

# Étude de l'absorption des phosphates, azote, chrome et cadmium par trois algues vertes isolées à partir d'effluents urbains

## Phosphate, nitrogen, chromium and cadmium uptake by three green algae species isolated from an urban wastewater

R. A. Zerhouni, D. Bouya, C. Ronneau and J. Cara

Volume 17, Number 3, 2004

URI: <https://id.erudit.org/iderudit/705536ar>

DOI: <https://doi.org/10.7202/705536ar>

[See table of contents](#)

Publisher(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (print)

1718-8598 (digital)

[Explore this journal](#)

Cite this article

Zerhouni, R. A., Bouya, D., Ronneau, C. & Cara, J. (2004). Étude de l'absorption des phosphates, azote, chrome et cadmium par trois algues vertes isolées à partir d'effluents urbains. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 17(3), 317–328. <https://doi.org/10.7202/705536ar>

Article abstract

Wastewater discharge is an environmental problem, especially in developing countries. Biological wastewater treatment seems to be an alternative for these countries due to its low cost. Algae are used in such wastewater treatment systems in many parts of the world. In addition to preventing environmental damage, the reuse of treated wastewater can be an alternative water supply in arid regions and during drought periods.

In this paper, three algal (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*) species were isolated from an urban effluent collected from a Mediterranean city (Fez, Morocco, situated between 4° to 7° W and 33° to 35° N) and their ability to remove phosphate and nitrogen was tested under laboratory conditions. The toxicity and uptake of chromium and cadmium were also studied.

Fez city wastewater was sampled monthly during one year (2000) at three main stations located along the Boukhareb stream which crosses the city. The following parameters were measured according to methods described by RODIER J. (1996): Chemical oxygen demand, COD; Biological oxygen demand, BOD;  $\text{NO}_3^-$ ;  $\text{NH}_4^+$ ;  $\text{PO}_4^{3-}$ ; electrical conductivity (EC) and organic matter. Heavy metals (Cr, Fe and Zn) were measured by INAA (Instrumental Thermal Neutron Activation Analysis) in wastewater samples dried on Teflon sheets at 70°C.

The collected samples were incubated under controlled conditions and species of algae were identified, isolated, and then transferred to fresh culture medium. *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda* were chosen for these experiments because of their abundance in wastewater over the year and for their capacities for biomass production. The removal of nutrients from aqueous media was studied by using monospecific cultures. Algae were in the exponential growth phase when the experiments were started and BG11 culture medium was used under standard growth conditions. Initial concentrations of phosphate and nitrogen were  $2.24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{PO}_4^{3-}$ ),  $12.84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{NO}_3^-$ ) and  $0.26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{N-NH}_4^+$ ). The concentrations decreased during the experimental period, and degrees of removal ranged from 83 to 75% for phosphate, from 85 to 77% for nitrogen and from 52 to 75% for ammonium.

To evaluate the sensitivity of the algal cells to heavy metals, the algal strains were exposed for one week to chromium as  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  and cadmium as  $\text{CdCl}_2$  at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 1.5 and 2 ppm ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of Cr or Cd. Culture growth was monitored by microscopic counting of algal cells to determine quantitative biomass changes. Results demonstrated that growth inhibition occurred at 1 ppm Cr and Cd, whereas levels of 1.5 and 2 ppm of both metals were lethal to the cultures, but no effect on growth was seen in algae exposed to 0.1 ppm of Cd or 0.1 ppm of Cr. *Scenedesmus quadricauda* was more resistant than *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa* to chromium and cadmium.

Radiotracers ( $^{51}\text{Cr}$  and  $^{109}\text{Cd}$ ) were used to trace the biosorption of chromium and cadmium by the three algal strains. Cr(VI) as  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  and Cd as  $\text{CdCl}_2$  were added to the algal suspension culture to give concentrations of 1, 1.5 and 2 ppm Cd and Cr respectively. At various stages during growth of the unialgal cultures, samples were removed, a pulse of  $^{51}\text{Cr}$  or  $^{109}\text{Cd}$  was added, and the uptake rates of Cr(VI) and Cd were determined. To evaluate the amount of heavy metals removed by the algal cells, microscopic cell counting was carried out. All the experiments were conducted under the above-mentioned conditions for each concentration studied, the measurements were repeated three times and the mean values from the three replicates were calculated. The results showed that chromium and cadmium removal by algae was dependent on the metal concentration in the culture medium. The quantity of metal removed also varied with algal species, where 20  $\mu\text{g}$ , 23  $\mu\text{g}$  and 35  $\mu\text{g}$  of Cd were accumulated by  $10^6$  cells of *Chlorella*, *Chlamydomonas* and *Scenedesmus* respectively at a metal concentration of 2 ppm. About 25  $\mu\text{g}$  of Cr were accumulated by  $10^6$  cells of *Chlorella* and *Chlamydomonas* whereas,  $10^6$  cells of *Scenedesmus* accumulated 32  $\mu\text{g}$  of Cr at a concentration of 2 ppm.

The experimental data presented here demonstrated that there was not a great difference in the uptake capabilities between the three algal strains, and reaffirmed the potential of algae in the purification of metal-contaminated wastewater. This wastewater treatment system has many advantages and it is an efficient way to significantly reduce the release of nutrients (e.g., phosphorus, nitrogen, ammonia) and heavy metals (e.g., chromium and cadmium).

# Étude de l'absorption des phosphates, azote, chrome et cadmium par trois algues vertes isolées à partir d'effluents urbains

Phosphate, nitrogen, chromium and cadmium uptake by three green algae species isolated from an urban wastewater

R.A. ZERHOUNI<sup>1\*</sup>, D. BOUYA<sup>1</sup>, C. RONNEAU<sup>2</sup>, J. CARA<sup>2</sup>

Reçu le 17 octobre 2002, accepté le 9 janvier 2004\*\*.

## SUMMARY

Wastewater discharge is an environmental problem, especially in developing countries. Biological wastewater treatment seems to be an alternative for these countries due to its low cost. Algae are used in such wastewater treatment systems in many parts of the world. In addition to preventing environmental damage, the reuse of treated wastewater can be an alternative water supply in arid regions and during drought periods.

In this paper, three algal (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda*) species were isolated from an urban effluent collected from a Mediterranean city (Fez, Morocco, situated between 4° to 7° W and 33° to 35° N) and their ability to remove phosphate and nitrogen was tested under laboratory conditions. The toxicity and uptake of chromium and cadmium were also studied.

Fez city wastewater was sampled monthly during one year (2000) at three main stations located along the Boukhrareb stream which crosses the city. The following parameters were measured according to methods described by RODIER (1996): Chemical oxygen demand, COD; Biological oxygen demand, BOD; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>; electrical conductivity (EC) and organic matter. Heavy metals (Cr, Fe and Zn) were measured by INAA (Instrumental Thermal Neutron Activation Analysis) in wastewater samples dried on Teflon sheets at 70°C.

The collected samples were incubated under controlled conditions and species of alga were identified, isolated, and then transferred to fresh culture medium. *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus quadricauda* were chosen for these experiments because of their abundance in wastewater over the year and for their capacities for biomass production.

1. Université sidi Mohamed Ben Abdellah. Faculté des Sciences Dhar El Mehraz. Laboratoire de Biologie végétale. B.P. 1796, Atlas. 30000 Fès. Maroc. Tél. : + 212 55 64 23 89 / + 212 55 73 29 81. Fax : + 212 55 73 29 81.
2. Université catholique de Louvain, Laboratoire de chimie des matériaux (C.M.A.T), n° 2, chemin du Cyclotron, B1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

\* Correspondance: E-mail : zerhounirachid@excite.com.

\*\* Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 avril 2005.

The removal of nutrients from aqueous media was studied by using mono-specific cultures. Algae were in the exponential growth phase when the experiments were started and BG11 culture medium was used under standard growth conditions. Initial concentrations of phosphate and nitrogen were  $2.24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{PO}_4^{3-}$ ),  $12.84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{NO}_3^-$ ) and  $0.26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{N-NH}_4^+$ ). The concentrations decreased during the experimental period, and degrees of removal ranged from 83 to 75% for phosphate, from 85 to 77% for nitrogen and from 52 to 75% for ammonium.

To evaluate the sensitivity of the algal cells to heavy metals, the algal strains were exposed for one week to chromium as  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  and cadmium as  $\text{CdCl}_2$  at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 1.5 and 2 ppm ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of Cr or Cd. Culture growth was monitored by microscopic counting of algal cells to determine quantitative biomass changes. Results demonstrated that growth inhibition occurred at 1 ppm Cr and Cd, whereas levels of 1.5 and 2 ppm of both metals were lethal to the cultures, but no effect on growth was seen in algae exposed to 0.1 ppm of Cd or 0.1 ppm of Cr. *Scenedesmus quadricauda* was more resistant than *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa* to chromium and cadmium.

Radiotracers ( $^{51}\text{Cr}$  and  $^{109}\text{Cd}$ ) were used to trace the biosorption of chromium and cadmium by the three algal strains. Cr(VI) as  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  and Cd as  $\text{CdCl}_2$  were added to the algal suspension culture to give concentrations of 1, 1.5 and 2 ppm Cd and Cr respectively. At various stages during growth of the unialgal cultures, samples were removed, a pulse of  $^{51}\text{Cr}$  or  $^{109}\text{Cd}$  was added, and the uptake rates of Cr(VI) and Cd were determined. To evaluate the amount of heavy metals removed by the algal cells, microscopic cell counting was carried out. All the experiments were conducted under the above-mentioned conditions for each concentration studied, the measurements were repeated three times and the mean values from the three replicates were calculated. The results showed that chromium and cadmium removal by algae was dependent on the metal concentration in the culture medium. The quantity of metal removed also varied with algal species, where 20  $\mu\text{g}$ , 23  $\mu\text{g}$  and 35  $\mu\text{g}$  of Cd were accumulated by  $10^6$  cells of *Chlorella*, *Chlamydomonas* and *Scenedesmus* respectively at a metal concentration of 2 ppm. About 25  $\mu\text{g}$  of Cr were accumulated by  $10^6$  cells of *Chlorella* and *Chlamydomonas* whereas,  $10^6$  cells of *Scenedesmus* accumulated 32  $\mu\text{g}$  of Cr at a concentration of 2 ppm.

The experimental data presented here demonstrated that there was not a great difference in the uptake capabilities between the three algal strains, and reaffirmed the potential of algae in the purification of metal-contaminated wastewater. This wastewater treatment system has many advantages and it is an efficient way to significantly reduce the release of nutrients (e.g., phosphorus, nitrogen, ammonia) and heavy metals (e.g., chromium and cadmium).

**Key-words:** algae, cadmium, chromium, wastewater, biosorption, nitrogen, phosphate.

## RÉSUMÉ

La capacité de déphosphatation et de dénitrification ainsi que la sensibilité et l'accumulation de deux métaux lourds (Cr et Cd) de *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella pyrenoidosa* et *Chlamydomonas reinhardtii* isolées des eaux usées de la ville de Fès, ont été étudiées dans les conditions de laboratoire. Les résultats ont montré que *S. quadricauda* présente les meilleurs taux de réduction des phosphates (83 %), et d'ammonium (75 %). L'étude de la sensibilité vis-à-vis du chrome et du cadmium des trois espèces, a montré qu'au-delà d'une concentration de 1 ppm, la croissance se trouve réduite et que *S. quadricauda* présente une sensibilité plus faible que les deux autres espèces. Les résultats des expériences d'absorption conduites avec du chrome VI marqué au  $^{51}\text{Cr}$  et du cadmium marqué au  $^{109}\text{Cd}$  ont montré que les quantités de chrome et du cadmium prélevées par *S. quadricauda* dépassent celles des deux

**autres espèces. L'utilisation potentielle des trois espèces dans le traitement des effluents urbains est discutée à la lumière des résultats de ces expériences.**

**Mots clés :** *algues, cadmium, chrome, eaux usées, absorption, azote, phosphates.*

## 1 – INTRODUCTION

L'exploitation des eaux usées comme ressource complémentaire en eau et en fertilisants est largement répandue à travers le monde. Dans les pays à climat aride et semi-aride, tels que le Maroc et beaucoup de pays sud-méditerranéens, les eaux usées peuvent constituer un apport en eau non négligeable pour pallier le déficit hydrique croissant et récurrent (BENEMANN *et al.*, 1977 ; DE LA NOÛE *et al.*, 1992 ; OSWALD 1989 ; OUZZANI, 1998). Néanmoins, la réutilisation des eaux usées et/ou leur déversement dans la nature, à l'état brut, peut s'accompagner de risques sanitaires et environnementaux et, dans bien de cas, un traitement approprié s'avère indispensable. Les systèmes de traitement intensifs ne peuvent être employés systématiquement pour des raisons de coût et de complexité de mise en œuvre, surtout si les quantités à traiter sont importantes : c'est le cas des effluents urbains. Actuellement, des procédés biologiques prometteurs tel que le lagunage à micro-algues et à macrophytes ont été proposés dans certaines régions. Ils dépendent essentiellement de l'énergie solaire, grâce à laquelle, les algues vivant dans les eaux usées, en tant que biosorbants, fixent les micro-polluants (STAUBER et FLORENCE, 1989 ; VALDMAN et LEITE, 2000 ; ZEISLER *et al.*, 1998). La bioremédiation est une nouvelle technologie environnementale en plein développement partout dans le monde (PICOT *et al.*, 1992 ; RAI *et al.*, 1981 ; WONG et TAM, 1997). Des travaux de recherches ont montré que certaines micro-algues possèdent un potentiel non négligeable dans la réduction des nutriments (phosphates, nitrates,...) et la sorption des métaux lourds surtout dans les effluents n'en contenant que de faibles concentrations (BARIAUD et MESTRE, 1984 ; BLAIS *et al.*, 2000 ; GUPTA *et al.*, 2001). La capacité épuratoire de l'association algues-bactéries dans des traitements séquentiels d'eaux usées a été rapportée par plusieurs auteurs (EL HAMOURI *et al.*, 1994 ; GUY, 1985 ; PROULX *et al.*, 1994). Cependant, la présence de métaux lourds et d'autres éléments toxiques peut diminuer la performance de ces systèmes, de même que les conditions climatiques et en particulier la température. L'isolement et la sélection de souches à partir d'un milieu pollué et dans les mêmes conditions climatiques que la région où le système de traitement pourrait être installé, peut constituer un atout important.

Plusieurs espèces de micro-algues ont été isolées identifiées à partir des eaux usées de la ville de Fès (ZERHOUNI et BOUYA, 2001) et le présent travail concerne l'étude de la performance, dans les conditions contrôlées, de trois de ces espèces algales (les plus abondantes) dans la réduction de la charge phosphatée et azotée ainsi que leur sensibilité et leur capacité d'accumuler le chrome hexavalent et le cadmium, deux métaux lourds toxiques et à incidence environnementale importante.

## 2 – MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Site et prélèvement

Durant l'année 2000, des prélèvements mensuels ont été effectués dans trois stations situées à l'amont, au milieu et à l'aval de l'Oued Boukhrareb qui draine les eaux usées de la ville de Fès (Nord-Ouest du Maroc, situé entre 4° à 7° W et 33° à 35° N). Des flacons de 1000 ml préalablement autoclavés ont été utilisés pour les prélèvements des eaux usées.

### 2.2 Isolements et cultures

Des échantillons d'eau usée brute ont été entretenus dans un volume de 1000 ml à une température de 25 °C et sous un éclairage continu de 0,08 g.cal.cm<sup>-2</sup>.min<sup>-1</sup>. Après quatre jours, les algues qui ont proliféré ont été isolées et identifiées. Trois souches d'algues communes et abondantes aux trois stations ; *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella pyrenoidosa* et *Chlamydomonas reinhardtii* ont été identifiées. Elles ont été cultivées séparément dans le milieu nutritif utilisé par GIPPS et COLLIER (1980) préparé dans les conditions stérile et dont la composition est donnée ci-dessous :

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg/l	Mn SO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,4 mg/l
K NO <sub>3</sub>	100 mg/l	Zn SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3 mg/l
Mg SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	50 mg/l	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,04 mg/l
Ca Cl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	5 mg/l	Co SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,03 mg/l
Fe Cl <sub>3</sub> .6 H <sub>2</sub> O	1 mg/l	Cu SO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,01 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5 mg/l	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,003 mg/l

Dans chaque expérience, des erlenmeyers de 500 ml ont été inoculés par 100 ml de souche algale (culture mère) en phase exponentielle de croissance. La durée de la culture est de 6 jours, le pH du milieu est ajusté à 6 et un bullage régulier maintient les cellules en suspension en plus d'une agitation intermittente. Les cultures monospécifiques ont été exposées à des concentrations variables de chrome (VI) et de cadmium (0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 ppm), fournis sous forme de (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) et de (CdCl<sub>2</sub>) respectivement avec trois répétitions pour chaque concentration. Pour déterminer l'aptitude de ces algues à accumuler le chrome et le cadmium, des expériences avec du <sup>51</sup>Cr (activité spécifique, 5 mCi/ml) et du <sup>109</sup>Cd (préparé au laboratoire C.M.A.T., Université Catholique de Louvain-la-Neuve, Belgique) ont été réalisées dans les mêmes conditions. Après des durées d'absorption de 30 minutes, 2 h 30 et 5 heures, 50 ml de chaque culture ont été prélevés. Les cellules algales ont été filtrées sur filtres en microfibre de verre Whatman GF/C de 47 mm de diamètre, rincées trois fois à l'eau déminéralisée et séchées à 100 °C durant 24 h. La radioactivité est comptée par spectrométrie gamma.

### 2.3 Analyses

Les paramètres physico-chimiques des eaux usées ont été déterminés suivant les méthodes décrites par RODIER (1996). La conductivité électrique a été mesurée à l'aide d'un conductimètre de type WTW 90.

La teneur en certains métaux lourds (Cr, Zn et Fe) a été déterminée par activation neutronique. Cette technique est très sensible à ces métaux par contre pour Cd elle est peu sensible et très peu fiable. Des échantillons d'eaux usées ont été évaporés à sec à 60 °C sur bain de sable et sur feuille de Teflon selon la méthode décrite par NAVARRE *et al.* (1980). Après irradiation des échantillons sous flux de neutrons ( $3,85 \times 10^{11} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) durant 40 heures, la radioactivité est mesurée à l'aide d'un détecteur au Ge-Li couplé à un analyseur Canberra 4096. Les capacités de déphosphatation et de dénitrification des trois espèces algales ont été testées par les dosages des nitrates, orthophosphates et ammonium au début et à la fin des expériences, suivant les méthodes colorimétriques (RODIER, 1996), en utilisant un spectrophotomètre UV-visible à double faisceau de type Cecil 9000. La croissance algale a été suivie par un comptage quotidien au microscope optique à l'aide d'un hémacytomètre « Thoma », suivant la méthode décrite par MACKA *et al.* (1979).

### 3 – RÉSULTATS

#### 3.1 Caractéristiques des eaux usées

Le tableau 1, donne les principales caractéristiques des eaux usées de la ville de Fès. La charge polluante est essentiellement d'origine domestique avec des apports non négligeables en certains métaux lourds (particulièrement le chrome, le fer et le zinc) liés aux activités artisanales locales des tanneries, dinanderies ainsi que, des apports organiques qui subissent une forte augmentation durant la saison oléicole (rejet de margine ou eaux d'olives) entraînant une augmentation de la DBO et de la DCO. La teneur en matière organique varie de 0,6 à 1,8 g/l et constitue 70 à 90 % du résidu sec à 105 °C.

**Tableau 1** Principales caractéristiques des eaux usées de la ville de Fès, dans les trois stations de prélèvement au niveau desquelles les souches algales ont été isolées.

**Table 1** Main characteristics of the Fes wastewaters sampled at the three sites where the algal strains were isolated.

Paramètres	Station 1	Station 2	Station 3
T°C	15 - 25	16 - 26	16 - 26
pH	6,8 - 7,3	6,8 - 7	6,8 - 7
DCO (mg d'O <sub>2</sub> .l <sup>-1</sup> )	259 - 1276	260 - 1228	288 - 1545
DBO <sub>5</sub> (mg d'O <sub>2</sub> .l <sup>-1</sup> )	128 - 496	144 - 480	176 - 592
Matière organique (g.l <sup>-1</sup> )	0,7 - 1,4	0,6 - 1,3	0,7 - 1,8
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	0,04 - 2	0,03 - 2	0,03 - 1,41
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	2,86 - 18,75	3,61 - 20,12	4,34 - 19,77
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	0,31 - 6,74	0,11 - 5,65	0,53 - 5,38
Conductivité (µS.cm <sup>-1</sup> )	1279 - 2060	1317 - 2040	1479 - 2095
Cr (mg/l)	0,25 - 1,54	0,15 - 1,23	0,13 - 1,50
Zn (mg/l)	0,05 - 0,42	0,15 - 1,20	0,13 - 2,20
Fe (mg/l)	0,90 - 4,40	1,22 - 6,01	1,70 - 5,50

### 3.2 Abatement des nitrates, de l'ammonium et des orthophosphates

Le tableau 2, montre que les taux d'abattement les plus élevés sont observés pour les orthophosphates (74,7 % à 83,4 %) et pour les nitrates (76,6 % à 85,2 %). Les différences ne sont pas significatives entre les trois espèces, bien que les pourcentages de réduction les plus élevés soient observés dans le cas de *S. quadricauda* pour les orthophosphates et *C. pyrenoidosa* pour les nitrates. Par contre, pour l'ammonium, le taux de réduction le plus élevé est enregistré dans le cas de *S. quadricauda* (75,3 %) et le plus bas (51,6 %) est observé dans le cas de *C. pyrenoidosa*.

**Tableau 2** Taux d'abattement des orthophosphates, des nitrates et des ions ammonium pour les trois espèces (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella pyrenoidosa* et *Chlamydomonas reinhardtii*) après six jours de culture. Moyenne de trois répétitions.

**Table 2** *Elimination rate of phosphates, nitrates and ammonia by the three species (Scenedesmus quadricauda, Chlorella pyrenoidosa and Chlamydomonas reinhardtii) after six days of incubation. Data represent the mean of three replicates after a six-day culture period.*

	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		
	Ci	Cf	%	Ci	Cf	%	Ci	Cf	%
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	2,24	0,37 ± 0,11	83,4	12,84	3,07 ± 0,24	76,6	0,62	0,15 ± 0,03	75,3
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,24	0,56 ± 0,18	74,7	12,84	1,91 ± 0,07	85,3	0,62	0,25 ± 0,08	59,5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2,24	0,52 ± 0,15	76,5	12,84	2,79 ± 0,16	78,2	0,62	0,32 ± 0,12	51,6

C<sub>i</sub> : Concentration initiale (mg/l).

C<sub>f</sub> : Concentration finale (mg/l).

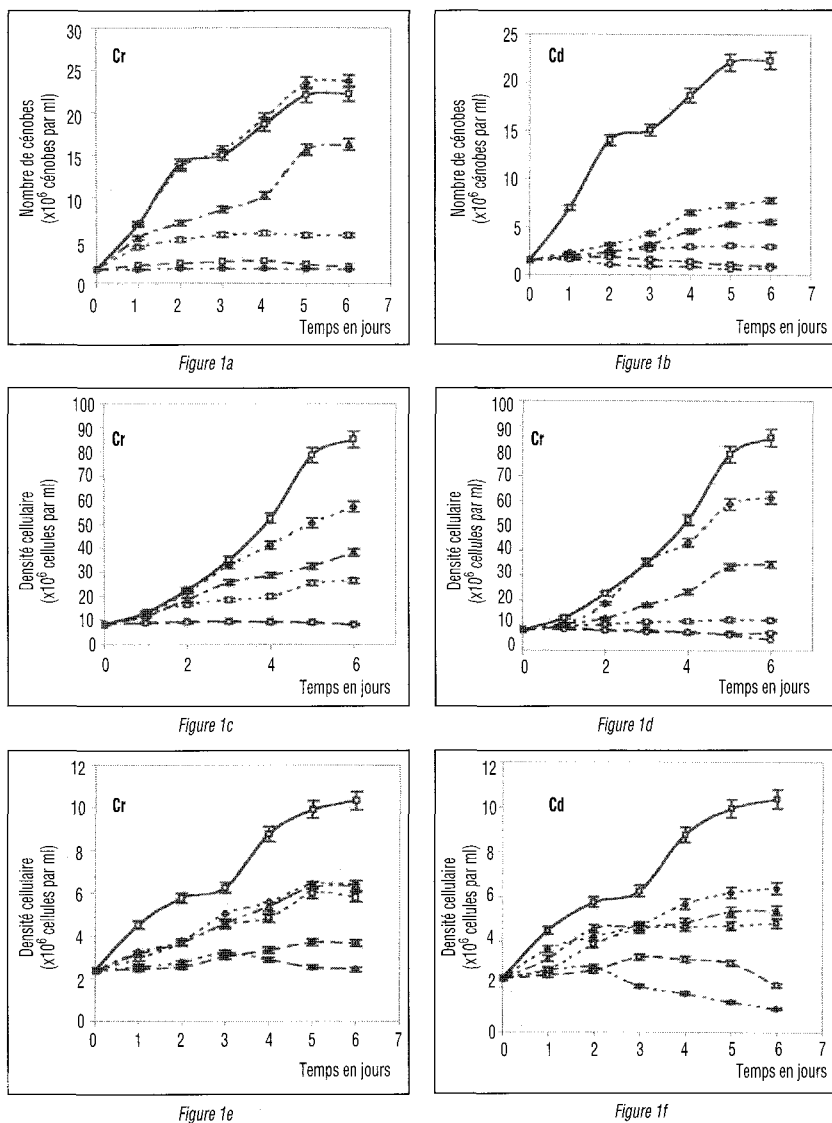
Taux d'abattement en italique.

### 3.3 Effet du chrome sur la croissance algale (figure 1)

À 0,1 ppm de chrome, la croissance de *S. quadricauda* (Fig.1a) n'est pas affectée voire légèrement stimulée alors qu'à 0,5 ppm, la densité cénobiale diminue de 26 % par rapport au témoin. Cette diminution s'accroît à 1 ppm où elle est de 75 %. Dans le cas de *C. pyrenoidosa* (Fig. 1c), à 0,1 ppm de chrome, la densité cellulaire décroît de 33 % par rapport au témoin et, à 1 ppm, la réduction est de 70 %. Pour *C. reinhardtii* (Fig. 1e), à 0,1 ppm de chrome, la densité cellulaire diminue de 38 % par rapport au témoin et la diminution atteint 65 % à 1,5 ppm. À la concentration de 2 ppm, la croissance des trois espèces est fortement réduite. Les trois espèces présentent une certaine sensibilité au chrome et *S. quadricauda* semble l'espèce la plus tolérante.

### 3.4 Effet du cadmium sur la croissance algale (figure 1)

En présence du cadmium, *S. quadricauda* montre une sensibilité bien marquée dès 0,1 ppm (Fig. 1b), la densité cénobiale atteint environ 7,75 x 10<sup>6</sup> cénobes/ml, soit une réduction de 65 % de la densité du témoin alors qu'à cette même concentration (0,1 ppm), la croissance de *C. pyrenoidosa* subit une réduction de seulement 28 % (Fig. 1d). Dans le cas de *C. reinhardtii*, à 0,1 ppm., il y a une réduction de 40 % (Fig. 1f). A des concentrations de 1,5 et de 2 ppm de cadmium, la croissance des trois espèces est très faible.



**Figure 1**

Effets du chrome et du cadmium sur la croissance de *Scenedesmus quadricauda* (Fig. 1a, Fig. 1b), *Chlorella pyrenoidosa* (Fig. 1c, Fig. 1d) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Fig. 1e, Fig. 1f). Les concentrations de chrome et de cadmium : 0 ppm (—□—) ; 0,1 ppm (-◆-) ; 0,5 ppm (-▲—) ; 1 ppm (-□-) ; 1,5 ppm (-□-) ; 2 ppm (-○-). Moyenne de trois répétitions, après une période de six jours de culture.

*Chromium and cadmium effects on the growth of Scenedesmus quadricauda* (Fig. 1a, Fig. 1b), *Chlorella pyrenoidosa* (Fig.1c, Fig.1d) and *Chlamydomonas reinhardtii* (Fig. 1e, Fig. 1f). *Chromium and cadmium concentrations* : 0 ppm (—□—) ; 0.1 ppm (-◆-) ; 0.5 ppm (-▲—) ; 1 ppm (-□-) ; 1.5 ppm (-□-) ; 2 ppm (-○-). *Data represent the mean of three replicates after a six-day culture period.*



### 3.5 Absorption du chrome (figure 2)

Les figures 2a, 2c et 2e représentent l'absorption du Cr par les trois algues. Pour les trois espèces, l'absorption augmente avec la concentration, la vitesse d'absorption est élevée au début de l'incubation et les quantités maximales prélevées sont observées entre 2 h 30 mn et 5 h (saturation). Pour *S. quadricauda*, le prélèvement est maximal à 2 ppm avec 32  $\mu\text{g}$  de Cr par  $10^6$  cénoibes alors qu'il est d'environ 25  $\mu\text{g}$  de Cr par  $10^6$  cellules pour *C. pyrenoidosa* et *C. reinhardtii*.

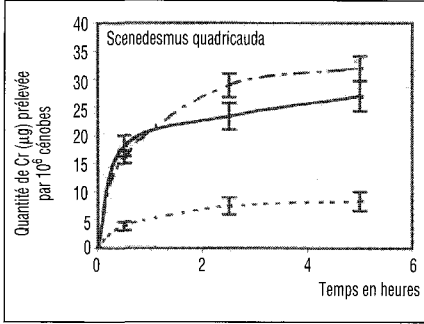


Figure 2a

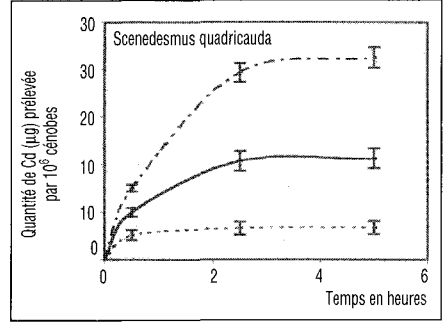


Figure 2b

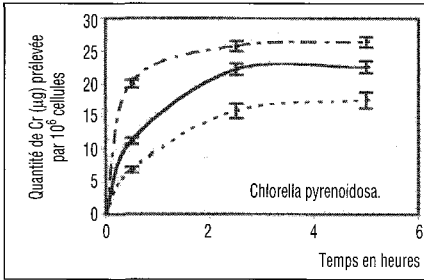


Figure 2c

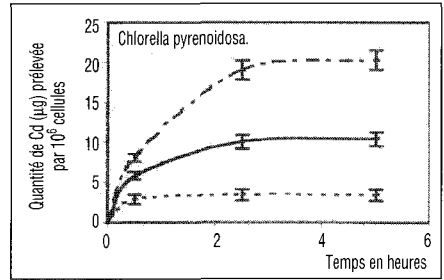


Figure 2d

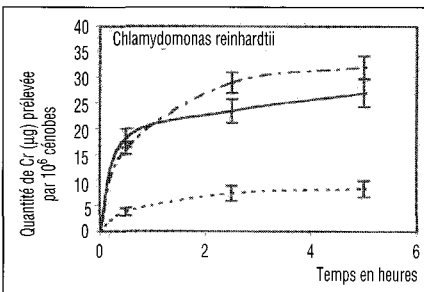


Figure 2e

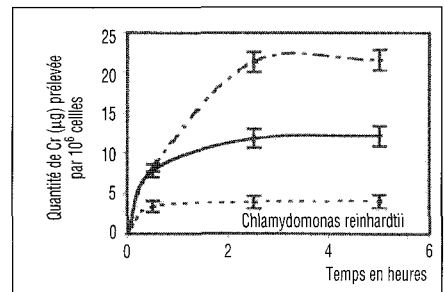


Figure 2f

#### Figure 2

Absorption du chrome et du cadmium marqués par *Scenedesmus quadricauda* (Fig. 2a, Fig. 2b), *Chlorella pyrenoidosa* (Fig. 2c, Fig. 2d) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Fig. 2e, Fig. 2f). Moyenne de trois répétitions. Les concentrations de chrome et de cadmium sont : 1 ppm (---); 1,5 ppm (—) et 2 ppm (- - -).

*Chromium and cadmium biosorption by Scenedesmus quadricauda* (Fig. 2a, Fig. 2b), *Chlorella pyrenoidosa* (Fig. 2c, Fig. 2d) and *Chlamydomonas reinhardtii* (Fig. 2e, Fig. 2f). Mean of three replicates. Chromium and cadmium concentrations : 1 ppm (---); 1,5 ppm (—) and 2 ppm (- - -).

### 3.6 Absorption du cadmium (figure 2)

Les figures 2b, 2d et 2f représentent l'absorption du Cd par les trois algues. De même que pour le chrome, et pour les trois espèces algales, l'absorption augmente avec la concentration du cadmium dans le milieu d'incubation et montre une certaine saturation à partir de 2 h 30 mn. Pour *S. quadricauda*, le prélèvement est de 35  $\mu\text{g}$  de Cd par  $10^6$  cénobes, pour *C. pyrenoidosa*, le prélèvement est de 20  $\mu\text{g}$  de Cd par  $10^6$  cellules, alors que pour *C. reinhardtii*, le prélèvement du Cd est de 23  $\mu\text{g}$  par  $10^6$  cellules à la concentration de 2 ppm.

## 4 - DISCUSSION

Le genre *Scenedesmus* consomme préférentiellement l'azote du milieu lorsqu'il est sous forme d'ions ammonium (BOUCHABCHOUB, 1993; WRIGLEY *et al.*, 1990). Les concentrations élevées d'ammonium mesurées dans les eaux usées au cours de cette étude pourraient expliquer entre autre l'abondance relative de *S. quadricauda* et les résultats de nos expériences suggèrent qu'elle est plus performante que les deux autres algues dans le traitement de la charge polluante azotée et phosphatée. Néanmoins, les taux d'abattement observés dans le cas des deux autres espèces sont aussi importants. Ces taux dépassent 50 % pour l'ammonium et 70 % dans le cas des phosphates. La combinaison des trois espèces dans le traitement de la charge azotée et phosphatée des effluents pourrait permettre une épuration plus performante. L'abondance relative de ces espèces durant toute l'année et leur grande vitesse de croissance (ZERHOUNI et BOUYA, 2001) sont en faveur de leur utilisation dans les conditions naturelles dans le traitement à grande échelle (lagunage par exemple). Cependant la présence de métaux lourds pourrait diminuer leur performance.

L'étude de la sensibilité de ces trois espèces vis-à-vis du chrome et du cadmium a montré qu'il y a réduction de la croissance au-delà de la concentration de 1 ppm et qu'à 0,1 ppm surtout pour le chrome, il y a absence d'effet, voire une légère stimulation. *S. quadricauda* semble relativement plus résistante au chrome et sensible au cadmium alors que pour *C. pyrenoidosa* et *C. reinhardtii*, les deux métaux ont pratiquement le même effet inhibiteur. L'effet de ces métaux sur l'inhibition de la multiplication cellulaire et de la perturbation du métabolisme cellulaire des plantes aquatiques ont été rapportés (RAI *et al.*, 1992 ; SRIVASTAV *et al.*, 1994). EICKHORN *et al.* (1971) ont montré que le chrome et le cadmium agissent aussi sur l'activité enzymatique algale en formant des complexes avec les acides aminés et les protéines en affectant les propriétés physiques de l'ADN et de la synthèse de la chlorophylle. Les trois espèces étudiées pourraient donc être utilisées dans l'abattement de la charge azotée et phosphatée dans la limite de leur tolérance aux deux métaux lourds testés. Quoique leur résistance puisse être améliorée par sélection et/ ou modification génétique (CAI *et al.*, 1999). On peut concevoir leur utilisation dans un traitement tertiaire pour les effluents contaminés après décontamination partielle.

La cinétique de sorption des métaux lourds peut être interprétée suivant les courbes de modélisation de Freundlich et Langmuir, dans la mesure où les métaux lourds adhèrent aux parois cellulaires, pour pénétrer ensuite dans les cellules algales sous forme d'ions (VOLESKY *et al.*, 1995). La vitesse d'absorption augmente très rapidement au début de l'expérience et diminue par la suite en montrant un palier de saturation à 5 heures. BECKER, (1983) a montré que, dans le cas des algues, la saturation par les métaux lourds est atteinte rapidement : un temps d'exposition de quelques heures est suffisant pour évaluer l'efficacité de prélèvement des cellules algales.

CONWAY (1978) a montré qu'à des concentrations de 0,1 à 10 mg de Cd par litre, 70 % à 90 % du Cd du milieu sont accumulés par les algues et les expériences de fractionnement cellulaire ont indiqué que 60 % du Cd prélevé est associé au contenu cellulaire et environ 40 % s'est fixé sur la paroi et ses revêtements organiques. À l'intérieur de la cellule, les métaux lourds se substituent à des ions métalliques ayant des propriétés chimiques similaires, (VALLÉE *et al.*, 1972) ont rapporté que le Cd peut se comporter comme un élément essentiel en remplaçant le Zn. Cependant, la sorption des métaux lourds peut être accomplie par des cellules algales inertes, cette constatation est confirmée par les courbes de biosorption où l'accumulation du chrome et du cadmium est maximale à la concentration létale de 2 ppm. WEHRHEIM *et al.*, (1994) ont montré que les cellules mortes de *Chlorella fusca* et leurs parois isolées peuvent fixer les ions de métaux lourds.

D'après nos résultats on peut suggérer que l'effet du Cd sur la croissance algale est plus marqué que celui du Cr pour l'ensemble des algues testées et que *S. quadricauda* s'est révélée plus performante dans la sorption du chrome et du cadmium suivi de *C. pyrenoidosa* et *C. reinhardtii*.

L'utilisation des micro-algues dans le traitement des eaux usées est une méthode biologique qui peut être intégrée dans divers procédés. Le principal avantage de cette méthode est double, d'abord, l'aptitude à réaliser des taux d'abattement d'azote et de phosphore appréciables, comparables à ceux d'autres procédés, et aussi, la sorption des métaux lourds lorsqu'ils s'y trouvent à de faibles teneurs (AZIZ *et al.*, 1992). LUKAVSKY (1985) a rapporté que lors du traitement par lagunage à micro-algues, la diminution de la teneur en azote et en phosphore est accompagnée par une réduction du taux de chrome de 85,4 % à 97,4 %. Ce procédé pourrait connaître des possibilités d'application au Maroc et dans les régions arides et semi-arides où la réutilisation des eaux usées en irrigation est très sollicitée (EL HAMOURI *et al.*, 1995). Plusieurs travaux sont élaborés sur la sélection de souches algales et leur utilisation dans le traitement des eaux contaminées par les métaux lourds (CAI *et al.*, 1995). À la lumière de ces résultats, l'exploitation des espèces algales adaptées aux eaux usées et existantes spontanément dans ce milieu, pourrait conduire à un système d'épuration approprié.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la coopération maroco-belge pour le soutien financier (projet FRAB 1101).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AZIZ M.A. and W.J. NG (1992). Feasibility of wastewater treatment using the activated algae. *Process Bioresource Technology*, **40**, 205-208.
- BARIAUD A. and MESTRE J-C., 1984. Heavy Metal Tolerance in a Cadmium - resistant population of *Euglena gracilis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **32**, 597-601.
- BECKER E.W., 1983. Limitations of heavy metal removal from waste water by means of algae. *Wat. Res.* **17**, (4), 459-466.
- BENEMANN J.R., WEISSMANN J.C., KOOPMAN BEN L. and OSWALD W. J., 1977. Energy production by microbial photosynthesis. *Nature*. **268**, 19-23.
- BLAIS J.F., DUFRESNE S. et MERCIER G., 2000. État du développement technologique en matière d'enlèvement des métaux des effluents industriels. *Rev. Sci. Eau* **12** (4) : 687-711.
- BOUCHABCHOUB A., 1993. Impact de certains polluants des eaux usées sur la croissance, l'appareil et l'activité photosynthétique de l'algue *Scenedesmus obliquus* (TURP) KUTZ. Th. Doct. Univ. Liège, Belgique. 130 pages.
- CAI X.-H., LOGAN T., GUSTAFSON T., TRAINA S and SAYRE R.T. (1995). Applications of eukaryotic algae for the removal of heavy metals from water. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. **4**: 338-344.
- CAI X.-H., BROWN C., ADHIYA J., TRAINA S. and SAYRE R.T. (1999). Growth and heavy metal binding properties of transgenic algae (*Chlamydomonas reinhardtii*) expressing a foreign metallothionein gene. *Int. J. Phytoremediation*. **1**: 53-65.
- CONWAY H.L., 1978. Sorption of Arsenic and Cadmium and their effects on growth, micronutrient utilisation, and photosynthetic pigment composition of *Asterionella formosa*. *J. Fish. Res. Board Can.* **35**, 286 -294.
- DE LA NOÛE J., LALIBERTE G. and PROULX D., 1992. Algae and waste water. *Journal of applied phycology*, **4**, 247-254.
- EICKHORN G.L., BERGER N.A., BUTZOW J.J., CLARK P., RIPKIND J. M., SHIN Y.A. and TARIEN E., 1971. The effect of metal ions on the structure of nucleic acids. *An. Chem. Soc. Adv. Chem.* **100**, pp. 135-154.
- EL HAMOURI B., JELLAL J., BELKHADIR R., MOUNIB R., BERRADA R. and RHALLABI N., 1994. Metabolic interactions between algae bacteria during wastewater treatment in a high rate algal pond. In « *Algal Biotechnology in Asia-Pacific Region* », PHANG *et al.* [eds], pp. 300-305.
- EL HAMOURI B., JELLAL J., OUATABIHT H., NEBRI B., BENKERROUM A., HAJLI A. and FIRADI R., 1995. The performance of a high rate algal pond in the morrocan climate. *Wat. Sc. and Tech.* **31** (12), 67-74.
- GIPPS J. F. and COLLIER B. A.W., 1980. Effect of Physical and Culture Conditions on Uptake of Cadmium by *Chlorella pyrenoidosa*. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* **31**, 747-55.
- GUPTA V. K., SHRIVASTAVA A. K. and NEERAJ J., 2001. Biosorption of Chromium(VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra species*. *Water Research*, **35** (17), 4079-4085.
- GUY M., 1985. Point sur l'épuration et le traitement des effluents. Vol. 2-2. Techniques et Documentation (Lavoisier). 219 p.

- LUKAVSKY J., 1985. A simple cultivation unit for the evaluation of algal growth potential and toxicity of water. *Water Res.* **19** (2), 269-270.
- MACKA W., WIHLIDAL H., STEHLIK G., WASHUTTL J. and BANCHER E., 1979. Uptake of  $^{203}\text{Hg}^{++}$  and  $^{115\text{m}}\text{Cd}^{++}$  by *Chlamydomonas reinhardi* under various conditions. *Chemosphere*. **10**, 787-796.
- MARTZKU S. and BRODA E., 1970. The uptake of Zn into the interior of *Chlorella*. *Planta* **92**, 29-40.
- NAVARRÉ J.-L., RONNEAU C. and PRIEST P., 1980. Deposition of heavy elements on Belgian agricultural soils. *Water Air Soil Pollut.*, **14**, 207-213.
- OUAZZANI N., 1998. Traitement extensif des eaux usées sous climat aride en vue d'une réutilisation en agriculture. Th. Doct. Univ. Cadi Ayyad, Maroc, 193 p.
- OSWALD W. J., 1989. Use of wastewater effluent in agriculture. *Desalination*, **72**, 67-80.
- PEARSON H.W., MARA D. D. and BARTONE C. R., 1987. Guidelines for the minimum evaluation of the performance of full-scale waste stabilization pond system. *Wat. Res.* **21** (9), 1067-1075.
- PICOT B., BAHLAOUI A., MOERSIDIK B., BALEUX B. et BONTOUX J., 1992. Comparaison de l'efficacité de purification des lagunes avec des taux élevés d'algues et des lagunes de décantation. *Water Science Technology*, **25**, (12), 163-171.
- PROULX D., LESSAR P. et DE LA NOÛE J., 1994. Traitement tertiaire d'un effluent domestique secondaire par culture intensive de la Cyanobactérie *Phormidium bohneri*. *Environmental Technology*, **15**, 449-458.
- RAI L.C., GAUR J. P. and KUMAR H. D., 1981. Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev.*, **56**, 99-151.
- RAI L. C., DUBEY S. K. and MALLICK N., 1992. Influence of chromium on some physiological variables of *Anabaena doliolum*: interaction with metabolic inhibitors. *Biometals*, **5**, 13-16.
- RODIER J., 1996. L'analyse de l'eau. Eaux résiduelles, eau de mer. 2<sup>e</sup> édition ; DUNOD, Paris.
- SRIVASTAV R. K., GUPTA S. K., NIGAM K. D. P. and VASUDEVAN P., 1994. Treatment of chromium and nickel in wastewater by using aquatic plants. *Wat. Res.* Vol. **28**, (7), 1631-1638.
- STAUBER J.L. and FLORENCE T.M., 1989. The effect of culture medium on metal toxicity to the marine diatom *Nitzschia closterium* and the freshwater green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Wat. Res.* **23**, (7), 907-911.
- VALDMAN E. and LEITE S.G.F., 2000. Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Sargassum* sp. Waste biomass. *Bioprocess Engineering*, **22**, (2), 171-173.
- VALLEE B.L. and ULMER D.D., 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 91-128.
- WEHRHEIM B. and WETTERN M., (a) 1994. Comparative studies of the heavy metal uptake of whole cells and different types of cell walls from *Chlorella fusca*. *Biotechnology Techniques* **8**, (4), 227-232.
- WEHRHEIM B. and WETTERN M., (b) 1994. Biosorption of cadmium, copper and lead by isolated mother cell walls and whole cells of *Chlorella fusca*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 725-728.
- WONG Y.-S. and TAM N.F.Y., 1997. Wastewater treatment with algae. HONG KONG [Ed], 180 p.
- WRIGLEY T.J. and TOERIEN D.F., 1990. Limnological aspects of small sewage ponds. *Wat. Res.*, **24**, (1), 83-90.
- ZEISLER R., DEKNER R., ZEILER E., DOUCHA J., MADER P. and KUCERA J., 1998. Single cell green algae reference materials with managed levels of heavy metals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **360**, 3/4, 429-432.
- ZERHOUNI A. R. et BOUYA D., 2001. Étude de la capacité épuratoire de quelques algues isolées à partir des eaux usées de la ville de Fès. *Ann. Chim. Sci. Mat.* **26**, S375-S382.