

République Algérienne Démocratique et Populaire  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et de Microbiologie

N° d'ordre : **002/Mag/2011**

N° de série : **002/SN/2011**

# Mémoire

Présenté pour l'Obtention du Diplôme de Magister en Microbiologie Appliquée.

Option: Biotechnologies Microbiennes

Par : **HARZALLAH Besma**

## Thème

**Etude de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par le  
microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station  
d'épuration des eaux usées d'IBN ZIAD.**

Soutenue le : **23 / 01 / 2011**

**Devant le jury :**

<b>Président :</b>	M <sup>me</sup> . MERAIHI Z.	Prof. Univ. Mentouri /Constantine.
<b>Rapporteur :</b>	Mr. BOUSSEBOUA H.	Prof. Univ. Mentouri/ Constantine.
<b>Examineurs :</b>	Mr. ARHAB R.	M.C. Univ. Tébessa.
	Mr. HAMIDECHI A.	M.C. Univ. Mentouri /Constantine.

**Année universitaire : 2010 – 2011**

## *Remerciements*

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, faculté des sciences de la nature et de la vie, département de Biochimie et de Microbiologie. Université Mentouri Constantine. Nombreux sont qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. C'est là un geste tout naturel que de remercier ces personnes :*

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude, et ma vive reconnaissance à Mr. BOUSSEBOUA H. Professeur à l'université Mentouri de Constantine, pour avoir accepté d'être mon directeur de mémoire, pour ses conseils avisés, sa rigueur scientifique et sa grande disponibilité.*

*Je remercie chaleureusement M<sup>me</sup>. MERAIHI Z. Professeur à l'université Mentouri de Constantine, pour avoir accepté de présider le jury.*

*Un grand merci à Mr. HAMIDECHI A. Maître de conférences à l'université Mentouri de Constantine, pour l'honneur qu'il me fait en participant au jury de ce mémoire.*

*Mes remerciements vont aussi à Mr. ARHAB R. Maître de conférences à l'université de Tébessa, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail durant ces deux années de mémoire et pour avoir accepté de juger ce travail.*

*A tous ceux qui, à un moment ou un autre, m'ont prodigué des conseils scientifiques, fourni une aide matérielle et technique, ou tout simplement humaine. MERCI*

# *Dédicaces*

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail dédié aux :*

*Chers Grands parents Ahcène et Fadila ;*

*Chers Parents ;*

*Mon Frère;*

*Toute la famille Harzallah et Aoulmi ;*

*Tous les amis ;*

*Pour leur présence de tous les instants,*

*Pour le soutien qu'ils m'ont apporté.*

*Avec toute mon affection et ma reconnaissance*

*Besma*

## Liste des abréviations

---

**[C]** : Concentration

**2,5-DMP** : 2,5-Diméthylphénol

**AAF** : Aéro-Anaérobie Facultatif

**ADH** : Arginine-Dihydrolase

**AnS** : Anaérobie Stricte

**AS** : Aérobie Stricte

**BCF** : Facteur de bioconcentration

**COV** : Composés Organo-halogénés Volatiles

**DBO<sub>5</sub>** : Demande Biochimique en Oxygène à 5 jours

**DCO** : Demande Chimique en Oxygène

**EPA** : Agence américaine pour la protection de l'environnement

**HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

**K<sub>oc</sub>** : Coefficient de partage carbone organique/eau

**LDC** : Lysine-Décarboxylase

**MES** : Matières En Suspension

**MEVAG** : Milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides

**MFS** : Methylgreen-Formalin-Saline

**MSM** : Milieu Salin Minimum

**ODC** : Ornithine-Décarboxylase

**ONPG** : Ortho-nitrophényl- $\beta$ -galactoside

**PCB** : Polychlorobiphényles

**RM** : Rouge de Méthyle

**STEP** : Station d'épuration

**T.S.I.** : Triple Sugar Iron Agar

**TDA** : Tryptophane Désaminase

**Tps** : Temps

**VF** : Milieu Viande-foie

**VP** : Vogue-Proskauer

## Liste des figures

---

**Figure 1.** Nature de la pollution des eaux

**Figure 2.** Structure chimique du 2,5-diméthylphénol

**Figure 3.** Voie proposée de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par *Alcaligenes eutrophus* JMP 134

**Figure 4.** Voie proposée de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par *Pseudomonas* sp.

**Figure 5.** Réaction de Berthelot

**Figure 6.** Cinétique de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par le microbiote de l'effluent d'entrée

**Figure 7.** Cinétique de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par le microbiote de l'effluent de sortie

**Figure 8.** Cinétique de dégradation du 2,5-diméthylphénol dans le témoin stérile

**Figure 9.** Cellule de Malassez

**Figure 10.** Différentes formes de protozoaires observées dans l'effluent d'entrée

**Figure 11.** Aspect macroscopique des souches bactériennes isolées

**Figure 12.** Courbe étalon du 2,5-diméthylphénol

## Liste des tableaux

---

**Tableau 1.** Types de pollution des eaux continentales, nature de produits polluants et leurs origines

**Tableau 2.** Propriétés Physico-chimiques du 2,5-diméthylphénol

**Tableau 3.** Les études de la toxicité du 2,5-diméthylphénol

**Tableau 4.** Propriétés physico-chimiques des effluents prélevés de la STEP

**Tableau 5.** Pourcentage de biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote de l'effluent d'entrée

**Tableau 6.** Pourcentage de biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote de l'effluent de sortie

**Tableau 7.** Pourcentage de dégradation du 2,5-DMP dans le témoin stérile

**Tableau 8.** Composition de la solution MFS (methylgreen-formalin-saline)

**Tableau 9.** Effet de la nature de l'inoculum et de la concentration introduite sur la biodégradation du 2,5-DMP (ANOVA)

**Tableau 10.** Test de Student pour comparer la dégradation biotique et abiotique

**Tableau 11.** Variation du pH au cours de la biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote de l'effluent d'entrée

**Tableau 12.** Variation du pH au cours de la biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote de l'effluent de sortie

**Tableau 13.** Variation du pH au cours de la dégradation abiotique du 2,5-DMP

**Tableau 14.** Résultats d'identification des souches (*Pseudomonas*)

**Tableau 15.** Résultats d'identification des souches (*Alcaligenes*)

**Tableau 16.** Résultats d'identification des souches (*Micrococcus*)

**Tableau 17.** Cinétique de la biodégradation du 2,5-DMP (mg/l) par le microbiote de l'effluent d'entrée

**Tableau 18.** Cinétique de la biodégradation du 2,5-DMP (mg/l) par le microbiote de l'effluent de sortie

**Tableau 19.** Cinétique de dégradation du 2,5-DMP (mg/l) dans le témoin stérile

# TABLE DES MATIERES

## Introduction

.....01

## Revue bibliographique

1. Les eaux usées .....	02
1.1. Définition .....	02
1.1.1. Les eaux usées domestiques .....	02
1.1.2. Les eaux usées industrielles .....	02
1.1.3. Les eaux de ruissellement .....	04
1.2. Origine des eaux usées .....	04
1.3. Composition des eaux usées .....	04
1.4. Microorganismes des eaux usées.....	04
1.4.1. Les bactéries.....	05
1.4.2. Les protozoaires.....	05
1.5. Caractéristiques physico-chimiques des eaux usées .....	05
1.5.1. Le pH .....	05
1.5.2. La température.....	06
1.5.3. La conductivité électrique.....	06
1.5.4. Les Matières En Suspension (MES).....	06
1.5.5. La demande en oxygène.....	06
1.6. Pollution de l'eau.....	08
1.6.1. La pollution toxique .....	08
1.6.2. Origine de la pollution toxique .....	09
1.6.3. Dégradation des polluants toxiques.....	12

1.7. Effets du déversement des eaux usées sur le milieu naturel.....	14
1.8. Traitement des eaux usées .....	15
1.8.1. Les prétraitements.....	15
1.8.2. Le traitement primaire.....	15
1.8.3. Le traitement biologique secondaire.....	16
1.8.4. Le traitement tertiaire complémentaire.....	17
2. Le 2,5-Diméthylphénol .....	19
2.1. Généralités.....	19
2.2. Utilisation et Préparation .....	19
2.3. Sources de pollution .....	19
2.4. Toxicité.....	21
2.5. Devenir de 2,5-diméthylphénol dans l'environnement .....	21
2.6. Rémanence dans le milieu.....	23
2.6.1. Dégradation abiotique.....	23
2.6.2. Dégradation biotique.....	23

<b>Matériel et méthodes</b>
-----------------------------

1. Choix du xénobiotique .....	25
2. Milieu de culture.....	25
3. Origine de l'inoculum (consortium microbien) .....	25
4. Dénombrement des protozoaires.....	26
5. Cinétique de biodégradation et dosage.....	26
5.1. Dispositif expérimental d'étude (réacteur batch) .....	26
5.2. Inoculation.....	26



5.3. Incubation.....	28
5.4. Témoins et contrôle.....	28
5.5. Suivi de la concentration du 2,5-diméthylphénol par dosage colorimétrique.....	28
6. Isolement et identification des microorganismes.....	29
6.1. Isolement.....	29
6.2. Purification.....	29
6.3. Identification.....	29
7. Analyses statistiques.....	31

## Résultats et Discussion

1. Qualité des effluents prélevés.....	33
2. Dénombrement des protozoaires.....	33
3. Cinétiques de biodégradation du 2,5-diméthylphénol.....	35
4. Identification des microorganismes dominants responsables de la biodégradation.....	41
4.1. Tests préliminaires.....	41
4.1.1. Coloration de Gram.....	41
4.1.2. Mobilité.....	41
4.1.3. Type respiratoire.....	41
4.1.4. Cultures sur King A et King B.....	42
4.2. Caractères biochimiques et physiologiques des souches bactériennes isolées.....	42

## Discussion générale et Conclusion

.....	45
-------	----

## Références bibliographiques

.....	48
-------	----

### Annexes

# *Introduction*

L'industrialisation, les pratiques d'une agriculture intensive et l'utilisation d'un nombre croissant de produits chimiques et médicamenteux dans la vie courante sont responsables de la dissémination de substances xénobiotiques variées, dont les effets à court terme ont pu être généralement limités grâce aux travaux d'alerte des toxicologues. Par contre, les effets à long terme n'ont été que progressivement mis en évidence, en particulier par des études épidémiologiques ou des accidents. Dans la plupart des cas, ces données concernent la santé humaine et, par analogie, la génotoxicité a été considérée comme un effet toxique au niveau des écosystèmes. Depuis plus d'un quart de siècle, on sait que l'utilisation de certains pesticides provoque de profondes modifications de l'écosystème dans lequel on les introduit. La dispersion et l'accumulation des pesticides dans tous les milieux et à tous les niveaux des compartiments de la biosphère posent d'insurmontables problèmes de santé publique et de toxicité vis à vis des biocénoses terrestres et aquatiques.

Les recherches entreprises jusqu'à présent se sont principalement intéressées aux composants majoritaires dans les pesticides. Elles ont permis, entre autres, de mettre en évidence la nuisance des dérivés phénoliques pour l'environnement aquatique. Ainsi, en 1982, l'agence américaine pour la protection de l'environnement (EPA) a publié une liste de 129 produits considérés comme polluants organiques [1]. Sur cette liste figurent les diméthylphénols (les xylénols), largement utilisés dans l'industrie où ils sont utilisés comme intermédiaires dans la fabrication de plusieurs produits industriels comme les résines, les antioxydants, les désinfectants et les vernis. Ces produits entrent aussi dans la composition des insecticides utilisés dans l'industrie de préservation du bois [2]. Ces multiples usages les disséminent largement dans l'environnement.

Le travail entrepris dans ce mémoire a pour objectif : l'évaluation de la biodégradabilité du 2,5-diméthylphénol par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'IBN ZIAD (Constantine), ainsi que l'isolement et l'identification des souches microbiennes dominantes impliquées dans sa dégradation.

# *Revue bibliographique*

## 1. Les eaux usées

### 1.1. Définition

Les eaux usées sont des eaux ayant été utilisées pour des usages domestiques, industriels ou même agricoles, constituant ainsi un effluent pollué et qui sont rejetées dans un émissaire d'égout [3].

Les eaux usées regroupent les eaux usées domestiques (les eaux vannes et les eaux ménagères), les effluents industriels (eaux usées des usines) et les eaux de ruissellement [4].

#### 1.1.4. Les eaux usées domestiques

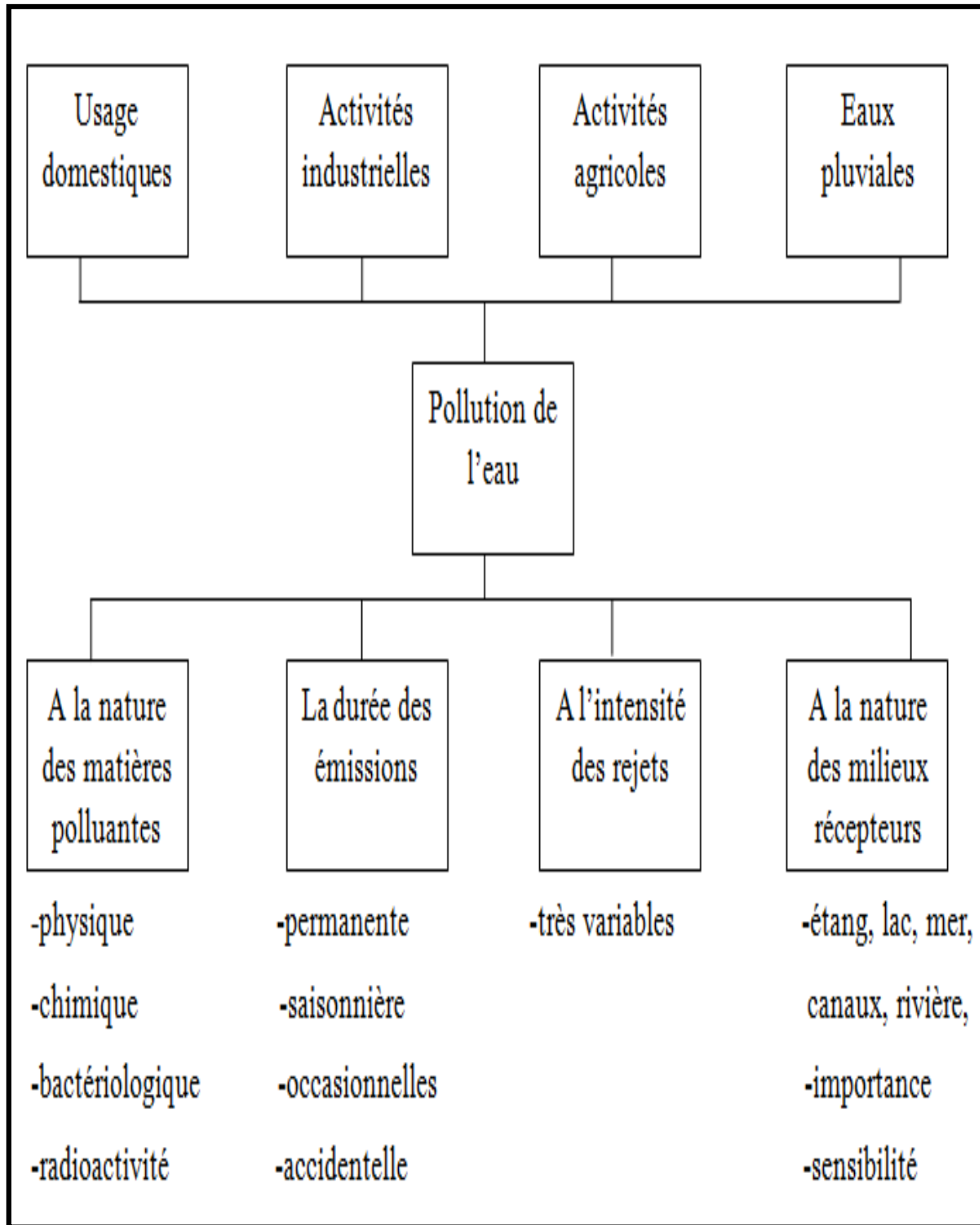
Elles proviennent des différents usages domestiques de l'eau. Elles sont essentiellement porteuses de pollution organique. Elles se répartissent en eaux ménagères « eaux grises », qui ont pour origine les salles de bains et les cuisines, et sont généralement chargées de détergents, de graisses, de solvants, de débris organiques... et en eaux vannes « eaux noires » ; il s'agit des rejets des toilettes, chargés de diverses matières organiques azotées et de germes fécaux [5].

#### 1.1.5. Les eaux usées industrielles

Tous les rejets résultant d'une utilisation de l'eau autre que domestique sont qualifiés de rejets industriels. Cette définition concerne les rejets des usines, mais aussi les rejets issus d'activités artisanales ou commerciales : blanchisseries, restaurants, laboratoires d'analyses médicales... [4]

Les caractéristiques de ces eaux subissent de grandes variations, elles dépendent d'une multitude de paramètres typiques de l'industrie : production, nettoyage, différentes étapes du procédé industriel, état des appareils... Par ailleurs, il existe des caractéristiques communes entre les effluents de la même industrie [6].

Certaines eaux usées industrielles sont toxiques pour la flore et la faune aquatique ou même pour l'homme car en plus de matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques tels que des solvants, des métaux lourds, des hydrocarbures, des micropolluants organiques... [5]



**Figure 1.** Nature de la pollution des eaux [9]

### **1.1.6. Les eaux de ruissellement**

Les eaux de ruissellement (eaux pluviales, eaux d'arrosage des voies publiques, eaux de lavage des caniveaux, des marchés et des cours) peuvent, elles aussi, constituer la cause de pollutions importantes des cours d'eau [5].

En effet, Le ruissellement urbain s'écoule directement dans les cours d'eau avoisinants à partir des nappes d'eau des toitures et des revêtements des rues. Ces eaux charrient usuellement des métaux lourds, des sels déglaçants, du fumier animal ainsi que du pétrole et des graisses. Les eaux pluviales, gorgées de boue et de sédiments, entraînent d'importantes quantités de contaminants (des métaux traces, des PCB et des pesticides), elles envasent ainsi les cours d'eau, suffoquent la vie aquatique et enfouissent les frayères [7].

## **1.2. Origine des eaux usées**

Les eaux usées urbaines proviennent essentiellement des activités domestiques et industrielles ainsi que des pratiques agricoles et des précipitations (les réseaux étant généralement unitaires) (Figure 1, ci-contre) [8, 9].

## **1.3. Composition des eaux usées**

La composition des eaux résiduaires urbaines brutes est variable et dépend essentiellement de l'activité humaine (eaux ménagères et eaux vannes), de la composition des eaux d'alimentation en eau potable et, accessoirement, de la nature des matériaux entrant dans la constitution des canalisations d'eau. Pour les composés chimiques éventuels, elle dépend aussi de la nature et de la quantité des effluents industriels rejetés dans le réseau urbain [10].

Les eaux usées urbaines contiennent également des matières solides, des substances dissoutes et des microorganismes : bactéries, protozoaires, virus et helminthes [8].

## **1.4. Microorganismes des eaux usées**

Les eaux usées contiennent tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales. Cette flore entérique normale est parfois accompagnée d'organismes pathogènes. L'ensemble de ces organismes peut être classé en quatre grands groupes : les bactéries, les virus, les protozoaires et les helminthes. Mais les bactéries et les protozoaires sont les acteurs clés du processus de biodégradation, et donc de dépollution du milieu [11].

#### 1.4.1. Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus communément rencontrés dans les eaux usées urbaines qui contiennent environ  $10^6$  à  $10^7$  bactéries/100 ml dont la plupart appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*,  $10^3$  à  $10^4$  au genre *Streptococcus* et  $10^2$  à  $10^3$  au genre *Clostridium* [12]. Les bactéries sont très utiles parce qu'elles décomposent au profit de leur croissance les matières organiques contenues dans les eaux usées. C'est pourquoi elles sont à la base de tous les procédés de traitement biologique des eaux usées. La concentration en bactéries pathogènes est de l'ordre de  $10^4$  germes/l. Parmi les bactéries de contamination fécale les plus détectées sont retrouvées les espèces du genre *Salmonella*, dont les espèces responsables de la typhoïde, des paratyphoïdes et des troubles intestinaux [8].

#### 1.4.2. Les protozoaires

Au cours de leur cycle vital, les protozoaires passent par une forme de résistance, les kystes, qui peuvent être véhiculés par les eaux résiduaires. Ces parasites sont très persistants. Ainsi, selon les conditions du milieu, ces organismes peuvent survivre plusieurs semaines, voire même plusieurs années [13]. Plusieurs protozoaires pathogènes ont été identifiés dans les eaux usées [14]. Parmi les plus importants du point de vue sanitaire, il faut citer *Entamoeba histolytica*, responsable de la dysenterie amibienne, *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum* [15]. Sachant que 10 à 30 kystes constituent une dose suffisante pour causer des troubles sanitaires [13].

#### 1.5. Caractéristiques physico-chimiques des eaux usées

Les analyses les plus communes des eaux usées sont basées sur l'évaluation de paramètres physico-chimiques et biologiques, tels que : le pH, la température, la conductivité, les matières en suspension ou les demandes en oxygène (DCO et/ou DBO) [16].

##### 1.5.6. Le pH

Il représente le degré d'acidité ou d'alcalinité du milieu. Les organismes vivants sont très sensibles à ses variations et un développement correct de la faune et de la flore aquatique n'est possible que si la valeur du pH est comprise entre 6 et 9. Son influence se fait également ressentir par le rôle qu'il exerce sur les autres éléments comme les métaux dont il peut diminuer ou augmenter la solubilité et donc la disponibilité et la toxicité éventuelle [17].



### **1.5.7. La température**

Elle influe sur la densité de l'eau et joue donc un rôle primordial dans les phénomènes de stratification des lacs et des mers, appelé thermocline. Certains rejets présentent des écarts de température importants avec le milieu récepteur, à l'exemple des eaux de refroidissement des centrales nucléaires. Une élévation de la température peut perturber fortement le milieu (pollution thermique) mais elle peut aussi être un facteur d'accroissement de la productivité biologique, qui peut être mise en valeur par l'aquaculture [17].

### **1.5.8. La conductivité électrique**

Elle représente la résistance qu'oppose l'eau au passage d'un courant électrique. Elle constitue également un indicateur corrélatif des concentrations globales des matières en solution dans l'eau [17].

### **1.5.9. Les Matières En Suspension (MES)**

Les MES sont les matières non dissoutes contenues dans l'eau. Elles comportent à la fois des éléments minéraux et organiques. Les MES comprennent les matières décantables et les colloïdes mais pas les matières dissoutes. Elles comportent souvent dans les cours d'eau des particules de nature argilo-humique provenant de l'érosion des sols, ainsi que d'autres constituants, en particulier d'origine organique. Les MES sont la cause essentielle de la turbidité de l'eau [18].

### **1.5.10. La demande en oxygène**

La demande en oxygène des eaux usées est corrélée à la nature de leur concentration en matières organiques, elle s'obtient par les analyses de la DCO et/ou de la DBO<sub>5</sub>.

#### **- La Demande Chimique en Oxygène (DCO)**

Elle représente la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation par processus chimique des matières oxydables existantes dans l'eau. Sa mesure correspond donc à une estimation corrélatrice des matières oxydables présentes dans l'eau, quelle que soit leur origine : organique ou minérale [19].

**Tableau 1.** Types de pollution des eaux continentales, nature de produits polluants et leurs origines [21]

Types de pollution	Nature	Sources
<b>Physique :</b>		
<b>Pollution thermique</b>	Rejets d'eau chaude	Centrales thermiques
<b>Pollution radioactive</b>	Radio-isotopes	Installations nucléaires
<b>Matière organique</b>	Glucides, Lipides, Protides	Effluents domestiques, Agricoles, Agro-alimentaires
	Ammoniac, Nitrates	Elevages et Piscicultures
<b>Chimique :</b>		
<b>Fertilisants</b>	nitrates, phosphates	Agriculture, Lessives
<b>Métaux et métalloïdes</b>	mercure, cadmium, plomb, aluminium, arsenic...	Industries, Agriculture, Pluies acides, Combustion
<b>Pesticides</b>	insecticides, herbicides, fongicides	Agriculture, Industries
<b>Organochlorés</b>	PCB, solvants	Industries
<b>Composées organiques de synthèse</b>	nombreuses molécules	Industries
<b>Détersifs</b>	agents tensio-actifs	Effluents domestiques
<b>Hydrocarbures</b>	pétrole et dérivés	Industrie pétrolière, Transports
<b>Microbiologique :</b>	bactéries, virus, champignons	Effluents urbains et d'élevage

- **La Demande Biochimique en Oxygène à 5 jours (DBO<sub>5</sub>)**

Elle correspond à la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation biologique des matières organiques. Soit donc leur biodégradation qui reproduit en fait leur autoépuration naturelle. Elle permet d'évaluer corrélativement les matières biodégradables présentes dans les eaux. Dans les conditions naturelles, celles-ci mettent de plusieurs jours (glucides) à plusieurs mois (composés azotés) pour être dégradées. C'est pourquoi la mesure a été standardisée à un délai raisonnable de 5 jours, considéré comme significatif [19].

**1.6. Pollution de l'eau**

On appelle pollution, tout facteur physique, chimique ou biologique rejeté dans une réserve d'eau naturelle (superficielle ou profonde) qui risque de perturber à plus ou moins longue échéance l'équilibre biologique et écologique de cette eau et susceptible de causer des inconvénients à l'écosystème ou à ses utilisateurs [20].

Les polluants des eaux peuvent être classés de manières différentes, par exemple suivant leurs caractéristiques chimiques, leur état physique, les compartiments de l'environnement dans lesquels ils sont déchargés ou trouvés, leurs sources, leurs effets, les organismes cibles qui peuvent être atteints... (Tableau 1, ci-contre) [21]

Les principaux polluants de l'eau naturelle sont les eaux usées et les autres déchets consommateurs d'oxygène (essentiellement les substances organiques dont la décomposition entraîne un épuisement de l'oxygène); les agents contaminants; les engrais; les produits chimiques organiques, notamment les pesticides, les agents tensio-actifs. Ainsi que divers produits ou déchets industriels : pétrole; minéraux, composés chimiques divers. D'autres substances peuvent également être concernées : sédiments composés de particules minérales extraits du sol, substances radioactives provenant des activités nucléaire, industrielle, médicale et scientifique [22].

**1.6.1. La pollution toxique**

Les substances toxiques sont en grande majorité d'origine synthétique, issues des activités humaines et qui présentent une nocivité pour les êtres vivants. Ils provoquent une intoxication des organismes affectés en perturbant certaines fonctions vitales, pouvant aller jusqu'à la mort. Ils ont la spécificité d'induire un impact toxique à des concentrations très

faibles (micro-, nano- voire picogramme par litre); pour cette raison, ils sont couramment appelés micropolluants [23, 24].

La présence de toxiques dans les milieux aquatiques peut compromettre sérieusement le cycle de vie de différents organismes aquatiques. L'impact des micropolluants peut être de différentes natures : intoxication létale, inhibition plus ou moins complète de certaines fonctions vitales (respiration, assimilation, croissance,...), inhibition des fonctions de reproduction, perturbation des systèmes hormonaux, développement de tumeurs... Par ailleurs, de nombreux toxiques ont la caractéristique de s'accumuler dans les tissus des organismes, ce qui peut entraîner des phénomènes d'amplification de la contamination le long de la chaîne alimentaire, avec des concentrations d'autant plus fortes que l'organisme est élevé dans la chaîne alimentaire [23, 24].

### **1.6.2. Origine de la pollution toxique**

Les micropolluants sont classés en 2 grandes catégories :

#### **- Les micropolluants minéraux**

Ce sont des métaux ou métalloïdes, notamment : l'arsenic, le cadmium, le cuivre, le chrome, le mercure, le nickel, le plomb et le zinc. Leur présence dans les milieux aquatiques peut être liée aux activités humaines, mais aussi aux apports naturels du fait de leur présence dans la croûte terrestre et de son érosion naturelle [24].

#### **- Les micropolluants organiques**

Ce sont en grande majorité des produits de synthèse issus de l'activité anthropique [25]. Ils proviennent principalement de trois ensembles d'activités industrielles (production d'énergie, métallurgie, industries chimiques et pharmaceutiques...), urbaines (transport, traitement des déchets...) et agricoles (produits phytosanitaires) [26].

Il existe environ cent mille molécules chimiques commercialisées sous plus d'un million de formes différentes. L'importance du nombre de substances qu'il est possible de retrouver dans les milieux aquatiques pose de sérieux problèmes en termes de gestion des risques [24].

- **Les pesticides** : à la différence des autres micropolluants, les pesticides (herbicides, insecticides, fongicides et autres biocides divers) ont par définition une action toxique

car il s'agit de leur finalité propre. 8 800 produits commerciaux existent sur le marché. Ils sont essentiellement employés en agriculture, pour lutter contre les végétaux jugés indésirables, les insectes ravageurs de cultures et les animaux nuisibles. Ils sont également utilisés pour l'entretien des voiries et des voies ferrées, le traitement du bois (scieries), ou le jardinage [24]. Ces substances ne sont qu'imparfaitement dégradées ou retenues dans les sols. Elles contaminent les eaux de surface (cours d'eau, lacs...) par ruissellement et les eaux souterraines par infiltration. Leurs molécules ou les produits de leur dégradation microbienne, souvent encore plus toxiques, se retrouvent dans les réserves d'eau potables ou à potabiliser [23]. Leurs effets sur la santé sont connus pour leurs fortes intoxications lors d'une absorption accidentelle et peuvent se manifester par des troubles nerveux, digestifs, respiratoires... Quant aux effets d'expositions répétées à de faibles doses pendant plusieurs années, ils restent mal connus mais il est probable que ces faibles doses s'accumulent dans l'organisme et peuvent engendrer à terme un risque. Ces polluants modifient le comportement des systèmes endocriniens et sont suspectés de participer à l'augmentation de la prévalence des cancers hormonaux chez l'homme ou la femme ou encore à la baisse de production de spermatozoïdes constatée ces dernières années chez l'homme [27].

- **Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) :** sont des contaminants produits par la combustion de la matière organique. Ils proviennent principalement des alumineries, le chauffage résidentiel au bois, la combustion industrielle des déchets de bois, la combustion de l'huile et diverses industries chimiques. La fumée de cigarette contient des HAP, de même que la fumée de cuisson et de friture. La cuisson au charbon de bois génère aussi la formation de HAP. Les HAP sont dispersés d'abord dans l'atmosphère. Ils peuvent cependant se retrouver dans l'eau et dans le sol. Ils peuvent être absorbés par les poumons et l'intestin ou encore demeurer au niveau de la peau. Plus d'une dizaine de molécules de HAP sont reconnues comme cancérogènes chez les animaux. C'est pourquoi plusieurs de ces substances sont considérées comme potentiellement cancérogènes chez l'homme [28].
- **Les polychlorobiphényles (PCB) :** sont des substances chlorées très stables, résistantes au feu et très peu biodégradables. Ces propriétés ont conduit à leur utilisation comme diélectriques dans les transformateurs et les condensateurs, les fluides caloporteurs ou les isolants. Ils ont été largement utilisés comme lubrifiants dans les turbines et les pompes, dans la formation des huiles de coupe pour le

traitement du métal, les soudures, les adhésifs, les peintures et les papiers autocopiants sans carbone. Ils persistent dans l'environnement et se concentrent d'un maillon à l'autre dans les chaînes alimentaires, les concentrations les plus élevées se retrouvant dans les animaux prédateurs, oiseaux ou mammifères, dont l'homme. Ils sont connus pour leurs effets neurologiques [29], endocriniens [30] et reproductifs [31]. Ils affectent aussi le développement fœtal et infantile [32] et sont fortement mutagènes et cancérigènes [33].

- **Les composés organo-halogénés volatiles (COV) :** sont des molécules de la chimie de synthèse, dérivés des hydrocarbures ou des éléments issus de la dégradation de ces molécules. Leur détection dans l'eau est principalement due à des pollutions anciennes (rejets industriels chroniques ou accidentels). Leur présence peut également être liée à la percolation de l'eau à travers des déchets enfouis dans le sol (anciennes décharges) ou des accidents routiers [34]. Parmi les principaux COV étudiés, on retrouve le benzène, le toluène, les isomères du xylène (*m*-xylène, *o*-xylène, *p*-xylène), l'éthylbenzène, le formaldéhyde... Ces derniers sont susceptibles d'avoir des effets sur la santé humaine : des effets aigus liés à une exposition à une forte dose sur une courte période mais aussi des effets chroniques liés à des expositions à de faibles doses sur le long terme, tels que des effets tératogènes (développement de masses cellulaires anormales au cours de la croissance fœtale), mutagènes (mutations génétiques) ou cancérogènes [35].
- **Les phénols et dérivés :** sont des substances organiques présentant un intérêt environnemental majeur. Ils sont très répandus dans notre environnement et présentent une toxicité élevée pour de nombreuses espèces, allant, en fonction de la nature du composé en cause, du simple effet irritatif à la toxicité neurologique voire la mortalité [36]. Le phénol et ses dérivés méthylés (crésols, diméthylphénols) se trouvent sur de nombreuses listes prioritaires [37]. Ils peuvent exister à l'état naturel dans les milieux aquatiques, étant produits par la décomposition de la végétation aquatique [38]. Largement exploités en industrie, les composés phénoliques sont souvent présents dans les eaux usées des raffineries de pétrole, les usines de gazéification du charbon et dans l'industrie des résines phénoliques. Ils sont parmi les polluants les plus fréquemment trouvés dans les rivières, les effluents industriels et les eaux de ruissellement des décharges. Leur toxicité réduit souvent l'efficacité du traitement biologique des eaux usées [39]. La dégradation de certains pesticides peut également

conduire à des phénols. Ainsi, les parathions (éthyl et méthyl) et le fenitrothion sont des insecticides organophosphorés largement utilisés dont les produits de décomposition sont respectivement le 4-nitrophénol et le 3-méthyl-4-nitrophénol [37].

#### **1.6.4. Dégradation des polluants toxiques**

La dégradation d'un produit correspond à sa dissipation par transformation de la molécule mère [40]. Elle permet de mesurer l'influence de ces substances et polluants sur les organismes vivants de différents écosystèmes ainsi que leur rémanence et persistance dans le milieu [41]. On distingue généralement la dégradation abiotique et biotique pour décrire ces transformations chimiques [42].

##### **- La dégradation abiotique**

C'est une des voies importantes d'élimination ou de transformation des produits chimiques dans l'environnement, en particulier dans les milieux de types air, eau, sol [41]. Elle correspond à une dégradation physique ou chimique du produit sans intervention de processus biologiques. Les principales réactions sont dues :

- **Au soleil** : par photo-décomposition, les rayons incidents, notamment les rayons ultraviolets, mènent à la photolyse des composés sensibles ;
- **A l'eau** : les principales réactions sont l'hydrolyse, l'oxydation (principalement dans les eaux de surface) et la réduction dans les eaux anaérobies et en profondeur dans les sédiments ;
- **Aux particules solides du sol** : les particules d'argiles ou les acides humiques peuvent catalyser des réactions de complexation ou de polymérisation [43].

##### **- La dégradation biotique**

Il s'agit de la biodégradation qui correspond à l'élimination d'un composé, grâce à l'activité de microorganismes. Une partie du substrat est assimilée par l'organisme considéré et s'accompagne d'un rejet de produits plus élémentaires ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ,  $H_2$ ...). Toutefois, les métabolismes concernés sont souvent incomplets et n'aboutissent pas toujours à une dégradation complète (minéralisation) du composé. Dans ce type de situation, le terme de biotransformation peut être employé mais par souci de simplification à l'usage le terme de biodégradation regroupe les deux phénomènes [44].

La biodégradation est basée sur deux processus : croissance et co-métabolisme microbiens.

Dans le cas de la croissance, les polluants organiques sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie.

Le co-métabolisme est défini comme un métabolisme d'un composé organique en présence d'un substrat de croissance (co-substrat) qui est utilisé comme source primaire de carbone et d'énergie.

Dans les eaux superficielles, la plupart des eaux souterraines et les filières de traitement des eaux usées, les processus sont plutôt de nature aérobie. En revanche, dans les sédiments, les nappes captives, les zones colmatées des berges et dans le prétraitement d'assainissement autonome, les stockages de déjections animales, la voie anaérobie est privilégiée [45]. Les réactions enzymatiques principales de la biodégradation aérobie sont des oxydations catalysées par des oxygénases et des peroxydases. Cependant, en présence d'une molécule d'oxygène, certains composés (benzoates, phénols, hydrocarbonés aromatiques) sont initialement oxydés par une mono ou une di-oxygénase et convertis en catéchols ou protocatechuates, par la suite minéralisés [46].

La biodisponibilité est la présence d'une substance dans l'environnement sous une forme susceptible d'interagir avec le vivant. Un polluant peut être peu biodisponible. C'est le cas par exemple des polluants stockés dans les sédiments où ils ne présentent alors un risque que pour les organismes fouisseurs (par exemple les vers), les organismes vivant uniquement dans l'eau (par exemple les poissons) ayant peu de chance d'y être exposés directement. Cependant, même si la probabilité d'exposition ne concerne, dans un premier temps, que certains organismes de la chaîne trophique, les substances toxiques des sédiments sont à surveiller. D'une part en raison de leur risque de remise en solution suite à un changement d'équilibre entre leur forme libre dans l'eau et leur forme stockée dans les sédiments, d'autre part en raison du risque de transmission par la chaîne alimentaire [47].

La bioaccumulation désigne le stockage de longue durée de polluants persistants par un organisme vivant, contaminé par son milieu (biotope) ou par sa nourriture, et dont il n'est pas capable de se débarrasser par excrétion ou métabolisme. Chez les animaux et l'homme, les produits solubles s'accumulent plutôt dans les muscles et les os, et les peu solubles (organochlorés par exemple) dans les graisses (produits lipophiles) [47]. La bioaccumulation



est estimée par le facteur de bioconcentration (BCF) qui est le rapport de la concentration dans l'organisme vivant sur la concentration dans le milieu [48].

### **1.7. Effets du déversement des eaux usées sur le milieu naturel**

Tant que la sensibilisation à l'environnement était restreinte, un nombre étonnant de grandes villes ne possédaient qu'un système rudimentaire de traitement des eaux usées, tant qu'elles en possédaient un. Les eaux d'égout brutes, ou à peine traitées, étaient simplement rejetées dans les cours d'eau ou les océans. Les eaux vives bien aérées ont un pouvoir d'auto-épuration. Jusqu'à ce que cette capacité ne soit pas dépassée en raison de l'accroissement de la population et de la quantité de déchets produite, le traitement sommaire des rejets municipaux ne causait donc pas de problème [49]. Ce phénomène d'auto-épuration devient moins efficace lorsque le milieu aquatique reçoit une pollution excessive qui dépasse la capacité de dilution du milieu récepteur et ses aptitudes d'auto-épuration. Cette auto-épuration devient impossible en cas de présence de substances non biodégradables (certaines substances chimiques stables) ou de substances toxiques inhibant le phénomène d'auto-épuration lui-même.

L'action polluante de certaines substances toxiques (white-spirit, peinture, colles, lubrifiants, pesticides, révélateurs, détergents ...) est immédiate et souvent foudroyante. Quand ils arrivent dans le milieu naturel, c'est tout l'écosystème aquatique qui est pollué, souvent sur des kilomètres de distance par rapport à la source de pollution [50]. Ces substances peuvent pénétrer dans les chaînes alimentaires. En effet, une faible partie est évacuée par excrétion, mais le reste s'accumule dans certains organes (foie, muscles, graisse) des poissons herbivores. Ceux-ci sont mangés par les poissons carnivores et les oiseaux, qui sont contaminés à leur tour et qui concentrent encore davantage les substances toxiques. Les espèces qui se trouvent à l'extrémité supérieure de la chaîne alimentaire, y compris l'homme, sont ainsi exposées à des teneurs en substances toxiques beaucoup plus élevées que celles qui se trouvaient au départ dans l'eau [51].

Au Canada, de même qu'aux États-Unis, on a amélioré la situation dans la majorité des cas de rejet sans traitement mais il n'en est pas de même partout dans le monde. Environ 70% des agglomérations urbaines établies en bordure de la Méditerranée déversent encore aujourd'hui leurs eaux usées dans la mer sans traitement [49]. En Algérie, peu d'importance est accordée à la couverture des services d'assainissement comparée à la couverture des services

d'approvisionnement en eau et encore moins d'importance est accordée à l'épuration [52]. En effet, pour un taux de couverture du réseau d'assainissement de l'ordre de 85 %, seules 20 % des eaux usées collectées en Algérie sont traitées [53].

### **1.8. Traitement des eaux usées**

La croissance continue de l'urbanisation, de la démographie et du développement industriel a engendré une dégradation importante des milieux naturels en aval des sites de rejet de ces réseaux. La nécessité d'assainir les eaux usées des villes avant leur restitution au milieu récepteur a donc fini par s'imposer. On est alors passé d'une logique de l'éloignement de l'eau usée à une logique de sa collecte et de son traitement. En station d'épuration, les traitements varient en fonction de la nature des eaux usées et de la sensibilité à la pollution du milieu récepteur [54]. Il y a plusieurs niveaux de traitement des eaux usées : les traitements primaires, secondaires et tertiaires. Plusieurs établissements municipaux de traitement des eaux usées utilisent le niveau primaire et secondaire (STEP IBN ZIAD) et quelques installations utilisent le traitement tertiaire [55].

#### **1.8.5. Les prétraitements**

Ces procédés précèdent le traitement primaire et permettent d'éliminer la fraction la plus grossière, afin de ne pas gêner les opérations ultérieures. Ce sont le dégrillage, le dessablage, le dégraissage également appelé déshuilage [4].

#### **1.8.6. Le traitement primaire**

La décantation primaire permet d'éliminer environ 70% des matières minérales et organiques en suspension [54]. L'efficacité de ce traitement dépend du temps de séjour et de la vitesse ascensionnelle (qui s'oppose à la décantation). En effet la décantation primaire permet d'éliminer, pour une vitesse ascensionnelle de 1,2 m/h, 40 à 60 % des MES, soit 10 à 30 % des virus, 50 à 90 % des helminthes et moins de 50 % des kystes de protozoaires [10]. La décantation des MES entraîne également avec elle des micropolluants.

Les performances de cette décantation peuvent être améliorées par l'adjonction de produits chimiques agglomérants (sulfate d'alumine, chlorure ferrique, agent de coagulation...). Cette technique qu'on appelle « floculation » permet de capter 90% des matières en suspension [54].

### 1.8.7. Le traitement biologique secondaire

À la fin du traitement primaire, la majeure partie de la matière organique des eaux usées est sous forme dissoute. Le traitement secondaire, qui est principalement de nature biologique, vise à éliminer le plus possible la matière organique résiduelle et à réduire la DBO [49].

C'est l'étape essentielle du traitement. Après décantation, l'effluent est introduit dans des bassins équipés de dispositifs d'aération (turbines, insufflation d'air...) où des microorganismes (essentiellement les bactéries et les protozoaires) naturellement présents dans l'effluent dégradent les matières organiques dissoutes. L'air insufflé leur fournit de l'oxygène nécessaire à leur métabolisme et ils se développent en se nourrissant de la pollution organique au profit de leur croissance. Ces microorganismes exercent également un effet physique de rétention de la pollution par leur propension à se rassembler en films ou flocons [56]. Selon la technologie utilisée, ces cultures bactériennes peuvent être libres (boues activées) ou fixées (lits bactériens et biofilms) [57].

#### - Le traitement par boues activées

C'est le traitement biologique le plus simple et le plus fréquemment utilisé actuellement en Algérie (STEP IBN ZIAD). Le floc bactérien est maintenu dans un bassin aéré et brassé. Un système d'aération permet à la fois d'apporter l'oxygène nécessaire à l'épuration et de brasser les eaux usées. Ce brassage est indispensable pour homogénéiser le mélange et éviter les dépôts. Les eaux usées restent normalement de cinq à dix heures dans un réservoir de boues activées, un temps trop court pour une oxydation complète de toute la matière organique. Cependant, durant cette période, la plupart de la matière organique dissoute est adsorbée sur les floculats et incorporée dans les cellules microbiennes. La DBO de l'effluent liquide est considérablement réduite (jusqu'à 95 %) par ce procédé, avec la plupart de la DBO désormais concentrée dans les floculats sédimentés [58]. Dans certains cas, un traitement faisant intervenir des microorganismes anaérobies (digestion anaérobie des boues résiduaires) complète le traitement secondaire [59]. Ainsi une réduction presque totale de la DBO peut être alors obtenue.

#### 1.8.8. **Le traitement tertiaire complémentaire**

Pour obtenir une épuration plus poussée, notamment lorsque la sensibilité du milieu récepteur l'exige (zone de baignade, vie piscicole, prise d'eau potable en aval de la station...), il peut être nécessaire d'effectuer des traitements complémentaires de différents types : filtration sur lit de sable, désinfection par le chlore et d'autres produits oxydants (ozone...), élimination de l'azote, élimination du phosphore... [54]

Tableau 2. Propriétés Physico-chimiques du 2,5-diméthylphénol

Paramètre	Valeur	Unité	Température (°C)	Source
Masse molaire	122,17	g/mole		[63]
Point d'ébullition	211,1	°C		[61]
Point de fusion	74,8	°C		[61]
Densité	0.965		80	[60]
Solubilité dans l'eau	3540	mg/l	25	[60]
Constante de Henry	$1,12 \cdot 10^{-6}$	atm. m <sup>3</sup> /mole	25	[61]
Pression de vapeur	0.156	mm Hg	25	[60]
pKa	10,41		25	[61]
Log K <sub>oc</sub>	2,33			[60]

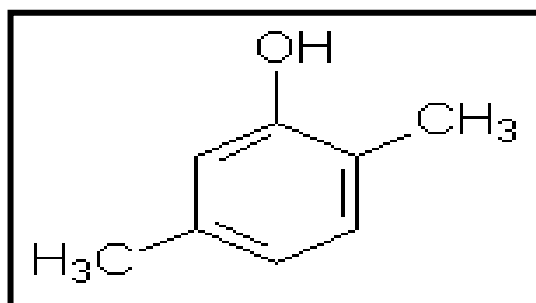


Figure 2. Structure chimique du 2,5-diméthylphénol [61]

## 2. Le 2,5-Diméthylphénol

### 2.1. Généralités

La formule brute du 2,5-diméthylphénol (2,5-DMP ou DMP) est  $C_8H_{10}O$ . Le 2,5-DMP est nommé aussi le 1-hydroxy-2,5-diméthylbenzène [60]. La structure du 2,5-DMP est représentée dans la figure 2 (ci-contre) [61].

À température ambiante, le 2,5-DMP se présente sous forme de cristaux acicules blancs, il possède une odeur phénique caractéristique et persistante [62]. Ses propriétés physico-chimiques sont mentionnées dans le tableau 2 (ci-contre).

### 2.2. Utilisation et Préparation

Le 2,5-diméthylphénol est principalement utilisé comme intermédiaire dans la synthèse des résines phénoliques, des plastiques, des esters phosphoriques et des antioxydants [64]. Il est aussi connu comme désinfectant et biocide [65]. C'est un acide puissant et ses propriétés antiseptiques sont supérieures à celles du phénol [66]. Il est aussi utilisé comme solvant des fibres de polyester [67]. Son mélange avec d'autres composés phénoliques permet son utilisation dans des complexes solvants, désinfectants, pesticides, ainsi que dans les mines et le domaine du pétrole [64].

À l'origine, la théorie indique que les diméthylphénols (y compris le 2,5-DMP) sont préparés soit par l'action de l'acide nitreux sur les xylidines, soit par celle de la potasse fondante sur les dérivés sulfonés des diméthylbenzines [68]. Industriellement, le mélange des diméthylphénols est obtenu par extraction à partir du goudron suivi d'une distillation fractionnée [69].

### 2.3. Sources de pollution

Le 2,5-diméthylphénol est naturellement présent dans la fumée du tabac [70], la fumée de la marijuana [71] et le thé noir [72].

L'utilisation anthropique du 2,5-DMP dans la préparation des désinfectants, la synthèse des résines artificielles, en tant que constituant de la créosote du goudron (0,7% en poids), comme matière première pour les antioxydants, les essences ainsi que le caoutchouc et comme composant dans les gaz d'échappement automobiles [38] aboutit à sa libération dans l'environnement par divers flux de déchets.

**Tableau 3.** Les études de la toxicité du 2,5-diméthylphénol

Organisme	Type de test	Voie	Dose signalée (Dose normalisée)	Effet	Source
<b>Souris</b>	DL50	Orale	383mg/kg (383mg/kg)	- Ataxie - Contraction musculaire ou spasticité - Poumons, Thorax ou Respiration : Dyspnée	(75)
		Cutanée		- Prolifération des lymphocytes auriculaires	
<b>Lapin</b>	DL50	orale	938mg/kg (938mg/kg)	- Ataxie  - Contraction musculaire ou spasticité - Poumons, Thorax ou Respiration : Dyspnée	(61)
<b>Rat</b>	DL50	orale	730mg/kg (730mg/kg)	- Convulsions ou effet sur le seuil épileptogène	(76)

## 2.4. Toxicité

Comme les crésols, les diméthylphénols (y compris le 2,5-DMP) sont plus toxiques que le phénol et les triméthylphénols [66, 73]. Le 2,5-DMP pénètre dans le corps humain par inhalation de ses aérosols, par absorption cutanée et par ingestion [60]. Il a été établi que 12 heures après son ingestion, des effets sur le métabolisme microsomal hépatique et pulmonaire sont déterminés. En effet, une diminution de l'activité benzyloxyrésorufine-O-debenzylase dans les poumons et une induction puissante du cytochrome P<sub>450</sub> dans le foie sont signalées [74]. Les symptômes les plus fréquents consécutifs à l'exposition aiguë, accidentelle ou volontaire, au 2,5-DMP sont des convulsions, une spasticité, une ataxie et une dyspnée (Tableau 3, ci-contre). Le 2,5-DMP est aussi connu pour son potentiel cancérigène et son activité anti-oestrogénique [77].

## 2.5. Devenir de 2,5-diméthylphénol dans l'environnement

Le devenir des diméthylphénols dans l'environnement est étroitement lié à leurs propriétés physico-chimiques ainsi qu'aux conditions environnementales dans lesquelles ils se trouvent.

Compte tenu de sa tension de vapeur, le 2,5-diméthylphénol émis dans l'atmosphère n'est présent que sous forme de vapeur. En cas de précipitation, le 2,5-DMP peut être entraîné par la pluie et s'introduire dans les compartiments terrestres (sols, eau et sédiments) [78].

Dans le sol, le 2,5-DMP a une mobilité modérée. En se basant sur la constante de Henry, la volatilisation du 2,5-DMP à partir des sols humides constitue un processus de transfert important alors qu'à partir d'un sol sec, elle reste relativement faible [60].

Dans les milieux aquatiques, le 2,5-DMP s'absorbe très peu sur les particules en suspension et les sédiments. D'après la constante de Henry, le 2,5-DMP se volatilise à partir des eaux de surface. En effet, sa demi-vie par évaporation depuis une eau de rivière et un lac est de 6 et 46 jours respectivement [60]. Généralement, un composé chimique est préférentiellement trouvé dans la phase organique si son  $\log K_{oc}$  est  $> 1$ . Le  $\log K_{oc}$  du 2,5-DMP est  $> 2$ . Cela prédit que sa bioconcentration dans les organismes aquatiques est modérée [79].



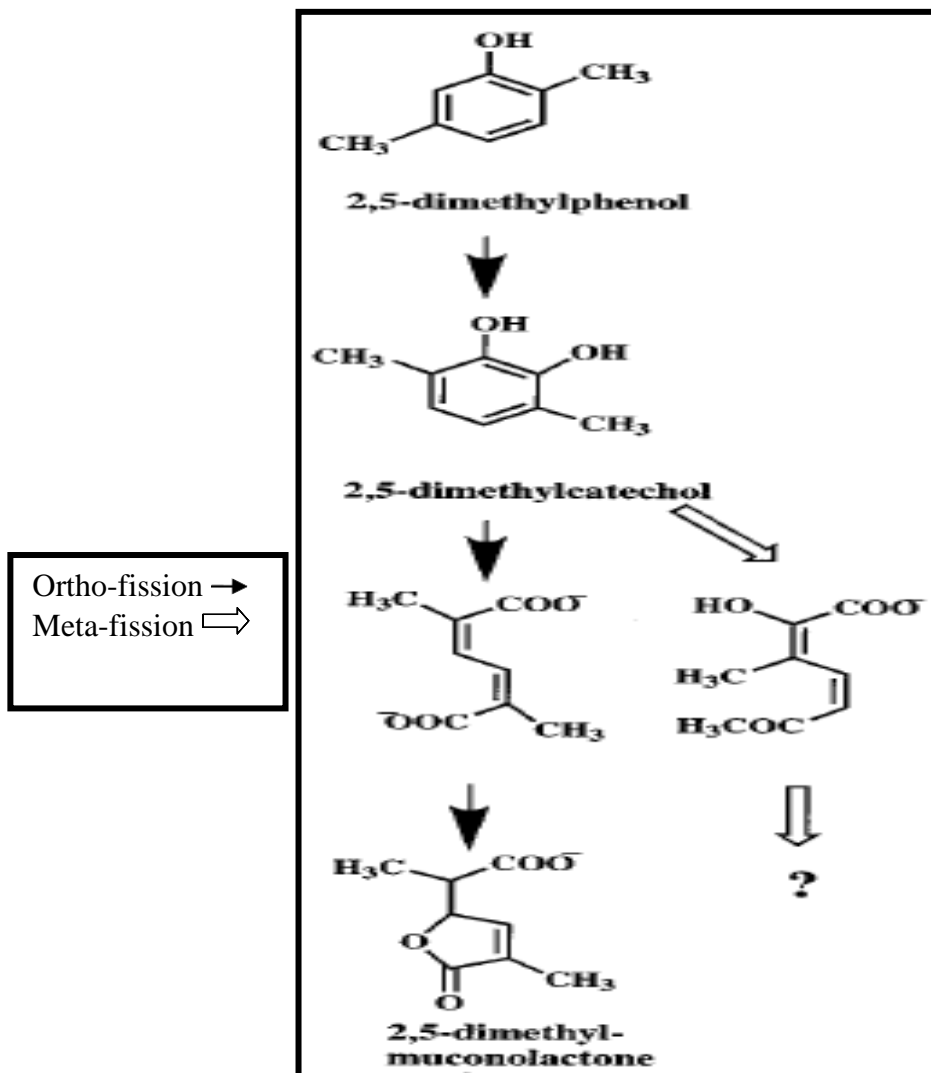


Figure 3. Voie proposée de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 [83]

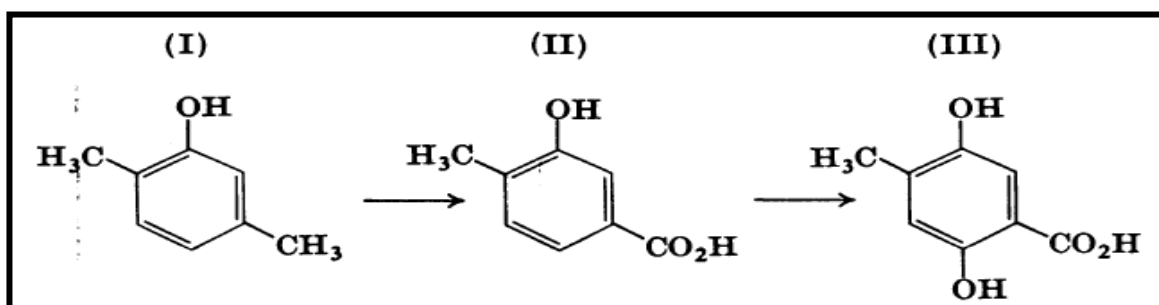


Figure 4. Voie proposée de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par *Pseudomonas* sp. (I), 2,5-diméthylphénol, (II), acide 3-hydroxy-4-méthylbenzoïque, (III), acide 4-méthylgentisique [82]

## 2.6. Rémanence dans le milieu

### 2.6.1. Dégradation abiotique

La dégradation abiotique dans l'atmosphère est conditionnée par la constante des réactions photochimiques. Ce taux est estimé à  $8 \cdot 10^{-11}$  cm<sup>3</sup>/molécule/s à 25°C, qui correspond à une demi-vie d'environ 4,8 heures et à la formation de  $5 \cdot 10^5$  radicaux hydroxyles par cm<sup>3</sup> [80]. En raison de l'absence de groupes fonctionnels hydrolysables, le 2,5-diméthylphénol est faiblement hydrolysé dans l'eau [81]. Le 2,5-DMP peut aussi disparaître par photo-décomposition [60].

### 2.6.2. Dégradation biotique

La dégradation aérobie des diméthylphénols par les microorganismes correspond à la participation d'enzymes, les oxygénases, pour incorporer l'oxygène moléculaire dissous à leurs substrats. Pour la fission du noyau benzène, l'anneau est préalablement dihydroxylé par une oxygénase en faisant apparaître dans la plupart des cas la structure d'un catéchol et dans une moindre mesure celle de l'acide gentisique. La fission de l'anneau se produit par une seconde réaction, catalysée par une oxygénase et comportant l'insertion du dioxygène dans le noyau aromatique [82]. Les travaux sur la biodégradation des diméthylphénols sont rares [66]. Ces composés ont été principalement étudiés pour déterminer leur voie de dégradation métabolique et les enzymes impliquées dans cette dernière [66]. Certains microorganismes utilisent deux voies (*ortho*- et *meta*-clivage) pour dégrader le 2,5-diméthylphénol. Les deux voies convergent vers le 2,5-diméthylmuconolactone. La concentration obtenue de ce produit via la *meta*-fission est négligeable, comparée à celle obtenue par l'*ortho*-fission (Figure 3, ci-contre) [83]. La biodégradation du 2,5-DMP (I) s'effectue aussi par une oxydation du groupe méthyle (en position *meta*) suivie d'une hydroxylation du noyau benzène (un second groupe hydroxyle est introduit en position *para*) formant ainsi l'acide 3-hydroxy-4-méthylbenzoïque (II) et l'acide 4-méthylgentisique (III) respectivement (Figure 4, ci-contre) [82]. Ce dernier sert de substrat pour la fission du noyau par la dioxygénase [82, 84, 85].

Différents types de bactéries, de champignons et de microalgues : *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Flavobacterium* sp., *Xanthomonas* sp., *Nocardia* sp., *Mycobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Comamonas* sp., *Bacillus* sp., *Candida tropicalis*, *Aspergillus awamori*, *Neurospora crassa*, *Trichosporon cutaneum*,

*Scenedesmus obliquus*, *Spirulina maxima*, *Chlorella* sp., sont connus pour leur capacité à dégrader les phénols et leurs dérivés, y compris le 2,5-DMP [86, 87, 88].

Les diméthylphénols, en forte concentration, inhibent toujours la croissance cellulaire en agissant négativement sur le système des oxygénases. Cependant, cet effet toxique peut être allégé dans une certaine mesure par une adaptation des microorganismes aux diméthylphénols ou par une addition de co-substrats de croissance conventionnels dans le milieu [66].

# *Matériel et méthodes*

### 1. Choix du xénobiotique

La molécule retenue pour cette étude est le 2,5-diméthylphénol. Cet isomère est connu pour sa toxicité et sa persistance dans le milieu. La molécule utilisée comme substrat d'étude a une qualité analytique avec un degré de pureté de 99%.

### 2. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est un milieu salin minimum (MSM) où le 2,5-diméthylphénol est la seule source de carbone et d'énergie. Il est composé des éléments minéraux suivants :  $K_2HPO_4$  (0,4 g/l),  $KH_2PO_4$  (0,2 g/l), NaCl (0,1 g/l),  $(NH_4)_2SO_4$  (0,4 g/l),  $MgSO_4$  (0,1 g/l),  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (0,01 g/l),  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$  (0,01 g/l),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (0,01 g/l) [89, 90, 91]. Son pH est ajusté à 7,2 avec une solution de NaOH à 30%, avant autoclavage. Le 2,5-DMP est introduit à différentes concentrations : 20 mg/l à 100 mg/l, avec un intervalle de 20 mg/l. Il est additionné aseptiquement après l'autoclavage du milieu de culture à 120°C pendant 20 minutes.

### 3. Origine de l'inoculum (consortium microbien)

Des prélèvements manuels instantanés sont effectués à partir du canal d'entrée et du canal de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'IBN ZIAD. Les propriétés physico-chimiques des effluents sont mesurées sur place : pH, température, conductivité, débit, matières en suspension (MES), DCO et DBO<sub>5</sub>.

Les échantillons sont prélevés dans des conditions d'asepsie rigoureuse pour éviter toute contamination accidentelle durant la manipulation.

L'échantillonnage a été réalisé comme suit :

- Les flacons de prélèvement en verre sont préalablement lavés, rincés soigneusement pour éliminer toute trace de résidu éventuel (détergent...) et stérilisés.
- Au moment du prélèvement, le flacon est rincé avec de l'eau à analyser.
- Le prélèvement manuel est effectué à 20-30 cm de la surface, au niveau d'une zone agitée par le courant de l'effluent où le risque de sédimentation est très faible.
- Les flacons remplis complètement sont fermés hermétiquement puis recouverts avec du papier aluminium pour assurer une double protection contre toute contamination probable.

- Les échantillons soigneusement étiquetés et conservés à 4°C dans une glacière sont transportés jusqu'au laboratoire pour être traités dans les 2 heures [92].

#### **4. Dénombrement des protozoaires**

Les protozoaires sont traités avec une solution de MFS (methylgreen-formalin-saline) (Annexe 1), qui permet la fixation des cellules par le formaldéhyde et la coloration des noyaux cellulaires par le vert de méthyle. Un volume de 100 µl de chaque effluent est mélangé avec le même volume de la solution MFS, les échantillons traités sont conservés 30 minutes à l'obscurité avant le comptage. Le dénombrement est réalisé sur une cellule de Malassez (Annexe 1).

La chambre de comptage est couverte par une lamelle fixée et remplie par capillarité à l'aide d'une pipette pasteur. Le comptage est ensuite réalisé sous microscope à l'objectif x40, de façon à ne compter que les cellules contenues dans les 25 rectangles subdivisés en 20 petits carrés.

#### **5. Cinétique de biodégradation et dosage**

Les deux effluents prélevés ont servi d'inoculum pour l'étude de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol. Deux séries sont réalisées en même temps et dans les mêmes conditions, l'une inoculée par l'effluent d'entrée et l'autre par l'effluent de sortie.

Deux paramètres permettant tous deux l'évaluation de la biodégradabilité du 2,5-DMP sont étudiés: l'éventuelle production de gaz et/ou la disparition du substrat.

##### **5.1. Dispositif expérimental d'étude (réacteur batch)**

Les cultures sont réalisées dans des fermenteurs miniaturisés. Il s'agit de flacons en verre stériles scellés d'un volume total de 500 ml. Le bouchon est muni d'un orifice protégé afin d'éviter tout échange avec le milieu extérieur, il permet les prélèvements aqueux, prévus pour le suivi de la concentration du substrat et du pH.

##### **5.2. Inoculation**

Le milieu minimum estensemencé à raison de 5% (V/V : 180 ml de milieu de culture inoculé avec 9 ml d'inoculum). Trois répétitions sont réalisées pour chaque concentration.

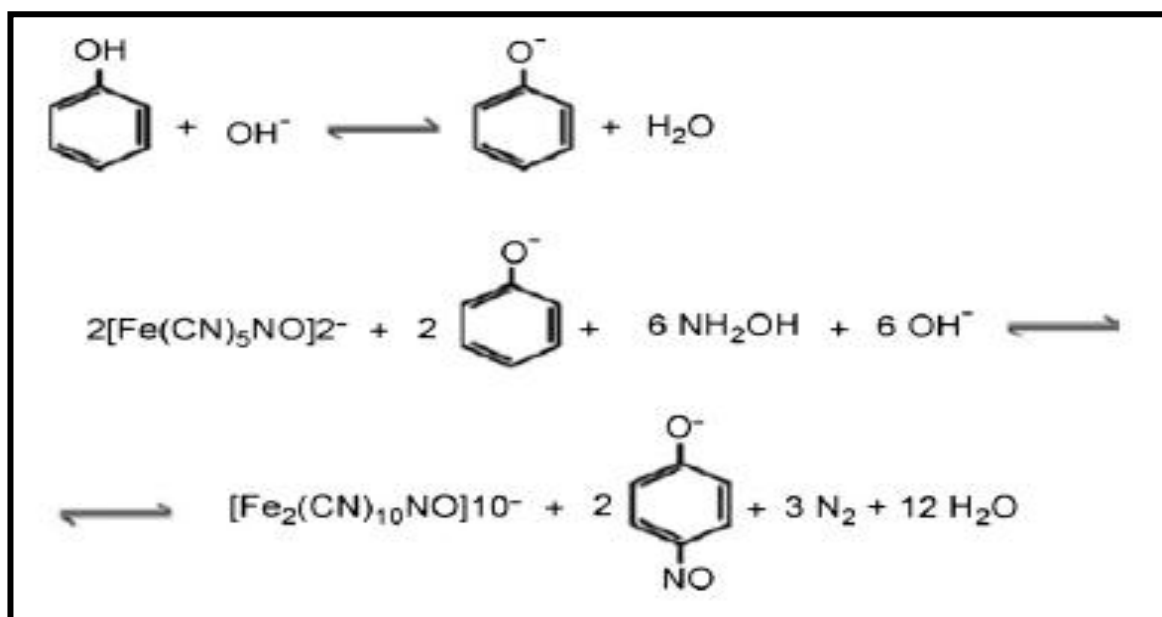


Figure 5. Réaction de Berthelot [86]

À chaque intervalle de temps, 10 ml de chaque flacon sont prélevés pour la mesure du pH et le dosage de la concentration du 2,5-diméthylphénol. Les fermenteurs sont standardisés à 2 volumes d'air et 1 volume du milieu de culture 2/1(V/V).

### 5.3. Incubation

Les flacons sont incubés à l'obscurité, à une température de 30°C et sans agitation. La mesure du pH et le dosage de la molécule (dosage colorimétrique) sont réalisés au cours des premières heures (3h et 6h) et des premiers jours (1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup>). Sa concentration est aussi mesurée après 14 et 30 jours d'incubation [93].

### 5.4. Témoins et contrôle

Les essais sont réalisés dans des conditions stériles, avec deux séries de témoins:

- ❖ **Témoin 1:** inoculum incubé dans les mêmes conditions expérimentales mais sans la molécule (2,5-DMP).
- ❖ **Témoin 2:** la molécule est introduite et l'incubation se fait dans les mêmes conditions expérimentales mais sans l'inoculum (pour vérifier une éventuelle dégradation abiotique).

### 5.5. Suivi de la concentration du 2,5-diméthylphénol par dosage colorimétrique

La méthode colorimétrique est basée sur la réaction de Berthelot. Les diméthylphénols réagissent avec le nitroprusside de sodium en présence de chlorhydrate d'hydroxylamine dans des conditions alcalines, ils donnent alors un produit de couleur bleu (Figure 5, ci-contre) présentant un maximum d'absorbance à 700 nm [86]. Le protocole se déroule selon les étapes suivantes :

- Centrifugation à 4°C : 8000 tours/minutes pendant 10min (afin d'obtenir un surnageant exempt de cellules microbiennes).
- Récupération du surnageant.
- 1ml du surnageant est dosé comme suit:
- Addition de 1 ml d'une solution nitroprusside de sodium (0,01 M).
- Addition de 1ml d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine H<sub>4</sub>CLNO (0,04 M).
- Addition de 3 ml d'une solution tampon (pH=12,3).



- Agitation.

- Lecture de la D.O. à la longueur d'onde  $\lambda=700$  nm, après 15 minutes d'incubation à 28°C.

## 6. Isolement et identification des microorganismes

Le but de cette manipulation est de tenter d'isoler et d'identifier les souches microbiennes dominantes, aptes à dégrader le 2,5-diméthylphénol à une concentration de 100 mg/l et ceci pour les deux effluents.

### 6.1. Isolement

L'isolement des microorganismes dominants est effectué au fur et à mesure de la biodégradation de la molécule, par la méthode de la dilution-extinction [18]. L'ensemencement est fait à partir des dilutions les plus importantes ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$ ), respectivement après 14 et 30 jours d'incubation sur gélose nutritive (Annexe 2).

### 6.2. Purification

Sur la base de l'aspect macroscopique différent, diverses colonies sont prélevées et repiquées sur le même milieu et parallèlement sur des milieux sélectifs tels que le milieu Cétrimide, Chapman, King A, King B et Mac Conkey (Annexe 2).

### 6.3. Identification

L'identification des souches bactériennes est basée sur des schémas d'identifications dichotomiques [94]. Chaque colonie purifiée est prélevée et diluée dans 1 ml d'eau physiologique. A partir de cette suspension bactérienne dense, on procède à une observation microscopique après coloration de Gram et à une série de tests biochimiques classiques en vue d'une identification éventuelle. Par les tests préliminaires d'orientation suivants [94, 95] :

- ❖ **Le type respiratoire** : il est identifié sur une gélose nutritive de type VF (Annexe 2), ensemencée à l'aide d'une pipette pasteur plongée au fond du tube et remontée en décrivant une spirale de façon à ensemercer uniformément le milieu sur toute la hauteur. La lecture se fait après 24h d'incubation à 30°C.
- ❖ **L'étude de la voie d'attaque des glucides** : ce test est effectué sur le milieu MEVAG (Annexe 2) afin de déterminer le type de métabolisme glucidique (fermentaire ou oxydative). La lecture se fait après 24h d'incubation à 30°C.

- ❖ **La mise en évidence de l'utilisation du mannitol :** le milieu utilisé est le mannitol-mobilité (Annexe 2). C'est une gélose semi molle permettant de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. L'obtention des résultats bien clairs nécessite un temps d'incubation de 24h à 30°C.
- ❖ **La mise en évidence de l'utilisation du glucose, du lactose et de la production d'H<sub>2</sub>S :** cette mise en évidence est réalisée sur le milieu T.S.I. (Annexe 2). On ensemence la surface de la pente de la gélose abondamment par stries serrées et le culot par piqure centrale. La lecture se fait après 24h d'incubation à 30°C.
- ❖ **La mise en évidence de la production d'acétoïne :** cette mise en évidence est effectuée sur le milieu Clark et Lubs (Annexe 2). L'incubation se fait à 30°C pendant 24h. Révéler après l'ajout des réactifs spécifiques.
- ❖ **La mise en évidence de la production d'acides mixtes :** ce test est effectué aussi sur le milieu Clark et Lubs (Annexe 2). L'incubation se fait à 30°C pendant 24h. La lecture se fait après l'addition des réactifs spécifiques.
- ❖ **La mise en évidence de la réduction des nitrates :** l'ensemencement est effectué sur bouillon nitraté (Annexe 2). Incuber à 30°C pendant 24h. La lecture se fait en ajoutant des réactifs spécifiques.
- ❖ **La mise en évidence de la production d'indole :** la culture est effectuée dans une eau peptonée exempte d'indole (Annexe 2) ou dans le milieu Urée-indole (Annexe 2). La lecture se fait après incubation à 30°C pendant 24h, l'indole produit est révélé par un réactif spécifique : le réactif de Kovacs.
- ❖ **La mise en évidence de l'uréase et la TDA :** ce test est effectué aussi sur le milieu urée-indole (Annexe 2), les résultats sont obtenus après 24h d'incubation à 30°C.
- ❖ **Utilisation du citrate comme seule source de carbone :** ce test est réalisé sur le milieu de Simmons (Annexe 2). La lecture se fait après incubation à 30°C pendant 24h à 5 jours.
- ❖ **La recherche des décarboxylases (arginine-dihydrolase : ADH ; ornithine-décarboxylase : ODC ; lysine-décarboxylase : LDC.) :** le milieu utilisé est le milieu Moëller (Annexe 2) additionné ou non (tube témoin) d'un acide aminé correspondant (arginine ou ornithine ou lysine). La lecture a lieu après 24h d'incubation à 30°C.

- ❖ **La recherche de la catalase :** le test classique consiste à mettre du matériel bactérien, prélevé par une anse métallique dans une goutte de peroxyde d'hydrogène déposée sur une lame de verre. La présence de catalase s'exprime aussitôt par un dégagement gazeux (O<sub>2</sub>) aisément discernable.
- ❖ **La recherche de la  $\beta$ -galactosidase :** le test consiste à ajouter un disque d'ONPG dans une suspension bactérienne dense, incubée à 37°C pendant 30min. La présence de la  $\beta$ -galactosidase se révèle par le virage de la couleur au jaune pour les cultures lactose négatif.

### 7. Analyses statistiques

Les résultats de la cinétique de biodégradation du 2,5-diméthylphénol ont été soumis à une analyse d'ANOVA à deux facteurs pour vérifier l'effet inoculum et dose ainsi que leur interaction par l'utilisation du logiciel STATISTICA/version 5 (1997).

La comparaison entre les deux processus de dégradation, biotique et abiotique, est effectuée par le test de Student.

# *Résultats et discussion*

**Tableau 4.** Propriétés physico-chimiques des effluents prélevés de la STEP

<b>Propriétés Physico-chimiques</b>	<b>Effluent d'entrée</b>	<b>Effluent de sortie</b>
<b>Température</b>	19,5°C	19,3°C
<b>Débit</b>	572 l/s	224 l/s
<b>Conductivité</b>	1770 µs/cm	1714 µs/cm
<b>pH</b>	7,94	7,59
<b>MES</b>	168 mg/l	6 mg/l
<b>DCO</b>	320 mg/l	22 mg/l
<b>DBO<sub>5</sub></b>	121 mg/l	10 mg/l

### 1. Qualité des effluents prélevés

L'analyse initiale des échantillons bruts montre que la charge polluante biodégradable ou non de chacun des deux inoculum est quantifiée par la détermination de sa DCO et de sa DBO<sub>5</sub> (Tableau 4, ci-contre). La différence entre la DCO et la DBO vient de la nature spécifique des substances présentes dans l'eau, certaines étant biodégradables et d'autres non [19]. Le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> donne une première estimation à la fois de la biodégradabilité de la matière organique des effluents et de leur teneur en substances non biodégradables. Pour les deux effluents, ce ratio est compris entre 2 et 3. Cela signifie qu'ils sont partiellement biodégradables [96].

L'analyse quantitative des phénols intrinsèques contenus dans les deux effluents montre que leur concentration initiale est de 1,67 mg/l pour l'effluent d'entrée et 0,78 mg/l pour l'effluent de sortie. La technique spectrale utilisée ne permet pas de séparer les différents types de phénols mais seulement de mesurer la concentration du mélange car la plupart des complexes phénoliques absorbent à la même longueur d'onde que celle du 2,5-diméthylphénol (700 nm). Ces résultats montrent donc que les eaux usées, avant et après traitement, contiennent des phénols dont probablement des diméthylphénols d'origine domestiques, ces deux valeurs restent supérieures aux normes admises (0,5 mg/l) [20]. La concentration des composés phénoliques intrinsèques de l'effluent de sortie est inférieure à celle de l'effluent d'entrée, ce qui montre, l'effet du traitement appliqué par la STEP.

Les deux inocula sont utilisés tels que prélevés et donc sans acclimatation. Par ailleurs, la plupart des travaux de biodégradation étudient la dégradation des diméthylphénols par des microorganismes sélectionnés par la méthode d'enrichissement [97]. Cette méthode, généralement longue, est plutôt destinée à l'isolement des souches microbiennes dominantes, présumées d'intérêt pour la dépollution. Dans ces études, la biodégradation analysée ne reflète pas donc celle du milieu naturel pris globalement.

### 2. Dénombrement des protozoaires

Différentes formes de protozoaires sont observées dans l'effluent d'entrée, elles ne peuvent être dénombrées et présentent une ciliature (Annexe 1). Par contre, dans l'effluent de sortie aucun protozoaire n'est observé. La même situation est constatée par d'autres auteurs

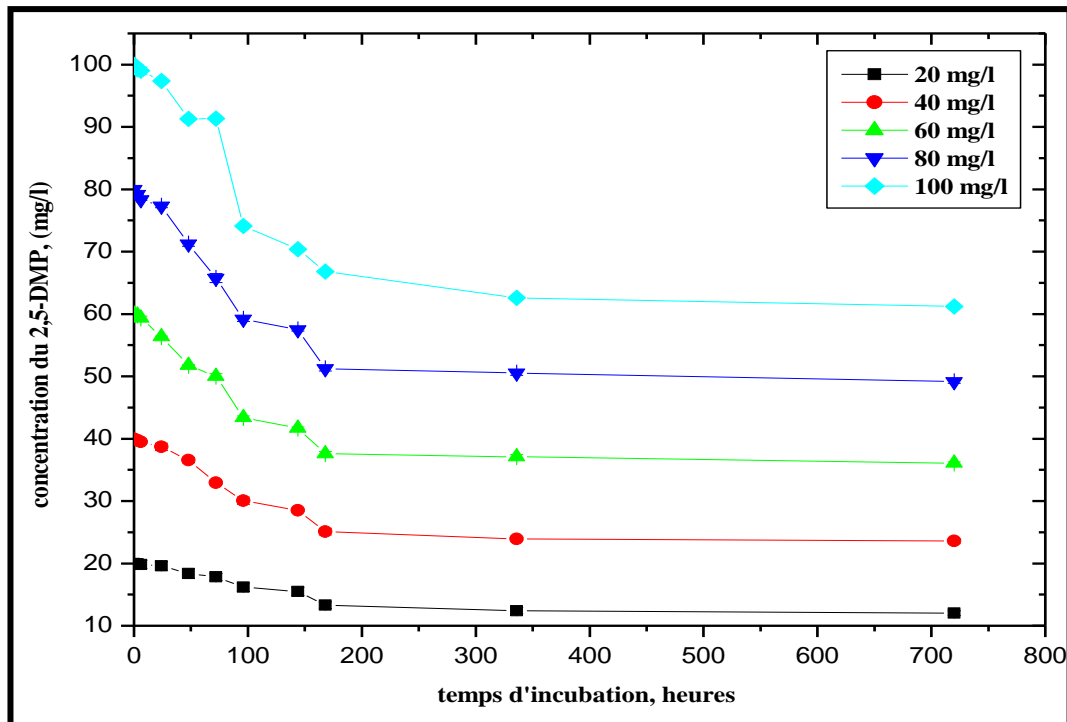


Figure 6. Cinétique de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par le microbiote de l'effluent d'entrée

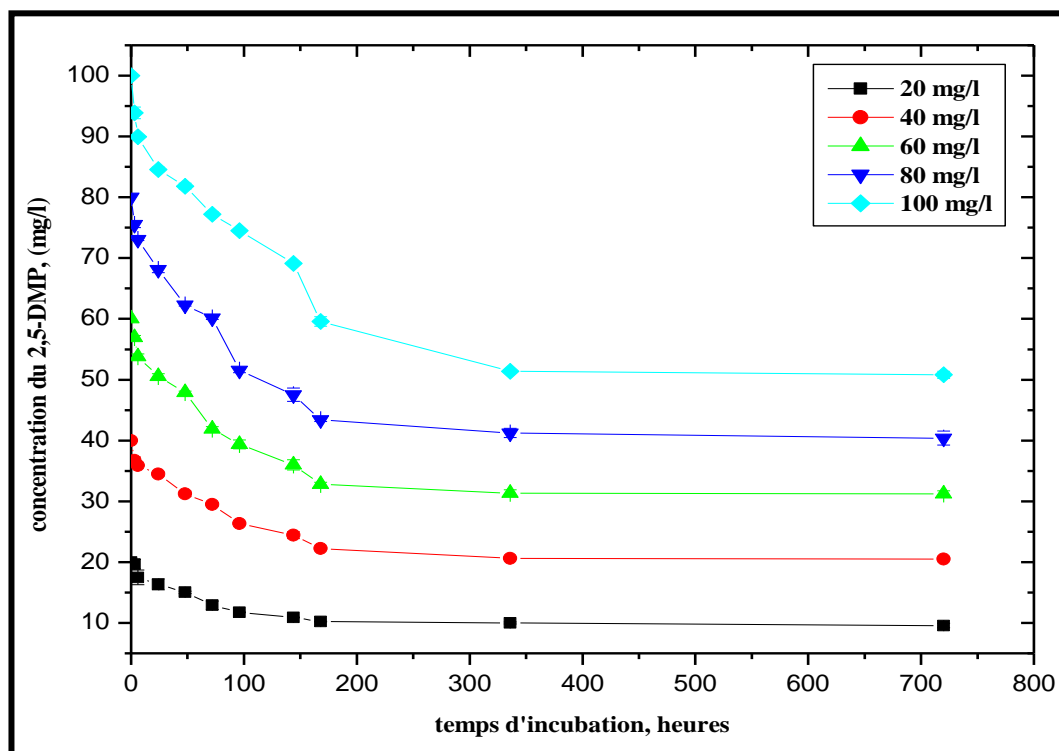


Figure 7. Cinétique de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par le microbiote de l'effluent de sortie

qui notent aussi que le groupe dominant dans leurs stations de traitement des eaux usées appartient à la famille des ciliées [11, 98, 99]. Cependant, la recherche de formes non végétatives, kystes et œufs, est positive dans les effluents d'entrée comme dans les effluents de sortie de leurs stations d'épuration, cette situation est liée aux conditions spécifiques du milieu [99].

### 3. Cinétiques de biodégradation du 2,5-diméthylphénol :

La biodégradation cinétique du 2,5-diméthylphénol par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration, aux différentes concentrations étudiées : 20 mg/l - 100 mg/l avec un intervalle de 20 mg/l, commence déjà à  $t = 3$  heures (Figures 6 et 7, ci-contre). Selon la littérature scientifique, la biodégradation des diméthylphénols engendre souvent une phase de latence plus au moins importante qui correspond au temps nécessaire pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat, sa durée est variable en fonction de l'espèce bactérienne et des conditions plus au moins favorables du milieu.

Par ailleurs, l'enzyme qui intervient dans la première étape de la biodégradation des diméthylphénols est la phénol hydroxylase, une enzyme intracellulaire d'une spécificité élargie qui peut, de ce fait, être induite par d'autres composés apparentés au phénol [83].

Le 2,5-DMP, dérivé méthyle du phénol, est un xénobiotique polluant toxique à faible teneur. Or les composés phénoliques naturellement produits existent depuis des temps immémoriaux dans les milieux naturels [57]. Certains travaux ont montré que le 2,5-DMP est naturellement présent dans l'environnement [70, 71, 72]. A ceci s'ajoute l'effet anthropique de l'homme par l'application de nombreux produits phytosanitaires, dont les insecticides utilisés dans l'industrie de préservation du bois et autres. Situation constatée par la présence intrinsèque des composés phénoliques dans nos échantillons bruts. Donc les cellules microbiennes de nos inocula pourraient avoir les enzymes nécessaires pour la dégradation, préalablement induites, ce qui leur a permis de commencer aussi rapidement l'assimilation et la métabolisation du 2,5-DMP. Des essais analogues menés avec des cultures bactériennes pures engendrent d'autres situations, telle une phase de latence de 23 jours avant le début de la dégradation du 2,5-DMP par une culture pure de *Pseudomonas putida* EKII [100]. De même qu'une culture bactérienne mixte adaptée sur un mélange de composés phénoliques est en mesure de minéraliser la molécule en 7 jours après une phase de latence de 100 h [66].



**Tableau 5.** Pourcentage de biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote de l'effluent d'entrée

Tps [C]	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h	144h	168h	336h	720h
[C]=20	0	1,65	12,65	18,35	24,8	35,55	41,35	45,5	48,95	50,05	52,20
[C]=40	0	8,25	10,25	13,8	21,95	26,27	34,22	38,92	44,4	48,42	48,77
[C]=60	0	5,1	10,39	15,74	20,19	30,15	34,4	40,04	45,34	47,8	47,94
[C]=80	0	5,62	8,68	14,83	22,16	24,8	35,56	40,61	45,77	48,46	49,51
[C]=100	0	6,11	10,08	15,42	18,18	22,79	25,49	30,86	40,45	48,62	49,19

**Tableau 6.** Pourcentage de biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote de l'effluent de sortie

Tps [C]	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h	144h	168h	336h	720h
[C]=20	0	0,4	0,9	2,1	8,2	10,9	19,05	22,45	33,55	37,85	39,95
[C]=40	0	0,62	1,27	3,25	8,6	17,72	24,82	28,67	37,22	40,15	41,05
[C]=60	0	0,29	1,15	6,12	13,7	16,65	27,69	30,54	37,42	38,14	39,87
[C]=80	0	1,01	2,07	3,37	10,97	17,8	26,02	28,18	35,93	36,85	38,55
[C]=100	0	0,75	0,99	2,61	8,7	18,64	25,91	29,61	33,17	37,41	38,77

**Tableau 7.** Pourcentage de dégradation du 2,5-DMP dans le témoin stérile

Tps [C]	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h	144h	168h	336h	720h
[C]=20	0	5,05	7,9	9,75	15,95	18,25	19,7	20,95	23,5	27,45	30,1
[C]=40	0	4,85	7,78	9,25	16,42	19,97	20,82	21,17	24,4	27,75	30,42
[C]=60	0	3,22	6,07	7,14	13,32	16,17	18,69	19,57	22,05	25,87	28,77
[C]=80	0	3,11	6,05	7,97	14,46	14,41	18,38	19,6	23,52	27,46	30,12
[C]=100	0	4,76	7,17	9,06	15,32	17,92	19,41	20,64	23,36	27,09	29,84

Selon ce même auteur, l'augmentation des concentrations du 2,5-DMP dans le milieu prolongent la phase de latence.

La situation inverse est notée dans notre étude par l'absence de la phase de latence malgré l'utilisation du 2,5-DMP à des concentrations encore plus élevées, ce qui laisse supposer que le microbiote de nos deux effluents est constitué d'une population microbienne spécifiquement plus active ou que les populations microbiennes concernées sont mieux et plus rapidement adaptés à la présence de ce composé. Cette situation pourrait bien résulter d'une présence pérenne du 2,5-DMP dans le milieu et probablement d'interrelations synergiques entre les espèces microbiennes co-cultivées.

Les résultats des tableaux 5 et 6 (ci-contre) montrent deux aspects majeurs de l'action de biodégradation des microbiotes des effluents d'entrée et de sortie. D'une part, le microbiote d'entrée est plus actif ( $p < 0,05$ ) (Annexe 3) et d'autre part, et pour les deux microbiotes, la concentration du milieu en 2,5-DMP n'a pas d'effet notable sur sa biodégradation ( $p > 0,05$ ) (Annexe 3).

En ce qui concerne la biodégradation du substrat, à la fin de la période d'incubation d'un mois 47 à 52% de la concentration initiale du 2,5-DMP sont dégradés par le microbiote de l'effluent d'entrée, et ce pour l'ensemble des concentrations introduites. 90,83% de cette biodégradation s'effectue durant les 7 premiers jours. Cette première semaine de dégradation semble correspondre à la phase exponentielle de la croissance microbienne où les microorganismes se multiplient intensément aux dépens du substrat. La situation est corroborée par la présence de troubles microbiens intenses dans tous les fermenteurs où ils apparaissent dès 24h d'incubation. Au-delà et jusqu'à la fin de l'incubation, une dégradation nettement moins importante est enregistrée et ne dépasse pas les 4,54%.

Par contre et pour l'effluent de sortie, le taux de la biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote s'avère relativement plus faible. Seulement 38 à 41% de la concentration initiale de ce substrat sont dégradés à la fin du mois de mesure, de manière uniforme pour l'ensemble des concentrations testées. Cependant, le profil cinétique de biodégradation observé dans ce cas est le même, puisque là aussi 89,45% de la totalité de la biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote de l'effluent de sortie se réalise au cours des 7 premiers jours d'incubation. Après et jusqu'à la fin du mois de mesure, la biodégradation suit une cinétique lente, où

seulement 4,18% de la molécule sont dégradés. Malgré ces taux appréciable de biodégradation du 2,5-DMP, il apparaît qu'environ la moitié du substrat persiste en l'état.

Les diméthylphénols en forte concentrations inhibent toujours la croissance cellulaire, en agissant directement sur les oxygénases des microorganismes [66]. Dans notre étude, le taux de la dégradation constaté dès la première semaine indique que la croissance microbienne n'est pas inhibée, pour les deux effluents et malgré l'utilisation de concentrations plus élevées que celles d'autres auteurs [66, 84, 85, 101, 102]. Cette situation dénote une grande efficacité du microbiote des deux effluents et surtout de leur résistance spécifique.

Le ralentissement de la dégradation, constaté après le 7<sup>ème</sup> jour dans les deux cas, peut être expliqué probablement par l'effet toxique des dérivés de dégradation produits au fur et à mesure de la métabolisation du substrat, la nature de ces dérivés reste à confirmer par HPLC. En effet, des travaux ont montré que les produits de dégradation des molécules xénobiotiques peuvent être plus toxiques que la molécule initiale [58, 103].

Par ailleurs, les conditions spécifiques de culture, dans notre étude et celles des autres auteurs, expliquent probablement la diversité des résultats exposés. Compte tenu de nos paramètres de travail, l'oxygène semble le principal facteur limitant pour la biodégradation, puisque le pH du milieu reste relativement constant (Annexe 4), de même que la température. Outre l'accumulation des dérivés toxiques, l'épuisement de l'oxygène du milieu pourrait donc bien être responsable du ralentissement considérable de la dégradation aérobie du 2,5-DMP par le microbiote des deux effluents.

Selon plusieurs auteurs, une quantité élevée de biomasse peut éliminer des concentrations importantes [104]. La minéralisation est une biodégradation complète des molécules organiques en composés inorganiques (eau, dioxyde de carbone, ions minéraux) [44]. Cependant, aucune production de gaz n'est observée dans nos fermenteurs, ce qui montre que le substrat n'est donc pas minéralisé.

Notre travail démontre que le 2,5-DMP est toléré par les microbiotes des deux effluents, tous deux aptes à le dégrader comme le montre clairement son profil de métabolisation durant les 7 premiers jours. Sa persistance dans le milieu, au-delà, résulte probablement de la toxicité de ses dérivés métaboliques vis-à-vis des microorganismes de sa dégradation. Le reliquat de 2,5-

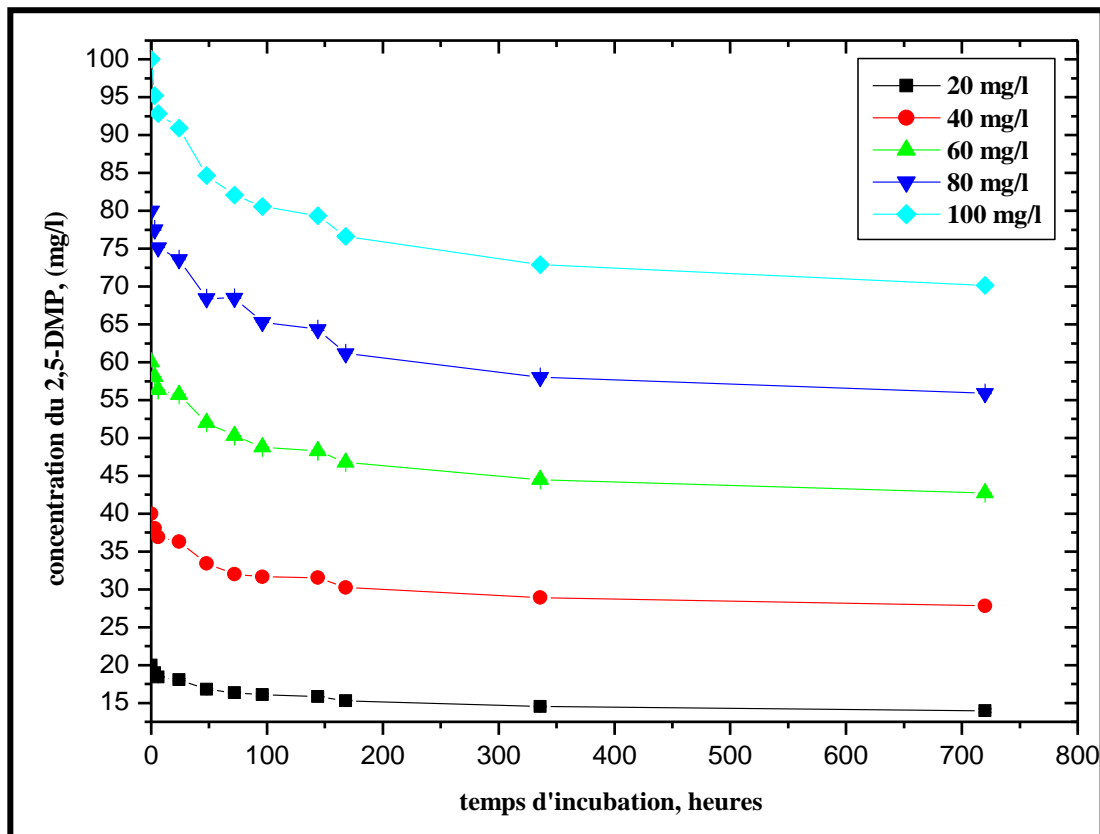


Figure 8. Cinétique de dégradation du 2,5-diméthylphénol dans le témoin stérile

DMP reste appréciable, à la fin de la cinétique de la biodégradation, il est de 50,47% et 60,36% dans les milieux inoculés par le microbiote d'entrée et de sortie respectivement.

Les témoins sans inoculation montrent une perte abiotique importante (Figure 8, ci-contre). En moyenne, 29,85% du 2,5-DMP disparaissent à la fin du mois d'incubation. La perte abiotique est notée dès le premier intervalle de mesure et suit un profil continu jusqu'à la fin du mois. Dans les eaux de surface, le 2,5-DMP peut disparaître par évaporation ou photo-décomposition [60]. Ces processus pourraient bien expliquer la diminution du 2,5-DMP dans le témoin stérile. Mais dans nos conditions expérimentales, l'incubation des fermenteurs est effectuée dans l'obscurité, l'effet de lumière est par conséquent éliminé. L'évaporation est certainement impliquée mais pas de manière prépondérante car le milieu est fermé et son volume d'air est limité. Le taux de dégradation abiotique relativement élevé du 2,5-DMP ne peut donc résulter de sa photo-décomposition ou de son évaporation, il serait plutôt dû à d'autres processus physico-chimiques qui restent à déterminer. Notons, cependant, que l'hydrolyse du 2,5-DMP n'est pas un processus abiotique à retenir vu que le peu de groupes fonctionnels hydroxyles le rend par nature faiblement hydrolysable dans l'eau [81].

La différence entre les deux processus de dégradation, biotique et abiotique, est très significative ( $p < 0,05$ ) (Annexe 3). Il est donc clairement établi que la diminution de la concentration du 2,5-DMP est causée principalement par l'activité biologique des microorganismes du milieu.

### 4. Identification des microorganismes dominants responsables de la biodégradation

#### 4.1. Tests préliminaires

La recherche de groupements microbiens, dominants impliqués dans le phénomène de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol, donne 05 colonies bactériennes d'aspects macroscopiques différents. Tous ces isolats sont capables de se développer sur le milieu minimum solide contenant le 2,5-DMP comme seule source de carbone et d'énergie. Ces souches ont donc la capacité de dégrader le 2,5-DMP. Les souches A et B produisent une pigmentation verte, diffusant dans toute la boîte de Pétri. De plus, une odeur caractéristique de la fleur de seringa s'exhale de ses cultures. Ces observations ont fortement orienté le diagnostic et l'identification vers le groupe fluorescent des *Pseudomonas*. Les deux souches pigmentées poussent bien sur le milieu Cétrimide et Mac Conkey [105], ce qui renforce notre hypothèse. Contrairement aux deux souches précédentes, le pigment jaune produit par la souche E est non diffusible. Cette pigmentation est caractéristique de certains genres de la famille des *Micrococcaceae*, l'isolement sur milieu Chapman accrédite ce constat.

##### 4.1.1. Coloration de Gram

L'observation au microscope après la coloration de Gram révèle que 02 souches bactériennes apparaissent sous forme de cocci à Gram négatif (souches : C et D), 01 souche (souche E) a aussi une forme de cocci mais elle est à Gram positif, alors que 02 souches (souches : A et B) sont des bacilles à Gram négatif.

##### 4.1.2. Mobilité

L'ensemencement des souches bactériennes sur le milieu mannitol-mobilité montre que toutes les souches sont mobiles, à l'exception de la souche E.

##### 4.1.3. Type respiratoire

Les souches purifiées ne poussent qu'en surface des tubes VF, elles sont de ce fait toutes aérobies.

### 4.1.4. Cultures sur King A et King B

Les souches A et B présentent une réaction positive avec le King B mais pas avec le King A. Elles produisent donc la pyoverdine mais pas la pyocyanine. La sécrétion de la pyocyanine et de la pyoverdine est caractéristique du groupe fluorescent des *Pseudomonas*. Les souches typiques de *Pseudomonas aeruginosa* secrètent les deux pigments, pyocyanine et pyoverdine. L'observation de la pyocyanine identifie même l'espèce car c'est la seule à produire ce pigment. Cependant *Pseudomonas aeruginosa* peut perdre par mutation la capacité de synthèse de l'un ou l'autre des pigments. Les espèces de *Pseudomonas* produisant la pyoverdine sont essentiellement *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* [92].

### 4.2. Caractères biochimiques et physiologiques des souches bactériennes isolées

Les faibles moyens d'investigation mis à notre disposition ne nous ont permis d'identifier uniquement le genre des souches bactériennes isolées. Les tableaux des résultats sont joints en annexe 5.

#### Souches A et B

Après l'addition des réactifs nitrite 1 et nitrite 2, on note l'absence d'une coloration rouge. Ceci signe l'absence des nitrites dans le milieu. Néanmoins, ce résultat ne signifie pas que les souches ne possèdent pas une nitrate réductase. En effet, l'ajout de la poudre de zinc, capable de réduire les nitrates du milieu, ne montre aucune coloration. Cette observation signifie que les deux souches possèdent une nitrate réductase très active, capable de réduire les nitrates du milieu au-delà des nitrites, jusqu'au stade diazote qui est bien mis en évidence par la formation des microbulles. Les deux souches ne produisent pas d'indole. Elles oxydent le glucose, le citrate et pas le mannitol. Une réponse positive est obtenue pour le test de la catalase et de l'arginine dihydrolase. Par contre, une réaction négative est obtenue pour les tests de l'uréase, la tryptophane désaminase et la  $\beta$ -galactosidase.

#### Souches C et D

Le test au  $\text{NO}_3$  montre que les deux souches réduisent le nitrate en nitrite. Elles ne produisent pas l'indole et ne fermentent pas le glucose. Elles assimilent le mannitol et le citrate. Elles possèdent une catalase mais pas une uréase, une tryptophane désaminase, une  $\beta$ -galactosidase et une arginine dihydrolase.

### Souche E

La souche E ne possède pas de nitrate réductase, comme le prouve la coloration rouge après l'addition de la poudre de zinc. Elle ne produit pas d'indole et ne fermente pas le glucose. Elle assimile le citrate et pas le mannitol. Elle possède une catalase mais pas une uréase, une tryptophane désaminase, une  $\beta$ -galactosidase et une arginine dihydrolase.

En se basant sur les schémas dichotomiques [94, 95] et en comparant les caractères étudiés avec ceux des genres bactériens publiés dans la 9<sup>ème</sup> édition du « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology » [106] on peut assimiler les bacilles à Gram négatif (souches A et B) au genre: *Pseudomonas* (Annexe 6), les coques à Gram négatif (souches C et D) au genre: *Alcaligenes* (Annexe 6) et les coques à Gram positif (souche E) au genre: *Micrococcus* (Annexe 6).

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que la biodégradation du 2,5-DMP est probablement due en majeure partie à l'action de ces populations bactériennes, dont trois populations bactériennes de morphologie différente au niveau de l'effluent d'entrée et deux populations bactériennes au niveau de l'effluent de sortie.

La toxicité du 2,5-DMP est responsable, dans tous les types de milieux, de l'élimination d'une part importante de leur microbiote [66], elle est certainement impliquée dans l'élimination d'une partie, probablement significative, de la population microbiennes des deux microbiotes. Mais ces trois genres bactériens ont résisté à la toxicité du 2,5-DMP présent en forte concentration dans le milieu. C'est une situation usuellement rapportée par de nombreux auteurs qui indiquent les trois genres identifiés capables d'utiliser les diméthylphénols comme seule source de carbone et d'énergie [57, 82, 84, 85, 87, 100, 101, 107, 108].

Nos souches bactériennes prouvent leur capacité à dégrader le 2,5-DMP. En effet, elles gardent leur intégrité cellulaire et dégradent le 2,5-DMP au profit de leur croissance tout au long de la période d'incubation.

Les espèces du genre *Pseudomonas* ont un potentiel de dégradation des phénols très élevé et sont considérées, par cet aspect, comme les espèces bactériennes les plus efficaces de la bioremédiation des phénols des eaux usées [109]. Grâce à leur aptitude à les dégrader, même lorsqu'ils se présentent dans le milieu à de très fortes concentrations. Ainsi, il est démontré que *Pseudomonas putida* assimile 85% d'une concentration de phénols de 500 mg/l, en



conditions contrôlées [110]. *Pseudomonas putida* est capable de dégrader 1000 mg/l de phénols en 260 heures [111]. De même que *Pseudomonas aeruginosa*, isolée à partir des eaux usées d'industries pharmaceutiques, dégrade les phénols à une concentration initiale de 2600 mg/l en 150 heures. Par ailleurs, *Pseudomonas pseudomallei* dégrade 1500 mg/l de phénols durant la même période. Ces deux espèces décomposent les phénols même en présence de très fortes concentrations salines [109]. Des études récentes montrent que la mixture des cultures bactériennes, avec la prédominance de *Pseudomonas putida*, dégradent complètement les phénols à une concentration initiale de 600 mg/l durant 26 heures [112].

*Pseudomonas aeruginosa* est connue par la variabilité et les capacités de son métabolisme [113]. Elle est capable de dégrader une large variété de polluants dont divers diméthylphénols [114, 115]. Elle pourrait donc être un outil très important de bioremédiation. Néanmoins, l'espèce est aussi connue par son caractère pathogène. De ce fait, la souche est un pathogène opportuniste [116, 117], à la fois pour les espèces hospitalières et d'environnement. Contrairement à *Pseudomonas aeruginosa*, le génome de *P. putida* manque des gènes codant pour les enzymes qui digèrent la membrane cellulaire, elle peut être de ce fait préférée dans les traitements de biodégradation [110, 111]. De plus, la capacité de l'espèce à former des biofilms et à s'agréger lui donne une importance dans le domaine de la bioremédiation, particulièrement dans le processus des boues activées où sa floculation lui permet de rester dans les boues plus de temps, la protégeant ainsi de la prédation.

Peu d'études sont menées sur la biodégradation des phénols et des diméthylphénols, par les espèces du genre *Alcaligenes* et *Micrococcus* [55, 81, 89, 90, 106], *Alcaligenes faecalis* et *A. eutrophus* étant les espèces majoritairement isolées et identifiées.

La biodégradation des diméthylphénols ne se limite pas à ces trois genres bactériens. Des bactéries du genre *Bacillus* et *Acinetobacter*, et probablement d'autres groupements bactériens, jouent aussi un rôle important dans l'élimination des phénols des milieux naturels [85].

# *Discussion générale et conclusion*

Les diméthylphénols sont utilisés en agriculture, en industrie et en santé publique depuis les années 1920. Leur toxicité a engendré leur classification par l'EPA dans la liste des polluants majeurs. L'utilisation des diméthylphénols est limitée, voire arrêtée dans plusieurs pays. Cependant, la contamination des milieux naturels par les diméthylphénols reste un sérieux problème dans les pays où les produits de préservation du bois et les produits phytosanitaires à base de ces composés restent d'usage courant.

Le but principal de ce travail est l'évaluation de la biodégradation cinétique du 2,5-diméthylphénol à différentes concentrations par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'IBN ZIAD. L'isolement et l'identification des souches microbiennes dominantes impliquées dans sa dégradation sont également engagés.

Les résultats de la cinétique de la biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration montrent que la dégradation de cet isomère commence très tôt, dès  $t = 3h$  et ceci pour toutes les concentrations étudiées. De plus, le dosage quantitatif des composés phénoliques intrinsèques montre une concentration de 1,67 mg/l pour l'effluent d'entrée et 0,78 mg/l pour l'effluent de sortie. Ce qui explique probablement la dégradation sans phase de latence pour les deux microbiotes considérés, déjà au contact et certainement adaptés au xénobiotique étudié ou au moins à sa famille chimique. Les microorganismes ayant alors les enzymes nécessaires à la dégradation, préalablement induites et grâce auxquelles la dégradation du 2,5-DMP a pu commencer aussi rapidement.

En ce qui concerne la biodégradation du 2,5-DMP et à la fin de la période d'incubation d'un mois, 47 à 52% de la concentration initiale sont dégradés par le microbiote de l'effluent d'entrée et ce pour l'ensemble des concentrations testées. Par contre et pour l'effluent de sortie, le taux de la biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote s'avère relativement plus faible. Seulement 38 à 41% de la concentration initiale du substrat sont dégradés à la fin du mois de mesure, de manière également uniforme pour l'ensemble des concentrations étudiées. Cela signifie que le microbiote de l'effluent d'entrée est plus actif que le microbiote de l'effluent de sortie ( $p < 0,05$ ), alors que la concentration des milieux en 2,5-DMP n'a pas d'effet notable sur sa biodégradation ( $p > 0,05$ ).

Malgré l'utilisation de concentrations élevées du 2,5-DMP, la croissance microbienne n'est pas inhibée. Cette observation est clairement confirmée par les taux de la biodégradation constatés pendant la première semaine, ils indiquent l'efficacité des deux microbiotes à dégrader ce composé. Un ralentissement de la biodégradation est constaté après le 7<sup>ème</sup> jour

d'incubation. Ce ralentissement n'est pas du à la mort des microorganismes car leur viabilité n'est pas en cause, puisqu'une culture peut être reprise à partir des échantillons même après 30 jours d'incubation. Ce résultat pourrait résulter de l'augmentation de la toxicité due à l'accumulation de produits intermédiaires. Par ailleurs, la nature de nos cultures, menées en système batch, suggère aussi comme cause majeure de ce ralentissement, l'épuisement de l'oxygène qui est le facteur limitant principal du milieu de culture.

Le 2,5-DMP subit en parallèle une diminution par voie abiotique, constatée au niveau du témoin stérile, elle est estimée à 30%. Usuellement, ce phénomène est relié à la photo-décomposition et à l'évaporation naturelles de substances chimio-oxydables présentes dans les eaux de surface. Mais dans le cas du 2,5-DMP et dans le cadre de nos conditions d'étude, ces deux phénomènes ne jouent pas un rôle prépondérant dans son élimination abiotique qui résulte probablement d'autres processus, forcément abiotiques qui restent à déterminer.

Aussi bien en condition biotiques qu'abiotiques, le 2,5-DMP n'est pas minéralisé car aucune production de gaz n'est enregistrée dans nos fermenteurs, durant toute la période d'incubation. Sa dégradation signifie donc probablement sa biotransformation en sous produits dérivés. Il reste à déterminer la nature de ces dérivés. Seule une analyse complète des produits terminaux à l'issue de la période d'incubation pourrait donner des réponses probantes sur les produits et les mécanismes de dégradation biotiques et abiotiques concernés.

L'identification des groupements microbiens impliqués dans la biodégradation du 2,5-DMP révèle la présence de 3 genres bactériens dominants au niveau de l'effluent d'entrée : *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. et *Micrococcus* sp. Seuls 2 de ces genres se retrouvent en dominance au niveau de l'effluent de sortie : *Pseudomonas* sp. et *Alcaligenes* sp. Les trois souches, testées en cultures pures, prouvent leur capacité à utiliser le 2,5-DMP comme élément nutritionnel. Cette efficacité à dégrader le 2,5-DMP pourrait s'expliquer par l'activité différente et complémentaire de ces souches dans le milieu où leur action est probablement associée à celle d'autres groupements microbiens non identifiés encore.

Ces résultats préliminaires indiquent l'implication de ses souches dans la biodégradation du 2,5-DMP et donc la possibilité de leur utilisation dans la protection de l'environnement. Ils permettent également d'envisager avec plus d'optimisme l'objectif d'une dégradation complète et rapide du 2,5-DMP où elles auraient un rôle significatif. De même qu'il ne faut pas écarter la possibilité que ces souches puissent adéquatement dégrader d'autres polluants organiques à rémanence élevée dans l'environnement.

En perspective, on peut prévoir l'étude de plusieurs aspects complémentaires à nos résultats :

- ❖ Il est indispensable d'identifier les métabolites intermédiaires et terminaux issus de la biotransformation (dégradation) du 2,5-DMP ;
- ❖ Il serait intéressant d'effectuer l'étude dans un système de culture permettant un approvisionnement continu du milieu en oxygène, pour lever la contrainte du système batch ;
- ❖ Il serait également intéressant d'effectuer une identification génomique des souches isolées jusqu'au rang de l'espèce et d'étudier l'évolution de l'équilibre de leurs populations respectives ;
- ❖ De même qu'il serait intéressant d'établir si les espèces les plus citées en ce domaine de par le monde sont présentes ou non au niveau des microbiotes locaux étudiés.

*Références  
bibliographiques*

1. **Callahan M.A., Slimak M., Gebel N., May I., Flower C., Freed R. et al.**, 1982. Water Related Environmental Fate of 129 Priority Pollutants. E.P.A, a,b, NTIS. 29-79- 4401.
2. **Goerlits D.F., Trouman D.E., Godsy E.M., Franks B.J.**, 1985. Migration of wood-preserving chemicals in contaminated ground water in a sand aquifer at Pensacola Florida. *Environmental Science and Technology*. 10 : 955-961.
3. **Ramade F.**, 2000. Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Ediscience international (Ed.). Paris. 89 p.
4. **Baumont S., Camard J.P., Lefranc A., Franconi A.**, 2004. Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France. Rapport ORS. France. 220 p.
5. [http://gue.univ-reunion.fr/ressources/GUE/Cours%20M2/UE4B/EAUX\\_USEES.pdf](http://gue.univ-reunion.fr/ressources/GUE/Cours%20M2/UE4B/EAUX_USEES.pdf) .
6. **Salghi R.**, 2005. Différents filières de traitement des eaux. Université Ibn Zohr. Maroc. 22 p.
7. **Anonyme.**, 2007. Le traitement des eaux usées municipales dans le bassin des grands lacs : l'ancien et le nouveau. Accord Canada-Ontario concernant l'écosystème du bassin des grands lacs. 4 p.
8. **Belaid N.**, 2010. Evaluation des impacts de l'irrigation par les eaux usées traitées sur les plantes et les sols du périmètre irrigué d'El Hajeb-Sfax: salinisation, accumulation et phytoabsorption des éléments métalliques. Thèse de Doctorat en chimie et microbiologie de l'eau. Université de Sfax. Tunisie. 188 p.
9. **Direction de l'environnement.**, 1990. Les stations d'épuration d'effluents domestiques. Ministère de l'intérieur. 24 p.
10. **Faby J.A., Brissaud F.**, 1997. L'utilisation des eaux usées épurées en irrigation. Office International de l'Eau. 76 p.

11. **Papadimitriou C.A., Papatheodoulou A., Takavakoglou V., Zdragas A., Samaras P., Sakellaropoulos G.P. et al .**, 2010. Investigation of protozoa as indicators of wastewater treatment efficiency in constructed wetlands. *Desalination*. 250 : 378–382.
12. **Toze S.**, 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewaters. *Water Resources*. 33 : 3545–3556.
13. **Campos C.**, 2008. New perspectives on microbiological water control for wastewater reuse. *Desalination*. 218 : 34–42.
14. **Gennaccaro A.L., McLaughlin M.R., Quintero-Betancourt W., Huffman D.E., Rose J.B.**, 2003. Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 : 4983–4984.
15. **Toze S.**, 2006. Reuse of effluent water-benefits and risks. *Agricultural Water Management*. 80 : 147–159.
16. **Metiche M.**, 2004. Environnement : Phénomènes de Pollution et Techniques de Protection. Centre Universitaire de Béchar. Algérie. 48 p.
17. **Gaujous D.**, 1995. La pollution des milieux aquatiques : aide-mémoire. Technique et documentation Lavoisier (Ed.). Paris. France. 220 p.
18. **Bousseboua H.**, 2005. Eléments de microbiologie. Campus-Club (2<sup>e</sup>Ed.). Constantine. Algérie. 304 p.
19. **Bliefert C., Perraud R.**, 2001. Chimie de l'environnement AIR, EAU, SOLS, DECHETS. De Boeck université (Ed.). Bruxelles. Belgique. 477 p.
20. **Ghadbane N.**, 2003. Les eaux usées urbaines Cas d'étude : ville de M'sila. Mémoire de Magister en gestion écologique de l'environnement urbain. Université Mohamed Boudiaf -M'sila. Algérie. 146 p.



21. [http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/decouv/degradation/03\\_différentes\\_gdes.htm](http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/decouv/degradation/03_différentes_gdes.htm).
22. <http://www.eaupropre36.org/>.
23. **Barraqué B., Beysens D., Billen G., Biscans B., Buzdinski H., Cabane B. et al.**, 2009. L'eau dont l'humain use et abuse. Institut Écologie et environnement. CNRS. Paris. France. 44 p.
24. **Besse M., Torre H.**, 2003. Note technique SDAGE n° 7 : Maîtrise des pollutions toxiques : stratégies de bassin et stratégies locales. Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse (Ed.). Lyon. France. 44 p.
25. **Boucheseiche C., Cremille E., Pelte T. et al.**, 2002. Guide technique SDAGE n° 7 : Pollution toxique et écotoxicologique : notions de base. Agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse (Ed.). Lyon. France. 82 p.
26. **Chu W., Kwan C.Y., Chan K. H., Kam S. R.**, 2005. Kinetics modeling and reaction pathway of 2,4-dichlorophenol transformation by photo-fenton-like oxydation. *Journal of Hazardous Materials*. 12 : 119-126.
27. **Tron I., Piquet O., Cohuet S.**, 2001. Effets chroniques des pesticides sur la sante : état actuel des connaissances. Rapport ORS. Bretagne. France. 88 p.
28. **Lajoie P.**, 2006. Polluants Vedettes : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Centre de santé publique de la région de Québec .Canada. 2p.
29. **Schantz S.L., Widholm J.J., Rice D.C.**, 2003. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. **Environmental Health Perspectives**. 111 : 357-576.
30. **Portigal C.L., Cowell S.P., Fedoruk M.N., Butler C.M., Rennie P.S., Nelson C.C.**, 2002. Polychlorinated biphenyls interfere with androgen-induced transcriptional activation and hormone binding. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 179 : 185-94.

- 31. Loch-Carusio R.,** 2002. Uterine muscle as a potential target of polychlorinated biphenyls during pregnancy. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 205 : 121-30.
- 32. Winneke G., Walkowiak J., Lilienthal H.,** 2002. PCB induced neurodevelopmental toxicity in human infants and its potential mediation by endocrine dysfunction. *Toxicology*. 181-182 : 161-165.
- 33. De S., Pramanik S.K., Williams A.L., Dutta S.K.,** 2004. Toxicity of Polychlorobiphenyls and its Bioremediation. *International Journal of Human Genetics*. 4 : 281-290.
- 34. Gachard S.,** 2009. Enjeux territorialisés. Fiche reflexe 7A. Composés organiques volatiles (COV). Alsace. France. 3 p.
- 35. Grange D., Host S., Gremy I.,** 2007. Les composés organiques volatils (COV). Etat des lieux : définition, sources d'émissions, exposition, effets sur la santé. Rapport ORS. Île-de-France. France. 127 p.
- 36. Botta A., Bellon L.,** 2004. Pollution chimique de l'eau et santé humaine. Coordination Euro-méditerranéenne de l'université de Tethys. 23 p.
- 37. Calvé S.,** 2004. Etude en laboratoire de la dégradation photochimique de polluants organiques persistants et mesures de leurs constantes de Henry. Rapport final. Université Lois Pasteur Strasbourg et CNRS. France. 25 p.
- 38. Conseil canadien des ministres de l'environnement.,** 1999. Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux : protection de la vie aquatique : phénols — phénols monohydriques et dihydriques, dans *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, Winnipeg, le Conseil. 5 p.
- 39. Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V.,** 2009. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*. 35 : 162–177.

- 40. Al Rajab A.J.,** 2007. Impact sur l'environnement d'un herbicide non sélectif, le glyphosate : Approche modélisée en conditions contrôlées et naturelles. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine. 148 p.
- 41. Gervaise Y.,** 2000. Nouveaux outils pour la prise en compte globale du lien environnement/santé au service de l'expertise, La revue Experts n° 48. Rouen. France. 11 p.
- 42. Schrack D., Coquil X., Ortar A., Benoît M.,** 2009. Rémanence des pesticides dans les eaux issues de parcelles agricoles récemment converties à l'agriculture biologique. *Innovations Agronomiques*. 4 : 259-268.
- 43. Vallet C.,** 2006. Modélisation du devenir des produits phytosanitaires dans le cadre d'un petit bassin versant agricole (domaine viticole du Hohrain à Rouffach). Mémoire d'Ingénieur. Ecole Nationale du Génie de l'Eau et de l'Environnement de Strasbourg. France. 96 p.
- 44. RECORD.,** 2008. Particules émises par les activités de traitement des déchets, de la caractérisation à l'impact sanitaire : État des connaissances. n°06-0666/1A. 152 p.
- 45. AFSSA.,** 2010. Résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine : Volet « Méthodologie générale d'évaluation de l'exposition de l'Homme aux résidus de médicaments via l'eau destinée à la consommation humaine ». 26 p.
- 46. Laperto M.,** 2006. A strategy for xenobiotic removal using photocatalytic treatment, microbial degradation or integrated photocatalytic-biological process. Thèse de doctorat en sciences. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne. Suisse. 181 p.
- 47. Levet D., Lehen A., Jacques S., Mouchelin J., Berly A.,** 2008. Guide pratique des Substances Toxiques dans les Eaux Douces et Littorales du bassin Seine-Normandie. Agence de l'Eau Seine-Normandie. Angers. France. 29 p.
- 48. Picahard A., Bisson M., Bureau J., Dujardin R., Lacroix G., Lefevre J.P. et al .,** 2005. 2,5-diméthylphénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Version N ° 3-1. INERIS. France. 35 p.

49. **Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L.**, 2003. Introduction à la microbiologie. ERPI (Ed.). Montréal. 945 p.
50. [http://www.cnidep.com/eaux\\_usees32.html](http://www.cnidep.com/eaux_usees32.html).
51. <http://ecoledeleau.eau-artois-picardie.fr/spip.php?rubrique65>.
52. **Hartani T.**, 1998. La réutilisation des eaux usées en irrigation. Situation actuelle et perspectives. Séminaire sur les ressources en eau non conventionnelles. Alger : KLI Conseil. 10 p.
53. **Medkour M.**, 2003. Réutilisation des eaux usées épurées. Séminaire sur le secteur de l'eau en Algérie. Ministère des Ressources en eau. Algérie. 12 p.
54. **Aussel H., Dornier G., Galtier Y.**, 2004. Le point des connaissances sur le traitement des eaux usées. INRS. Paris. France. 4 p.
55. <http://www.safewater.org>.
56. **Bloomberg M.R., Lloyd E.**, 2008. New York City's Wastewater Treatment System: Cleaning the water we use - Protecting the environment we live in. New York City Department of Environmental Protection. New York. USA. 32 p.
57. **Pelmont J.**, 2005. Biodégradations et Métabolismes : Les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences (Ed.). Grenoble. France. 792 p.
58. **Madigan M, Martinko J.**, 2007. Brock, Biologie des micro-organismes. Pearson (11<sup>e</sup>Ed.). France. 1088 p.
59. **Desjardins R.**, 1997. Le traitement des eaux. Ecole polytechnique de Montréal (2<sup>e</sup>Ed.). Canada. 303 p.
60. <http://toxnet.nlm.nih.gov>.
61. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/PhysicalProperties.jsp/>.
62. **Quesneville M.**, 1868. Le Moniteur Scientifique : Compte-rendu des Académies et Sociétés savantes et Revue des progrès accomplis dans les Sciences mathématiques, physiques et naturelles. 10<sup>ème</sup> tome. Journal des Sciences Pures et Appliquées. 1194 p.

- 63. Merck.**, 1996. The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Ralway, N.J., Merck and Co., Inc (12<sup>e</sup>Eds.). USA. 1723 p.
- 64. Merisol.**, 2009. Product Stewardship Summary : Xylenols. 5 p.
- 65. Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. et al.**, 2003. Microbiologie. De Boeck université (2<sup>e</sup> Ed.). Bruxelles. Belgique. 1164 p.
- 66. Acuña-Argüelles M.E., Olguin-Lora P., Razo-Flores E.**, 2003. Toxicity and kinetic parameters of the aerobic biodegradation of the phenol and alkylphenols by a mixed culture. *Biotechnology Letters*. 25 : 559–564.
- 67. Montgomery D.J H.**, 1991. Groundwater chemicals field guide. CRC Press, 48 p.
- 68. Berthelot M., Jungfleisch E.C.**, 1908. Traité élémentaire de chimie organique, Volume 1. Dunod H., Pinat E (Eds.). 2228 p.
- 69. Finar I.L, SC B., PH. D.**, 1967. Organic chemistry VOLUME ONE (1) : the fundamental principals/I. The English Language Book Society and Longman Group limited (Ed.). London.
- 70. Risner C.H., Cash S.L.**, 1990. A High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Major Phenolic Compounds in Tobacco Smoke. *Journal of Chromatographic Science*. 28 : 239-244.
- 71. Hashibe M., Straif K., Tashkin D.P., Morgenstern H., Greenland S., Zhang Z.F.**, 2005. Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. *Alcohol*. 35: 265–275.
- 72. Kaiser H. E.**, 1967. Cancer-promoting effects of phenols in tea. *Cancer*. 20 : 614-6.
- 73. Devillers J.**, 1988. Acute toxicity of cresols, xylenols, and trimethylphenols to *Daphnia magna* Straus 1820. *The Science of the Total Environment*. 76 :79-83.
- 74. Day B.J., Carlson G.P.**, 1992. Effect of p-xylene metabolites, p-methylbenzyl alcohol and 2,5-dimethylphenol, on rat hepatic and pulmonary microsomal metabolism. *Chemical Pathology and Pharmacology*. 76 : 117-120.

- 75. Yamano T., Ichihara M., Shimizu M., Noda T., Tsujimoto Y., 2007.** Immunomodulatory effects of mono-, di-, and trimethylphenols in mice. *Toxicology*. 232 : 132–137.
- 76. Lamson P.D., Brown H.W., 1935.** Anthelmintic studies on alkylhydroxybenzenes iii. 6-n-alkyl-meta-cresols. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 53 : 227-233.
- 77. Kawagoshi Y., Tsukagoshi Y., Fukunaga I., 2002.** Determination of estrogenic activity in landfill leachate by simplified yeast two-hybrid assay. *Journal of Environmental Monitoring*. 4 : 1040-6.
- 78. Leuenberger C., Ligocki M.P., Pankow J.F., 1985.** Trace organic compounds in rain. 4. Identities, concentrations, and scavenging mechanisms for phenols in urban air and rain. *Environmental Science and Technology*. 19 : 1053-8.
- 79. Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U. et al., 1994.** The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere*. 29 : 1501-14.
- 80. Atkinson R., 1994.** Gas Phase Tropospheric Chemistry of Organic Compounds: a review. *Journal of Physical and Chemical Reference Data: Monograph 2*. 1-216.
- 81. Mill T., 1982.** Hydrolysis and Oxidation Processes in the Environment. *Environmental and Toxicological Chemistry*. 1 : 135-41.
- 82. Hopper D.J., Chapman P.J., 1970.** Gentisic Acid and its 3- and 4-Methyl-Substituted Homologues as Intermediates in the Bacterial Degradation of m-Cresol, 3,5-Xylenol and 2,5-Xylenol. *Journal of Biochemistry*. 122 : 19-28.
- 83. Pieper D.H., Stadler-Fritzsche K., Knackmuss J., Timmis K.N., 1995.** Formation of Dimethylmuconolactones from Dimethylphenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 : 2159–2165.
- 84. Hopper D.J., Kemp P.D., 1980.** Regulation of enzymes of the 3,5-xylenol-degradative pathway in *Pseudomonas putida*: evidence for a plasmid. *Journal of Bacteriology*. 142 : 21-26.

- 85. Gao X., Tan C.L., Yeo C.C., Poh C.L., 2005.** Molecular and Biochemical Characterization of the *xlnD*-Encoded 3-Hydroxybenzoate 6-Hydroxylase Involved in the Degradation of 2,5-Xylenol via the Gentisate Pathway in *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867. *Journal of Bacteriology*. 187: 7696–7702.
- 86. Varma R.J., Gaikwad B.G., 2008.** Rapid and high biodegradation of phenols catalyzed by *Candida tropicalis* NCIM 3556 cells. *Enzyme and Microbial Technology*. 43 : 431–435.
- 87. Shokrollahzadeh S., Azizmohseni F., Golmohammad F., Shokouhi H., Khademhaghighat F., 2008.** Biodegradation potential and bacterial diversity of a petrochemical wastewater treatment plant in Iran. *Bioresource Technology*. 99 : 6127–6133.
- 88. Klekner V., Kosaric N., 1992.** Degradation of phenols by algae. *Environmental Technology*. 13 : 493 – 501.
- 89. Jiang Y., Wen J., Bai J., Jia X., Hu Z., 2007.** Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Hazardous Materials*. 147 : 672-676.
- 90. Bai J., Wen J.P., Li H.M., Jiang Y., 2006.** Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and *m*-cresol using *Alcaligenes faecalis*. *Process Biochemistry*. 42 : 510-517.
- 91. Yan J., Jianping W., Hongmei L., Suliang Y., Hu Z., 2005.** The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal*. 24 : 243–247.
- 92. Rodier J., Bazin C., Broutin J.P. et al., 2005.** L'analyse de l'eau. Dunod (8<sup>e</sup>Ed.). Paris. 1382 p.
- 93. Anonyme., 2003.** Flash Info Biodegradabilité et développement durable : Comment tester la biodégradabilité d'un produit?. News Internes Développement Technique Information Pratique N° 7.
- 94. Joffin J., Leyral G., 2002.** Microbiologie Technique. CNDP d'Aquitaine (2<sup>e</sup>Ed.). Bordeaux. 299 p.

- 95. Guiraud J.P.**, 1998. Microbiologie Alimentaire. Dunod (Ed.). Paris. France. 652 p.
- 96. Anonyme.**, 2006. La biodégradabilité des effluents urbains. Memotec n° 19.
- 97. Tomei M.C., Annesini M.C.**, 2008. Biodegradation of Phenolic Mixtures in a Sequencing Batch Reactor A kinetic study. *Environmental science and pollution Research*. 15 : 188 – 195.
- 98. Papadimitriou C.h., Palaska G., Lazaridou M., Samaras P., Sakellaropoulos G.P.**, 2007. The effects of toxic substances on the activated sludge microfauna. *Desalination*. 211 : 177–191.
- 99. Aloul Z., Achour H., Alouini A.**, 1992. Devenir de la charge parasitaire des eaux usées traitées dans le réseau d’irrigation “Cebala”. *CIHEAM-Options Méditerranéennes*. 117-124.
- 100. Hinteregger C., Leitner R., Loidl M., Ferschl A., Streichsbier F.**, 1992. Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 37 : 252–259.
- 101. Poh C.L., Bayly R.C.**, 1980. Evidence for Isofunctional Enzymes Used in m-Cresol and 2,5-Xylenol Degradation via the Gentisate Pathway in *Pseudomonas Alcaligenes*. *Journal of Bacteriology*. 143 : 59-69.
- 102. Ramakrishnan A., Gupta S.K.**, 2006. Anaerobic biogranulation in a hybrid reactor treating phenolic waste. *Journal of Hazardous Materials*. 137 : 1488–1495.
- 103. Grady J.C.**, 1985. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnology and Bioengineering*. 27 : 660-674.
- 104. Fackurddin A.N.M., Quilty B.**, 2005. The influence of glucose and fructose on the degradation of 2-chlorophenol by *Pseudomonas putida* CP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21 : 1541-1548.
- 105. Brodsky M.H., Nixon M.C.**, 1973. Rapid method for detection of *Pseudomonas aeruginosa* on MacCONKEY Agar under ultraviolet light. *Applied Microbiology*. 26 : 219-220.



- 106. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. et al.,** 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins Co (9<sup>e</sup>Ed.). Baltimore. 787 p.
- 107. Viggor S., Heinaru E., Loponen J., Merimaa M., Tenno T., Heinaru A.,** 2002. Biodegradation of Dimethylphenols by Bacteria with Different Ring-Cleavage Pathways of Phenolic Compounds. *Environmental Science and Pollution Research*. 1 : 19 -26.
- 108. Doddamani H.P., Ninnekar H.Z.,** 2001. Biodegradation of carbaryl by a Micrococcus species. *Current Microbiology*. 43 : 69-73.
- 109. Afzal M., Lqbal S., Rauf S., Khalid Z.M.,** 2007. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. *Journal of Hazardous Materials*. 149 : 60-66.
- 110. Annadurai G., Juang R.S., Lee D.J.,** 2002. Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge. *Waste Management*. 22: 703-710.
- 111. Gonzalez G., Herrera G., Garcia M.T.,** 2001. Biodegradation of phenol industrial wastewater in fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresource Technology*. 80 : 137-142.
- 112. Saravanan P., Pakshirajan K., Prabikumar S.,** 2008. Biodegradation of phenol and *m*-cresol in batch and fed batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly *Pseudomonas sp.* *Bioresource Technology*. 99 : 8553-8.
- 113. Valat C.,** 2005. Développement d'outils biologiques pour le diagnostic environnemental. Thèse de Doctorat. Ecole National Supérieure des Mines de Saint-Etienne et Université Jean Monnet de Saint-Etienne. 200 p.
- 114. Chaerun S.K., Tazaki K., Asada R., Kogure K.,** 2004. Bioremediation of coastal areas 5 years after *Nakhodka* oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*. 30 : 911-922.

- 115. Kim S.B., Park C.H., Kim D.J., Jury W.A.,** 2003. Kinetics of benzene biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*: parameter estimation. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 : 1038-1045.
- 116. Choi J.Y., Sifri C.H., Goumnerov B.C., Rahme L.G., Ausubel F.M., Calderwood S.B.,** 2002. Identification of Virulence Genes in a Pathogenic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* by Representational Difference Analysis. *Journal of Bacteriology*. 184 : 952-961.
- 117. Walker T.S., Bais H.P., Déziel E., Schweizer H.P., Rahme L.G., Fall R. et al.,** 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiology*. 134 : 320-331.
- 118. Chapman G.H.,** 1945. The significance of sodium chloride in studies of *staphylococci*. *Journal of Bacteriology*. 50 : 201-203.
- 119. MacConkey A.,** 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. **Journal of Hygiene**. 8 : 333-379.
- 120. King E.O., Ward M.K., Raney D.E.,** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 44 : 301-7.
- 121. Lowbury E.J.L., Collins, A.G.,** 1955. The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Pathology*. 8 : 47-48.
- 122. Brown V.I., Lowbury E.J.L.,** 1965. Use of an improved Cetrimide Agar Medium and of culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Pathology*. 18 : 752-756.
- 123. Simmons J.S.,** 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *Journal of Infectious Diseases*. 39 : 209-214.
- 124. Clark W.M., Lubs H.A.,** 1915. The differentiation of bacteria of the Colon-Aerogenes family by the use of indicators. *Journal of Infectious Diseases*. 17 : 160-173.
- 125. Hajna A.A.,** 1945. Triple Sugar Iron Medium for the Identification of the Intestinal groups of Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 49 : 516-517.

# *Annexes*

## Annexe 1. Protozoaires

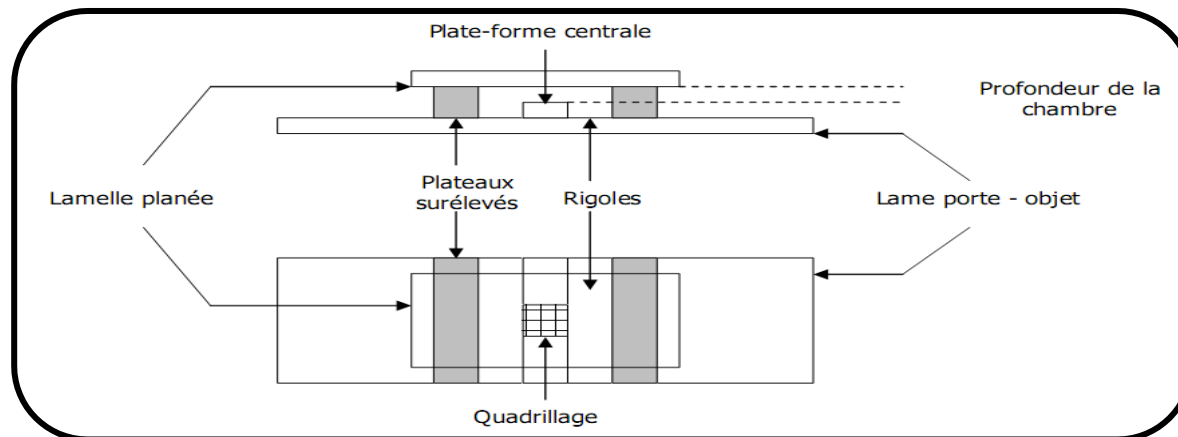
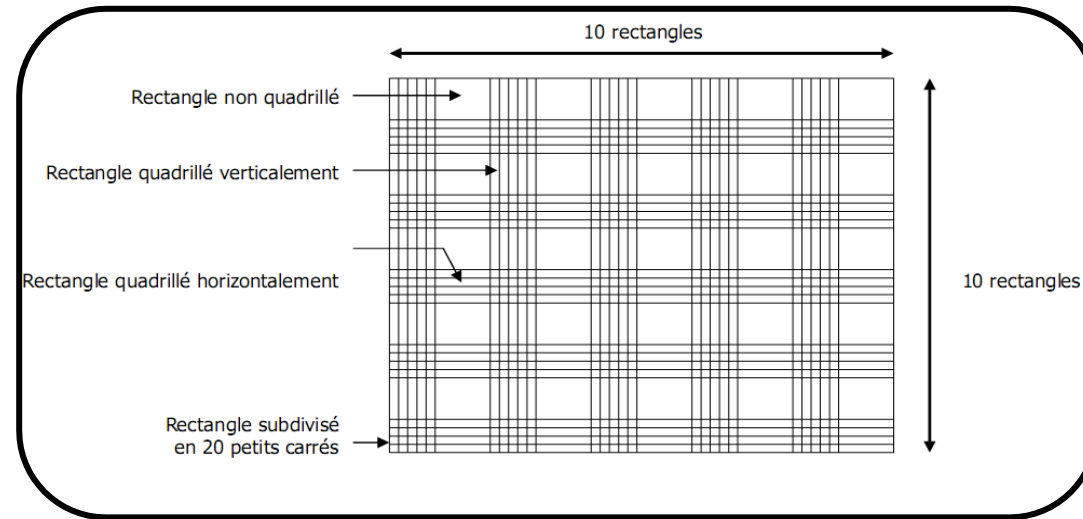
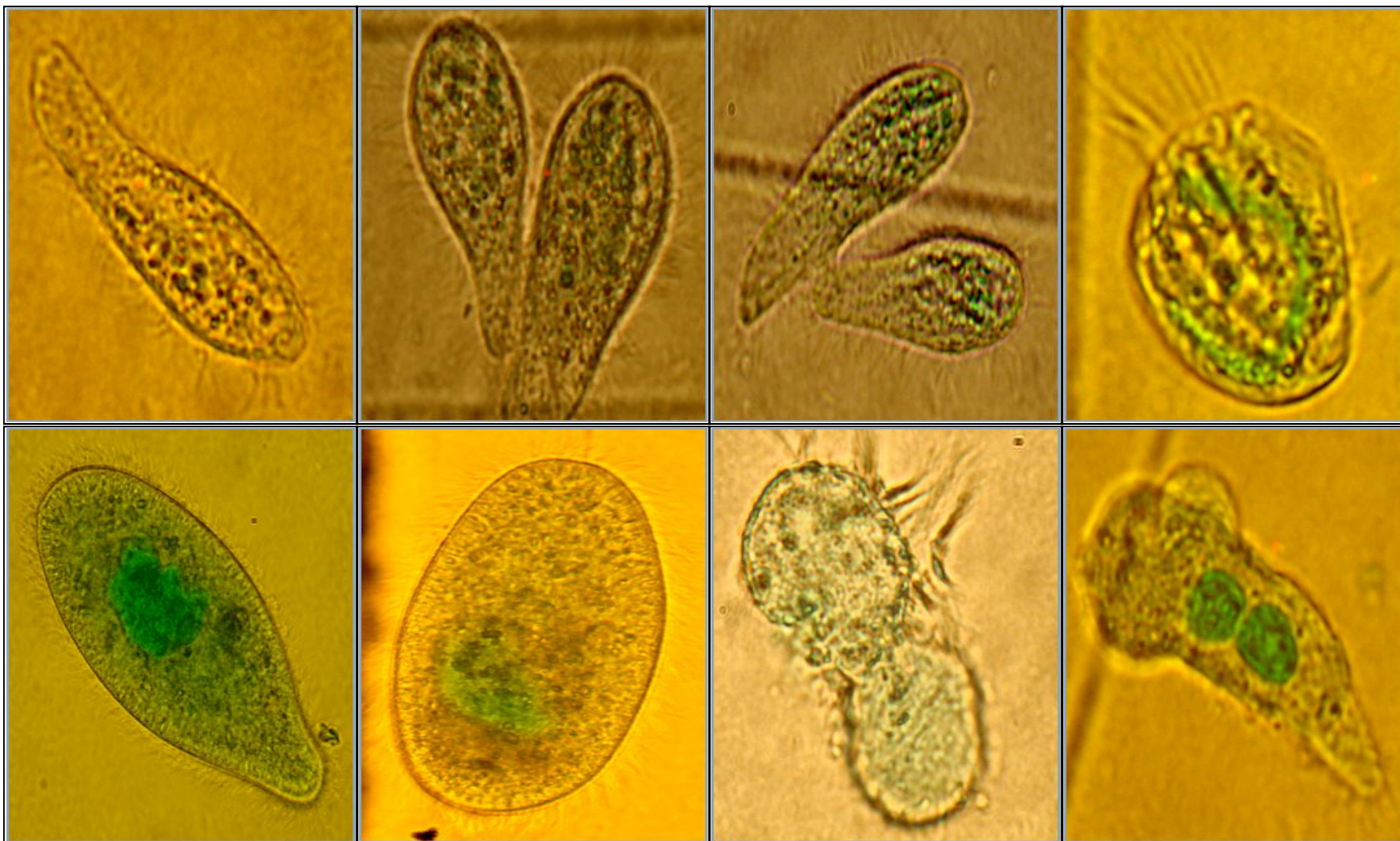


Figure 9. Cellule de Malassez

**Tableau 8.** Composition de la solution MFS (methylgreen-formalin-saline)

<b>Composants</b>	<b>Quantités</b>
<b>Formaldéhyde 35%</b>	100 ml
<b>Vert de méthyle</b>	0,6 g
<b>Chlorure de sodium</b>	8 g
<b>Eau distillée</b>	900 ml



**Figure 10.** Différentes formes de protozoaires observées dans l'effluent d'entrée

**Annexe 2.** Milieux de culture utilisés

Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture														
<p><b>Chapman - Mannitol Salt Agar</b> (fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p>milieu sélectif pour l'isolement et la numération des staphylocoques. Il permet également de différencier les espèces fermentant le mannitol de celles qui ne le fermentent pas.</p>	<p>Le milieu Chapman - Mannitol Salt Agar est préparé selon la formule décrite par Chapman (118).</p> <table border="0"> <tr> <td><b>Peptone</b></td> <td align="right">10</td> </tr> <tr> <td><b>Extrait de viande de bœuf</b></td> <td align="right">1</td> </tr> <tr> <td><b>Chlorure de sodium</b></td> <td align="right">75</td> </tr> <tr> <td><b>Mannitol</b></td> <td align="right">10</td> </tr> <tr> <td><b>Rouge de phénol</b></td> <td align="right">0,025</td> </tr> <tr> <td><b>Agar</b></td> <td align="right">15</td> </tr> <tr> <td><b>pH final :</b></td> <td align="right">7,4 ± 0,2</td> </tr> </table>	<b>Peptone</b>	10	<b>Extrait de viande de bœuf</b>	1	<b>Chlorure de sodium</b>	75	<b>Mannitol</b>	10	<b>Rouge de phénol</b>	0,025	<b>Agar</b>	15	<b>pH final :</b>	7,4 ± 0,2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Mannitol (+)</b> : coloration <b>jaune</b> du milieu.</li> <li>• <b>Mannitol (-)</b> : <b>absence</b> de coloration.</li> </ul> <p>Les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> élaborent leur propre pigment. Les colonies s'entourent en 24 à 48 heures d'une auréole <b>jaune</b> due à la fermentation du mannitol. Les souches de <i>Staphylococcus epidermidis</i> et autres <i>Micrococcaceae</i> donnent naissance à de petites colonies, qui, dans la majorité des cas, se développent sans modifier la teinte du milieu. En effet après 24-48 heures d'incubation, quelques souches d'entérocoques, de <i>Bacillus</i>, de <i>Micrococcus</i> et de <i>Serratia</i> peuvent cultiver.</p>
<b>Peptone</b>	10																
<b>Extrait de viande de bœuf</b>	1																
<b>Chlorure de sodium</b>	75																
<b>Mannitol</b>	10																
<b>Rouge de phénol</b>	0,025																
<b>Agar</b>	15																
<b>pH final :</b>	7,4 ± 0,2																

Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture																				
<p style="text-align: center;"><b>Mac Conkey</b> (fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p>milieu sélectif utilisé pour tester la capacité des bactéries à Gram négatif à fermenter certains sucres ou sources de carbone (lactose); La gélose Mac Conkey est employée entre autres pour la culture des entérobactéries et du <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p>	<p>Le milieu Mac Conkey est préparé selon la formule décrite par Mac Conkey (119).</p> <table border="0"> <tr> <td><b>Peptone pancréatique de gélatine</b></td> <td style="text-align: right;">17</td> </tr> <tr> <td><b>Tryptone</b></td> <td style="text-align: right;">1,5</td> </tr> <tr> <td><b>Peptone pepsique de viande</b></td> <td style="text-align: right;">1,5</td> </tr> <tr> <td><b>Lactose</b></td> <td style="text-align: right;">10</td> </tr> <tr> <td><b>Sels biliaries</b></td> <td style="text-align: right;">1,5</td> </tr> <tr> <td><b>Chlorure de sodium</b></td> <td style="text-align: right;">5</td> </tr> <tr> <td><b>Rouge neutre</b></td> <td style="text-align: right;">0,03</td> </tr> <tr> <td><b>Cristal violet</b></td> <td style="text-align: right;">0,001</td> </tr> <tr> <td><b>Agar agar bactériologique</b></td> <td style="text-align: right;">13,5</td> </tr> <tr> <td><b>pH final :</b></td> <td style="text-align: right;">7,1 ± 0,2</td> </tr> </table>	<b>Peptone pancréatique de gélatine</b>	17	<b>Tryptone</b>	1,5	<b>Peptone pepsique de viande</b>	1,5	<b>Lactose</b>	10	<b>Sels biliaries</b>	1,5	<b>Chlorure de sodium</b>	5	<b>Rouge neutre</b>	0,03	<b>Cristal violet</b>	0,001	<b>Agar agar bactériologique</b>	13,5	<b>pH final :</b>	7,1 ± 0,2	<p>La gélose Mac Conkey avec cristal violet permet de mettre en évidence la fermentation du lactose par le virage du rouge neutre.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Colonies lactose (+) : roses à rouges</b> parfois entourées d'un halo de sels biliaries précipités.</li> <li>• <b>Colonies lactose (-) : incolores</b> ou faiblement colorées à <b>beiges</b>.</li> </ul>
<b>Peptone pancréatique de gélatine</b>	17																						
<b>Tryptone</b>	1,5																						
<b>Peptone pepsique de viande</b>	1,5																						
<b>Lactose</b>	10																						
<b>Sels biliaries</b>	1,5																						
<b>Chlorure de sodium</b>	5																						
<b>Rouge neutre</b>	0,03																						
<b>Cristal violet</b>	0,001																						
<b>Agar agar bactériologique</b>	13,5																						
<b>pH final :</b>	7,1 ± 0,2																						



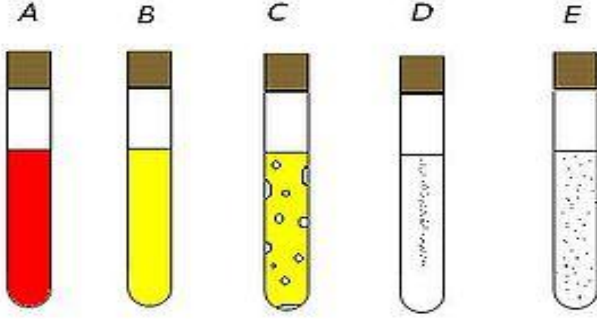
Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture
<p align="center"><b>King B</b></p> <p>(fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p>Milieu permettant la production de fluorescéine (ou pyoverdine), pigment jaune vert fluorescent sous lumière ultra-violette, par certains <i>Pseudomonas</i> (les <i>Pseudomonas</i> du groupe fluorescent).</p>	<p>Le milieu King B est préparé selon la formule théorique décrite par King, Ward et Raney (120).</p> <p><b>Peptone</b> 20  <b>Glycérol</b> 10 ml  <b>Phosphate dipotassique</b> 1,5  <b>Sulfate de magnésium, 7 H<sub>2</sub>O</b> 1,5  <b>Agar agar bactériologique</b> 15  <b>pH final :</b> 7,2 ± 0,2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La pyoverdine <b>jaunit</b> le milieu.</li> <li>• Cette molécule présente une <b>fluorescence jaune verte</b> détectable sous ultra-violets à 360 nm.</li> <li>• Elle est <b>insoluble</b> dans le chloroforme.</li> </ul>
<p align="center"><b>King A</b></p> <p>(fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p>Le milieu de King A permet la détection de la synthèse de pyocyanine, pigment élaboré spécifiquement par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (bacille pyocyanique).  Utilisé en parallèle avec le milieu de King B (détection de la pyoverdine), il permet d'orienter l'identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p>	<p>Le milieu King A est préparé selon la formule théorique décrite par King, Ward et Raney (120).</p> <p><b>Peptone</b> 20  <b>Glycérol</b> 10 ml  <b>Sulfate de potassium</b> 10  <b>Chlorure de magnésium</b> 1,4  <b>Agar purifié</b> 12  <b>pH final :</b> 7,2 ± 0,2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Une synthèse de pyocyanine se traduit par une coloration <b>bleue</b>.</li> <li>• Elle est <b>soluble</b> dans le chloroforme.</li> <li>• Une coloration <b>rouge</b> traduit la production de <b>pyorubine</b>.</li> <li>• Une synthèse de <b>pyoverdine</b> et de <b>pyocyanine associée</b> provoque une coloration <b>verte</b>.</li> </ul>


Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture
<p align="center"><b>Cétrimide</b></p> <p>(Fournit commercialement par les Laboratoires DIFCO)</p>	<p align="center">un milieu sélectif permettant l'isolement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p>	<p>La formule du milieu est dérivée de celle du milieu de King A qui favorise la production de pyocyanine par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (121, 122).</p> <p><b>Peptone</b> 20</p> <p><b>Cétrimide</b> 0,3</p> <p><b>Chlorure de magnésium</b> 1,4</p> <p><b>Sulfate de potassium</b> 10</p> <p><b>Agar bactériologique</b> 13,6</p> <p><b>pH final :</b> 7,2 ± 0,2.</p> <p><b>Préparation :</b> Ce milieu a été préparé au sein du laboratoire à partir du milieu déshydraté</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-dissoudre 45,3 g dans 990 ml d'eau distillée</li> <li>-Ajouter 10 ml de Glycérol</li> <li>-Porter à ébullition</li> <li>-Stériliser</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'obtention de colonies présentant une pigmentation caractéristique bleue ou bleu-verte et une fluorescence sous ultra-violets à 254 nm oriente vers <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</li> </ul>

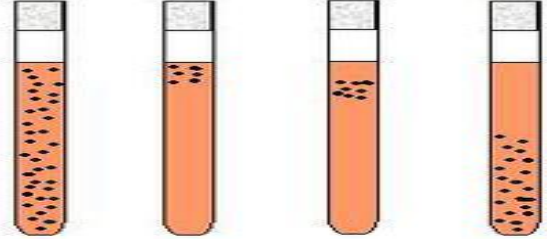
Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture
<p align="center"><b>Citrate de Simmons</b></p> <p>(fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p>La gélose Simmons citrate (milieu minéral minimum au citrate de sodium) est utilisée pour la différenciation des bacilles Gram négatifs.</p> <p>Il permet la recherche du citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie pour les bactéries.</p>	<p>La gélose Simmons citrate est préparée selon la formule décrite par Simmons (123).</p> <p><b>Citrate de sodium</b> 1</p> <p><b>Chlorure de sodium</b> 5</p> <p><b>Sulfate de magnésium</b> 0,2</p> <p><b>Phosphate mono-ammonique</b> 1</p> <p><b>Phosphate dipotassique</b> 1</p> <p><b>Bleu de bromothymol</b> 0,08</p> <p><b>Agar</b> 15</p> <p><b>pH final :</b> 6,8 ± 0,2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les bactéries "<b>citrate positive</b>" <b>bleuissent</b> ce milieu en donnant une culture souvent abondante.</li> <li>• Les bactéries "<b>citrate négative</b>" ne donnent <b>ni culture, ni bleuissement</b> du milieu, même après plusieurs jours d'étuve.</li> </ul>

Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture
<p align="center"><b>Clark et Lubs</b> (fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p align="center">Le bouillon de Clark et Lubs permet l'étude de la voie de fermentation du glucose.</p>	<p align="center">Ce milieu est préparé selon la formule décrite par Clark et Lubs (124).</p> <p><b>Peptone</b> 7  <b>Glucose</b> 5  <b>Phosphate dipotassique</b> 5  <b>pH final :</b> 6,9 ± 0,2</p>	<p>Prélèvement de deux aliquotes et réaliser les tests suivants :</p> <p><b>1- Test VP</b> (mise en évidence de la production d'acétoïne)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol et le même volume de soude concentrée (ou de potasse) ;</li> <li>- Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation ;</li> <li>- Attendre 10 min.</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anneau rouge</b> en surface : VP +</li> <li>• <b>Anneau jaune</b> en surface : VP –</li> </ul> <p><b>2- Test RM</b> (mise en évidence de la production d'acides mixtes)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle ;</li> <li>- la lecture est immédiate.</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Milieu rouge</b> : RM +</li> <li>• <b>Milieu jaune</b> : RM –</li> </ul>

Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture
<p><b>Eau peptonée exempte d'indole</b> (fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p>L'eau peptonée exempte d'indole permet la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières.</p> <p>Elle est utilisée pour rechercher la production d'indole.</p>	<p><b>Tryptone</b> 10</p> <p><b>Chlorure de sodium</b> 5</p> <p><b>pH final :</b> 7,2 ± 0,2</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs ;</li> <li>- La réaction est immédiate.</li> <li>• Réaction <b>indole-positif</b> : anneau <b>rouge</b>,</li> <li>• Réaction <b>indole-négatif</b>: anneau <b>brunâtre</b> (teinte originelle du réactif).</li> </ul>
<p><b>Bouillon nitraté</b> (fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p>Le bouillon nitraté est un bouillon de culture permettant la recherche de l'utilisation de l'ion nitrate par certains micro-organismes, notamment par respiration nitrate.</p>	<p><b>Infusion cœur-cerveille</b> 25</p> <p><b>Nitrate de sodium</b> 10</p> <p><b>pH final :</b> 7,2</p>	<p>Après avoir vérifié la présence de culture, ajouter les réactifs Nitrites 1 et 2 (ou du réactif de Griess).</p> <p><b>1-</b> Une <b>coloration rouge</b> signe la <b>présence</b> de nitrites : bactérie nitrate réductase +, stade nitrites).</p> <p><b>2-</b> En cas de milieu incolore, ajouter du zinc (réducteur des nitrates). Attendre quelques minutes.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Une <b>coloration rouge</b> montre la <b>présence</b> de nitrites : la bactérie est Nitrate réductase - (il y avait des nitrates dans le milieu, ils ont été réduits par le zinc, pas par les bactéries).</li> <li>• Une <b>absence de coloration</b> montre l'<b>absence</b> de nitrates : la bactérie les a réduits en azote (il n'y en a plus dans le milieu pour que le zinc les réduisent).</li> </ul>

Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture
<p align="center"><b>Mannitol-Mobilité</b> (fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p align="center">Ce milieu permet la mise en évidence de la dégradation du mannitol ainsi que la mobilité.</p>	<p><b>Hydrolysate trypsique de caséine</b>      10</p> <p><b>Mannitol</b>      7,5</p> <p><b>Rouge de phénol</b>      0,0004</p> <p><b>Nitrate de potassium</b>      1</p> <p><b>Agar</b>      3,5</p> <p><b>pH final :</b>      7,6</p>	<div style="text-align: center;">  </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>A:</b> pas de dégradation du mannitol</li> <li>• <b>B:</b> dégradation du mannitol</li> <li>• <b>C:</b> dégradation du mannitol avec production de gaz</li> <li>• <b>D:</b> bactérie non mobile, colonies au lieu de l'ensemencement</li> <li>• <b>E:</b> bactérie mobile, répartition des colonies dans le milieu</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Milieu jaune : mannitol +</li> <li>• Milieu rouge : mannitol -</li> </ul>




Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture																								
<p style="text-align: center;"><b>T.S.I.</b> (fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p>La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet une mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.</p>	<p>Ce milieu est préparé selon la formule décrite par Hajna (125).</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td><b>Tryptone</b></td> <td style="text-align: right;">14</td> </tr> <tr> <td><b>Extrait autolytique de levure</b></td> <td style="text-align: right;">3</td> </tr> <tr> <td><b>Extrait de viande</b></td> <td style="text-align: right;">3</td> </tr> <tr> <td><b>Glucose</b></td> <td style="text-align: right;">1</td> </tr> <tr> <td><b>Lactose</b></td> <td style="text-align: right;">10</td> </tr> <tr> <td><b>Saccharose</b></td> <td style="text-align: right;">10</td> </tr> <tr> <td><b>Chlorure de sodium</b></td> <td style="text-align: right;">5</td> </tr> <tr> <td><b>Thiosulfate de sodium</b></td> <td style="text-align: right;">0,3</td> </tr> <tr> <td><b>Citrate ferrique ammoniacal</b></td> <td style="text-align: right;">0,3</td> </tr> <tr> <td><b>Rouge de phénol</b></td> <td style="text-align: right;">0,024</td> </tr> <tr> <td><b>Agar agar bactériologique</b></td> <td style="text-align: right;">13,5</td> </tr> <tr> <td><b>pH final :</b></td> <td style="text-align: right;">7,4 ± 0,2</td> </tr> </table>	<b>Tryptone</b>	14	<b>Extrait autolytique de levure</b>	3	<b>Extrait de viande</b>	3	<b>Glucose</b>	1	<b>Lactose</b>	10	<b>Saccharose</b>	10	<b>Chlorure de sodium</b>	5	<b>Thiosulfate de sodium</b>	0,3	<b>Citrate ferrique ammoniacal</b>	0,3	<b>Rouge de phénol</b>	0,024	<b>Agar agar bactériologique</b>	13,5	<b>pH final :</b>	7,4 ± 0,2	<p>La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :</p> <p><b>1- Fermentation de glucose :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Culot rouge : glucose non fermenté</li> <li>• Culot jaune : glucose fermenté</li> </ul> <p><b>2- Fermentation du lactose et/ou du saccharose :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés</li> <li>• Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)</li> </ul> <p><b>3- Production de gaz :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Apparition de gaz dans le culot.</li> </ul> <p><b>4- Formation d'H<sub>2</sub>S :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqure.</li> </ul> <div style="text-align: center;">  </div>
<b>Tryptone</b>	14																										
<b>Extrait autolytique de levure</b>	3																										
<b>Extrait de viande</b>	3																										
<b>Glucose</b>	1																										
<b>Lactose</b>	10																										
<b>Saccharose</b>	10																										
<b>Chlorure de sodium</b>	5																										
<b>Thiosulfate de sodium</b>	0,3																										
<b>Citrate ferrique ammoniacal</b>	0,3																										
<b>Rouge de phénol</b>	0,024																										
<b>Agar agar bactériologique</b>	13,5																										
<b>pH final :</b>	7,4 ± 0,2																										

Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture
<p align="center"><b>Viande-foie</b> (fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p align="center">Le milieu VF est principalement utilisé en tube profond pour la détermination du type respiratoire des micro- organismes.</p>	<p><b>Base viande foie</b> 30 <b>Glucose</b> 2 <b>Agar</b> 6 <b>pH final :</b> 7,4</p>	<p align="center">A      B      C      D</p>  <p>La hauteur de la culture permet de déterminer le type respiratoire :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>A:</b> culture sur toute la hauteur : aéro-anaérobie facultatif (AAF)</li> <li>• <b>B:</b> culture seulement en haut : aérobie stricte (AS)</li> <li>• <b>C:</b> culture limitée entre 0,5 et 1,5 cm du haut : micro-aérophile</li> <li>• <b>D:</b> culture seulement 1 cm au-dessous du haut : anaérobie stricte (AnS).</li> </ul>



Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture
<p align="center"><b>Urée-indole</b> (fournit commercialement par l'Institut Pasteur d'Alger)</p>	<p>Le milieu urée indole est un milieu permettant la recherche d'une enzyme appelée uréase, on peut aussi déterminer les caractères biochimique comme T.D.A, indole grâce à ce milieu.</p>	<p><b>L-Tryptophane</b> 3</p> <p><b>Phosphate bipotassique</b> 1</p> <p><b>Phosphate monopotassique</b> 1</p> <p><b>Chlorure de sodium</b> 5</p> <p><b>Urée</b> 20</p> <p><b>Alcool à 95°</b> 10 ml</p> <p><b>Rouge de phénol à 1 %</b> 2,5 ml</p>	<p><b>- 1- Mise en évidence de l'uréase</b></p> <p>L'hydrolyse de l'urée est catalysée l'uréase, il y a production de dioxyde de carbone et d'ammoniac. Ce dernier alcalinise le milieu. Cette alcalinisation est mise en évidence par le virage du rouge de phénol au rose.</p> <p><b>2- Mise en évidence de la TDA</b></p> <p>La tryptophane désaminase (TDA) est une enzyme capable de catalyser la libération du groupement amine primaire du tryptophane (W) avec production d'acide indole-pyruvique (AIP) et d'ammonium, l'acide indole-pyruvique est mis en évidence par sa complexation en un composé marron foncé en présence d'ions fer III (ferriques, Fe<sup>+3</sup>).</p> <p><b>3- Mise en évidence de la production d'indole</b></p> <p>Grace à une tryptophanase, les bactéries peuvent dégrader le tryptophane en indole, acide pyruvique et NH<sub>3</sub>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Indole (+) : anneau <b>rouge</b></li> <li>• Indole (-) : anneau <b>brunâtre</b></li> </ul>

Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture
<b>Milieu de Moëller</b>	<p>Le milieu de Moëller est un milieu de culture permettant la recherche de 3 enzymes :</p> <p><b>L'ornithine décarboxylase</b> s'il contient de l'ornithine ;</p> <p><b>La lysine décarboxylase</b> s'il contient de la lysine ;</p> <p><b>L'arginine dihydrolase</b> s'il contient de l'arginine.</p>	<p><b>Extrait de levure</b> 3</p> <p><b>L-ornithine (monochlorhydrate)</b> }  <b>L-arginine (monochlorhydrate)</b> } 5  <b>L-lysine (monochlorhydrate)</b> }</p> <p>(suivant le cas)</p> <p><b>Glucose</b> 1</p> <p><b>Bromocrésol pourpre</b> 0,00016</p> <p><b>Éthanol</b> 1 ml</p> <p><b>Chlorure de sodium</b> 5</p> <p><b>pH final :</b> 6,8</p>	<p>La mise en évidence des décarboxylases est différente selon le métabolisme glucidique</p> <p><b>1- Pour les souches à métabolisme oxydatif</b></p> <p>Verser goutte à goutte une solution tampon pH 4 dans chacun des tubes LDC, ADH, ODC en agitant quelques secondes après chaque goutte ; chaque tube reçoit le même nombre de gouttes permettant le virage au jaune du tube témoin.</p> <p>La présence de décarboxylase est révélée si le tube reste violet (l'alcalinité due à l'amine entraîne le virage de l'indicateur au violet) et si le tube vire vers le jaune cela signifie l'absence de décarboxylase.</p> <p><b>2- Pour les souches à métabolisme fermentaire</b></p> <p>Décarboxylase négative si le tube vire au jaune.</p>

Milieu de culture	Usage	Composition théorique (en g/l d'eau distillée)	Lecture			
<p align="center"><b>Gélose Nutritive</b></p>	<p align="center">C'est un milieu d'isolement non-sélectif courant surtout utilisé pour la recherche de FMAR (Flore Mésophyle Aérobie Revivifiable)</p>	<p><b>Extrait de viande</b> 1</p> <p><b>Extrait de levure</b> 2</p> <p><b>Peptone</b> 5</p> <p><b>Chlorure de sodium</b> 5</p> <p><b>Agar</b> 15</p> <p><b>pH final :</b> 7,4</p>	<p>S'effectue par examen macroscopique après une incubation 24/48 heures à 37°C en relevant les caractères suivants qui vont orienter l'identification des souches :</p> <p>Taille des colonies</p> <p>Contour</p> <p>Relief</p> <p>Surface</p> <p>Consistance</p> <p>Transparence</p> <p>Pigmentation</p> <p>Type des colonies</p> <p>Exigence</p>			
<p align="center"><b>M.E.V.A.G</b></p>	<p align="center">Il est utilisé pour la recherche de la voie d'attaque du glucose</p>	<p><b>Macération de viande</b></p> <p><b>KCl</b></p> <p><b>Rouge de phénol</b></p> <p><b>Glucose</b></p> <p><b>Eau</b></p> <p><b>Agar</b></p>				
			<p align="center"><b>Métabolisme fermentaire</b></p>	<p align="center"><b>Métabolisme oxydatif</b></p>	<p align="center"><b>Métabolisme inerte</b></p>	

### Annexe 3. Analyse statistique

**Tableau 9.** Effet de la nature de l'inoculum et de la concentration introduite sur la biodégradation du 2,5-DMP (ANOVA)

Effet	dl Effet	MC Effet	dl Erreur	MC Erreur	F	Niveau p
Echantillon	1	734,2832	20	8,400620	87,40822	0,00000
Dose	4	14,5168	20	8,400620	1,72806	0,18335
Interaction	4	9,6363	20	8,400620	1,14709	0,36332

**Tableau 10.** Test de Student pour comparer la dégradation biotique et abiotique

Source	Moyenne	EC-type	Différence	t	Niveau p
Biodégradation	39,62	1,0017	9,79	4,2715	0,00006
Dégradation abiotique	29,83	0,6414			

**Annexe 4.** Variation du pH au cours de la dégradation de la molécule substrat

**Tableau 11.** Variation du pH au cours de la biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote de l'effluent d'entrée

Tps [C]	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h	144h	168h	336h	720h
[C]=20	7,33	7,09	7,24	7,21	7,24	7,01	7,26	7,38	7,15	7,14	7,06
[C]=40	7,26	7,16	7,22	7,19	7,27	7,07	7,24	7,23	7,22	7,17	7,05
[C]=60	7,28	7,15	7,27	7,19	7,27	7,14	7,17	7,33	7,16	7,32	7,14
[C]=80	7,24	7,15	7,27	7,25	7,30	7,24	7,04	7,35	7,28	7,39	7,15
[C]=100	7,24	7,09	7,25	7,21	7,27	7,27	7,23	7,23	7,19	7,31	7,32

**Tableau 12.** Variation du pH au cours de la biodégradation du 2,5-DMP par le microbiote de l'effluent de sortie

Tps [C]	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h	144h	168h	336h	720h
[C]=20	7,19	7,17	7,20	7,23	7,23	7,26	7,16	7,14	7,12	7,11	7,15
[C]=40	7,26	7,17	7,20	7,20	7,20	7,28	7,22	7,25	7,22	7,21	7,20
[C]=60	7,22	7,16	7,15	7,12	7,24	7,24	7,23	7,23	7,29	7,24	7,24
[C]=80	7,25	7,16	7,15	7,10	7,24	7,25	7,21	7,22	7,27	7,20	7,12
[C]=100	7,29	7,16	7,15	7,13	7,25	7,25	7,22	7,18	7,19	7,14	7,16

**Tableau 13.** Variation du pH au cours de la dégradation abiotique du 2,5-DMP

Tps [C]	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h	144h	168h	336h	720h
[C]=20	7,19	7,16	7,18	7,18	7,22	7,26	7,23	7,25	7,20	7,22	7,19
[C]=40	7,24	7,24	7,24	7,20	7,27	7,30	7,33	7,27	7,24	7,28	7,28
[C]=60	7,22	7,20	7,21	7,22	7,21	7,20	7,24	7,21	7,21	7,21	7,23
[C]=80	7,20	7,18	7,19	7,20	7,21	7,23	7,29	7,24	7,20	7,21	7,21
[C]=100	7,23	7,22	7,22	7,21	7,24	7,25	7,28	7,27	7,21	7,25	7,25

**Annexe 5.** Caractères cultureux, physiologiques et biochimiques des souches bactériennes

<i>Pseudomonas</i>	<b>A = B</b>	<b>Les souches</b>		<b>Aspect des colonies</b>	<b>Tableau 14.</b> Résultats d'identification des souches
	-	<b>Le Gram</b>			
	<b>Bacilles</b>	<b>La morphologie</b>			
	<b>Incolores, fluorescence sous UV</b>	<b>Mac Conkey</b>		<b>Les caractères biochimiques</b>	
	<b>aérobie (aérophile)</b>	<b>Type respiratoire (VF)</b>			
	-	<b>Mannitol</b>			
	<b>Oxydatif</b>	<b>Métabolisme sur MEVAG</b>			
	+	<b>Mobilité</b>			
	<b>rouge</b>	<b>Pente</b>	<b>TSI</b>		
	<b>rouge</b>	<b>Culot</b>			
	-	<b>H<sub>2</sub>S</b>			
	-	<b>Production de gaz</b>			
	-	<b>RM</b>			
	-	<b>Vp</b>			
	<b>+N<sub>2</sub></b>	<b>Nitrates réductases</b>			
	<b>+ milieu bleuit</b>	<b>Citrates</b>			
	-	<b>Indole</b>			
	-	<b>TDA</b>			
	+	<b>ADH</b>			
	-	<b>LDC</b>			
	-	<b>ODC</b>			
	-	<b>ONPG (β-galactosidase)</b>			
	+	<b>Catalase</b>			
	<b>+ Fluorescence</b>	<b>A 37°C</b>	<b>Cétrimide</b>		
	<b>+ Fluorescence</b>	<b>A 42°C</b>			

<i>Alcaligenes</i>	<b>C = D</b>	<b>Les souches</b>	
	-	<b>Le Gram</b>	
	<b>Cocci</b>	<b>La morphologie</b>	
	<b>Incolores à croissance lente</b>	<b>Mac Conkey</b>	
	<b>aérobie (aérophile)</b>	<b>Type respiratoire (VF)</b>	
	+	<b>Mannitol</b>	
	<b>Oxydatif</b>	<b>Métabolisme (MEVAG)</b>	
	+	<b>Mobilité</b>	
	<b>Jaune</b>	<b>Pente</b>	<b>TSI</b>
	<b>rouge</b>	<b>Culot</b>	
	-	<b>H<sub>2</sub>S</b>	
	-	<b>Production de gaz</b>	
	-	<b>RM</b>	
	-	<b>Vp</b>	
	+	<b>Nitrates réductases</b>	
	<b>+ milieu bleuit après 48h</b>	<b>Citrates</b>	
	-	<b>Indole</b>	
	-	<b>TDA</b>	
	-	<b>ADH</b>	
	-	<b>LDC</b>	
	-	<b>ODC</b>	
	-	<b>ONPG (β-galactosidase)</b>	
	+	<b>Catalase</b>	

**Tableau 15.** Résultats d'identification des souches

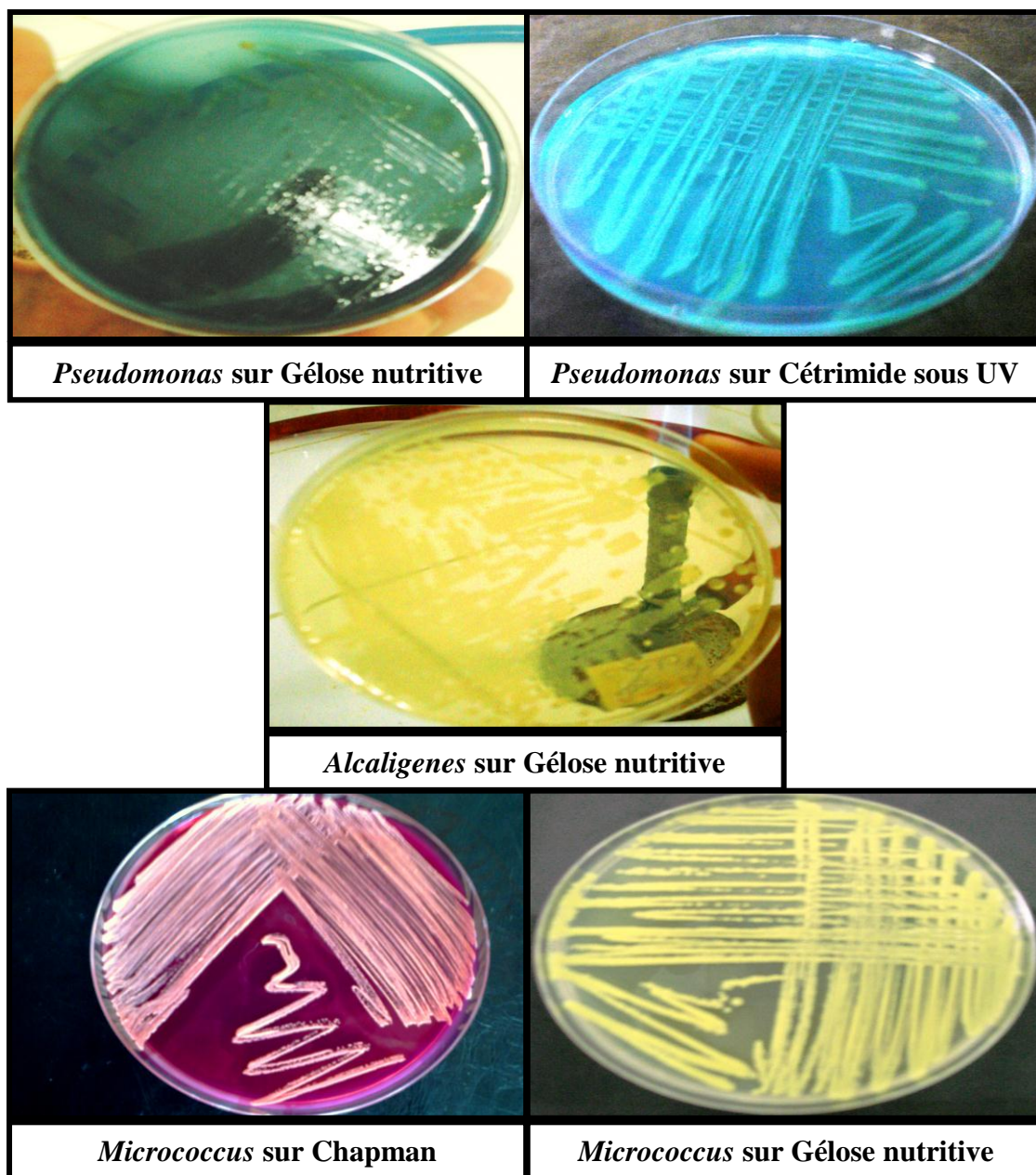
**Aspect des colonies**

**Les caractères biochimiques**

<i>Micrococcus</i>	E	Les souches		Aspect des colonies	Tableau 16. Résultats d'identification des souches
	+	Le Gram			
	Cocci	La morphologie			
	+	Croissance	Chapman		
	-	Acidification			
	-	Mannitol			
	jaune	Pigmentation			
	aérobie (aérophile)	Type respiratoire (VF)		Les caractères biochimiques	
	Oxydatif	Métabolisme (MEVAG)			
	-	Mannitol			
	-	Mobilité			
	Légèrement jaune	Pente	TSI		
	rouge	Culot			
	-	H <sub>2</sub> S			
	-	Production de gaz			
	-	RM			
	-	Vp			
	-	Nitrates réductases			
	+ milieu bleuit après 24h	Citrates			
	-	Indole			
	-	TDA			
	-	ADH			
	-	LDC			
	+	ODC			
	-	ONPG (β-galactosidase)			
	+	Catalase			



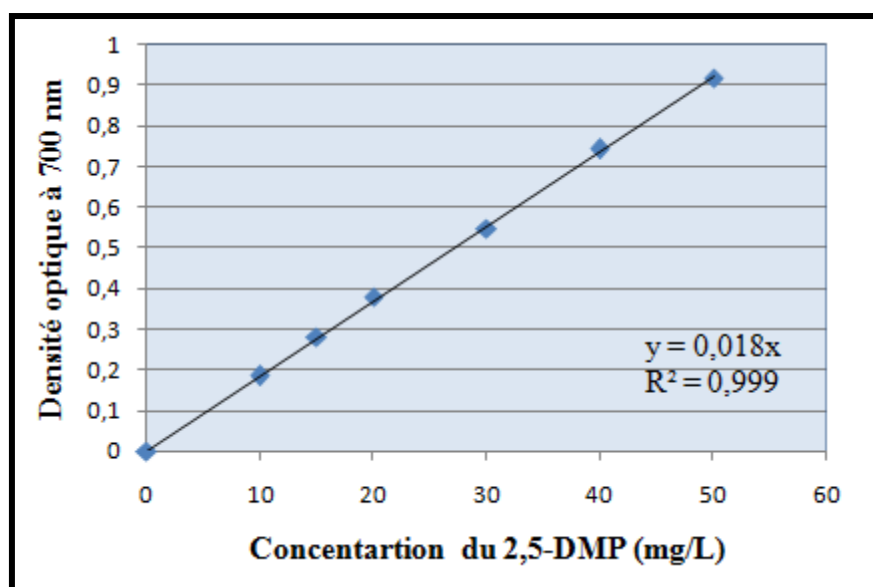
**Annexe 6.** Souches bactériennes isolées



**Figure 11.** Aspect macroscopique des souches bactériennes isolées

### Annexe 7. Courbe étalon

Concentration du 2,5-DMP (mg/l)	D.O. à 700 nm
0	0
10	0,184
15	0,282
20	0,381
30	0,547
40	0,743
50	0,917



**Figure 12.** Courbe étalon du 2,5-diméthylphénol

## Annexe 8. Cinétiques de la dégradation

**Tableau 17.** Cinétique de la biodégradation du 2,5-DMP (mg/l) par le microbiote de l'effluent d'entrée

Tps [C]	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h	144h	168h	336h	720h
[C]=20	20	19,67	17,47	16,33	15,04	12,89	11,73	10,90	10,21	9,99	9,56
[C]=40	40	36,70	35,90	34,48	31,22	29,49	26,31	24,43	22,24	20,63	20,49
[C]=60	60	56,94	53,77	50,56	47,89	41,91	39,36	35,98	32,80	31,32	31,24
[C]=80	80	75,50	73,05	68,13	62,27	60,16	51,55	47,51	43,38	41,23	40,39
[C]=100	100	93,89	89,92	84,58	81,82	77,21	74,51	69,14	59,55	51,38	50,81

**Tableau 18.** Cinétique de la biodégradation du 2,5-DMP (mg/l) par le microbiote de l'effluent de sortie

Tps [C]	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h	144h	168h	336h	720h
[C]=20	20	19,92	19,82	19,58	18,36	17,82	16,19	15,51	13,29	12,43	12,01
[C]=40	40	39,75	39,49	38,70	36,56	32,91	30,07	28,53	25,11	23,94	23,58
[C]=60	60	59,83	59,31	56,33	51,78	50,01	43,39	41,68	37,55	37,12	36,08
[C]=80	80	79,19	78,34	77,30	71,22	65,76	59,18	57,45	51,25	50,52	49,16
[C]=100	100	99,25	99,01	97,39	91,30	81,36	74,09	70,39	66,83	62,59	61,23

**Tableau 19.** Cinétique de dégradation du 2,5-DMP (mg/l) dans le témoin stérile

Tps [C]	0h	3h	6h	24h	48h	72h	96h	144h	168h	336h	720h
[C]=20	20	18,99	18,42	18,05	16,81	16,35	16,06	15,81	15,30	14,51	13,98
[C]=40	40	38,06	36,89	36,30	33,43	32,01	31,67	31,53	30,24	28,90	27,83
[C]=60	60	58,07	56,36	55,72	52,01	50,30	48,79	48,26	46,77	44,48	42,74
[C]=80	80	77,51	75,16	73,62	68,43	68,47	65,29	64,32	61,18	58,03	55,90
[C]=100	100	95,24	92,83	90,94	84,68	82,08	80,59	79,36	76,64	72,91	70,16

## Abstract

The study was carried out to evaluate the ability of total microbiota, collected at inlet and outlet of the wastewater treatment station of IBN ZIAD (Constantine), to degrade 2,5-dimethylphenol (2,5-DMP). The latter was used as unique carbon source in a minimum medium growth. Cultures are performed in miniaturized batch fermentors with different initial concentrations [20 mg/l, 40 mg/l, 60 mg/l, 80 mg/l and 100 mg/l]. Then, the media were incubated at 30°C and for 30 days without shaking. The biodegradation kinetics of 2,5-DMP is spectrophotometry determined by its concentration measurements in the medium. Various culture parameters are also carried on and an isolation of dominant bacterial groups is performed.

Substrate kinetic degradation shows that the biodegradation is continuous until the end of the measurement for all the studied concentrations, with different levels of degradation ( $p < 0.05$ ): 49.52% for the inlet microbiota effluent and 39.63% for the outlet microbiota effluent. For both microbiota, the concentration of 2,5-DMP in the medium has no significant effect on its biodegradation ( $p > 0.05$ ). No gas production is recorded throughout the incubation period, indicating the none mineralization of 2,5-DMP, probably being transformed into derivatives being unidentified. Furthermore, 2,5-DMP is also degraded by abiotic process (sterile control test) where 29.85% of its initial concentration are lost after 30 days. The difference between biotic and abiotic degradation processes is significant ( $p < 0.05$ ). The search for dominant microbial groups involved in this phenomenon reveals the presence of bacterial strains belonging to three types: *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. and *Micrococcus* sp., they are found in the inlet effluent, but only strains belonging to the two first types are found in the outlet effluent.

**Key words:** Biodegradation, 2,5-dimethylphenol, xenobiotics, effluents, water pollution.

## ملخص

تم اختبار قدرة ميكروبات النفايات السائلة للمياه المستعملة الداخلة و الخارجة لمياه الصرف الصحي لمحطة إبن زياد (قسنطينة) على التفكيك الحيوي ل5،2 ثنائي ميثيل الفينول في وسط أدنى كمصدر وحيد للكربون و الطاقة. تمت عملية الزرع في مخمرات مصغرة بتراكيز أولية مختلفة (20، 40، 60، 80 و 100 ملغ/ل) تحت درجة حرارة 30° م دون رج لمدة 30 يوم . يتم رصد حركية منحنى الهدم الحيوي ل5،2 ثنائي ميثيل الفينول عن طريق فحص تركيزه بواسطة الإمتصاص الضوئي . تم اتباع معالم مختلفة أخرى للزراعة و عزل المجموعات البكتيرية المهيمنة كذلك.

تبين حركية الهدم الحيوي إستمرار التحلل حتى نهاية القياس لكل التركيزات المدروسة مع هدم إجمالي بمعدلات مختلفة ( $p < 0,05$ ) : 49،52% للمجهرات من مدخل النفايات السائلة و 39،63% للمجهرات من مخرج مياه الصرف . تركيز 5،2 ثنائي ميثيل الفينول لكلا المجهرتين ليس له تأثير كبير على الهدم الحيوي ( $p > 0,05$ ). لم يسجل أي إنتاج للغاز طوال فترة الحضان مما يدل على عدم التحلل المعدني ل 5،2 ثنائي ميثيل الفينول و احتمال تحوله إلى مشتقات أخرى. بالإضافة إلى ذلك لوحظت عملية هدم لا حيوي ل5،2 ثنائي ميثيل الفينول حيث تم إزالة 29،85% من تركيزه الأولي بعد 30 يوم. الفرق بين عمليتي الهدم، الحيوي و لا الحيوي ، واضح ( $p < 0,05$ ). أظهر البحث عن المجموعات الميكروبية المهيمنة التي تنطوي عليها هذه الظاهرة وجود سلالات بكتيرية تنتمي إلى ثلاثة أجناس هي: *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Micrococcus sp.* الموجودة في مداخل النفايات السائلة مع وجود النوعين الأوليين في خارج النفايات السائلة.

كلمات مفتاحية: الهدم الحيوي ، 5،2 ثنائي ميثيل الفينول ، النفايات السائلة ، تلوث المياه .

Nom : HARZALLAH  
Prénom : Besma

Date de soutenance : 23/01/2011

**Thème : Etude de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'IBN ZIAD.**

**Résumé :**

La capacité du microbiote total des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'IBN ZIAD (Constantine) à dégrader le 2,5-diméthylphénol (2,5-DMP) est testée dans un milieu de croissance minimum où il est la seule source de carbone et d'énergie. Les cultures sont effectuées dans des fermenteurs miniaturisés, menées en batch à différentes concentrations initiales [20 mg/l, 40 mg/l, 60 mg/l, 80 mg/l et 100 mg/l] et incubées à 30°C sans agitation pendant 30 jours. Le suivi cinétique de la biodégradation du 2,5-DMP est fait par un dosage de sa concentration dans le milieu, mesurée par spectrophotométrie. Divers paramètres de culture sont également suivis et un isolement des groupements bactériens dominants est également effectué.

La cinétique de dégradation du substrat montre que la biodégradation est continue jusqu'à la fin du mois de mesure pour l'ensemble des concentrations étudiées, avec des taux de dégradation moyens différents ( $p < 0,05$ ) : 49,52% pour le microbiote de l'effluent d'entrée et 39,63% pour le microbiote de l'effluent de sortie. Pour les deux microbiotes la concentration du milieu en 2,5-DMP n'a aucun effet significatif sur sa biodégradation ( $p > 0,05$ ). Aucune production de gaz n'est enregistrée sur toute la période d'incubation, ce qui indique la non minéralisation du 2,5-DMP, probablement transformé en dérivés en voie d'identification. Par ailleurs, le 2,5-DMP est aussi dégradé par voie abiotique (témoin stérile) à 29,85% de sa concentration initiale au bout de 30 jours. La différence entre les deux processus de dégradation, biotique et abiotique, est significative ( $p < 0,05$ ). La recherche de groupements microbiens dominants impliqués dans ce phénomène révèle la présence de souches bactériennes, appartenant aux trois genres suivant : *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. et *Micrococcus* sp., présentes dans l'effluent d'entrée mais seules des souches appartenant aux deux premiers genres sont présentes au niveau de l'effluent de sortie.

**Mots clés:** Biodégradation, 2,5-diméthylphénol, xénobiotiques, effluents, pollution de l'eau.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications.

**Directeur de recherche :** Pr. BOUSSEBOUA H.

**Président :** M<sup>me</sup>. MERAIHI Z. Prof. Univ. Mentouri / Constantine.

**Rapporteur :** Mr. BOUSSEBOUA H. Prof. Univ. Mentouri/ Constantine.

**Examineurs :** Mr. ARHAB R. M.C. Univ. Tébessa.

Mr. HAMIDECHI A. M.C. Univ. Mentouri /Constantine.