THESE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

EN CO-TUTELLE AVEC

L'UNIVERSITE DE CARTHAGE
FACULTE DES SCIENCES DE Bizerte

Ecole doctorale science et vie

ECOLE DOCTORALE N° 602
Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité : « Génie des procédés »

Par
« Ahlem MANSOURI»

« Approche intégrée de suivi d'un procédé de bioremédiation : Application aux sédiments de la lagune de Bizerte»

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 16/10/2018 »
Unité de recherche : GEPEA / UR17ES20

Composition du Jury:

Président:	**M.Robert DURAN**	Professeur, Université de Pau
Examinateurs :	**M. Abdelwahab CHATTI**	Maître de conférences, centre CERTE, Tunisie
	M. Benoît FERRARI	Maître de conférences, Centre Ecotox Eawag-EPFL, Suisse
Dir. de thèse :	**M. Gérald THOUAND**	Professeur, Université de Nantes
Dir. de thèse:	**M. Ahmed LANDOULSI**	Professeur, Faculté des sciences de Bizerte

Invitées :

- **Mme. Chiraz ABBES** — Maître assistante, Faculté des sciences de Bizerte
- **Mme. Marie-José DURAND** — Maître de conférences, Université de Nantes

Dédicaces

Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire …

À mes chers parents Ibrahim et Jezia. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être. Je vous remercie pour le soutien inconditionnel que vous m'avez accordé tout au long de mon cursus et qui m'ont permis de réaliser de si longues études. Ce travail est le fruit de vos sacrifices. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout-puissant, vous préserve et vous accorde une longue vie et bonheur.

À ma deuxième maman Neila. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

À mes frères Mohamed et Khalil

En témoignage de la grande affectation et de l'estime que j'ai pour vous. Que dieu vous bénisse, vous aide à réussir et à avoir un brillant avenir.

À mon cher mari Bilel

Tu m'as supporté et épaulé au quotidien tout au long de cette thèse, tu étais présent tout le temps pour m'écouter et m'encourager, je ne peux trouver les mots justes et sincères pour t'exprimer ma grande reconnaissance et mon amour.

À toute ma belle-famille qui m'a aussi encouragé pour aller droit au but, et avec cette question récurrente « quand est-ce que tu soutiendras ta thèse ? ≫ m'a permis de ne pas dévier de mon objectif final !

À tous mes plus proches amis : Aicha, Lamia, Afef, Ines ….

Je ne peux trouver les mots justes pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères et sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

À tous ceux que j'aime et ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur.

Merci à tous !

A mes deux anges Zakariya § Mouadh

Remerciement

Dans ce paragraphe, je voudrais exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail. La principale difficulté étant de n'oublier personne, je remercie par avance tous ceux dont le nom n'apparaitra pas mais qui m'ont soutenue, de près ou de loin.

En premier lieu, j'adresse mes plus sincères remerciements à mes deux directeurs de thèse, monsieur **Ahmed LANDOULSI** pour avoir cru en moi et soutenait ma candidature et monsieur **Gérald THOUAND** pour m'avoir fait confiance et m'avoir donné la chance de travailler au sein de CBAC. J'ai eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Je tiens également à vous exprimer ma reconnaissance pour votre grande disponibilité, votre rigueur scientifique et vos précieuses directives que vous avez cessé de me prodiguer tout au long de l'élaboration de ce travail et qui m'ont été d'un grand apport.

Je tiens également à remercier l'initiatrice de ce travail madame **Chiraz ABBES** qui m'a suivi depuis le mastère et jusqu'à la fin de cette thèse et qui ma accompagné toujours avec un mot d'encouragement positif et optimiste durant les moments de joie et de faiblesse.

Je tiens également à remercier madame **Marie José DURAND** pour m'avoir suivi pas à pas dans mes recherches et qui crée un cadre de travail intéressant et m'avoir alloué des moyens expérimentaux importants.

Je suis également très honorée que monsieur **Robert DURAN** et monsieur **Abdelwahab CHATTI** aient accepté de d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que monsieur **Benoit FERRARI** d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je voudrais exprimer mon respect et mes profondes reconnaissances à ma commission des thèses ; Michel Dion et Christine Lors pour leur suivi régulier. Merci pour le regard critique et avise qu'ils porteront sur ce travail.

Je remercie aussi les autres encadrant qui ont été indispensables à la progression de ce travail multidisciplinaire, Je pense ici à monsieur **Mickaël CREGUT** pour son soutien très pédagogique.

Merci à Sulivan, Ali, Emilie, Anna, Marine et toute l'équipe CBAC de La Roche Sur Yon, pour leurs contributions respectives et leurs suggestions pertinentes. Et à tout le personnel du labo, même si j'ai eu peu l'occasion de le côtoyer.

J'exprime toute ma reconnaissance à l'équipe LBBM, leur soutien et leur bonne humeur, je cite spécialement Ramla, Khadija, Hamida, Bochra, Imen, Amel, Wiem, … Pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale.

Enfin, merci au personnel des différents services de la faculté des sciences de Bizerte et de l'institut universitaire de La Roche Sur Yon dans lesquels j'ai pu évoluer et qui n'a pas pu être cité ici.

Table des Matières

TABLE DES MATIÈRES 3

PRODUCTION SCIENTIFIQUE 7

LISTE DES ABREVIATIONS 9

LISTE DES FIGURES 10

LISTE DES TABLEAUX 13

INTRODUCTION GENERALE 15

CHAPITRE I : EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE 18

1. POLLUTION ENVIRONNEMENTALE; CAS DU DDT ET DU BAP 19

1.1. LE DDT; DEFINITION ET CAS MAJEURS DE POLLUTION DANS LE MONDE 19

1.1.1. Généralités *19*

1.1.2. Pollution environnementale par le DDT *20*

1.2. LE BENZO(A)PYRENE (BAP) : GENERALITES ET POLLUTION ENVIRONNEMENTALE 21

1.2.1. Le Benzo(a)Pyrène : Définition et sources d'émission *21*

1.2.2. Pollution environnementale par le BaP *22*

2. BIODEGRADATION : PRE-REQUIS POUR ELABORER UN PROCEDE DE BIOREMEDIATION DE MOLECULES ORGANIQUES 23

2.1. BIODEGRADATION DU DDT 23

2.2. BIODEGRADATION DU BAP 26

3. PROCEDES DE BIOREMEDIATION DES SITES POLLUES PAR LE DDT ET LE BAP 27

3.1. ÉLABORATION DU PROCEDE A L'ECHELLE DE LABORATOIRE 27

3.2. APPLICATION *IN-SITU* 28

3.3. FACTEURS D'AMELIORATION DE LA BIOREMEDIATION 29

3.3.1. La biostimulation *29*

3.3.2. La bioaugmentation *30*

3.3.3. Les champs magnétiques statiques (CMS) *32*

4. METROLOGIE DES PROCEDES DE BIOREMEDIATION 33

4.1. CARACTERISTIQUES D'ELABORATION D'UN PROCEDE DE BIOREMEDIATION 33

4.2. ÉTAT DE L'ART DU MONITORING DU PROCEDE DE BIOREMEDIATION, CAS DE LA POLLUTION PAR LE DDT. 34

4.3. SUIVI DE LA BIOREMEDIATION PAR LA METROLOGIE DE PREMIER NIVEAU 37

4.4. SUIVI DE LA BIOREMEDIATION SELON LA METROLOGIE DE DEUXIEME NIVEAU 37

4.5. CARACTERISATION D'UNE BIOREMEDIATION SELON LA METROLOGIE DE TROISIEME NIVEAU 38

4.5.1. Principe de l'approche écotoxicologique *39*

4.5.2. Utilisation des tests écotoxicologique pour le monitoring des procédés de bioremédiation *39*

5. SITES D'ETUDE : LA LAGUNE DE BIZERTE 40

5.1. PRESENTATION GENERALE 40

5.2. PRINCIPALES MENACES DE POLLUTION DE LA LAGUNE DE BIZERTE 40

5.3. Étude bibliometrique des travaux de bioremediation realises sur la lagune de Bizerte 44

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES 47

PARTIE I : MATERIEL ET METHODES UTILISES POUR L'ISOLEMENT ET LA CARACTERISATION DES BACTERIES. 48

1. MILIEUX DE CULTURE ET PRODUITS CHIMIQUES 48

1.1. Milieux de cultures 48

Nitrate d'ammonium 48

1.2. Solutions de $MgSO_4$ 48

2. SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES 48

3. ISOLEMENT DES SOUCHES DEGRADANT LE BAP ET /OU LE DDT DE LA LAGUNE DE BIZERTE 50

4. TEST DE TOXICITE A LA RESAZURINE 50

5. TEST DE BIODEGRADATION (DBO TRAK II) 51

6. SUIVI DE LA CINETIQUE DE BIODEGRADATION DU DDT ET DU BAP 52

7. ESSAI D'OPTIMISATION DE LA BIODEGRADATION DU DDT ET DU BAP PAR COUPLAGE AVEC UN CHAMP MAGNETIQUE STATIQUE 52

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES UTILISES POUR LA METROLOGIE DE PROCEDE DE BIOREMEDIATION ... 53

1. PRODUITS CHIMIQUES ET MILIEUX DE CULTURE 53

1.1. Antibiotiques 53

1.2. Solution de metaux lourds 53

1.3. Solution de saccharose et de TPS 54

1.4. Milieux de cultures 54

2. SOUCHES BACTERIENNES ET CONSERVATION 55

2.1. Souches bacteriennes utilisees 55

2.2. Conservation des souches par lyophilisation en microplaques 56

3. ANALYSES CHIMIQUES 56

3.1. Caracterisation du sediment traite 56

3.1.1. Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) 56

3.1.2. Suivi des concentrations d'azote (N) et du phosphate (P) 56

3.1.3. Suivi de l'oxygène dissous et du pH 56

3.1.4. Mesure du carbone organique total dissous 57

3.2. Dosage des polluants organiques cibles (DDT, BaP et d'autres HAP) 57

3.3. Mesure des metaux et du TBT bio-accessibles 58

3.3.1. Tests de lixiviation 58

3.3.2. Exploitation des résultats de bioluminescence 58

4. ANALYSES BIOLOGIQUES 60

4.1. Denombrement de la biomasse 60

4.2. Suivi des souches bacteriennes lors de la bioaugmentation 60

4.2.1. Extraction de l'ADN du sédiment 60

4.2.2. PCR quantitative 61

4.3. Analyse de l'activite metabolique du consortium bacterien 65

5. TESTS DE TOXICITE 66

5.1. Analyse de la toxicite globale des sediments par des bacteries temoins 66

5.2. Analyse de la toxicite globale des sediments par les bacteries transformees 66
5.2.1. Préparation des souches compétentes 66
5.2.2. Transformation des souches par le plasmide pBtacLux d'E.coli DH1 67
5.2.3. Caractérisation d'émission de bioluminescence des bactéries transformées 68
5.3. Depistage de la genotoxicite des sediments 69

6. SIMULATION D'UN BIOPROCEDE DE BIOREMEDIATION 70

6.1. Échantillonnage et preparation des echantillons 70
6.2. Le dopage des sediments (SPIKING) 71
6.3. Structure et dimensionnement des bioreacteurs 72
6.4. Oxygenation et ajout des nutriments 73
6.5. Le monitoring de procede de bioremediation 74

7. TESTS STATISTIQUES 74

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION 76

PARTIE I : ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET DETERMINATION DE LA CAPACITE DE BIODEGRADATION DES SOUCHES BACTERIENNES 77

1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES SOUCHES DEGRADANT LE BAP ET/OU LE DDT A PARTIR DE LA LAGUNE DE BIZERTE 77

1.1. LISTE DES SOUCHES 77

1.2. Tests de toxicite 79
1.2.1. Tests de toxicité des souches autochtones 79
1.2.2. Étude des souches de références 80
1.3. Test de biodegradation: Demande Biologique en Oxygene (DBO) 81

2. ÉTUDE DE LA CINETIQUE DE BIODEGRADATION DU DDT ET/OU DU BAP ET EFFET DU CHAMP MAGNETIQUE STATIQUE (CMS) 83

2.1. Étude de la cinetique de biodegradation du melange DDT et BaP en melange 83
2.1.1. Étude de la biodégradation du mélange DDT et BaP en absence de CMS 83
2.1.2. Étude de la biodégradation du mélange DDT et BaP avec l'effet d'un champ magnétique statique (CMS) 85
2.2. Étude de la cinetique de biodegradation du BaP par *M. maritypicum* CB7 88
2.2.1. Biodégradation du BaP par M. maritypicum CB7 en absence de CMS 88
2.2.2. Biodégradation du BaP par M. maritypicum CB7 en présence de CMS 88

PARTIE II : METROLOGIE DE PROCEDE DE BIOREMEDIATION DES SEDIMENTS DE LA LAGUNE DE BIZERTE 91

1. HOMOGENEITE ET STABILITE DES BIOREACTEURS 91

1.1. Évolution des parametres physicochimiques 91
1.2. Fonctionnement epuratoire des bioreacteurs 92
1.2.1. Évolution du carbone organique total dissous et de la biomasse totale 93
1.2.2. Profil métabolique des bioréacteurs 95
1.3. Devenir des bacteries utilisees en bioaugmentation 97
1.3.1. Extraction et quantification de l'ADN à partir des échantillons de sédiment 97
1.3.2. Amplification des souches bactériennes cibles 98

2. QUEL EST LE DEVENIR DES POLLUANTS DANS LES BIOREACTEURS ? 100

2.1. Devenir des polluants organiques 100
2.2. Devenir des metaux et du TBT bio-accessibles 105

3. EMPREINTE ECOTOXICOLOGIQUE ET GENOTOXIQUE DES BIOREACTEURS 108

3.1. ANALYSE DE LA TOXICITE DES BIOREACTEURS 108

3.1.1. Tests de toxicité avec une matrice d'eau de mer 108

3.1.2. Évaluation de la toxicité globale par E.coli pBtaclux 110

3.1.3. Évaluation de la toxicité globale de lixiviat par les bactéries issues de la lagune de Bizerte 111

3.2. ANALYSES DE LA GENOTOXICITE DES BIOREACTEURS 112

CONCLUSION GENERALE 115

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 118

ARTICLES PUBLIES DANS DES REVUES INTERNATIONALES 134

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications soumises dans une revue avec comité de lecture

- **Mansouri, A., Cregut, M., Abbes, C., Durand, M. J., Landoulsi, A., Thouand, G.** (2016). The environmental issues of DDT pollution and bioremediation: a multidisciplinary review. *Applied biochemistry and biotechnology*, *181*(1), 309-339.

- **Mansouri, A., Abbes, C., & Landoulsi, A.** (2017). Combined intervention of static magnetic field and growth rate of *Microbacterium maritypicum* CB7 for Benzo (a) Pyrene biodegradation. *Microbial pathogenesis*, *113*, 40-44.

- **Mansouri, A., Mouhoub, R. B., Landoulsi, A. & Abbes, C.** (2018). Improvement of DDT-BaP mixture biodegradation efficiency using bacterial isolates induced by static magnetic field. Article in press dans Plos One.

- **Mansouri, A., Cregut, M., Abbes, C., Durand, M. J., Landoulsi, A., Thouand, G.** (2018).Integrated approach for monitoring a bioremediation process: Application to the sediment of the Bizerte lagoon. Article en revision dans *Journal of Hazardous Material*.

- **Abbes, C., Mansouri, A., Werfelli, N., & Landoulsi, A**. (2018). Aerobic Biodegradation of DDT by *Advenella Kashmirensis* and Its Potential Use in Soil Bioremediation. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 1-14.

- **Mouhoub, R. B., Mansouri, A., Aliliche, K., Beghalem, H., Landoulsi, A., & El May, A.** (2017). Unraveling the expression of genes involved in the biosynthesis pathway of cardiolipin and phosphatidylethanolamine in Salmonella Hadar grown under static magnetic field 200 mT. *Microbial pathogenesis*, *111*, 414-421.

Brevet national

Brevets sous le numéro TN 2017/0054, intitulé : "Développement d'un **B**ioprocédé **M**icrobien sous l'effet d'un **C**hamp **M**agnétique **S**tatique pour la **D**égradation d'un mélange de **P**olluants"

Congrès avec comité de lecture

- **Mansouri, A., Hammami M.A., Abbes, C., & Landoulsi, A.** Biodégradation d'un mélange de polluants organiques. 24ème congrès de l'association Tunisienne de Biotechnologie, Hammamet, Tunisie 18-22 décembre 2013

- **Mansouri, A., Cregut, M., Abbes, C., Durand, M. J., Thouand, G., & Landoulsi, A.** Effects of static magnetic fields on the biomass growth and biodegradation ability of *Pseudomonas stutzeri* from Bizerte lagoon (Tunisia). *25th* **International Symposium on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Bordeaux, France** 11-14 September 2015

- **Mansouri, A., Abbes, C., & Landoulsi, A.** Biodegradation ability of *Microbacterium maritypicum* CB7 under the effect of static magnetic field. The International Days of Biotechnology (IDB 2017), Hammamet, Tunisie 18-22 December 2017.

Communication par poster

- **Mansouri, A., Hammami M.A., Abbes, C., & Landoulsi, A.** Sélection et caractérisation de bactéries dégradant les HAP et les PoP. 24ème congrès de l'association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB), Hammamet, Tunisie 12-15 Mars 2012.

- **Mansouri, A., Abbes, C., & Landoulsi, A.** Isolement et identification de *Pseudomonas Stutzeri* KC157911 dégradant le DDT et le BaP en mélange de la lagune de Bizerte. 23ème congrès de l'association Tunisienne de Biotechnologie, Hammamet, Tunisie 17-20 Décembre 2012.

- **Mansouri, A., Abbes, C., & Landoulsi, A.** Biodégradation et Bioremédiation deDDT et de BaP dans des environnements extrêmes. 4èmes Journées Scientifiques de l'Association Tunisienne de Toxicologie (ATT), et les 1ères Journées de la Fédération Maghrébine de Toxicologie (FMT)**,** Monastir, Tunisie 10-13 Février 2013.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BaP: Benzo(a)Pyrène
CBA: Chlorobenzoic acid
CI50: Concentration inhibitrice50 %
CMS : Champ Magnétique Statique
COT : Carbone Organique Total
DBO : Demande Biologique en Oxygène
DBP: 4,4 -dichlorobenzophenone
DCO : Demande Chimique en Oxygène
DDA : 2,2-bis(p-chlorophenyl) acetate
DDD: 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane
DDE: 1,1-dichloro- 2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene
DDM: Bis(4 -chlorophenyl)methane
DDMS : 1-chloro-2,2-bis(4'-chlorophenyl) ethane
DDMU: 1-chloro-2-2-bis-(4 -chlorophenyl) ethylene
DDNS: 2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane
DDNU: 1,1-bis(4-chlorophenyl) ethylene
DDOH: 2,2-bis(4'-chlorophenyl) ethanol
DDT: 1,1,1-dichlorodiphenyl trichloroethane
DDTs: DDT et les sous produits de degradation
EPA: Environmental Protection Agency
GM : Growth medium
HAP : Hydrocarbures Aromatiques polycycliques
o,p –DDT: 1,1,1-dichlorodiphenyl trichloroethane
OCP: pesticides Organochlorés
OMS: Organization mondiale de santé
TPS : Tampon Phosphate Salin
PCB : Les polychlorobiphényles
PI : Propidium
p,p –DDT: 1,1,1-dichlorodiphenyl trichloroéthane
TBT : Tributylétain
UNEP: United Nations Environment Programme

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Concept de procédé développé pour le traitement des sédiments de la lagune de Bizerte. 17
Figure 2 : Évolution de l'utilisation du DDT dans le monde 19
Figure 3: Localisation des principaux réservoirs de DDT dans le monde entier et les concentrations plasmatiques de DDE dans le tissu adipeux humain 21
Figure 4: Principales sources d'émissions du BaP 22
Figure 5: Schéma de la biodégradation du DDT en aérobiose et en anaérobiose. 25
Figure 6: Biodégradation du BaP par quelques espèces de bactéries, de champignons et d'algues. .. 26
Figure 7: voie proposée pour la biodégradation du BaP par *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 27
Figure 8: Évolution de procédés de bioremédiation en fonction des quantités traités et de la complexité de procédé 28
Figure 9: Caractérisation idéale d'un procédé de bioremédiation. 33
Figure 10: Figure représentant les principales publications sur le processus de bioremédiation pour les sols contaminés au DDT. 36
Figure 11: Répartition des types de pollution le long de la lagune de Bizerte. 41
Figure 12: Exemple de plaque à 96 puits utilisée lors des tests de toxicité 50
Figure 13: Construction génétique des souches utilisées pour la détection des métaux 58
Figure 14: Etapes d'induction de toutes les bactéries lyophilisées en microplaque. 59
Figure 15: Présentation de la sélection des bactéries transformées sur boite de Pétri : les colonies blanches ont été transformées contrairement aux bleues. 62
Figure 16: Gel d'agarose présentant les produits d'amplification sur clones. Les clones utilisés pour le reste de l'étude sont pointés (*Pseudomonas stutzeri* LBR: 635 pb, *Cupriavidus metallidurans* LBJ : 437 pb et *Rhodococcus equi* LBB: 68 pb) (Résultats issues de cette thèse). 63
Figure 17: Présentation de la courbe standard avec les points de la gamme étalon en rouge et les échantillons en vert (a), des courbes d'amplification pour la gamme étalon (b) avec les courbes d'amplification pour la gamme étalon et les échantillons (c), et les courbes de dissociation (d). 64
Figure 18: Description du vecteur d'expression pB*tacLux* (Charrier et al., 2006). 67
Figure 19: Etapes de la transformation des souches bactériennes par *pBtaclux.* 67
Figure 20: Différentes étapes effectuées pour la réalisation du test d'Ames en microplaque. 70
Figure 21: Localisation de la lagune de Bizerte et de la station d'échantillonnage. 71
Figure 22: Montage utilisé pour le dopage et le mélange des sédiments de la lagune 71
Figure 23: Schéma du montage de traitement de sédiment en bioréacteur. 73
Figure 24: Photographie des bioréacteurs utilisés pour la bioremediation des sédiments. 74
Figure 25: Évolution de la consommation d'oxygène chez *Pseudomonas stutzeri LBR* pendant dix jours, en présence de 10 mg/L DDT+10 mg/L BaP avec leurs témoins respectifs : témoin positif et témoin inoculum. 82
Figure 26: Évolution de la consommation d'oxygène chez *Cupriavidus metallidurans* LBJ pendant dix jours, en présence de 10 mg/L DDT+10 mg/L BaP avec leurs témoins respectifs : témoin positif et témoin inoculum. 82

Figure 27: Évolution de la consommation d'oxygène chez *Rhodococcus equi* LBB pendant dix jours, en présence de 10 mg/L DDT+10 mg/L BaP avec leurs témoins respectifs : témoin positif et témoin inoculum 83
Figure 28: Biodégradation du DDT et du BaP en mélange avec le consortium constitué de *Pseudomonas stutzeri* LBR, *Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB pendant 30 jours..... 85
Figure 29: Cinétique de biodégradation du DDT (10 mg/L) (a) et BaP (10 mg/L) (b) en mélange avec un consortium composé de *P. stutzeri*, *C. metallidurans* et *R. equi* pendant 30 jours, avec et sans champ magnétique statique. 87
Figure 30: Courbe de dégradation du BaP au cours de la croissance de la souche *M. maritypicum* CB7 durant 30 jours mesuré par CLHP. La courbe bleue correspond à la croissance cellulaire en Log_{10} UFC/mL. 88
Figure 31: Effet de différentes inductions du champ magnétique statique sur la biodégradation du BaP par *M. maritypicum* CB7 mesuré par CLHP 89
Figure 32: Évolution des paramètres clés (pH, N et P) dans les bioréacteurs témoins et bioaugmentés 92
Figure 33 : (A) Évolution de la quantité de carbone organique totale dissous dans les bioréacteurs témoins et bioaugmentés durant 90 jours de traitement. (B) : Évolution de la quantité de carbone organique total dissous dans les bioréacteurs bioaugmentés durant les 23 derniers jours de traitement 93
Figure 34: Évolution de la population totale (exprimée en nombre de cellules/mL) dans l'effluent au cours de suivi de la bioremédiation des sédiments 94
Figure 35: Distribution de l'utilisation des sources de carbone contenues dans les plaques BIOLOG au premier jour de suivi au niveau des bioréacteurs témoins (a) et bioaugmentés (b), et aux 90ième jours au niveau des bioréacteurs témoins (c) et bioaugmentés (d)..... 96
Figure 36: Différences d'ADN extrait en ng d'ADN par g de sédiments entre échantillons témoins et bioaugmentés (à T90)..... 98
Figure 37: Représentation de la densité de souches utilisées en bioaugmentation des sédiments exprimée en nombre de copies du gène ciblé par gramme de sédiments 99
Figure 38: Comparaison entre les chromatogrammes de sédiments avant traitement (a) et en fin de traitements dans les bioréacteurs bioaugmentés (b) et témoins (c). 101
Figure 39: Suivi de devenir du BaP(a) et pourcentage de biodégradation des HAP (b) dans les échantillons de sédiments prelevés des bioréacteurs témoins et bioaugmentés après 90 jours de traitement. 102
Figure 40: Suivi de devenir du DDT(a) et pourcentage de biodégradation des dérivés du DDT(b) dans les échantillons de sédiments prelevés des bioréacteurs témoins et bioaugmentés après 90 jours de traitement 104
Figure 41: Voie de biodégradation du DDT dans les bioréacteurs..... 105
Figure 42: Évolution de la détection des métaux par *E.coli* Arslux (a), *E.coli* Coplux (b), *E.coli* Znlux (c), *E.coli* Merlux (d) et de *E.coli* TBT3 (e) dans les échantillons d'effluents des bioréacteurs témoins et bioaugmentés au cours de temps. 106
Figure 43: Suivie de l'inhibition de la bioluminescence de *A.fischeri* (LUMISTOX) par les effluents des bioréacteurs témoins (a) et bioaugmentés (b) après 5, 15 et 30 min de contact et illustration des différences entre les bioréacteurs témoins (traits continues) et bioaugmentés (traits discontinus) après 30 min de contact. 109

Figure 44: Pourcentages d'inhibition de la bioluminescence d'*E.coli pB*taclux par les effluents des bioréacteurs témoins et des bioréacteurs bioaugmentés. 111
Figure 45: Suivi de la toxicité des sédiments traités par les bactéries allochtones transformées : *Pseudomonas stutzeri* LBR pBtaclux (a), *Cupriavidus metallidurans* LBJ pBtaclux (b) et *Rhodococcus equi* LBB pBtaclux (c) pendant 90 jours. 112
Figure 46: Évaluation de la génotoxicité des effluents liquides des sédiments traités (témoins et bioaugmentés) sans et avec activateur métabolique (S9) par quatre souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 et TA1537) (En rouge la ligne de base de mutagénicité pour chacune des souches, les étoiles indiquent la signification des corrélations: * p <0,05). 113

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des bactéries et des champignons isolés pour leurs capacités de dégrader le DDT avec les sous-produits finaux et les pourcentages de dégradation de chaque espèce 24
Tableau 2: Utilisation des nutriments organiques et des matériaux bio-transformés en biostimulation pour amender la biodégradation des polluants 30
Tableau 3: Différentes souches bactériennes utilisées en bioaugmentation 31
Tableau 4: Effet des champs magnétiques sur la biodégradation des composés organiques. 32
Tableau 5: Résumé des études sur la bioremédiation des sols contaminés par le DDT classé par ordre chronologique 34
Tableau 6: Récapitulatif des techniques d'analyses moléculaires du consortium bactérien 38
Tableau 7: Comparaison de l'évolution des concentrations des contaminants dans les eaux de la lagune et dans les sédiments entre 2012 et 2014. 42
Tableau 8: Répartition des travaux de bioremédiation et de monitoring effectués sur la lagune de Bizerte..... 45
Tableau 9: Différents composés utilisés pour la préparation des milieux LB et le milieu M9. 48
Tableau 10: Distribution des souches bactériennes utilisées 49
Tableau 11: Préparation des solutions mères des métaux lourds 54
Tableau 12: Différents composés et milieux de cultures utilisés pour les cultures bactériennes..... 54
Tableau 13: Distribution des souches bactériennes utilisées pour les différents tests 55
Tableau 14: Les solutions utilisées pour extraire l'ADN à partir du sédiment. 61
Tableau 15: Amorces utilisées pour la détection des bactéries utilisées lors de la bioaugmentation. 61
Tableau 16: Optimisation des conditions de qPCR pour chacune des souches ciblées..... 62
Tableau 17: Différents produits et concentrations utilisés pour la préparation du mix de la PCR pour l'amplification de l'ADN 16S des souches cibles 64
Tableau 18: Types de substrats présents dans la microplaque (BIOLOG, ECOPlate). 65
Tableau 19: Distribution des CI_{50} des souches bactériennes transformées et rendues bioluminescentes et leurs comparaisons par rapport à *A. fischeri* 68
Tableau 20: fréquences des prélèvements effectués pour le suivi de la bioremédiation des sédiments traités 74
Tableau 21: Distribution des souches sélectionnées selon la source de carbone et sa concentration 79
Tableau 22: Différentes concentrations d'inhibition de la formation de résorufine (CI_{50}) en mg/L du DDT et /ou du BaP des différentes souches (Mtx= mélange de métaux lourds) 80
Tableau 23: Caractéristiques toxicologiques des trois souches de références 81
Tableau 24: Biodégradation du DDT (10 mg/L) et du BaP (10 mg/L) en mélange en présence de Pseudomonas stutzeri LBR, Cupriavidus metallidurans LBJ et Rhodococcus equi LBB pendant 30 jours…. 84
Tableau 25: Effet d'une induction de 200 mT sur la biodégradation du DDT et du BaP 86

Tableau 26: Évolution de l'indice de Shannon des effluents des sédiments témoins et bioaugmentés au cours du procédé de bioremédiation appliqué durant 90 jours 96
Tableau 27: Répartition des concentrations des métaux obtenus dans le lixiviat des sédiments avant et après la fin de procédé..... 107

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La préoccupation croissante pour la réussite des opérations de bioremédiation des sites contaminés a nécessité d'explorer des technologies efficaces en terme de coût, de développer également des outils de surveillance qui prennent en considération tous les facteurs physiques, chimiques et biologiques d'un procédé. L'emploi de procédés biologiques pour éliminer les polluants industriels qui contaminent le cycle biogéochimique des substances naturelles, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement. Ils consistent à utiliser des systèmes biologiques pour réduire le niveau de pollution présente dans l'environnement.

Les procédés de bioremédiation consistent à activer la capacité naturelle que possèdent des nombreux microorganismes, à dégrader les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique. Ces organismes peuvent être indigènes ou exogènes (Mansouri et al., 2016).

Ainsi, pour concevoir un système de bioremédiation, plusieurs facteurs responsables du procès doivent être abordés et explorés. Il existe un certain nombre d'espèces bactériennes isolées à partir de différents environnements qui ont la capacité de dégrader divers polluants comme les pesticides organochlorés tel que le Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) tel que le Benzo(a)pyrene (BaP).

Ces microorganismes ont besoin de nutriments et de source de carbone pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur survie (Ballerini et al., 1998). L'acclimatation de ces espèces peut favoriser la biorestauration des environnements pollués (Boopathy, 2000). Toutes fois, il est possible d'induire la capacité de dégradation de ces microorganismes en les exposant à des niveaux plus élevés de polluants, ceci peut dans certains cas entraîner une adaptation génétique et des changements d'activité conduisant à l'augmentation de leur capacité de biodégradation des polluants organiques.

La bioremédiation doit faire face à un environnement hétérogène dans lequel les contaminants sont présents en association avec des particules du sol, ou dissous dans la fraction aqueuse et dans l'eau interstielle du sédiment. Pour cette raison, la bioremédiation doit avoir une approche pluridisciplinaire, prenant ainsi en compte l'ingénierie des procédés, la microbiologie, l'écologie, l'écotoxicologie, et la chimie analytique.

C'est dans ce cadre que nous avons mené cette étude. Un consortium des souches bactériennes a été isolé de lagune de Bizerte pour sa capacité à dégrader un mélange hétérogène de polluants. Ce consortium a subi une série d'essais de toxicité et de biodégradation afin de choisir les souches les plus compétentes pour la bioremédiation. Par la suite la capacité de biodégradation de ces souches a été améliorée par la combinaison de leurs activités avec l'effet d'un champ magnétique statique à plusieurs inductions.

Les étapes précédentes nous en permis d'appliquer le procédé développé sur un échantillon représentatif de sédiments de la lagune de Bizerte (Tunisie). Ce sédiment est caractérisé par une pollution mixte de divers composés organiques et de métaux lourds, a subi un traitement de bioremédiation par trois souches bactériennes durant trois mois. Le suivi de l'efficacité du procédé de bioremédiation a été effectué par plusieurs moyens prenant en compte la chimie, la microbiologie, la toxicologie et l'écotoxicologie (**Figure 1**).

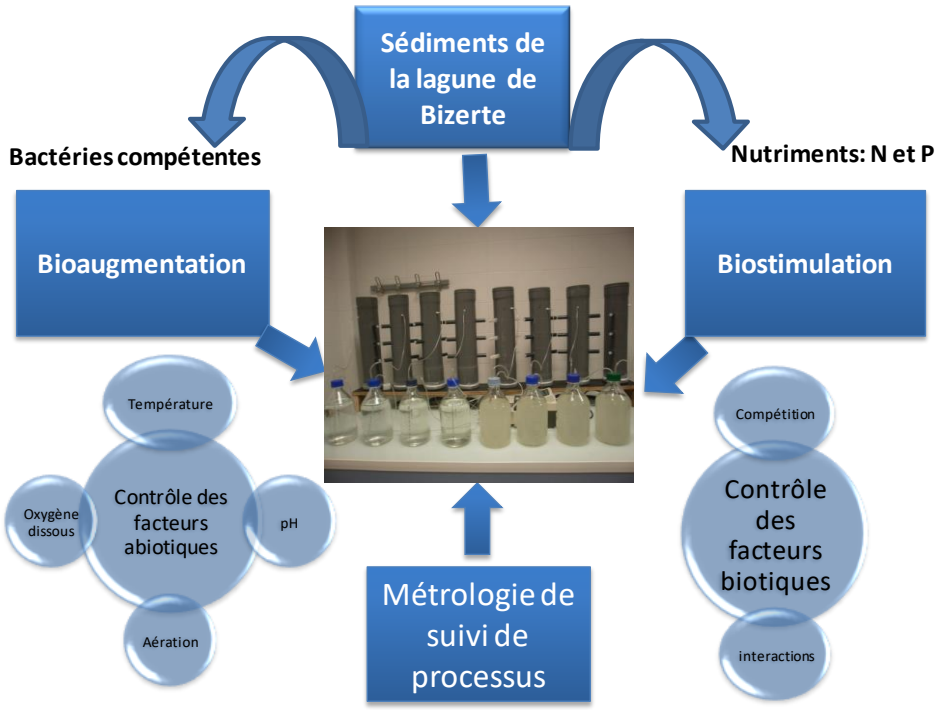


Figure 1: Concept du procédé développé pour le traitement des sédiments de la lagune de Bizerte.

La métrologie du procédé de bioremédiation est effectuée d'une part par la quantification chimique des 16 HAP recommandés par l'agence de protection de l'environnement (EPA), du DDT, du phosphate, de l'azote et d'autre part par des mesures biologiques et écotoxicologiques incluant l'analyse des communautés bactériennes et le suivi de la toxicité des effluents.

CHAPITRE I : EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

Cette étude bibliographique a fait l'objet d'une revue publiée dans le journal « Applied Biotechnology and Biochemistry » (Mansouri et al., 2016)

1. Pollution environnementale; cas du DDT et du BaP

1.1. Le DDT; Définition et cas majeurs de pollution dans le monde

1.1.1. Généralités

Le DDT est le premier insecticide de synthèse qui a été développé et utilisé dans le monde entier depuis les années 1940. Il a été largement utilisé comme un insecticide organochloré pour les cultures agricoles et le contrôle des maladies transmises par des vecteurs, comme le typhus et la malaria (Tren et Bate, 2004, Wurl et Obbard, 2005). En outre, le DDT a été utilisé dans les peintures antisalissures sur les bateaux de pêche (Lin et al., 2009) et dans l'industrie pour sa transformation en Dicofol : un acaricide (Van de Plassche et al., 2002).

L'utilisation du DDT a connu un essor important et la production a atteint des pics de 550,000 tonnes par an en 1970 (ATSDR, 2002; OMS, 1989). Par la suite une prise de conscience des effets néfastes du DDT sur la santé publique a conduit à son interdiction en 1972 par la convention de Stockholm (**Figure 2**) (Mansouri et al., 2016),. Malgré cette interdiction, le DDT demeure la seule stratégie efficace pour lutter contre le paludisme dans des nombreux pays, en particulier ceux d'Afrique, d'Asie, et en Amérique latine. Par conséquent, l'organisation mondiale de la santé a annoncé en 2006 que le DDT peut être encore utilisé pour la lutte contre le paludisme dans ces pays (OMS, 2007).

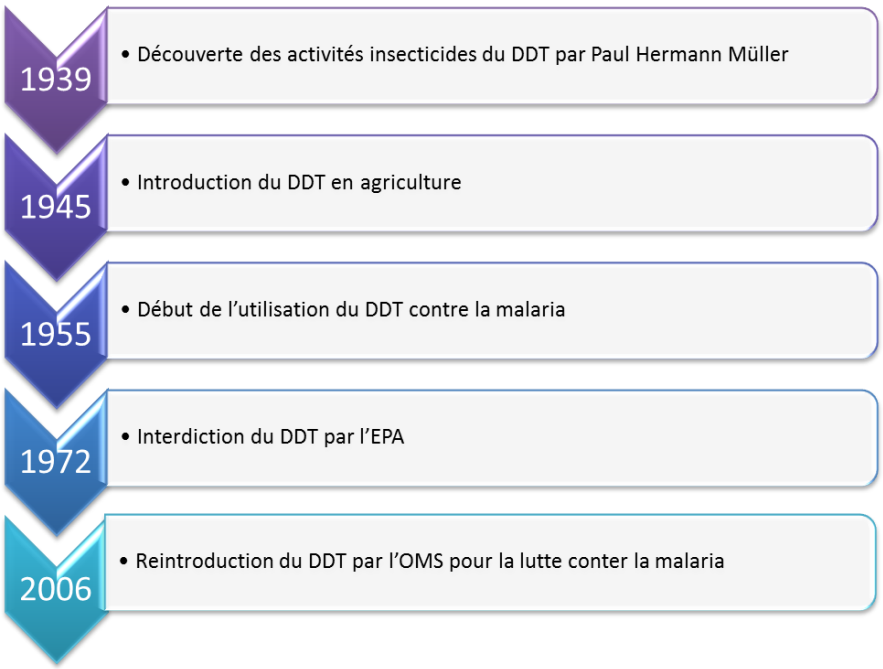


Figure 2 : Évolution de l'utilisation du DDT dans le monde (OMS, 2011)

1.1.2. Pollution environnementale par le DDT

En raison de sa faible solubilité dans l'eau (log Kow DDT= 6,9), le DDT a une forte affinité pour les particules en suspension dans l'eau, qui peuvent servir de chélateur pour ce composé, et notamment promouvoir la stabilité et la résistance à la biodégradation (Sanger et al., 1999).
Selon les conditions d'utilisation, seulement 10 % du DDT utilisé atteignent sa cible biologique, ce qui conduit à une libération importante de ce composé dans l'environnement (Pozo et al., 2006).
Dans l'eau : après le traitement des cultures et des forêts pour lutter contre les insectes, le DDT peut également s'évaporer du sol contaminé dans l'air et peut ensuite être déposé sur les surfaces d'eau. À la suite des cycles d'évaporations et de dépôts, le DDT peut contaminer de nombreux environnements qui n'ont jamais été traités, il atteint les eaux de surface et les eaux souterraines par le ruissellement ou dans certains cas par l'application directe (Pimentel et al., 1980; ATSDR, 1994; Anitescu et Tavlarides, 2006; Eqani et al., 2011). Dans les eaux de surface, le DDT sera adsorbé sur les particules en suspension et par conséquent il peut être déposé dans les sédiments où il peut être absorbé par les poissons.
Aux États-Unis, le DDT a été détecté dans des échantillons d'eau de surface à un niveau médian de 1 ng/L (ATSDR, 1994). Cependant, les plus hauts niveaux de contamination d'eau par le DDT ont été détectés au Nigeria, en Chine et en Inde à des concentrations de 120 ng/L, 250 ng/L et 5794 ng/L respectivement (Grung et al., 2015 ; Mamta et al., 2015; Ogbeide et al., 2015; Yadav et al., 2015).

Bien que le DDT ait été détecté dans l'eau, cette matrice n'est pas la plus appropriée pour surveiller les niveaux de toxicité (ATSDR, 1994), par conséquent la Commission Européenne (Commission européenne, 2010) suggère les sédiments et les organismes vivants comme bonnes matrices pour la surveillance de toxicité.
Dans le sol et les sédiments des résidus de DDT ont été détectés dans différentes régions du monde, y compris les zones éloignées des activités humaines telles que les régions polaires (Wang et al., 2006 ; Klanova et al., 2008; Zanaroli et al., 2015). En effet, en raison de son utilisation historique, le DDT a été accumulé dans les sols et les sédiments fluviaux, et des concentrations élevées ont été notées allant de 0,0086 à 1600 mg/kg (Cheikh et al., 2002 ; Bakan et Ariman 2004; Kantachote et al., 2004; Villa et Nogueir, 2004 ; Ameur et al., 2011). Cela fait des sédiments une source potentielle de contamination conduisant à la contamination dans les organismes benthiques et la bioamplification du DDT le long de la chaîne alimentaire (Bakan et Arisman, 2004).
Dans le cas des organismes vivants, où le DDT peut s'accumuler et persister longtemps, ce dernier ainsi que ses métabolites (DDE, DDD) peuvent ensuite être transférés à des niveaux trophiques supérieurs par bioamplification (Roberta et al., 2010 ; Deribe et al., 2013 ; Duan et al., 2014). Pour ces raisons, de nombreuses études ont été effectuées pour évaluer la concentration du DDT et ses métabolites dans les écosystèmes aquatiques (Hites, 2004 ; Hale et al., 2009). Les résidus du DDT et de son métabolite DDE ont également été trouvés dans les poissons et les mammifères marins (Masmoudi et al., 2007 ; Ben Ameur et al., 2013). Dans les prédateurs de haut niveau, le DDT a été détecté à des concentrations élevées qui présentent un risque pour la santé humaine, avec des niveaux allant de 3 à 50 ng/g dans différents pays (Binelli et Provini, 2004; Bettinetti et al., 2005; Yang et al., 2006; Zahou et al., 2008).
Tous ces facteurs expliquent les niveaux relativement élevés du DDT et son métabolite DDE dans les tissus adipeux, le plasma sanguin, le foie, le cerveau, le placenta et le lait maternel (Tanabe et al., 1990 ; Kannan et al., 1994; Kiviranta et al., 2002 ; Fitzgerald et al., 2004. Ces concentrations ont été extrapolées pour obtenir une idée de la pollution de l'environnement global par le DDT (**Figure 3**).

L'EPA estime que boire 2 litres d'eau par jour contenant 0,59 ng/L de DDT et consommer 6,5 grammes de poisson par jour (contenant 0,59 ng/L de DDT) serait associé à un risque accru de cancer (EPA, 1980).

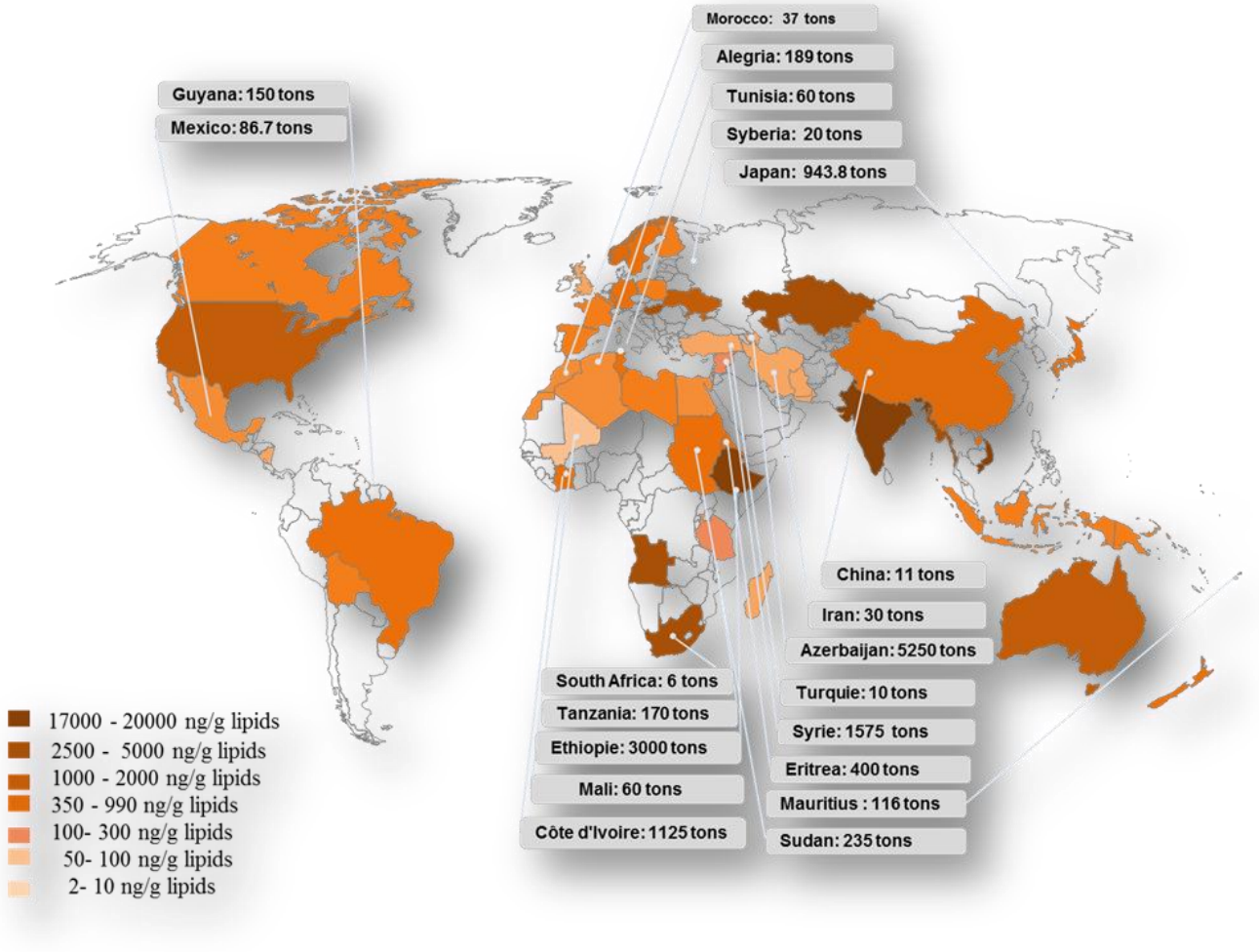


Figure 3: Localisation des principaux réservoirs de DDT dans le monde entier et les concentrations plasmatiques de DDE dans le tissu adipeux humain (Mansouri et al., 2016)

1.2. Le Benzo(a)Pyrène (BaP) : Généralités et pollution environnementale

1.2.1. Le Benzo(a)Pyrène : Définition et sources d'émission

Le Benzo(a)Pyrène (BaP) est l'un des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) de la liste des polluants prioritaires de l'EPA. Les sources de BaP peuvent être naturelles (incendies de forêts) mais sont majoritairement anthropiques dans les zones à forte densité démographiques (Mastral et al., 2000 ; Li et al., 2015). En plus de procédés industriels (Song et al., 2015), les HAP et principalement le BaP sont également générés par d'autres activités anthropiques telles que les émissions des véhicules (Gunawardena et al., 2012), le chauffage résidentiel ... (Adetona et al., 2013; Gunawardena et al., 2014). En parallèle de ces sources, la combustion incomplète de la matière organique reste la principale source de HAP dans l'atmosphère (**Figure 4**).

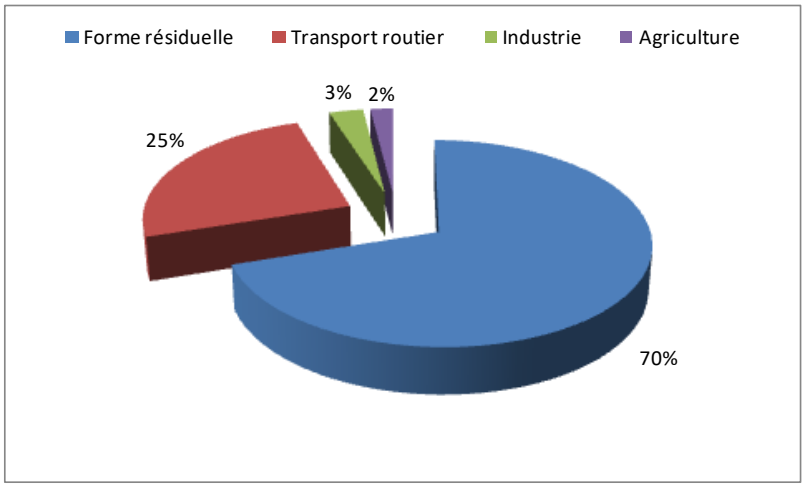


Figure 4: Principales sources d'émissions du BaP (ATSDR, 2002)

Le BaP est connu pour être le premier cancérogène chimique des HAP (Tsai et al., 2007; Wang et al., 2015), il est souvent utilisé comme un HAP modèle en raison de son potentiel génotoxique et de son potentiel récalcitrant à la biodégradation (Gibson et al., 2012). Il a été appliqué pour évaluer le risque cancérogène, mutagène, tératogène et cytotoxique des HAP (Qi et al., 2014). En raison de ses propriétés, le BaP est classé comme cancérogène pour l'Homme par le Centre international de recherche sur le cancer (Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer 2012).

1.2.2. Pollution environnementale par le BaP

La pollution par le BaP est généralement associée à la pollution par les autres HAP, dont leurs taux dans l'environnement ne cessent d'augmenter dû au développement socio-économique rapide. Ces composés sont souvent étudiés en raison de leur impact pour l'écosystème (Saeedi et al., 2012, Lin et al., 2015). La pollution par les HAP et plus précisément le BaP est ubiquitaire, les différents compartiments de l'environnement ont été le lieu d'une contamination. Des niveaux élevés de BaP ont été signalés dans l'eau, les sédiments, le sol et l'air (Wan et al., 2006 ; Wang et al., 2013 ; Zhang et al., 2008a ; Zhang et al., 2004). De part de leur nature hydrophobe (log Kow= 6,13), les HAP s'accumulent dans les sédiments et les sols, en effet ces derniers ont la capacité d'adsorber les polluants organiques et jouent le rôle de réservoir pour ces composés (Meador et al., 1995). Les concentrations de HAP et plus précisément du BaP dans les sédiments peuvent s'accumuler en raison d'un certain nombre de sources, comme les dépôts atmosphériques, des fuites d'hydrocarbures des pétroliers, la production ou transport de pétrole (Yunker et al., 1993 ; Baumard et al., 1998). La concentration de BaP dans les sédiments peut varier de plusieurs ordres de grandeur d'un niveau indétectable jusqu'à plusieurs centaines de mg/kg (Paine et al., 1996 ; Ma et al., 2011; Kumar et al., 2013; Bayat et al., 2015) en fonction de la proximité à l'activité industrielle, mais aussi en fonction de la texture du sol.

Cependant en raison de leurs faibles solubilités, les concentrations de BaP et des HAP dans l'eau sont faibles. Dans certains cas extrêmes, des concentrations élevées de HAP y compris de BaP ont été rapportées dans des nombreux plans d'eau (Schiff et al., 2002), ces concentrations ont dépassé celles rencontrées au niveau du sol et ont atteint 20 mg/L en Chine (Zapata-Perez et al., 2000, Botello et al., 2001, Wu, 2002). En raison de son hydrophobicité, le BaP est résistant à la dégradation microbienne et

peut persister plus que 15 ans dans l'environnement, ce qui provoque un risque de contamination des eaux souterraines (Feng-Peng et al., 2009) et son accumulation le long de la chaine trophique.

Le DTT comme le BaP font partie des substances prioritaires à contrôler dans le cadre de la directive 2008/105/CE du 16 décembre 2008 du Parlement Européen et du conseil, établissant des normes de qualité environnementale (NQE) dans le domaine de l'eau mais également dans le domaine marin.

2. Biodégradation : pré-requis pour élaborer un procédé de bioremédiation de molécules organiques

Toutes les caractéristiques du DDT et de BaP associés à l'accroissement des sites contaminés dans le monde, ont poussé les scientifiques à chercher des solutions pour la remédiation de ces sites contaminés. Plusieurs solutions ont été proposées comme les méthodes de traitement physicochimiques traditionnelles. Ces méthodes ont montré vite leurs limites : des coûts très élevés, relargage des sous-produits plus toxiques que les composés initiaux, destruction de l'environnement. Seul le traitement biologique de ces sites était la solution la plus adaptée et la plus écologique.

2.1. Biodégradation du DDT

Comme le montre le tableau 1, plusieurs espèces de bactéries et de champignons ont été isolées à partir d'habitats distincts : sols, boues activées, eau douce, eau de mer, sédiments (Johnsen, 2013; Mansouri et al., 2016). Ces microorganismes sont dominés par espèces appartenant à la famille des *Pseudomonas*, alors que les champignons appartiennent à différentes espèces et familles (**Tableau 1**).

Tous les micro-organismes impliqués dans la biodégradation du DDT nécessitent la présence d'enzymes qui clivent la liaison carbone-chlore, étape critique de la biodégradation du DDT dans des conditions physiologiques (Häggblom et Bossert, 2003) (**Figure 5**).
Néanmoins, jusqu'à présent et en raison de la toxicité élevée et de la complexité du DDT, seule une dégradation partielle, générant des sous-produits organiques, a été trouvée dans la majorité des microorganismes (**Tableau 1**). Une minéralisation complète a été observée chez les micro-organismes pouvant métaboliser les métabolites intermédiaires du DDT tels que DDE et DDD (**Tableau 1**). C'est le cas de certaines souches bactériennes, comme *Chryseobacterium* sp. PYR2, *Alcaligenes eutropha* A5 et *Pseudomonas acidovorans* M3GY (Nadeau, et al., 1994 ; Hay, et Focht, 2000 ; Qu et al., 2015) qui ont une forte capacité à métaboliser le DDT selon différentes voies métaboliques (**Figure 5**).

Tableau 1: Liste des bactéries et des champignons isolés pour leurs capacités de dégrader le DDT avec les sous-produits finaux et les pourcentages de dégradation de chaque espèce (Mansouri et al., 2016)

	Souches dégradant le DDT	Produits finaux de dégradation	Références
Bactéries	*Aerobacter aerogenes*	DDD	Kuhad et al., 2004
	Aeromonas hydrophila	DDD, DDE, DDMU,DDNU, DBP	Cao et al., 2010
	Alcaligenes eutrophus A5	DDD, DDE, 4-CBA	Nadeau et al., 1994
	Alcalinigenes sp. DG-5	DDD,DDE	Gao et al., 2011
	Alcaligenes sp.	DDD,DDE	Patil et al., 1970
	Arthrobacter sp.	DDA	Kuhad et al., 2004
	Bacillus sp.	DDA	Qu et al., 2015
	Chryseobacterium sp. PYR2	DDD, DDE, DDMU, DDMS, DBP, CBA, CPA	Beunink and Rehm, 1988
	Enterobacter cloacae	DDD, DDM	Yim et al., 2008
	Eubacterium limosum	4-chlorophenylacetate	Aislabie et al., 1997
	Klebsiella pneumonia	DDD, DDE	Hay and Focht, 1988
	Pseudomonas acidovorans M3GY	4-CBA, 4-CPA	Golovleva et al., 1982
	Pseudomonas aeruginosa	DDD	Santracruz et al., 2005
	Pseudomonas fluorescens	DDD, DDE	Pfaender and Alexander , 1972
	Pseudomonas putida	DDD, DDMS, DBP	Hua et al., 2010
	Pseudomonas sp.	DDD, DDE	Wang et al., 2010
	Pseudoxanthomonas sp.	NA	Bajaj et al., 2014
	Rohodococcus sp. Strain IITR03	DDD,DDE, DDNU	Bidlan and Manonmani, 2002
	Serratia marcescens DT-1P	NA	Fang et al., 2010
	Sphingobacterium sp.	DDD,DDE, DDMU, DDNS,DDA,DBP	Mwangi et al., 2010
	Staphylococcus sp.	DDD	Li et al., 2008
	Stenotrophomonas sp. DDT-1	DDD,DDE, DDMU, DDNU,DDOH, DDA, DDM	Patil et al., 1970
	Trichoderma viridae	DDE	Patil et al., 1970
Champignons	*Aspergillus niger*	DDD, DDM	Subba-Rhao et al., 1985
	Aspergillus sydowi Ce15 *	DDM	Ortega et al., 2011
	Aspergillus sydowii Ce19 *	DBP	Ortega et al., 2011
	Bionectria sp. Ce5 *	DDM, DBP	Ortega et al., 2011
	Boletus eduli +	DDD, DBP	Yi et al., 2007
	Cladosporium sp. AJR[3] 18501	DDD	Juhaz and Naidu, 1999
	Daedalea dickinsii	DDD,DDE,DBP	Purnomo et al., 2008, 2010
	Fomitopsis pinicola	DDD,DDE,DBP	Purnomo et al., 2008, 2010
	Fusarium moniliforme ¤	DDD, DBP	Gita et Anupriya, 2010
	Fusarium oxysporum ¤	DDD, DBP	Gita et Anupriya, 2010
	Fusarium solani	DDD,DDE, DDOH, DBP	Mitra et al., 2001
	Gloeophyllum trabeum	DDT,DDE,DBP	Purnomo et al., 2008
	Gomphidius viscidus +	DDD, DBP	Yi et al., 2007
	Glomus etunicatum	DDD, DBP	Wu et al., 2008
	Penicillium miczynskii *	DDD	Ortega et al., 2011
	Penicillium raistrickii *	DDD	Ortega et al., 2011
	Phanerochaete chrysosporium	DDD, DBP	Bumpus et Host, 1987
	Phlebia brevispora	DDD,DDA, DBP, DBH	Xiao et al., 2011
	Phlebia lindtneri	DDD,DDA, DBP, DBH	Xiao et al., 2011
	Laccaria bicolor +	DDD, DBP	Yi et al., 2007
	Leccinum scabrum +	DDD, DBP	Yi et al., 2007
	Nectriam ariannaeae *	NA	Ortega et al., 2011
	Trichoderma sp. *	NA	Ortega et al., 2011
	Xerocomus chrysenteron	DDD, DDE, DBP	Huang et Wang, 2013

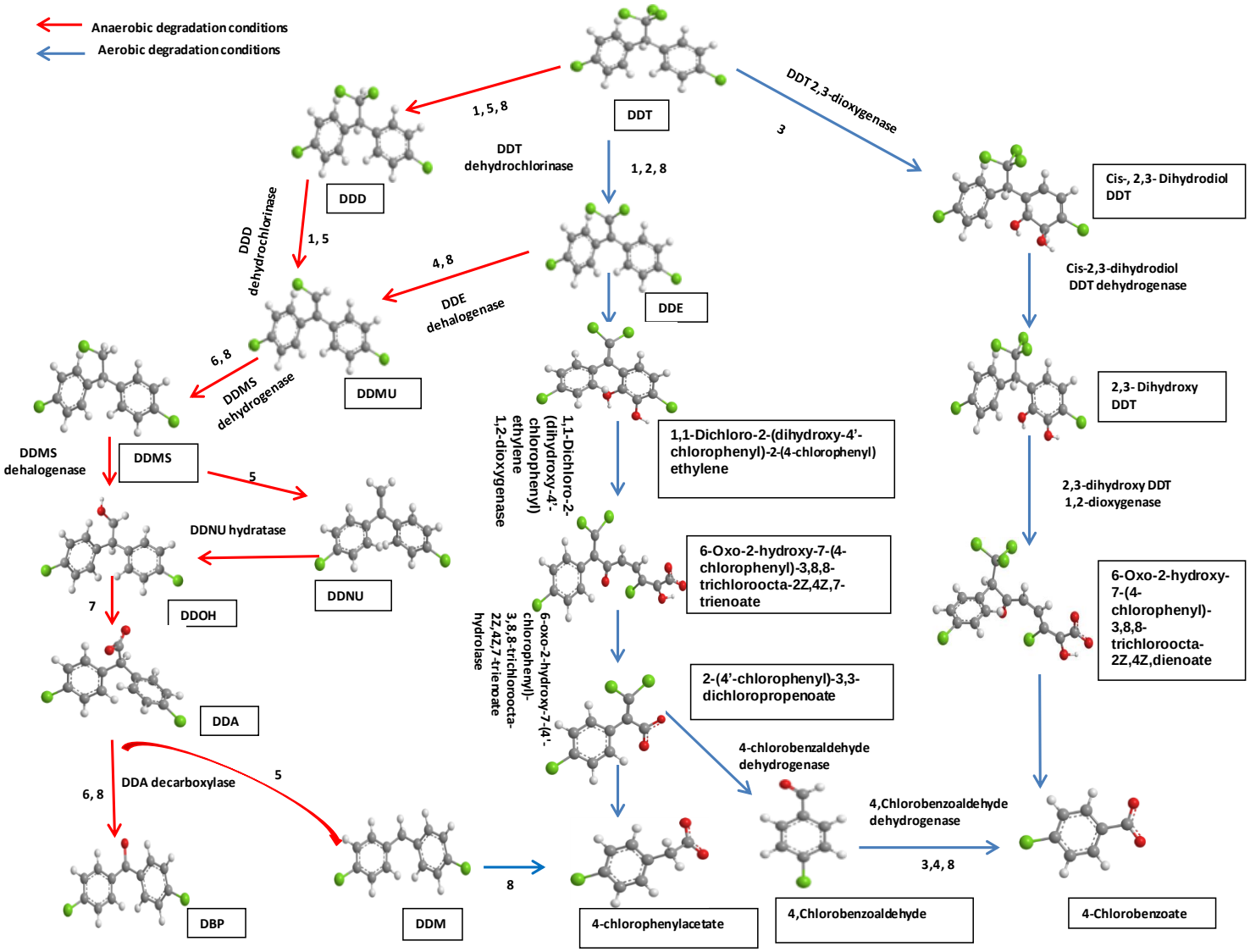


Figure 5: Schéma de la biodégradation du DDT en aérobiose (bleue) et en anaérobiose (rouge) (Mansouri et al., 2016).

Atomes blancs: hydrogen, atomes rouges: oxygène, atomes verts: chlore, atomes gris: carbone.
DDT 1,1,1-dichlorodiphenyl trichloroethane; DDE 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethylene;DDD 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane; DDMU 1-chloro-2-2-bis-(4'-chlorophenyl) ethylene; DDMS 1-chloro-2,2-bis(4'-chlorophenyl) ethane; DDNU 1,1-bis(4-chlorophenyl) ethylene; DDOH 2,2-bis(4'-chlorophenyl) ethanol; DDA 2,2-bis(p-chlorophenyl) acetate; DBP 4,4'-dichlorobenzophenone; DDM bis(4'-chlorophenyl)methane. 1: *Proteus vulgaris*, 2: *Klebsiella pneumoniae*, 3: *Ralstonia eutropha*A5, 4: *Pseudomonas acidovorans*M3GY, 5: *Aeromonas hydrophila*, 6: *Pseudomonas putida*, 7: *Bacillus* sp., 8: *Chryseobacterium*sp.PYR2

2.2. Biodégradation du BaP

La biodégradation des HAP (BaP compris) peut s'effectuer aussi bien en anaérobiose qu'en aérobiose (Cerniglia, 1993). La dégradation microbienne est le principal mécanisme pour la restauration écologique des sites contaminés par les HAP. Pour cette raison, la biodégradation du BaP par divers types de micro-organisme a été rapportée dans la **figure 6**. En outre, les études relatives à la dégradation du BaP par les algues sont rares par rapport à celles menée à l'aide de bactéries et des champignons (Juhasz et Naidu, 2000 ; Samanta et al., 2002).

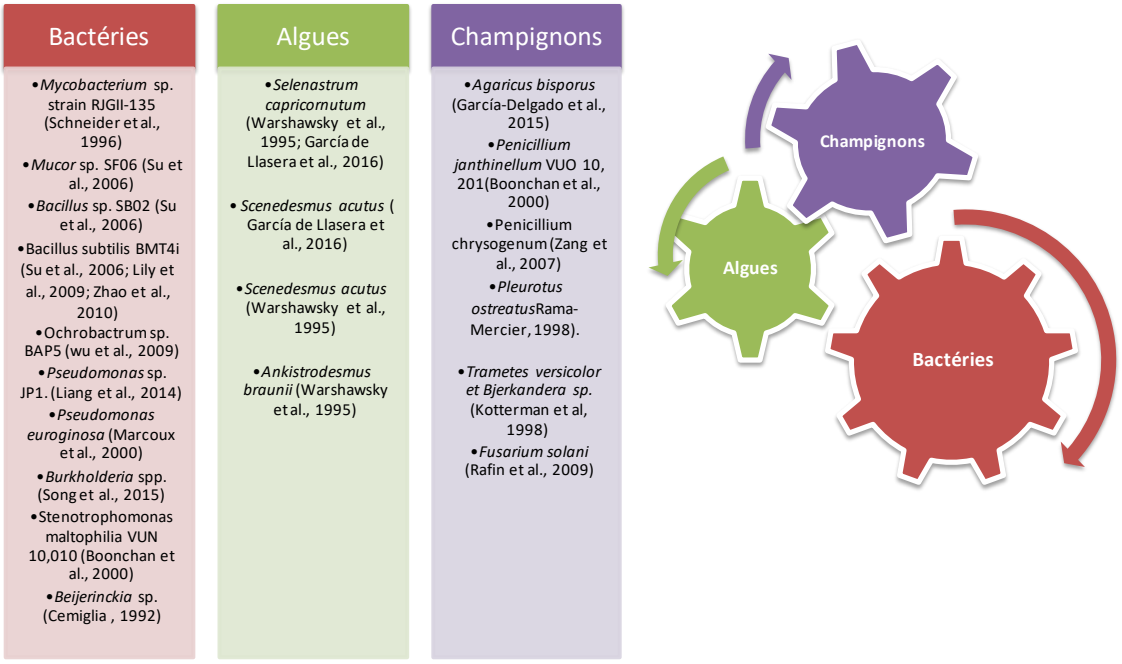


Figure 6: Biodégradation du BaP par quelques espèces de bactéries, de champignons et d'algues.

La **figure 7** démontre les différentes voies métaboliques proposées pour la dégradation du BaP. Ces voies sont différentes mais elles ont en commun l'augmentation de la quantité de CO_2 libérée en parallèle avec l'avancement de la biodégradation (Rentz et al., 2000 ; Moody et al., 2004 ; Seo et al., 2009).
Cette biodégradation s'effectue grâce à l'activation des enzymes clés : les dioxygénases et les monooxygénases (Butler et Manson, 1996) principalement en deux étapes :

- ✓ L'activation du cycle aromatique par hydroxylation pour former un catéchol.
- ✓ Le clivage du cycle activé.

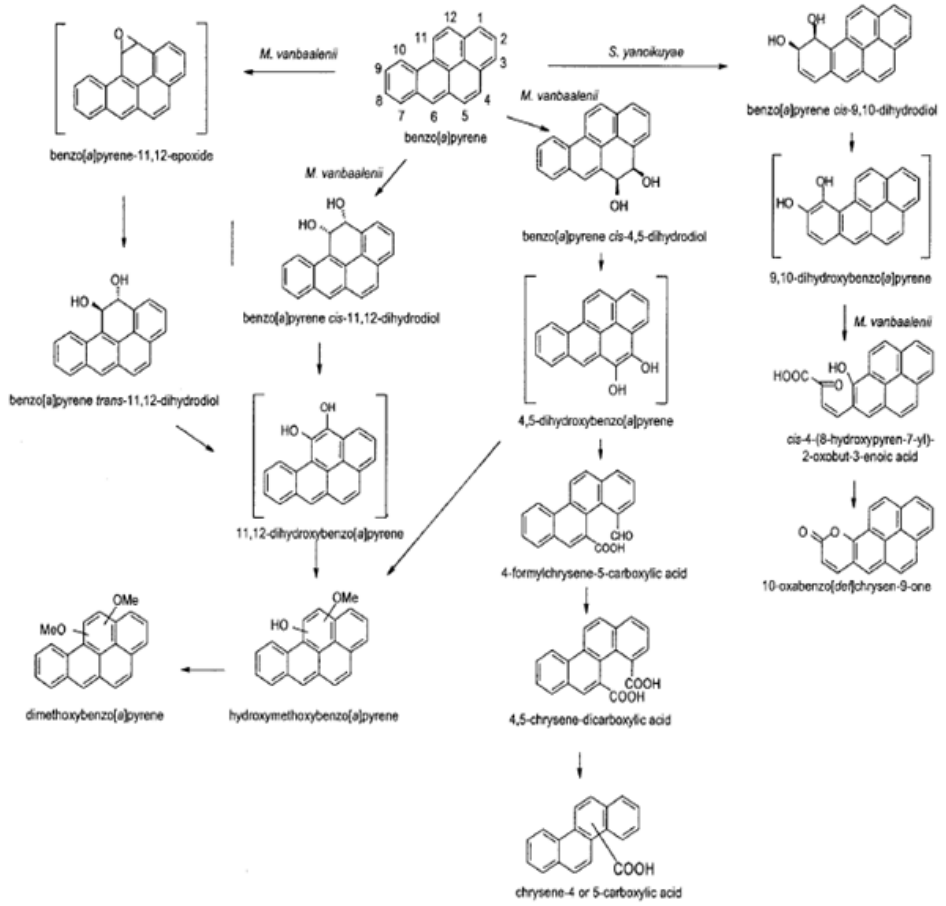


Figure 7: voie proposée pour la biodégradation du BaP par *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Moody et al., 2004).

3. Procédés de bioremédiation des sites pollués par le DDT et le BaP

La compréhension des processus et les voies de biodégradation des contaminants fourniront de nouveaux outils pour évaluer l'efficacité de la bioremédiation et permettra de prédire le succès de la biorestauration réduisant ainsi les incertitudes qui sont toujours le principal inconvénient de cette biotechnologie environnementale.

Cette technique a été largement étudiée pour plusieurs contaminants (Sturman et al., 1995 ; Hughes et al., 1997; Calvo et al., 2009). Dans le cadre de notre étude on ne s'intéresse qu'à l'étude des procédés de bioremédiation du DDT et du BaP.

3.1. Élaboration du procédé à l'échelle de laboratoire

Tout procédé de bioremédiation passe par plusieurs étapes avant l'élaboration et l'application *in-situ*. Cependant ces étapes sont nécessaires pour éviter l'échec du procédé une fois appliqué sur le site (**Figure 8**).

Par exemple pour le DDT, les procédés de bioremédiation ont commencé à l'échelle du laboratoire par le traitement d'une faible quantité de sol de l'ordre de 1 et 2 g (DeLorenzo et al., 2001). Par la suite, les quantités traitées ont été plus importantes dans le but d'augmenter la complexité du procédé et de se rapprocher des conditions environnementales. Purnomo et al. 2010, rapportent le traitement d'une dizaine de Kg de sol contaminés dans des bioréacteurs de 200 litres de volume (Purnomo et al., 2010a). Quelques années après, Fan et al., 2013 ont traité des centaines de Kg de sol contaminés par le DDT dans des biopiles.

Une fois le procédé testé au stade laboratoire, il sera appliqué *in-situ*.

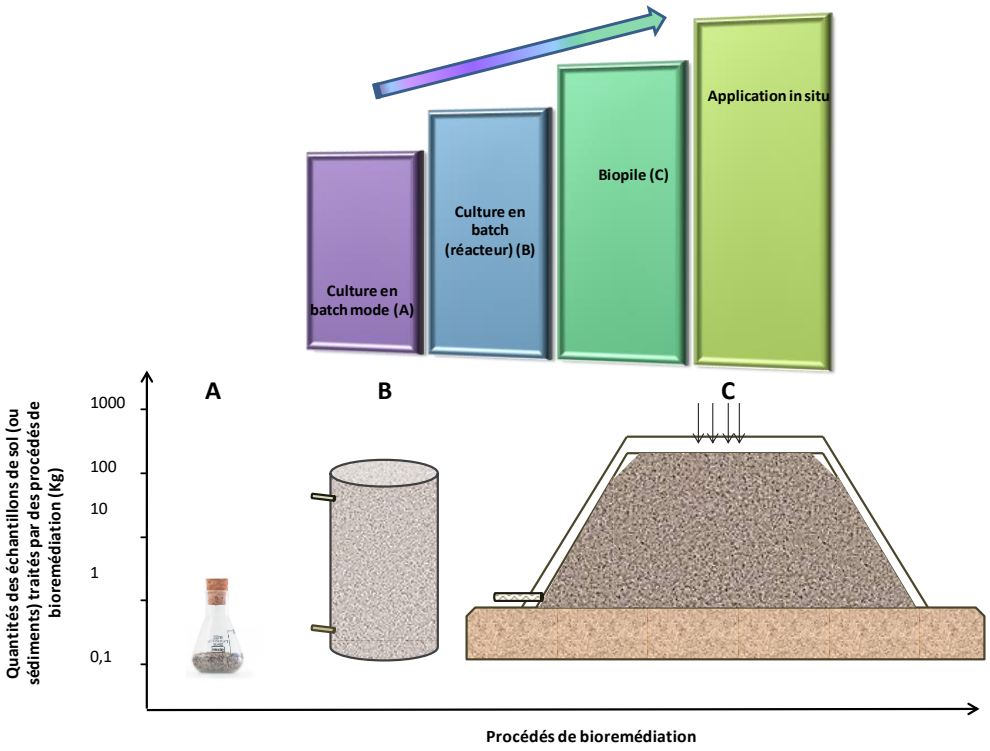


Figure 8: Évolution de procédés de bioremédiation en fonction des quantités traités et de la complexité de procédé

3.2. Application *in-situ*

Généralement les traitements *in-situ* s'imposent dans les cas où les polluants ont pénétré profondément dans l'environnement (les sols, la nappe d'eau, les sédiments …) et si ils sont répartis sur des surfaces importantes, rendant leur élimination trop coûteuse. Ces traitements visent à activer les processus de biodégradation, et à améliorer l'accessibilité des microorganismes aux polluants (Ballerini et al., 1998 ; Reddy and Adams, 2015).

De nombreux environnements contaminés par le DDT, sont plus compliqués à traiter à cause de la distribution hétérogène des polluants dans l'environnement (Mansouri et al., 2016) ; la mise en place d'un procédé de bioremédiation est dans ce cas complexe et non rentable (Sun et al., 2015 ; Pan et al., 2016).

La bioremédiation à grande échelle a été peu appliquée, Fang et al. (2010) l'ont étudié sur un sol contaminé par le DDT par atténuation naturelle. Après 13 semaines de suivi, ils ont constaté un taux de

bioremédiation d'environ 30 % (Fang et al., 2010). Une étude similaire a été menée pour la bioremédiation des sédiments de la baie de San Francisco en 1992 (Anderson et al., 2000).
Concernant les HAP, plusieurs travaux ont été réalisés dans le but de développer une approche pour la bioremédiation *in situ* des HAP, ainsi, les espèces de bactéries d'origine naturelle se sont avérées efficaces pour la dégradation du BaP à l'échelle du terrain (Wilson and Jones, 1993 ; Guerin, 1999 ; Zhu et al., 2016). Dans ce cadre une étude menée par Barr et al. (2006) a montré la bioremédiation d'un sol contaminé par les BaP, en utilisant un andain tournant *in-situ* (Barr, 2006). Après un traitement de six mois sur site ils ont obtenu un taux d'abattement de 80 % à partir d'une concentration initiale de 10.000 mg/kg de BaP (Barr, 2006).
Une autre étude menée par Colon et al. (2010) a montré la potentialité de la bioremédiation des HAP dans le sol lors d'un essai sur le terrain. Au niveau de cette étude, sur une durée de 8 mois, le rendement de bioremédiation des HAP (BaP compris) a été accéléré de 47 % à 83 % par bioaugmentation et biostimulation (Colon et al., 2010). Les résultats de cette étude ont été confortés plus tard par ceux obtenus par Baldan et al., en 2015 qui ont également étudié la bioremédiation d'un sol pollué par des HAP en biopile. Ils ont constaté un taux de bioremédiation de 95 % des HAP totaux sur 500 jours de suivi à partir d'une concentration initiale de 3 g/Kg (Baldan et al., 2015).

3.3. Facteurs d'amélioration de la bioremédiation

Au cours des dernières décennies avec l'accroissement du nombre de sites pollués dans le monde entier, plusieurs essais ont été menées pour améliorer l'activité de biodégradation des microorganismes dans un environnement complexe, avec pour objectif principal l'identification de la combinaison la plus efficace entre : l'amendement de la zone, les facteurs associés et les conditions d'exploitation afin d'atteindre la biodégradation ultime des polluants ou la production de sous-produits non toxiques pour l'environnement (Ballerini et al., 1998 ; Zhu et al., 2016). Ceci prend en compte la biostimulation, la bioaugmentation, ou encore le couplage de l'activité de biodégradation avec des phénomènes physiques tel que le champ magnétique statique.

3.3.1. La biostimulation

Cette technique, utilise souvent des éléments nutritifs, des accepteurs ou des donneurs d'électrons, dans le but de stimuler l'activité des populations microbiennes (Scow and Hicks, 2005, Couto et al., 2010). Dans d'autres cas on va promouvoir un co-métabolisme (De Lorenzo et al., 2008). Cette technique a été utilisée pour une grande variété de xénobiotiques (Riser-Roberts, 1998 ; Kadian et al., 2008 ; Chen et al., 2012) (**Tableau 2**). Dans certaines conditions, même si la population microbienne indigène possède le potentiel pour la bioremédiation des contaminants, les facteurs indispensables à l'activité biologique sont en carence. Dans ces cas, la biostimulation peut améliorer la dégradation des polluants (Cosgrove et al., 2010; Kanissery et al., 2011 ; Chen et al., 2012 ; Adams et al., 2015).

Tableau 2: Utilisation des nutriments organiques et des matériaux bio-transformés en biostimulation pour amender la biodégradation des polluants (source : Ahlem Mansouri, cette thèse)

Famille de polluant	Polluants	Types d'amendements	Effets sur la biodégradation	Effets sur la bioremédiation (%)	Références
Pesticides	Atrazine et Arochlore	Boues d'épuration	La dégradation des a été stimulée	30	Guo et al., 1991 Leoni et al., 1992 Gan et al., 1996
	Atrazine	Cellulose, de la paille, et de compost	L'ajout de matière organique a stimulé l'alkylation dans les sols non adaptés	60,5	Abdelhafid, et al., 2000
	Atrazine	Les fumiers et charbon de bois	C'est le mélange le plus efficace pour la dégradation d'Atrazine	89,5	Mukherjee et al., 2009 Dehghani et al., 2013
	DDT	glucose	Accélération du taux de formation des sous produits (DDE et DDD)	95	Wang et al., 2010
	DDT	lactate et acétate et H_2	Les accepteurs d'électron ont permis la transformation rapide du DDT en sous produits mois toxique tel que le DDMU et le DDNU	87	Gohil et al., 2014
	DDT	NH_4Cl et KH_2PO_4	Accélération de la respiration bactérienne qui se témoigne par une accélération de la transformation du DDT	85,4	Sun et al., 2015
HAP	Hydrocarbures pétroliers brut	Copeaux de bois et de boues d'épuration	Amélioration de la croissance des microorganismes allochtones (bio-dégradeurs)	100	Atagana, 2008
	Hydrocarbures pétroliers raffinés	Peau de banane et compost de champignons	Elimination significative des HAP	92	Abioye et al.,2012
	hydrocarbures pétroliers brut	Fientes de volailles	Elimination significative des HAP	98,92	Chikere et al., 2012
	Carburant hydrocarboné (diesel)	Peau de pomme de terre	Biodégradation importante après stimuler la croissance microbienne	82	Dadrasnia and Agamuthu, 2013
	Pétrole brut d'hydrocarbures de pétrole	Bagasses de canne à sucre	Biodégradation importante	100	Hamzah et al., 2014
	Benzo(a)Pyrène	Matière organique composée	Augmentation de la biodisponibilité aux microorganismes et élimination accéléré du BaP au niveau de sédiment	78	Yan et al., 2014

3.3.2. La bioaugmentation

La bioaugmentation est l'ajout des microorganismes allochtones ou autochtones pour favoriser la biodégradation des polluants par l'introduction de souches ou de consortiums spécifiques compétents en se basant sur leurs capacités métaboliques (Gentry et al., 2004 ; Mrozik and Piotrowska-Seget, 2010). Le procédé de bioaugmentation n'est indispensable que lorsque le milieu pollué ne contient pas des dégradeurs spécifiques ou lorsque la flore indigène ne parvient pas à augmenter ses vitesses de biodégradation (El Fantroussi et Agathos, 2005 ; Adams et al., 2015).

Dans le cas où les micro-organismes ajoutés sont extraits du sol, ils seront acclimatés au contaminant, cultivés *ex-situ* puis réinjectés. La bioaugmentation a fait l'objet de plusieurs études dans la littérature (**Tableau 3**).

D'après le tableau 3, cette technique a permis dans plusieurs cas d'améliorer la biodégradation de certains polluants jusqu'à 100 %, c'est le cas du DDT (Wang et al., 2010) et d'atrazine (Sagarkar et al., 2016).

Tableau 3: Différentes souches bactériennes utilisées en bioaugmentation (source : Ahlem Mansouri, cette thèse)

Biote étudié	Polluant	Microorganismes utilisés	Effet sur la biodégradation (%)		Références
			Sans bioaugmentaion	Avec bioaugmentation	
Sol et sédiment	**DDT**	-*Ulva* sp et *Gelidium* sp	1	80	Kantachote et al., 2004
		-*Pleurotus ostreatus*	2	48	Purnomo et al., 2010
		-*Pseudoxanthomonas Sp.*	3	100	Wang et al., 2010
		-*Gloeophyllum trabeum*	4	64	Purnomo et al., 2011
		-*Phanerochaete chrysosporium*	5	60	Thomas and Gohil, 2011
		-*Flammulina velutipes*	6	66.82	Fan et al., 2013
		-Chryseobacterium sp. PYR2	7	90	Qu et al., 2015
	Atrazine	-Pseudomonas sp. strain ADP	79	87	Shapir et al., 1997; Liam et al., 2009
		-Agrobacterium radiobacter J14a	1	25	Struthers et al., 1998
		-Escherichia coli pAtzA	2	25	Strong et al., 2000
		--Consortium composé de *Agrobacterium* strain J_{14} et *Rhodococcus erythropolis*	12	60	Dehghani et al., 2013
		-Arthrobacter sp. AK-YN10	70	99	Sagarkar et al., 2016
	Phenanthrene	-Arthrobacter RP17			Schwartz et al., 2000
		-Consortium composé de Bacillus sp. ASP1, Pseudomonas sp.ASP2, Stenotrophomonas maltophilia ASP3, Staphylococcus sp. ASP4, Geobacillus sp. ASP5 et Alcaligenes sp. ASP6.	61	94	Patel et al., ,2013
		-Sorghum and Onobrychis			
		-Eisenia fetida	69	85	Baneshi et al., 2014
			42,86	61,83	Asgharnia et al., 2014
Boues activées	-Phenol	-Comamonas sp. RN7(R503)	65	89	Watanabe te al., 2002
	-3-Chloroaniline	-Comamonas testosteroni I2	NA	NA	Boon et al., 2003
	Pentachlorophénol	-Desulfitobacterium frappieri PCP-1	NA	NA	Guiot et al., 2002; Lanthier et al., 2002
	-Phosphorus	-Candidatus Accumulibacter phosphatis	50	63	Dabert et al., 2005
Eau	-Tétrachlorure de carbone	-Pseudomonas stutzeri KC	75	98	Dybas et al., 2002
	-Tert-butyléther de méthyle	-Hydrogenophaga flava ENV735	NA	NA	Streger et al., 2002
	-Chlorobenzènes	-b-proteobacterium souche PM1	NA	NA	Smith et al., 2005
		- Consortium composé de P. putida GJ31, P. aeruginosa RHO1 and P. putida F1DCC	NA	NA	Wenderoth et al., 2003

Il existe plusieurs possibilités pour introduire les souches cultivées de façon exogène : soit seule, soit en consortiums (El Fantroussi et al., 1999; Da Silva et al., 2004; Lanthier et al., 2005 ; Hu et al., 2015). On peut également citer l'addition de gènes de biodégradation via un vecteur (souche bactérienne) (Dejonghe et al., 2001 ; Watanabe et al., 2002; Albert et Tanee, 2017). Dans ce cadre Watanabe et ses collaborateurs ont étudié en 2002, l'augmentation des boues activées avec les gènes cataboliques SSP qui codent pour le phénol hydroxylase de *Comamonas testosteroni*. Ces gènes ont été introduits dans une bactérie indigène, *Comamonas sp.* RN7, qui constitue la population catabolique dominante de la communauté des boues activées. Ce traitement a abouti à une amélioration de la dégradation du phénol de 20 % par rapport à l'échantillon de boue non inoculé (Watanabe et al., 2002). Ceci suggère que cette souche vectrice est un bon candidat pour l'amélioration de la biodégradation du phénol et pourra donc être utilisée *in-situ*. Nous pouvons également citer le travail de Gao et ses collaborateurs, qui ont appliqué la bioaugmentation d'un sol contaminé par le DDT par un plasmide issu de *Sphingobacterium* sp. D-6 (Gao et al., 2015). Le plasmide a été transféré à des bactéries du sol, du genre *Cellulomonas*, pour former des dégradeurs de DDT et accélérer ainsi sa biodégradation. Les résultats suggèrent que l'ensemencement de plasmide de *Sphingobacterium* dans le sol est une méthode de bioaugmentation efficace pour améliorer la biodégradation du DDT (Gao et al., 2015).

Dans certains cas, ces méthodes sont couplées pour obtenir des meilleurs rendements de bioremédiation (Olaniran et al., 2006). L'application de la bioaugmentation sur le terrain a été réalisée dans quelques études (Forsyth et al., 1995 ; Major et al., 2002 ; Silva et al., 2015).

3.3.3. Les champs magnétiques statiques (CMS)

L'électromagnétisme peut affecter les organismes de deux façons différentes, incluant une accélération de la croissance. Cette caractéristique a été utilisée pour l'amélioration de la bioremédiation.
Le rôle de CMS dans la biodégradation des polluants organiques, n'a reçu que relativement peu d'attention (Fojt et al., 2004; Margesin et al., 2005; Hunt et al., 2009). La combinaison de l'effet d'une exposition au CMS avec l'activité de biodégradation de différentes souches bactériennes s'est déjà avérée être une option prometteuse (Čejková et al., 2005) pour l'amélioration du traitement des eaux usées (Ji et al., 2010; Niu et al., 2013) et pour la dépollution des sites fortement pollués (Jirku et al., 2006) (**Tableau 4**). Néanmoins jusqu'à nos jours il n'y a aucune étude réalisée à grande échelle.

Tableau 4: Effet des champs magnétiques sur la biodégradation des composés organiques (Classés par intensité d'induction du champ magnétique exercé).

Pollution étudiée	Induction exercée	Durée de l'induction	Matrice biologique	Effets observées	Effet sur la biodégradation (%)	références
Formaldéhyde	7 mT	29 jours	Boue activée	- Augmentation de la croissance de la biomasse - Augmentation de l'activité déshydrogénase - diminution de la concentration de formaldéhyde - Une diminution de l'écotoxicité de l'effluent de sortie de bioréacteur à la daphnie	80	Lebouska et al., 2010; 2011; 2013
Composés phénoliques	22 mT	14 heures	Boue activée	- Biodégradation deux fois plus rapide par rapport au contrôle - Réduction complète sous l'effet de CM	100	Rao et al., 1997
Eau usée	5- 17 - 50 mT	20 heures	*Escherichia coli* et *Pseudomonas putida*	- Ralentissement de la croissance cellulaire de deux bactéries - Accroissement de l'activité enzymatique (déshydrogénase et β-galactosidase) et de la synthèse de l'ATP - Surexpression du gène *rpoS*	ND	Filipicˇ et al., 2012
Boue activée	10-50 mT	50 jours	Boue activée	- Synthèse de acides gras insaturés ce qui augmente la perméabilité de la membrane - Accélération de l'activité de déshydrogénase	40	Niu et al., 2014
Nitrates	200 mT	4 heures	*Pseudomonas denitrificans*	- Augmentation de la croissance cellulaire - Accélération de la dénitrification	60	Beschkov et al., 2004
Phénol	370 mT	3 jours	*Rhodococcus erythropolis*	- Augmentation de la croissance cellulaire de 28 % et l'activité de respiration de 10 % - Augmentation l'oxydation de phénol	34	Krˇiklavova et al., 2014
Substances organiques	500 mT	60 heures	Eau usée	- Stimulation de la croissance - Stimulation de la biodégradation	39	Ji et al., 2010
Composés organiques	1,13 T	12 heures	Eau usée	- Accroissement de l'activité de la déshydrogénase - Augmentation de la perméabilité membranaire - Augmentation de la dégradation des composés organiques	94,9	Niu et al., 2013

L'exposition humaine à un champ magnétique statique suit une norme internationale qui a été publiée par la Commission Internationale sur la Protection des Radiations Non-Ionisants (ICNIRP, 1994). Pour l'exposition professionnelle, les limites actuelles sont d'éviter essentiellement les sensations de vertige et de nausée induite par le mouvement dans un champ magnétique statique. Les limites recommandées sont pondérées par le temps moyen de 200 mT au cours de la journée de travail pour l'exposition professionnelle, avec une valeur maximale de 2 T. Une limite d'exposition continue de 40 mT est donnée pour le grand public.

4. Métrologie des procédés de bioremédiation

4.1. Caractéristiques d'élaboration d'un procédé de bioremédiation

La métrologie appliquée pour le suivi des procédés de bioremédiation se définit par toutes les opérations de mesure ayant pour but de connaître et de suivre les différents paramètres de dépollution et ses évolutions. Elle intègre toutes les opérations nécessaires à la caractérisation du milieu : l'élaboration de traitements adaptés, la définition d'un mode de prélèvement représentatif du milieu, la définition des méthodes de mesure les plus adaptées au système et l'interprétation des mesures effectuées...
La métrologie appliquée aux traitements des sols et des sédiments est encore peu développée vue la complexité de la matrice qui joue souvent le rôle de réservoir pour les xénobiotiques. Dans cette étude nous allons essayer de combler ce déficit lié à la métrologie. Plusieurs étapes sont nécessaires, en commençant par l'évaluation de l'état de pollution par différents outils (étape 1 : étude de l'état de l'art et de l'historique de la pollution du site étudié par différents outils), puis par l'élaboration du procédé au laboratoire, et enfin son application *in-situ* et son éventuel suivi au cours du temps (**Figure 9**).

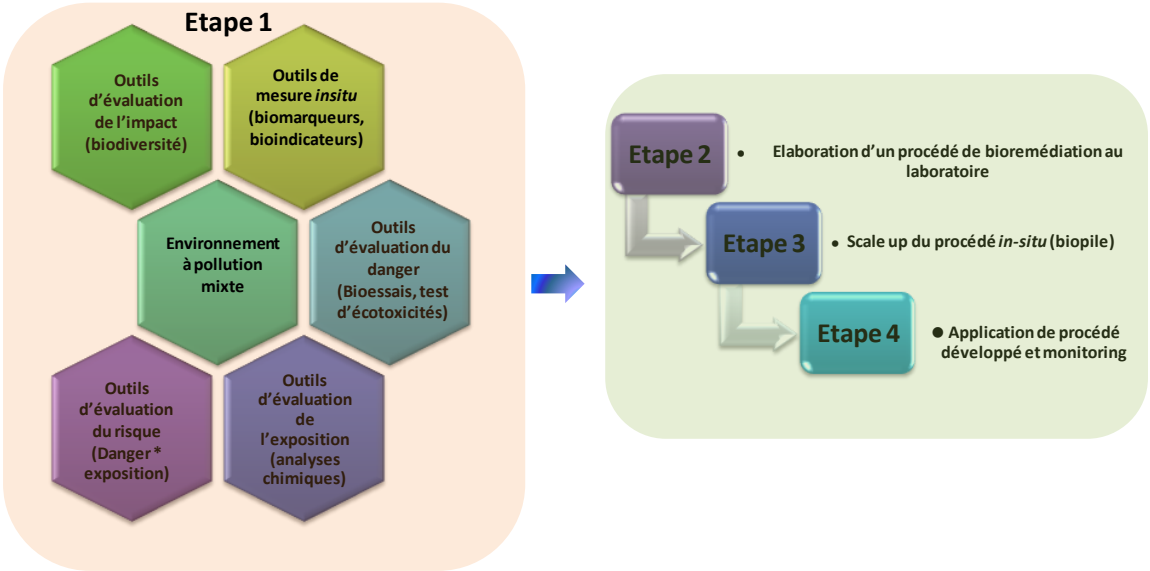


Figure 9: Caractérisation idéale d'un procédé de bioremédiation.

4.2. État de l'art du monitoring du procédé de bioremédiation, cas de la pollution par le DDT.

Afin de gérer les enjeux liés à la présence de substances toxiques et de leurs effets sur le milieu aquatique, il est nécessaire de développer des outils de mesure qui permettent d'évaluer les conséquences de l'opération de bioremédiation sur l'environnement.

Néanmoins, les surveillances (monitoring) effectuées lors des procédés de bioremédiation ne sont pas toujours complets et ne prennent pas en compte les paramètres clés de la bioremédiation comme l'évaluation de la toxicité (**Figure 9**).

Dans le cas du DDT, plusieurs études de bioremédiation ont été réalisées à différentes échelles depuis le laboratoire jusqu'à l'application sur le terrain (**Tableau 5**).

Tableau 5: Résumé des études sur la bioremédiation des sols contaminés par le DDT classé par ordre chronologique (ND: Non disponible)

Matrice (Concentration initiale de DDTs (mg / kg)	Volume traité	Souches utilisées	Méthodes appliquées	Volume du réacteur	Durée de procédé (Efficacité de la biodégradation %)	Métrologie appliquée	Références
Sol contaminé (ND)	10 g	Communauté microbienne autochtone	Flacon discontinu (Batch)	250 mL	6 semaines (24,5)	- Analyse CLHP -L'effet de la teneur en eau du sol sur la biodégradation du DDT au 14C -Estimation du C02 libéré	Boul (1996)
Sol contaminé (82)	400 g	*Phanerochaete Chrysosporum*	Flacon discontinu (Batch)	250 mL	4 semaines (75)	- Analyse GC-ECD du DDT, DDD et DDE - Suivi du CH4 et CO2 libéré	Corona-Cruz et al., 1999
Sol contaminé (5)	10 g	Communauté microbienne autochtone	Flacon discontinu (Batch)	ND	12 semaines (34)	- Analyse GLC - Effet de la bioaugmentation avec *Fusarium solani*	Mitra et al., 2001
Sol contaminé (10)	10 g	*Ulva* sp et *Gelidium* sp	Flacon discontinu (Batch)	150 mL	6 semaines (80)	- Analyse CLHP - Analyse de la communauté microbienne - Effet de taux d'algues ajoutée sur la biodégradation du DDT	Benejam et al., 2010
Sol contaminé (1600)	150 g	Communauté microbienne autochtone	Flacon discontinu (Batch)	2 L	24 heures (50)	- Analyse CG-ECD - Evaluation de l'influence de la concentration de H2O2 sur la dégradation du DDT	Duan et al., 2014
Sol contaminé (32,9)	3 g	Boue granulaire	Flacon discontinu (Batch)	120 mL	8 semaines (75)	- Analyse CG-ECD - Effet de température sur la biodégradation du DDT	Baczynski et al., 2010
Sol contaminé (0,427)	10 m2	Communauté microbienne autochtone	*In-situ*	ND	13 semaines (27,8)	- Analyse CG-ECD - Effet de bioaugmentation avec *Sphingobacterium* sp. - Effet de la température et des sources de carbone supplémentaires sur la biodégradation du DDT	Fang et al., 2010
Sol contaminé (0,25)	2 g	*Pleurotus ostreatus*	Flacon discontinu (Batch)	100 mL	4 semaines (48)	- Analyse CLHP (pour DDT) et CG-SM (pour ses métabolites) - Analyse des activités enzymatiques ligninolytiques - Minéralisation du [U-14C] DDT	Purnomo et al., 2010a
Composé de fumier de bétail avec contamination artificielle par le DDT (0,25)	5 g	Communauté microbienne autochtone	Réacteur de compostage	ND	4 semaines (88)	- Analyse CLHP - Effet de température sur la biodégradation du DDT en compostage - Analyse de la communauté microbienne	Purnomo et al., 2010b
Sol contaminé (4,863)	500 g	Communauté microbienne autochtone	Flacon discontinu (Batch)	ND	4 semaines (28,1)	- Analyse CG-ECD - Effet du cometabolisme avec la laccase extraite de *Panus conchatus* sur la bioremédiation - Examiner les effets de différentes conditions atmosphériques (air, oxygène et azote, pH) sur la biodégradation du DDT	Zhao et Yi, 2010

Suite du tableau

Matrice (Concentration initiale de DDTs (mg / kg)	Volume traité	Souches utilisées	Méthodes appliquées	Volume du réacteur	Durée de procédé (Efficacité de la biodégradation %)	Métrologie appliquée	Références
Sol contaminé (20)	500 g	*Pseudoxanthomonas Sp.*	Flacon discontinu (Batch)	250 mL	3 semaines (100)	- Analyse CLHP	Bajaj et al., 2014
Sol contaminé (0,25)	2 g	*Gloeophyllum trabeum*	Flacon discontinu (Batch)	100 mL	4 semaines (64)	- Analyse CLHP - Effet de l'addition Fe2 + sur la réaction de Fenton	Purnomo et al., 2011
Sol contaminé (22,35)	100 g	Communauté microbienne autochtone bioaugmenté par *Phanerochaete chrysosporium*	Flacon discontinu (Batch)	1 L	3 semaines (60)	- Analyse CG-CD - Effet de la bioaugmentation avec *Phanerochaete chrysosporium* sur la biodégradation des DDT	Thomas et Gohil, 2011
Sol contaminé (ND)	50 g	Boue granulaire	Flacon discontinu (Batch)	120 mL	8 semaines (99)	- Analyse CG-SM - Effet de l'addition de surfactants sur la biodégradation du DDT	Baczynski, 2012
Sol contaminé (4,272)	1 kg	*Flammulina velutipes*	Flacon discontinu (Batch)	100 mL	4 semaines (66,82)	- Analyse CG-SM - Effet de la viatbolisation avec la laccase (sol de 6 U g-1) dans la biodégradation du DDT	Fan et al., 2013
Sol contaminé (82,5)	5 g	Communauté microbienne autochtone	Flacon hermétique	125 mL	7 semaines 67,59	- Analyse CLHP - Effet de l'addition de co-substrates (phénol, hexane et toluène) sur le taux de biodégradation du DDT, DDE et DDD - La production de CO2 - Évaluation des communautés bactériennes - Dégradation des co-substrats volatiles	Ortiz et al., 2013
Sol contaminé (15)	1 Kg	Communauté microbienne autochtone	Flacon discontinu (Batch)	2 L	15 semaines (30)	- Analyse CG-ECD - Analyse par microscopie électronique par transmission . - Suivi du pH et du COT	Schauer et al., 2010
Sol contaminé (12,9)	ND	Communauté microbienne autochtone	Réacteur de compostage aéré	200 L	10 Jours (80,8)	- Analyse CG-ECD - Suivi de la température et de l'O2 - Analyse microbienne	Liang et al., 2014
Sol contaminé (100)	2 kg	Communauté microbienne autochtone	Microcosme	9 L	8 semaines (94)	- Analyse CG-ECD - Analyse microbienne - Effet de la bio-stimulation avec addition de surfactants - Test de toxicité - Propriétés physiques et chimiques du sol - Microscopie électronique à balayage du sol	Betancur-Corredor et al., 2015
Sol contaminé (20)	ND	Communauté microbienne autochtone	Mesocosme	ND	13 semaines (85,4)	- Analyse CG-ECD - Analyse de la diversité microbienne avec qPCR - Effet de la bio-stimulation avec des nutriments et des plantes (*Orychophragmus violaceus*) - Numérisation des abondances de gènes linA	Sun et al., 2015

Les premières études sur la bioremédiation du DDT sont apparues dans les années 90 à petite échelle (Boul et al., 1996) où le monitoring de procédé a été effectué uniquement sur la communauté microbienne et l'analyse chimique (**tableau 5**). Des années plus tard, le processus de traitement des sols pollués au DDT s'est amélioré pour traiter des volumes plus importants jusqu'à 70 kg en mésocosmes (Qu et al. , 2015). Le suivi a également été amélioré par : la mesure de différents facteurs physico-chimiques, l'évaluation du taux de biodégradation du DDT, de la toxicité et des modifications du sol suite au processus de bioremédiation (Betancur-Corredor et al., 2015). Cette dernière étude est la seule à évaluer la toxicité du processus de traitement en utilisant les bactéries luminescentes *Allivibrio fischeri* (**tableau 5**)

alors que le test existe depuis 1960. Ils ont montré une diminution de la toxicité du sol traité par rapport au contrôle (Sun et al., 2015).

Pour apprécier les performances des traitements et de leurs mesures associées, la figure 10 présente huit critères retouvés dans les publications : la concentration initiale de DDT, l'efficacité de traitement, le volume et les microorganismes utilisés, la méthode, la durée de suivi et surtout le monitoring effectué (**Figure 10**).

Globalement, ceci nous amène à classer les procédés de bioremédiation en se basant sur le type de métrologie réalisée en 3 catégories (**Figure 10**) :

- Métrologie de premier niveau : qui prend en compte l'analyse chimique des polluants et quelques analyses microbiologiques de base, cela représente environ 60 % des articles.
- Métrologie de deuxième niveau : plus développée que le premier niveau et qui étudie l'effet de la variation des paramètres physico-chimiques sur le taux de biodégradation des polluants, cela représente environ 40 % des articles.
- Métrologie de troisième niveau ou complète : qui prend en compte le suivi de tous les paramètres clés de la bioremédiation et surtout les analyses toxicologiques.
  D'après la littérature, cette dernière catégorie de métrologie est la plus complexe à réaliser, pour cette raison elle est rare (Mansouri et al., 2016).

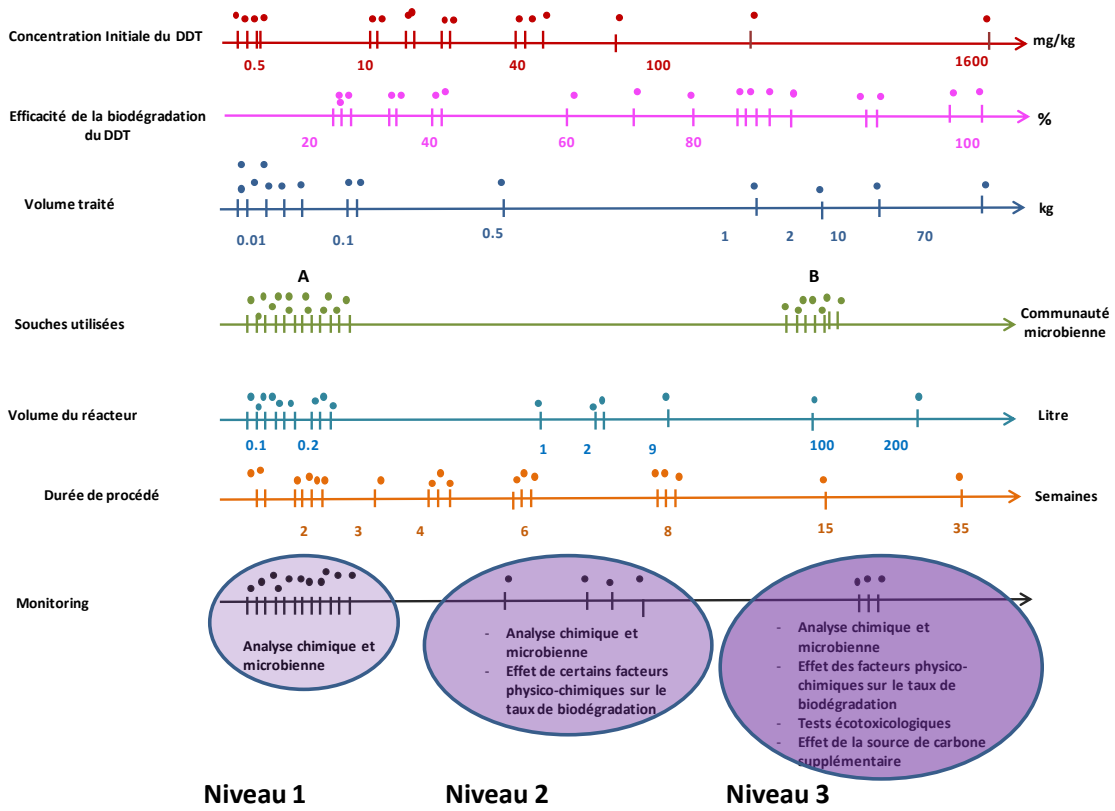


Figure 10: Figure représentant les principales publications sur le processus de bioremédiation pour les sols contaminés au DDT.
(A : communauté microbienne autonome, B : bioaugmentation avec d'autres souches isolées)

4.3. Suivi de la bioremédiation par la métrologie de premier niveau

Au niveau de cette catégorie de métrologie, uniquement des tests préliminaires sont effectués pour le suivi de procédé tel que le dosage des polluants par des méthodes chromatographiques ainsi que des suivis biologiques de la communauté microbienne.
La métrologie de premier niveau, a aussi été effectuée grâce au suivi de l'élimination de Carbone Organique Totale (COT), il a été toujours considéré comme un moyen d'évaluation efficace pour la métrologie chimique de procédé de bioremédiation (Zhang et al., 2012 ; Yan et al., 2016; Yang et al., 2016).

Ce niveau d'analyse a été mené dans certains cas, au moyen de l'étude de l'évolution du profil du consortium bactérien et du dénombrement de la biomasse totale (Scholes et al., 2016 ; Taube et al., 2016). Gryta et al. (2014) ont appliqué un procédé de bioremédiation des boues d'épuration des eaux usées, ils ont constaté que ce type d'environnement pollué est difficile à évaluer et nécessite l'association de plusieurs approches à la fois chimiques et biologiques dont l'analyse par la technologie BIOLOG qui est très sensible aux substances toxiques (Gryta et al., 2014). Aussi, ils ont associé l'analyse CLHP en parallèle avec les analyses BIOLOG pour la métrologie de procédé de bioremédiation des eaux usées (Gryta et al., 2014).

4.4. Suivi de la bioremédiation selon la métrologie de deuxième niveau

Ce type de métrologie est plus développé que le précédent. Les scientifiques ont constaté que le suivi chimique des polluants ainsi que les analyses biologiques utilisées lors de la métrologie de premier niveau, ne sont pas suffisantes pour renseigner sur l'état global du procédé effectué (Heitzer et Sayler, 1993), et surtout ils ne prennent pas en compte l'effet des sous-produits de la biodégradation qui sont dans certains cas plus toxiques que les composés initiaux. Pour ces raisons, des techniques moléculaires complémentaires comme des analyses microbiologiques ainsi que l'effet de la variation des paramètres physico-chimiques sur le taux de biodégradation des polluants ont été suivis.
Dans la littérature, plusieurs techniques moléculaires ont été utilisées pour le contrôle du procédé de bioremédiation et particulièrement le suivi de l'effet de la bioaugmentation (**Tableau 6**) ; tel que l'amplification de l'ARN 16s par PCR (El Fantrousi et al., 1999; Major et al., 2002; Streger et al., 2002; Landvay et al., 2003; Dabert et al., 2005). D'autres ont utilisé la technique FISH pour le suivi de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 au cours d'une expérience de bioaugmentation pour la dégradation de Pentachlorophénol (Guiot et al., 2002; Lanthier et al., 2002 ;Satoh et al., 2003).
Les techniques moléculaires permettent de suivre l'évolution de la structure d'une communauté microbienne durant les bioprocédés (Kaplan et Kitts, 2004).

Tableau 6: Récapitulatif des techniques d'analyses moléculaires du consortium bactérien

Techniques utilisées	Avantages	Inconvénients	Références bibliographiques
T-RFLP	• Très reproductible •Automatisation possible •Plus simple que la RFLP •Possibilité de détection de changement dans la diversité microbienne	•Des erreurs obtenus lors de la PCR peuvent fausser les résultats •Les résultats dépendent de l'éfficacité d'extraction de l'ADN •Choix non précis des amorces universelles et des enzymes de restriction	Kirk et al., 2004 La montagne et al., 2004 Thomassin –Lacroix et al., 2001
DGGE/TGGE	•Rapide et reproductible •Possibilité d'analyser plusieurs échantillons simultanément	•Des erreurs obtenus lors de la PCR peuvent fausser les résultats •Problèmes de co-migration (une bande qui peut représenter plus qu'une espèce) •Les résultats dépendent de l'éfficacité d'extraction de l'ADN	Iwamoto et Nasu, 2001 Kirk et al., 2004 Evans et al., 2004
rep-PCR	•Rapide et reproductible •Bonne résolution	•Des erreurs obtenus lors de la PCR peuvent fausser les résultats •Les résultats dépendent de l'éfficacité d'extraction de l'ADN	Vinuesa et al., 1998 Healy et al., 2005
SSCP	•Rapide et reproductible •Possibilité d'analyser plusieurs échantillons simultanément	•Des erreurs obtenus lors de la PCR peuvent fausser les résultats •Les résultats dépendent de l'éfficacité d'extraction de l'ADN	Zumstein et al., 2000 Kirk et al., 2004
qPCR	•Rapide et reproductible •Possibilité d'analyser plusieurs échantillons simultanément •Détermine le nombre de copies d'un gène dans un mélange complexe •Permet de quantifier le potentiel fonctionnel des microorganismes	•Des erreurs obtenus lors de la PCR peuvent fausser les résultats •Limites de détection élevées	Ding et al., 2010 El Azhariet al., 2008 Peng et al., 2010

4.5. Caractérisation d'une bioremédiation selon la métrologie de troisième niveau

Les procédés de bioremédiation sont habituellement contrôlés selon des instruments chimiques et biologiques conventionnels, qui peuvent être chers mais aussi qui ne fournissent pas une étude complète de procédé. En raison du coût associé aux outils de contrôle traditionnels, l'intérêt change vers l'utilisation des différents tests d'écotoxicité pour compléter la métrologie des procédés de bioremédiation.

Les outils d'évaluation de l'écotoxicité sont les moyens les plus sensibles pour une métrologie complète et efficace des procédés de bioremédiation, ils renseignent sur les niveaux de danger ou même des effets sur le milieu aquatique (Colon et al., 2010). L'objectif de l'écotoxicité est de préciser les modalités et les mécanismes de contamination des divers écosystèmes et de la biosphère par les principales catégories de polluants toxiques.

4.5.1. Principe de l'approche écotoxicologique

L'approche écotoxicologique basée sur les différents tests réalisés soit sur les microorganismes soit sur l'eau ou le sédiment montre les effets d'un tel changement (Shen et al., 2016). Une substance est considérée toxique lorsque les voies physiologiques ou biochimiques des organismes, les organes, les tissus, les cellules où les fragments cellulaires sont perturbés. Les tests d'écotoxicité consistent à établir une relation concentration - effet pour un système biologique donné et un temps d'exposition défini. De plus, il est nécessaire de mettre en évidence les substances, comme certains HAP, qui peuvent affecter le patrimoine génétique. En effet une relation étroite existe entre génotoxicité et cancérogénicité. Les principaux critères de choix des tests pour l'industriel sont la sensibilité de réponse, la faisabilité technique, la normalisation, le temps de réponse ainsi que le coût.
Des bactéries bioluminescentes (naturellement ou génétiquement modifiées) ont été utilisés. Des tests d'inhibition ou d'induction de bioluminescence ont était souvent choisi comme procédé de criblage dans une batterie de tests, en raison de leur rapidité et de leur coût (Girotti et al., 2008 ; Xu et al., 2013).
En effet, l'évaluation écotoxicologique des déchets pétroliers avant et après traitement permet d'observer s'il y a un abattement de la toxicité des polluants (Pagnout et al., 2006), mais aussi de voir si ces déchets traités peuvent être remis dans l'environnement (Hyötyläinen et Oikari, 1998 ; Bispo et al., 1999). Des batteries de tests ont été réalisées afin de contrôler les performances de traitement de déchets et de comparer divers tests commercialisés (Juvonen et al., 2000 ; Van Gestel et al., 2001). Le test le plus couramment utilisé est celui de la diminution de la bioluminescence émise par les bactéries marines. Très souvent, la toxicité diminue après le traitement et les tests sont plus ou moins sensibles selon la nature de la pollution (Durand et al., 2009 ; Jouanneau et al., 2011).

La génotoxicité des procédés de bioremédiation est aussi contrôlée au sein de ce niveau de métrologie, en utilisant le test d'Ames. Il consiste à révéler si une substance est capable d'induire des mutations chez une bactérie *Salmonella typhimurium* porteuse d'une mutation sur l'un des gènes qui gouvernent la synthèse de l'histidine (Maron Et Ames 1983).
Plusieurs souches de *S. typhimurium* de nature génétique différente ont été utilisées dans la littérature notant les souches TA1535, TA1537, TA98, TA100 et TA102. Toutes ces souches sont porteuses de mutations qui permettent de tester des agents mutagènes variés (Wilcox et al., 1990).
C'est une méthode simple, sensible, bien précise et avec un large gamme d'applications, en effet il s'applique également à l'analyse d'effluents industriels, des échantillons environnementaux, d'eau à usage alimentaire, de fumées ou de gaz d'échappement, de rejets biologiques humains pour les individus qui sont en contact avec des produits cancérogènes (Eom et al., 2007 ; Rajput et al., 2010 ; Graillot et al., 2012 ; Parrella et al., 2013 ; Dongmei et al., 2015**;** Josephy et al., 2015; Hebert et al., 2015; Hug et al., 2015 ; Sharif et al., 2015; Yi et al., 2015 ; Kubásek et al., 2016).

4.5.2. Utilisation des tests écotoxicologique pour le monitoring des procédés de bioremédiation

L'évaluation des procédés de bioremédiation est généralement effectuée par une analyse chimique des polluants. Cela ne suffit pas pour évaluer le risque environnemental ni pour évaluer l'efficacité de la technique utilisée. Néanmoins, très peu d'études, ont pu intégrer l'approche écotoxicologique pour compléter le monitoring des procédés de bioremédiation.

Molina-Barahona et al. (2005) ont réalisé un procédé de bioremédiation d'un sol contaminé par les HAP (diesel) en microcosme, le monitoring a été effectué par des méthodes analytiques (par Spectroscopie infrarouge et suivi de production de CO_2), des méthodes biologiques (dénombrement de la biomasse totale). L'écotoxicité a été évaluée directement sur le sol par des bioessais de phytotoxicité et sur nématodes, la toxicité des extraits liquides a été étudiée sur *Daphnia magna*. Les résultats ont montré qu'après traitement il y avait une réduction significative de la phytotoxicité (9 % -15 %) et de la toxicité (3 fois), confirmant ainsi l'efficacité du processus de bioremédiation (Molina-Barahona et al., 2005).

Plus tard, Betancur-Corredor et ses collaborateurs ont effectué le monitoring d'un procédé de bioremédiation d'un sol contaminé par le DDT en utilisant l'approche chimique (analyse par chromatographie gazeuse des polluants ainsi que l'étude des propriétés physico-chimiques du sol), l'approche biologique (par dénombrement de la biomasse totale) et en utilisant les bactéries luminescentes (par exemple *Allivibrio fischeri)*. Ils ont constaté une diminution de la toxicité du sol traité par rapport au contrôle (Betancur-Corredor et al., 2015).

5. Sites d'étude : La lagune de Bizerte

5.1. Présentation générale

La lagune de Bizerte est située au nord-est de la Tunisie à 60 Km de la capitale Tunis, entre 37°8' et 37°14' de latitude Nord et 9°46' et 9°56' de longitude Est (**Figure 11**), elle s'étend sur une superficie totale de 380 surfaces km^2 dont 150 Km^2 de plan d'eau (Souissi, 1981). Cette lagune est reliée en permanence à la mer Méditerranée par un chenal rectiligne de 8,5 km de large et de 13 Km de long, elle communique également avec le lac Ichkeul (110 Km^2) par l'oued Tinja (Zaouali, 1984). L'alimentation hydrique de la lagune s'effectue grâce à l'apport direct des précipitations et grâce à plusieurs ruissellements qui débouchent dans la lagune à partir de lac Ichkeul. Ceci génère une salinité moyenne de 37,65 g/l, et une température moyenne de 14,8 °C (Essid, 2008). Ces dernières valeurs ont augmenté par rapport à celle enregistrée en 2003 par Harzallah, en raison d'aménagements hydrauliques qui ont diminué les apports d'eau douce. Ces installations ont engendré des modifications profondes des caractéristiques hydrologiques de la lagune avec notamment une augmentation de la salinité, mais également une augmentation de la concentration en contaminant (Harzallah, 2003).
Cet écosystème lagunaire est un des plus importants d'un point de vue économique pour la Tunisie, du fait de la pêche (l'exploitation des ressources halieutiques et aquacoles) du tourisme et des exportations (Harzallah, 2003). Pour ces raisons, la lagune a été classée seconde en tant que source de revenus d'exportations des produits agricoles et agroalimentaires (Harzallah, 2003).

5.2. Principales menaces de pollution de la lagune de Bizerte

Malgré cette importance écologique, la lagune de Bizerte est soumise à de nombreuses pressions anthropiques, y compris l'urbanisation (273 000 habitants en 2000 sont concentrés autour de la lagune), les activités agricoles et les activités industrielles. En outre, des nombreuses unités industrielles ont été concentrées dans la ville de Bizerte et ses environs (84 industries), Zarzouna (32 industries), Menzel Abderrahmen (10 industries), Menzel Jemil (71 industries) et Menzel Bourguiba (48 industries) couvrant divers secteurs (métallurgie, cimenterie, agroalimentaire, sidérurgie, textile, raffinerie de pétrole, confection, matériaux de construction, délavage des jeans, huiles et graisses, production de pneus des

pêcheries, traitement des produits de mer…) (DGEQV, 2003), cette activité génère une pollution préoccupante (Bejaoui et al., 2008; Bejaoui et al., 2009 ; Tborbi et al., 2012) (**Figure 11**).

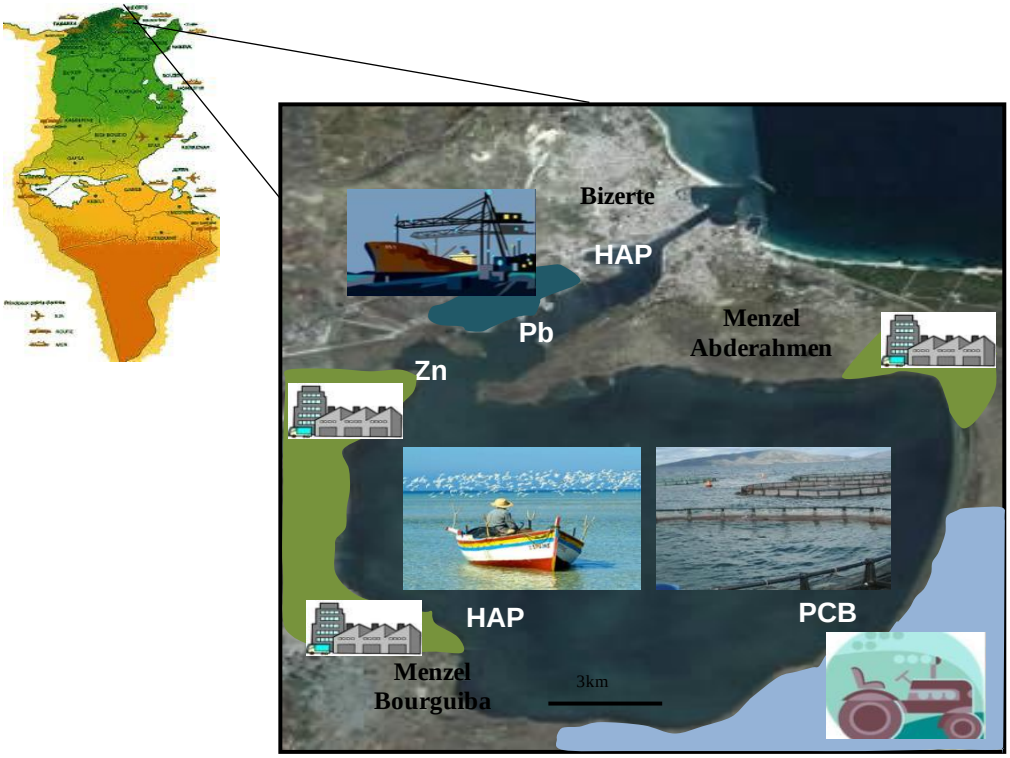


Figure 11: Répartition des types de pollution le long de la lagune de Bizerte.

Les rejets directs et indirects des déchets urbains et industriels ainsi que le ruissellement des produits chimiques, conduisent à la contamination de la lagune par différents composés toxiques (**Tableau 7**) comme des HAP (Trabelsi et Driss., 2005 ; Ennaceur et al., 2009 ; Alves Martins et al., 2015) des pesticides des organochlorés (OCP) (Cheikh et al., 2002), des métaux lourds (Ben Garali et al., 2010 ; Zaaboub et al., 2015) et diverses autres substances toxiques par exemple des organoétains (Lahbib et al., 2009, Abidli et al., 2011). L'accumulation de cette pollution et l'absence de traitement peuvent pour certains composés dépasser les seuils de toxicité préconisés au niveau de l'eau et surtout au niveau du sédiment de la lagune où les polluants sont adsorbés aux particules de sédiments (Yoshida et al., 2002 ; Dellali et al., 2004 ; Trabelsi et Driss, 2005). Cette pollution a tendance à perturber la distribution et la diversité écologique au niveau des milieux aquatiques (Schwarzenbach et al., 2006; Robert, 2012; Lafabrie et al., 2013; Pringault et al., 2015).

Cette pollution est aussi liée à des risques écotoxicologiques et immunologiques importants (Chao et al., 2004; Weisglas- Kuperus et al., 2004), et impliquée dans le développement de cancers (Safi, 2002). Dans ce contexte, des teneurs importantes de polychlorobiphényles (PCB) et de DDT ont été retrouvées à la fois dans le sérum (Ennaceur et Driss, 2010) et dans le lait des femmes de la ville de Bizerte (Ennaceur et al., 2007; Ennaceur et al., 2008; Ben Hassine et al., 2012).

La concentration des xénobiotiques au niveau de la lagune de Bizerte est variée selon l'activité et les rejets enregistrés au niveau du milieu de l'échantillonnage.

Les teneurs les plus élevées en hydrocarbures ont été enregistrées le long du chenal à cause d'une part de la proximité de la cimenterie de Bizerte et d'autre part par le fait que cette zone est située à

l'embouchure du canal reliant la lagune à la mer Méditerranée, lieu où le trafic maritime est important (**Figure 11**).

Il est à noter que généralement des pics de pollution sont fréquemment observés dans les quelques heures qui suivent les épisodes pluvieux (Schulz, 2001; Neumann et al., 2003). C'est pour cette raison que les concentrations mesurées pour toute la lagune en saison estivale sont relativement faibles par rapport à celles trouvées en saison hivernale, ceci peut être expliqué par la croissance et l'activité intense des organismes marins dégradeurs amplifiés au cours de la saison estivale.

Le tableau ci-dessous (tableau 7) présente la variation des concentrations en métaux lourds, HAP et organoétains enregistrées au niveau de l'eau et de sédiments de la lagune de Bizerte prélevée de la zone la plus contaminée entre 2012 et 2014.

Tableau 7: Comparaison de l'évolution des concentrations des contaminants dans les eaux de la lagune et dans les sédiments entre 2012 et 2014. Les concentrations des contaminants dans les sédiments sont exprimées en µg/Kg de poids sec pour les métaux traces, en ng/Kg de poids sec pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Pour les organoétains en ng/kg. Les concentrations des contaminants dans les eaux des stations sont exprimées en µg/L pour tous les éléments (Bdl=au-dessous des seuils de détection des appareils de mesure, Nd= valeur non déterminée)

Contaminants		Eau de la lagune (µg/L)		Sédiment de la lagune (µg/Kg)	
Famille	**Composé**	**2012**	**2014**	**2012**	**2014**
Organoétains	Monobutyltin (MBT)	bdl	nd	bdl	37,60
	Dibutyltin (DBT)	bdl	nd	bdl	16,60
	Tributyltin(TBT)	bdl	nd	bdl	28,50
Métaux	Argent (Ag)	nd	nd	nd	26,84
	Arsenic (As)	bdl	0,84	nd	17,45
	Cadmium (Cd)	0,20	0,03	0,45	0,58
	Cobalt (Co)	nd	0,09	nd	7,13
	Chrome (Cr)	bdl	0,34	nd	84,56
	Cuivre (Cu)	3,70	0,46	31,09	31,04
	Césium (Cs)	nd	nd	nd	3,32
	Mercure (Hg)	0,01	nd	nd	nd
	Nickel (Ni)	0,70	0,52	nd	30,04
	Plomb (Pb)	2,80	0,03	37,09	70,24
	Zinc (Zn)	11,00	1,05	161,59	227,53
	Manganèse (Mn)	nd	4,55	135,93	161,41
	Fer (Fe)	nd	1,04	6896,39	nd
	Vanadium (V)	nd	1,11	nd	95,14
	Rubidium (Rb)	nd	115,25	nd	45,27
	Molybdène (Mo)	nd	nd	nd	3,37
	Etain (Sn)	nd	3,68	nd	3,82
	Antimoin (Sb)	nd	0,17	nd	0,72
	Strontium (Sr)	nd	nd	nd	444,44
	Barium (Ba)	nd	nd	nd	176,44
	Thallium (Tl)	nd	0,01	nd	0,42
	Uranium (U)	nd	4,16		3,18
HAP	Naphtalène (Naph)	Bdl	bdl	0,00	nd
	Acénaphtène (Ace)	bdl	bdl	0,00	nd
	Acénaphtylène (Act)	bdl	bdl	15,25	n.d
	Fluorène (Fl)	Bdl	bdl	13,63	21,00
	Phénanthrène (Phe)	Bdl	bdl	65,30	365,80
	Anthracène (Ant)	Bdl	bdl	4,44	61,90
	Fluoranthène (Ft)	Bdl	bdl	9,25	676,70
	Pyrène (Py)	Bdl	bdl	0,48	695,70
	Benzo(a) anthracène (B(a) an)	Bdl	bdl	28,04	418,90
	Chrysène (Chry)	Bdl	bdl	2,06	259,30
	Benzo(b) fluoranthène (B (b) ft)	Bdl	bdl	1,31	772,30
	Benzo (k) fluoranthène (B(k)ft)	Bdl	bdl	9,43	161,00
	Benzo (a) pyrène (B (a) py)	Bdl	bdl	1,20	536,80
	Dibenzo (a,h) anthracène (Di(a,h) an	Bdl	bdl	0,47	170,00
	Benzo (g,h,i) perylène (B(g,h,i)pe)	Bdl	bdl	2,62	626,50
	Indéno (cd) pyrène (Ind (1,2,3-cd) py)	bdl	bdl	0,00	617,00

Dans le cadre des travaux de cette présente thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une pollution complexe au niveau de la lagune de Bizerte et en analysant plus particulièrement les polluants de la famille des HAP (Benzo(a)Pyrène), un pesticide (le DDT) et les métaux lourds.
La littérature nous indique que le BaP est détecté au niveau de la lagune de Bizerte, à une concentration moyenne de 47,12 ng/g de sédiments, le dosage de DDT et de ses métabolites n'a jamais été réalisé au niveau de sédiments ou de l'eau de la lagune de Bizerte. Toutes les études ont signalé des niveaux de concentration importants de BaP au niveau des organismes marins allant de 23,4 à 134 ng/g de matière sèche (Ben Ameur et al., 2013).

5.3. Étude bibliométrique des travaux de bioremédiation réalisés sur la lagune de Bizerte

Plusieurs travaux se sont intéressés à la lagune de Bizerte, ces études appartiennent à une large gamme de spécialité comprenant l'étude géographique, l'étude de la pollution et de sa répartition (Mzoughi et al., 2002 ; Barhoumi et al., 2014 ; Louiz et al., 2016), ainsi que de son impact sur des indicateurs biologiques (Sahraoui et al., 2009 ; Abdili et al., 2011, Martins et al. , 2015, 2016).
D'autres travaux ont été plutôt orientés vers l'identification des microorganismes dégradeurs des polluants spécifiques continus dans la lagune (Ben Said et al., 2008).

Récemment des études de bioremédiation ont été réalisées sur les sédiments de la lagune de Bizerte, ces études ont évalué l'impact d'une pollution artificielle et ou naturelle sur l'équilibre biologique de cet écosystème. Le monitoring a été effectué par différentes méthodes mais qui n'a jamais pris en compte la toxicité des sédiments après son traitement (**Tableau 8**).

Tableau 8: Répartition des travaux de bioremédiation et de monitoring effectués sur la lagune de Bizerte

Volume de sédiment traité	Méthodes appliquées	Volume du réacteur	Durée de procédé (Efficacité de la biodégradation %)	Métrologie appliquée	Références
200 g	microcosmes	1600 mL	30 jours	- Analyse de la biomasse microbienne - Analyse de la structure de la communauté bactérienne par T-RFLP - Suivi de la consommation d'oxygène des sédiments - Effet de la bioaugmentation avec *Phanerochaete chrysosporium* sur la biodégradation des DDT	Louati et al., 2013
ND	ND	ND	ND	- Analyse des bio-marqueurs de pollution (acétylcholinestérase musculaire, éthoxyresorufine-O-déséthylase hépatique, glutathion-S-transférase, catalase, lipoperoxydation, facteur de condition et indice hepatosomatique chez *Zosterisessor ophiocephalus* - Analyse des polluants par GC	Barhoumi et al., 2014b
200 g	microcosmes	1600 mL	30 jours (96)	- L'abondance et la diversité des nématodes (*Spirinia parasitifera*) - Analyse CLHP des HAP	Louati et al., 2015
200 g	microcosmes	1600 mL	40 jours (82)	-Etude de la structure de la communauté bactérienne à base de gène ARNr 16S - Etude de l'abondance et la diversité de la méiofaune - Effet de la bioaugmentation avec *Acinetobacter sp.* sur la biodégradation de l'anthracène - Suivi de concentration d'anthracène par CG	Said et al., 2015
Etude de terrain	ND	ND	ND	-Les réponses aux biomarqueurs de stress oxydatif, de génotoxicité et d'histopathologie chez *Mugil cephalus* et *Dicentrarchus labrax* exposées à des polluants persistants.	Ameur et al., 2015

Conclusion

Un certain nombre d'études ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité d'un procédé de bioremédiation. Ces procédés s'adressent souvent à des sédiments ou à des sols contaminés, qui n'ont pas les mêmes propriétés physico-chimiques. Par exemple Jørgensen et al. (2000) ont étudié les performances de traitement en biopiles des sédiments contaminés par des hydrocarbures. L'évaluation a été effectuée par l'analyse de la biodégradation, l'activité microbienne (respirométrie), et la dénitrification. Cependant aucune évaluation écotoxicologique n'a été réalisée.

Dans la plupart des études, il manque soit une évaluation de l'écotoxicité, soit de la mutagénicité, soit une analyse du profil microbien. Il manque également, très souvent, une analyse de consortium bactérien au cours de la biodégradation. Il faut également noter qu'aucune méthode d'évaluation d'un traitement n'est clairement proposée. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail : Proposer une méthode d'évaluation d'un pilote de procédé de bioremédiation de sédiments contaminés par un mélange de polluants organiques et inorganiques (sédiments issus de la lagune de Bizerte). Nous avons donc construit une plate-forme expérimentale afin de simuler les conditions de la lagune de Bizerte. Cette plate-forme a permis d'évaluer le traitement sur un sédiment pollué. Pour cela, nous nous sommes référés aux travaux de Cécile-Noel (2014), pour construire notre plate-forme expérimentale. Cette approche nous servira de point de départ pour notre étude.

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Partie I : Matériel et méthodes utilisés pour l'Isolement et la caractérisation des bactéries.

1. Milieux de culture et produits chimiques

1.1. Milieux de cultures

Au cours de ces travaux deux milieux de culture ont été utilisés avec une spécificité relative aux souches bactériennes utilisées. Le milieu Luria Bertani (LB) et le milieu minéral (M9) qui est riche en oligoéléments, vitamines et sels minéraux (**Tableau 9**).

Tableau 9: Différents composés utilisés pour la préparation des milieux LB et le milieu M9.

Milieu de culture	Composition chimique		Fournisseur	Références
	Composé	Quantité (g/L) d'eau distillée		
Milieu LB	Chlorure de sodium	10	Fluka@	Atlas, 1997
	Tryptone	10		
	Extrait de levure	5		
Milieu minéral M9	$Na_2HPO_4.7H_2O$	12,8	Fluka@	Atlas, 1997
	Phosphate de potassium	3	Merck@	
	Chlorure de sodium	0,5	Fluka@	
	Nitrate d'ammonium	1,5	Aldrich@	
	Sulfate de magnésium	0,5	Merck@	
	chlorure de calcium	0,04	Fluka@	

1.2. Solutions de $MgSO_4$

Le lavage des bactéries avant de lancer les tests de bioremédiation a été effectué à l'aide d'une solution de $MgSO_4$ (Sigma) à 10^{-2} M.

2. Souches bactériennes utilisées

Huit souches bactériennes ont été isolées à partir de l'eau de la lagune de Bizerte pour leur capacité à dégrader le DDT et/ou du BaP (**Tableau 10)**. Ces souches ont subi des tests de toxicité et de biodégradation pour choisir les plus compétentes pour la dégradation du mélange DDT+ BaP+métaux lourds.

Trois autres souches de références, ont été commandées de chez DSMZ. Ces souches témoins sont connues pour leur capacité à dégrader différents polluants (**Tableau 10**).

Tableau 10: Distribution des souches bactériennes utilisées

Souches bactériennes	Milieu de culture	Conditions de culture	Utilisation	Références
Pseudomonas stutzeri LBR	LB	30 °C, 250 rpm	-Utilisée comme dégradeur du DDT et du BaP -Utilisé lors des tests de toxicité	Cette thèse
Cupriavidus metallidurans LBJ	LB	30 °C, 250 rpm	-Utilisée comme dégradeur du DDT et du BaP -Utilisé lors des tests de toxicité	Cette thèse
Rhodococcus equi LBB	LB	30 °C, 250 rpm	-Utilisée comme dégradeur du DDT et du BaP -Utilisé lors des tests de toxicité	Cette thèse
Pseudomonas pachastrellae	LB	30 °C, 250 rpm	-Utilisée comme dégradeur du DDT -Utilisé lors des tests de toxicité	Cette thèse
Microbacterium maritipicum CB7	LB	30 °C, 250 rpm	-Utilisée comme dégradeur du BaP -Utilisé lors des tests de toxicité	Cette thèse
Microbacterium hydrocarbonoxydans	LB	37 °C, 250 rpm	-Utilisée comme dégradeur du BaP -Utilisé lors des tests de toxicité	Cette thèse
Microbacterium sp.	LB	30 °C, 250 rpm	-Utilisée comme dégradeur du DDT -Utilisé lors des tests de toxicité	Cette thèse
Acinetobacter sp.	LB	30 °C, 250 rpm	-Utilisée comme dégradeur du DDT -Utilisé lors des tests de toxicité	Cette thèse
Pseudomonas stutzeri (6084)	LB	30 °C, 250 rpm	- Utilisées comme des souches de références	DSMZ
Cupriavidus metallidurans CH3 (2839)	LB	30 °C, 250 rpm	- Utilisées comme des souches de références	DSMZ
Rhodococcus equi (43950)	LB	30 °C, 250 rpm	- Utilisées comme des souches de références	DSMZ

3. Isolement des souches dégradant le BaP et /ou le DDT de la lagune de Bizerte

L'isolement et la sélection des bactéries dégradant le BaP et/ou le DDT ont été réalisés à partir 2 mL d'eau de mer. 20 mL de milieu minimum M9 contenant une concentration finale de 50 ou 100 mg/L de BaP et de 25 ou 50 mg/L de DDT ont été inoculés. La culture a été incubée pendant 21 jours à l'obscurité sous agitation à 250 rpm à 30 °C.

Pour l'isolement des souches pures, des aliquotes de cultures ont été réparties par étalements sur milieu LB et ont été incubées pendant 24 heures à 30 °C.

Par la suite, la purification des colonies a été réalisée par repiquages successifs et les différents types de colonies ont été sélectionnés morphologiquement (forme, couleur et apparence).

Les souches bactériennes pures ont été cultivées dans un milieu M9 additionné de BaP et/ou de DDT aux concentrations indiquées pour étudier leurs capacités potentielles à dégrader ces polluants.

Les isolats ont été identifiés par des tests microbiologiques de routine (coloration GRAM, galerie API, tests oxydase, catalase, coagulase…) et par un séquençage du gène codant la sous unité 16S du ribosome.

Concernant l'identification phylogénétique des isolats, les séquences ont été comparées à celles présentes dans la banque de données du NCBI en utilisant le logiciel BLAST et elles ont été alignées avec le programme DAMBE (version 5.3.9) (Xia et Xie, 2001).

4. Test de toxicité à la résazurine

Afin d'évaluer la toxicité du BaP, DDT et des métaux lourds seuls ou en mélange, nous avons choisi de mesurer la CI_{50} (concentration du polluant en mg/L induisant 50 % de mortalité bactérienne) pour les différentes souches retenues en présence ou en absence des métaux lourds aux concentrations rencontrées dans la lagune.

Nous avons mesuré la CI_{50} de chaque souche isolée en appliquant le test de toxicité réalisée à l'aide de la résazurine (Creugut et al., 2013). Le principe du test repose sur la propriété de la résazurine non fluorescente à être réduite en résorufine fluorescente par les systèmes d'oxydo-réduction de la cellule viable, ce qui va entrainer un changement de couleur du bleu non fluorescent au rose fluorescent (**Figure 12**).

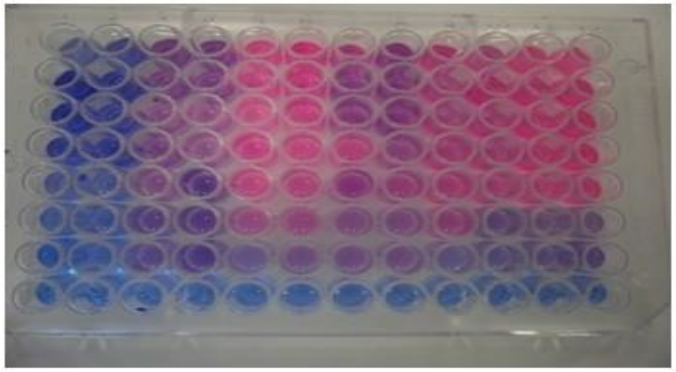


Figure 12: Exemple de plaque à 96 puits utilisée lors des tests de toxicité

D'après le degré de la fluorescence, nous pouvons calculer la concentration inhibitrice CI_{50} pour chaque souche bactérienne et pour chaque polluant ou mélange de polluants.
Après purification de la souche, nous avons ensemencé une plaque de 96 puits contenant la bactérie et la source de carbone (ou le mélange) à tester à différentes concentrations. Durant l'expérience nous avons suivi la respiration bactérienne à l'aide d'un fluorimètre. Le degré de fluorescence est proportionnel à la respiration bactérienne et à la concentration du polluant dans les puits. Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe : pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du composé et donc la déduction de la CI_{50}.
Le pourcentage d'inhibition de la respiration est calculé comme suit:

Pourcentage d'inhibition (%) = 100- [100*Fluorescence échantillon/ Fluorescence échantillon témoin].

5. Test de biodégradation (DBO Trak II)

La méthode respirométrique basée sur la mesure de la Demande Biologique en Oxygène (DBO) permet de quantifier l'oxygène consommé par les bactéries durant la biodégradation des substrats organiques.
Les données de ce test permettent d'appréhender l'activité de biodégradation aérobie des microorganismes au moyen de l'estimation d'un pourcentage de biodégradation (REF : Norme OCDE 301).
Le suivi a été effectué durant 10 jours dans des bouteilles ambrées de 500 mL contenant 420 mL d'échantillon à l'aide d'un BODTrack II (Hach®, Fr). Les essais de biodégradation ont été réalisés avec 10 mg/L de BaP et de DDT maintenu sous agitation constante dans une enceinte thermostatée à (T °C). La détermination du pourcentage de biodégradation est réalisée en utilisant la formule fournie dans la norme OCDE 301.
Chacune des bouteilles est fermée hermétiquement dans le but d'éviter tous changements de pression à l'intérieur de la bouteille de suivi. Lorsque l'oxygène est consommé lors de la dégradation, ceci génère une diminution de la pression d'air située au-dessous de l'échantillon. Cette baisse est proportionnelle avec la DBO et donc avec la biodégradation.
NB : au cours de la biodégradation, il y a une production de CO_2 qui peut interférer avec la mesure, pour cette raison des pastilles d'hydroxyde de potassium sont placées au niveau de chaque couvercle hermétique pour capter et éliminer le CO_2 produit.
Au cours de ce test plusieurs témoins ont été utilisés dans le but d'apprécier la capacité de biodégradation de l'inoculum en présence du mélange DDT+ BaP :

- Témoin biotique constitué de la culture bactérienne ensemencée dans le milieu minéral en absence de toute source de carbone, dans le but d'étudier le niveau de carbone endogène de la souche qui peut masquer le niveau de la biodégradation s'il n'est pas pris en considération.
- Témoin abiotique constitué de milieu minéral ensemencé de DDT et BaP à la même concentration que celle utilisait ultérieurement avec les bactéries.
- Témoin positif constitué de milieu minéral inoculé avec la culture bactérienne et le benzoate de sodium (BNa) comme source de carbone ; cette substance est reconnue comme substance référence facilement biodégradable.
- Témoin biodégradation constitué de milieu minéral ensemencé de la culture bactérienne avec DDT (10 mg/L) et BaP (10 mg/L) comme source de carbone.

L'estimation du pourcentage de biodégradation est calculée selon la formule suivante (Cregut et al., 2013) :

$$\text{Pourcentage de biodégradation} = \left(\frac{\text{Oxygène consommé - ThOD}}{\text{ThOD}} \right)$$

$$\text{Avec : ThOD} = \frac{16\,[2C + 0{,}5\,(h - Cl - 3N) + 3S + (5/2)\,P + 0{,}5\,Na - O]\ \text{mg/mg}}{\text{Poids moléculaire du produit (polluant)}}$$

6. Suivi de la cinétique de biodégradation du DDT et du BaP

Les essais de suivi de cinétique de biodégradation ont été réalisés en présence de 10 mg/L du BaP et de 10 mg/L de DDT et en présence des métaux lourds.
Une culture de nuit dans le milieu LB est lavée 3 fois dans du $MgSO_4$ (10^{-2}M), le culot bactérien est par la suite ré-suspendu dans le milieu minéral qui a servi à ensemencer les nouvelles cultures. Les cultures sont maintenues sous agitation constante 250 rpm et à 28 °C durant 30 jours. Un prélèvement est effectué tous les 3 jours suivi d'une extraction du DDT et du BaP et d'un dosage HPLC-UV selon les conditions suivantes :

- Appareil: Agilent 1100 series HPLC system
- Colonne: Zorbax Eclipse Plus C18 (5µm, 4.6*250mm), Agilent (USA)
- Longueur d'onde: 238 nm
- Débit: 1mL/min
- Volume injecte: 20 µL
- Phase mobile: ACN/H2O avec un gradient comme suit :
    - De 0-5 min 70 % ACN 30 % H_2O
    - De 5-10 min linéaire jusqu´à 100 % ACN
    - De 10-20 min 100 % ACN

7. Essai d'optimisation de la biodégradation du DDT et du BaP par couplage avec un champ magnétique statique

Nous avons étudié l'effet de l'induction par un champ magnétique statique, sur le taux de biodégradation :
- du mélange DDT avec du BaP en présence des trois souches bactériennes (isolées et en consortium) préalablement définies : *Pseudomonas stutzeri* LBR, *Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB (une induction de 200 mT pendant 5 heures). La durée de l'expérience est de 5 jours ou 30 jours.
N.B. 200 mT correspond à la limite d'exposition professionnelle au cours d'une journée de travail recommandée par l'ICNIRP (CNIRP 1994).
- du BaP seulement en présence de *Microbacterium maritypicum* CB7 (plusieurs inductions : 50, 100 et 200 mT, durant 5 jours).
Le montage d'exposition au champ magnétique statique a été mis au point au Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire à la Faculté des Sciences de Bizerte. Il comporte:

- Deux bobines cylindriques espacées de 11 cm, de diamètre d=20 cm et d'épaisseur e =13 cm
- Un électro- aimant (Beaudouin)
- Un générateur de courant délivrant un courant continu (fréquence 50 Hz)
- Un système de réglage de l'induction du champ électromagnétique
- Un système de refroidissement des bobines (pompe à eau)
- Un montage d'incubation de l'inoculum constitué d'une résistance et d'une pompe permettant une circulation d'eau de 30 °C à travers un système de double fiole avec chemise intermédiaire (espace entre la fiole intérieure et la fiole extérieure). La double fiole a été réalisée de manière artisanale par un souffleur de verre.
- Un tesla-mètre numérique est utilisé pour une vérification régulière de l'induction du champ.

NB : la préparation de la culture bactérienne et les extractions sont effectuées avec les mêmes procédures que celles utilisées pour le suivi des cinétiques de biodégradation du DDT et du BaP.

Partie II : Matériel et méthodes utilisés pour la métrologie de procédé de bioremédiation

1. Produits chimiques et Milieux de culture

1.1. Antibiotiques

Pour les solutions d'antibiotiques (ampicilline et gentamicine à 10 % (M/V)), 1 g de chaque antibiotique (sodium Salt, Sigma ®) est ajouté à 10 mL d'eau distillée stérile. La solution est par la suite stérilisée par filtration (0,22 µm, Deutscher®) est répartie dans des tubes Eppendorf ® de 1 mL et conservée à -20 °C durant 3 mois.

1.2. Solution de métaux lourds

Les métaux lourds (Eléments Traces Métalliques ETM) sont utilisés comme témoins positifs pour l'induction des souches bioluminescentes. Des solutions mères concentrées en métaux sont préparées comme indiqué dans le **tableau 11**. Les solutions concentrées ainsi que les dilutions stérilisées par filtration (0,22 µm, Dutscher®) sont conservées dans des bouteilles brunes à 4 °C pendant 3 mois.

Tableau 11: Préparation des solutions mères des métaux lourds

Métal (formule chimique)	MM (g/mol)	Solvant	Masse ajoutée (g/L)	Fournisseur
$Pb(CH_3COOH)_2$, 3 H_2O	379,34	Eau distillée	3,7934	Panreac
$CuSO_4$, 5 H_2O	249,68	Eau distillée	2,4968	Labosi
ZnCl2	136,28	HCl (30 mM)	1,3682	Prolabo
As_2O_3	197,8	NaOH (2M)	1,978	Sigma
$HgCl_2$	271,59	Eau distillée	0,2716	Fluka

1.3. Solution de saccharose et de TPS

Une solution du saccharose (Sigma ®) à 24 % (M/V) (nécessaire pour l'étape de lyophilisation des souches transformées) est préparée dans l'eau distillée et ensuite stérilisée par autoclavage.

La solution de TPS est préparée comme suit : dans un litre d'eau distillée, nous avons ajouté 0,58 g de NaH_2PO_4 (Sigma®), 2,5 g de Na_2HPO_4 (Fluka®) et 8,5 g de NaCl (Fluka®), par la suite le pH est ajusté à 7,4 et la solution est stérilisée par autoclavage.

1.4. Milieux de cultures

Au cours de ces travaux les souches bioluminescentes et les souches utilisées pour le test d'Ames ont été cultivées respectivement dans le milieu acétate et le milieu GM (**Tableau 12**).

Tous les milieux de culture utilisés au cours de ces travaux sont stérilisés par autoclavage.

Tableau 12: Différents composés et milieux de cultures utilisés pour les cultures bactériennes

Milieu de culture	Composition chimique		Fournisseur	Références
	Composé	Quantité (g)/L d'eau distillée		
Milieu acétate	Acétate de sodium trihydrate	2,835	Fluka@	Jouanneau et al., 2011
	Chlorure d'ammonium	0,1919	Merck@	
	Di-potassium hydrogénophosphate	0,028	Merck@	
	Chlorure de sodium	5	Fluka@	
	Extrait de levure	5	Biokar@	
	Tryptone	1	Biokar@	
Milieu GM	-	-	Xenometrix@	Xenomotrix, 2015

2. Souches bactériennes et conservation

2.1. Souches bactériennes utilisées

Au cours de la bioaugmentation des bioréacteurs nous avons utilisés trois souches bactériennes, *Pseudomonas stutzeri* LBR, *Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB, isolées de la lagune de Bizerte. Ces souches ont été choisies pour leurs capacités à dégrader un mélange de polluants (DDT + BaP) et pour leurs résistances aux métaux (voir chapitre précédent).
D'autres souches de références ont été utilisées pour le monitoring du procédé. *Aliivibrio fischeri* et *E.coli* pBtaclux ont permis l'évaluation de la toxicité globale des effluents du sédiment traité. L'évaluation de la génotoxicité a été effectuée grâce aux souches développées par Ames (*Salmonella thyphimirium* TA98, TA100, TA1535 et TA1537, (Maron and Ames, 1983)). Enfin cinq souches d'*E. coli* transformées ont été utilisées pour l'évaluation semi-quantitative des métaux et du tributylétain (TBT) disponibles **(Tableau 13).**

Tableau 13: Distribution des souches bactériennes utilisées pour les différents tests

Souches bactériennes	Milieu de culture	Conditions de culture	Utilisation	Références
Pseudomonas stutzeri LBR	LB	30 °C, 250 rpm	-Utilisée comme dégradeur en bioaugmentation -Evaluer la toxicité globale	Cette thèse
Cupriavidus metallidurans LBJ	LB	30 °C, 250 rpm	- Utilisée comme dégradeur en bioaugmentation -Evaluer la toxicité globale	Cette thèse
Rhodococcus equi LBB	LB	30 °C, 250 rpm	- Utilisée comme dégradeur en bioaugmentation -Evaluer la toxicité globale	Cette thèse
Aliivibrio fischeri	LB	30 °C, 250 rpm	Tests de toxicité globale : Microtox	Mamindy-Pajany et al., 2011
E.coli pBtaclux	Milieu acétate	30 °C, 250 rpm	Tests de toxicité globale	Charrier et al., 2006
Salmonella thyphimirium (TA98, TA100, TA1535 et TA1537)	Milieu GM	37 °C, 250 rpm	Tests de mutagénicité	Wilcox et al., 1990
E.coli DH1 pBZntlux, pBArslux, pBCoplux, pBMerlux et *E.coli* DH1 TBT	Milieu acétate	30 °C, 250 rpm	Évaluation semi-quantitative des métaux et du TBT disponibles	Durand et al., 2003 ; Jouanneau et al., 2011

2.2. Conservation des souches par lyophilisation en microplaques

Pour la lyophilisation des souches transformées, ces dernières sont remises en culture à 30 °C sous une agitation de 250 rpm à A 260 nm = 0,1. Lorsque l'absorbance mesurée à 620 nm correspond au maximum d'émission de la bioluminescence de chacune des souches, 16 mL de chaque suspension bactérienne sont centrifugés dans des tubes Falcon® de 50 mL à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C. Les culots bactériens sont repris dans un mélange de 5 mL du milieu LB et 5 mL du saccharose 24 % (50/50) préalablement filtré et refroidis.
Les suspensions bactériennes diluées sont ensuite réparties dans les puits des microplaques (MicroWell® plate, Nunc) (100 µL de suspension par puits) et placées à -80 °C pendant 3 heures avant d'être lyophilisées à -50 °C sous une pression de 0,05 mbar durant 36 heures (Christ, Alpha 1-2). Les microplaques lyophilisées sont par la suite fermées hermétiquement avec un film autocollant en polyéthylène transparent (Deutscher, référence 106524) et conservées à -20 °C jusqu'à utilisation.

3. Analyses chimiques

3.1. Caractérisation du sédiment traité

Plusieurs analyses ont été effectuées pour caractériser le sédiment traité :

3.1.1. Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO initiale de sédiments a été déterminée grâce à un kit de DCO (0-1500 ppm, Hach-Lange ®). 5 g de sédiments ont été homogénéisés dans 50 ml d'eau, suivi d'une incubation dans un bain d'ultrason (15 min). Le sédiment est par la suite centrifugé à 6000 rpm (centrifugeuse Awel MF20R ; rotor AMF 20-8) pendant 10 min, la DCO est évaluée sur le surnagent. La mesure a été effectuée en suivant les recommandations du fournisseur: 2 mL d'effluent sont ajoutés dans des tubes à DCO, puis incubés pendant deux heures à 150 °C avant de procéder à la lecture de la DO par le spectrophotomètre HACH® à 620 nm.

3.1.2. Suivi des concentrations d'azote (N) et du phosphate (P)

La détermination des concentrations de N et du P a été effectuée à l'instant initial et tous les 10 jours tout au long du procédé de bioremédiation à partir de 5 g de sédiments.
Les analyses sont faites sur des extraits aqueux issus de la même extraction que pour la DCO (paragraphe 3.1.1). Les analyses ont été effectuées avec le Kit (27425-45) HACH® pour le phosphate et avec le kit (26053-45) HACH® pour l'azote. La lecture se fait avec le spectrophotomètre HACH® à 620 nm.

3.1.3. Suivi de l'oxygène dissous et du pH

La concentration de l'oxygène dissous et la mesure du pH ont été suivis, au niveau de tous les bioréacteurs, tous les 10 jours durant le procédé de dépollution à l'aide d'une sonde de mesure HQ40D

(HACH ®). Les mesures effectuées prennent en considération tous les bioréacteurs, elles ont été effectuées à trois hauteurs différentes: porte 1 (à 15 cm), porte 2 (à 25 cm) et porte 3 (à 35 cm).

3.1.4. Mesure du carbone organique total dissous

Les mesures ont été effectuées avec le TOC-mètre (TOC-Vcsn, Shimadzu) qui permet de mesurer le carbone sous ses différentes formes. Pour cela, 5 mL d'effluent à analyser ont été prélevés (tous les 3 jours durant les 3 mois de suivi), puis mis dans des tubes falcons® stériles. Les bouchons de ces derniers ont été perforés à deux endroits. La première ouverture permet de faire entrer le capillaire du TOC-mètre, tandis que la seconde permet de faire rentrer l'air au moment de l'aspiration et donc de faire le prélèvement pour effectuer la mesure autonomique.

3.2. Dosage des polluants organiques cibles (DDT, BaP et d'autres HAP)

Tous les 10 jours, 10 g de sédiment ont été prélevés de chaque bioréacteur, les prélèvements ont été effectués à 3 hauteurs différentes des bioréacteurs (à 10, 25 et 40 cm) puis homogénéisés par agitation (250 rpm) pendant 10 min. Les polluants contenus dans les sédiments sont extraits à l'aide de 100 mL de dichlorométhane dans un bain à ultrasons (15 min), suivi d'une étape de séparation de deux phases (aqueuse et organique). L'extrait (la phase organique) est ensuite séché au rotavapor à 800 mbar et à 40 °C ; température d'évaporation du dichlorométhane. L'extrait séché est finalement récupéré dans 1 mL de méthanol Sigma Aldrich® (99 %) et stocké à 4 °C dans des vials en verre ambrés et bouchés par un septum en téflon pour l'analyse chimique.

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'une chromatographie liquide haute performance Ultimate 3000 (Thermo Scientific®Fr) équipée d'un détecteur à barrette de diodes, DAD 3000 (Thermo Scientific®Fr). Les solutés ont été analysés à l'aide d'un gradient acétonitrile / eau. Les solvants utilisés présentaient une qualité minimale de gradient, l'acétonitrile correspondait au produit Chromasolv Gradient Grade (Sigma Aldrich, Fr) et d'eau ultra pure produite au sein du laboratoire à l'aide d'un système de purification d'eau, Simplicity (Millipore, Fr). La pureté de l'eau en sortie a été contrôlée en sortie du purificateur d'eau à 18,2 Mohm.

Le gradient utilisé a permis une séparation des 16 standards d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (Supelco®, Fr) et du DDT et de ses principaux dérivés.

La séparation a été réalisée avec un débit d'1mL/min, à 50 bars, à 30°C à l'aide d'un gradient acétonitrile/eau. La proportion initiale d'acétonitrile et d'eau était de 60/40, de 0 à 1 min. Puis la proportion d'acétonitrile a atteint 100 % après 43 min de cinétique. Par la suite, la colonne a été stabilisée, à nouveau, par une diminution de la concentration d'acétonitrile à sa proportion initiale d'acétonitrile/eau.

La colonne utilisée pour cette séparation est de type Hypersil Green PAH (Thermo Scientific®,Fr) présentant les dimensions suivantes : 150 x 4,6 mm avec une porosité de 5 µm. La colonne utilisée était équipée d'une pré-colonne de protection spécifique aux colonnes de type C18 Hypersil.

3.3. Mesure des métaux et du TBT bio-accessibles

Ces tests ont été effectués au moyen des bactéries transformées et rendues bioluminescentes pour la détection des métaux. Il s'agit de cinq souches d'*E. coli* transformées par différents plasmides pour la détection du cadmium, l'arsenic III, le mercure, le cuivre et le zinc (**Figure 13**), et d'une souche pour la détection du TBT (Durand et al., 2003). Ces souches préalablement testées sont lyophilisées et conservées dans des plaques à 96 puits (Jouanneau et al., 2011).

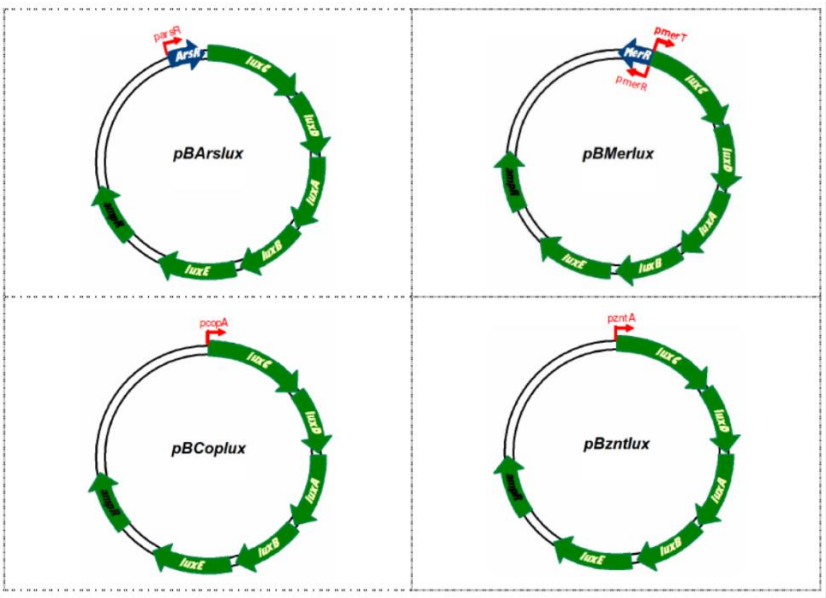


Figure 13: Construction génétique des souches utilisées pour la détection des métaux (Jouanneau et al., 2011).

3.3.1. Tests de lixiviation

Le test de lixiviation normalisé (CEN, 2002) a été appliqué aux échantillons de sédiments (Témoin et bioaugmenté). Cette procédure consiste en une seule extraction avec de l'eau déminéralisée, en utilisant un rapport solide à liquide de 1/10. On a mélangé 10 g de sédiments avec 100 mL d'eau déminéralisée pendant 24 h avec agitation (2500 rpm). Après centrifugation à 3000 x g pendant 15 min, les lixiviats récupérés ont été filtrés sur des filtres de 0,45 µm (Millipore). Par la suite 10 mL de chaque lixiviat ont ensuite été acidifié avec de l'acide nitrique (HNO_3) à 65 % (Foucault et al., 2013).

3.3.2. Exploitation des résultats de bioluminescence

Ce protocole est identique pour les essais d'induction pour toutes les bactéries bioluminescentes en microplaques. Les bactéries préalablement lyophilisées et conservées à -80°C, sont réhydratées avec 100 µL d'eau distillée stérile et incubées pendant 30 min à 30 °C. Par la suite 25 µL de l'effluent à tester sont ajoutés dans chaque puits. Les puits induits par l'eau distillée stérile uniquement ont servi comme témoins négatifs (**Figure 14**).

La lecture de la bioluminescence a été réalisée à 490 nm à 30 °C, à l'aide d'un luminomètre à microplaque (Berthold® MicroLumat Plus Lb96V) avec un temps d'intégration d'une seconde par puits.

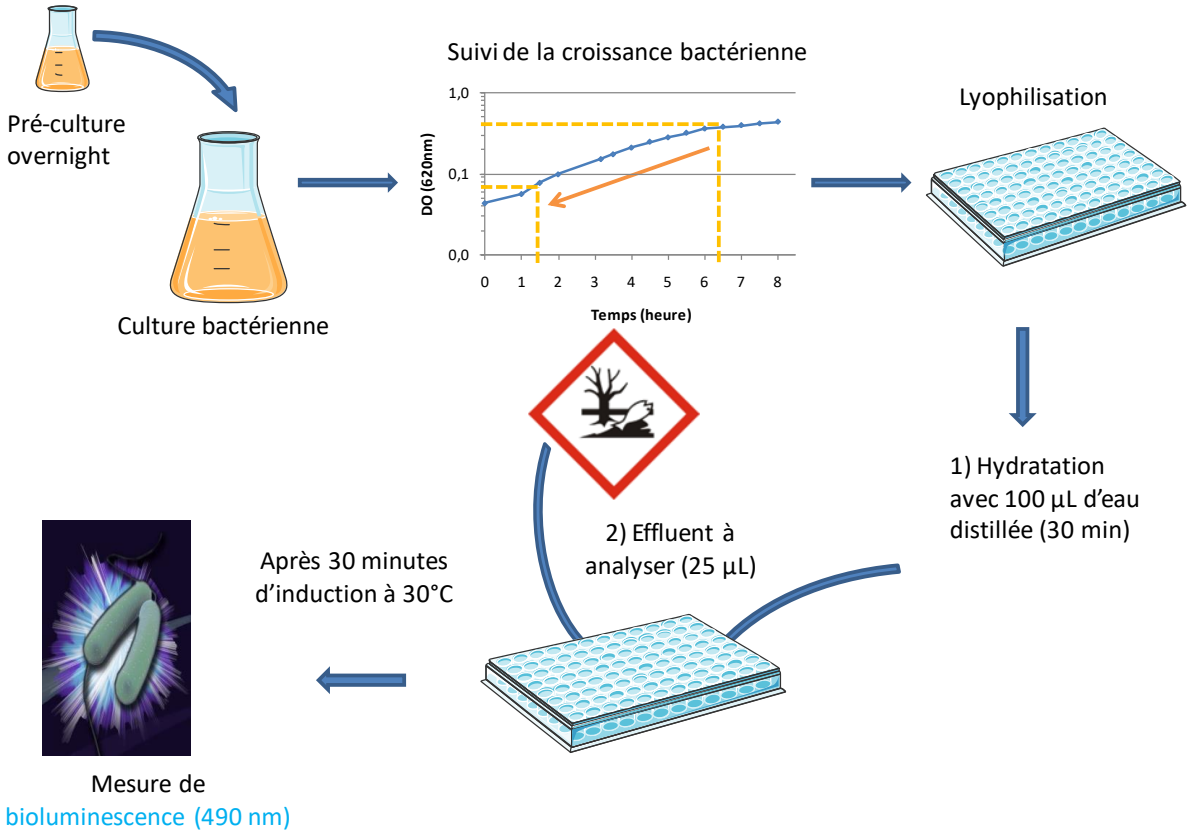


Figure 14: Etapes d'induction de toutes les bactéries lyophilisées en microplaque.

Le traitement des données de bioluminescence des souches constitutives (*Pseudomonas stutzeri* LBR pBtaclux, *Cupriavidus metallidurans* LBJ pBtaclux et *Rhodococcus equi* LBB pBtaclux) est exprimé en taux d'inhibition de la bioluminescence, tandis que celui des bactéries inductives est exprimé en facteurs d'induction de bioluminescence.

$$TI = 1 - (BL_{mesurée}) / BL_{témoin})$$

$$FI = (BL_{mesurée}) / BL_{témoin})$$

Avec :
TI : taux d'inhibition de la bioluminescence
FI : facteur d'induction
BL mesurée : bioluminescence mesurée de l'échantillon
BL témoin : bioluminescence mesurée en présence de l'eau

Dans le but d'exploiter les résultats de bioluminescence et de prédire une information à la fois qualitative et semi-quantitative sur la présence des métaux dans les sédiments traités ; des modèles statistiques d'arbre de décision ont été développés par Jouanneau et al., 2011 en utilisant le logiciel Metalsoft. Il a été montré que le couplage des bactéries lyophilisées en microplaque et l'analyse par arbre de décision a permis d'estimer les niveaux des différentes concentrations métalliques avec une efficacité de prédiction de 89 %, 94 %, 95 % et 100 % pour le cadmium, le cuivre, l'arsenic III et le mercure respectivement.

4. Analyses biologiques

4.1. Dénombrement de la biomasse

Dans le but de suivre l'évolution de la biomasse au cours du procédé de bioremédiation, nous avons utilisé un kit de viabilité LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen), qui permet de distinguer quantitativement les bactéries vivantes des bactéries mortes, même au sein d'une population mixte contenant plusieurs familles et genres bactériens.

Ce kit contient deux marqueurs fluorescents SYTO 9 (vert) et Iodure de Propidium (PI) (violet). Le SYTO 9 possède la capacité de diffuser dans les cellules et d'émettre de la fluorescence de couleur verte une fois liée à l'ADN. Il permet donc de marquer la totalité les cellules (mortes et vivantes) d'un échantillon. Le PI ne peut pénétrer dans les cellules que si les membranes sont altérées, donc seules les cellules mortes seront colorées en rouge.

Pour chaque prélèvement de l'effluent (tous les 3 jours durant les 3 mois de suivi) nous avons effectué des dilutions successives (1/10, 1/20 et 1/100). 1 mL de chaque dilution a été mélangé avec 3 µL d'un mélange de SYTO 9 et d'iodure de propidium (1: 1), puis a été agitée par inversion et mis en incubation dans l'obscurité pendant 20 min à température ambiante. 5 µL de chaque mélange ont été déposés sur des cellules de Malassez et le dénombrement a été effectué par microscopie. La lecture a été faite grâce à un microscope Olympus BX51 à EPI fluorescence à 520 nm X 40.

4.2. Suivi des souches bactériennes lors de la bioaugmentation

La bioaugmentation du sédiment a été réalisée par l'ajout de trois souches bactériennes : *Pseudomonas stutzeri* LBR*, Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB*.* Pour suivre et quantifier ces souches dans les bioréacteurs nous avons réalisé une PCR quantitative au début et à la fin de l'expérience (qPCR). Des amorces spécifiques de chaque souche ont été utilisées (ces quantifications ont été faites par la société Welience, INRA Dijon).

4.2.1. Extraction de l'ADN du sédiment

Les analyses de la qPCR ont été effectuées en début du suivi et après 90 jours d'expérience. Dans le but de prendre en considération la distribution au niveau de la totalité des bioréacteurs, trois prélèvements ont été effectués à partir de chaque bioréacteur à trois niveaux différents (à 10, 25 et 40 cm de hauteur). Ces prélèvements ont été bien homogénéisés (maintenu en agitation dans des tubes falcon® de 500 mL à 250 rpm pendant une heure à température ambiante).

Pour extraire l'ADN des échantillons des sédiments, nous avons utilisé une méthode d'extraction d'ADN standard : ceci permet d'extraire l'ADN génomique total à partir de 1 g de sédiments équivalents secs à l'aide d'un kit FastPrep (MP-BIO).

Au préalable, les échantillons ont été centrifugés à 10000 g pendant 10 min pour récupérer l'ADN total. Cette étape est suivie d'une lyse mécanique (agitation en présence de billes de verre de 4 mm (MP Bio), des billes de silice 100 µm (MP Bio) et des billes de céramique 1,4 mm (MP Bio), et d'une lyse chimique des protéines et des lipides par l'action d'un tampon de lyse (SDS dénaturé) à 70 °C (**tableau 14**).

Tableau 14: Les solutions utilisées pour extraire l'ADN à partir du sédiment.

Composés	Concentrations finales	Proportions de tampon	Rôles des produits
Tris-HCl	100 mM pH 8	**1 mL** Tris 1 M pH8	Rôle tamponneur à pH 8
EDTA	100 mM pH 8	**2 mL** EDTA 0,5 M pH 8	Chélateur des cations bivalents
NaCl	100 mM	**1 mL** NaCl1 M	Interactions ADN-protéines
SDS	2 %	**1 mL** SDS 20 %	Lyse membranaire
H_2O UP	-	**5 mL** H_2O UP	-

Cette opération est suivie d'une précipitation des complexes protéines/lipides-SDS dénaturés. Ensuite l'ADN est séparé des protéines dénaturées en présence d'une forte concentration d'acétate de potassium (CAS : 127-08-2) 3M à pH 5,5.
Une précipitation des ADN suivi d'un lavage à l'isopropanol et à l'éthanol 70 %, permet de récupérer l'ADN contenant encore des impuretés (protéines, sucres, macromolécules phénoliques, …).
L'ADN est donc purifié par deux méthodes successives et différentes. D'abord en utilisant un tamis moléculaire sur colonne d'affinité Microbiospin PVPP (PolyVinylPpolyPirrolidone) Biorad®, suivi d'une seconde étape sur une colonne d'exclusion Geneclean® Turbo (MP Bio).
L'ADN récupéré en solution aqueuse est quantifié par spectrométrie UV (260 nm) puis conservé à -20°C.

4.2.2. PCR quantitative

- **Amplification des gènes ciblés**

Pour réaliser la qPCR chaque souche bactérienne a été ciblée dans un gène spécifique, ceci a permis d'obtenir des produits de PCR de différentes tailles :

Tableau 15: Amorces utilisées pour la détection des bactéries utilisées lors de la bioaugmentation

Souche	Gène cible	Amorces	Tm (°C)	Références
Pseudomonas stutzeri LBR	Fps158 Rps743	5'- GTGGGGGACAACGTTTC-3' 5'- CACCTCAGTGTCAGTATTAGC-3'	48	Bennasar et al., 1998
Cupriavidus metallidurans LBJ	CmF1 CmR1	5'- AGTTTCCTGGCCATGATGAG-3' 5'- TCCGTTTCCTGTACCACCTC-3'	59	Ryan and Adley, 2011
Rhodococcus equi LBB	ChoE	5'- CGACAAGCGCTCGATGTG-3' 3'-TGCCGAAGCCCATGAAGT-5'	56	Rodrı´guez-La´zaro et al., 2006

Pour *Pseudomonas stutzeri* LBR la taille de la bande amplifiée est de 635 pb, Pour *Cupriavidus metallidurans* LBJ la taille de la bande amplifiée est de 437 pb, par contre pour *Rhodococcus equi* LBB la taille de la bande amplifiée est de 68 pb. Les amorces utilisées sont présentés dans le **tableau 15** et les conditions de la qPCR sont présentées dans le **tableau 16.**

Tableau 16: Optimisation des conditions de qPCR pour chacune des souches ciblées (Résultats issues de cette thèse)

Souches bactériennes	Conditions de qPCR
Pseudomonas stutzeri LBR	- Dénaturation initiale : 95°C pendant 15minutes - Dénaturation : 95°C pendant 15 secondes - Hybridation des amorces : 60°C pendant 30 secondes - Elongation : 72°C pendant 30 secondes (+ collecte des données) - Les étapes 2, 3 et 4 sont répétées 35 fois. - Courbes de dissociation : 95°C pendant 15 sec ; 60°C pendant 15 sec ; 95°C pendant 15 sec
Cupriavidus metallidurans LBJ	- Dénaturation initiale : 95°C pendant 15minutes - Dénaturation : 95°C pendant 15 secondes - Hybridation des amorces : 50°C pendant 30 secondes - Elongation : 72°C pendant 30 secondes (+ collecte des données) - Les étapes 2, 3 et 4 sont répétées 35 fois. - Courbes de dissociation : 95°C pendant 15 sec ; 60°C pendant 15 sec ; 95°C pendant 15 sec
Rhodococcus equi LBB	- Dénaturation initiale : 95°C pendant 15minutes - Dénaturation : 95°C pendant 15 secondes - Hybridation des amorces : 60°C pendant 30 secondes - Elongation : 72°C pendant 30 secondes (+ collecte des données) - Les étapes 2, 3 et 4 sont répétées 35 fois. - Courbes de dissociation : 95°C pendant 15 sec ; 60°C pendant 15 sec ; 95°C pendant 15 sec

- **Ligation – transformation**

Afin de produire le fragment d'intérêt pour les besoins de la qPCR, les fragments amplifiés ont été clonés dans un vecteur plasmidique (kit CloneJet, ThermoFisher®) pour chacune des souches (**Figure 15**).
E.coli (5-alpha High Efficiency, NEB®) a été utilisé comme cellule-hôte et les bactéries transformées (ayant inclus le plasmide) ont été sélectionnées sur milieu LB avec ampicilline.



Figure 15: Présentation de la sélection des bactéries transformées sur boite de Pétri : les colonies blanches ont été transformées contrairement aux bleues.

- **Vérification des clones**

Huit clones par échantillons ont été analysés par PCR pour vérifier la présence de l'insert à l'aide des amorces fournies dans le kit Clone Jet®. Au moins un clone pour chaque fragment contient l'insert et est donc conservé pour la suite de l'étude. Pour *Rhodococcus equi* LBB, deux fragments de taille proche sont

présents, les 2 clones sont donc conservés et seront vérifiés ultérieurement avec les amorces spécifiques (**Figure 16**).

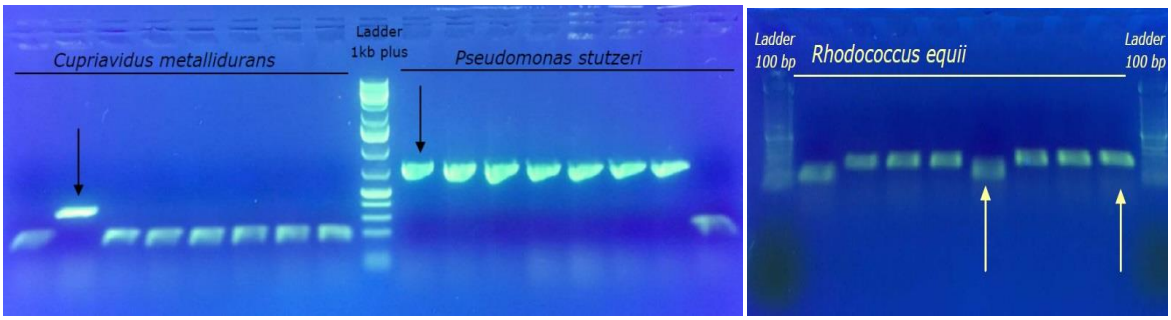


Figure 16: Gel d'agarose présentant les produits d'amplification sur clones. Les clones utilisés pour le reste de l'étude sont pointés (*Pseudomonas stutzeri* LBR: 635 pb, *Cupriavidus metallidurans* LBJ : 437 pb et *Rhodococcus equi* LBB: 68 pb) (Résultats issues de cette thèse).

- **Extraction des plasmides**

Le clone identifié comme portant le gène (taille attendue) a été incubé sur boite de Pétri pour fournir le matériel biologique nécessaire à l'extraction des plasmides (kit d'extraction de plasmide Macherey-Nagel®). À l'issue de l'extraction, l'ADN plasmidique extrait a été dosé au Quantifluor® et l'équivalent en nombre de copies de gène par µl a été déterminé. Les plasmides pour chaque clone d'intérêt ont été produits en quantité suffisante pour préparer une gamme étalon.

La mise en œuvre de la PCR quantitative consiste en l'amplification d'une séquence cible au sein de l'ADN extrait de l'échantillon, en comparaison à une gamme étalon dont le nombre de copies du gène est connu. Le SYBRGreen® permet de quantifier en temps réel l'ADN amplifié dans les échantillons par des mesures de fluorescence. La gamme étalon est réalisée à partir du gène d'intérêt intégré dans un vecteur, et dont le nombre de copies est connu.

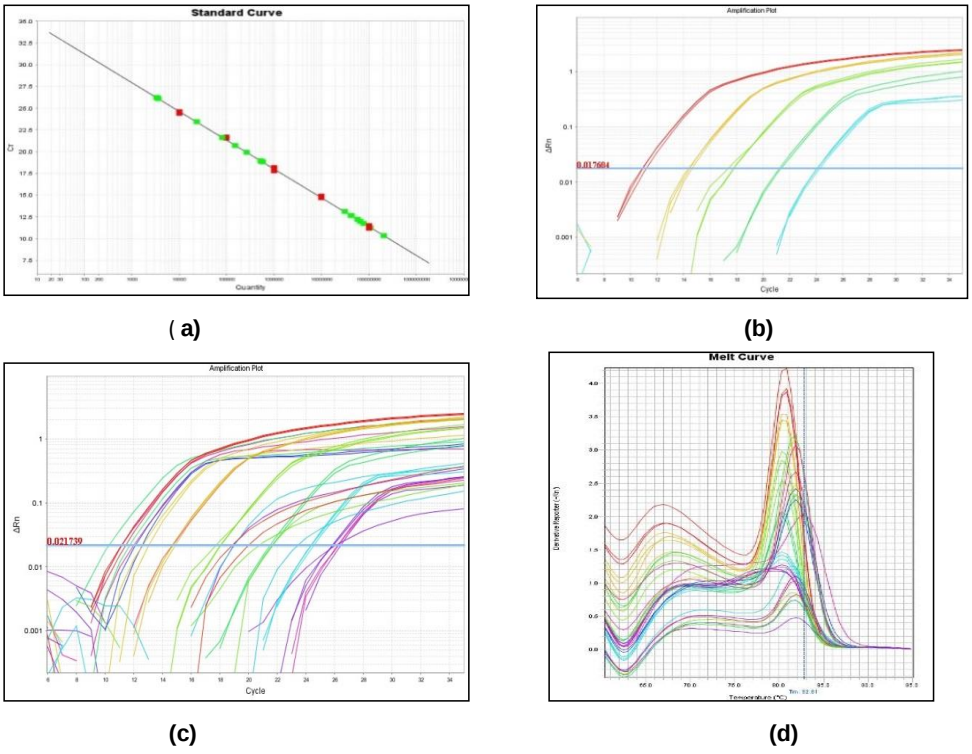
Le thermocycleur utilisé pour mesurer la fluorescence et donc l'amplification en temps réel est le stepOne (Applied Biosystems®).

Les « mix » utilisés sont détaillés dans le **tableau 17**. Les amorces sont spécifiques à chaque cible tandis que le reste du mix est identique. 2 µL d'ADN sont ajoutés à une concentration de 1 ng/µL, pour obtenir un volume total de 35 µL par tube.

Tableau 17: Différents produits et concentrations utilisés pour la préparation du mix de la PCR pour l'amplification de l'ADN 16S des souches cibles

Réactifs	Marque	Quantité finale/tube	Pour 1 Tube (µL)
Master mix SybrGreen (6mM $MgCl_2$)	Life Technologies	1x	10
Tampon ($MgCl_2$)	Roche	1X	2,5
dNTPs	Roche	5 mM	0,2
Primer 1 (10µM)	eurogentec	12,5 µM	1,25
Primer 2 (10µM)	eurogentec	12,5 µM	1,25
Taq Polymérase	Roche	1,5 U/µL	0,60
T4 gène 32	MP Bio	0,625 µg	1,25
ADN à amplifier	-	1 ng/µL	2,00
H_2O (UP)	-	-	15,95

Suite à la vérification de la présence des inserts dans les clones choisies, la quantification de chacune des souches bactérienne a est effectuée par qPCR dont les caractéristiques sont les suivantes : la pente est de -3,3, le R^2=0,998 et l'efficacité de 100 % (**Figure 17**) ce qui rentre dans les critères de validité.



(**a)** **(b)** **(c)** **(d)**

Figure 17: Présentation de la courbe standard avec les points de la gamme étalon en rouge et les échantillons en vert (a), des courbes d'amplification pour la gamme étalon (b) avec les courbes d'amplification pour la gamme étalon et les échantillons (c), et les courbes de dissociation (d).

4.3. Analyse de l'activité métabolique du consortium bactérien

Les microplaques BIOLOG ont été utilisées pour observer les changements de profil métabolique du consortium bactérien présent dans le sédiment au cours de l'activité de biodégradation. Le test se fait sur la microplaque 96 puits (ECO cat n°1506 MicroPlate - BIOLOG) contenant des triplicatas de 31 sources de carbone et 3 autres témoins (Insam, 1997 ; Choi et Dobbs, 1999), ainsi qu'une solution tampon et des sels de tétrazolium (indicateur coloré de l'activité bactérienne) (**Tableau 18**). Après chaque prélèvement (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90 jours), 20 g de sédiments lavés et dilués au 1/50 dans le tampon TPS (pH=7) sont mis en agitation pendant une demi-heure. 150 µL de cette préparation ont été répartis dans chacun des puits de la microplaque (Biggs et al., 2001). La lecture est réalisée par spectrométrie (λ = 590 nm) (Biolog microstation reader, model BioTekInc).

Le pourcentage de substrats métabolisés par le consortium microbien est alors déterminé au bout de 120 - 144 h d'incubation. Puis le pourcentage de dégradation de chaque source de carbone est calculé après 120 h d'incubation.

La présence de calcium qui peut fausser les analyses (Pierce et al., 2014) a été évité en diluant les échantillons avant de les distribuer dans les microplaques.

Les résultats sont exprimés en indice de diversité de Shannon. Cet indice fournit des informations sur la répartition de l'utilisation des sources de carbone par les communautés microbiennes (Harch et al., 1997) et qui était calculé selon Zak et al., (1994).

$$H=-\Sigma pi(lnpi)$$

Avec:

pi = développement de la couleur proportionnelle d'un puit/ le développement de couleur totale de tous puits d'une plaque.

H = indice de diversité de Shannon

Tableau 18: Types de substrats présents dans la microplaque (BIOLOG, ECOPlate).

Polymères	Carbohydrates	Acides carboxyliques	Acides aminés	Amines	Composés phénoliques
Tween 40 Tween 80 Cyclodextrine glycogène	Acide D-glactonique D-xylose i-erythritol D-mannitaol D-cellobiose B-methyl-D-glucoside N-acétyl-D-glucosamine Glucose-1-phosphate D,L-α-glycérol phosphate α-D-lactose	Acide purivique Acide D-galacturonique Acide itaconique Acide γhydroxybutyrique Acide D-malique Acide D-glucosaminique Acide α-ketrobutyrique	L-arginine L-aspirine L-phénylalanine L-sérine L-thréonine Acide glycyl-L-glutamique	Phényéthyl-amine Putrescine	Acide 2-hydroxibenzoique Acide 4-hydroxybenzoique

5. Tests de toxicité

5.1. Analyse de la toxicité globale des sédiments par des bactéries témoins

Ces tests ont été effectués avec la bactérie luminescente *A. fischeri* NRRL B-11177 (LUMIStox®, Dr Bruno Lange ; ISO 11348-2). Le principe de ce test est de mesurer l'inhibition de la luminescence émise par *A. fischeri* suite à l'exposition à un effluent pendant 5, 15 et 30 min de contact. Les analyses ont été effectuées tous les 3 jours sur les effluents de circulation des 8 bioréacteurs.

Dans le cadre de notre étude le test a été validé puisque 73,68 % $\pm$ 3,32 (moyenne et écart type sur 3 essais) d'inhibition de la bioluminescence après 30 min d'induction sont obtenus pour le témoin positif, le 3,5-dichlorophénol, à une concentration de 6 mg/L.

Dans un premier temps, 500 µL de la suspension bactérienne d' *A. fischeri* sont placés dans des cuves en verre du luminomètre (LUMIStox 300, LUMIStherm incubator). Après 15 min d'incubation à 15 °C, la luminescence est mesurée. Puis, 500 µL des d'échantillons sont disposés dans les cuves. La luminescence est enfin mesurée au bout de 5, 15 et 30 min d'incubation. Il est possible alors d'en déduire le pourcentage d'inhibition à t min.

Le principe est de calculer la diminution de la luminescence pour chaque échantillon d'effluent par rapport au témoin (généralement du NaCl 2 %), exprimée en % de la luminescence initiale.

Les résultats obtenus ne sont considérés valides que si les conditions suivantes sont simultanément satisfaites : les deux témoins positifs du test : le 3,5-dichlorophénol (97 %, Aldrich) provoque 64 % d'inhibition à 6 mg/L au bout de 30 min d'incubation, et le sulfate de zinc (exprimé en Zn^{2+}, 99 % Aldrich) provoque 35 % d'inhibition à 25 mg/L au bout de 30 min d'incubation.

5.2. Analyse de la toxicité globale des sédiments par les bactéries transformées

Les souches bactériennes isolées à partir de la lagune de Bizerte : *Pseudomonas stutzeri* LBR, *Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB ont été transformées et rendues bioluminescentes dans le but de jouer un double rôle. Un rôle de dégradeurs des polluants, mais aussi un rôle d'indicateurs d'effet toxique du sédiment tout au long de son traitement. En effet, si le sédiment présente une toxicité sur ces bactéries, leurs activités de biodégradation seront limitées.

La toxicité globale a été aussi évaluée par le biais d'une autre souche bioluminescente d'eau douce: *E.coli* DH1 pBTaclux qui exprime constitutivement la bioluminescence grâce au plasmide pBTaclux (Jouanneau et al., 2011).

Les analyses avec *E.coli* pBTaclux sont aussi faites en microplaques comme avec les autres souches bioluminescentes et avec un temps de contact de l'effluent de 60 min.

Dans le cas des souches constitutives; Le plasmide pBtac*lux CDABE* d'*E.coli* DH1 a été inséré (selon les modalités ci-dessous) dans *Pseudomonas stutzeri* LBR, *Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB, ce plasmide, lorsqu'il est transformé dans les souches, a permis une expression constitutive de la bioluminescence.

5.2.1. Préparation des souches compétentes

La préparation des souches compétentes, est faite en suivant les étapes suivantes :

À partir d'une pré-culture de nuit dans le milieu LB à DO_{620} =0,8, nous avons effectué 3 lavages successifs au glycérol stérile à 10 % (1 volume, ½ volume et 1/10 volume), chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 4000 g durant 10 min à 4 °C. Le culot final est repris dans du glycérol 10 % stérile.
Par la suite, le culot de chacune des souches est distribué dans des tubes à PCR stériles (50 µL/tube) et conservé à -80°C jusqu'à utilisation (jusqu'à 6 mois de conservation).

5.2.2. Transformation des souches par le plasmide pB*tacLux* d'*E.coli* DH1

Le p*tac* est un promoteur hybride, fort, élaboré à partir de promoteurs p*trp* et p*lac* d'*E.coli*. Ce promoteur est sous la dépendance et la régulation de *LacI*. L'opéron lux a une séquence de gène connue lux CDABE, où lux A et lux B codent pour les composants de la luciférase, et les gènes lux CDE codent pour un complexe de réductase nécessaires pour le mécanisme de la luciférase (Meighen, 1991) (**Figure 18**).

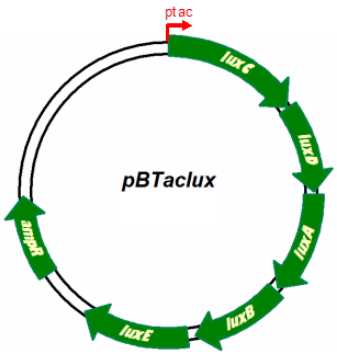


Figure 18: Description du vecteur d'expression pB*tacLux* (Charrier et al., 2006).

Le jour de la transformation, les culots de bactéries compétentes, doivent subir une décongélation lente à 4 °C. Ensuite, 1 µL de plasmide est mélangé à 50 µL de bactéries compétentes dans une cuve à électroporation pré-refroidit à 4 °C.
Le mélange est soumis à un choc électrique à 2500 V pendant 20 secondes (à l'exception de *Rhodococcus equi* LBB qui était soumis à une électroporation de 1800 à 1900 V pendant 20 secondes), et est par la suite déposé sur un lit de glace 2 min. Puis, 900 µL de milieu LB à 4°C sont ajouté aux cellules fraîchement électroporées et la suspension est incubée 1 heure à 37 °C (**Figure 19**).

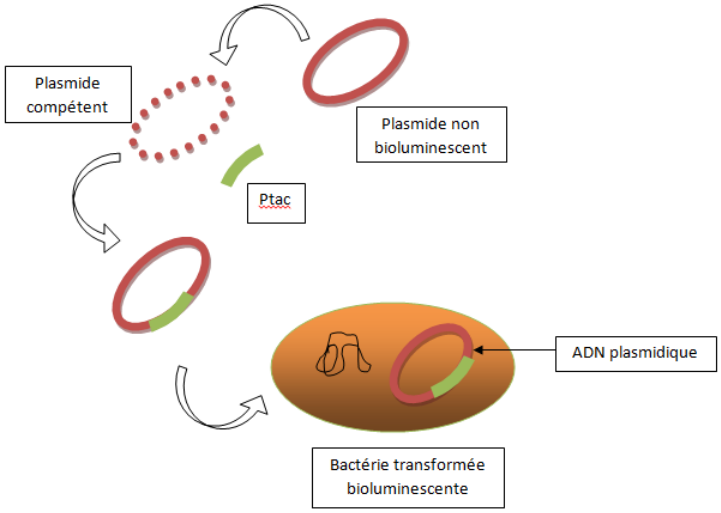


Figure 19: Etapes de la transformation des souches bactériennes par *pBtaclux.*

Des dilutions (10^{-1} jusqu'à 10^{-10}) de chacune des cultures sont préparées et étalées sur milieu solide LB avec Gentamicine à 10 µg/mL et incubées 24 h. Après incubation 12 h à 37°C, 8 clones ont été prélevés du milieu et mises en suspension dans du milieu LB additionné de la Gentamicine à la même concentration.
Après cette étape, le plasmide a été extrait de chacune des souches transformées et visualisé sur un gel d'agarose 1 %. La cinétique de croissance (DO_{620} nm) et la cinétique de l'émission de bioluminescence ont été également étudiées sur un milieu LB additionné de gentamicine (10 µg/L).
Afin d'augmenter le signal de la bioluminescence des souches transformées, de la riboflavine et de décanal ont été ajoutés en accord avec les préconisations de Bachmann et collaborateurs (2007) lorsque les bactéries étaient en carence.

5.2.3. Caractérisation d'émission de bioluminescence des bactéries transformées

Dans le but de déterminer l'optimum d'émission de bioluminescence des souches génétiquement modifiées (*Pseudomonas stutzeri* LBR *pBtaclux, Cupriavidus metallidurans* LBJ *pBtaclux* et *Rhodococcus equi* LBB *pBtaclux*), les cinétiques d'émission de bioluminescence de ces souches ont été étudiées en parallèle avec leur cinétique de croissance (DO_{620} nm). Nous pouvons constater que le maximum de bioluminescence des trois souches a été obtenu au milieu de la phase stationnaire (environ après six heures de suivi).
Par la suite, et pour mieux caractériser ces souches, les concentrations inhibitrices 50 (CI_{50}) des substances de toxicité de références (le 3,5 Dichlorophénol et le sulfate de zinc) et de DDT, BaP et /ou métaux lourds ont été effectué (**Tableau 19**).

Tableau 19: Distribution des CI_{50} des souches bactériennes transformées et rendues bioluminescentes et leurs comparaisons par rapport à *A. fischeri* (résultats issus de cette thèse)

Souches bactériennes **CI 50** **Polluant (mg/L)**	***Pseudomonas stutzeri LBR*** **pB*tacLux***	***Cupriavidus metallidurans LBJ*** **pB*tacLux***	***Rhodococcus equi LBB*** **pB*tacLux***	***Aliivibrio fischeri***
3.5 Dichlorophénol	**159,5**	**84**	**87,5**	**15**
Sulfate du Zinc	**72**	**163**	**125,2**	**58**
DDT	**56**	**78**	**81**	**13,8**
BaP	**58**	**81**	**79**	**11,3**
DDT + BaP	**44**	**65,7**	**78,3**	**5**
DDT + BaP + métaux 1X	**CI50 n'est pas changée**	**CI50 n'est pas changée**	**CI50 n'est pas changée**	**Ne résiste pas**
DDT + BaP + métaux 10X	**CI_{50} n'est pas changée**	**CI_{50} n'est pas changée**	**60 % d'inhibition**	**Ne résiste pas**

5.3. Dépistage de la génotoxicité des sédiments

Le test d'Ames est un test de mutation génique. Il consiste à révéler si une substance est capable d'induire des mutations chez une bactérie modèle : *Salmonella typhimurium* qui est porteuse d'une mutation sur l'un des gènes qui gouverne la synthèse de l'histidine (Maron Et Ames 1983). La mutation rend les bactéries auxotrophes, suite à cette mutation la bactérie (His^-) est incapable de se développer sur milieu de culture en carence d'histidine, contrairement aux bactéries prototrophes (His^+) qui se développent sur un milieu qui en est dépourvu. On cherche alors l'apparition de souches mutantes (mutation réverse). La fréquence de ces mutations réverses peut être considérablement augmentée en exposant les bactéries à un agent mutagène. Le Test d'Ames permet donc de quantifier l'induction de ces mutations. Certaines substances nécessitent un inducteur pour être mutagène.

Le test d'Ames est réalisé à l'aide d'un kit d'Ames XENOMETRIX® (Ames MPF™ 98/100/1535/1537) selon les étapes mentionnées au niveau de la figure ci-après (**Figure 20**).

Le test a été réalisé avec 4 différentes souches mutantes de *Salmonella typhimurium à savoir* TA98, 100, 1535 et 1537. Dans le but de déterminer laquelle parmi ces souches bactériennes est la plus sensible à ce type d'analyse, une analyse comparative entre les quatre souches a été réalisée.

Les souches bactériennes (TA98, 100, 1535 et 1537) fournies avec le kit sont mises en culture dans 50 mL de milieu de culture GM, Xenometrix®et mis en agitation à 250 rpm et à 37 °C pendant la nuit. Le lendemain les absorbances (DO à 620 nm) sont mesurées et doivent être ≥2.5, correspondant à la phase exponentielle de ces souches. Dans le cas où la DO ne serait pas atteinte, l'incubation des cultures peut être prolongée jusqu'à l'atteinte de l'absorbance adéquate.

Par la suite, 240 µL des suspensions bactériennes sont distribués dans des plaques 24 puits (Thermo scientifique® 142475) en présence de l'effluent à tester, de milieu d'exposition et de mix de S9 (dans le cas des tests avec S9) puis incubés pendant une heure sous agitation 250 rpm et à 37 °C.

Pour le contrôle négatif, le DMSO est mis à la place de l'effluent, alors que pour les contrôles positifs le 2 nitrofluorène a été utilisé avec les souches TA98 et TA100 et le 9-aminoacridine a été utilisé avec les souchesTA1535 et TA1537.

Par la suite, le contenu des plaques 24 puits sont distribués dans des plaques 384 puits à raison de 50 µL par puits et incubés pendant 48 h à 37 °C. La lecture des résultats est basée sur l'apparition des révertants jaunes. La fréquence de mutation dans les microplaques est l'équivalant au nombre de puits qui ont changé de couleur violette et jaunissent causés par une baisse du pH due à la mutation.

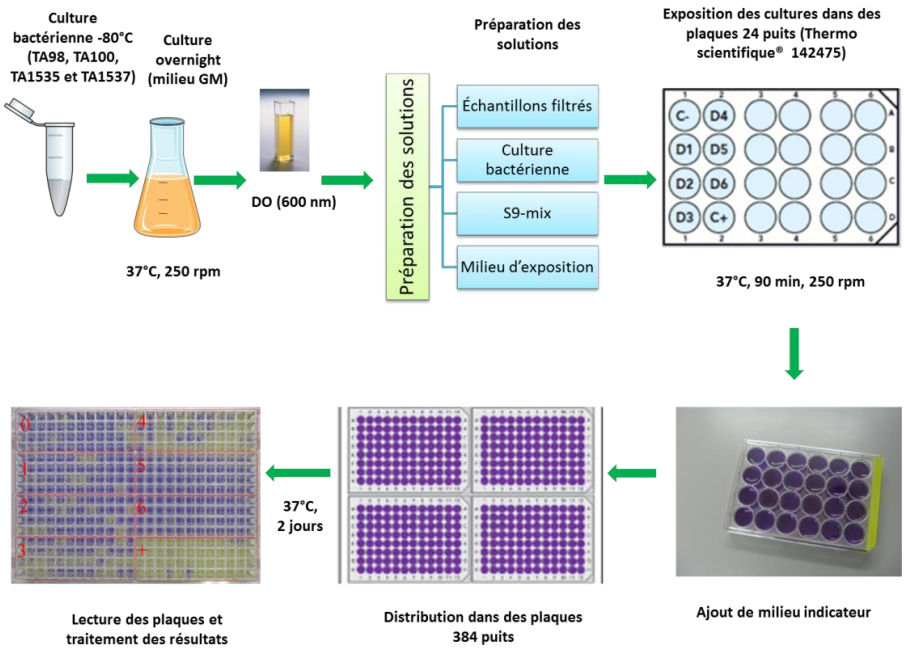


Figure 20: Différentes étapes effectuées pour la réalisation du test d'Ames en microplaque.

6. Simulation d'un bioprocédé de bioremédiation

Les sédiments sont des chélateurs pour les micropolluants, ils peuvent être utilisés comme indicateurs sur la pollution historique des cours d'eau. Les mesures sur eau et matières en suspension donnent une indication sur la pollution du milieu au moment du prélèvement. Ces deux mesures se complètent, pour des raisons de physico-chimie : certains polluants sont adsorbés sur les matières en suspension alors que d'autres sont solubilisés dans l'eau.

6.1. Échantillonnage et préparation des échantillons

À partir de la lagune de Bizerte (localisée à l'extrême Nord-Est tunisien, entre 37°80'-37°14'de latitude Nord et 9°46'-9°56 de longitude Est), 60 Kg de sédiments ont été recueillies en Aout 2015 au niveau de la station LB (indiquée par l'étoile sur la figure 21). Cette station est considérée comme la plus chargée en métaux lourds et en HAP en raison de la proximité d'un port industriel (Martins et al., 2015).
La caractérisation des sédiments de base a été réalisée (pH, concentration de N et de P) (Guicharnaud et al., 2010), ils sont principalement composés d'argile (> 90 %) et de sable (10 %).
Le sédiment a été transporté dans du matériel stérile et envoyé réfrigéré par avion (de Tunis à Nantes). Après avoir récupéré le sédiment a été conservé à 4 °C pendant une semaine avant son utilisation.

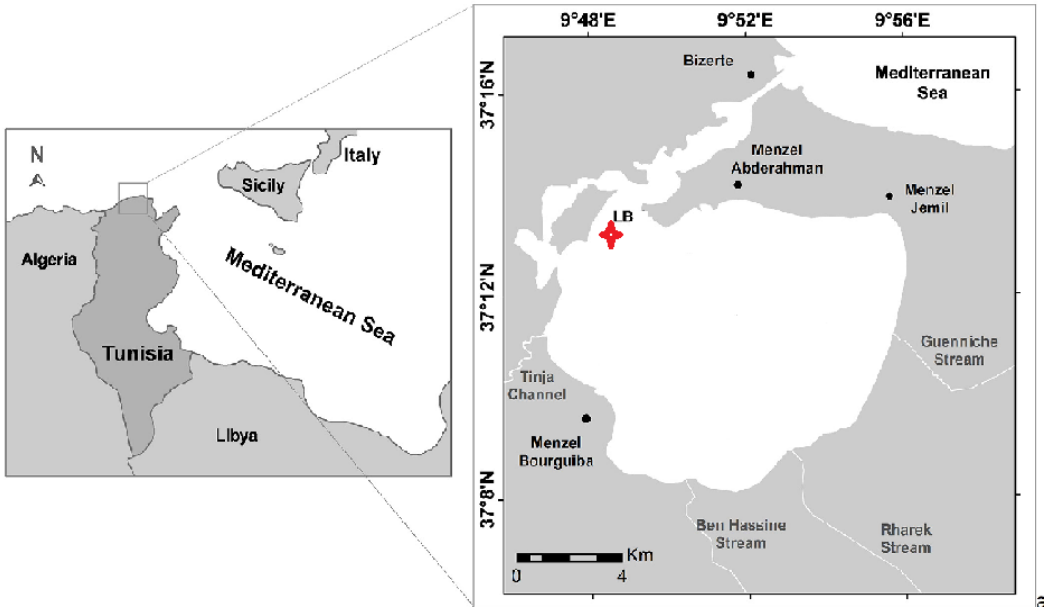


Figure 21: Localisation de la lagune de Bizerte et de la station d'échantillonnage.

6.2. Le dopage des sédiments (SPIKING)

Le mode de dopage peut avoir un impact direct sur la pertinence de la bioremédiation et du monitoring. En effet, il est indispensable pour garantir la fiabilité de la méthode et notamment sa justesse, de réaliser le dopage et le mélange en respectant des normes adaptées avec le type de matrice et de polluant avec lequel nous travaillons.

Dans le cadre de cette étude le dopage a été fait conformément aux normes présentées par l'OCDE (OCDE, 2005), par un mélange du DDT et du BaP à 40 mg/L chacun, les solutions ont été préparées dans le DMSO, puis un échantillon de 1 kg de sédiments a été dopé et maintenu toute une nuit en agitation (250 rpm), ce dernier a servi pour le dopage des 60 kg de sédiments. Ces derniers sont mis en agitation dans une bétonnière pendant 6 heures pour s'assurer de son homogénéité (**Figure 22**).



Figure 22: Montage utilisé pour le dopage et le mélange des sédiments de la lagune.

6.3. Structure et dimensionnement des bioréacteurs

D'après notre étude bibliographique, le volume des réacteurs utilisés pour réaliser un monitoring de procédé de bioremédiation est très variable d'une expérience à l'autre (de 0,1 à 60 L). Cependant, le facteur le plus important qui doit être maintenu constant à chaque fois est le rapport diamètre / hauteur des réacteurs qui se situe autour de 0,2 à 0,3 (Aal et al., 2010 ; 2014).

Le dimensionnement des réacteurs a tenu compte de plusieurs paramètres :

- Plusieurs portes de prélèvements de sédiments le long du réacteur, un volume mort en tête de réacteur a été laissé pour les émissions de gaz et la respiration, la hauteur de réacteur devait être assez importante.
- Un échantillonnage continu de liquide (effluent) pour les analyses (d'une dizaine de mL).
- Un diamètre important car un diamètre faible aurait entrainé des effets de paroi qui sont susceptibles de modifier la configuration de l'écoulement.
- Cependant, pour pouvoir respecter ces conditions et éviter le risque d'anisotropie de la matrice non consolidée (Kemna et al., 2012) qui peut être observé dans le cas des dimensions très larges ; nous avons travaillé avec 7,5 kg de sédiments dans chaque réacteur.

La littérature montre que les matériaux principalement utilisés dans les expériences de traitement du sol ou de sédiments en réacteur sont le PVC (Polychlorure de vinyle) ou le PVDF (Polyfluorure de vinylidène ou en anglais PolyVinyliDeneFluoride) dans le cas ou des substances peuvent altérer le PVC (Schweitzer, 2004).

Les réacteurs ont été construits à partir de tubes de 13 cm de diamètre et de 50 cm de long en PVC. Le rapport diamètre / hauteur est de 0,3 et le volume total d'un réacteur est de 7,5 L (**Figure 23**).

Les réacteurs sont remplis de sédiments de la lagune de Bizerte jusqu'à 45 cm de hauteur, afin de laisser 5 cm libres pour le dégazage du CO_2 produit pendant la biodégradation. Un volume de 5 cm en bas des réacteurs est occupé par des petites billes en verre afin d'éviter le colmatage des tuyaux lors de la circulation d'eau.

Le prélèvement de fluide (lixiviat) en cours d'expérience pour réaliser le suivi des paramètres microbiologiques et toxiques a été rendu possible grâce à un orifice muni d'ouverture.

Le prélèvement de sédiments en permanence est fait à trois niveaux différents, repartis sur la longueur de réacteur: S1 (bas), S2 (milieu) et S3 (haut) afin d'éviter une incertitude liée à la stratification au niveau des réacteurs (**Figure 23**).

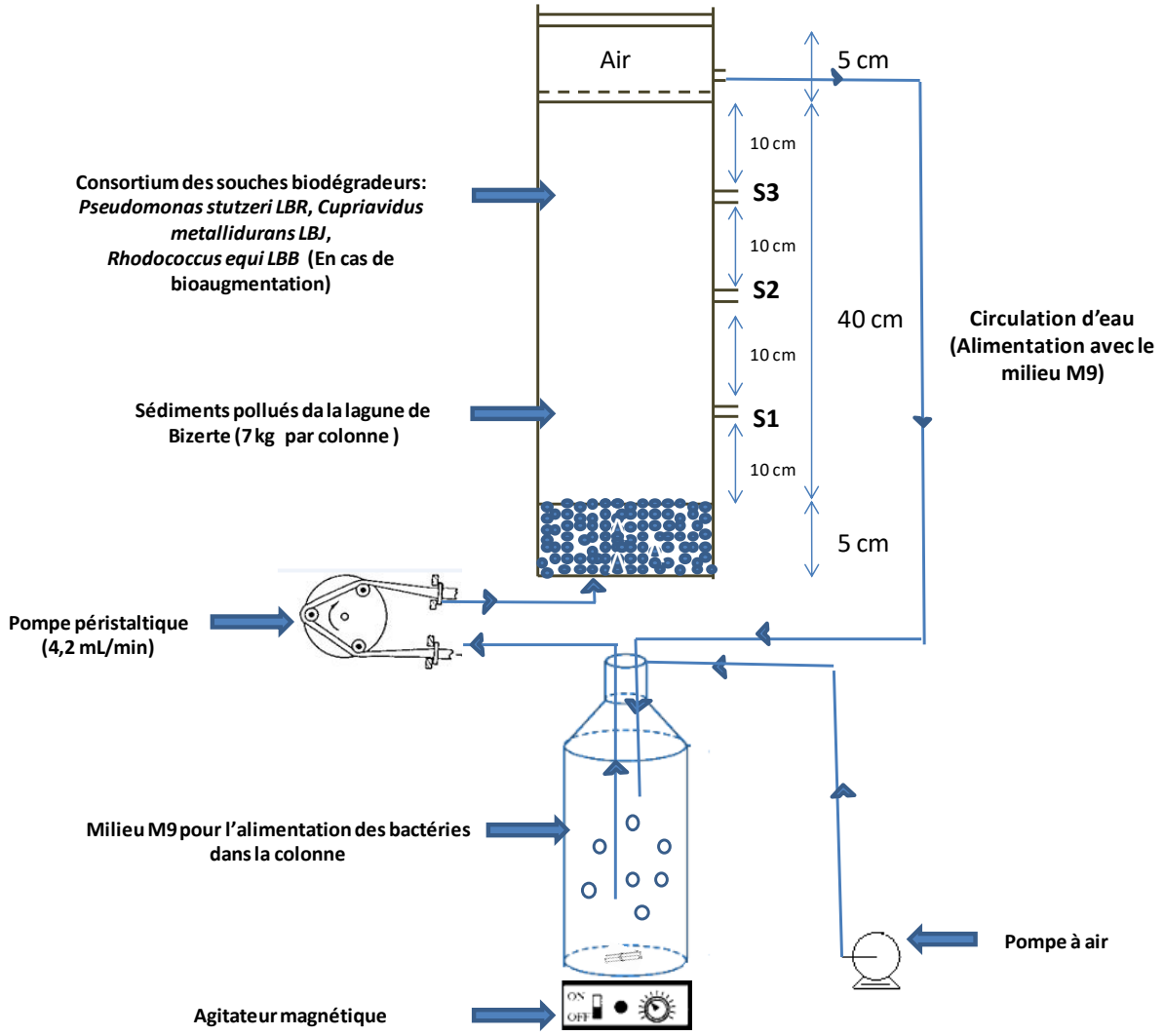


Figure 23: Schéma du montage de traitement de sédiment en bioréacteur.

Les bioréacteurs sont en système batch où la circulation des fluides est réalisée d'une manière ascendante avec le milieu minéral M9 contenu dans la bonbonne d'alimentation, afin d'éviter au maximum la formation de cheminements préférentiels. Cette circulation est opérée à un faible débit (250 mL/h soit 4,2 mL/min) permettant d'assurer l'évacuation de l'air présent dans les pores et la non déstructuration la matrice de sédiments (Noel et al., 2012). Dans notre étude, nous avons utilisé un circuit en boucle fermée : le fluide qui sort des réacteurs repart dans l'alimentation, ce système a l'avantage de faciliter le maintien des conditions microbiologiques dans les réacteurs et limite les contaminations accidentelles.

6.4. Oxygénation et ajout des nutriments

Nous avons choisi des conditions apparentes aérobies sans pour autant exclure les microenvironnements anaérobies. Pour ces raisons, et dans le but d'éviter les carences en oxygène dans les réacteurs, un bullage en oxygène est réalisé au niveau de la tête des bouteilles d'alimentation des réacteurs (**Figure 24**). De plus, pour stimuler les conditions optimales de la biodégradation, les éléments nutritifs ont été ajoutés dans les bouteilles d'alimentation pour respecter un rapport C: N: P de 100: 10: 1.

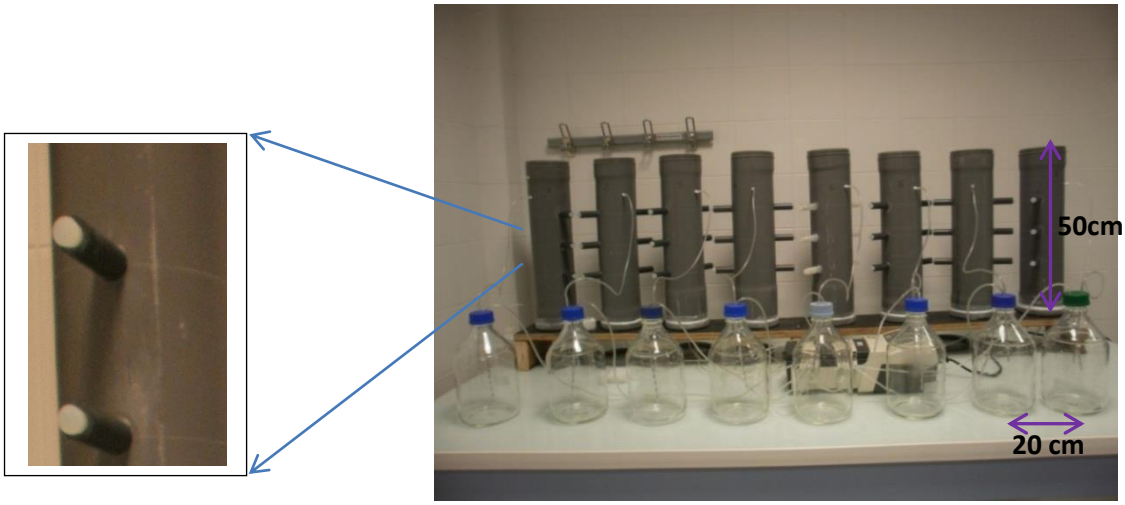


Figure 24: Photographie des bioréacteurs utilisés pour la bioremediation des sédiments.

6.5. Le monitoring de procédé de bioremédiation

Pour la métrologie du procédé appliqué, on a réalisé des prélèvements de sédiments à partir des trois portes de prélèvements (S1,S2 et S3), concernant les analyses effectuées sur une matrice liquide, celles-ci sont prélevées à partir des effluents de circulation.
Ces différentes opérations ont été faites tout au long du suivi de procédé (3 mois) avec des fréquences variables (**Tableau 20**).

Tableau 20: fréquences des prélèvements effectués pour le suivi de la bioremédiation des sédiments traités

Type de monitoring	Monitoring effectué	Matrice utilisée	Fréquence
Suivi microbiologique	Suivi des souches utilisées en bioaugmentation	Sédiment brut	Au début et à la fin de suivi
	Profil métabolique microbien	Effluent de sédiment	T initial et tous les 10 jours
	Dénombrement de la biomasse totale		T initial et tous les 3 jours
Suivi de toxicité et de mutagénicité	Test d'(éco)toxicité	Lixiviat et effluent de sédiment	T initial et tous les 3 jours
	Test d'Ames	Effluent de sédiment	T initial et tous les 30 jours
Suivi chimique	Détermination de COT dissous	Lixiviat de sédiment	T initial et tous les 3 jours
	Détermination des métaux et TBT disponibles	Lixiviat de sédiment	T initial et tous les 3 jours
	Dosage des polluants	Sédiment brut	T initial et tous les 10 jours

7. Tests statistiques

La significativité des différences entre les modalités est testée avec le test d'ANOVA et les comparaisons par paires ont été effectuées avec le test de Fischer.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

Partie I : Isolement, identification et détermination de la capacité de biodégradation des souches bactériennes

1. Isolement et identification des souches dégradant le BaP et/ou le DDT à partir de la lagune de Bizerte

1.1. Liste des souches

Huit souches bactériennes ont pu être sélectionnées par la méthodologie décrite précédemment (**Tableau 21**).

- ***Cupriavidus metallidurans* LBJ (*C. metallidurans* LBJ)**

Cupriavidus metallidurans: (Règne : Bacteria, Embranchement : Proteobacteria, Classe : Beta Proteobacteria, Ordre: Burkholderiales, *Famille : Oxalobacteraceae, Genre : Cupriavidus*)
La souche *Cupriavidus metallidurans* (Mergeay, 1978; Mergeay et al., 2003) est connue par sa résistance à plusieurs métaux lourds, elle présente des gènes codant pour des fonctions de résistance aux métaux lourds portés par des méga-plasmides (Diels et al., 2009).

- ***Rhodococcus equi* LBB (*R. equi LBB*)**

*Rhodococcus equi (*classe : *Actinobacteria*, sous-classe : *Actinobacteridae*, ordre : *Actinomycetales*, sous-ordre des *Corynebacterineae*, famille des *Nocardiaceae*, genre : *Rhodococcus)*
Il a était démontré que cette souche peut dégrader l'hexane et d'autres composés aromatiques (Bouchez et al., 2001).
En 2011, Song et ses collègues ont montré que la souche *Rhodococcus* sp. P14 est la première bactérie du genre *Rhodococcus* qui a la capacité de dégrader les HAP à haut poids moléculaire (Song et al., 2011). Des travaux réalisés par Bajaj et ces collaborateurs en 2014 ont montré la capacité de *Rhodococcus equi* à dégrader le DDT et ses métabolites (Bajaj et al., 2014).

- ***Pseudomonas pachastrellae* CB-52**

Pseudomonas pachastrellae (Phylum : Proteobacteria., Classe : Gammaproteobacteria., Ordre : Pseudomonadales., Famille : Pseudomonadaceae., Genre et espèce : *Pseudomonas pachastrellae)*
Pseudomonas pachastrellae est une bactérie marine nouvellement identifiée (Romanenko et al., 2005). Des travaux réalisés en 2011 ont montré que cette souche dégrade le pétrole brut (Joel et al., 2011).

- ***Microbacterium paraoxydans* CB-56**

Microbacterium paraoxydans (Phylum : Actinobacteria, Ordre : Actinomycet*ales*, Sous-ordre : Micrococcineae, Genre : *Microbacterium)*
Dans la littérature il n'y a pas des études qui montrent la capacité de cette bactérie à dégrader les HAP ni les pesticides.

- ***Microbacterium maritipicum* CB7 (*M. maritypicum* CB7)**

*Microbacterium maritipicum (*Phylum : Actinobacteria, Ordre : Actinomycet*ales*, Sous-ordre : Micrococcineae, Genre : *Microbacterium)*

Il a été démontrée que *Microbacterium maritipicum* dégrade les HAP l'anthracène (Salam et al., 2014), phenanthrène et le pyrène (Schippers et al., 2005 ; Rodrigo et al., 2007). Sa capacité à dégrader le BaP ou le DDT n'a pas été démontrée dans la bibliographie.

- ***Microbacterium sp.* MB50-GJ**

Microbacterium sp. (Phylum : Actinobacteria, Ordre : Actinomycet*ales*, Sous-ordre : Micrococcineae, Genre : *Microbacterium)*
Les bactéries du genre *Microbacterium* possèdent la capacité à métaboliser un ensemble de xénobiotiques et même des métaux lourds. En outre *Microbacterium sp.* isolée à partir d'un échantillon de boue de minerai de fer, avait un haut degré de tolérance au chromate (Liu et al., 2012).
La même étude a également montré que *Microbacterium sp.* possède un certain degré de résistance à des métaux lourds, par exemple Cd, Pb, Zn, Cu, Co, Hg et Ag.
Cette même souche s'est révélée résistante à l'arsenic, au nickel, au zinc, au sélénium et au chrome stanneux ainsi qu'à une concentration de 100 µg/mL cobalt. Elle présente également une sensibilité variable au mercure, le cadmium, le plomb et l'antimoine présent dans un sol contaminé par un effluent textile (Kaushiket al., 2012). Cependant le rôle de *Microbacterium sp.* dans la dégradation du BaP ou du DDT n'a pas été démontré.

- ***Acinetobacter* sp. MB25-B**

*Acinetobacter sp. (*Phylum : Gammaproteobacteria**,** Ordre : Pseudomonadales**,** Famille: Moraxellacées**,** Genre et espèce : *Acinetobacter* sp.)
Une caractéristique remarquable de nombreuses souches du genre *Acinetobacter* est qu'elles sont capables d'utiliser une large gamme de divers composés (tels que les hydrocarbures) comme sources de carbone et d'énergie, et de croître sur des milieux relativement simples. Ce métabolisme leur confère une capacité d'adaptation élevée qui explique que ces bactéries soient retrouvées dans des environnements variés.
En outre les espèces *d'Acinetobacter* sont naturellement résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques, y compris la pénicilline, le chloramphénicol, et souvent les aminosides (Le et al., 2012). Des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* ont été sélectionnées à partir d'un sol à Hong Kong contenant entre 3,6 à 33,4 mg/kg du DDT (Chiu et al., 2006).
Pour ces raisons, elles constituent un intérêt croissant en vue d'applications biotechnologiques et environnementales, telle que la bioremédiation.

- ***Pseudomonas stutzeri* LBR (*P. Stutzeri* LBR)**

Pseudomonas stutzeri (Phylum : Proteobacteria., Classe : Gammaproteobacteria., Ordre : Pseudomonadales., Famille : Pseudomonadaceae., Genre et espèce : *Pseudomonas stutzeri.*
Cette bactérie est connue pour son métabolisme diversifié et son omniprésence dans des environnements pollués : les eaux marines, le sol (Lalucat et al., 2006). Ceci lui confère une diversité phénotypique et génotypique extrêmement large.
Pseudomonas stutzeri est connue comme une bactérie dénitrifiante, elle est considérée comme une espèce modèle dans l'étude de ce processus (Zumft ; 1997). Elle a été reconnue pour sa capacité à dégrader le benzène (Cafaro et al., 2005), la naphtalène (Garcia et al., 2012) et le phénanthrène (Grimberg et al., 1996) mais aussi le chlorpyrifos, un pesticide organophosphoré (Sasikala et al., 2012). Une étude récente a montré que *Pseudomonas stutzeri* est capable de dégrader un mélange de pétrole brut (Parthipan et al., 2017).

Tableau 21: Distribution des souches sélectionnées selon la source de carbone et sa concentration (croissance bactérienne, - : absence de croissance)

Substrat / Souches	DDT (mg/L)		BaP (mg/L)		DDT+BaP
	25	50	50	100	
Cupriavidus metallidurans	+	+	+	+	+
Rhodococcus equi	+	+	+	+	+
Pseudomonas pachastrellae	+	+	-	-	-
Microbacterium paraoxydans	+	+	+	-	-
Microbacterium maritypicum	+	+	+	+	-
Microbacterium sp.	+	+	-	-	-
Acinetobacter sp .	+	+	-	-	-
Pseudomonas stutzeri	+	+	+	-	+

Les résultats présentés dans ce tableau montrent que les huit souches sont capables de se développer en présence de DDT. En présence de BaP, la croissance est absente pour 3 des souches testées, cette absence de croissance est encore plus marquée lorsque les bactéries sont mises en présence du mélange DDT et BaP.

1.2. Tests de toxicité

1.2.1. Tests de toxicité des souches autochtones

Vu que dans l'environnement une souche bactérienne est exposée non pas à un seul polluant mais à un mélange de polluants, nous avons décidé de déterminer parmi les huit souches sélectionnées les bactéries les plus résistantes à la toxicité d'un mélange BaP + DDT + métaux lourds.
Les essais de toxicité ont été réalisés à l'aide de la résazurine et nous avons pu déterminer le CI_{50} de ces différentes souches une fois exposées au mélange. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 22**.

Tableau 22: Différentes concentrations d'inhibition de la formation de résorufine (CI_{50}) en mg/L du DDT et /ou du BaP des différentes souches (Mtx= mélange de métaux lourds)

Les souches bactériennes	CI_{50} mg/L		
	DDT	BaP	DDT+BaP+Mtx
Pseudomonas stutzeri LBR	**250**	**95**	**40**
Cupriavidus metallidurans LBJ	**100**	**100**	**40**
Rhodococcus equi LBB	**235**	**100**	**40**
Microbacterium maritipicum CB7	100	45	10
Pseudomonas pachastrellae	50	15	10
Microbacterium paraoxydans	215	50	10
Microbacterium sp.	100	45	10
Acinetobacter sp.	95	20	10

D'après le tableau ci-dessus nous pouvons conclure que les souches les plus compétentes sont les suivantes : *Pseudomonas stutzeri* LBR, *Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB.
Etant données que la CI_{50} en présence du mélange DDT + BaP + métaux lourds des trois souches choisies, est de 40 mg/L, nous avons choisi de continuer à travailler avec une concentration de 10 mg/L du DDT et de 10 mg/L de BaP, pour garantir un meilleur rendement des souches bactériennes.

1.2.2. Étude des souches de références

Pour conforter notre choix sur les trois souches retenues, parmi le souchier initial, et s'assurer qu'elles sont les plus compétentes pour la biodégradation du mélange DDT + BaP et résistantes aux métaux lourds, des souches références de même genre et espèce ont été commandées de chez DSMZ. Ces dernières ont subi les mêmes tests de toxicité que nos souches de départ.
Les résultats obtenus à partir des trois expériences indépendantes sont fournis dans le tableau ci-dessous (**Tableau 23**).

Tableau 23: Caractéristiques toxicologiques des trois souches de références

CI_{50} Souches bactériennes	CI_{50} DDT (mg/L)	CI_{50} BaP (mg/L)	Ci_{50} du mélange DDT + BaP + Mtx (mg/L)
Cupriavidus metallidurans CH3 (2839)	20	10	10
Rhodococcus equi (43950)	10	10	Pas de respiration
Pseudomonas stutzeri (6084)	10	20	Pas de respiration

Les résultats obtenus confirment que les trois souches sélectionnées à partir de l'eau de la lagune de Bizerte sont plus résistantes au mélange DDT, BaP et métaux lourds par rapport aux souches de références qui sont elles-mêmes issues des environnements contaminés différents. Ceci justifie le choix des souches bactériennes pour la suite du travail.

- Un souchier composé de huit souches bactériennes était isolé à partir de la lagune de Bizerte pour la biodégradation du DDT et /ou du BaP
- Suite à des tests de toxicité trois souches du souchier initial, ont été retenues pour ses capacités à dégrader le DDT et le BaP en mélange, ces souches sont *Pseudomonas stutzeri* LBR, *Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB.
- La comparaison de ces souches par rapport à des souches de références montre que les souches que nous avons sélectionnées ont une meilleure adaptation et capacité de biodégradation du DDT + BaP que les autres souches.

1.3. Test de biodégradation: Demande Biologique en Oxygène (DBO)

Ce test est basé sur la mesure de la Demande Biologique en Oxygène (DBO), il permet de quantifier l'oxygène consommé par les bactéries durant la biodégradation du mélange DDT + BaP + métaux lourds, au cours du temps (dix ou cinq jours en fonction des souches).

Durant le test, le BNa (Benzoate de sodium) est utilisé comme témoin positif permettant de vérifier que la respiration a eu lieu. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous :

- ***Pseudomonas stutzeri* LBR**

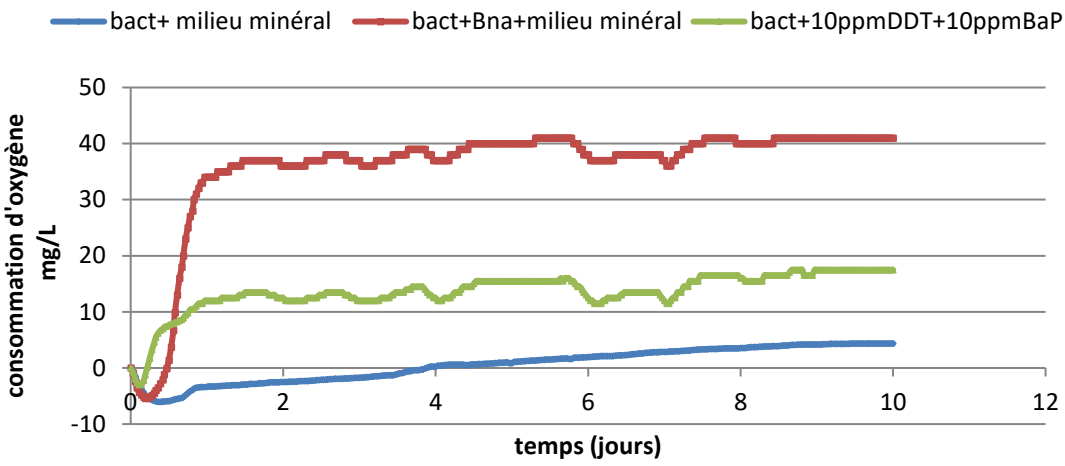


Figure 25: Évolution de la consommation d'oxygène chez *Pseudomonas stutzeri LBR* pendant dix jours, en présence de 10 mg/L DDT+10 mg/L BaP avec leurs témoins respectifs : témoin positif (bactérie + milieu minéral + BNa) et témoin inoculum (bactérie + Milieu minéral), (bact= bactérie, ppm=mg/L).

D'après ces courbes nous pouvons estimer un pourcentage de biodégradation de DDT et de BaP par *Pseudomonas stutzeri* LBR de 15 % après 10 jours d'incubation

- ***Cupriavidus metallidurans* LBJ**

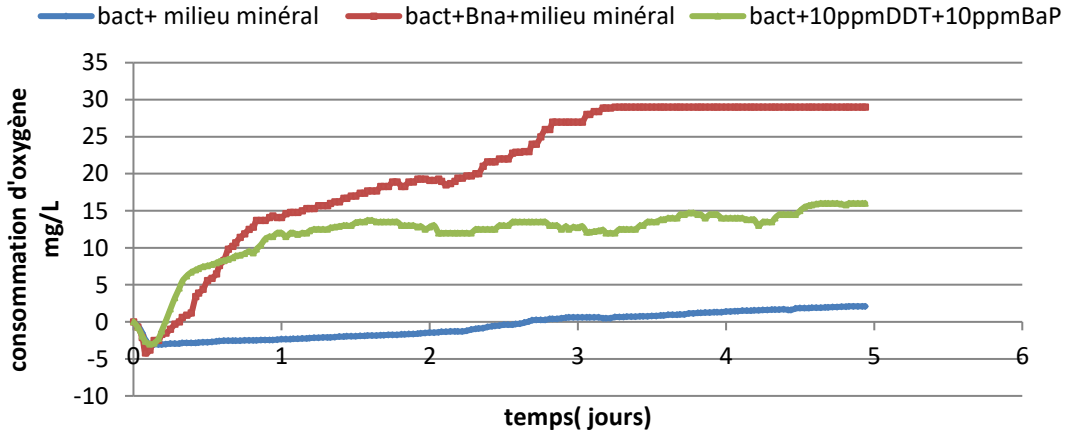


Figure 26: Évolution de la consommation d'oxygène chez *Cupriavidus metallidurans* LBJ pendant dix jours, en présence de 10 mg/L DDT+10 mg/L BaP avec leurs témoins respectifs : témoin positif (bactérie + milieu minéral + BNa) et témoin inoculum (bactérie + Milieu minéral), (bact= bactérie, ppm=mg/L) .

D'après ces courbes nous pouvons estimer un pourcentage de biodégradation de DDT et de BaP par *Cupriavidus metallidurans* LBJ de 14,76 % après 5 jours d'incubation.

➢ ***Rhodococcus equi* LBB**

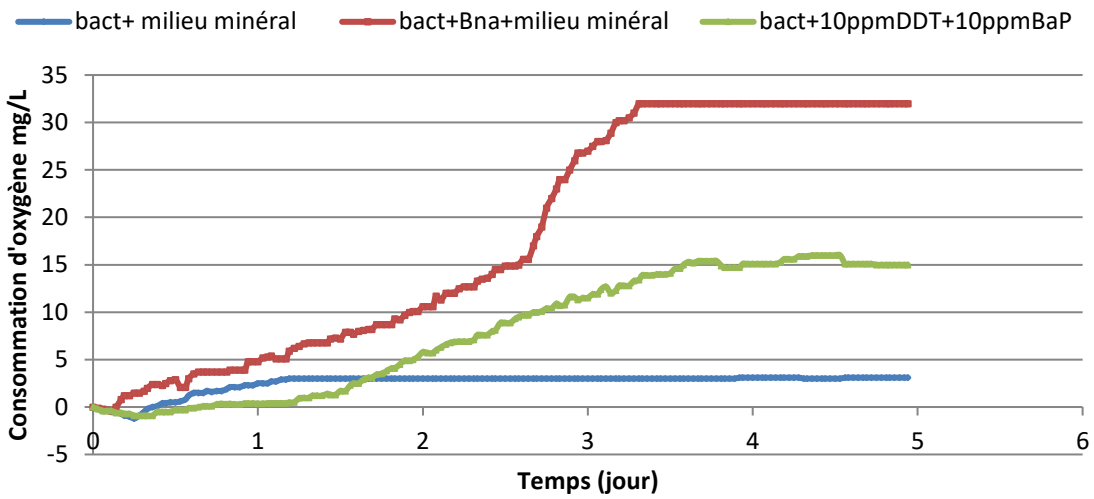


Figure 27: Évolution de la consommation d'oxygène chez *Rhodococcus equi* LBB pendant dix jours, en présence de 10 mg/L DDT+10 mg/L BaP avec leurs témoins respectifs : témoin positif (bactérie + milieu minéral + BNa) et témoin inoculum (bactérie + Milieu minéral), (bact= bactérie, ppm=mg/L).

D'après ces courbes nous pouvons estimer un pourcentage de biodégradation de DDT et de BaP par *Rhodococcus equi* LBB est de 13,2 % après 5 jours d'incubation.

Dans ce qui suit nous présentons les travaux réalisés pour la valorisation des souches bactériennes sélectionnées dans la biodégradation du DDT et du BaP en présence et en absence d'un champ magnétique statique.

2. Étude de la cinétique de biodégradation du DDT et/ou du BaP et effet du champ magnétique statique (CMS)

Nous avons suivi l'effet du champ magnétique statique sur la biodégradation dans deux cas de figures:

- 1er cas : Nous avons étudié l'effet d'un champ magnétique statique (CMS) de 200 mT sur la biodégradation du mélange DDT et BaP en présence des souches isolées *P. stutzeri* LBR, *C. metallidurans* LBJ et *R. equi* LBB isolées et en consortium.

- 2nd cas : Nous avons étudié l'effet de plusieurs inductions du CMS (50, 100 and 200 mT) sur la biodégradation du BaP en présence de la souche isolée *M. maritypicum* CB7.

2.1. Étude de la cinétique de biodégradation du mélange DDT et BaP en mélange

2.1.1. Étude de la biodégradation du mélange DDT et BaP en absence de CMS

➢ **Cas de l'utilisation des souches isolées**

Les souches bactériennes *P. stutzeri* LBR, *C. metallidurans* LBJ et *R. equi* LBB ont été ensemencés séparément dans un milieu minimum M9 additionné par 10 mg/L de DDT et 10 mg/L de BaP pendant 30 jours à pH 7,0 et à 30 °C. Ceci est dans le but d'étudier leurs capacités à dégrader les polluants en mélange (**Tableau 24**).

Tableau 24: Biodégradation du DDT (10 mg/L) et du BaP (10 mg/L) en mélange en présence de Pseudomonas stutzeri LBR, Cupriavidus metallidurans LBJ et Rhodococcus equi LBB pendant 30 jours.

	***P. stutzeri* LBR**	***C. metallidurans* LBJ**	***R. equi* LBB**
	Pourcentage de biodégradation (%)		
DDT	87 ± 1,52	79 ± 2,44	68 ± 2,71
BaP	83 ± 0,95	57 ± 1,79	50± 2,49

Comme le montre le **tableau 24**, *P. stutzeri* LBR a dégradé 87 % du DDT et 83 % du BaP présents dans le milieu et ceci durant 30 jours. Dans les mêmes conditions *C. metallidurans* LBJ a dégradé 79 % du DDT et 57 % du BaP. Cependant, *R. equi* LBB a pu dégrader environ 68 % du DDT et seulement 50 % du BaP. Ces résultats ont montré que l'efficacité de la dégradation du DDT et du BaP par les souches testées varie en fonction de l'espèce.

- **Cas de l'utilisation d'un consortium**

Dans les mêmes conditions, nous avons testé l'efficacité de biodégradation du DDT et du BaP en mélange par le consortium bactérien formé par les trois souches (*P. stutzeri* LBR, *C. metallidurans* LBJ et *R. equi* LBB) (**Figure 28**).

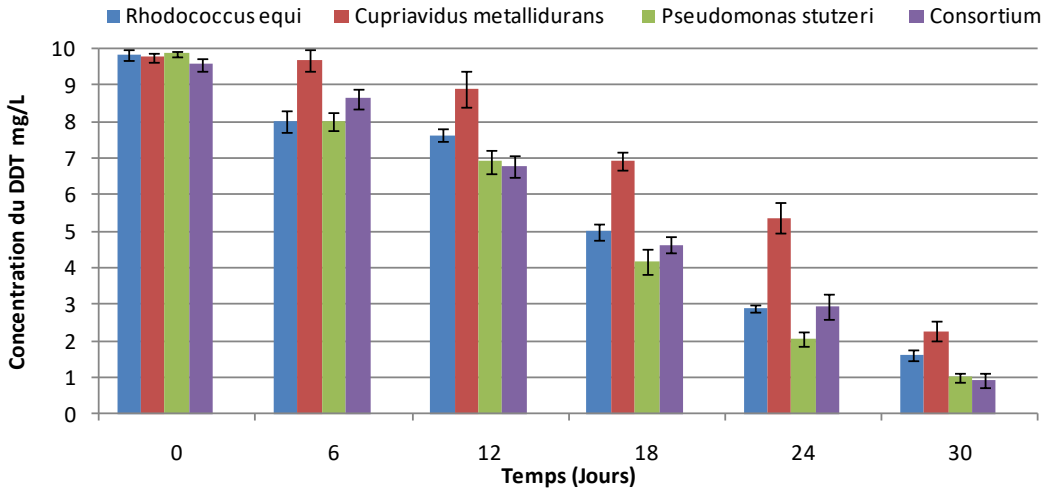


Figure 28: Biodégradation du DDT (a) et du BaP (b) en mélange avec le consortium constitué de *Pseudomonas stutzeri* LBR, *Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB pendant 30 jours.

D'après la figure 30 nous pouvons conclure qu'en présence du consortium bactérien le taux de biodégradation du DDT est de 90 % tandis que le taux de biodégradation du BaP est de 83 %. Ces résultats montrent bien qu'il y a une nette amélioration du taux de biodégradation du mélange DDT avec BaP, comparant aux résultats obtenus en présence des souches isolées dans les mêmes conditions.

2.1.2. Étude de la biodégradation du mélange DDT et BaP avec l'effet d'un champ magnétique statique (CMS)

- **Cas de l'utilisation des souches isolées**

Nous avons étudié l'effet d'un champ magnétique statique de 200 mT (induction durant 5 h avant le début de suivi) sur la capacité de biodégradation du DDT et BaP en mélange, par les souches isolées (*P. stutzeri* LBR, *C. metallidurans* LBJ et *R. equi* LBB). L'expérience a été réalisée avec des souches individuelles en milieu M9 additionné de DDT (10 mg/L) et de BaP (10 mg/L) durant 5 jours à 30°C (**Tableau 25**).

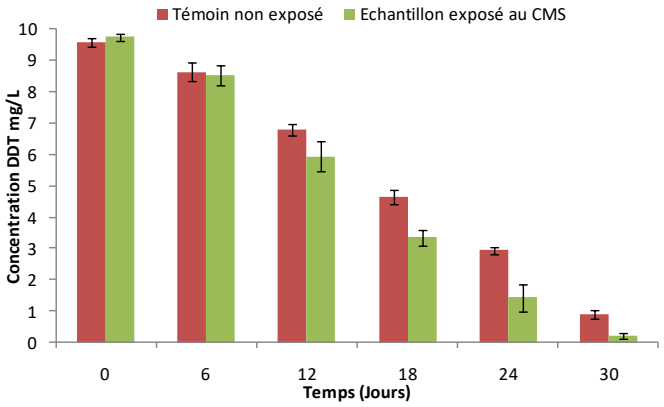
Tableau 25: Effet d'une induction de 200 mT sur la biodégradation du DDT et du BaP

	Pourcentage de biodegradation								
	***P. stutzeri* LBR**			***C. metallidurans* LBJ**			***R. equi* LBB**		
	Sans CMS	Avec CMS	Facteur de gain	Sans CMS	Avec CMS	Facteur de gain	Sans CMS	Avec CMS	Facteur de gain
DDT	16 (±0,451)	34,5 (± 1,321)	2,15	12 (±1,467)	29,8 (±2,321)	2,48	10 (±1,487)	30 (±2,319)	3
BaP	9 (±0,159)	21,5 (±2,132)	2,38	6,8 (±0,982)	18,2 (±1,022)	2,67	9,3 (±0,451)	19 (±3,237)	2

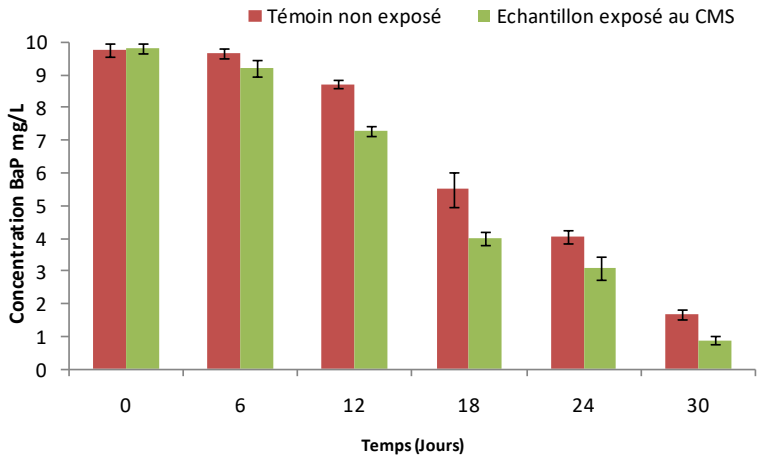
Les résultats obtenus dans le tableau 25 montrent que le CMS présente un effet positif sur le taux de biodégradation du DDT et du BaP en mélange. D'ailleurs nous pouvons conclure que pour les trois souches testées séparément et après 5 jours d'expérience suite à l'application d'un CMS nous avons un gain dans le pourcentage de biodégradation de 2 à 3 fois par rapport aux témoins (sans CMS) (**Tableau 25**).

- **Cas de l'utilisation d'un consortium bactérien**

Nous avons testé l'effet d'un CMS de 200 mT (induction durant 5 h avant le début de l'expérience) sur le taux de biodégradation du DDT et du BaP en mélange en présence du consortium bactérien (*P. stutzeri* LBR, *C. metallidurans* LBJ et *R. equi* LBB) et ceci durant 30 jours à 30 °C (**Figure 29**).



(a)



(b)

Figure 29: Cinétique de biodégradation du DDT (10 mg/L) (a) et BaP (10 mg/L) (b) en mélange avec un consortium composé de *P. stutzeri*, *C. metallidurans* et *R. equi* pendant 30 jours, avec et sans champ magnétique statique.

D'après la figure ci-dessus nous pouvons conclure que le taux de biodégradation du DDT est de 98 % en présence du CMS par rapport à 90 % en son absence et le taux de biodégradation du BaP est de 90 % en présence du CMS par rapport à 83 % en son absence. D'après ces résultats nous pouvons conclure qu'il y a une nette amélioration ($p<0,05$) du taux de biodégradation du mélange DDT et BaP sous l'effet d'un CMS de 200 mT en présence du consortium bactérien par rapport à l'expérience réalisé dans les mêmes conditions en son absence.

- Les bactéries isolées LBR, LBJ et LBB de la lagune de Bizerte ont été caractérisées et identifiées comme étant liées à: *Pseudomonas stutzeri*, *Cupriavidus metallidurans* et *Rhodococcus equi* respectivement selon son ADNr 16S, ainsi que des caractéristiques biochimiques avec 100 % d'identité.
- L'utilisation de ces bactéries isolées dans la dégradation du mélange de BaP-DDT a été réalisée et le résultat révèle leur capacité à dégrader ces polluants. L'utilisation d'une induction de 200 mT d'un champ magnétique statiques peut améliorer l'efficacité de la biodégradation du mélange BaP-DDT avec de bons taux de biodégradation. Cependant, d'autres études alliant la combinaison de la capacité de biodégradation de ces isolats et du CMS dans l'eau et les sédiments pollués doivent être menées avec soin afin de développer un processus de bioremédiation plus efficace.

2.2. Étude de la cinétique de biodégradation du BaP par *M. maritypicum* CB7

2.2.1. Biodégradation du BaP par M. maritypicum CB7 en absence de CMS

Nous avons étudié la croissance de *M. maritypicum* CB7 dans un milieu M9 additionné de BaP à 10 mg/L. Les résultats sont présentés dans la **figure 28**. Après 30 jours de croissance en présence de BaP comme source de carbone unique, *M. maritypicum* CB7 peut éliminer 69 % du BaP initial. Aucune croissance significative n'a été obtenue dans les cultures inoculées avec *M. maritypicum* CB7 sans addition de BaP comme source de carbone.

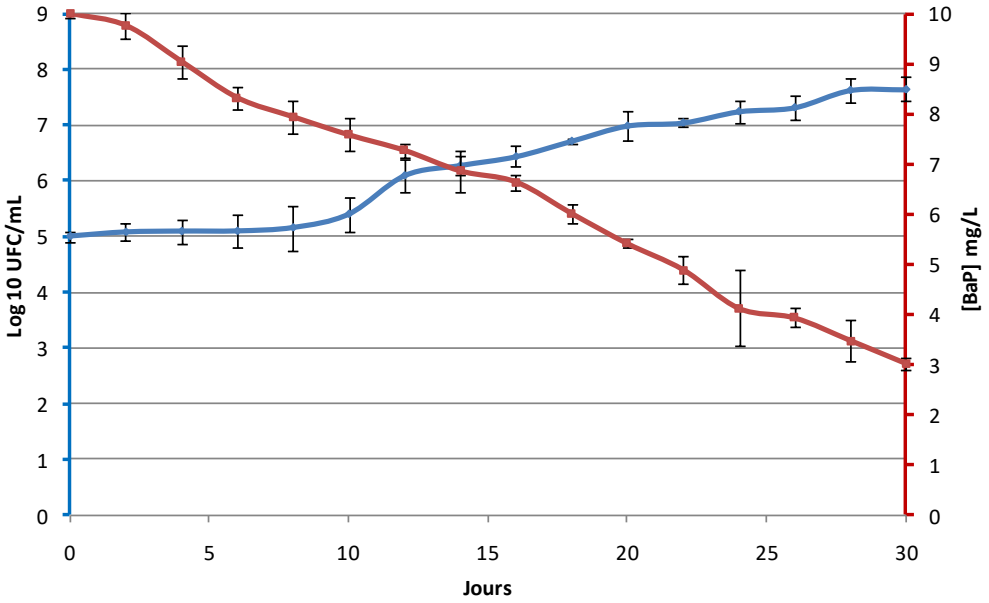


Figure 30: Courbe de dégradation du BaP au cours de la croissance de la souche *M. maritypicum* CB7 durant 30 jours mesuré par CLHP. La courbe bleue correspond à la croissance cellulaire en Log_{10} UFC/mL.

La biodégradation du BaP a montré une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration du BaP dans le milieu de 10 mg/L à 3,1 mg/L après 30 jours de culture (correspondant à un taux de biodégradation de 69 %). Cette modification de la concentration du BaP dans le milieu s'accompagne d'une augmentation significative ($p < 0,05$) de la croissance bactérienne de 5 Log_{10} à 7,8 Log_{10} UFC/mL après 30 jours de croissance. Dans un milieu M9 dépourvu de BaP (témoin négatif), la souche de *M. maritypicum* CB7 est incapable de croître (**figure 28**).

2.2.2. Biodégradation du BaP par *M. maritypicum* CB7 en présence de CMS

Afin d'améliorer le taux de biodégradation du BaP par la bactérie *M. maritypicum* CB7, nous avons choisi de tester l'effet de différentes inductions (50, 100 et 200 mT de CMS) durant 5 jours.

Les résultats (**figure 29**) indiquent que le taux de biodégradation est proportionnel à l'augmentation de l'induction du champ magnétique.

En effet, pour les échantillons témoins, la concentration du BaP a baissé de 10 à 7 mg/L. L'exposition de l'échantillon à une induction de 50 mT a augmenté la biodégradation du BaP, la concentration du BaP a passée de 10 mg/L à 6 mg/L. En augmentant l'induction du champ à 100 mT, la biodégradation du BaP a augmenté significativement et est passée de 10 mg/L à 5,8 mg/L. A 200 mT, la concentration du BaP

baisse de 10 mg/L à 3,9 mg/L. Le CMS a donc eu un effet positif sur l'amélioration de la biodégradation du BaP par la souche de *M. maritypicum* CB7 (**figure 29**).

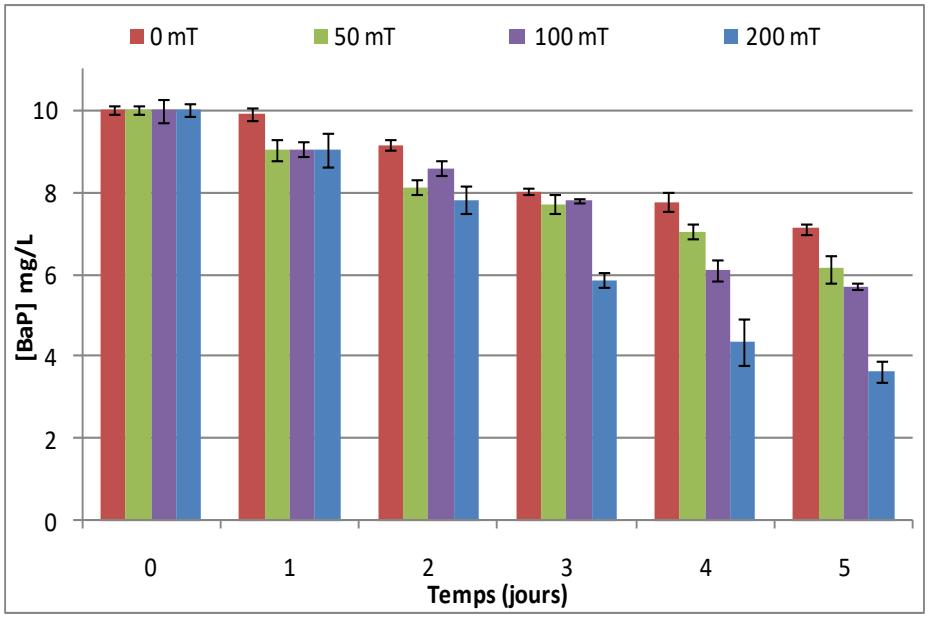


Figure 31: Effet de différentes inductions du champ magnétique statique sur la biodégradation du BaP par *M. maritypicum* CB7 mesuré par CLHP

En effet, en présence d'une induction d'un CMS de 100 mT nous avons obtenu un pourcentage de biodégradation de 42 % et en présence d'une induction de 200 mT, le taux de biodégradation a doublé pour atteindre 61 % par rapport à un taux de 30 % en l'absence de CMS (Mansouri et al., 2017).

- La biodégradation du BaP par *M. maritypicum* CB7 a été examinée et les résultats ont montrés qu'il est capable d'utiliser le BaP comme seule source de carbone et d'énergie. *M. maritypicum* CB7 est capable de dégrader 69 % du BaP pendant 30 jours à 28 °C et à pH 7,0 lorsque la concentration initiale du BaP était de 10 mg/L.
- Afin d'améliorer l'efficacité de la biodégradation du BaP par *M. maritypicum* CB7, nous avons testé l'effet de différentes inductions (50, 100 et 200 mT) sur un champ magnétique statique. Les résultats montrent que les deux inductions du CMS (100 et 200 mT) améliorent significativement le taux de biodégradation du BaP par la souche *M. maritypicum* CB7.

De nos jours, l'utilisation des micro-organismes génétiquement modifiés pour la dépollution des milieux naturels, est interdite (Sayler et al., 2000). Pour cette raison, plusieurs efforts sont consacrés pour améliorer les performances des micro-organismes en biodégradation. Plusieurs voies sont explorées actuellement tels que l'application d'un champ magnétique statique. Les travaux publiés ont montré qu'un champ magnétique peut avoir plusieurs effets sur le métabolisme des microorganismes avec

l'accélération ou inhibition d'un certain nombre d'enzymes. Généralement, l'impact du CMS dépend de son intensité, les résultats obtenus par Yavuz et Celebi, 2000, montrent que le taux d'élimination des polluants du substrat de boue a été augmenté jusqu'à 44 % en augmentant la force du champ magnétique. Ces résultats sont en accord avec nos travaux suite à l'utilisation de plusieurs inductions (Mansouri et al., 2017)

D'autres travaux ont montré qu' à plus de 1T, les processus physiologiques dans les organismes seront inhibés (Miyakoshi, 2005). Cependant, un CMS à faible induction peut sur-exprimer les enzymes responsables de la dépollution et stimuler dans ce cas la biodégradation des polluants dans les eaux usées (Niu et al., 2013). Une étude réalisée par Filipic et ses collaborateurs a prouvé que l'exposition à de faibles intensités de CMS (17 mT) affecte l'activité des processus physiologiques des microorganismes de deux façons: elle peut stimuler l'activité de certaines enzymes pour la biodégradation des composés organiques et la réptimer d'autres enzymes de croissance chez *Escherichia coli* et *Pseudomonas putida* (Filipic ^ et al., 2012). Selon Křiklavová et al. (2014), la perméabilité de la membrane serait affectée par le champ électromagnétique et pourrait entraîner des altérations du transport ionique des substrats. En conséquence, le métabolisme cellulaire a été stimulé pour augmenter l'absorption et la dégradation du DDT et du BaP. Ces modifications de la membrane cellulaire modifient sa composition ionique mais aussi les propriétés de transport biochimiques et mécaniques. Ces modifications pourraient améliorer l'activité enzymatique spécifique (Hunt et al., 2009).

Le rôle du CMS dans la biodégradation des polluants organiques a reçu relativement peu d'attention; mais il a été étudié avec plusieurs souches bactériennes (Fojt et al., 2007; Hunt et al., 2009). Des effets positifs ont été obtenus avec une amélioration du traitement des eaux usées (Hunt et al., 2009), ceci est en accord avec les résultats que nous avons trouvé. Cependant, l'influence de la CMS modérée sur la physiologie bactérienne est encore mal comprise et les mécanismes responsables des effets du CMS sur les processus de traitement des eaux usées restent inconnus. Potenza et al. (2004) ont indiqué qu'un CMS élevé (300 mT) pourrait influencer la croissance cellulaire et l'expression des gènes. Ces effets biologiques peuvent être associés à diminution de la stabilité de l'ADN suite à des perturbations par interaction directe ou indirecte (activité des radicaux oxydants). Dans une autre étude, Mihoub et al. (2012) ont observé un remodelage de la composition lipidique membranaire de *Salmonella typhimurium* sous l'effet d'un CMS de 200 mT. Křiklavová et al. (2014) ont observé que le CMS améliore la biodégradation du phénol d'environ 35 % dans le cas de *Rhodococcus erythropolis* et accélére la croissance autour de 28 % dans un réacteur alimenté par lot.

Selon Zaidi et al. (2014), le CMS permet d'accroître les performances de traitement des eaux usées car, d'une part il est possible d'améliorer la performance physique en terme de séparation solide-liquide principalement par l'agrégation des particules colloïdales. Et d'autre part car il modifie les propriétés biologiques grâce à l'amélioration de l'activité bactérienne. L'utilisation de CMS pour l'application de bioremédiation a déjà été prouvée comme une option prometteuse pour l'élimination du DDT et du BaP.

Partie II : Métrologie de procédé de bioremédiation des sédiments de la lagune de Bizerte

Lors de cette étude nous avons utilisé huit bioréacteurs, quatre ont été bioaugmentés et 4 témoins (non bioaugmentés). Ces bioréacteurs ont été remplis par des sédiments de la lagune de Bizerte préalablement mélangés et homogénéisés. La bioaugmentation a été effectuée par l'ajout des trois souches sélectionnées à partir de l'eau de la lagune de Bizerte et formant le consortium bactérien (*P. stutzeri* LBR, *C. metallidurans* LBJ et *R. equi* LBB), comme décrit précédemment.

La capacité épuratoire globale des bioréacteurs a été suivie durant 90 jours, prenant en considération à la fois les caractéristiques microbiologiques, chimiques et écotoxiques des sédiments traités. Les résultats vont être présentés pour les deux conditions (avec ou sans bioaugmentation).

1. Homogénéité et stabilité des bioréacteurs

Lors de cette étude 8 réacteurs ont été étudiés, 4 ont été bioaugmentés et 4 témoins (non bioaugmentés). Afin de vérifier la stabilité et l'homogénéité des réacteurs, nous avons suivi les caractéristiques physico-chimiques, microbiologiques et métaboliques de chaque bioréacteur.
Les réacteurs ont été maintenus dans une salle thermostatée à 19 °C ± 1, en accord avec la température moyenne des sédiments enregistrée au niveau de la lagune de Bizerte (Boufahja et al., 2013).

1.1. Évolution des paramètres physicochimiques

Les échantillons de sédiments prélevés de la lagune, ont été analysés avant de mettre en œuvre le procédé de bioremédiation. La demande chimique en oxygène (DCO) a été évaluée pour les sédiments bruts à 45 mg d'oxygène par g de sédiments, valeur comparable aux résultats publiés par Martins et al. (2015).
La réussite de l'opération de bioremédiation nécessite que le processus de biodégradation soit maintenu sans carence, aussi les paramètres clés pH, N, P et O_2 dissous ont été suivis en continu durant 90 jours (**Figure 32**).

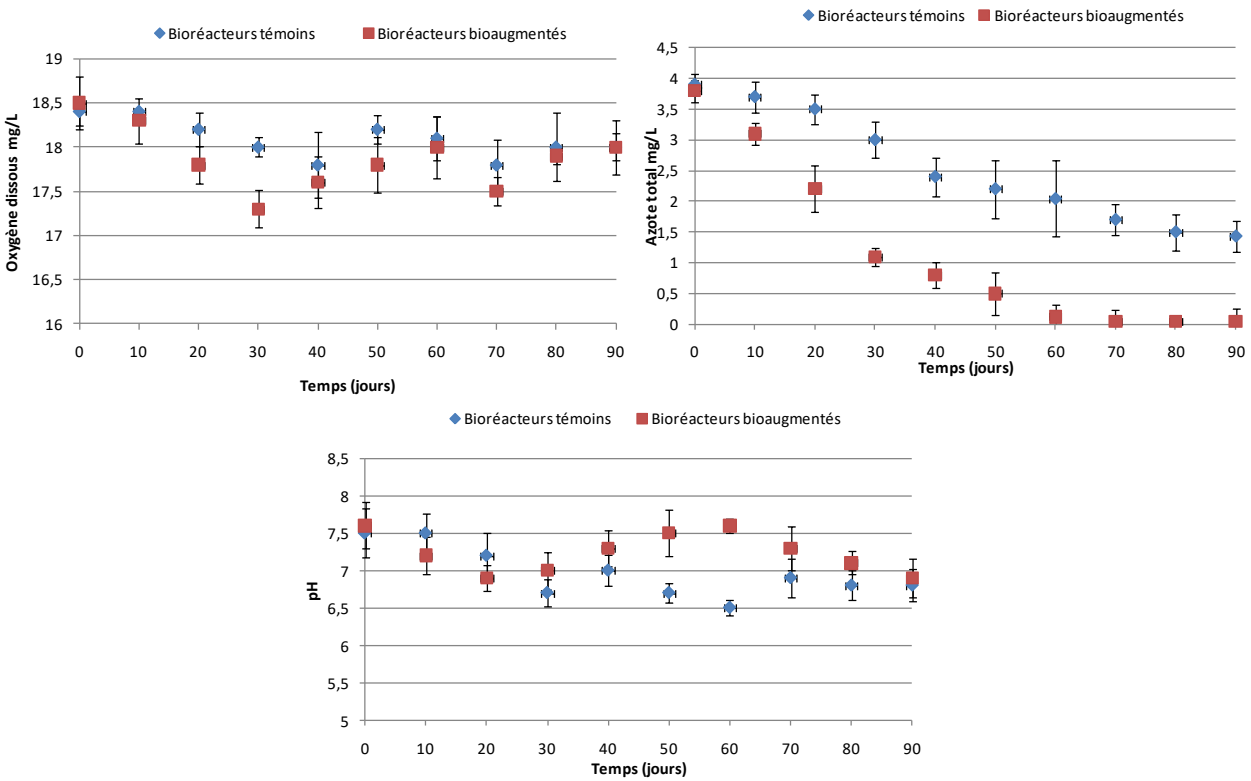


Figure 32: Évolution des paramètres clés (pH, N et P) dans les bioréacteurs témoins (en bleu) et bioaugmentés (en rouge)

Les résultats présentés dans la **figure 32,** montrent que durant les 90 jours, le pH varie peu entre les réacteurs d'un même type, une légère acidification (non significative) est constatée pour les réacteurs témoins sur la période 50-60 jours. L'oxygène (données non représentées) a été maintenu constant grâce à un bullage forcé appliqué au niveau des bouteilles d'alimentation des bioréacteurs, et au débit de circulation de l'effluent dans les bioréacteurs (4,2 mL/min).

Concernant l'azote et le phosphore, les réacteurs d'une même condition sont homogènes et leur concentration diminue au cours du temps. Cependant, la concentration en azote devient non quantifiable dans les réacteurs bioaugmentés à partir de 70 jours d'expérimentation. En ce qui concerne le phosphore, la concentration chute également plus fortement dans les réacteurs bioaugmentés que dans les témoins et elle se stabilise à partir de 70 jours autour de 0,025 g/kg. Malgré cette chute en azote et phosphore les réacteurs bioaugmentés ne présentent pas de carence majeure qui limiterait la biodégradation.

En somme, le suivi sur une période de 90 jours des paramètres physicochimiques (pH, O_2, N, P) montre que les réacteurs sont homogènes pour chacune des deux conditions (témoins ou bioaugmentés).

1.2. Fonctionnement épuratoire des bioréacteurs

La capacité épuratoire globale des bioréacteurs a été suivie durant 90 jours en s'intéressant à des paramètres généralistes tels que le carbone organique total, la biomasse et le profil métabolique des microorganismes. Les résultats présentés pour les deux conditions (avec ou sans bioaugmentation) sont la moyenne de 4 réplicats.

1.2.1. Évolution du carbone organique total dissous et de la biomasse totale

La **figure 33** représente l'évolution de la concentration en carbone organique totale (COT) au niveau des bioréacteurs témoins et bioaugmentés durant les 90 jours de suivi. Les résultats montrent qu'au début de l'expérimentation le niveau de carbone organique est comparable (42 ± 1,8 g/Kg) dans les réacteurs avec ou sans bioaugmentation ; cette valeur est en accord avec celles publiée par Martins et al. (2015) qui ont mesuré une quantité de carbone de 59 g/kg dans les sédiments de la lagune prélevés au niveau de la même localisation.

Cette quantité a tendance à baisser au cours de l'expérimentation dans les deux conditions. Cependant une différence significative est observée entre les deux types de bioréacteurs à partir du 50^{ièmes} jours de suivi, la quantité de COT au niveau des bioréacteurs témoins est de 24 g/l (± 3,2). Au terme du suivi (90 jours), la quantité de COT est de 15 g/L au niveau des bioréacteurs témoins et de 200 mg/L pour des bioréacteurs bioaugmentés (**Figure 33**).

Ces résultats montrent que l'abattement du carbone mesuré par le paramètre du COT est meilleur dans les bioréacteurs bioaugmentés (99 % de consommation de carbone organique) en comparaison des 65 % trouvés au niveau des bioréacteurs témoins.

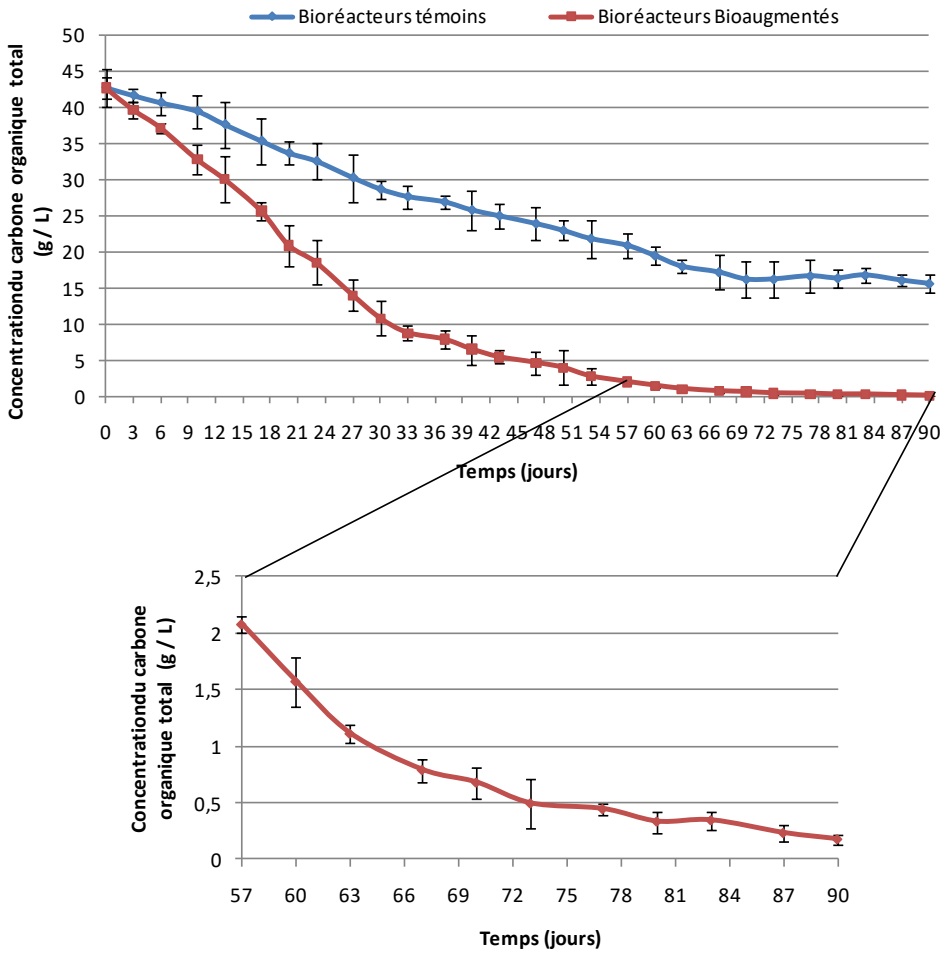


Figure 33 : (A) Évolution de la quantité de carbone organique totale dissous dans les bioréacteurs témoins et bioaugmentés durant 90 jours de traitement. **(B)** : Évolution de la quantité de carbone organique total dissous dans les bioréacteurs bioaugmentés durant les 23 derniers jours de traitement

L'évaluation et le suivi du COT est une des méthodes de monitoring les plus adoptées pour évaluer un procédé de bioremédiation (Heitzer et al., 1993 ; Margesin et al., 2000). Plusieurs études ont pu montrer l'importance de ce suivi pendant ces opérations. Des études concernant la bioremédiation des sols contaminés par des HAP, ont montré une diminution du COT au cours du procédé (Kao et al., 2000 ; Ceccanti et al., 2006 ; Lin et al., 2010). Une autre étude menée par Vinas et ses collaborateurs, portant sur l'effet d'une bioaugmentation à l'aide de boues activés sur la bioremédiation d'un sol contaminé par les HAP, constatent également une diminution de la quantité de COT d'environ 30 % du sol traité par rapport au témoin (Vinas et al., 2005).

Bien que l'évaluation de la COT soit utilisée pour déterminer l'efficacité des procédés de bioremédiation, elle permet également de déterminer les concentrations résiduelles des polluants. Ce facteur est important à prendre en considération lors des procédés de bio- dépollution (Nocentini et al., 2000 ; Sabaté et al., 2004).

La production de biomasse suit logiquement la consommation de carbone comme le montre la figure 34**.** La quantité de biomasse dans les bioréacteurs (témoins et bioaugmentés) a été suivie en mesurant le nombre de cellules par mL sur des échantillons de l'effluent du sédiment en cours de traitement. En début d'expérimentation la biomasse est de 10^2 cellules/mL pour le lot de bioréacteurs témoins par rapport à 10^7 cellules/mL pour le lot de bioréacteurs bioaugmentés. Cette quantité de biomasse augmente progressivement en un mois pour atteindre 10^4 cellule/mL dans le lot de bioréacteurs témoins et 10^9 cellule/mL pour les réacteurs bioaugmentés (**Figure 34**). La biomasse se maintient à un niveau constant dans les bioréacteurs témoins à partir du 40ème jour (10^4 cellules/mL) alors que pour le lot bioaugmenté on atteint progressivement 10^{11}cellules/mL au bout du 90ième jour de suivi (**Figure 34**).

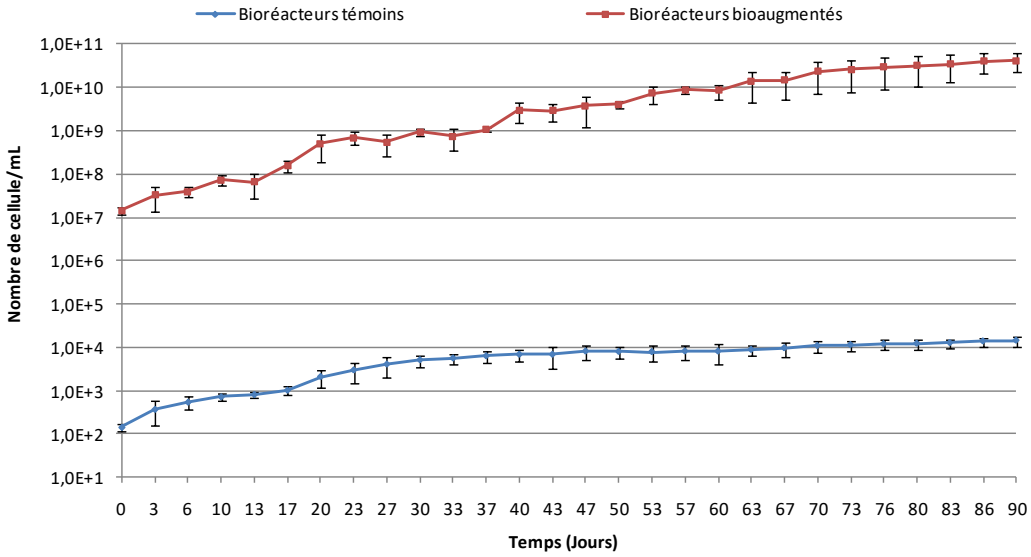


Figure 34: Évolution de la population totale (exprimée en nombre de cellules/mL) dans l'effluent au cours de suivi de la bioremédiation des sédiments

La flore microbienne, a été ajoutée (à 10^7 cellules/mL) au sédiment au début du traitement au niveau du lot de bioréacteurs bioaugmentés, elle a peuplé ces réacteurs durant les premières semaines du traitement, la différence de biomasse demeure importante entre les deux lots jusqu'à la fin de traitement (**Figure 34**). Cette croissance est en accord avec la différence significative de la quantité de COT observée en fin de procédé entre les bioréacteurs témoins et les bioaugmentés. Ceci peut s'expliquer par le fait que la flore ajoutée lors de la bioaugmentation est constituée d'un consortium choisi pour sa capacité épuratoire importante. Ce consortium est capable de survivre et de se multiplier même dans des

environnements fortement pollués, contrairement au lot témoin où la biomasse naturelle de la flore aurait une croissance plus faible. Cette différence peut être due à l'augmentation de la toxicité résultant de la biodégradation. En effet, les sous-produits de la dégradation et les composés initialement récalcitrants à la biodégradation, ont pu s'accumuler au niveau des sites enzymatiques des microorganismes les empêchant d'avoir accès à d'autres sources de carbone ralentissant ainsi, leurs croissances. Une étude menée par MacNaughton et al. (1999) dans un contexte similaire a montré que la quantité de biomasse au cours d'un procédé de bioremédiation de sédiments contaminés par le pétrole brut diminue suite à l'accumulation de produits toxiques, quel que soit le traitement appliqué (atténuation naturelle, biostimulation ou bioaugmentation). D'autres études arrivent également à ces mêmes résultats (Edlund et al., 2006; Paissé et al., 2008; Lin et al., 2010; Crisafi et al., 2016).

1.2.2. Profil métabolique des bioréacteurs

L'évolution des profils métaboliques de la flore microbienne dans les lixiviats des bioréacteurs au cours du traitement de bioremédiation a été étudiée en mesurant les pourcentages d'utilisation des sources de carbones contenues dans les plaques BIOLOG. La figure 35 présente les résultats obtenus pour les deux types de lots de bioréacteurs (témoins et bioaugmentés) au début du suivi et aux 90ième jours de suivi. Ils sont exprimés par une gamme de couleurs représentant les pourcentages de consommation des substrats carbonés (polymères, carbohydrates, acides carboxyliques, acides aminés, amines et composés phénoliques).

Globalement, au début de l'expérimentation le profil métabolique microbien semble très diversifié et variable en fonction des bioréacteurs, en effet au niveau des bioréacteurs témoins, les pourcentages moyens de biodégradation varient entre 20 et 40 % alors qu'au niveau des bioréacteurs bioaugmentés ils sont compris entre 50 et 80 %. Au 90ième jour de suivi les pourcentages de consommation des sources carbonées sont plutôt de l'ordre de 60 % pour les bioréacteurs témoins alors qu'ils atteignent 90 % pour les réacteurs bioaugmentés (**Figure 35**).

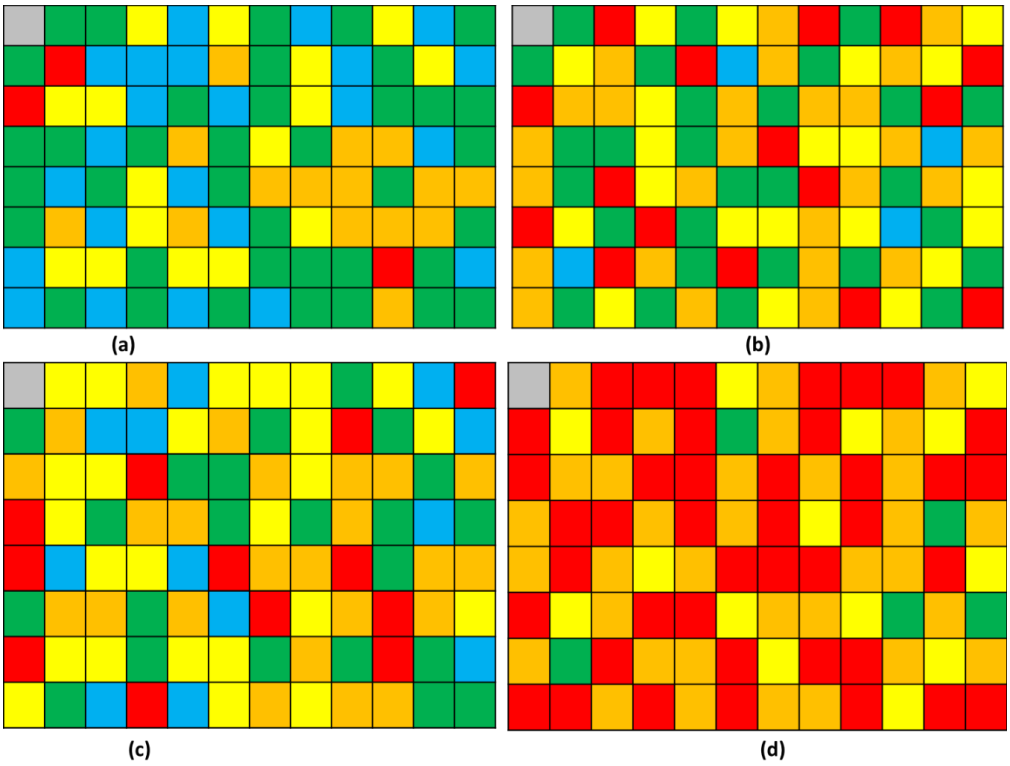


Figure 35: Distribution de l'utilisation des sources de carbone contenues dans les plaques BIOLOG au premier jour de suivi au niveau des bioréacteurs témoins (a) et bioaugmentés (b), et aux 90ième jours au niveau des bioréacteurs témoins (c) et bioaugmentés (d).
Avec les pourcentage de dégradation comme suit: : 0% ; : 0-20 % ; : 20-40 % ; : 40-60% ; : 60-80% ; : 80-100 % de biodégradation

L'indice de Shannon est un paramètre intéressant pour suivre la diversité métabolique des communautés à partir de la répartition de l'utilisation des sources de carbones (Harch et al., 1997), nous avons donc suivi son évolution au cours du procédé (**Tableau 26**).

Tableau 26: Évolution de l'indice de Shannon des effluents des sédiments témoins et bioaugmentés au cours du procédé de bioremédiation appliqué durant 90 jours

Types de bioréacteurs		Temps d'incubations (Jours)									
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Bioréacteurs témoins	T1	1,9	2,35	3,52	4,25	4,2	3,5	3,17	1,85	2,79	3,51
	T2	1,72	2,21	2,89	3,91	3,23	3,12	2,89	1,24	2,33	3,11
	T3	1,81	2,41	3,63	4,35	4,01	3,4	3,21	1,64	2,87	3,29
	T4	1,96	2,52	3,81	4,12	4,17	3,25	3	1,87	2,91	3,34
Bioréacteurs bioaugmentés	B1	2,23	3,22	4,5	3,81	3,12	4,1	4,58	5,09	4,92	4,52
	B2	2,51	3,61	4,21	3,52	3,02	3,82	4,38	4,97	4,75	4,53
	B3	2,06	3,82	4,32	3,06	2,95	3,96	4,62	5,23	4,82	4,41
	B4	2,38	3,52	4,09	3,14	3	3,9	4,71	4,89	4,69	4,31

D'après l'analyse de tableau on en déduit qu'il y a une différence significative (en utilisant un test ANOVA), entre les indices obtenus au niveau des bioréacteurs témoins et bioaugmentés dès le premier

jour de suivi (P <0,05). Cette différence n'est pas très prononcée au début de suivi (J0, **Tableau 26**). Ceci peut être expliqué par le fait qu'au début du traitement y a moins de différences entre le lot témoin et le lot bioaugmenté. En effet la flore présente va consommer les sources de carbone facile comme la matière organique. Après l'épuisement de cette matière organique la microflore est obligée de s'adapter aux composés organiques qui restent à dégrader dans le milieu et qui seront leur seule source de carbone.

Les indices de Shannon sont fluctuants tout au long du suivi ; l'indice de Shannon initial des bioréacteurs témoin est de 1,9 il atteint 4 aux 40ième jours de suivi, puis un effet de répression a été constaté au 70ième jour (Indice de Shannon 1.6). Cette diminution de la diversité microbienne observée peut être due à l'accumulation des produits toxiques. Ces produits peuvent aussi jouer le rôle d'inhibiteur sur les sites enzymatiques de certains microorganismes. En général, une réduction de la biodiversité indique souvent l'extinction des espèces sensibles suite à une contamination (Rutgers et al., 1998).
La technique d'analyse BIOLOG EcoPlate utilisée pour observer l'évolution du consortium microbien sur un sédiment pollué par un mélange de composés organiques est très peu retrouvée dans la littérature. Les techniques BIOLOG ont parfois permis d'identifier certaines souches de bactéries dégradant divers polluants comme les hydrocarbures pétroliers (Bhattacharya et al., 2003) et des pesticides (Pan et al., 2016), en complément des techniques de biologie moléculaire. Au cours d'un processus de bioremédiation, cette technique a été utilisée pour observer l'évolution globale du profil microbien (Stefanowicz, 2006; Wan et al., 2013; Yu et al., 2015). Elle a été utilisée également pour le suivi des différences entre un traitement témoin et un autre bioaugmenté (Teng et al., 2010).
Bien qu'avantageuse, cette technique a aussi plusieurs limites :

- Les puits ne développent une coloration que lorsque la densité de l'inoculum atteint 10^8 cellules/mL et les croissances des bactéries présentes dans la microplaque peuvent varier et évoluer au cours du temps d'incubation d'un puit à un autre (Haack et al., 1995).
- Cette technique n'est pas applicable à la détection et l'identification de microorganismes non cultivables, même si le milieu de culture est liquide et que les cellules sont plus facilement cultivables sur ce type de milieu que sur un milieu solide.
- La lecture des résultats de ces plaques est considérée non validée en cas des fortes concentrations en calcium, car il qui engendre des faux positifs (Pierce et al., 2014). C'est pour cette raison que des dilutions dans de l'eau distillée stérile ont été faites pour éviter ce problème.

1.3. Devenir des bactéries utilisées en bioaugmentation

Nous avons utilisée des techniques moléculaires pour quantifier les souches bactériennes utilisées en bioaugmentation.

1.3.1. Extraction et quantification de l'ADN à partir des échantillons de sédiment

Après l'extraction de l'ADN total de sédiments des bioréacteurs témoins (brut) et bioaugmentés, les produits de PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose à 1 %, et l'ADN contenu dans l'échantillon de sédiments issus de tous les bioréacteurs a été quantifié (**Figure 36**).

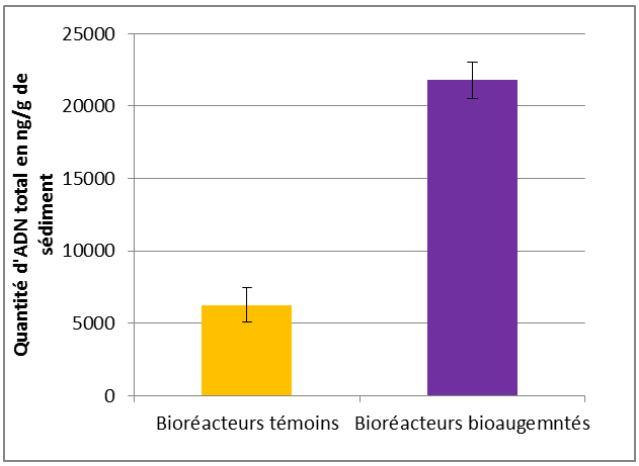


Figure 36: Différences d'ADN extrait en ng d'ADN par g de sédiments entre échantillons témoins et bioaugmentés (à T90)

Malgré des quantités d'ADN très faibles dans les échantillons prélevés initialement (T= 0 jours), une amplification de l'ADN est observée dans tous les échantillons. Cela signifie donc que l'ADN est présent en quantité et qualité suffisante pour permettre une amplification des souches bioaugmentées lorsque la cible est présente. La densité bactérienne totale dans les échantillons à T0 varie de 10^6 à 10^8 copies du gène 16S/g sédiment. Elle est nettement supérieure dans les échantillons à T final (90 jours) avec un nombre de copies du gène 16S se situant entre 10^{11} et 10^{12} **(Figure 36).**

1.3.2. Amplification des souches bactériennes cibles

L'amplification des souches utilisées lors de la bioaugmentation est faite via le clonage des gènes cibles de chacune de ces souches dans *E.coli.* A chaque fois huit clones par souche ont été analysés par PCR pour vérifier la présence de l'insert à l'aide des amorces fournies. Les étapes précédentes nous ont permis de quantifier les trois cibles bactériennes au niveau de tous les bioréacteurs et de comparer leurs abondances les unes par rapport aux autres (**Figure 37**).

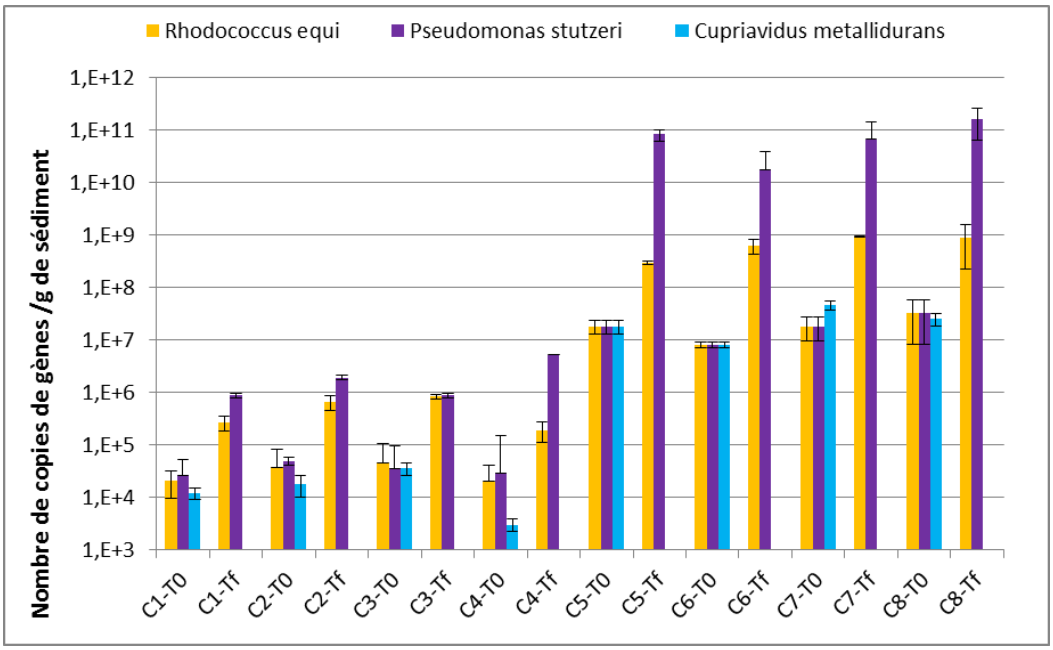


Figure 37: Représentation de la densité de souches utilisées en bioaugmentation des sédiments exprimée en nombre de copies du gène ciblé par gramme de sédiments (Colonnes C1 à C4 : bioréacteurs témoins, de C5 à C8 bioréacteurs bioaugmentées, T0 : temps initial : jour 0, Tf : temps final : jour 90)

Les résultats montrent vers la fin de suivi de procédé, une différenciation nette entre les trois bactéries, alors que le même taux de bioaugmentation entre les différentes souches a été appliqué au début des expérimentations (de l'ordre de 10^7 cellule/g de sédiments pour chacune des souches). En effet *Pseudomonas stutzeri* LBR est la souche la plus représentée parmi les trois souches avec une densité de 8.32 x 10^{13} copies du gène ciblé par gramme de sédiments contre uniquement 5.21 x 10^{12} copies du gène ciblé par gramme de sédiments pour *Rhodococcus equi* LBB (**Figure 37**). Dans le cas de *Cupriavidus metallidurans* LBJ, et malgré un taux de croissance similaire de celui de *Pseudomonas stutzeri* LBR (respectivement µ= 0,05 et 0,04), le nombre de copies du gène ciblé par gramme de sédiments est au-dessous de seuil de détection au niveau de tous les bioréacteurs témoins ou bioaugmentés, ceci suggère que cette souche a été éliminée par sélection naturelle.

En raison de la facilité et de coût relativement faible par rapport à d'autres techniques moléculaires, la qPCR reste la technique la plus favorable pour l'analyse rapide de la présence et de l'abondance des communautés microbiennes impliquées dans les procédés de bioremédiation (DeFlaun et al., 2001 ; Maphosa et al., 2010).

Dans une étude récente, un consortium composé de *Pseudomonas* sp. WBC-3, *Cupriavidus necator* JMP134 et d'*Alcaligenes* sp. NyZ215 ont été inoculées par bioaugmentation dans un sol contaminé par trois isomères du nitrophénol (Chi et al., 2013). Les résultats montrent que la bioaugmentation a permis une accélération de la biodégradation des nitrophénols, cependant même si les trois souches ont survécu et étaient stables durant un mois, leur abondance a été affecté par la contamination par le nitrophénol (Chi et al., 2013).

-L'analyse et le suivi des paramètres physicochimiques limitants de la bioremédiation, au niveau des bioréacteurs, nous ont permis de constater leur stabilité et leur maintien à des niveaux suffisants tout au long des 90 jours.

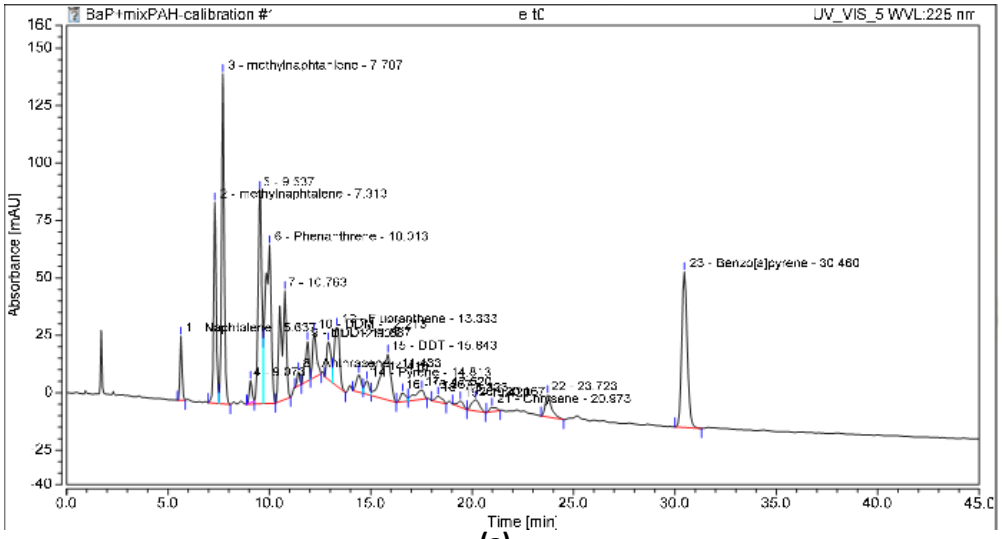
- L'efficacité de bioprocédé appliqué en termes de consommation de COT est maximale au niveau des bioréacteurs bioaugmentés (99 % de COT) par rapport à 65 % uniquement au niveau des bioréacteurs témoins. Ces résultats sont en corrélation avec la diversité de l'activité métabolique plus importante au niveau des bioréacteurs bioaugmentés que dans les témoins.

- La bioaugmentation par le consortium a montré que les deux souches *Pseudomonas stutzeri* et *Rhodococcus equi* ont été détectées jusqu'au dernier jour de suivi, par contre la souche *Cupriavidus metallidurans* a été perdue dans tous les bioréacteurs.

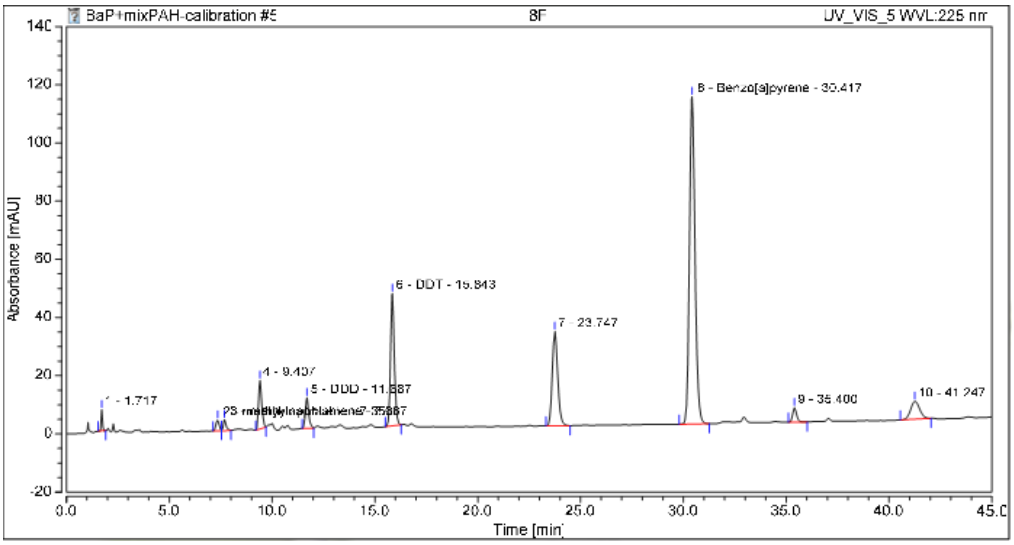
2. Quel est le devenir des polluants dans les bioréacteurs ?

2.1. Devenir des polluants organiques

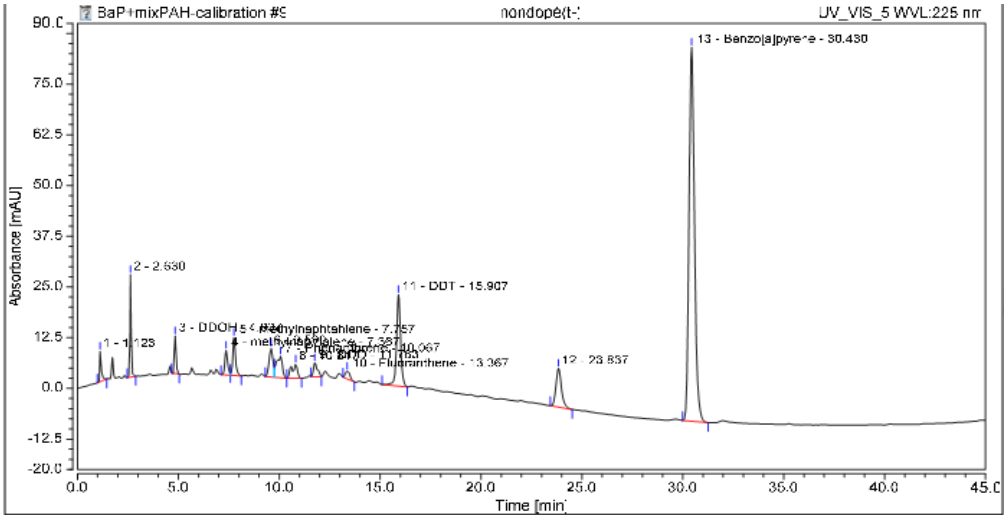
Les analyses CLHP ont été réalisées sur les échantillons de sédiments prélevés tous les 10 jours de traitement à trois niveaux de chaque bioréacteur (à 15, 25 et 40 cm de hauteur).
Les chromatogrammes CLHP obtenus pour les bioréacteurs témoins et bioaugmentés à T0 (a) et T final (b) du traitement sont présentés dans la figure 38.



(a)



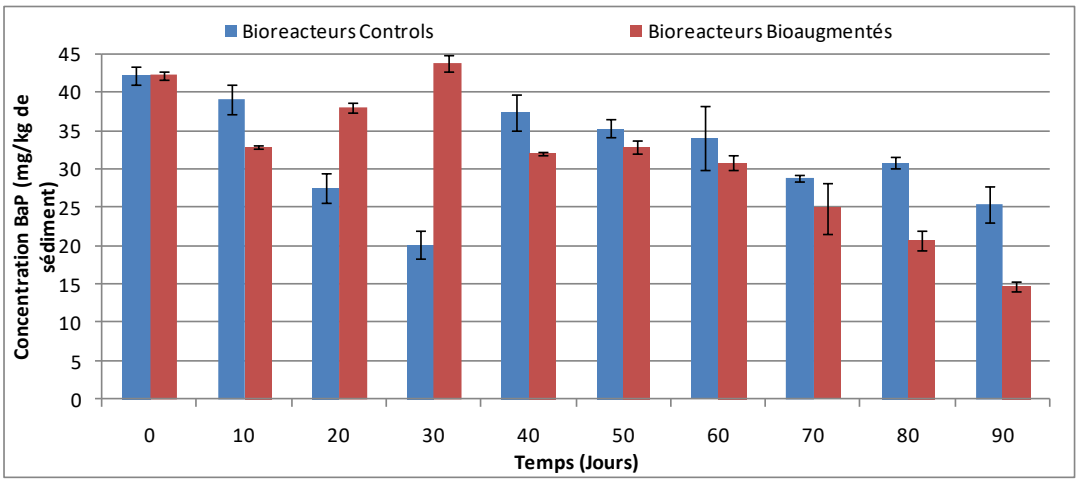
(b)



(c)

Figure 38: Comparaison entre les chromatogrammes de sédiments avant traitement (a) et en fin de traitements dans les bioréacteurs bioaugmentés (b) et témoins (c).

La comparaison entre le profil chromatographique de sédiments à T0 et à T final (90 jours) montre une différence nette au niveau de la concentration des polluants que ce soit pour les réacteurs témoins ou bioaugmentés, ces observations préliminaires plaident en faveur de la réussite de la bioremédiation concernant leur dégradation primaire. Les analyses des chromatogrammes issus de la CLHP nous ont permis de suivre le devenir des polluants majoritaires contenus dans les sédiments de la lagune de Bizerte à savoir les BaP et les autres HAP inscrits dans la liste de l'EPA (Environnemental Protection Agency) (Knuckles et al., 2001) (Figure 39a, Tableau b).



(a)

Composés (HAP)	Pourcentage de biodégradation	
	Bioréacteurs témoins	Bioréacteurs bioaugmentés
Naphtalene	100	100
Acenaphthylene	100	100
1-2-methylnaphtalene	100	100
2-1-methylnaphtahlene	100	100
Acenaphtene	100	100
Fluorene	87,6	100
Phenanthrene	51,4	89,6
Anthracene	100	100
Fluoranthene	61,8	92,3
Pyrene	38,7	71,4
Benzo[b]fluoranthene	88,6	90,3
Dibe,zo[a,h]anthracene	90,7	93,6
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	45,6	67,2

(b)

Figure 39: Suivi de devenir du BaP(a) et pourcentage de biodégradation des HAP (b) dans les échantillons de sédiments prelevés des bioréacteurs témoins et bioaugmentés après 90 jours de traitement.

Le contenu initial du sédiment en BaP et DDT est quasiment identique au niveau des bioréacteurs témoins et bioaugmentés (Figure 39), ceci est la résultante de l'homogénéisation de sédiments que nous avons effectués avant de lancer les expériences. Les composés aromatiques les plus abondants avant l'ajout de BaP et de DDT à près de 40 mg/kg de sédiments, sont le naphtalène et ses dérivés, le fluorène et ses dérivés, le phénanthrène et les dérivés du phénanthrène/anthracène, et le dibenzothiophène et ses dérivés. Le pyrène et les dérivés du fluoranthène sont présents en fin de traitement avec des quantités faibles dans les sédiments, ceci peut être expliqué par les concentrations initiales importantes de ces composés.

Del'Arco et de França (2001), ont étudié l'influence du taux de contamination des hydrocarbures dans des sédiments sableux sur leurs biodégradations, les expérimentations ont été effectuées en triplicata dans des réacteurs en PVC d'une contenance de 29 L, qui simulent un procédé de bioremédiation. Les bioréacteurs ont été bioaugmentés avec un consortium provenant d'un épandage d'une raffinerie pré-adapté au pétrole. L'évaluation de la biodégradation a été réalisée sur 28 jours de traitement. Les auteurs ont mis en évidence que le taux de biodégradation dépend du taux de la contamination initiale en hydrocarbures. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que plus la concentration en hydrocarbures est élevée, plus les contraintes de diffusion à travers les particules solides de sédiments augmentent et donc moins la biodégradation sera favorisée.

Les cinétiques de biodégradation du BaP sont très variables tout au long du suivi (**Figure 40 a**). Les pourcentages de biodégradation au niveau des bioréacteurs bioaugmentés diminuent dès les premiers 10 jours de suivi suite à la prolifération et l'acclimatation de la biomasse bioaugmentée avec les substrats dans les sédiments. Par la suite les cinétiques de biodégradation sont lentes au début du traitement 15 % de BaP sont éliminées au bout de 40 jours de traitement alors que 50 % sont dégradés entre le 40ième et le 90ième jour (**Figure 40 a**). Ces résultats prouvent que les microorganismes dégradent très rapidement et préférablement les sources de carbones faciles, puis s'adapteraient aux polluants plus compliqués pour les dégrader plus rapidement en fin de traitement comme déjà observé dans la littérature (Oudot et al., 1998).

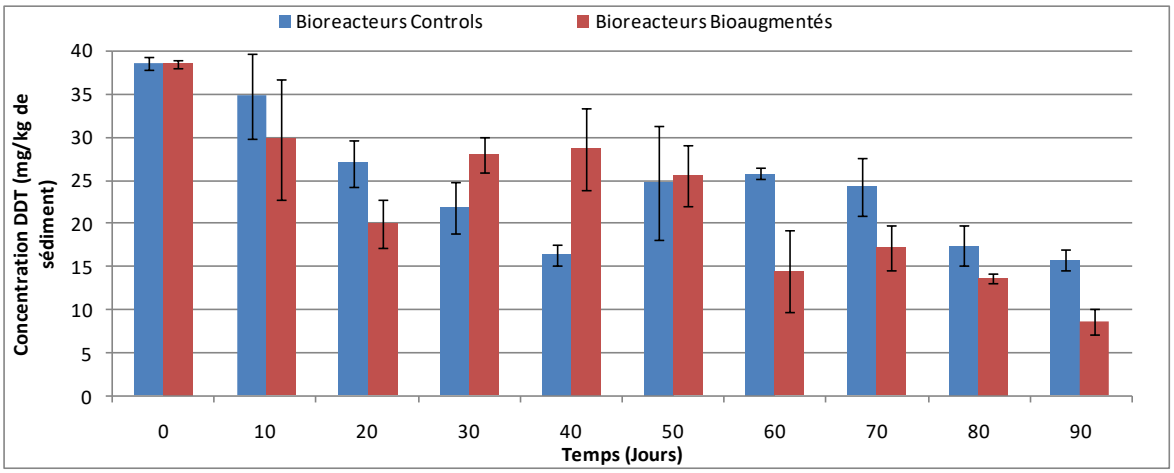
La différence des cinétiques de biodégradation du BaP est significative entre les bioréacteurs témoins et bioaugmentés au bout de 90 jours de traitement (**Figure 40 a**) aboutissant à des taux de biodégradation de 40 % et de 67 % respectivement.

Dans les sédiments, la biodégradation des HAP est différente selon les bioréacteurs, témoins ou bioaugmentés, mais aussi la structure chimique liée à la richesse en noyaux benzéniques. Pour certains composés tels que le naphtalene, l'acenaphthylene, le 1-2-methylnaphtalene, le 2-1-methylnaphtahlene, l'acenaphtene, l'anthracene, il n'y a pas une différence au niveau des pourcentages de biodégradation entre les bioréacteurs témoins et les bioréacteurs bioaugmentés. Par contre la différence de biodégradation entre les bioréacteurs témoins et bioaugmentés est nette, dans le cas des autres HAP (Figure 40, **Tableau b**)**.**

Smith et al. (1997) ont étudié la biodégradation des HAP. Ils déduisent que plus les molécules ont des noyaux aromatiques, plus elles sont adsorbées sur les particules et moins la sorption est réversible, donc moins grande est la bioaccessibilité. De façon générale, plus le nombre de cycles augmente, plus les composés sont difficilement biodégradables (Walker et al., 1976 ; Oudot, 1984).

Les cinétiques de biodégradation du DDT sont aussi variables en fonction de temps et des bioréacteurs. Elles sont rapides au début du suivi, comme dans le cas des hydrocarbures, la flore de sédiments commence à consommer les sources de carbone facile à métaboliser comme la matière organique, par la suite, une fois épuisé, les microorganismes se trouvent face aux polluants qui doivent utiliser comme

source de carbone, c'est à ce moment que la cinétique de biodégradation est lente (**Figure 40 a**). Ceci à abouti à un taux de disparition du DDT de 82 % au niveau des bioréacteurs bioaugmentés par rapport à 67,7 % uniquement au niveau des bioréacteurs témoins (**Figure 40 a**).



(a)

Composés (Dérivés du DDT)	Pourcentage de biodégradation	
	Bioréacteurs témoins	Bioréacteurs bioaugmentés
DDE	95,7	100
DDD	31,2	74,5
DDM	100	100
DDOH	63,9	87,4

(b)

Figure 40: Suivi de devenir du DDT(a) et pourcentage de biodégradation des dérivés du DDT(b) dans les échantillons de sédiments prelevés des bioréacteurs témoins et bioaugmentés après 90 jours de traitement

Ces différences entre les deux types de bioréacteurs peuvent être expliquées aussi par la modification de la diversité du consortium microbien constatée par l'analyse BIOLOG. Ceci peut être dû à l'accumulation de composés récalcitrants à la biodégradation.

La biodégradation des dérivées du DDT semble être plus efficace dans les bioréacteurs bioaugmentés que dans les témoins. Les composés qui ont été détectés suite à la biodégradation du DDT sont les suivants DDE, DDD, DDM et DDOH. Selon la voie métabolique ci-dessous (**Figure 41**), on peut dire que les dérivés retrouvés sont en accord avec la littérature (Mansouri et al., 2016).

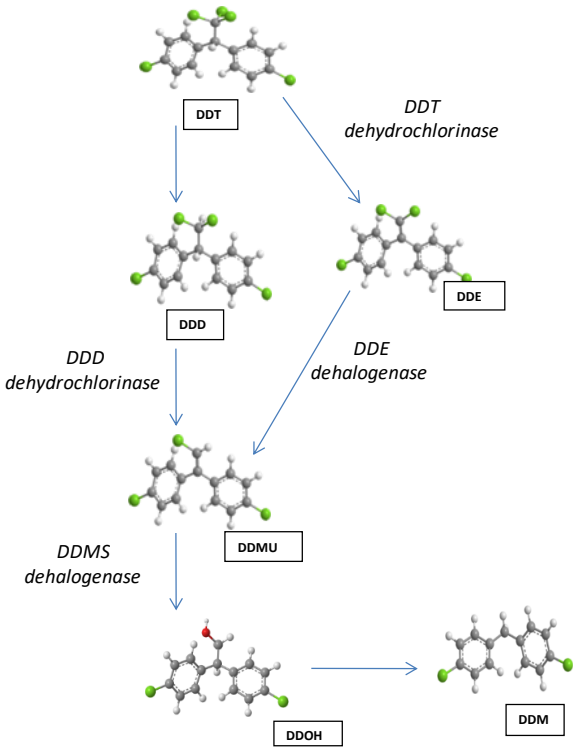


Figure 41: Voie de biodégradation du DDT dans les bioréacteurs selon Mansouri et al., 2016

N.B : Pour plusieurs HAP tels que le naphtalene, l'acenaphthylene, le 1-2-methylnaphtalene, le 2-1-methylnaphtahlene, l'acenaphtene, l'anthracene, et des dérivés du DDT tels que le DDE et le DDM ; les concentrations mesurées aux niveaux des bioréacteurs ont tendance à diminuer progressivement jusqu'à des niveaux très bas (au-dessous de la limite de détection), pour ces raisons on peut conclure que la biodégradation primaire de ces composés est totale.

Les analyses par CLHP permettent d'étudier l'évaluation globale de la biodégradation des familles d'hydrocarbures et du DDT et de ses dérivés. Ces approches analytiques sont complémentaires des autres tests qui ont été effectués et concordent bien avec les résultats de l'analyse du profil microbien.

2.2. Devenir des métaux et du TBT bio-accessibles

Dans cette étude un ensemble de cinq bactéries bioluminescentes : *E. coli* Zntlux, *E. coli* Arslux, *E. coli* Coplux, *E. coli* Merlux et *E. coli* TBT, ont été utilisées pour la détermination semi-quantitative des métaux bio-accessibles dans les sédiments au cours de traitement (**Figure 42**).

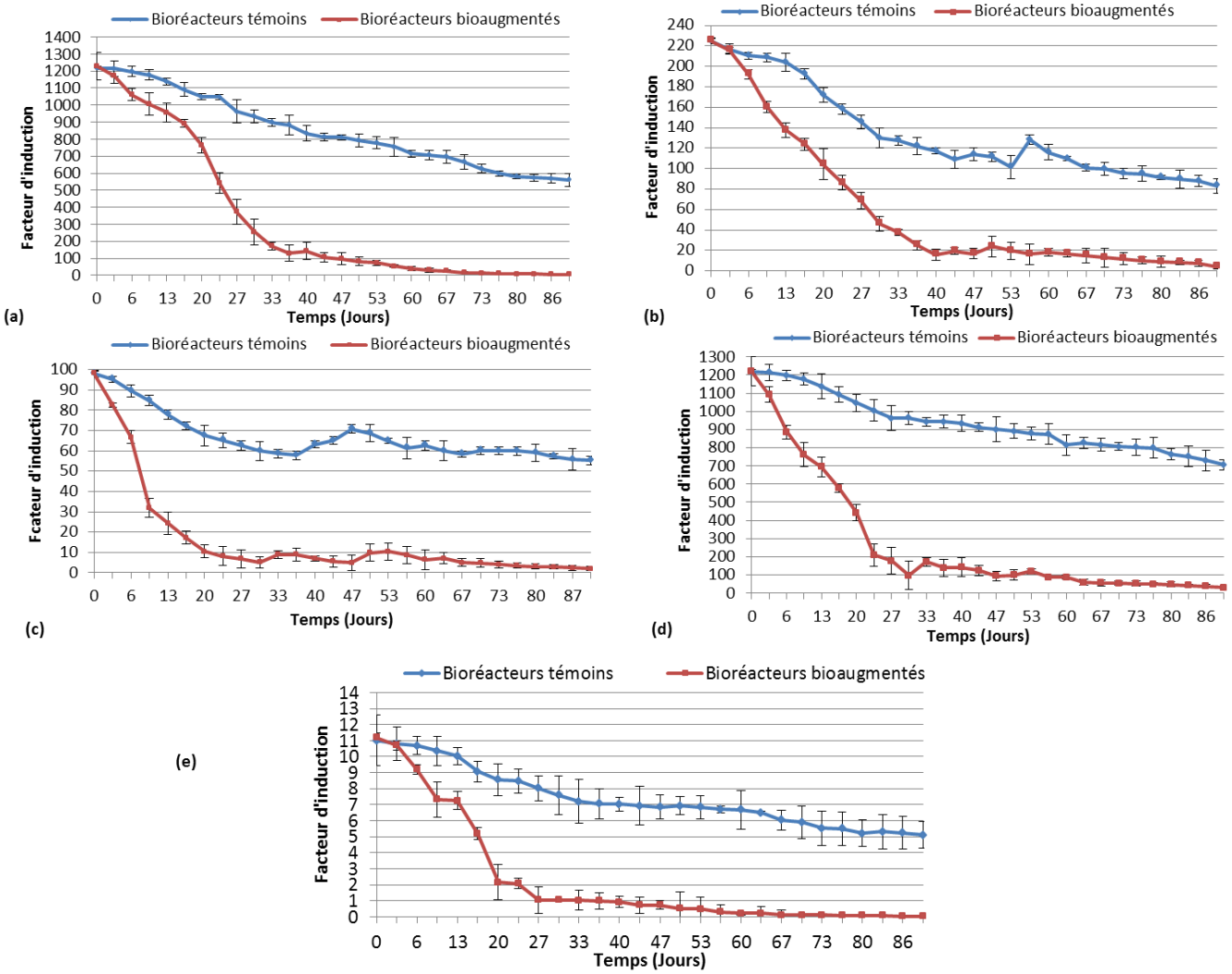


Figure 42: Évolution de la détection des métaux par *E.coli* Arslux (a), *E.coli* Coplux (b), *E.coli* Znlux (c), *E.coli* Merlux (d) et de *E.coli* TBT3 (e) dans les échantillons d'effluents des bioréacteurs témoins et bioaugmentés au cours de temps.

Afin de déterminer le bilan des métaux dans les sédiments, nous avons effectué des tests de lixiviation sur les sédiments au début (jour 0) et à la fin (jour 90) du traitement (**Tableau 27**). Les résultats sont exprimés en facteurs d'induction pour chaque souche métaux et organométalliques. Ces facteurs d'induction ont été transformés en concentration en métaux grâce aux arbres de décisions développées par Jouanneau et al. (2013) (**Tableau 27**).

Tableau 27: Répartition des concentrations des métaux obtenus dans le lixiviat des sédiments avant et après la fin de procédé.

Métaux lourds détectés par des souches bioluminescentes	Quantités détectés (µg/mL d'eau lixiviée des sédiments)			
	Bioréacteurs témoins		Bioréacteurs bioaugmentés	
	0 jours	90 jours	0 jours	90 jours
Arsenic	19,106	11,208	19,121	8,623
Cuivre	37,471	17,422	38,914	5,211
Zinc	320,562	173,123	318,374	49,368
Mercure	123,073	92,145	124,187	22,497

Les résultats montrent que la bioluminescence des souches induites par la présence de métaux et d'organoétains dans les effluents présente une différence significative ($p<0,05$) entre les deux types de bioréacteurs. En effet les facteurs d'induction à T= 0 (début de l'expérimentation) sont identiques pour tous bioréacteurs, cette homogénéité de mesure est la résultante de l'homogénéisation du sédiment que nous avons effectué avant de distribuer les sédiments dans les bioréacteurs.

Les niveaux de bioluminescence mesurée pour des différentes souches recombinantes *d'Escherichia coli* montre une diminution dans les deux conditions des réacteurs cependant la chute du facteur d'induction est plus importante dans les réacteurs bioaugmentés à partir du 20ième jour pour toutes les bactéries détectrices des métaux.

D'après l'analyse de tableau on peut constater que les concentrations en métaux détectés par les souches bioluminescentes au début du procédé sont similaires à celles obtenues par l'équipe de Sakka (décrites dans le chapitre I). Les résultats montrent qu'au niveau des bioréacteurs témoins les concentrations des métaux obtenues vers la fin de procédé sont plus importantes au niveau des bioréacteurs témoins par rapport aux bioréacteurs bioaugmentés. Les métaux bioaccéssibles sont donc en concentrations moindre dans le cas des réacteurs bioaugmentés.

Des nombreux capteurs bactériens sont dédiés à la détection spécifique des polluants. Ces bioéléments utilisés sont des souches bactériennes (*E. coli*) génétiquement modifiées (Jouanneau et al., 2013). Dans ce cas, les gènes lux CDABE sont clonés en aval d'un promoteur permettant de mettre en évidence la présence spécifique ou semi-spécifique de certains composés dans un échantillon (D'Souza, 2001; Lei et Chen, 2006). Dans le cas de la détection des métaux, les promoteurs utilisés sont principalement impliqués dans les mécanismes de résistance bactérienne aux lourds métaux (Brown et al., 2002 ; Brown et Shih, 2005; Dumat et al., 2006).

Foucault et al. (2013) ont utilisé ces tests avec les 5 souches pour la détection des métaux et pour évaluer la performance d'un procédé de bioremédiation appliqué à un sol issu d'une zone industrielle contaminée par des HAP et des métaux lourds (Foucault et al., 2013). Ils ont constaté que l'utilisation d'une batterie de micro-organismes bioluminescents est adaptée pour l'évaluation et la classification de l'état de pollution des environnements étudiés (Foucault et al., 2013).

- Les analyses CLHP montrent que le DDT et le BaP ont été dégradés à 82 % et à 67 % respectivement au niveau des bioréacteurs bioaugmentés alors que le taux de biodégradation est de 67 % et 40 % au niveau des bioréacteurs témoins pour les mêmes molécules.
- La différence est aussi notable entre les bioréacteurs témoins et bioaugmentés en ce qui concerne les concentrations en métaux bioaccéssibles.

3. Empreinte écotoxicologique et génotoxique des bioréacteurs

Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont mis l'accent sur les avantages de l'utilisation des tests bactériens rapides, sensibles, reproductibles pour le dépistage et l'évaluation de la toxicité. La stratégie globale d'évaluation de l'impact du traitement développée dans cette étude a consisté a associer une batterie de tests d'écotoxicité bactériens à savoir un bio-essai évaluant l'impact toxique sur une bactérie marine bioluminescente (*Allivibrio fischeri*), d'une bactérie d'eau douce similaire aux bactéries utilisée en bioaugmentation et enfin d'évaluer la génotoxicité.
La bioluminescence bactérienne est l'un des outils utilisés pour le monitoring des procédés de bioremédiation (Juvonen et al., 2000). Il a été considérablement utilisé dans le suivi des effets des contaminants chimiques organiques et inorganiques sur l'environnement (Steinberg et al., 1995; Louati et al., 2015).

3.1. Analyse de la toxicité des bioréacteurs

Il est intéressant de pouvoir suivre l'évolution de la toxicité globale au cours des processus de bioremédiation. Plusieurs polluants, surtout les HAP, entraînent plutôt une toxicité à long terme qui est due au fait que certains produits de biodégradation sont plus toxiques que les composés parentaux (Juvonen et al., 2000). Les analyses effectuées décrites dans ce paragraphe visent à caractériser la toxicité des effluents et des sédiments traités dans les bioréacteurs.

3.1.1. Tests de toxicité avec une matrice d'eau de mer

La figure 43 présente les résultats des taux d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie *Allivibrio fischeri* calculés à 5, 15, et 30 min de temps de contact des bactéries avec les effluents des bioréacteurs témoins et bioaugmentés.
Les résultats (**Figure 43**) montrent que la toxicité des lixiviats varie en fonction du temps d'induction (5, 15 ou 30 min) mais aussi varie en fonction du traitement (témoin ou bioaugmenté). On constate aussi que

le taux d'inhibition de la luminescence au début du traitement (à T0) est maximal (de l'ordre de 100% après 30 min de contact) pour tous les échantillons.
Le taux d'inhibition après 5 et 15 min de contact est de l'ordre de 20 et 50 % respectivement en début d'expérience pour tous les bioréacteurs (**Figure 43**).
Les différences entre les taux d'inhibition déterminés après 5 et 15 min de contact entre les bioréacteurs témoins et bioaugmentés ne sont pas significatives ($p<0.05$), tandis que celles obtenues après 30 min de contact sont très significatives. De plus il semble globalement, que la toxicité soit mieux révélée à 30 min de temps de contact avec les bactéries, qu'à 5 ou 15 min. C'est pour cette raison que l'on va se focaliser sur l'analyse des courbes d'induction à 30 min (**Figure 43,** c).

La toxicité initiale est élevée (98 %) au niveau de deux types de traitements, puis elle diminue progressivement au cours de temps, cette diminution de toxicité est plus importante pour les bioréacteurs bioaugmentés, à titre d'exemple le taux d'inhibition de la bioluminescence aux 30^{ième}jours de suivi est de 85% pour les effluents témoins et 66 % bioaugmentés après 30 min de contact. Cette différence demeure importante entre les deux traitements jusqu'à la fin du traitement (**Figure 43**).

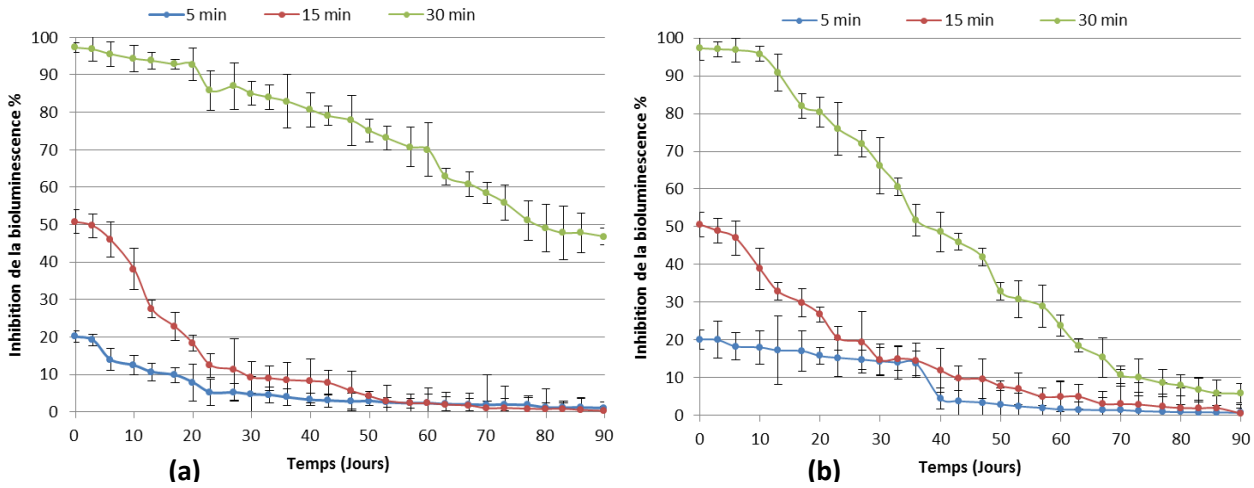


Figure 43: Suivie de l'inhibition de la bioluminescence de *A.fischeri* (LUMISTOX) par les effluents des bioréacteurs témoins (a) et bioaugmentés (b) après 5, 15 et 30 min de contact et illustration des

différences entre les bioréacteurs témoins (traits continues) et bioaugmentés (traits discontinus) après 30 min de contact.

Il existe peu de données sur l'utilisation des contaminants organiques dans les essais de toxicité sur sédiment dopé; pour les HAP, on peut citer le cas du fluoranthène (Dittsworth et al., 1990) et le cas de mélange des HAP (Louati et al., 2015) les auteurs ont constaté une toxicité élevée entre 60 et 80 % d'inhibition de bioluminescence après le dopage de sédiments.

Peu de travaux ont étudié l'évaluation de la toxicité avec le LUMIStox sur des échantillons de sédiments pollués par un mélange des composés organiques et inorganiques. Néanmoins d'autres équipes ont étudié l'évaluation de la toxicité des sédiments avec le test LUMIStox (Guzzella et al., 1998 ; Salizzato et al., 1998), ils ont conclu que cette technique est un moyen fiable pour l'évaluation de la toxicité des sédiments marins (Guzzella et al., 1998). Une autre étude a été réalisée avec ce bioessai sur les 16 HAP répertoriés par l'EPA (Loibner et al., 2004), les auteurs ont d'abord étudié la toxicité sur chacun des HAP dissous à une concentration proche de la saturation dans une solution aqueuse, ils observent que pour les composés possédants un nombre de noyaux aromatiques supérieurs à trois, aucune toxicité n'apparaît. Tandis que pour ceux ayant deux ou trois noyaux aromatiques, excepté l'anthracène, le taux d'inhibition de la bioluminescence pouvait atteindre les 95 %. Les auteurs en déduisent donc que la solubilité des HAP est un paramètre très important dans la détermination de la toxicité de ces composés en solution aqueuse (Harkey and Young, 2000; Loibner et al., 2004).

Une étude menée par Steliga et ses collaborateurs sur la bioremédiation *in-situ* d'un sol contaminé par les HAP, a constaté que parallèlement à la diminution des concentrations des 16 HAP de l'EPA contenues dans le sédiment, la toxicité a tendance à augmenter, ceci est dû à la génération des sous-produits plus toxiques que les composés parentaux (Steliga et al., 2012) ; la comparaison a été basée sur les résultats des tests de toxicité (Microtox, Ostacodtoxkit et Phytotoxkit) et de mutagénicité (test d'Ames) (Steliga et al., 2012).

Dans la littérature et au cours d'un bioprocédé de dépollution, la toxicité aiguë a tendance à diminuer (Brohon and Gourdon, 2000). Papadopoulou and Samara, 2002; Joner et ses collaborateurs 2004 ont étudié la dégradation de HAP par phytoremédiation et ont évalué par le biais du LUMIStox l'écotoxicité résiduelle des hydrocarbures. Betancur-Corredor et ses collaborateurs ont étudié la toxicté d'un sol pollué par le DDT avant et après 8 semaines de bioremédiation, ils déterminent effectivement que les taux d'inhibition de la luminescence diminuent au cours de l'expérimentation (Betancur-Corredor et al., 2015).Toutes ces études confirment l'efficacité de leur procédé appliqué et l'intérêt d'évaluer l'écotoxicité.

3.1.2. Évaluation de la toxicité globale par *E.coli* pBtaclux

La souche constitutive *E.coli* DH1 pBTaclux a été utilisée pour évaluer la toxicité globale des effluents de sédiments traités (**Figure 44**).

Au début de l'expérimentation (jours 0), le pourcentage d'inhibition de la bioluminescence au niveau de tous les bioréacteurs est très élevé de l'ordre de 98 % il continu à baisser légèrement au niveau des bioréacteurs bioaugmentés pour atteindre 50% d'inhibition aux 50 ^{ième} jours de suivi par rapport à 80% d'inhibition d'émission de bioluminescence au niveau des bioréacteurs témoins (**Figure 44**). La différence entre les deux lots de bioréacteurs est d'autant plus importante aux 90 ième jours de l'expérimentation en effet les taux d'inhibition de bioluminescence sont de l'ordre de 5% au niveau des bioréacteurs bioaugmentés alors qu'ils sont de 48 % au niveau des bioréacteurs témoins (**Figure 44**).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec *A. fischeri.*

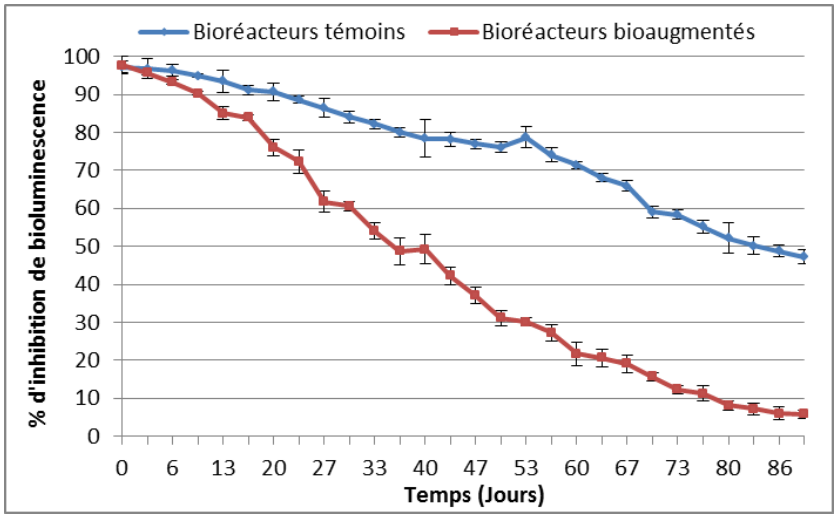


Figure 44: Pourcentages d'inhibition de la bioluminescence d'*E.coli pB*taclux par les effluents des bioréacteurs témoins et des bioréacteurs bioaugmentés.

Très peu des travaux ont utilisé la souche *E.coli* pBtaclux pour évaluer la toxicité d'un procédé, Foucault et ses collaborateurs ont étudié la bioremédiation d'un sol contaminé par des métaux lourds et des métalloïdes, ils ont montré que l'évaluation de la toxicité des lixiviats du sol par la souche bioluminescente *E.coli* pBtaclux était une l'un des moyens fiables pour la quantification de la toxicité (Foucault et al., 2013).

3.1.3. Évaluation de la toxicité globale de lixiviat par les bactéries issues de la lagune de Bizerte

Cette partie a été développée spécifiquement pour cette étude. Les bactéries qui ont été isolées à partir de la lagune de Bizerte pour leurs capacités de biodégradation, elles ont été transformées par le plasmide pBtaclux et rendu bioluminescentes. Ce développement a été fait afin de contrôler la toxicité des effluents des sédiments traités sur les dégradeurs potentiels. En effet ces bactéries jouent un double rôle à la fois des dégradeurs spécifiques des polluants mais aussi des indicateurs de toxicité.

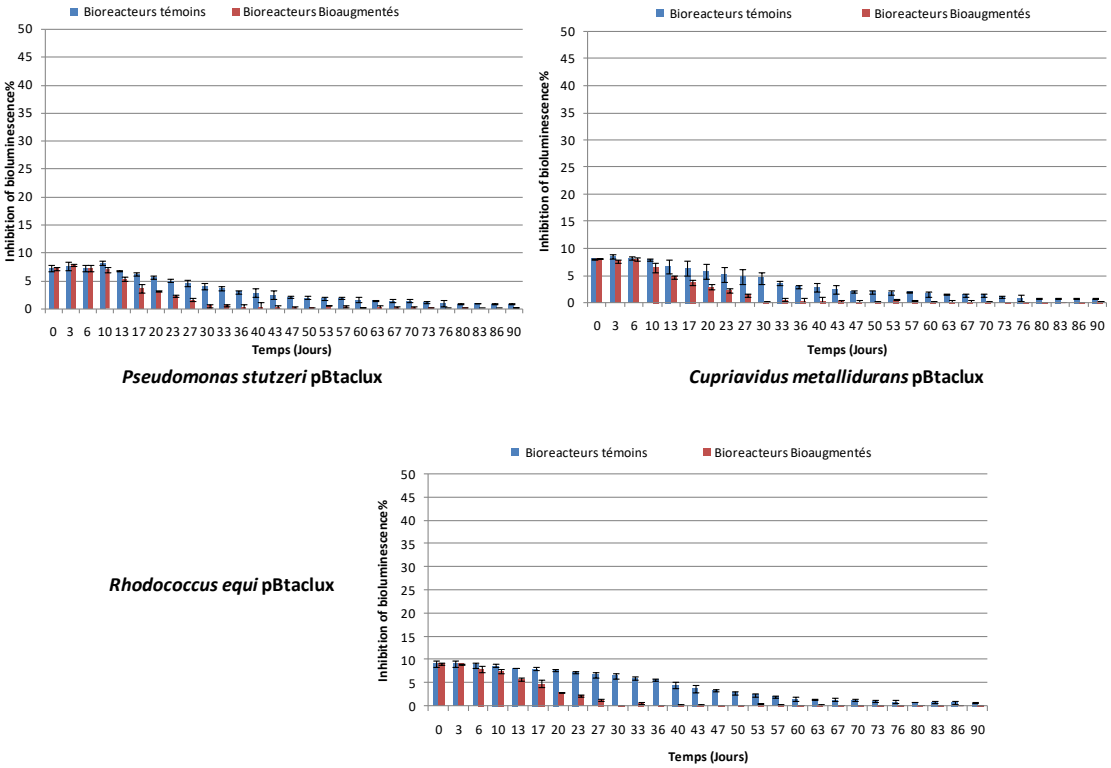


Figure 45: Suivi de la toxicité des sédiments traités par les bactéries allochtones transformées : *Pseudomonas stutzeri* LBR pBtaclux (a), *Cupriavidus metallidurans* LBJ pBtaclux (b) et *Rhodococcus equi* LBB pBtaclux (c) pendant 90 jours.

La figure 45 montre que même après le dopage des sédiments au début de l'expérimentation, une inhibition de 8 % de la bioluminescence des trois souches *Pseudomonas stutzeri* LBR pBtaclux, *Cupriavidus metallidurans* LBJ pBtaclux et *Rhodococcus equi* LBB pBtaclux a été mesuré au niveau des deux types de bioréacteurs. Une faible toxicité continue non significative est observée (inférieure à 10%) au cours du temps avec un léger écart entre le lot de bioréacteurs témoin et le lot bioaugmentés (**Figure 45**). Ces trois modèles cellulaires (plus résistants que les souches utilisées ultérieurement) ont peu d'atteinte toxique et peuvent donc être utilisés pour le traitement de bioaugmentation.

3.2. Analyses de la génotoxicité des bioréacteurs

Afin d'évaluer le pouvoir mutagène des sédiments traités, nous avons réalisé le test d'Ames sur nos échantillons. Les essais ont été effectués en triplicata sur les échantillons d'effluents de sédiments au début de l'expérimentation, aux 30ième, aux 60 ^{ième} et aux 90ième jours de suivi. Le test est réalisé en milieu liquide et en microplaque (96 puits) pendant 3 jours à 37 °C.

Le test a été réalisé avec 4 différentes souches mutantes de *Salmonella typhimurium* (TA98, 100, 1535 et 1537) en présence et en absence d'activateur métabolique S9. Ce dernier sert à stimuler l'effet de certaines substances qui ne sont pas directement mutagènes (pro-mutagène). En effet certaines substances comme le Benzo(a)Pyrène peuvent ne pas être mutagènes sous sa forme primitive mais ils agissent par l'intermédiaire de l'un ou de plusieurs de métabolites (Elliott et al., 1992).

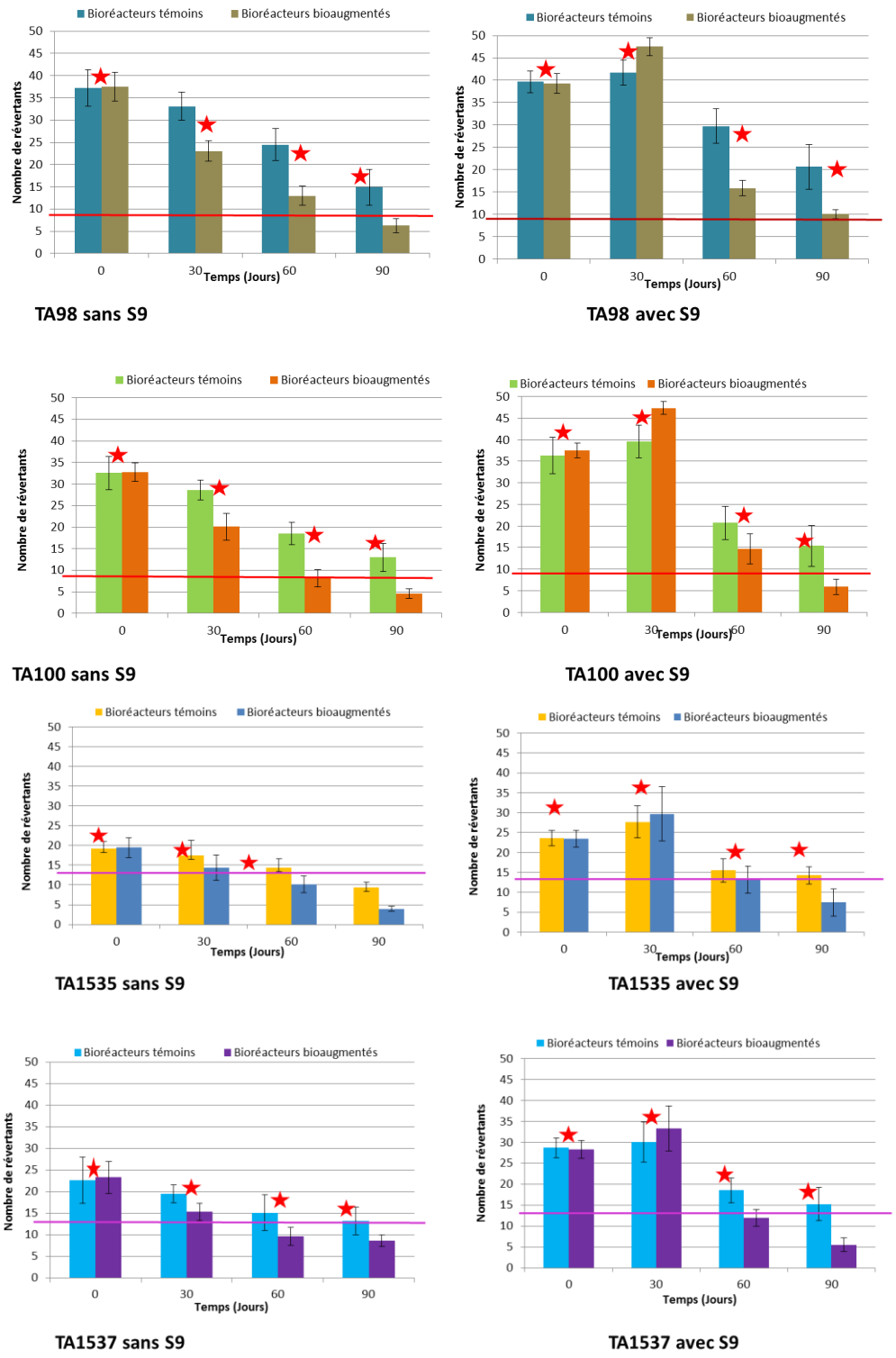


Figure 46: Évaluation de la génotoxicité des effluents liquides des sédiments traités (témoins et bioaugmentés) sans et avec activateur métabolique (S9) par quatre souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 et TA1537) (En rouge la ligne de base de mutagénicité pour chacune des souches, les étoiles indiquent la signification des corrélations: * p <0,05).

Les différences obtenues en fonction de souches testées peuvent être expliquées par la différence de sensibilité aux mutagènes de chacune par rapport aux autres. En effet la souche TA98 est la souche la plus sensible aux résidus mutagènes alors que la souche TA1535 est la moins sensible.

Les résultats des tests de mutagénicité et les différences obtenues sans et avec activateur métabolique peuvent être dus au relargage des produits de dégradation. Nous constatons qu'au début du suivi (jour 0) les effluents ont un pouvoir mutagène en absence ou en présence d'activateur métabolique quels que soient les réacteurs. Globalement la mutagénicité diminue au cours du temps. Cependant au terme du suivi (90 jours), les deux types de mutagénicité observés (sans ou avec activateur métabolique) baissent au niveau des bioréacteurs bioaugmentés pour atteindre un niveau non significatif alors qu'elles demeurent importantes un niveau des bioréacteurs témoins (Figure 46).

Les HAP sont généralement considérés comme agents mutagènes, et surtout cancérogènes. C'est notamment le cas pour le Benzo(a)Pyrène, le plus toxique des HAP répertoriés par l'EPA (Juhasz et Naidu, 2000), les HAP sont pour la plupart des mutagènes indirects.

Bouchez-Naïtali et al. (2005) discutent de la génotoxicité de plusieurs HAP. Ils trouvent que, mis à part le cas des aromatiques monocycliques, les pouvoirs mutagènes apparaissent pour les HAP à partir de 4 cycles et sont particulièrement marqués pour les HAP à 5 et 6 cycles comme par exemple le BaP. De plus, la génotoxicité des HAP a fait l'objet de normes pour les eaux potables et le Benzo(a)Pyrène fait l'objet de spécification particulière (Bouchez-Naïtali et al., 2005). Il est aussi très important de signaler que les caractéristiques des hydrocarbures tels que la solubilité dans l'eau, l'hydrophobicité, la dégradation biologique et chimique de ces molécules, peuvent influencer l'évaluation de leur mutagénicité (Bouchez-Naïtali et al., 2005). Les interactions entre les polluants au sein de la même matrice peuvent aussi intervenir : la mutagénicité du Benzo(a)Pyrène lors du test de toxicité sur *Salmonella typhimurium*, est augmentée par la présence de petites quantités de naphtalène ou d'anthracène, deux HAP non mutagènes (Herman, 1982 ; cité par Babich et Stotzky, 1983).

Plusieurs travaux ont étudié la mutagénicité des procédés de bioremédiation en se basant sur le test d'Ames (Whit and Claxton, 2004 ; Man et al., 2013). Pagnout et al. (2006) ont évalué la mutagénicité de trois HAP (le pyrène, le fluoranthène et le phénanthrène) ainsi que les sous-produits de leurs biodégradations par *Mycabacterium* sp. SNP11. Ils ont déduit que la génotoxicité est nettement réduite après biodégradation, malgré une accumulation des métabolites intermédiaires (Pagnout et al., 2006). Les auteurs suggèrent aussi que l'accumulation de métabolites a été moins importante que dans l'environnement et supposent qu'ils peuvent s'accumuler plus facilement sur des sédiments et laisser place à une génotoxicité plus importante (Pagnout et al., 2006).

Steliga et al. (2012) ont étudié la mutagénicité d'un sol fortement contaminé par les HAP avant et après bioremédiation par des bactéries et des champignons isolés de mêmes environnements. Ils ont constaté que le procédé appliqué a conduit à une diminution progressive de la mutagénicité du sol sur une période de 3 ans (Steliga et al., 2012).

-Les tests de toxicité effectués sur des bactéries d'eau de mer (*A. fisheri*) ou sur des bactéries d'eau douce (bactéries issues de la lagune de Bizerte et *E. coli* ont montré que les niveaux de toxicité ont diminués progressivement depuis le début jusqu'à la fin de suivi de bioremédiation.

- Les tests de génotoxicité ont montré qu'elle augmente quelques jours après le début de traitement, puis elle diminue progressivement jusqu'à atteindre des niveaux non mutagènes dans le cas des bioréacteurs bioaugmentés.

- ces essais ont montré une différence significative entre le lot des bioréacteurs témoins par rapport au lot bioaugmenté.

Conclusion

Tout au long des expériences présentées dans ce chapitre, nous avons examiné d'une part la faisabilité d'application d'un procédé de bioremédiation d'un sédiment contaminé par un mélange hétérogène de polluants (des pesticides, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des métaux, des organoétains. Et d'autre part, nous avons proposé une batterie de mesure à la fois chimiques, biologiques et toxicologiques pour évaluer le procédé de bioremédiation.

Nous avons aussi examiné l'impact d'une bioaugmentation avec des bactéries préalablement sélectionnées et identifiées pour leurs capacités de dégradation d'un mélange de polluants. Le suivi de réussite de traitement a été fait par plusieurs méthodes : (i) suivi des bactéries utilisés lors de la bioaugmentation (par PCR quantitative), (ii) suivi de la biomasse totale des sédiments (par Epiflorescence), (iii) suivi de changement de profil métabolique des sédiments (par BIOLOG), (IV) l'évolution de la quantité de carbone totale dans l'effluent de sédiment traité (par un dosage de carbone organique totale) (V) suivi du devenir des concentrations des polluants dans le sédiment (par UCLHP) et (VI) suivi de la toxicité globale et de la mutagénicité de sédiments traité (par des tests de toxicité et le test d'Ames).

Les résultats ont montré une différence toujours significative ($p<0,05$) entre les sédiments bioaugmentés et les sédiments témoins.

Les résultats indiquent que la souche *Pseudomonas stutzeri* est prédominante dans tous les sédiments traités avec le potentiel génétique à dégrader les HAP et les pesticides. Il a été montré que les traitements avec bioaugmentation diminuent la contamination HAP dans le sédiment d'environ 80 %. Nous pouvons aussi constater que la toxicité des sédiments bioaugmentés évaluée avec tous les tests effectués est toujours beaucoup plus faible (voir pas toxique avec quelques modèles bactériens testés) que les sédiments témoins.

Une combinaison d'une batterie de tests de toxicité, de génotoxicité et d'une évaluation biologique et chimique du procédé peut être utile pour fournir une évaluation globale de biorestauration des environnements contaminés.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail était de développer un procédé de bioremédiation dédié pour des sites à pollution mixte. Mais aussi présenter et tester plusieurs approches expérimentales de métrologie pour l'évaluation de l'efficacité et de la réussite de ce procédé. Afin de répondre aux différentes questions posées par le schéma global de la démarche proposée, nous avons dans un premier temps réalisé un état de l'art du site d'étude choisi (la lagune de Bizerte; Tunisie) afin d'avoir une vision multidisciplinaire de la problématique. Dans un second temps, nous avons isolé des souches bactériennes de la lagune de Bizerte pour leurs capacités à dégrader un mélange de polluants aussi bien organiques et inorganiques. Après nous avons utilisé une batterie de tests à la fois biologiques, chimiques et toxicologiques, afin de pouvoir évaluer dans les meilleures conditions un procédé de bioremédiation des sédiments pollués.

Il est évident que le choix d'un traitement biologique adéquat s'accompagne d'une analyse préliminaire de site et de la pollution à traiter ce qui permet de choisir les microorganismes candidats pour cette opération. Dans ce cadre, un souchier composé de huit souches bactériennes a été isolé de la lagune de Bizerte pour sa capacité à dégrader le DDT et/ ou le BaP. Ce souchier a subi des tests de biodégradation et de toxicité pour déterminer les souches bactériennes les plus compétentes pour la biodégradation d'un mélange complexe du DDT + BaP et qui résistent aux métaux lourds. Ces tests nous on permit de choisir les trois souches suivantes *Pseudomonas stutzeri, Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB*,* qui apparaissent comme des candidates pour la dégradation du mélange DDT+BaP. La cinétique de biodégradation de ces trois souches, a été étudiée durant 30 jours. Les analyses ont montré qu'en présence de 10 mg/L du DDT et de 10 mg/L du BaP comme uniques sources de carbone, nous obtenons un taux d'abattement du DDT de 89,77 %, 76,74 %, 83,7 et de 90,46 % de *Pseudomonas stutzeri* LBR*, Cupriavidus metallidurans* LBJ*, Rhodococcus equi* LBB et de consortium respectivement. Tandis que le taux de biodégradation obtenu pour le BaP était de 68,13 %, 50,73 %, 55,77 % et de 82,95 % de *Pseudomonas stutzeri LBR, Cupriavidus metallidurans* LBJ*, Rhodococcus equi* LBB et de consortium respectivement.

Afin d'optimiser le taux de biodégradation de ces souches, une approche de couplage de la biodégradation aux effets de champ magnétique statique a été réalisée, les résultats ont prouvé que l'utilisation d'une induction de 200 mT des champs magnétiques statiques a amélioré l'efficacité de la biodégradation du mélange DDT-BaP.

Les étapes précédentes nous en permis de développer un procédé de bioremédiation que nous avons appliqué sur des échantillons de sédiments issus de la lagune de Bizerte. Huit bioréacteurs ont été installés et remplies chacun par 7 Kg de sédiment préalablement dopés avec 40 mg/kg du DDT et du BaP, dont quatre bioréacteurs témoins et quatre bioréacteurs bioaugmentés avec un consortium composé de *Pseudomonas stutzeri LBR, Cupriavidus metallidurans* LBJ et *Rhodococcus equi* LBB. La réussite du procédé de bioremédiation a été suivie par une batterie de test à la fois biologique chimique et écotoxicologique. Le suivi des paramètres physicochimiques limitant de la biodégradation, nous avons permis de constater leur stabilité tout au long des 90 jours de suivi.

La bioaugmentation des sédiments effectuées avec un consortium composé de souches préalablement isolées : *Pseudomonas stutzeri*, *Rhodococcus equi* et *Cupriavidus metallidurans* a abouti à une différence significative entre le lot des bioréacteurs témoins par rapport au lot bioaugmenté. Cette différence est observée à la fois au niveau des résultats de la consommation de COT et des concentrations des polluants dans les sédiments. Après le suivi de consortium utilisé en bioaugmentation par qPCR, nous avons constaté que les deux souches *Pseudomonas stutzeri* LBR et *Rhodococcus equi* LBB ont été détectées jusqu'au dernier jour de suivi, par contre la souche *Cupriavidus metallidurans* LBJ n'est plus présente dans tous les bioréacteurs, ceci peut être dû à la compétition bactérienne lors de la bioremédiation. Cette hypothèse nécessite d'autres investigations.

Les tests de toxicité effectués sur des bactéries d'eau de mer (*A. fisheri*) ou sur des bactéries d'eau douce (*E.coli* et sur les bactéries isolées de la lagune de Bizerte transformées) ainsi que les tests de génotoxicité ont montré que les niveaux de toxicité ont diminué progressivement depuis le début jusqu'à la fin de suivi de procédé. Néanmoins, il est possible de conclure l'importance voire

l'obligation de passer par les tests de toxicité parmi les tests de routine pour le suivi d'un bioprocédé puisque les produits de dégradation qui sont libérés au cours du procédé ont tendance à générer plus de toxicité et de mutagénicité.

La méthode du Biolog EcoPlate nous a permis d'observer les variations de la diversité de la population microbienne au cours du suivi. Nous avons ainsi pu constater que la diversité microbienne varie en fonction du temps, du milieu et de l'évolution de la toxicité. Cette méthode peut donc être proposée dans le cadre d'un suivi de bioprocédé, puisqu'elle donne des informations complémentaires aux analyses de l'écotoxicité et aux analyses chimiques. Le suivi de la quantité de biomasse par Epiflorescence complète les données obtenues par le BIOLOG EcoPlate.

Les résultats et analyses de cette étude permettent de faire un certain nombre de recommandations quant aux traitements des sites à pollution mixte et aux différents tests nécessaires pour le suivi des bioprocédés. Quelques perspectives peuvent être proposées. En effet, il pourrait être envisagé de continuer les études à plus grandes échelles en biopile ou encore *in-situ*.

La méthodologie pourrait alors être testée sur une autre catégorie de matrice polluée, par exemple des boues de stations d'épuration ou des sols contaminés, et également d'évaluer la filière de traitements complète. Il serait également nécessaire de discuter le devenir de ces matrices après les opérations de bioremédiation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmention: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, *3*(1), 28-39.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2002). Toxicological profile for DDT, DDE, DDD. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service Atlanta, GA. Available on the Internet at: http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp35.html.

Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (ATSDR)/US Public Health Service. 704 (1994). ATSDR. Atlanta, GA

Albert, E., & Tanee, F. B. G. (2017). A laboratory trial of bioaugmentation for the removal of total petroleum hydrocarbon (TPH) in a Niger Delta soil using Oscillatoria bornettia. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, *1*(3), 147-159.

Ameur, W. B., El Megdiche, Y., de Lapuente, J., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Ennaceur, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Touil, S., Driss, M.R., & Touil, S. (2015). Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in Mugil cephalus and Dicentrarchus labrax gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere*, *135*, 67-74.

Anderson, B.S., Hunt, J.W., Phillips, B.M., Stoelting, M., Becker, J., Fairey, R., Puckett, H.M., Stephenson, M., Tjeerdema, R., & Martin, M. (2000). Ecotoxicologic change at a remediated Superfund site in San Francisco, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *19*, 879–887.

Anitescu, G., & Tavlarides, L. L. (2006). Supercritical extraction of contaminants from soils and sediments. *The Journal of supercritical fluids*, *38*(2), 167-180.

Bachmann, H., Santos, F., Kleerebezem, M., & van Hylckama Vlieg, J. E. (2007). Luciferase detection during stationary phase in Lactococcus lactis. *Applied and environmental microbiology*, *73*(14), 4704-4706.

Baczynski,T. (2012). Influence of process parameters on anaerobic biodegradation of DDT in contaminated soil preliminary lab-scale study. Part I. surfactant and initial contamination level. *Environment Protection Engineering*, *38*, 113-125.

Baczynski,T.P., Pleissner, D., &Grotenhuis, T. (2010b). Anaerobic biodegradation of organochlorine pesticides in contaminated soil – Significance of temperature and availability. *Chemosphere*, *78*, 22–28.

Bajaj, A., Mayilraj, S., Mudiam, M. K. R., Patel, D. K., & Manickam, N. (2014). Isolation and functional analysis of a glycolipid producing Rhodococcus sp. strain IITR03 with potential for degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT). *Bioresource technology*, *167*, 398-406.

Baldan, E., Basaglia, M., Fontana, F., Shapleigh, J. P., & Casella, S. (2015). Development, assessment and evaluation of a biopile for hydrocarbons soil remediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *98*, 66-72.

Ballerini, D., Gatellier, C., & Vogel, T. (1998). Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués. *Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. Angers, Francia*, 18-157.

Bancroft, K., Maloney, S. W., McElhaney, J., Suffet, I. H., & Pipes, W. O. (1983). Assessment of bacterial growth and total organic carbon removal on granular activated carbon contactors. *Applied and environmental microbiology*, *46*(3), 683-688.

Barhoumi, B., Clerandeau, C., Gourves, P. Y., Le Menach, K., El Megdiche, Y., Peluhet, L., Budzinski, H., Baudrimont, M., Driss, M.R., & Cachot, J. (2014b). Pollution biomonitoring in the Bizerte lagoon (Tunisia), using combined chemical and biomarker analyses in grass goby, Zosterisessor ophiocephalus (Teleostei, Gobiidae). *Marine environmental research*, *101*, 184-195.

Barhoumi, B., Le Menach, K., Devier, M. H., Ameur, W. B., Etcheber, H., Budzinski, H.,Cachot, J.,& Driss, M. R. (2014a). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from the Bizerte Lagoon, Tunisia: levels, sources, and toxicological significance. *Environmental monitoring and assessment*, *186*(5), 2653-2669.

Ben Ameur, W., El Megdiche, Y., Eljarrat, E., Ben Hassine, S., Badreddine, B., Souad, T., Bèchir, H., Barceló, D., & Driss, M.R. (2013). Organochlorine and organobromine compounds in a benthic fish (Soleasolea) from Bizerte Lagoon (northern Tunisia): implications for human exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 88*, 55-64.

Ben Ameur, W., Trabelsi, S., El Bedoui, B., &Driss, M.R. (2011). Polychlorinated biphenyls in sediments from Ghar El Melh lagoon, Tunisia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 86*, 539–544.

Ben Said, O., Goñi-Urriza, M. S., El Bour, M., Dellali, M., Aissa, P., & Duran, R. (2008). Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(4), 987-997.

Benejam, L., Benito, J., & Gracia-Berthou, E. (2010). Decreases in condition and fecundity of freshwater fishes in a highly polluted reservoir. *Water, Air, & Soil Pollution*, *210*, 231–242.

Bennasar, A., Guasp, C., & Lalucat, J. (1998). Molecular methods for the detection and identification of Pseudomonas stutzeri in pure culture and environmental samples. *Microbial ecology*, *35*(1), 22-33.

Betancur-Corredor, B., Pino, N. J., Cardona, S., & Peñuela, G. A. (2015). Evaluation of biostimulation and Tween 80 addition for the bioremediation of long-term DDT-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, *28*, 101-109.
Betancur-Corredor, B., Pino, N. J., Cardona, S., & Peñuela, G. A. (2015). Evaluation of biostimulation and Tween 80 addition for the bioremediation of long-term DDT-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, *28*, 101-109.

Bettinetti, R., Croce, V., & Galassi, S. (2005). . Ecological risk assessment for the recent case of DDT pollution in Lake Maggiore (Northern Italy). *Water, Air, & Soil Pollution*, *152*, 385–399.

Binelli, A., and Provini, A. (2004). Risk for human health of some POPs due to fish from Lake Iseo. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *58*, 139–145.

Boul, H.L. (1996). Effects of soil moisture on the fate of radio labelled DDT and DDE in vitro. *Chemosphere*, *32*, 855-866.

Brar, S. K., Verma, M., Surampalli, R. Y., Misra, K., Tyagi, R. D., Meunier, N., & Blais, J. F. (2006). Bioremediation of hazardous wastes—a review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, *10*(2), 59-72.

Brohon, B., & Gourdon, R. (2000). Influence of soil microbial activity level on the determination of contaminated soil toxicity using Lumistox and MetPlate bioassays. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*(6), 853-857.

Butler, C. S., & Mason, J. R. (1996). Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Advances in microbial physiology*, *38*, 47-84.

Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G. A., Uad, I., & González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of the total environment*, *407*(12), 3634-3640.

Ceccanti, B., Masciandaro, G., Garcia, C., Macci, C., & Doni, S. (2006). Soil bioremediation: combination of earthworms and compost for the ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, *177*(1), 383-397.

Čejková, A., Masák, J., Jirků, V., Veselý, M., Pátek, M., & Nešvera, J. (2005). Potential of Rhodococcus erythropolis as a bioremediation organism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(3), 317-321.

Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, *4*(3), 331-338.

Chen, J., Hubbard, S. S., Williams, K. H., Flores Orozco, A., & Kemna, A. (2012). Estimating the spatiotemporal distribution of geochemical parameters associated with biostimulation using spectral induced polarization data and hierarchical Bayesian models. *Water Resources Research*, *48* (5), 1 -25.

Chi, X. Q., Zhang, J. J., Zhao, S., & Zhou, N. Y. (2013). Bioaugmentation with a consortium of bacterial nitrophenol-degraders for remediation of soil contaminated with three nitrophenol isomers. *Environmental pollution*, *172*, 33-41.

Chiu, S. W., Ho, K. M., Chan, S. S., So, O. M., & Lai, K. H. (2006). Characterization of contamination in and toxicities of a shipyard area in Hong Kong. *Environmental pollution*, *142*(3), 512-520.

Corona-Cruz, A., Gold-Bouchot, G., Gutierrez-Rojas, M., Monroy-Hermosillo, O., &Favela, E. (1999). Anaerobic-aerobicbiodegradation of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) in soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *63*, 219-225.

Cosgrove, L., McGeechan, P. L., Handley, P. S., & Robson, G. D. (2010). Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *Applied and environmental microbiology*, *76*(3), 810-819.

Couto, M. N. P., Monteiro, E., & Vasconcelos, M. T. S. (2010). Mesocosm trials of bioremediation of contaminated soil of a petroleum refinery: comparison of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Environmental Science and Pollution Research*, *17*(7), 1339-1346.

Crisafi, F., Genovese, M., Smedile, F., Russo, D., Catalfamo, M., Yakimov, M., & Denaro, R. (2016). Bioremediation technologies for polluted seawater sampled after an oil-spill in Taranto Gulf (Italy): A comparison of biostimulation, bioaugmentation and use of a washing agent in microcosm studies. *Marine pollution bulletin*, *106*(1), 119-126.

Da Silva, M. L., Daprato, R. C., Gomez, D. E., Hughes, J. B., Ward, C. H., & Alvarez, P. J. (2006). Comparison of bioaugmentation and biostimulation for the enhancement of dense nonaqueous phase liquid source zone bioremediation. *Water Environment Research*, *78*(13), 2456-2465.

De Lorenzo, V. (2008). Systems biology approaches to bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, *19*(6), 579-589.

Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E. M., & Verstraete, W. (2001). Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environmental Microbiology*, *3*(10), 649-657.

DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., &Ross, P.E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*.20:84–98.

Deribe, E., Rosseland, B. O., Borgstrøm, R., Salbu, B., Gebremariam, Z., Dadebo, E., ... & Eklo, O. M. (2013). Biomagnification of DDT and its metabolites in four fish species of a tropical lake. *Ecotoxicology and environmental safety*, *95*, 10-18.

Derouiche, A., Sanda, Y. G., & Driss, M. R. (2004). Polychlorinated biphenyls in sediments from Bizerte lagoon, Tunisia. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, *73*(5), 810-817.

Di Landa, G., Parrella, L., Avagliano, S., Ansanelli, G., Maiello, E., &Cremisini, C. (2009). Assessment of the potential ecological risk posed by antifouling booster biocides to the Marine Ecosystem of the Gulf of Napoli (Italy). *Water Air and Soil Pollution*. 200:305–321.

Diels, L., Van Roy, S., Taghavi, S., & Van Houdt, R. (2009). From industrial sites to environmental applications with Cupriavidus metallidurans. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *96*(2), 247-258.

Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, *59*(2-3), 143-152.

Duan, G., Riqing, Y., Xuan, H., Qin, T., Laiguo, C., &Yuping, W. (2014). Bioaccumulation and biomagnification of persistent organic pollutants in Indo-Pacific humpback dolphins (Sousa chinensis) from the Pearl River Estuary, China. *Chemosphere*,*114*, 106–113.

Durand, M. J., Thouand, G., Dancheva-Ivanova, T., Vachon, P., & DuBow, M. (2003). Specific detection of organotin compounds with a recombinant luminescent bacteria. *Chemosphere*, *52*(1), 103-111.

Edlund, A., & Jansson, J. K. (2006). Changes in active bacterial communities before and after dredging of highly polluted Baltic Sea sediments. *Applied and environmental microbiology*, *72*(10), 6800-6807.

El Fantroussi, S., & Agathos, S. N. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current opinion in microbiology*, *8*(3), 268-275.

El Fantroussi, S., Belkacemi, M., Top, E. M., Mahillon, J., Naveau, H., & Agathos, S. N. (1999). Bioaugmentation of a soil bioreactor designed for pilot-scale anaerobic bioremediation studies. *Environmental science & technology*, *33*(17), 2992-3001.

Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. &Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175-177.

Environmental Protection Agency (EPA). (1980). Washington DC: United States Environmental Protection Agency. 440/5-80-038.

Eqani, S.A., Malik, R.N., & Mohammad, A. (2011). The level and distribution of selected organochlorine pesticides in sediments from River Chenab, Pakistan. *Environmental Geochemistry and Health, 33*,33– 47.

European Commission. (2010). Guidance Document No. 25 on Chemical Monitoring of Sediment and Biota under the Water Framework Directive

Fan, B., Zhao, Y., Mo, G., Ma, W., & Wu, J. (2013). Co-remediation of DDT-contaminated soil using white rot fungi and laccase extract from white rot fung. *Journal of Soils and Sediments*, *13*, 1232–1245.

Fang, H., Dong, B., Yan, H., Tang, F., &Yu, Y. (2010). Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil. *Journal Hazardous Material*, *184*, 281–289.

Fitzgerald, E.F., Hwang, S.A., Langguth, K., Cayo, M., Yang, B.Z., Bush, B., Worswick, P., & Lauzon, T (2004). Fish consumption and other environmental exposures and their associations with serum PCB concentrations among Mohawk women at A kwesasne. *Environmental Research*, *94*, 160–170.

Fojt, L., Klapetek, P., Strašák, L., & Vetterl, V. (2009). 50Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. *Micron*, *40*(8), 918-922.

Forsyth, J. V., Tsao, Y. M., & Bleam, R. D. (1995). *Bioremediation: When is augmentation needed?* (No. CONF-950483--). Battelle Press, Columbus, OH (United States).

Gentry, T., Rensing, C., & Pepper, I. A. N. (2004). New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical reviews in environmental science and technology*, *34*(5), 447-494.

Gohil, H., Ogram, A., & Thomas, J. (2014). Stimulation of anaerobic biodegradation of DDT and its metabolites in a muck soil: laboratory microcosm and mesocosm studies. *Biodegradation*, *25*(5), 633-642.

Grung, M., Lin, Y., Zhang, H., Steen, A., Huang, J., Zhang, G., &Larssen, T. (2015).Pesticide levels and environmental risk in aquatic environments in China. A review. *Environment International*, *81*, 87–97.

Gryta, A., Frąc, M., & Oszust, K. (2014). The application of the Biolog EcoPlate approach in ecotoxicological evaluation of dairy sewage sludge. *Applied biochemistry and biotechnology*, *174*(4), 1434-1443.

Guerin, T. F. (1999). Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ landtreatment. *Journal of hazardous materials*, *65*(3), 305-315.

Häggblom, M. M., & Bossert, I. D. (2003). *Microbial Processes and Environmental Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Hale, S.E., Tomaszewski, J.E., Luthy, R.G., & Werner, D. (2009). Sorption of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its metabolites by activated carbon in clean water and sediment slurries. *Water Research*, *43*,4336-4346.

Harch, B. D., Correll, R. L., Meech, W., Kirkby, C. A., & Pankhurst, C. E. (1997). Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilisation data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities. *Journal of Microbiological Methods*, *30*(1), 91-101.

Hay, A. G., & Focht, D. D. (2000). Transformation of 1, 1-dichloro-2, 2-(4-chlorophenyl) ethane (DDD) by Ralstonia eutropha strain A5. *FEMS microbiology ecology*, *31*(3), 249-253.

Heitzer, A., & Sayler, G. S. (1993). Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends in biotechnology*, *11*(8), 334-343.

Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A., & Schwager, S.J. (2004). Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science*, *303*, 226-229.

Höhener, P., Hunkeler, D., Hess, A., Bregnard, T., & Zeyer, J. (1998). Methodology for the evaluation of engineered in situ bioremediation: lessons from a case study. *Journal of microbiological methods*, *32*(2), 179-192.

Hughes, J. B., Beckles, D. M., Chandra, S. D., & Ward, C. H. (1997). Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *18*(2), 152-160.

Hunt, R. W., Zavalin, A., Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., & Das, K. C. (2009). Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. *International journal of molecular sciences*, *10*(10), 4515-4558.

ICNIRP (1994). International Commission on Non- Ionising Radiation Protection. https://www.icnirp.org/

Insam, H., 1997. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: Insam, H., Rangger, A. (Eds.), Microbial Communities: Functional Versus Structural Approaches. Springer-Verlag, pp. 259–260.

Jeanbille, M., Buée, M., Bach, C., Cébron, A., Frey-Klett, P., Turpault, M. P., & Uroz, S. (2016). Soil Parameters Drive the Structure, Diversity and Metabolic Potentials of the Bacterial Communities Across Temperate Beech Forest Soil Sequences. *Microbial ecology*, *71*(2), 482-493.

Ji, Y., Wang, Y., Sun, J., Yan, T., Li, J., Zhao, T. Yin, X., & Sun, C. (2010). Enhancement of biological treatment of wastewater by magnetic field. *Bioresource technology*, *101*(22), 8535-8540.

Jirku, V., Cejková, A., Masák, J., Pátek, M., & Nešvera, J. (2006). Towards the applicability of Rhodococci in monoaromatic compounds bioremediation. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions*, 561-565.

Johnsen, R. E. (2013). DDT metabolism in microbial systems. *Residue Reviews: Residues of Pesticides and Other Contaminants in the Total Environment*, *61*, 1.

Jørgensen, K. S., Puustinen, J., & Suortti, A. M. (2000). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental pollution*, *107*(2), 245-254.

Jouanneau, S., Durand, M. J., Courcoux, P., Blusseau, T., & Thouand, G. (2011). Improvement of the identification of four heavy metals in environmental samples by using predictive decision tree models coupled with a set of five bioluminescent bacteria. *Environmental science & technology*, *45*(7), 2925-2931.

Juhasz, A. L., & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *International biodeterioration & biodegradation*, *45*(1), 57-88.

Kadian, N., Gupta, A., Satya, S., Mehta, R. K., & Malik, A. (2008). Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed materials. *Bioresource Technology*, *99* (11), 4642-4647.

Kanissery, R. G., & Sims, G. K. (2011). Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. *Applied and Environmental Soil Science*, *2011*, doi:10.1155/2011/843450.

Kannan, K., Tanabe, S., Williams, R. J., & Tatsukawa, R. (1994). Persistant organochlorine residues in foodstuffs from Australia, Papua New Guinea and the Solomon Islands: contamination levels and human dietary exposure. *Science of the Total Environment*, *153*(1-2), 29-49.

Kantachote, D., Naidu, R., Williams, B., McClure, N., Megharaj, M., Singleton, I. (2004). DDT resistance and transformation by different microbial strains isolated from DDT-contaminated soils and compost materials. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 632–638.

Kao, C. M., & Wang, C. C. (2000). Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. *Water Research*, *34*(13), 3413-3423.

Kiviranta, H., Vartiainen, T., &Tuomisto, J. (2002). Polychlorinated dibenzo-p-dioxins,dibenzofurans, and biphenyls in fishermen in Finland. *Environmental Health Perspectives*. 110:355–361.

Klánová, J., Matykiewiczová, N., Máčka, Z., Prosek, P., Láska, K., & Klán, P. (2008). Persistent organic pollutants in soils and sediments from James Ross Island, Antarctica. *Environmental Pollution*, 152, 416–423.

Křiklavová, L., Truhlář, M., Škodová, P., Lederer, T., & Jirků, V. (2014). Effects of a static magnetic field on phenol degradation effectiveness and Rhodococcus erythropolis growth and respiration in a fed-batch reactor. *Bioresource technology*, *167*, 510-513.

Lanthier, M., Tartakovsky, B., Villemur, R., DeLuca, G., & Guiot, S. R. (2002). Microstructure of anaerobic granules bioaugmented with Desulfitobacterium frappieri PCP-1. *Applied and environmental microbiology*, *68*(8), 4035-4043.

Liang, Q., Lei, M., Chen, T., Yang, J., Wan, X., & Yang, S. (2014). Application of sewage sludge and intermittent aeration strategy to the bioremediation of DDT-and HCH-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, *26*(8), 1673-1680.

Lin, T. C., Pan, P. T., & Cheng, S. S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, *176*(1), 27-34.

Lin, T., Hu, Z., Zhang, G., Li, X., Xu, W., Tang, J., & Li, J. (2009). Levels and mass burden of DDTs in sediments from fishing harbors: the importance of DDT-containing antifouling paint to the coastal environment of China. *Environmental science & technology*, *43*(21), 8033-8038.

Louati, H., Said, O. B., Got, P., Soltani, A., Mahmoudi, E., Cravo-Laureau, C. Duran, R., Aissa, P., & Pringault, O. (2013). Microbial community responses to bioremediation treatments for the mitigation of low-dose anthracene in marine coastal sediments of Bizerte lagoon (Tunisia). *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(1), 300-310.

Louati, H., Said, O. B., Soltani, A., Cravo-Laureau, C., Duran, R., Aissa, P., Mahmoudi, E., & Pringault, O. (2015). Responses of a free-living benthic marine nematode community to bioremediation of a PAH mixture. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(20), 15307-15318.

Louiz, I., Hassine, O. K. B., Palluel, O., Ben-Attia, M., & Aït-Aïssa, S. (2016). Spatial and temporal variation of biochemical biomarkers in Gobius niger (Gobiidae) from a southern Mediterranean lagoon (Bizerta lagoon, Tunisia): Influence of biotic and abiotic factors. *Marine pollution bulletin*, *107*(1), 305-314.

Luo, W., Zhao, Y., Ding, H., Lin, X., & Zheng, H. (2008). Co-metabolic degradation of bensulfuron-methyl in laboratory conditions. *Journal of hazardous materials*, *158*(1), 208-214.

MacNaughton, S. J., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y. J., & White, D. C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and environmental microbiology*, *65*(8), 3566-3574.

Major, D. W., McMaster, M. L., Cox, E. E., Edwards, E. A., Dworatzek, S. M., Hendrickson, E. R., ... & Buonamici, L. W. (2002). Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environmental Science & Technology*, *36*(23), 5106-5116.

Mamta Rao, R.J., and Wani, K.A. (2015). Concentration of Organochlorine and Organophosphorus Pesticides in Different Molluscs from Tighra Reservoir, Gwalior, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *95*, 332-339.

Man, Y. B., Chow, K. L., Kang, Y., & Wong, M. H. (2013). Mutagenicity and genotoxicity of Hong Kong soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxins/furans. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *752*(1), 47-56.

Mansouri, A., Cregut, M., Abbes, C., Durand, M. J., Landoulsi, A., & Thouand, G. (2016). The Environmental Issues of DDT Pollution and Bioremediation: a Multidisciplinary Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-31.

Mansouri, A., Abbes, C., Landoulsi, A. (2017). Combined intervention of static magnetic field and growth rate of *Microbacterium maritypicum* CB7 for Benzo(a)Pyrene biodegradation. *Microbiol Pathogenesis*, *5*(113), 40-44.

Margesin, R., Fonteyne, P. A., & Redl, B. (2005). Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by Rhodococcus spp. and basidiomycetous yeasts. *Research in microbiology*, *156*(1), 68-75.

Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, *113*(3-4), 173-215.

Martins, M. V. A., Helali, M. A., Zaaboub, N., Boukef-BenOmrane, I., Frontalini, F., Reis, D., Portela, H., Clemente, I.M., Nogueira, L., Pereira, E., Miranda, P., El Bour, M.,& Miranda, P. (2016). Organic matter quantity and quality, metals availability and foraminiferal assemblages as environmental proxy applied to the Bizerte Lagoon (Tunisia). *Marine pollution bulletin*, *105*(1), 161-179.

Martins, M. V. A., Zaaboub, N., Aleya, L., Frontalini, F., Pereira, E., Miranda, P.,Mane, M., Rocha, F., Laut, L.,& El Bour, M. (2015). Environmental quality assessment of Bizerte Lagoon (Tunisia) using living foraminifera assemblages and a multiproxy approach. *PloS one*, *10*(9), e0137250.

Masmoudi, W., Romdhane, M.S., Khériji, S., &El Cafsi, M. (2007). Polychlorinated biphenyl residues in the gold engrey mullet (*Liza aurata*) from Tunis Bay, Mediterranean sea (Tunisia). *Food Chemistry, 105*, 72–76.

Mastral, A. M., Callen, M. S., & Garcia, T. (2000). Toxic organic emissions from coal combustion. *Fuel processing technology*, *67*(1), 1-10.

Mitra, J., Mukherjee, P.K., Kale, S.P., &Murthy, N.B. (2001). Bioremediation of DDT in soil by genetically improved strains of soil fungus *Fusarium solani*. *Biodegradation*, *12*, 235-245.

Molina-Barahona, L., Vega-Loyo, L., Guerrero, M., Ramirez, S., Romero, I., Vega-Jarquín, C., & Albores, A. (2005). Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environmental toxicology*, *20*(1), 100-109.

Moody, J. D., Freeman, J. P., Fu, P. P., & Cerniglia, C. E. (2004). Degradation of benzo [a] pyrene by Mycobacterium vanbaalenii PYR-1. *Applied and environmental microbiology*, *70*(1), 340-345.

Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological research*, *165*(5), 363-375.

Mzoughi, N., Stoichev, T., Dachraoui, M., El Abed, A., Amouroux, D., & Donard, O. F. X. (2002). Inorganic mercury and methylmercury in surface sediments and mussel tissues from a microtidal lagoon (Bizerte, Tunisia). *Journal of Coastal Conservation*, *8*(2), 141-145.

Nadeau, L.J., Mann, F.M., Breen, A., &Sayler, G.S. (1994). Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl) ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Applied and Environmental Microbiology, 60*, 51-55.

Niu, C., Geng, J., Ren, H., Ding, L., Xu, K., & Liang, W. (2013). The strengthening effect of a static magnetic field on activated sludge activity at low temperature. *Bioresource technology*, *150*, 156-162.

Nocentini, M., Pinelli, D., & Fava, F. (2000). Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere*, *41*(8), 1115-1123.

Olaniran, A. O., Pillay, D., & Pillay, B. (2006). Biostimulation and bioaugmentation enhances aerobic biodegradation of dichloroethenes. *Chemosphere*, *63*(4), 600-608.

Organisation Mondiale de Santé (OMS). (1989). Environmental health Criteria 83, DDT and its Derivatives--Environmental Effects. World Health Organization, Geneva.

Ortíz, I., Velasco, A., Le Borgne, S., & Revah, S. (2013). Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates. *Biodegradation*, *24*(2), 215-225.

Oudot, J., Merlin, F. X., & Pinvidic, P. (1998). Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments. *Marine Environmental Research*, *45*(2), 113-125.

Paissé, S., Coulon, F., Goñi-Urriza, M., Peperzak, L., McGenity, T. J., & Duran, R. (2008). Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS microbiology ecology*, *66*(2), 295-305.

Pan, X., Lin, D., Zheng, Y., Zhang, Q., Yin, Y., Cai, L.,Fang,H., & Yu, Y. (2016). Biodegradation of DDT by *Stenotrophomonas* sp. DDT-1: Characterization and genome functional analysis. *Scientific reports*, *6*.

Parthipan, P., Elumalai, P., Sathishkumar, K., Sabarinathan, D., Murugan, K., Benelli, G., & Rajasekar, A. (2017). Biosurfactant and enzyme mediated crude oil degradation by Pseudomonas stutzeri NA3 and *Acinetobacter baumannii* MN3. *3 Biotech*, *7*(5), 278. doi: 10.1007/s13205-017-0902-7

Pimentel, D., Andow, D., Dyson-Hudson, R., Gatlahan, D., Jacobson, S., Irish, M., Kroop, S., Moss, A., Schreiner, I., Shepard, M., Thompson, T., & Vinzant, B. (1980). Environmental and social costs of pesticides: a preliminary assessment. *Oikos*, *34*, 126–140.

Poland, J. S., Riddle, M. J., & Zeeb, B. A. (2003). Contaminants in the Arctic and the Antarctic: a comparison of sources, impacts, and remediation options. *Polar Record*, *39*(4), 369-383.

Pozo, K., Harner, T., Wania, F., Muir, D. C., Jones, K. C., & Barrie, L. A. (2006). Toward a global network for persistent organic pollutants in air: results from the GAPS study. *Environmental Science & Technology*, *40*(16), 4867-4873.

Purnomo, A. S., Mori, T., Takagi, K., & Kondo, R. (2011). Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *65*(5), 691-695.

Purnomo, A.S., Koyama, F., Mori, T., &Kondo, R. (2010b). DDT degradation potential of cattle manure compost. *Chemosphere*, *80*, 619-624.

Purnomo, A.S., Mori, T., Kamei, I., Nishii, T., &Kondo, R. (2010a). Application of mushroom waste medium from *Pleurotusostreatus* for bioremediation of DDT-contaminated soil. *International Biodeterioration& Biodegradation*, *64*, 397-402.

Qu, J., Xu, Y., Ai, G. M., Liu, Y., & Liu, Z. P. (2015). Novel *Chryseobacterium*sp. PYR2 degrades various organochlorine pesticides (OCPs) and achieves enhancing removal and complete degradation of DDT in highly contaminated soil. Journal of Environmental Management., *161*, 350–357.

Reddy, K., & Adams, J. (2015). *Sustainable remediation of contaminated sites*. Momentum Press.

Ripp, S., Nivens, D. E., Ahn, Y., Werner, C., Jarrell, J., Easter, J. P., Chris D. Cox, Robert S. Burlage,Sayler, G. S. (2000). Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. *Environmental science & technology*, *34*(5), 846-853.

Riser-Roberts, E. (1998). *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes*. CRC press.

Roberta, B., Silvana, G., Licia, G., Silvia, Q., & Pietro, V. (2010). . The role of zooplankton in DDT biomagnifications in a pelagic food web of Lake Maggiore (Northern Italy). *Environmental science and pollution research international, 17*, 1508–1518.

Rodríguez-Lázaro, D., Lewis, D. A., Ocampo-Sosa, A. A., Fogarty, U., Makrai, L., Navas, J.Scortti, M, Hernández, M,& Vázquez-Boland, J. A. (2006). Internally controlled real-time PCR method for quantitative species-specific detection and vapA genotyping of Rhodococcus equi. *Applied and environmental microbiology*, *72*(6), 4256-4263.

Rollin, C., & Quiot, F. (2006). Eléments traces métalliques-guide méthodologique: recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. *Rapp. d'étude INERIS*.

Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2011). Specific PCR to identify the heavy-metal-resistant bacterium Cupriavidus metallidurans. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *38*(9), 1613-1615.

Sabaté, J., Vinas, M., & Solanas, A. M. (2004). Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International biodeterioration & biodegradation*, *54*(1), 19-25.

Sahraoui, I., Hlaili, A. S., Mabrouk, H. H., Leger, C., & Bates, S. S. (2009). Blooms of the diatom genus pseudo-nitzschia H. peragallo in Bizerte lagoon (Tunisia, SW Mediterranean). *Diatom Research*, *24*(1), 175-190.

Said, O. B., Louati, H., Soltani, A., Preud'homme, H., Cravo-Laureau, C., Got, P., Pringault, O., Aissa, P., & Duran, R. (2015). Changes of benthic bacteria and meiofauna assemblages during bio-treatments of anthracene-contaminated sediments from Bizerta lagoon (Tunisia). *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(20), 15319-15331.

Salam, L. B., Obayori, O. S., & Olatoye, N. O. (2014). Biodegradation of anthracene by a novel actinomycete, Microbacterium sp. isolated from tropical hydrocarbon-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(1), 335-341.

Salomo, S., Münch, C., & Röske, I. (2009). Evaluation of the metabolic diversity of microbial communities in four different filter layers of a constructed wetland with vertical flow by Biolog™ analysis. *Water research*, *43*(18), 4569-4578.

Samanta, S. K., Singh, O. V., & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, *20*(6), 243-248.

Sanger, D. M., Holland, A. F., & Scott, G. I. (1999). Tidal creek and salt marsh sediments in South Carolina coastal estuaries: II. Distribution of organic contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *37*(4), 458-471.

Sasek, V., Glaser, J. A., & Baveye, P. (Eds.). (2012). *The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solutions* (Vol. 19). Springer Science & Business Media.

Sayler, G. S., & Ripp, S. (2000). Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology*, *11*(3), 286-289.

Schauer, R., Bienhold, C., Ramette, A., & Harder, J. (2010). Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. *The ISME journal*, *4*(2), 159-170.

Schippers, A., Bosecker, K., Spröer, C., & Schumann, P. (2005). Microbacterium oleivorans sp. nov. and Microbacterium hydrocarbonoxydans sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *55*(2), 655-660.

Scholes, E., Verheyen, V., & Brook-Carter, P. (2016). A review of practical tools for rapid monitoring of membrane bioreactors. *Water Research*, *102*, 252-262.

Scow, K. M., & Hicks, K. A. (2005). Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology*, *16*(3), 246-253.

Silva-Castro, G. A., Uad, I., Rodríguez-Calvo, A., González-López, J., & Calvo, C. (2015). Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environmental research*, *137*, 49-58.

Singh, A., Kuhad, R. C., Shareefdeen, Z., & Ward, O. P. (2004). Methods for monitoring and assessment of bioremediation processes. In *Biodegradation and bioremediation* (pp. 279-304). Springer Berlin Heidelberg.

Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., & Hu, Z. (2011). Isolation, characterization of Rhodococcus sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Marine pollution bulletin*, *62*(10), 2122-2128.

Stefanowicz, A. (2006). The Biolog Plates Technique as a Tool in Ecological Studies of Microbial Communities. *Polish Journal of Environmental Studies*, *15*(5).

Steliga, T., Jakubowicz, P., & Kapusta, P. (2012). Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology*, *125*, 1-10.

Sturman, P. J., Stewart, P. S., Cunningham, A. B., Bouwer, E. J., & Wolfram, J. H. (1995). Engineering scale-up of in situ bioremediation processes: a review. *Journal of Contaminant Hydrology*, *19*(3), 171-203.

Sun, G., Zhang, X., Hu, Q., Zhang, H., Zhang, D., & Li, G. (2015). Biodegradation of dichlorodiphenyltrichloroethanes (DDTs) and hexachlorocyclohexanes (HCHs) with plant and nutrients and their effects on the microbial ecological kinetics. *Microbial ecology*, *69*(2), 281-292.

Tanabe, S., Gondaira, F., Subramanian, A., Ramesh, A., Mohan, D., Kumaran, P., ... & Tatsukawa, R. (1990). Specific pattern of persistent organochlorine residues in human breast milk from South India. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(3), 899-903.

Taube, N., He, J., Ryan, M. C., & Valeo, C. (2016). Relative importance of P and N in macrophyte and epilithic algae biomass in a wastewater-impacted oligotrophic river. *Environmental monitoring and assessment*, *188*(8), 494.

Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., & Christie, P. (2010). Effect of bioaugmentation by Paracoccus sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technology*, *101*(10), 3437-3443.

Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., & Christie, P. (2010). Effect of bioaugmentation by Paracoccus sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technology*, *101*(10), 3437-3443.

Thomas, J. E., & Gohil, H. (2011). Microcosm studies on the degradation of o, p'-and p, p'-DDT, DDE, and DDD in a muck soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(3), 619-625.

Tren, R., & Bate, R. (2004). South Africa's War against Malaria. *Lessons from the developing world Policy analysis*.

Van de Plassche, E. J., Schwegler, A. M. G. R., Rasenberg, M., & Schouten, G. (2002). DDT in Dicofol. In *Further Assessment of Persistent Organic Pollutants (Pops). Compendium of Substance-Related Information, Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution, UNECE*.

Van Straalen, N. M. (2002). Assessment of soil contamination–a functional perspective. *Biodegradation*, *13*(1), 41-52.

Vinas, M., Sabaté, J., Espuny, M. J., & Solanas, A. M. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(11), 7008-7018.

Wan, S., Sun, L., Douieb, Y., Sun, J., & Luo, W. (2013). Anaerobic digestion of municipal solid waste composed of food waste, wastepaper, and plastic in a single-stage system: performance and microbial community structure characterization. *Bioresource technology*, *146*, 619-627.

Wang, X.P., Yao, T.D., Cong, Z.Y., Yan, X.L., Kang, S.C., & Zhang, Y. (2006). Gradient distribution of persistent organic contaminations along northern slope of Central-Himalayas, China. *Science of The Total Environment.* 372:193–202.

Ward, O., Singh, A., & Van Hamme, J. (2003). Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *30*(5), 260-270.

Watanabe, K., Teramoto, M., & Harayama, S. (2002). Stable augmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harboured by an indigenous dominant bacterium. *Environmental Microbiology*, *4*(10), 577-583.

Weber, K.P., Gehder, M., Legge, R.L., 2007. Assessment of changes in the microbial community of constructed wetland mesocosms in response to acid mine drainage exposure. Water Research 42 (1–2), 180–188.

White, D. C., Flemming, C. A., Leung, K. T., & Macnaughton, S. J. (1998). In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, *32*(2), 93-105.

White, P. A., & Claxton, L. D. (2004). Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *567*(2), 227-345.

Wilson, S. C., & Jones, K. C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental pollution*, *81*(3), 229-249.

Wurl, O., & Obbard, J. P. (2005). Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Singapore's coastal marine sediments. *Chemosphere*, *58*(7), 925-933.

Yadav, I.C., Devi, N.L., Syed, J.H., Cheng, Z., Li, J., Zhang, G., & Jones, K.C. (2015). Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of The Total Environment*, *511*, 123–137.

Yan, M., Zhao, L., Bao, M., & Lu, J. (2016). Hydrolyzed polyacrylamide biodegradation and mechanism in sequencing batch biofilm reactor. *Bioresource technology*, *207*, 315-321.

Yang, C. W., Hsiao, W. C., & Chang, B. V. (2016). Biodegradation of sulfonamide antibiotics in sludge. *Chemosphere*, *150*, 559-565.

Yang, N., Matsuda, M., Kawano, M., & Wakimoto, T. (2006). PCBs and organochlorine pesticides (OCPs) in edible fish and shell fish from China. *Chemosphere*, *63*, 1342–1352.

Yang, Y., Ligouis, B., Pies, C., Grathwohl, P., & Hofmann, T. (2008). Occurrence of coal and coal-derived particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a river floodplain soil. *Environmental Pollution*, *151*(1), 121-129.

Yavuz, H., & Celebi, S. S. (2000). Effects of magnetic field on activity of activated sludge in wastewater treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, *26*(1), 22-27.

Zhang, A., Chen, Z., Ahrens, L., Liu, W., & Li, Y. F. (2012). Concentrations of DDTs and enantiomeric fractions of chiral DDTs in agricultural soils from Zhejiang Province, China, and correlations with total organic carbon and pH. *Journal of agricultural and food chemistry*, *60*(34), 8294-8301.

Zhao, Y., & Yi, X. (2010). Effects of soil oxygen conditions and soil pH on remediation of DDT-contaminated soil by laccase from white rot fungi. *International journal of environmental research and public health*, *7*(4), 1612-1621.

Zhou, R., Zhu, L., Chen, Y., & Kong, Q. (2008). Concentrations and characteristics of organochlorine pesticides in aquatic biota from Qiantang River in China. *Environmental Pollution*. 151:190-199.

Zhu, F., Storey, S., Ashaari, M. M., Clipson, N., & Doyle, E. (2016). Benzo (a) pyrene degradation and microbial community responses in composted soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

ARTICLES PUBLIÉS DANS DES REVUES INTERNATIONALES