ F. « Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia ». *Chemosphere*. avril 2012. Vol. 87, n°5, p. 453-462.
- [6] RADJENOVIC J., PETROVIC M., BARCELÓ D. « Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor ». *Anal. Bioanal. Chem.* 18 novembre 2006. Vol. 387, n°4, p. 1365-1377.
- [7] RICHARDSON S. D. « Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues ». *Anal. Chem.* juin 2006. Vol. 78, n°12, p. 4021-4046.
- [8] RODIL R., QUINTANA J. B., LÓPEZ-MAHÍA P., MUNIATEGUI-LORENZO S., PRADA-RODRÍGUEZ D. « Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry ». *J. Chromatogr. A*. 3 avril 2009. Vol. 1216, n°14, p. 2958-2969.
- [9] AGÜERA LOPEZ A. *Emerging contaminants from industrial and municipal waste*. Berlin; Heidelberg : Springer, 2008. ISBN : 9783540792093.
- [10] JEKEL M. *Organic pollutants in the water cycle: properties, occurrence, analysis and environmental relevance of polar compounds*. Weinheim; Chichester : Wiley-VCH; John Wiley [distributeur], 2006. ISBN : 9783527312979.
- [11] WOJCIESZYŃSKA D., HUPERT-KOCUREK K., JANKOWSKA A., GUZIK U. « Properties of catechol 2,3-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels ». *Biochem. Eng. J.* 15 juillet 2012. Vol. 66, n°0, p. 1-7.
- [12] GIGER W., ALDER A. C., GOLET E. M., KOHLER H.-P. E., MCARDELL C. S., MOLNAR E., SIEGRIST H., SUTER M. J.-F. « Occurrence and Fate of Antibiotics as Trace Contaminants in Wastewaters, Sewage Sludges, and Surface Waters ». *Chim. Int. J. Chem.* 1 septembre 2003. Vol. 57, n°9, p. 485-491.
- [13] TERNES T. A. « Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers ». *Water Res.* novembre 1998. Vol. 32, n°11, p. 3245-3260.

- [14] YU J. T., BOUWER E. J., COELHAN M. « Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent ». *Agric. Water Manag.* novembre 2006. Vol. 86, n°1-2, p. 72-80.
- [15] OETKEN M., NENTWIG G., LÖFFLER D., TERNES T., OEHLMANN J. « Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates. Part I. The Antiepileptic Drug Carbamazepine ». *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20 juillet 2005. Vol. 49, n°3, p. 353-361.
- [16] QUAN X., YANG Z., SHI H., TANG Q., QIAN Y. « The effect of a secondary chlorophenol presence on the removal of 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) in an activated sludge system bioaugmented with 2,4-DCP degrading special culture ». *Process Biochem.* novembre 2005. Vol. 40, n°11, p. 3462-3467.
- [17] RICHARDSON S. D., TERNES T. A. « Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues ». *Anal. Chem.* juin 2005. Vol. 77, n°12, p. 3807-3838.
- [18] RICHARDSON S. D. « Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues ». *Anal. Chem.* juin 2007. Vol. 79, n°12, p. 4295-4324.
- [19] RICHARDSON S. D. « Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues ». *Anal. Chem.* juin 2003. Vol. 75, n°12, p. 2831-2857.
- [20] CLARKE B. O., SMITH S. R. « Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids ». *Environ. Int.* janvier 2011. Vol. 37, n°1, p. 226-247.
- [21] HERNANDO M. D., RODRÍGUEZ A., VAQUERO J. J., FERNÁNDEZ-ALBA A. R., GARCÍA E. « Environmental risk assessment of emerging pollutants in water: Approaches under horizontal and vertical EU legislation ». *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2011. Vol. 41, n°7, p. 699-731.
- [22] OULTON R. L., KOHN T., CWIERTNY D. M. « Pharmaceuticals and personal care products in effluent matrices: a survey of transformation and removal during wastewater treatment and implications for wastewater management ». *J. Environ. Monit.* 2010. Vol. 12, n°11, p. 1956-1978.
- [23] REIF R., SANTOS A., JUDD S. J., LEMA J. M., OMIL F. « Occurrence and fate of pharmaceutical and personal care products in a sewage treatment works ». *J. Environ. Monit.* 2011. Vol. 13, n°1, p. 137-144.
- [24] WELLS M. J., BELL K. Y., TRAEGLER K. A., PELLEGRIN M.-L., MORSE A. « Emerging pollutants ». *Water Environ. Res.* 2010. Vol. 82, n°10, p. 2095-2170.
- [25] FENT K., WESTON A. A., CAMINADA D. « Ecotoxicology of human pharmaceuticals ». *Aquat. Toxicol.* 2006. Vol. 76, n°2, p. 122-159.
- [26] DÍAZ-CRUZ M. S., LÓPEZ DE ALDA M. J., BARCELO D. « Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge ». *TrAC Trends Anal. Chem.* 2003. Vol. 22, n°6, p. 340-351.
- [27] JURY K. L., KHAN S. J., VANCOV T., STUETZ R. M., ASHBOLT N. J. « Are sewage treatment plants promoting antibiotic resistance? » *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2011. Vol. 41, n°3, p. 243-270.

- [28] BELL K. Y., WELLS M. J., TRAEXLER K. A., PELLEGRIN M.-L., MORSE A., BANDY J. « Emerging pollutants ». *Water Environ. Res.* 2011. Vol. 83, n°10, p. 1906-1984.
- [29] CASTIGLIONI S., ZUCCATO E., FANELLI R. *Illicit drugs in the environment: occurrence, analysis, and fate using mass spectrometry* Wiley.com, 2011. ISBN : 1118008995.
- [30] RICHARDSON S. D. « Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues ». *Anal. Chem.* 6 décembre 2011. Vol. 84, n°2, p. 747-778.
- [31] FAN Z., WU S., CHANG H., HU J. « Behaviors of glucocorticoids, androgens and progesterones in a municipal sewage treatment plant: comparison to estrogens ». *Environ. Sci. Technol.* 2011. Vol. 45, n°7, p. 2725-2733.
- [32] CLARA M., GANS O., WINDHOFER G., KRENN U., HARTL W., BRAUN K., SCHARF S., SCHEFFKNECHT C. « Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment ». *Chemosphere.* 2011. Vol. 82, n°8, p. 1116-1123.
- [33] LARA-MARTÍN P. A., LI X., BOPP R. F., BROWNAWELL B. J. « Occurrence of alkyltrimethylammonium compounds in urban estuarine sediments: behentrimonium as a new emerging contaminant ». *Environ. Sci. Technol.* 2010. Vol. 44, n°19, p. 7569-7575.
- [34] RICHARDSON S. D., TERNES T. A. « Water analysis: emerging contaminants and current issues ». *Anal. Chem.* 2011. Vol. 83, n°12, p. 4614-4648.
- [35] SCHEURER M., BRAUCH H.-J., LANGE F. T. « Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT) ». *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. Vol. 394, n°6, p. 1585-1594.
- [36] BUERGE I. J., BUSER H.-R., KAHLE M., MÜLLER M. D., POIGER T. « Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: an ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater ». *Environ. Sci. Technol.* 2009. Vol. 43, n°12, p. 4381-4385.
- [37] OPPENHEIMER J., EATON A., BADRUZZAMAN M., HAGHANI A. W., JACANGELO J. G. « Occurrence and suitability of sucralose as an indicator compound of wastewater loading to surface waters in urbanized regions ». *Water Res.* 2011. Vol. 45, n°13, p. 4019-4027.
- [38] MARTIN J. W., ASHER B. J., BEESON S., BENSKIN J. P., ROSS M. S. « PFOS or PreFOS? Are perfluorooctane sulfonate precursors (PreFOS) important determinants of human and environmental perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure? » *J. Environ. Monit.* 2010. Vol. 12, n°11, p. 1979-2004.
- [39] TAKAGI S., ADACHI F., MIYANO K., KOIZUMI Y., TANAKA H., WATANABE I., TANABE S., KANNAN K. « Fate of perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate in drinking water treatment processes ». *Water Res.* 2011. Vol. 45, n°13, p. 3925-3932.
- [40] LU Y., YUAN T., WANG W., KANNAN K. « Concentrations and assessment of exposure to siloxanes and synthetic musks in personal care products from China ». *Environ. Pollut.* 2011. Vol. 159, n°12, p. 3522-3528.
- [41] SÁNCHEZ-BRUNETE C., MIGUEL E., ALBERO B., TADEO J. L. « Determination of cyclic and linear siloxanes in soil samples by ultrasonic-assisted extraction and gas

- chromatography–mass spectrometry ». *J. Chromatogr. A.* 2010. Vol. 1217, n°45, p. 7024-7030.
- [42] ZHANG Z., QI H., REN N., LI Y., GAO D., KANNAN K. « Survey of cyclic and linear siloxanes in sediment from the Songhua River and in sewage sludge from wastewater treatment plants, Northeastern China ». *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2011. Vol. 60, n°2, p. 204-211.
- [43] STASINAKIS A. S., GATIDOU G., MAMAIS D., THOMAIDIS N. S., LEKKAS T. D. « Occurrence and fate of endocrine disrupters in Greek sewage treatment plants ». *Water Res.* 2008. Vol. 42, n°6, p. 1796-1804.
- [44] WEISS S., REEMTSMA T. « Determination of benzotriazole corrosion inhibitors from aqueous environmental samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry ». *Anal. Chem.* 2005. Vol. 77, n°22, p. 7415-7420.
- [45] NI H.-G., LU F.-H., LUO X.-L., TIAN H.-Y., ZENG E. Y. « Occurrence, phase distribution, and mass loadings of benzothiazoles in riverine runoff of the Pearl River Delta, China ». *Environ. Sci. Technol.* 2008. Vol. 42, n°6, p. 1892-1897.
- [46] MATAMOROS V., JOVER E., BAYONA J. « Occurrence and fate of benzothiazoles and benzotriazoles in constructed wetlands ». *Water Sci Technol* 2010. Vol. 61, n°1, p. 191-198.
- [47] HAO C., CLEMENT R., YANG P. « Liquid chromatography–tandem mass spectrometry of bioactive pharmaceutical compounds in the aquatic environment—a decade’s activities ». *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. Vol. 387, n°4, p. 1247-1257.
- [48] TERNES T. A., JOSS A. *Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: the challenge of micropollutants in urban water management.* IWA publishing, 2006. ISBN : 1843390930.
- [49] RADJENOVIĆ J., PETROVIĆ M., BARCELÓ D. « Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment ». *Water Res.* 2009. Vol. 43, n°3, p. 831-841.
- [50] VERLICCHI P., AL AUKIDY M., ZAMBELLO E. « Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—a review ». *Sci. Total Environ.* 2012. Vol. 429, p. 123-155.
- [51] JONES O. A., LESTER J. N., VOULVOULIS N. « Pharmaceuticals: a threat to drinking water? » *Trends Biotechnol.* avril 2005. Vol. 23, n°4, p. 163-167.
- [52] KLAVARIOTI M., MANTZAVINOS D., KASSINOS D. « Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes ». *Environ. Int.* février 2009. Vol. 35, n°2, p. 402-417.
- [53] BUFFLE M.-O., SCHUMACHER J., SALHI E., JEKEL M., VON GUNTEN U. « 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 Res.* mai 2006. Vol. 40, n°9, p. 1884-1894.

- [54] VOGNA D., MAROTTA R., ANDREOZZI R., NAPOLITANO A., D' ISCHIA M. « Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine ». *Chemosphere* janvier 2004. Vol. 54, n°4, p. 497-505.
- [55] TEKIN H., BILKAY O., ATABERK S., BALTA T., CERIBASI I., SANIN F., DILEK F., YETIS U. « Use of Fenton oxidation to improve the biodegradability of a pharmaceutical wastewater ». *J. Hazard. Mater.* 21 août 2006. Vol. 136, n°2, p. 258-265.
- [56] HUBER M. M., KORHONEN S., TERNES T. A., VON GUNTEN U. « Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide ». *Water Res.* septembre 2005. Vol. 39, n°15, p. 3607-3617.
- [57] LEE Y., VON GUNTEN U. « Oxidative transformation of micropollutants during municipal wastewater treatment: Comparison of kinetic aspects of selective (chlorine, chlorine dioxide, ferrateVI, and ozone) and non-selective oxidants (hydroxyl radical) ». *Water Res.* janvier 2010. Vol. 44, n°2, p. 555-566.
- [58] RAMSEIER M. K., PETER A., TRABER J., VON GUNTEN U. « Formation of assimilable organic carbon during oxidation of natural waters with ozone, chlorine dioxide, chlorine, permanganate, and ferrate ». *Water Res.* février 2011. Vol. 45, n°5, p. 2002-2010.
- [59] GONZÁLEZ O., SANS C., ESPLUGAS S. « Sulfamethoxazole abatement by photo-Fenton: Toxicity, inhibition and biodegradability assessment of intermediates ». *J. Hazard. Mater.* 31 juillet 2007. Vol. 146, n°3, p. 459-464.
- [60] MÉNDEZ-ARRIAGA F., ESPLUGAS S., GIMÉNEZ J. « Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton ». *Water Res.* janvier 2010. Vol. 44, n°2, p. 589-595.
- [61] ROZAS O., CONTRERAS D., MONDACA M. A., PÉREZ-MOYA M., MANSILLA H. D. « Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of ampicillin solutions ». *J. Hazard. Mater.* 15 mai 2010. Vol. 177, n°1-3, p. 1025-1030.
- [62] TROVÓ A. G., NOGUEIRA R. F. P., AGÜERA A., FERNANDEZ-ALBA A. R., SIRTORI C., MALATO S. « Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation ». *Water Res.* septembre 2009. Vol. 43, n°16, p. 3922-3931.
- [63] ABRAMOVIĆ B., KLER S., ŠOJIC D., LAUŠEVIĆ M., RADOVIĆ T., VIONE D. « Photocatalytic degradation of metoprolol tartrate in suspensions of two TiO₂-based photocatalysts with different surface area. Identification of intermediates and proposal of degradation pathways ». *J. Hazard. Mater.* 30 décembre 2011. Vol. 198, n°0, p. 123-132.
- [64] CHATZITAKIS A., BERBERIDOU C., PASPALTSIS I., KYRIAKOU G., SKLAVIADIS T., POULIOS I. « Photocatalytic degradation and drug activity reduction of Chloramphenicol ». *Water Res.* janvier 2008. Vol. 42, n°1-2, p. 386-394.
- [65] KANECO S., LI N., ITOH K., KATSUMATA H., SUZUKI T., OHTA K. « Titanium dioxide mediated solar photocatalytic degradation of thiram in aqueous solution: Kinetics and mineralization ». *Chem. Eng. J.* 1 mai 2009. Vol. 148, n°1, p. 50-56.
- [66] ZHANG J., FU D., XU Y., LIU C. « Optimization of parameters on photocatalytic degradation of chloramphenicol using TiO₂ as photocatalyst by response surface methodology ». *J. Environ. Sci.* août 2010. Vol. 22, n°8, p. 1281-1289.

- [67] GÜYER G. T., INCE N. H. « Degradation of diclofenac in water by homogeneous and heterogeneous sonolysis ». *Ultrason. Sonochem.* janvier 2011. Vol. 18, n°1, p. 114-119.
- [68] HARTMANN J., BARTELS P., MAU U., WITTER M., TÜMPLING W. V., HOFMANN J., NIETZSCHMANN E. « Degradation of the drug diclofenac in water by sonolysis in presence of catalysts ». *Chemosphere* janvier 2008. Vol. 70, n°3, p. 453-461.
- [69] EMERY R. J., PAPADAKI M., FREITAS DOS SANTOS L. M., MANTZAVINOS D. « Extent of sonochemical degradation and change of toxicity of a pharmaceutical precursor (triphenylphosphine oxide) in water as a function of treatment conditions ». *Environ. Int.* février 2005. Vol. 31, n°2, p. 207-211.
- [70] BELKHEIRI D., FOURCADE F., GENESTE F., FLONER D., AÏT-AMAR H., AMRANE A. « Feasibility of an electrochemical pre-treatment prior to a biological treatment for tetracycline removal ». *Sep. Purif. Technol.* novembre 2011. Vol. 83, p. 151-156.
- [71] REN Y., WU Z., ONDRUSCHKA B., BRAEUTIGAM P., FRANKE M., NEHRING H., HAMPEL U. « Oxidation of Phenol by Microbubble-Assisted Microelectrolysis ». *Chem. Eng. Technol.* mai 2011. Vol. 34, n°5, p. 699-706.
- [72] SIRÉS I., CENTELLAS F., GARRIDO J. A., RODRÍGUEZ R. M., ARIAS C., CABOT P.-L., BRILLAS E. « Mineralization of clofibric acid by electrochemical advanced oxidation processes using a boron-doped diamond anode and Fe²⁺ and UVA light as catalysts ». *Appl. Catal. B Environ.* 30 mars 2007. Vol. 72, n°3-4, p. 373-381.
- [73] MANSOUR D., FOURCADE F., BELLAKHAL N., DACHRAOUI M., HAUCHARD D., AMRANE A. « Biodegradability improvement of sulfamethazine solutions by means of an electro-Fenton Process ». *Water. Air. Soil Pollut.* 2012. Vol. 223, n°5, p. 2023-2034.
- [74] KOSJEK T., ANDERSEN H. R., KOMPARE B., LEDIN A., HEATH E. « Fate of Carbamazepine during Water Treatment ». *Environ. Sci. Technol.* 14 juillet 2009. Vol. 43, n°16, p. 6256-6261.
- [75] RIZZO L. « Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment ». *Water Res.* 1 octobre 2011. Vol. 45, n°15, p. 4311-4340.
- [76] LLORET L., EIBES G., LÚ-CHAU T. A., MOREIRA M. T., FEIJOO G., LEMA J. M. « Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens ». *Biochem. Eng. J.* septembre 2010. Vol. 51, n°3, p. 124-131.
- [77] FERRARI B., MONS R., VOLLAT B., FRAYSSE B., PAXÉAUS N., GIUDICE R. L., POLLIO A., GARRIC J. « Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? » *Environ. Toxicol. Chem.* 1 mai 2004. Vol. 23, n°5, p. 1344-1354.
- [78] JONES O. A. H., VOULVOULIS N., LESTER J. N. « Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals ». *Water Res.* décembre 2002. Vol. 36, n°20, p. 5013-5022.
- [79] PRAJAPATI S. T., GOHEL M. C., PATEL L. D. « Studies to enhance dissolution properties of carbamazepine ». *Indian J. Pharm. Sci.* 2007. Vol. 69, n°3, p. 427.

- [80] MIAO X.-S., METCALFE C. D. « Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry ». *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75, n°15, p. 3731-3738.
- [81] CLARA M., STRENN B., KREUZINGER N. « Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration ». *Water Res.* février 2004. Vol. 38, n°4, p. 947-954.
- [82] SCHEYTT T., MERSMANN P., LINDSTÄDT R., HEBERER T. « Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments ». *Chemosphere* juillet 2005. Vol. 60, n°2, p. 245-253.
- [83] TERNES T. A., MEISENHEIMER M., MCDOWELL D., SACHER F., BRAUCH H.-J., HAIST-GULDE B., PREUSS G., WILME U., ZULEI-SEIBERT N. « Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment ». *Environ. Sci. Technol.* 25 juillet 2002. Vol. 36, n°17, p. 3855-3863.
- [84] GEBHARDT W., SCHRÖDER H. F. « Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation ». *23rd Montreux Symp. Liq. Chromatogr.-Mass Spectrom. Supercrit. Fluid Chromatogr.-Mass Spectrom. Capill. Electrophor.-Mass Spectrom. Tandem Mass Spectrom. 23rd Montreux Symp. Liq. Chromatogr.-Mass Spectrom. Supercrit. Fluid Chromatogr.-Mass Spectrom. Capill. Electrophor.-Mass Spectrom. Tandem Mass Spectrom.* 10 août 2007. Vol. 1160, n°1-2, p. 34-43.
- [85] ZHANG Y., GEIßEN S.-U., GAL C. « Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies ». *Chemosphere* novembre 2008. Vol. 73, n°8, p. 1151-1161.
- [86] ÖLLERS S., SINGER H. P., FÄSSLER P., MÜLLER S. R. « Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water ». *J. Chromatogr. A* 16 mars 2001. Vol. 911, n°2, p. 225-234.
- [87] ANDREOZZI R., RAFFAELE M., NICKLAS P. « Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment ». *Chemosphere* mars 2003. Vol. 50, n°10, p. 1319-1330.
- [88] METCALFE C. D., MIAO X.-S., KOENIG B. G., STRUGER J. « Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada ». *Environ. Toxicol. Chem.* 2003. Vol. 22, n°12, p. 2881-2889.
- [89] TERNES T. A. « Pharmaceuticals and Metabolites as Contaminants of the Aquatic Environment ». In : *Pharm. Care Prod. Environ.* American Chemical Society, 2001. p. 39-54. ISBN : 0-8412-3739-5.
- [90] MAGDEBURG A., STALTER D., SCHLÜSENER M., TERNES T., OEHLMANN J. « Evaluating the efficiency of advanced wastewater treatment: Target analysis of organic contaminants and (geno-)toxicity assessment tell a different story ». *Water Res.* 1 mars 2014. Vol. 50, n°0, p. 35-47.

- [91] GUNEYSEL O., ONUR O., DENIZBASI A., SARITEMUR M. « Carbamazepine overdose after exposure to simethicone: a case report ». *J. Med. Case Reports*. 2008. Vol. 2, n°1, p. 242.
- [92] BRETON H., COCIGLIO M., BRESSOLLE F., PEYRIERE H., BLAYAC J. P., HILLAIRE-BUYS D. « Liquid chromatography–electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma ». *J. Chromatogr. B* 15 décembre 2005. Vol. 828, n°1–2, p. 80–90.
- [93] BLEEKER E. A. J., VAN DER GEEST H. G., KLAMER H. J. C., DE VOOGT P., WIND E., KRAAK M. H. S. « Toxic and Genotoxic Effects of Azaarenes: Isomers and Metabolites ». *Polycycl. Aromat. Compd.* 1 novembre 1999. Vol. 13, n°3, p. 191–203.
- [94] MOHAPATRA D. P., BRAR S. K., TYAGI R. D., PICARD P., SURAMPALLI R. Y. « Carbamazepine in municipal wastewater and wastewater sludge: Ultrafast quantification by laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization coupled with tandem mass spectrometry ». *Talanta* 15 septembre 2012. Vol. 99, n°0, p. 247–255.
- [95] METCALFE C. D., KOENIG B. G., BENNIE D. T., SERVOS M., TERNES T. A., HIRSCH R. « Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants ». *Environ. Toxicol. Chem.* 2003. Vol. 22, n°12, p. 2872–2880.
- [96] HEBERER T. « Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data ». *Toxicol. Lett.* 2002. Vol. 131, n°1, p. 5–17.
- [97] CARBALLA M., OMIL F., LEMA J. M., LLOMPART M., GARCÍA-JARES C., RODRÍGUEZ I., GOMEZ M., TERNES T. « Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant ». *Water Res.* 2004. Vol. 38, n°12, p. 2918–2926.
- [98] KINNEY C. A., FURLONG E. T., ZAUGG S. D., BURKHARDT M. R., WERNER S. L., CAHILL J. D., JORGENSEN G. R. « Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application ». *Environ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 40, n°23, p. 7207–7215.
- [99] KÖCK-SCHULMEYER M., GINEBRED A., POSTIGO C., LÓPEZ-SERNA R., PÉREZ S., BRIX R., LLORCA M., ALDA M. L. DE, PETROVIĆ M., MUNNÉ A. « Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: the impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain) ». *Chemosphere*. 2011. Vol. 82, n°5, p. 670–678.
- [100] HUMMEL D., LÖFFLER D., FINK G., TERNES T. A. « Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry ». *Environ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 40, n°23, p. 7321–7328.
- [101] LECLERCQ M., MATHIEU O., GOMEZ E., CASELLAS C., FENET H., HILLAIRE-BUYS D. « Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants ». *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2009. Vol. 56, n°3, p. 408–415.
- [102] KIM S. D., CHO J., KIM I. S., VANDERFORD B. J., SNYDER S. A. « Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters ». *Water Res.* 2007. Vol. 41, n°5, p. 1013–1021.

- [103] CUNNINGHAM V. L., PERINO C., D'ACO V. J., HARTMANN A., BECHTER R. « Human health risk assessment of carbamazepine in surface waters of North America and Europe ». *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2010. Vol. 56, n°3, p. 343-351.
- [104] EKWALL B., ABDULLA, E., BARILE, F., CHESNE, C., COTTIN, M., CURREN, R. « A comparative cytotoxicity analysis of the results from tests of the first 30 MEIC reference chemicals in 68 different in vitro toxicity systems ». In : *8th Annual Meeting of the Japanese Society for alternatives to animal experiments*. Tokyo : [s.n.], 1994.
- [105] HENSCHEL K.-P., WENZEL A., DIEDRICH M., FLIEDNER A. « Environmental hazard assessment of pharmaceuticals ». *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 1997. Vol. 25, n°3, p. 220-225.
- [106] DAUGHTON C. G., TERNES T. A. « Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? » *Environ. Health Perspect.* 1999. Vol. 107, n°Suppl 6, p. 907.
- [107] FERRARI B., PAXÉUS N., GIUDICE R. L., POLLIO A., GARRIC J. « Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac ». *Ecotoxicol. Environ. Saf.* juillet 2003. Vol. 55, n°3, p. 359-370.
- [108] KIM Y., CHOI K., JUNG J., PARK S., KIM P.-G., PARK J. « Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea ». *Environ. Int.* 2007. Vol. 33, n°3, p. 370-375.
- [109] JOS A., REPETTO G., RIOS J. C., HAZEN M. J., MOLERO M. L., DEL PESO A., SALGUERO M., FERNÁNDEZ-FREIRE P., PÉREZ-MARTIN J. M., CAMEÁN A. « Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints ». *Toxicol. In Vitro.* 2003. Vol. 17, n°5, p. 525-532.
- [110] ANDREOZZI R., MAROTTA R., PINTO G., POLLIO A. « Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity ». *Water Res.* 2002. Vol. 36, n°11, p. 2869-2877.
- [111] DUSSAULT E. B., BALAKRISHNAN V. K., SVERKO E. D., SOLOMON K. R., SIBLEY P. K. « Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates ». *Environ. Toxicol. Chem.* 2008. Vol. 27, n°2, p. 425-432.
- [112] CLEUVERS M. « Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects ». *Toxicol. Lett.* 2003. Vol. 142, n°3, p. 185-194.
- [113] NALECZ-JAWECKI G., PERSOONE G. « Toxicity of Selected Pharmaceuticals to the Anostracan Crustacean *Thamnocephalus platyurus*-Comparison of Sublethal and Lethal Effect Levels with the 1h Rapidtoxkit and the 24h Thamnotoxkit Microbiotests ». *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2006. Vol. 13, n°1, p. 22-27.
- [114] MARTIN-DIAZ L., FRANZELLITTI S., BURATTI S., VALBONESI P., CAPUZZO A., FABBRI E. « Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis* ». *Aquat. Toxicol.* 2009. Vol. 94, n°3, p. 177-185.

- [115] CONTARDO-JARA V., LORENZ C., PFLUGMACHER S., NÜTZMANN G., KLOAS W., WIEGAND C. « Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha* ». *Aquat. Toxicol.* 2011. Vol. 105, n°3, p. 428-437.
- [116] MALARVIZHI A., KAVITHA C., SARAVANAN M., RAMESH M. « Carbamazepine (CBZ) induced enzymatic stress in gill, liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio* ». *J. King Saud Univ.-Sci.* 2012. Vol. 24, n°2, p. 179-186.
- [117] VERNOUILLET G., EULLAFFROY P., LAJEUNESSE A., BLAISE C., GAGNÉ F., JUNEAU P. « Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels ». *Chemosphere.* 2010. Vol. 80, n°9, p. 1062-1068.
- [118] EGUCHI K., NAGASE H., OZAWA M., ENDOH Y. S., GOTO K., HIRATA K., MIYAMOTO K., YOSHIMURA H. « Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae ». *Chemosphere.* 2004. Vol. 57, n°11, p. 1733-1738.
- [119] ZHANG W., ZHANG M., LIN K., SUN W., XIONG B., GUO M., CUI X., FU R. « Eco-toxicological effect of Carbamazepine on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* ». *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2012. Vol. 33, n°2, p. 344-352.
- [120] GERNAEY K. V., VAN LOOSDRECHT M., HENZE M., LIND M., JØRGENSEN S. B. « Activated sludge wastewater treatment plant modelling and simulation: state of the art ». *Environ. Model. Softw.* 2004. Vol. 19, n°9, p. 763-783.
- [121] HAI F. I., YAMAMOTO K., FUKUSHI K. « Hybrid treatment systems for dye wastewater ». *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2007. Vol. 37, n°4, p. 315-377.
- [122] REDDY C. A. « The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants ». *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995. Vol. 6, n°3, p. 320-328.
- [123] HATA T., KAWAI S., OKAMURA H., NISHIDA T. « Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation ». *Biodegradation.* 2010. Vol. 21, n°5, p. 681-689.
- [124] KIM Y.-J., NICELL J. A. « Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A ». *Bioresour. Technol.* 2006. Vol. 97, n°12, p. 1431-1442.
- [125] RODARTE-MORALES A. I., FEIJOO G., MOREIRA M. T., LEMA J. M. « Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi ». *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011. Vol. 27, n°8, p. 1839-1846.
- [126] SUÁREZ S., CARBALLA M., OMIL F., LEMA J. M. « How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? ». *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2008. Vol. 7, n°2, p. 125-138.
- [127] YANG S., HAI F. I., NGHIEM L. D., PRICE W. E., RODDICK F., MOREIRA M. T., MAGRAM S. F. « Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review ». *Bioresour. Technol.* août 2013. Vol. 141, n°0, p. 97-108.
- [128] KARAM J., NICELL J. A. « Potential applications of enzymes in waste treatment ». *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1997. Vol. 69, n°2, p. 141-153.

- [129] MAYER A. M., STAPLES R. C. « Laccase: new functions for an old enzyme ». *Phytochemistry*. 2002. Vol. 60, n°6, p. 551-565.
- [130] BENDING G. D., FRILOUX M., WALKER A. « Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential ». *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. Vol. 212, n°1, p. 59-63.
- [131] CAJTHAML T., KŘESINOVÁ Z., SVOBODOVÁ K., MÖDER M. « Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi ». *Chemosphere*. 2009. Vol. 75, n°6, p. 745-750.
- [132] YANG S., HAI F. I., NGHIEM L. D., RODDICK F., PRICE W. E. « Removal of trace organic contaminants by nitrifying activated sludge and whole-cell and crude enzyme extract of *Trametes versicolor* ». *Water Sci. Technol.* 2013. Vol. 67, n°6, p. 1216-1223.
- [133] MARCO-URREA E., PÉREZ-TRUJILLO M., BLÁNQUEZ P., VICENT T., CAMINAL G. « Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR ». *Bioresour. Technol.* 2010. Vol. 101, n°7, p. 2159-2166.
- [134] GOLAN-ROZEN N., CHEFETZ B., BEN-ARI J., GEVA J., HADAR Y. « Transformation of the recalcitrant pharmaceutical compound carbamazepine by *Pleurotus ostreatus*: role of cytochrome P450 monooxygenase and manganese peroxidase ». *Environ. Sci. Technol.* 2011. Vol. 45, n°16, p. 6800-6805.
- [135] TADKAEW N., HAI F. I., MCDONALD J. A., KHAN S. J., NGHIEM L. D. « Removal of trace organics by MBR treatment: the role of molecular properties ». *Water Res.* 2011. Vol. 45, n°8, p. 2439-2451.
- [136] JUNGHANNS C., MOEDER M., KRAUSS G., MARTIN C., SCHLOSSER D. « Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases ». *Microbiology*. 2005. Vol. 151, n°1, p. 45-57.
- [137] SOARES A., GUIEYSSE B., MATTIASSON B. « Influence of agitation on the removal of nonylphenol by the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera* sp. BOL 13 ». *Biotechnol. Lett.* 2006. Vol. 28, n°3, p. 139-143.
- [138] HIRANO T., HONDA Y., WATANABE T., KUWAHARA M. « Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus* ». *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. Vol. 64, n°9, p. 1958-1962.
- [139] LEE S.-M., KOO B.-W., CHOI J.-W., CHOI D.-H., AN B.-S., JEUNG E.-B., CHOI I.-G. « Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity ». *Biol. Pharm. Bull.* 2005. Vol. 28, n°2, p. 201-207.
- [140] LEE S.-M., KOO B.-W., LEE S.-S., KIM M.-K., CHOI D.-H., HONG E.-J., JEUNG E.-B., CHOI I.-G. « Biodegradation of dibutylphthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity ». *Enzyme Microb. Technol.* 2004. Vol. 35, n°5, p. 417-423.
- [141] TSUTSUMI Y., HANEDA T., NISHIDA T. « Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes ». *Chemosphere*. 2001. Vol. 42, n°3, p. 271-276.

- [142] TAMAGAWA Y., HIRAI H., KAWAI S., NISHIDA T. « Removal of estrogenic activity of endocrine-disrupting genistein by ligninolytic enzymes from white rot fungi ». *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. Vol. 244, n°1, p. 93-98.
- [143] CABANA H., JIWAN J.-L. H., ROZENBERG R., ELISASHVILI V., PENNINGCKX M., AGATHOS S. N., JONES J. P. « Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Corioloropsis polyzona* ». *Chemosphere.* 2007. Vol. 67, n°4, p. 770-778.
- [144] FUKUDA T., UCHIDA H., TAKASHIMA Y., UWAJIMA T., KAWABATA T., SUZUKI M. « Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa* ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15 juin 2001. Vol. 284, n°3, p. 704-706.
- [145] NICOLUCCI C., ROSSI S., MENALE C., GODJEVARGOVA T., IVANOV Y., BIANCO M., MITA L., BENCIVENGA U., MITA D. G., DIANO N. « Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads ». *Biodegradation.* 2011. Vol. 22, n°3, p. 673-683.
- [146] HAI F. I., NGHIEM L. D., KHAN S. J., PRICE W. E., YAMAMOTO K. « Wastewater reuse: Removal of Emerging Trace Organic Contaminants by Membrane Bioreactors ». In: *Membr. Biol. React.* London UK: IWA publishing, 2013. p.165-205. ISBN : 9781780400655.
- [147] SUZUKI K., HIRAI H., MURATA H., NISHIDA T. « Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi ». *Water Res.* 2003. Vol. 37, n°8, p. 1972-1975.
- [148] MARCO-URREA E., PÉREZ-TRUJILLO M., VICENT T., CAMINAL G. « Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor* ». *Chemosphere* février 2009. Vol. 74, n°6, p. 765-772.
- [149] RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ C. E., JELIĆ A., LLORCA M., FARRÉ M., CAMINAL G., PETROVIĆ M., BARCELÓ D., VICENT T. « Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge ». *Bioresour. Technol.* 2011. Vol. 102, n°10, p. 5602-5608.
- [150] TRAN N. H., URASE T., KUSAKABE O. « Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *Trametes versicolor* and its laccase ». *J. Water Environ. Technol.* 2010. Vol. 8, n°2, p. 125-140.
- [151] KURNIAWATI S., NICELL J. A. « Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol ». *Enzyme Microb. Technol.* 2007. Vol. 41, n°3, p. 353-361.
- [152] ACCINELLI C., SACCÀ M. L., BATTISSON I., FICK J., MENCARELLI M., GRABIC R. « Removal of oseltamivir (Tamiflu) and other selected pharmaceuticals from wastewater using a granular bioplastic formulation entrapping propagules of *Phanerochaete chrysosporium* ». *Chemosphere* septembre 2010. Vol. 81, n°3, p. 436-443.
- [153] MARCO-URREA E., PÉREZ-TRUJILLO M., CRUZ-MORATÓ C., CAMINAL G., VICENT T. « Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR ». *J. Hazard. Mater.* 2010. Vol. 176, n°1, p. 836-842.

- [154] ZHANG Y., GEIßEN S.-U. « In vitro degradation of carbamazepine and diclofenac by crude lignin peroxidase ». *J. Hazard. Mater.* 15 avril 2010. Vol. 176, n°1-3, p. 1089-1092.
- [155] MARCO-URREA E., PÉREZ-TRUJILLO M., CAMINAL G., VICENT T. « Dechlorination of 1, 2, 3-and 1, 2, 4-trichlorobenzene by the white-rot fungus *Trametes versicolor* ». *J. Hazard. Mater.* 2009. Vol. 166, n°2, p. 1141-1147.
- [156] TORRES-DUARTE C., ROMAN R., TINOCO R., VAZQUEZ-DUHALT R. « Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system ». *Chemosphere.* 2009. Vol. 77, n°5, p. 687-692.
- [157] EIBES G., DEBERNARDI G., FEIJOO G., MOREIRA M. T., LEMA J. M. « Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase ». *Biodegradation.* 2011. Vol. 22, n°3, p. 539-550.
- [158] HIRAI H., NAKANISHI S., NISHIDA T. « Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi ». *Chemosphere.* 2004. Vol. 55, n°4, p. 641-645.
- [159] HAI F. I., YAMAMOTO K., NAKAJIMA F., FUKUSHI K. « Bioaugmented membrane bioreactor (MBR) with a GAC-packed zone for high rate textile wastewater treatment ». *Water Res.* mars 2011. Vol. 45, n°6, p. 2199-2206.
- [160] CAJTHAML T., KŘESINOVÁ Z., SVOBODOVÁ K., SIGLER K., ŘEZANKA T. « Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol ». *Environ. Pollut.* 2009. Vol. 157, n°12, p. 3325-3335.
- [161] RODARTE-MORALES A. I., MOREIRA M. T., FEIJOO G., LEMA J. M. « Evaluation of two fungal strains for the degradation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) ». *Chem. Eng. Trans.* 2010. Vol. 20, p. 31-36.
- [162] RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ C. E., MARCO-URREA E., CAMINAL G. « Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems ». *Bioresour. Technol.* 2010. Vol. 101, n°7, p. 2259-2266.
- [163] CABANA H., JONES J. P., AGATHOS S. N. « Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: a review ». *Eng. Life Sci.* 2007. Vol. 7, n°5, p. 429-456.
- [164] MARCO-URREA E., RADJENOVIĆ J., CAMINAL G., PETROVIĆ M., VICENT T., BARCELÓ D. « Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibrac acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor* ». *Water Res.* janvier 2010. Vol. 44, n°2, p. 521-532.
- [165] OKAZAKI S., MICHIZOE J., GOTO M., FURUSAKI S., WARIISHI H., TANAKA H. « Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed micelles in organic media ». *Enzyme Microb. Technol.* 2002. Vol. 31, n°3, p. 227-232.
- [166] RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ C. E., MARCO-URREA E., CAMINAL G. « Naproxen degradation test to monitor *Trametes versicolor* activity in solid-state bioremediation processes ». *J. Hazard. Mater.* 15 juillet 2010. Vol. 179, n°1-3, p. 1152-1155.
- [167] MARCO-URREA E., PÉREZ-TRUJILLO M., CRUZ-MORATÓ C., CAMINAL G., VICENT T. « White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR ». *Chemosphere.* 2010. Vol. 78, n°4, p. 474-481.

- [168] AURIOL M., FILALI-MEKNASSI Y., ADAMS C. D., TYAGI R. D., NOGUEROL T.-N., PIÑA B. « Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor* ». *Chemosphere*. 2008. Vol. 70, n°3, p. 445-452.
- [169] AURIOL M., FILALI-MEKNASSI Y., TYAGI R. D., ADAMS C. D. « Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater ». *Water Res.* 2007. Vol. 41, n°15, p. 3281-3288.
- [170] SAITO T., KATO K., YOKOGAWA Y., NISHIDA M., YAMASHITA N. « Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil ». *J. Biosci. Bioeng.* 2004. Vol. 98, n°1, p. 64-66.
- [171] WANG J., LIU G.-F., LU H., JIN R.-F., ZHOU J.-T., LEI T.-M. « Biodegradation of Acid Orange 7 and its auto-oxidative decolorization product in membrane-aerated biofilm reactor ». *Int. Biodeterior. Biodegrad.* février 2012. Vol. 67, n°0, p. 73-77.
- [172] MAO L., LU J., HABTESELESSIE M., LUO Q., GAO S., CABRERA M., HUANG Q. « Ligninase-mediated removal of natural and synthetic estrogens from water: II. Reactions of 17 β -estradiol ». *Environ. Sci. Technol.* 2010. Vol. 44, n°7, p. 2599-2604.
- [173] HATA T., SHINTATE H., KAWAI S., OKAMURA H., NISHIDA T. « Elimination of carbamazepine by repeated treatment with laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole ». *J. Hazard. Mater.* 2010. Vol. 181, n°1, p. 1175-1178.
- [174] KIM Y.-J., NICELL J. A. « Laccase-catalysed oxidation of aqueous triclosan ». *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006. Vol. 81, n°8, p. 1344-1352.
- [175] WANG J., MAJIMA N., HIRAI H., KAWAGISHI H. « Effective removal of endocrine-disrupting compounds by lignin peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 ». *Curr. Microbiol.* 2012. Vol. 64, n°3, p. 300-303.
- [176] MURUGESAN K., CHANG Y.-Y., KIM Y.-M., JEON J.-R., KIM E.-J., CHANG Y.-S. « Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators ». *Water Res.* 2010. Vol. 44, n°1, p. 298-308.
- [177] YANG S. « Removal of micropollutants by a fungus-augmented membrane bioreactor ». 2012.
- [178] WENG S.-S., KU K.-L., LAI H.-T. « The implication of mediators for enhancement of laccase oxidation of sulfonamide antibiotics ». *Bioresour. Technol.* 2012. Vol. 113, p. 259-264.
- [179] CABANA H., ALEXANDRE C., AGATHOS S. N., JONES J. P. « Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals ». *Bioresour. Technol.* 2009. Vol. 100, n°14, p. 3447-3458.
- [180] CABANA H., JONES J. P., AGATHOS S. N. « Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals ». *J. Biotechnol.* 2007. Vol. 132, n°1, p. 23-31.

- [181] SONGULASHVILI G., JIMENÉZ-TOBÓN G. A., JASPERS C., PENNINGCKX M. J. « Immobilized laccase of *Cerrena unicolor* for elimination of endocrine disruptor micropollutants ». *Fungal Biol.* 2012. Vol. 116, n°8, p. 883-889.
- [182] TABOADA-PUIG R., JUNGHANNS C., DEMARCHE P., MOREIRA M. T., FEIJOO G., LEMA J. M., AGATHOS S. N. « Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors ». *Bioresour. Technol.* 2011. Vol. 102, n°11, p. 6593-6599.
- [183] CARDINAL-WATKINS C., NICELL J. A. « Enzyme-Catalyzed Oxidation of 17 β -Estradiol Using Immobilized Laccase from *Trametes versicolor* ». *Enzyme Res.* 2011. n°Article ID 725172, p. 1-11.
- [184] LLORET L., EIBES G., FEIJOO G., MOREIRA M. T., LEMA J. M., HOLLMANN F. « Immobilization of laccase by encapsulation in a sol-gel matrix and its characterization and use for the removal of estrogens ». *Biotechnol. Prog.* 2011. Vol. 27, n°6, p. 1570-1579.
- [185] LLORET L., HOLLMANN F., EIBES G., FEIJOO G., MOREIRA M. T., LEMA J. M. « Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor ». *Biodegradation.* 2012. Vol. 23, n°3, p. 373-386.
- [186] ZHANG J., LIU X., XU Z., CHEN H., YANG Y. « Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase ». *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2008. Vol. 61, n°4, p. 351-356.
- [187] GARCÍA-GALÁN M. J., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ C. E., VICENT T., CAMINAL G., DÍAZ-CRUZ M. S., BARCELÓ D. « Biodegradation of sulfamethazine by *Trametes versicolor*: Removal from sewage sludge and identification of intermediate products by UPLC-QqTOF-MS ». *Sci. Total Environ.* 2011. Vol. 409, n°24, p. 5505-5512.
- [188] RODARTE-MORALES A. I., FEIJOO G., MOREIRA M. T., LEMA J. M. « Operation of stirred tank reactors (STRs) and fixed-bed reactors (FBRs) with free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* for the continuous removal of pharmaceutical compounds ». *Biochem. Eng. J.* juillet 2012. Vol. 66, p. 38-45.
- [189] JELIC A., CRUZ-MORATÓ C., MARCO-URREA E., SARRÀ M., PEREZ S., VICENT T., PETROVIĆ M., BARCELO D. « Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates ». *Water Res.* mars 2012. Vol. 46, n°4, p. 955-964.
- [190] HAI F. I., YAMAMOTO K., NAKAJIMA F., FUKUSHI K. « Factors governing performance of continuous fungal reactor during non-sterile operation—the case of a membrane bioreactor treating textile wastewater ». *Chemosphere.* 2009. Vol. 74, n°6, p. 810-817.
- [191] LIBRA J. A., BORCHERT M., BANIT S. « Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions ». *Biotechnol. Bioeng.* 2003. Vol. 82, n°6, p. 736-744.
- [192] HAI F. I., MODIN O., YAMAMOTO K., FUKUSHI K., NAKAJIMA F., NGHIEM L. D. « Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white-rot fungi ». *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2012. Vol. 43, n°3, p. 459-462.

- [193] HAI F. I., YAMAMOTO K., NAKAJIMA F., FUKUSHI K. « Removal of structurally different dyes in submerged membrane fungi reactor—biosorption/PAC-adsorption, membrane retention and biodegradation ». *J. Membr. Sci.* 2008. Vol. 325, n°1, p. 395-403.
- [194] ZHANG Y., GEIßEN S.-U. « Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor ». *Bioresour. Technol.* 2012. Vol. 112, p. 221-227.
- [195] ALVAREZ V. M., MARQUES J. M., KORENBLUM E., SELDIN L. « Comparative Bioremediation of Crude Oil-Amended Tropical Soil Microcosms by Natural Attenuation, Bioaugmentation, or Bioenrichment ». *Appl. Environ. Soil Sci.* 2011. Vol. 2011, p. 1-10.
- [196] HUA X., WANG J., WU Z., ZHANG H., LI H., XING X., LIU Z. « A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil ». *Biochem. Eng. J.* avril 2010. Vol. 49, n°2, p. 201-206.
- [197] LIU C., ALI S. W., GUAN L.-B., YU F.-B., LI S.-P., WONG M. H. « Biotreatment of o-nitrobenzaldehyde manufacturing wastewater and changes in activated sludge flocs in a sequencing batch reactor ». *Bioresour. Technol.* janvier 2012. Vol. 104, p. 228-234.
- [198] JU Z., JIANBING L., LAILIN C., THRING R. W. « Remediation of refinery oily sludge using isolated strain and biosurfactant ». *IEEE*, 2011. p. 1649-1653. ISBN : 978-1-61284-339-1.
- [199] LEE E.-H., KANG Y.-S., CHO K.-S. « Bioremediation of Diesel-Contaminated Soils by Natural Attenuation, Biostimulation and Bioaugmentation Employing *Rhodococcus* sp EH831 ». *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 2011. Vol. 39, n°1, p. 86-92.
- [200] SINGH R. K., KUMAR S., KUMAR S., KUMAR A. « Biodegradation kinetic studies for the removal of p-cresol from wastewater using *Gliomastix indicus* MTCC 3869 ». *Biochem. Eng. J.* juin 2008. Vol. 40, n°2, p. 293-303.
- [201] ZILOUEI H., GUIEYSSE B., MATTIASSON B. « Two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of high concentrations of pentachlorophenol using *Sphingobium chlorophenolicum* DSM 8671 ». *Chemosphere* [août 2008. Vol. 72, n°11, p. 1788-1794.
- [202] ZAWIERUCHA I., MALINA G. « Bioremediation of Contaminated Soils: Effects of Bioaugmentation and Biostimulation on Enhancing Biodegradation of Oil Hydrocarbons ». In: SINGH A, PARMAR N, KUHAD RC, ÉD. *Bioaugmentation Biostimulation Biocontrol* Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 187-201. ISBN : 978-3-642-19768-0, 978-3-642-19769-7.
- [203] DA SILVA M. L. B., ALVAREZ P. J. J. « Bioaugmentation ». In : TIMMIS KN, ÉD. *Handb. Hydrocarb. Lipid Microbiol.* Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 4531-4544. ISBN : 978-3-540-77584-3, 978-3-540-77587-4.
- [204] SNIEGOWSKI K., BERS K., VAN GOETEM K., RYCKEBOER J., JAEKEN P., SPANOGHE P., SPRINGAEL D. « Improvement of pesticide mineralization in on-farm biopurification systems by bioaugmentation with pesticide-primed soil ». *FEMS Microbiol. Ecol.* avril 2011. Vol. 76, n°1, p. 64-73.
- [205] FAN L. « Bioaugmentation Treatment of Bromoamine Acid Wastewater with *Sphingomonas* sp. FL ». *Adv. Mater. Res.* janvier 2011. Vol. 183-185, p. 814-818.

- [206] PAYNE R. B., MAY H. D., SOWERS K. R. « Enhanced Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyl Impacted Sediment by Bioaugmentation with a Dehalorespiring Bacterium ». *Environ. Sci. Technol.* 15 octobre 2011. Vol. 45, n°20, p. 8772-8779.
- [207] FAGERVOLD S. K., WATTS J. E. M., MAY H. D., SOWERS K. R. « Effects of bioaugmentation on indigenous PCB dechlorinating activity in sediment microcosms ». *Water Res.* juillet 2011. Vol. 45, n°13, p. 3899-3907.
- [208] SUDJARID W., CHEN I.-M., MONKONG W., ANOTAI J. « Reductive dechlorination of 2,3,4-chlorobiphenyl by biostimulation and bioaugmentation ». *Environ. Eng. Sci.* 2012. Vol. 29, n°4, p. 255-261.
- [209] MADUEÑO L., COPPOTELLI B. M., ALVAREZ H. M., MORELLI I. S. « Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina ». *Int. Biodeterior. Biodegrad.* mars 2011. Vol. 65, n°2, p. 345-351.
- [210] TALE V. P., MAKI J. S., STRUBLE C. A., ZITOMER D. H. « Methanogen community structure-activity relationship and bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters ». *Water Res.* 15 octobre 2011. Vol. 45, n°16, p. 5249-5256.
- [211] XU Z., SHUAI SHAO, LUYI ZOU. « Research on degradation of Nitrobenzene by artificial enrichment bioaugmentation in the source water ». IEEE, 2011. p. 7049-7052. ISBN : 978-1-4244-9172-8.
- [212] ZHANG J., ZHANG Y., QUAN X., LI Y., CHEN S., ZHAO H., WANG D. « An anaerobic reactor packed with a pair of Fe-graphite plate electrodes for bioaugmentation of azo dye wastewater treatment ». *Biochem. Eng. J.* avril 2012. Vol. 63, p. 31-37.
- [213] MROZIK A., PIOTROWSKA-SEGET Z. « Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds ». *Microbiol. Res.* juillet 2010. Vol. 165, n°5, p. 363-375.
- [214] YU L., PENG D., REN Y. « Protozoan predation on nitrification performance and microbial community during bioaugmentation ». *Bioresour. Technol.* décembre 2011. Vol. 102, n°23, p. 10855-10860.
- [215] LIU X., ZHANG J., JIANG J., LI R., XIE Z., LI S. « Isolation a Candida Strain Capable of Degrading Reactive Blue 13 and Bioaugmentation of Aerobic Sequencing Batch Reactors ». IEEE, 2011. p. 1-4. ISBN : 978-1-4244-5088-6.
- [216] DUQUE A. F., BESSA V. S., CARVALHO M. F., CASTRO P. M. L. « Bioaugmentation of a rotating biological contactor for degradation of 2-fluorophenol ». *Bioresour. Technol.* octobre 2011. Vol. 102, n°19, p. 9300-9303.
- [217] QUAN X., TANG H., MA J. « Effects of gene augmentation on the removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a biofilm reactor under different scales and substrate conditions ». *J. Hazard. Mater.* 30 janvier 2011. Vol. 185, n°2-3, p. 689-695.
- [218] MA J., QUAN X., YANG Z., LI A. « Biodegradation of a mixture of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and multiple chlorophenols by aerobic granules cultivated through plasmid pJP4 mediated bioaugmentation ». *Chem. Eng. J.* 2012. Vol. 181, p. 144-151.

- [219] PUYOL D., MOHEDANO A. F., RODRIGUEZ J. J., SANZ J. L. « Effect of 2,4,6-trichlorophenol on the microbial activity of adapted anaerobic granular sludge bioaugmented with *Desulfitobacterium* strains ». *New Biotechnol.* 15 décembre 2011. Vol. 29, n°1, p. 79-89.
- [220] QUAN X., MA J., XIONG W., YANG Z. « Effects of gene-augmentation on the formation, characteristics and microbial community of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading aerobic microbial granules ». *J. Hazard. Mater.* 30 novembre 2011. Vol. 196, n°0, p. 278-286.
- [221] QUAN X.-C., TANG H., MA J.-Y. « Bioaugmentation of bioreactors with a pJP4 receiving transconjugant to enhance the removal of 2,4-D ». *Huan Jing Ke Xue Huanjing Kexue Bian Ji Zhongguo Ke Xue Yuan Huan Jing Ke Xue Wei Yuan Hui Huan Jing Ke Xue Bian Ji Wei Yuan Hui.* juillet 2011. Vol. 32, n°7, p. 2152-2157.
- [222] MROZIK A., MIGA S., PIOTROWSKA-SEGET Z. « Enhancement of phenol degradation by soil bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. JS150 ». *J. Appl. Microbiol.* décembre 2011. Vol. 111, n°6, p. 1357-1370.
- [223] INOUE D., YAMAZAKI Y., TSUTSUI H., SEI K., SODA S., FUJITA M., IKE M. « Impacts of gene bioaugmentation with pJP4-harboring bacteria of 2, 4-D-contaminated soil slurry on the indigenous microbial community ». *Biodegradation.* 2012. Vol. 23, n°2, p. 263-276.
- [224] SAYARA T., BORRÀS E., CAMINAL G., SARRÀ M., SÁNCHEZ A. « Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation ». *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2011. Vol. 65, n°6, p. 859-865.
- [225] WU Z., DONG H., ZOU L., LU D., LIU Z. « Enriched Microbial Community in Bioaugmentation of Petroleum-Contaminated Soil in the Presence of Wheat Straw ». *Appl. Biochem. Biotechnol.* 18 février 2011. Vol. 164, n°7, p. 1071-1082.
- [226] ACEVEDO F., PIZZUL L., CASTILLO M. DEL P., CUEVAS R., DIEZ M. C. « Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracoophyllum discolor* ». *J. Hazard. Mater.* 15 janvier 2011. Vol. 185, n°1, p. 212-219.
- [227] ALBERT E., TANEE F. « A laboratory trial of bioaugmentation for removal of total petroleum hydrocarbon (TPH) in Niger Delta soil using *Oscillatoria bornettia* ». *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 2011. Vol. 1, p. 147-168.
- [228] BORRÀS E., LLORENS-BLANCH G., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ C. E., SARRÀ M., CAMINAL G. « Soil colonization by *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic materials: Substrate selection and naproxen degradation ». *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2011. Vol. 65, n°6, p. 846-852.
- [229] DIDIER T., PHILIPPE L.-G., SONIA H., AMAR B., CLAUDIA M.-C., MARIELLE D., JAIRO F. « Prospects of *Miscanthus x giganteus* for PAH phytoremediation: A microcosm study ». *Ind. Crops Prod.* mars 2012. Vol. 36, n°1, p. 276-281.
- [230] IBARROLAZA A., COPPOTELLI B. M., DEL PANNO M. T., DONATI E. R., MORELLI I. S. « Application of the knowledge-based approach to strain selection for a bioaugmentation process of phenanthrene- and Cr(VI)-contaminated soil ». *J. Appl. Microbiol.* juillet 2011. Vol. 111, n°1, p. 26-35.

- [231] KAUPPI S., SINKKONEN A., ROMANTSCHUK M. « Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation ». *Int. Biodeterior. Biodegrad.* mars 2011. Vol. 65, n°2, p. 359-368.
- [232] ŁEBKOWSKA M., ZBOROWSKA E., KARWOWSKA E., MIAŚKIEWICZ-PĘSKA E., MUSZYŃSKI A., TABERNACKA A., NAUMCZYK J., JĘCZALIK M. « Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field-scale processes in Poland ». *Ecol. Eng.* novembre 2011. Vol. 37, n°11, p. 1895-1900.
- [233] NOPCHAROENKUL W., PINPHANICHAKARN P., PINYAKONG O. « The development of a liquid formulation of *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 and its application in the treatment of pyrene-contaminated soil ». *J. Appl. Microbiol.* juillet 2011. Vol. 111, n°1, p. 36-47.
- [234] PLANGKLANG P., REUNGSANG A. « Bioaugmentation of carbofuran residues in soil by *Burkholderia cepacia* PCL3: A small-scale field study ». *Int. Biodeterior. Biodegrad.* septembre 2011. Vol. 65, n°6, p. 902-905.
- [235] SONG Y., WANG F., KENGARA F. O., BIAN Y.-R., YANG X.-L., LIU C.-Y., JIANG X. « Improved Biodegradation of 1,2,4-Trichlorobenzene by Adapted Microorganisms in Agricultural Soil and in Soil Suspension Cultures ». *Pedosphere* août 2011. Vol. 21, n°4, p. 423-431.
- [236] SPROCATI A. R., ALISI C., TASSO F., MARCONI P., SCIULLO A., PINTO V., CHIAVARINI S., UBALDI C., CREMISINI C. « Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil ». *ACB 2011 Bioenergy Env. Biotech. Ind. Biotech.* novembre 2012. Vol. 47, n°11, p. 1649-1655.
- [237] TACCARI M., MILANOVIC V., COMITINI F., CASUCCI C., CIANI M. « Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community ». *Int. Biodeterior. Biodegrad.* janvier 2012. Vol. 66, n°1, p. 39-46.
- [238] TOWELL M. G., PATON G. I., SEMPLE K. T. « The biodegradation of cable oil components: Impact of oil concentration, nutrient addition and bioaugmentation ». *Environ. Pollut.* décembre 2011. Vol. 159, n°12, p. 3777-3783.
- [239] DE GUSSEME B., VANHAECKE L., VERSTRAETE W., BOON N. « Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor ». *Water Res.* février 2011. Vol. 45, n°4, p. 1829-1837.
- [240] FRASCARI D., CAPPELLETTI M., FEDI S., ZANNONI D., NOCENTINI M., PINELLI D. « 1,1,2,2-Tetrachloroethane aerobic cometabolic biodegradation in slurry and soil-free bioreactors: A kinetic study ». *Biochem. Eng. J.* octobre 2010. Vol. 52, n°1, p. 55-64.
- [241] NEUMANN L., SCHERER P. « Impact of bioaugmentation by compost on the performance and ecology of an anaerobic digester fed with energy crops ». *Bioresour. Technol.* février 2011. Vol. 102, n°3, p. 2931-2935.
- [242] POPAT S. C., ZHAO K., DESHUSSES M. A. « Bioaugmentation of an anaerobic biotrickling filter for enhanced conversion of trichloroethene to ethene ». *Chem. Eng. J.* 2012. Vol. 183, p. 98-103.

- [243] QU Y., ZHANG R., MA F., ZHOU J., YAN B. « Bioaugmentation with a novel alkali-tolerant *Pseudomonas* strain for alkaline phenol wastewater treatment in sequencing batch reactor ». *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18 janvier 2011. Vol. 27, n°8, p. 1919-1926.
- [244] ROH H., CHU K.-H. « Effects of solids retention time on the performance of bioreactors bioaugmented with a 17 β -estradiol-utilizing bacterium, *Sphingomonas* strain KC8 ». *Chemosphere* juin 2011. Vol. 84, n°2, p. 227-233.
- [245] SANTHARAM S., IBBINI J., DAVIS L. C., ERICKSON L. E. « Field study of biostimulation and bioaugmentation for remediation of tetrachloroethene in groundwater ». *Remediat. J.* mars 2011. Vol. 21, n°2, p. 51-68.
- [246] SCHNEIDER I. D., TOPALOVA Y. I. « Effect of bioaugmentation on anaerobic wastewater treatment in the dairy industry ». *J. Dairy Sci.* septembre 2011. Vol. 94, n°9, p. 4389-4397.
- [247] TUO B., YAN J., FAN B., YANG Z., LIU J. « Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of *Bacillus* sp. isolated from petroleum-contaminated soil ». *Bioresour. Technol.* 2012. Vol. 107, p. 55-60.
- [248] KHAN M. Z., MONDAL P. K., SABIR S. « Bioremediation of 2-chlorophenol containing wastewater by aerobic granules-kinetics and toxicity ». *J. Hazard. Mater.* 15 juin 2011. Vol. 190, n°1-3, p. 222-228.
- [249] SAKULTANTIMETHA A., KEENAN H. E., BEATTIE T. K., BANGKEDPHOL S., CAVOURA O. « Bioremediation of tributyltin contaminated sediment: Degradation enhancement and improvement of bioavailability to promote treatment processes ». *Chemosphere* avril 2011. Vol. 83, n°5, p. 680-686.
- [250] SEMRANY S., FAVIER L., DJELAL H., TAHA S., AMRANE A. « Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs) ». *Biochem. Eng. J.* décembre 2012. Vol. 69, p. 75-86.
- [251] STEVENS-GARMON J., DREWES J. E., KHAN S. J., MCDONALD J. A., DICKENSON E. R. « Sorption of emerging trace organic compounds onto wastewater sludge solids ». *Water Res.* 2011. Vol. 45, n°11, p. 3417-3426.
- [252] AUBENNEAU M., TAHAR A., CASELLAS C., WISNIEWSKI C. « Membrane bioreactor for pharmaceutically active compounds removal: Effects of carbamazepine on mixed microbial communities implied in the treatment ». *Bioprocess Eng. - SFGP2009* novembre 2010. Vol. 45, n°11, p. 1826-1831.
- [253] BAJAJ M., GALLERT C., WINTER J. « Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor ». *Bioresour. Technol.* novembre 2008. Vol. 99, n°17, p. 8376-8381.
- [254] TERNES T. A., MEISENHEIMER M., MCDOWELL D., SACHER F., BRAUCH H.-J., HAIST-GULDE B., PREUSS G., WILME U., ZULEI-SEIBERT N. « Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment ». *Environ. Sci. Technol.* 1 septembre 2002. Vol. 36, n°17, p. 3855-3863.
- [255] RICHARDSON B. J., LAM P. K. S., MARTIN M. « Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China ». *Mar. Pollut. Bull.* septembre 2005. Vol. 50, n°9, p. 913-920.

- [256] BORRÀS E., LLORENS-BLANCH G., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ C. E., SARRÀ M., CAMINAL G. « Soil colonization by *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic materials: Substrate selection and naproxen degradation ». *Int. Biodeterior. Biodegrad.* septembre 2011. Vol. 65, n°6, p. 846-852.
- [257] BADIA-FABREGAT M., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ C. E., GAGO-FERRERO P., OLIVARES A., PIÑA B., DÍAZ-CRUZ M. S., VICENT T., BARCELÓ D., CAMINAL G. « Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* ». *J. Environ. Manage.* 2012. Vol. 104, p. 114-120.
- [258] NYANHONGO G. S., GUBITZ G., SUKYAI P., LEITNER C., HALTRICH D., LUDWIG R. « Oxidoreductases from *Trametes* spp. in biotechnology: a wealth of catalytic activity ». *Food Technol. Biotechnol.* 2007. Vol. 45, n°3, p. 250.
- [259] ZHANG Y., GEIßEN S.-U. « Elimination of carbamazepine in a non-sterile fungal bioreactor ». *Bioresour. Technol.* mai 2012. Vol. 112, p. 221-227.
- [260] CLESCERI L. S., GREENBERG A. E., EATON A. D. « Method 2540 D ». In : *Stand. Methods Exam. Water Wastewater.* American Public Health Association, 1998.
- [261] BOURBONNAIS R., PAICE M. G., REID I. D., LANTHIER P., YAGUCHI M. « Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. » *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61, n°5, p. 1876-1880.

ANNEXES

Annexe 1	Classification simplifiée des polluants	224
Annexe 2	Principe de la décantation.....	225
Annexe 3	Calcul théorique du rapport DCO/COD	226
Annexe 4	Constantes physiques des composés volatils	227
Annexe 5	Review article in <i>Biochemical Engineering J.</i>	229
Annexe 6	Détails complémentaires concernant les méthodes analytiques	230
Annexe 7	Liste des abréviations	242
Annexe 8	Signatures	247

Annexe 1 Classification simplifiée des polluants

A. Polluants d'origine domestique

A.1. aliments et additifs alimentaires

A.1.1. édulcorants

A.1.2. colorants alimentaires

A.1.3. conservateurs, émulsifiants, stabilisants

A.2. détergents et cosmétiques

A.2.1. sulfonates et ammonium quaternaires

A.2.2. muscs, parfums et écrans UV

B. Polluants d'origine agricole (élevage animal inclus)

B.1. engrais et fertilisants

B.2. pesticides

B.3. médicaments vétérinaires

A.3. médicaments humaines

A.3.1. antibiotiques et anti-inflammatoires

A.3.2. antiviraux et anticancéreux

A.3.3. antidépresseurs, antiépileptiques et calmants

A.3.4. analgésiques et anesthésiques

A.3.5. hypoglycémisants et hypolipidémisants

A.4. produits à usage urbain

A.4.1. peintures et vernis

A.4.2. ciments et céramiques

A.4.3. polymères et nanoparticules

A.4.4. papiers et encres

C. Polluants d'origine industrielle

C.1. métaux et autres polluants inorganiques

C.2. produits pétroliers et autres polluants organiques

C.3. produits organométalliques

D. Produits de la dégradation partielle des polluants des autres groupes

Annexe 2 **Principe de la décantation**

Les sédiments formés dans l'étape dite de « traitement primaire » sont appelés « boues primaires » et sont pompés continuellement en dehors d'un bassin dit « de la première décantation » pour subir ensuite le traitement des boues. Le traitement primaire de l'eau est donc une simple décantation qui permet de diminuer significativement la turbidité des eaux usées en éliminant jusqu'à 60 % des solides en suspension et environ 30 % des demandes chimiques et biochimiques en oxygène (DCO et DBO). Le principe de la décantation discrète d'une particule supposée **sphérique de rayon r** repose sur l'équilibre de trois forces :

- 1- le poids qui attire cette particule vers le bas :

$$\vec{P} = m\vec{g} = \rho V\vec{g} = \rho \left(\frac{4}{3}\pi r^3\right)\vec{g}$$

\vec{P} : Vecteur-poids

m : Masse de la particule

\vec{g} : Vecteur-accélération de la pesanteur

ρ : Masse volumique de la particule

V : Volume de la particule

r : Rayon de la particule supposée sphérique

- 2- la poussée d'Archimède exercée par le liquide déplacé qui la pousse vers le haut :

$$\vec{A} = -\rho_e V\vec{g} = \rho_e \left(\frac{4}{3}\pi r^3\right)\vec{g}$$

\vec{A} : Vecteur-poussée d'Archimède

ρ_e : Masse volumique de l'eau

- 3- la résistance du fluide pour des **vitesse faibles** (loi de Stokes) qui s'oppose à son mouvement :

$$\vec{R} = -6\pi\eta r\vec{v}$$

\vec{R} : Vecteur-résistance au déplacement

η : Viscosité dynamique de l'eau

\vec{v} : Vecteur-vitesse de sédimentation

Puisqu'à l'équilibre la somme des forces est nulle ($\vec{P} + \vec{A} + \vec{R} = \vec{0}$), il vient après simplification :

$$\vec{v} = \frac{2r^2}{9\eta}(\rho - \rho_e)\vec{g}$$

Dans la pratique, la vitesse de sédimentation est plus grande que celle calculée par cette formule due au phénomène de floculation où les petites particules s'associent pour former des agrégats de plus grande dimension qui sédimentent plus rapidement. Cependant, la vitesse de sédimentation ainsi calculée permet un bon dimensionnement du décanteur en considérant un rapport longueur/hauteur égal au rapport vitesse horizontal/vitesse de sédimentation.

Annexe 3 **Calcul théorique du rapport DCO/COD**

Si on désigne par CH_{4n} et par $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ les formules génériques de la matière organique et de la biomasse respectivement, on peut écrire les équations bilans suivantes :

❖ *Pour les hétérotrophes en aérobie :*

- *Matière organique comme source d'énergie :*

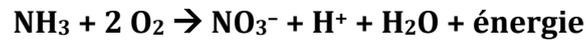


- *Matière organique comme source de carbone de la nouvelle biomasse :*



❖ *Pour les autotrophes en aérobie :*

- *Ammoniac comme source d'énergie :*



- *Matière inorganique comme source de carbone de la nouvelle biomasse :*



❖ *Pour les hétérotrophes en anoxie :*

- *Matière organique comme source d'énergie :*



- *Matière organique comme source de carbone de la nouvelle biomasse :*



La détermination de n peut se faire en mesurant le carbone organique dissous (**COD**) et la demande chimique en oxygène (**DCO**) de l'effluent.

Le rapport $\text{DCO}/\text{COD} = 8(n + 1)/3$ et le nombre $(-4n)$ est appelé « degré d'oxydation moyenne du carbone » et peut varier entre (-4) pour CH_4 et $(+4)$ pour CO_2 .

Annexe 4 **Constantes physiques des composés volatils**

La volatilité d'un composé peut être estimée à partir de plusieurs constantes physiques caractéristiques ; ce sont principalement sa pression de vapeur saturante P_{vapeur} , sa constante de la loi de Henry H ou son coefficient de solubilité de Bunsen α .

1- Un corps pur pris à l'état liquide ou un solide placé dans un récipient fermé s'évapore plus ou moins facilement à une température donnée jusqu'à atteindre une certaine pression limite dans l'espace de tête de ce récipient ; on dit que la phase gazeuse a été saturée par la vapeur et on appelle la pression atteinte par définition « pression de vapeur saturante P_{vapeur} ». Cette pression varie en fonction de la température absolue T suivant l'équation empirique d'Antoine :

$$\log(P_{\text{vapeur}}) = A - \frac{B}{C + T}$$

Un corps est autant volatil que la valeur de sa pression de vapeur saturante est élevée. Un liquide porté à une certaine température où sa pression de vapeur saturante devient égale à la pression atmosphérique ou environnante commence à bouillir : cette température est appelée « point d'ébullition » et on peut réarranger l'équation d'Antoine pour la calculer en fonction des coefficients empiriques positifs A , B et C :

$$T_{\text{ébullition}} = \frac{B}{A - \log(P_{\text{atmosphérique}})} - C$$

2- Un solvant est placé dans un récipient fermé auquel on injecte dans l'espace de tête un gaz. À une température donnée, une partie de ce gaz se dissout dans le solvant jusqu'à atteindre une concentration qui est proportionnelle à la pression partielle de ce gaz dans la phase gazeuse environnante à l'équilibre. C'est la loi de Henry qu'on représente par la formule suivante :

$$P_{\text{partielle}} = H C_{\text{solvant}}$$

H est la constante caractéristique de cet équilibre, elle peut être vue comme la pression partielle du composé dans la phase gazeuse lorsque sa concentration dans la phase liquide est de 1 mol L^{-1} . Dans ce sens, H peut aussi exprimer la volatilité du composé. Cependant, si H et P_{vapeur} varient dans le même sens, il ne faut pas les confondre puisqu'elles expriment deux phénomènes différents : H décrit la facilité avec laquelle le composé peut passer de la phase gazeuse vers un solvant, alors que P_{vapeur} décrit la facilité avec laquelle le composé peut s'évaporer, c'est-à-dire passer lui-même de l'état liquide à l'état gazeux et ceci en présence ou en absence d'un solvant.

3- Dans le même contexte de la loi de Henry, si la pression partielle est de 1 atmosphère (= 101 300 Pa) à une certaine température et que le volume du solvant liquide est 1 litre, on peut, d'après la loi de Henry, calculer la quantité de matière du composé dissous dans le solvant est $1/H$ (**H** étant exprimée en **L atm mol⁻¹**). Si on calcule le volume gazeux correspondant à cette quantité dans les conditions normales de température et de pression (C.N.T.P., 273 K et 1 atm), on obtient ce qui est par définition appelé le « coefficient de solubilité de Bunsen » :

$$\alpha = 273 R/H$$

Ce coefficient est adimensionnel et exprime le volume gazeux d'un composé qui peut être solubilisé dans une unité de volume d'un solvant lorsque la pression partielle du composé est de 1 atm à une certaine température. Comme α est inversement proportionnel à **H**, il est facile de constater qu'une petite valeur de α exprime une grande volatilité du composé.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bej

Review

Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs)

Samer Semrany^{a,b,c,*}, Lidia Favier^{a,b}, Hayet Djelal^{a,b,d}, Samir Taha^c, Abdeltif Amrane^{a,b}^a Université Rennes 1, SDLM, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CIP, CNRS, UMR 6226, Av. Général Leclerc, CS 50837, 35708 Rennes Cedex 7, France^b Université Européenne de Bretagne, 35000 Rennes, France^c Université Libanaise, EDST, Centre Azm pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications, LBA3B, Tripoli, Lebanon^d Ecole des Métiers de l'Environnement, Campus de Ker Lann, 35170 Bruz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2012

Received in revised form 26 August 2012

Accepted 28 August 2012

Available online 6 September 2012

Keywords:

Water pollution

Bioremediation

Activated sludge

Biostimulation

Bioaugmentation

ABSTRACT

Water quality is questionable when looking at the emerging pollutants that accumulate in hydrosphere day after day. In terms of water treatments to eliminate organic compounds, biological treatments are the most used technique, especially the conventional activated sludge (CAS) process. Unfortunately, several of these compounds such as petroleum and industrial wastes, some pesticides, pharmaceuticals, and hormonal substances appear to be refractory to such treatments and can join the different water surfaces from other natural environments especially contaminated soils. Physical and chemical treatments, in particularly the advanced oxidation processes (AOPs) are able to degrade some of these pollutants, but the nature and the possible effects of oxidation by-products remain controversial when complete mineralization does not occur. The aim of this article is to shed light on new and renewed biotechnological techniques recently introduced to resolve recalcitrance problem. Amending activated sludge with additional microorganisms able to produce versatile enzymes to enhance biodegradability or "bioaugmentation", is gradually considered as a possible solution for the recalcitrance of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs). The use of this technique, traditionally in soil remediation field, and recently in water and sediments treatment is reviewed in this paper.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction, definitions and concepts	76
2. Advanced Biological Processes (ABPs)	77
2.1. Acclimation	77
2.2. Biostimulation	77
2.3. Bioaugmentation	77
3. Bioaugmentation different aspects	77
4. Experimental approach to evaluate bioaugmentation	78
5. Reviewed bioaugmentation processes	78
5.1. In soil matrices	78
5.1.1. Petroleum and derivatives	78
5.1.2. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)	80
5.1.3. Other pollutants in soil	81

Abbreviations: AOP, advanced oxidation process; ABP, Advanced Biological Process; BA, bioaugmentation; Bio-ROC, Bio-Refractory Organic Compound; BS, biostimulation; 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; DNA, deoxyribonucleic acid; GEM, Genetically Engineered Microorganism; HRT, hydraulic retention time; MBR, membrane bioreactor; MC, microcosm; NA, natural attenuation; PAH, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon; PCB, polychlorinated biphenyl; PhAC, pharmaceutically active compound; SBR, sequencing batch reactor; SRT, sludge retention time; TPH, Total Petroleum Hydrocarbon.

* Corresponding author at: Université Rennes 1, SDLM, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CIP, CNRS, UMR 6226, Av. Général Leclerc, CS 50837, 35708 Rennes Cedex 7, France.

E-mail addresses: samer.semrany@gmail.com, samer.semrany@ensc-rennes.fr (S. Semrany).

Annexe 6 Détails complémentaires concernant les méthodes analytiques

A. Méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques sont basées sur la séparation des constituants d'un mélange en s'appuyant sur la différence de compatibilité de ses constituants vis-à-vis deux phases dont l'une est stationnaire (fixée dans une colonne) et l'autre est mobile (qui traverse la colonne chromatographique). Suivant l'état physique gazeux ou liquide de la phase mobile, on parle respectivement d'une chromatographie en phase gazeuse [en anglais « Gas Chromatography (GC) »], ou d'une chromatographie en phase liquide [en anglais « Liquid Chromatography (LC) »].

Les premiers essais de la LC utilisaient des adsorbants minéraux comme phase stationnaire et des solvants organiques comme phase mobile ; ainsi cette configuration où la phase stationnaire est plus polaire que la phase mobile a pris la nomination de « chromatographie en phases normales ». Cependant, de nos jours la configuration inverse est la plus utilisable ; par suite avec une phase stationnaire greffée d'une longue chaîne carbonée (C₈ à C₁₈ donc hydrophobe) et une phase mobile polaire (méthanol, acétonitrile) et presque toujours partiellement aqueuse (donc hydrophile), la chromatographie est désignée par la qualificative « en phases inversées ».

Avec les améliorations apportées au cours des années à la LC, nous sommes aujourd'hui capables d'analyser des échantillons de 5 µL, dans une colonne de 5 cm et pendant moins que 5 minutes ! Pour que la phase liquide puisse avancer dans une colonne remplie d'une phase stationnaire d'une granulométrie très fine, il faut utiliser des systèmes de pompes produisant une haute pression d'où la nomination « High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) » souvent considérée pour être « High Performance ». Aujourd'hui, on utilise des machines dites d'UHPLC (quelques fois UPLC plus court), on est passé de la « High Pressure » à la « Ultra-High Pressure ».

D'autre part, les premières séparations chromatographiques étaient pratiquées sur des substances colorées, ce qui rend facile la détection du temps de sortie de chacune de la colonne. Depuis, les méthodes de détection se sont améliorées et sont devenues de plus en plus variées. La lecture en ligne de l'absorbance de la lumière par le liquide sortant de la colonne reste une des méthodes de détection les plus utilisables surtout sous sa version actuelle (dite « détecteur à barrette de diodes (DAD) ») permettant d'enregistrer le chromatogramme à plusieurs longueurs d'onde et d'obtenir le spectre d'absorption UV-visible de chaque composé qui sort de la colonne, ce qui constitue un premier pas vers son identification.

B. L'analyse chromatographique utilisée dans cette étude

a- Caractéristiques du système chromatographique

Les éluants utilisés pour l'analyse chromatographique ont été de l'acétonitrile de grade HPLC fourni par Fisher Scientific (Illkirch, France) et de l'eau ultra-pure non-pyrogène (résistivité 18.2 M Ω cm, < 0.1 UFC mL⁻¹) produite par l'appareil Elga Purelab Option-Q7 de Veolia Water Solutions and Technologies (Antony, France). Le système Acquity UPLC® H-Class de Waters Corporation (Guyancourt, France) a été utilisé. Le logiciel Empower™ a permis de contrôler le système et d'acquérir les données. Après la préparation, 10 μ L d'échantillon est injecté dans une colonne Waters® BEH-C₁₈ (10 cm \times 2,1 mm \times 1,7 μ m, 45°C). La détection a été faite grâce à une barrette de diode Acquity UPLC® PDA e λ qui permet de balayer les longueurs d'onde de 200 à 400 nm.

b- Calibration pour détecter la carbamazépine

La carbamazépine en poudre (pureté 99 %) a été achetée auprès d'Acros Organics (Geel, Belgique). La concentration de la CBZ a été déterminée par chromatographie en phase liquide. La carbamazépine (CBZ) dans l'échantillon est éluée après 1,75 min en mode isocratique (60 % eau, 40 % acétonitrile) sous un débit de 0,4 mL min⁻¹, et détectée à 285 nm. La concentration en CBZ est déduite à partir des aires de pic suivant une calibration par des standards externes. La limite de quantification de la méthode est 20 μ g CBZ L⁻¹ avec des erreurs relatives de \pm 2 %.

c- Préparation de l'échantillon et le déroulement de l'analyse

Un échantillon pris aseptiquement à partir du milieu de culture à étudier est centrifugé à **4000 tr min⁻¹** pendant cinq minutes à température ambiante (**25°C**) en utilisant la centrifugeuse Jouan C4.12 (Saint-Herblain, France) pour éliminer les débris solides dans le culot et récupérer le surnageant pour en doser la concentration en CBZ. Un aliquote de **2 mL** du surnageant est alors mélangé durant **10 s** avec **2 mL** d'acétonitrile en utilisant un agitateur vortex. Le mélange est laissé au repos pour **15 min** permettant la précipitation probable de certains composés qui ne sont pas solubles dans l'acétonitrile. Après centrifugation, **2 mL** du surnageant sont alors filtré à travers des filtres à seringues Pall® Acrodisc® ayant une membrane en GHP de porosité **2 µm** avant l'analyse par chromatographie en phase liquide ultra-haute pression.

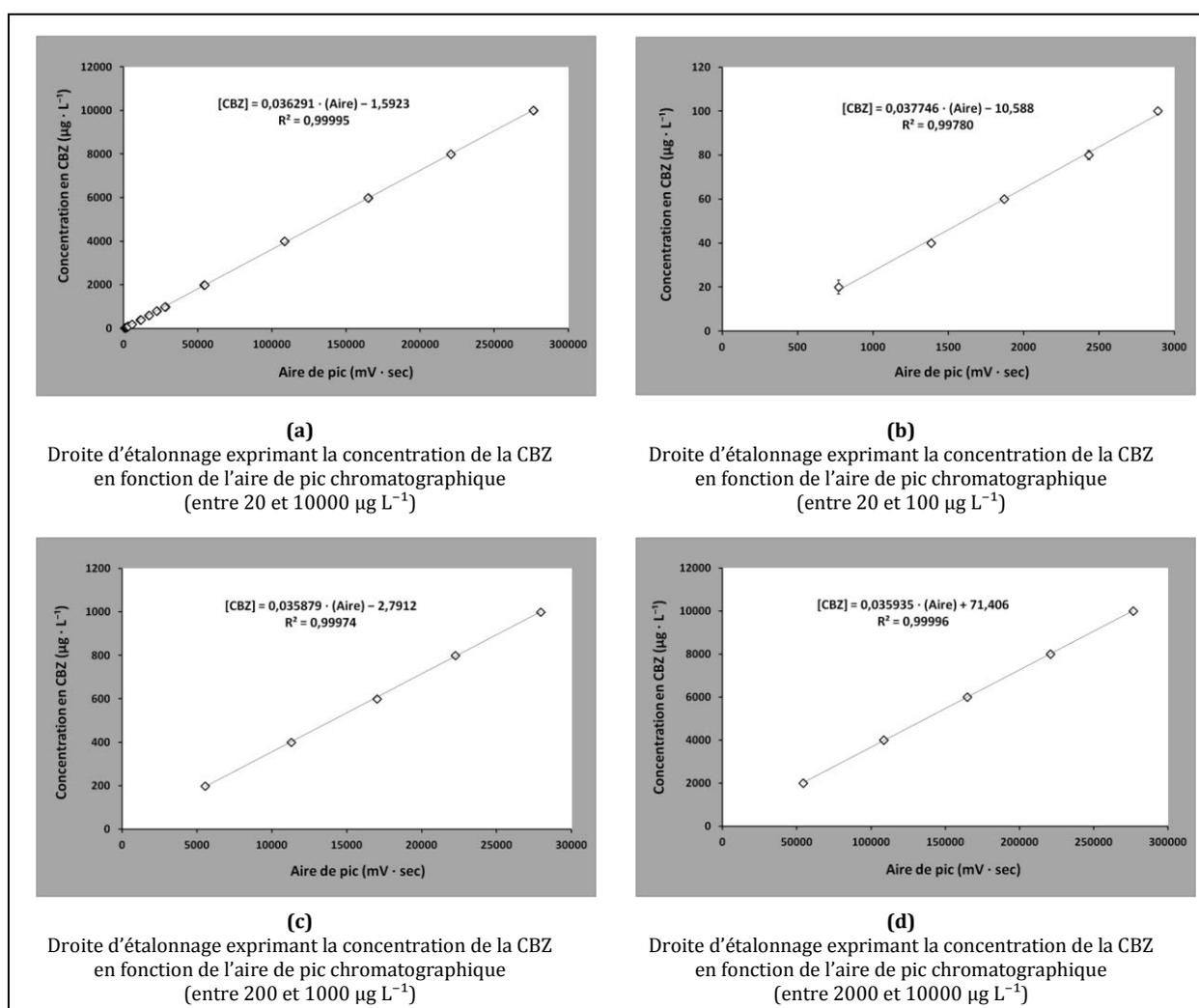


Figure A : Droites d'étalonnage permettant de mesurer la carbamazépine par chromatographie

C. Méthodes spectrophotométriques

L'activité enzymatique en laccase est déterminée suivant Bourbonnais et al. [261]. Bref, un échantillon ($V_{\text{échantillon}} = 200 \mu\text{L}$) du surnageant récupéré à partir du milieu de culture liquide, est mélangé avec $1600 \mu\text{L}$ d'un tampon acétique $0,1 \text{ M}$ ($\text{pH} = 5,0$), et $200 \mu\text{L}$ d'une solution d'ABTS à $0,55 \text{ mM}$ (formant un mélange de volume total $V_{\text{total}} = 2 \text{ mL}$). Un spectrophotomètre Thermo Spectronic Genesys 20 (trajet optique de longueur $\ell = 1 \text{ cm}$) est réglé sur 420 nm pour mesurer la croissance de l'absorbance ΔA du mélange observé durant la durée de mesure $\Delta t = 30 \text{ min}$. Une unité d'activité enzymatique (UE) est défini comme la quantité en μmol d'ABTS oxydé ($\epsilon = 0.036 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) formée par minute. L'activité enzymatique en laccase est finalement exprimée en unités enzymatiques par litre de milieu de culture (UE L^{-1}) en utilisant l'équation A:

$$E_{/(\text{UE L}^{-1})} = \frac{\Delta A}{\epsilon_{/(\text{L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})} \cdot \ell_{/\text{cm}}} \cdot \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{échantillon}}} \cdot \frac{1}{\Delta t_{/\text{min}}} = \frac{250 \Delta A}{27} \quad (\text{Equation A})$$

D. Test de toxicité *Microtox*®

Ce test repose sur la mesure d'une diminution de la bioluminescence ($\lambda_{\text{lumière émise}} = 490 \text{ nm}$) des bactéries *Vibrio fischeri* observée en présence d'un milieu toxique. Ces bactéries luminescentes (grâce à l'enzyme luciférase) sont exposées à une gamme de concentrations de la substance testée (généralement une série de dilution de $\frac{1}{2}$). La lumière émise par les bactéries est mesurée par un lecteur (*Microbics M500 Analyzer*®) pour déterminer une relation dose-réponse. La concentration efficace (EC50), la concentration qui inhibe 50 % de la lumière émise, est alors déterminée. EC50 est exprimée en une unité normale de concentration (par exemple mg L^{-1}) si la substance toxique est parfaitement connue ; sinon, EC50 sera exprimée comme un pourcentage de dilution de la solution la plus concentrée.

E. La demande biochimique en oxygène DBO5

La demande biochimique en oxygène (DBO5) est par définition la quantité de dioxygène consommée pendant 5 jours par les microorganismes d'un échantillon pollué pour en consommer la matière organique biodégradable.

La matière organique totale d'un échantillon est généralement évaluée grâce à la mesure de la DCO (Demande Chimique en Oxygène) qui est la quantité de dioxygène consommée lors d'une combustion totale supposée de cette matière. Puisque 5 jours ne sont pas suffisants pour dégrader biochimiquement toute la matière organique, on a toujours $DBO5 < DCO$. En plus, le rapport $DBO5/DCO$ toujours inférieur à 1, est un indice de la biodégradabilité : ainsi, pour une substance fortement biodégradable comme le glucose, ce rapport est d'environ 0,7 - 0,8, alors que pour une substance chimique toxique, il est très proche de zéro.

La mesure de la DBO5 dans ce travail a été faite en utilisant le système Oxitop® de WTW. Le principe est le suivant : un volume bien précis de l'échantillon est placé sous agitation dans une bouteille munie d'un bouchon renfermant une sonde manométrique qui mesure la dépression observée au cours du temps et indique une valeur de DBO chaque 24 heures jusqu'au 5^{ème} jour. En effet, lorsque l'O₂ est consommé, il y a dégagement de CO₂ qui sera piégé par des pastilles d'hydroxyde de sodium NaOH placées dans un capuchon surmontant la solution. Suivant le volume se trouvant dans la bouteille, la valeur affichée (**VA**) sur le bouchon sera multipliée par un facteur **f** indiqué dans le tableau.

Tableau B : Différentes gammes de mesure de la DBO5 par Oxitop®

Gamme (mg O₂ · L⁻¹)	0-40	0-80	0-200	0-400	0-800	0-2000	0-4000
Volume liquide/mL (V_L)	432	365	250	164	97	43,5	22,7
Facteur (f)	1	2	5	10	20	50	100

$$f \approx 2371,5 / V_L - 4,4816$$

Il faut mieux que la valeur obtenue à la fin des 5 jours tombe dans la gamme choisie, c'est pourquoi la mesure de la DBO d'un échantillon inconnu est généralement précédée d'une mesure de sa demande chimique en oxygène (DCO) pour pouvoir choisir la gamme en supposant une bonne biodégradabilité en écrivant :

$$DBO5_{\text{supposée}} = DCO / 1,46$$

Si l'échantillon ne contient pas assez de microorganismes pour dégrader la matière organique, est un milieu carencé en minéraux ou/et a le pH non favorable à la prolifération microbienne, il faut mieux régler ces paramètres avant de commencer la mesure de DBO. On se convient dans ces cas à ajouter dans la bouteille des boues activées lavées et qui donnent une concentration en matière sèche d'environ $0,05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, des sels minéraux et un tampon.

Préparation des solutions :

(A) Solution acide [HCl à 1 mol L^{-1}] : Verser peu à peu 83 mL de HCl concentré (12 mol L^{-1}) dans 700 mL d'eau placés dans une fiole jaugée de 1 L. Laisser refroidir et compléter à 1 L.

(B) Solution basique [NaOH à 1 mol L^{-1}] : Dissoudre 40 g de pastilles NaOH peu à peu dans 700 mL d'eau placés dans une fiole jaugée de 1 L. Laisser refroidir et compléter à 1 L.

(T) Solution tampon phosphate [KH_2PO_4 à $1,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$] : Dissoudre 204 g de KH_2PO_4 dans 700 mL d'eau placés dans un bécher. Ajuster le pH à 7,2 en ajoutant peu à peu de **(B)** ; transvaser dans une fiole de 1 L et compléter jusqu'au trait de jauge.

(M1) Solution minérale 1 [NH_4Cl à $0,2665 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$] : Dissoudre 24,7 g de NH_4Cl dans 700 mL d'eau placés dans une fiole de 1 L et compléter jusqu'au trait de jauge.

(M2) Solution minérale 2 [CaCl_2 à $0,25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$] : Dissoudre 27,8 g de CaCl_2 dans 700 mL d'eau placés dans une fiole de 1 L et compléter jusqu'au trait de jauge.

(M3) Solution minérale 3 [MgSO_4 à $0,0902 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$] : Dissoudre 22,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 700 mL d'eau placés dans une fiole de 1 L et compléter jusqu'au trait de jauge.

(M4) Solution minérale 4 [FeCl_3 à $0,0018 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$] : Dissoudre 0,49 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 700 mL d'eau placés dans une fiole de 1 L et compléter jusqu'au trait de jauge.

Les solutions ci-dessus peuvent être stockées à 4°C pendant plusieurs mois. Elles doivent être renouvelées si on constate une précipitation ou une prolifération microbienne.

(GG) Solution Glucose-Glutamate [chacun à $1,5 \text{ g L}^{-1}$] : Placer 2 à 3 g de glucose et d'acide glutamique dans des coupelles en aluminium dans une étuve à 103°C pendant 1 h. Peser 1,5 g de chacun et les dissoudre dans 700 mL d'eau placés dans un bécher. Ajuster le pH à 7 en ajoutant peu à peu de **(B)** ; transvaser dans une fiole jaugée de 1 L et compléter.

Ensuite, répartir le contenu dans des petits récipients et les congeler. Sinon, laisser une portion pour être utiliser le jour même et jeter ce qui n'a pas été utilisé. Chaque portion une fois décongelée doit être utilisée le jour même et tout ce qui est non utilisé après décongélation est jeté.

(BAL) Suspension de boues activées lavées : Il est préférable de faire une mesure préliminaire de la matière sèche dans les boues activées brutes si on n'en a aucune idée ; retirer 5 mL de ces boues et les mettre dans une coupelle en aluminium pré-pesée dans une étuve à 101°C pendant 2 heures. Peser la coupelle avec les débris secs et retirer par différence la concentration en matière sèche des boues :

$\Delta m = m (\text{coupelle} + \text{débris secs}) - m (\text{coupelle vide})$; masse exprimée en g

$\text{MS par litre} = \Delta m / 0,005$; concentration en g/L

Prélever alors un volume suffisant (1,5 fois plus que celui calculé) des boues pouvant apporter 0,05 g de MS par litre de contenu total des bouteilles à préparer. Centrifuger ces boues (une proposition de 4000 tr/min pendant 5 minutes), remettre le surnageant dans le réacteur des boues activées brutes. Le lavage des boues consiste à remettre en suspension les culots dans des volumes équivalents d'eau distillée (il est préférable de ne plus laver avec de l'eau de robinet qui contient du chlore) et de centrifuger une deuxième fois dans les mêmes conditions ; cette fois-ci le surnageant est jeté.

Une série de « ré-suspension – centrifugation » pourrait être nécessaire jusqu'à avoir un surnageant pratiquement transparent. Une dernière centrifugation est réalisée après avoir mettre en suspension tous les culots dans un même récipient à centrifuger ; le surnageant est jeté et le grand culot est remis en suspension dans un minimum de volume d'eau distillée et le tout transvasé dans un bécher sous agitation magnétique. Alors une deuxième fois, une mesure de la MS est effectuée sur les BAL suivant la même procédure ci-dessus.

(EDE) Eau de dilution et d'ensemencement : Pour préparer 1 L de cette eau, il faut mélanger 2,5 mL de (T) avec 1 mL de chacune des solutions (M1), (M2), (M3) et (M4) dans 800 mL d'eau placés dans un bécher sous agitation magnétique pendant 20-30 minutes pour bien saturer la solution en dioxygène, ajouter alors le volume de BAL équivalent à 0,5 g de MS et compléter jusqu'à un volume total de 1 L tout en maintenant l'agitation pendant le reste de la manipulation. Si on aurait besoin de plus de 1 L (c'est préparer plus que 20 bouteilles de DBO dans la gamme 0-40), il faut préparer tout le volume d'un seul coup tout en conservant les mêmes proportions de tampon, minéraux et MS.

(B-DBO) Blanc DBO : Pour préparer 1 L de ce blanc, il suffit de diluer au dixième **(EDE)** c'est-à-dire d'en mettre 100 mL dans un bécher, compléter à 1 L et laisser s'agiter pendant 20 minutes pour saturer en dioxygène.

(T-DBO) Témoin DBO : Pour préparer 400 mL de ce témoin, il suffit d'ajouter 40 mL de **(GG)** fraîchement préparés ou décongelés, amener le volume à 400 mL avec de l'eau et laisser sous agitation pour saturer en dioxygène. Un ajustement de pH n'est pas pratiquement nécessaire car déjà effectuer pour **(GG)**.

(E_n-DBO) Échantillons qu'on désire mesurer la DBO : Suivant la gamme choisie, ajuster le pH à 7 d'un volume suffisant pour remplir deux bouteilles de chaque échantillon. Si des dilutions sont nécessaires, il faut les noter pour bien mener les calculs ultérieurs. Si l'agitation, subite par les solutions pendant l'ajustement des pH, n'est pas suffisante, il faut la prolonger pendant 20 minutes pour saturer en dioxygène.

Préparation des bouteilles : Les bouteilles sont bien lavées et propres. Sinon, les rincer avec (A) dilué au dixième puis à l'eau distillée. S'assurer que l'eau de rinçage est neutre avant l'utilisation des bouteilles lavées à l'acide.

Deux bouteilles notées **B1** et **B2** sont remplies avec 432 mL de **(B-DBO)** chacune. Elles servent comme des blancs qui permettent de quantifier la respiration endogène.

Deux bouteilles notées **T1** et **T2** sont remplies avec 147,6 mL de **(T-DBO)** et 16,4 mL de **(EDE)** chacune. Elles servent comme témoins positifs qui permettent de quantifier la limite supérieure de la respiration exogène sur des sources carbonées facilement biodégradables.

Pour chaque échantillon, deux bouteilles notées **E_{n1}** et **E_{n2}** sont remplies chacune suivant la gamme choisie avec 90 % en volume de **(E_n-DBO)** et les 10 % restants avec **(EDE)**.

Chaque bouteille est munie de son barreau aimanté, de son capuchon contenant 2 à 3 pastilles de NaOH et fermée avec son bouchon Oxitop. Ramener les manomètres à zéro en appuyant simultanément sur les boutons S et M. Mettre les bouteilles sous agitation dans l'incubateur à 20°C. Il n'y a rien maintenant que d'attendre pendant 5 jours. Des mesures manuelles de la DBO instantanée peuvent être effectuées en appuyant sur le bouton M et ceci même après 25 jours si du dioxygène reste dans la bouteille. Le bouton S aide à voir les valeurs DBO1 jusqu'à DBO5 qui seront stockées en mémoire. Voici enfin deux exemples d'application à la mesure de la DBO5 et qui paraissent instructifs. Dans le premier exemple, on teste l'efficacité d'un prétraitement ayant pour but d'améliorer la biodégradabilité d'une solution contenant un polluant peu biodégradable. On s'attend alors à une augmentation de la DBO5 après ce prétraitement si celui-ci aboutit à la transformation du polluant en des produits organiques plus facilement dégradables. Cependant, il se peut qu'on assiste à une diminution de la DBO5 si le prétraitement est trop poussé et aboutissant donc à la minéralisation du polluant ne laissant que peu de la substance carbonée aux microorganismes pour consommer. Dans le deuxième exemple, c'est un test de toxicité qui est présenté.

On s'attend à des diminutions croissantes des DBO5 observées sur des solutions contenant le témoin GG mais des concentrations croissantes d'une substance toxique supposée non-biodégradable.

Tableau C : Exemple d'une mesure de DBO5 étudiant l'effet d'un traitement sur la biodégradabilité

Bouteille #	B1	B2	ST1	ST2	SNT1	SNT2	T1	T2	% biodégradable : avant traitement = $\frac{26,11}{231,67} = 11,3 \%$ après traitement = $\frac{59,44}{231,67} = 25,7 \%$
mL T-DBO	0	0	0	0	0	0	147,6	147,6	
mL solution traitée (ST)	0	0	225	225	0	0	0	0	
mL solution non traitée (SNT)	0	0	0	0	225	225	0	0	
mL d'EDE	0	0	25	25	25	25	16,4	16,4	
mL de B-DBO	432	432	0	0	0	0	0	0	
Volume total	432	432	250	250	250	250	164	164	
Gamme	0-40	0-40	0-200	0-200	0-200	0-200	0-400	0-400	
Facteur f	1	1	5	5	5	5	10	10	
Valeur Affichée (VA)	1	2	10	12	4	6	22	20	
DBO = $(f \cdot VA - VA_{\text{blanc}})/0,9$	0		59,44		26,11		231,67		

Tableau D : Exemple d'une mesure de DBO5 étudiant l'inhibition de l'activité microbienne

Bouteille #	B1	B2	T5.1	T5.2	T10.1	T10.2	T0.1	T0.2	% d'inhibition : pour $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} =$ $\frac{231,67 - 120,56}{231,67} = 48,0 \%$ pour $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} =$ $\frac{231,67 - 53,88}{231,67} = 76,7 \%$
mL T-DBO	0	0	0	0	0	0	147,6	147,6	
mL T-DBO à 5 ppm de (P)	0	0	147,6	147,6	0	0	0	0	
mL T-DBO à 10 ppm de (P)	0	0	0	0	147,6	147,6	0	0	
mL d'EDE	0	0	16,4	16,4	16,4	16,4	16,4	16,4	
mL de B-DBO	432	432	0	0	0	0	0	0	
Volume total	432	432	164	164	164	164	164	164	
Gamme	0-40	0-40	0-400	0-400	0-400	0-400	0-400	0-400	
Facteur f	1	1	10	10	10	10	10	10	
Valeur Affichée (VA)	1	2	10	12	4	6	22	20	
DBO = $(f \cdot VA - VA_{\text{blanc}})/0,9$	0		120,56		53,88		231,67		

F. Dosage du carbone organique dissous (COD)

Dans un échantillon aqueux, le carbone total (CT) est divisé en du carbone inorganique (CI) (principalement carbonates et CO_2) et du carbone organique total (COT). En acidifiant la solution, le CI est volatilisé sous forme de CO_2 (il paraît aussi que durant cette étape, un peu de carbone organique dit volatil peut se perdre, mais ce type de composés carbonés est rare dans les eaux naturelles). La filtration sur $0,45 \mu\text{m}$, permet d'éliminer le carbone organique particulaire (COP) et il reste le carbone organique dissout (COD).

Carbone Total (CT)			
Carbone Inorganique (CI)	Carbone Organique Total (COT)		
	Carbone Organique Volatil (COV)	Carbone Organique Non Volatile (CONV)	
		Carbone Organique Particulaire (COP)	Carbone Organique Dissous (COD)

Figure A : Diagramme représentant les différentes fractions de carbone dans un milieu liquide

De ce qui précède, on peut dire que la détermination du CT se fait sans acidification ni filtration. L'acidification sans filtration permet d'éliminer les carbonates et de mesurer le CONV souvent confondu avec le COT (COV négligeable). Enfin, si on acidifie et on filtre (ce qui est le cas dans cette étude), la mesure donnée est le COD.

Étalonnage du COT-mètre par de l'hydrogénophthalate de potassium ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$)

- 1- Placer de l'hydrogénophthalate de potassium solide en poudre dans une coupelle en aluminium à l'étuve jusqu'à masse fixe (refroidir la coupelle dans un dessiccateur chaque fois avant de peser).
- 2- Peser exactement 0,1064 g de la poudre anhydre et les dissoudre avec de l'eau ultra-pure (EUP) dans une fiole de 500 mL. La solution obtenue (S_{100}) est à $100 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1}$; une mole de $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ de masse 204,22 g contient 8 mol-atomes de carbone de masse 96 g, donc 106,4 g de ce composé contiennent 50 mg de C dans 500 mL.
- 3- Prendre 10 mL de (S_{100}), les mettre dans une fiole de 100 mL et compléter avec de l'EUP pour obtenir une solution (S_{10}) à $10 \text{ mg}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1}$.
- 4- Préparer dans des tubes à essai les solutions de la gamme d'étalonnage comme indiqué dans le **Tableau 2.5** :

Tableau E : Mode de préparation de la gamme d'étalonnage du COT-mètre

Solution numéro :	S_2	S_4	S_6	S_8	Solution numéro :	S_{20}	S_{40}	S_{60}	S_{80}
mL de (S_{10})	4	8	12	16	mL de (S_{100})	4	8	12	16
mL d'EUP	16	12	8	4	mL d'EUP	16	12	8	4
$\text{mg}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1}$	2	4	6	8	$\text{mg}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1}$	20	40	60	80

- 5- Les vials de mesure du COD sont bien lavés à l'acide sulfurique, rincés à l'EUP et placés à l'étuve pour bien sécher.
- 6- Un vial étiqueté S_0 est remplis d'EUP et Dix autres de S_2 à S_{100} sont remplis par filtration sur $0,45 \mu\text{m}$ par la solution de même nom.
- 7- Garder les à la chambre froide jusqu'à réalisation des mesures.

La mesure repose sur une acidification et minéralisation complète de la matière organique du volume injecté, ce qui produit du dioxyde de carbone CO_2 qui sera canalisé devant un détecteur qui mesure l'absorbance infrarouge IR. L'aire de pic est proportionnel à la quantité de CO_2 produite, elle-même proportionnelle au COD.

Annexe 7 Liste des abréviations

A. Abréviations

ABTS	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AI	Acridine
AHTN	Tonalide
Allo-BA	BioAugmentation Allochtone
AN	Atténuation Naturelle
ANOVA	Analyse de la variance (ANalysis Of VAriance)
AO	Acridone
AQ	Ammonium Quaternaire
ARN _m	Acide RiboNucléique messenger
ASM	Modèle de boues activées (Activated Sludge Model)
ATCC	American Type Culture Collection
Auto-BA	BioAugmentation Autochtone
BA	BioAugmentation
BAC	Boues Activées Conventionnelles
BAL	Boues Activées Lavées
BS	BioStimulation
CAT	Catalase
CBZ	Carbamazépine
CCD	Plan centré composite (Central Composite Design)
CLL	Champignon LigninoLytique
COD	Carbone Organique Dissous
COT	Carbone Organique Total

CPF	Composé PerFluoré
CYP3A4	CYtochrome P450 3A4
CSTR	Réacteur continu parfaitement agité (Continuous Stirred Tank Reactor)
DBO	Demande Biochimique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
DiOH-CBZ	10,11-dihydro-10,11-trans-dihydroxycarbamazépine
DOE	Plan d'expérience (Design Of Experiments)
DSM	Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
EP-CBZ	10,11-époxy-carbamazépine
EUP	Eau ultra-pure
GAE	Groupe fonctionnel Attracteur d'Électrons
GDE	Groupe fonctionnel Donneur d'Électrons
Gen-BA	BioAugmentation Génique
GG	Glucose-Glutamate
GOT	Glutamate Oxaloacétate Transaminase
GPT	Glutamate Pyruvate Transaminase
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HBT	1-hydroxybenzotriazole
HHCB	Galaxolide
HRT	Temps de séjour hydraulique (Hydraulic Retention Time)
hsp70	Protéines de choc thermique (heat shock protein 70)
IM	Iminostilbène
IMS	Services marketing intercontinentaux (Intercontinental Marketing Services)
LDH	Lactate DésHydrogénase

LiP	Lignine-peroxydase
LME	Enzyme modifiante de la lignine (Lignin Modifying Enzyme)
MEC	Concentration mesurée dans l'environnement (Measured Environmental Concentration)
MC	Microcosme
MMB	Milieu Minéral de Base
MnP	Peroxydase manganèse-dépendante
MOS	Marge de sécurité (Margin Of Safety)
MPO	MicroPolluant Organique
MS	Matière Sèche
MT	MétalloThionéine
NT	Azote Total
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
PBA	Procédé Biologique Avancé
PBDE	Diphényléther polybromé
PCA	Alcane polychloré
PCB	Polychlorobiphényle
PCN	Naphtalène polychloré
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PFAC	Perfluoroalkylcarboxylate
PFAS	Perfluoroalkylsulfonate
PFOA	Acide perfluorooctanoïque
PFOS	Perfluorooctane sulfonate
P-gp	P-glycoprotéine
PhAC	Composé à activité pharmaceutique (Pharmaceutically Active Compound)

PNEC	Concentration prédite sans effet (Predicted No-Effect Concentration)
POA	Procédé d'Oxydation Avancée
PPSP	Produit Pharmaceutique et de Soins Personnel
QSAR	Relation quantitative structure-activité (Quantitative Structure-Activity Relationship)
RMX	Résistance aux Multi-Xénobiotiques
RSM	Méthodologie de la surface de réponse (Response Surface Methodology)
RSP	Résidus de Substances Pharmaceutiques
R@X	Aérobie puis anoxie
SCE	Somme des Carrés des Erreurs
SCR	Somme des Carrés de Régression
SCT	Somme des Carrés Totale
SOD	Superoxyde dismutase
SPO	Sous-Produits d'Oxydation
SRT	Age des boues (Sludge Retention Time)
SS	Solides en Suspension
STEP	STation d'ÉPuration des eaux usées
TEMPO	(2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-yl)-oxyle
WRF	Champignon de la pourriture blanche (White-Rot Fungi)
X@R	Anoxie puis aérobie
μ-OGM	MicroOrganisme Génétiquement Modifié

B. Grandeurs

C_e	Concentration du composé restant par unité de volume de la phase liquide à l'équilibre
CE_{50}	Concentration demi-Efficace
CL_{50}	Concentrations demi-Létale
$D_{o/e}$	Coefficient de distribution octanol/eau
f_{co}	Fraction de carbone organique de la matière en suspension
H	Constante de la loi de Henry
K_{co}	Coefficient de sorption sur carbone organique
K_d	Coefficient de distribution
K_M	Constante de Monod
$K_{o/e}$	Coefficient de partage octanol-eau
$p_{sorption}$	Proportion ad/absorbée d'une substance
P_{vapeur}	Pression de vapeur saturante
q_e	Concentration du composé ad/absorbé par unité de masse de la phase ad/absorbante
R	Coefficient de corrélation de Pearson
R^2	Coefficient de détermination
α	Coefficient de solubilité de Bunsen

Annexe 8

Signatures

VU :

Le Directeur de Thèse
(Nom et Prénom)

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Avec modifications

Sans modifications

Le Président de Jury,

(Nom et Prénom)

Si modifications à faire, validation par le directeur de thèse du manuscrit corrigé avec attestation

ABSTRACT

Pharmaceutical residues are considered as an emerging environmental problem because of their presence and their continuous accumulation in the environment. Even at low concentrations, these substances may threaten all living organisms. It is therefore urgent to develop the technical means to eliminate them. In this framework is the work of this thesis, it intended to treat carbamazepine, an antiepileptic drug widely detected in the aquatic environment. A first study was conducted on the biodegradation of carbamazepine by activated sludge by biostimulation with various sources of conventional carbon. An optimization of the various operating parameters was also performed. In addition, a second study examined the biodegradation of the target molecule by a fungal strain, and this work was completed by a third synthesis study establishing technical fungal bioaugmentation of activated sludge to improve performance treatment.

RESUME

Les résidus pharmaceutiques sont considérés comme un problème écologique émergent, à cause de leur présence et leur accumulation continue dans l'environnement. Même à de faibles concentrations, ces substances sont susceptibles de menacer l'ensemble des organismes vivants. Il est donc, urgent de développer les moyens techniques permettant leur élimination. Dans ce cadre s'inscrit le travail de cette thèse, il a pour objectif de traiter la carbamazépine, un antiépileptique largement détecté dans le milieu aquatique. Une première étude a été menée sur la biodégradation de la carbamazépine par des boues activées par biostimulation avec différentes sources de carbone conventionnelles. Une optimisation des différents paramètres opératoires a été également effectuée. En outre, une seconde étude a porté sur la biodégradation de la molécule cible par une souche fongique, et ce travail a été achevé par une troisième étude de synthèse mettant en place la technique de bioaugmentation fongique des boues activées afin d'améliorer la performance du traitement.