

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri -
Constantine Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie Département de
Biochimie

N° d'Ordre : 209/DS/2017
N° de Série : 04/Bioch/2017



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat en Sciences en Microbiologie Appliquée
Option : Biotechnologies microbiennes

**Etude de la biodégradation de l'*ortho*-nitrophénol et du
para-nitrophénol par le microbiote des eaux usées et
mise en évidence des bactéries dominantes impliquées
dans ce processus**

Présentée par :

DAFFRI Amel

Soutenue : Le 10/12/2017

Devant le jury :

Présidente:	M ^{me} SATTI D.	Prof. Université des frères Mentouri-Constantine 1.
Directrice de thèse:	M ^{me} MIHOUBI I.	Prof. Université des frères Mentouri-Constantine 1.
Examineurs:	M ^r BRANES Z.	Prof. Université Badji-Mokhtar-Annaba.
	M ^r KECHA M.	Prof. Université Abderahmane Mira-Bejaïa.
	M ^{me} BENLOUNISSI A.	MCA E.N.S.B Taoufik Khaznadar-Constantine 3.

Année universitaire : 2017-2018

Remerciements

Dans cet avant-propos, j'aimerais bien en premier lieu, exprimer ma gratitude envers les personnes qui ont rendu possible la soutenance de ce travail de thèse.

Je commence par Madame Ilhem DJEZZAR-MIHOUBI, Professeur à l'Université des frères Mentouri-Constantine¹, qui a accepté d'être ma directrice de thèse, malgré ses occupations. Dont, je témoigne sa bonté, sa rigueur, son dynamisme et sa disponibilité.

Je remercie particulièrement les membres de jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail: la présidente, Madame Dalila SATTA, Professeur à l'Université des frères Mentouri-Constantine¹, pour avoir accepté de présider le jury. Monsieur Zidane BRANES Professeur à l'Université Badji Mokhtar-Annaba, Monsieur Mouloud KECHA, Professeur à l'Université Abderhamane Mira de Bejaïa et Madame Aïcha BENLOUNISSI, Maître de Conférence (A) à l'ENSB de l'Université de Constantine 3, pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

Je remercie également, Madame L. GILLMANN, Directrice du laboratoire SONAS, IUT, Université Angers (France), de m'avoir accueillie dans son laboratoire et Madame M. SAUNIER pour son assistance technique.

Enfin, je remercie vivement, Monsieur Abdelkader ROUABAH, Professeur à l'Université des frères Mentouri-Constantine 1 et Vice-Doyen chargé de la post-graduation de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, pour la confiance qu'il m'a accordée. Sans oublier ses conseils, ses encouragements et, surtout, sa patience jusqu'au bout.

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Revue bibliographique

Chapitre I: Les eaux usées

1. Définition des eaux usées.....	3
1.1 Les eaux usées domestiques.....	3
1.2 Les eaux usées urbaines.....	3
1.3 Les eaux usées industrielles.....	3
1.4 Les eaux agricoles.....	4
2. Caractéristiques des eaux usées.....	4
2.1 Paramètres Physiques.....	4
2.1.1 Température.....	4
2.1.2 Matière en suspension.....	4
2.2 Paramètres organoleptiques.....	5
2.2.1 Turbidité.....	4
2.2.2 Couleur.....	5
2.3 Paramètres Chimiques.....	5
2.3.1 Potentiel Hydrogène	5
2.3.2 Conductivité.....	6
2.3.3 Oxygène Dissous.....	6
2.3.4 Demande Chimique en Oxygène.....	6
2.3.5 Demande Biochimique en Oxygène.....	6
2.3.6 Biodégradabilité.....	7
2.3.7 Azote.....	7
2.3.7.1. Nitrates.....	7
2.7.3.2. Azote ammoniacal.....	8
2.3.8 Phosphore.....	8
2.3.9 Sulfate.....	8

Chapitre II: Les composés nitroaromatiques

1. Les mononitrophénols.....	25
2. Toxicité.....	27
3. Biodégradation des composés nitroaromatiques.....	28
3.1 Biodégradation aérobie.....	30
3.2 Biodégradation anaérobie.....	31
4. Principales réactions de dégradation des nitrophénols.....	32
4.1 Réaction d'oxygénation initiale qui donne le nitrite.....	32
4.2 Réaction de transformation réductrice.....	33
4.3 Elimination réductrice complète du groupement nitro par la formation du complexe de Meisenheimer-hydrure.....	33
4.4 Réduction du cycle aromatique.....	34

Partie expérimentale

Chapitre I: Etude de la biodégradation de l'*ortho*-Nitrophénol et du *para*-Nitrophénol

1. Matériel et Méthodes.....	36
1.1 Milieu de culture.....	36
1.2 Prélèvement de l'inoculum.....	36
1.3 Cinétique de biodégradation et dosages.....	37
1.4 Identification de métabolites produits de la biodégradation par HPLC.....	38
2. Résultats et Discussion.....	39
2.1 Evaluation de la biodégradabilité des échantillons des eaux usées prélevé.....	39
2.2 Biodégradation de l' <i>ortho</i> -Nitrophénol.....	40
2.3 Biodégradation du <i>para</i> -Nitrophénol	41
2.4 Identification des produits de la biodégradation du du <i>para</i> -Nitrophénol.....	44
2.5 Identification des produits de la biodégradation de l' <i>ortho</i> -Nitrophénol.....	47
2.6 Analyse par GC-MS.....	49
2.7 Résultat de la GC-MS.....	50

Chapitre II: Isolement et Identification des bactéries dégradants les Nitrophénols

1. Matériel et Méthodes	63
1.1 Isolement et purification des microorganismes.....	63
1.2 Identification bactérienne.....	63
1.2.1 Etude macroscopique et microscopique.....	63
1.2.2 Identification Biochimique.....	64
1.3. Identification Moléculaire.....	64
1.3.1 Extraction de l'ADN.....	64
1.3.2 Amplification des séquences des gènes codant l'ARNr 16S par PCR.....	64
1.3.3 Électrophorèse et purification des produits de la réaction de polymérisation en chaîne.....	66
1.3.4 Séquençage et analyse des séquences.....	67
2. Résultats et Discussion	67
2.1 Identification des souches bactériennes.....	67
2.1.1 Examen microscopique après coloration de Gram.....	68
2.1.2 Identification biochimique.....	69
2.1.3 Identification moléculaire.....	69
Conclusion générale	83
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des Figures

- Figure 1:** Traitement des eaux usées dans une station d'épuration.
- Figure 2:** Structure chimique des mononitrophénols.
- Figure 3:** Réaction d'oxygénation initiale qui donne le nitrite.
- Figure 4:** Voie d'élimination du groupement nitro par réaction de transformation réductrice.
- Figure 5:** Elimination complète du groupement nitro par réduction complète.
- Figure 6:** Structure chimique du complexe de Meisenheimer.
- Figure 7:** Courbe d'étalonnage de l'ONP.
- Figure 8:** Courbe d'étalonnage du PNP.
- Figure 9:** Cinétique de biodégradation de l'ONP après 80 jours d'incubation.
- Figure 10:** Cinétique de biodégradation du PNP après 80 jours d'incubation.
- Figure 11:** Les chromatogrammes HPLC obtenus de la biodégradation du PNP à $\lambda=230$ nm.
- Figure 12:** Les chromatogrammes HPLC obtenus de la biodégradation de l'ONP à $\lambda=280$ nm.
- Figure 13:** Spectre de masse obtenu par GC-MS du témoin de l'ONP.
- Figure 14:** Spectre de masse obtenu par GC-MS de l'échantillon 1 de l'ONP.
- Figure 15:** Voie de dégradation de l'ONP par *P.putida*.
- Figure 16:** Spectre de masse obtenu par GC-MS de l'échantillon 2 de l'ONP.
- Figure 17:** Spectre de masse obtenu par GC-MS de l'échantillon 3 de l'ONP.
- Figure 18:** Les deux voies de dégradation de l'ONP *via* le malate acétate et le β -hydroxymalate acétate.
- Figure 19:** Biodégradation de l'*ortho*-nitrophénol selon la voie des Nitrobenzènes.
- Figure 20:** Biodégradation de l'*ortho*-nitrophénol *via* la voie des Benzoates.
- Figure 21:** Biodégradation de l'*ortho*-nitrophénol *via* la voie des Benzoates (bis).
- Figure 22:** Spectre de masse obtenu par GC-MS du témoin du PNP.
- Figure 23:** Spectre de masse obtenu par GC-MS du PNP.
- Figure 24:** Les deux voies de dégradation du PNP *via* le 4-nitrocatechol et l'hydroquinone.
- Figure 25:** Observation microscopique des quatre souches obtenues après la coloration de Gram (grossissement X100).
- Figure 26:** Résultats des tests PCR sur gel d'agarose de l'ADN des souches bactériennes isolées.
- Figure 27:** Arbre phylogénétique des séquences du gène ARNr16S de la souche 1 (*Pseudomonas aeruginosa*).

Figure 28: Arbre phylogénétique des séquences du gène ARNr16S de la souche 2 (*Pseudomonas aeruginosa*).

Figure 29: Arbre phylogénétique des séquences du gène ARNr 16S de la souche 3 (*Bacillus cereus*).

Figure 30: Arbre phylogénétique des séquences du gène ARNr16S de la souche 4 (*Pseudomonas aeruginosa*).

Liste des Tableaux

Tableau 1: Les sources de pollution des eaux.

Tableau 2: Les propriétés physiques et chimiques des Mononitrophénols.

Tableau 3: Les propriétés physico-chimiques des échantillons des eaux usées prélevés.

Tableau 4: Les conditions PCR pour le couple P8-P535.

Tableau 5: Les conditions PCR pour le couple 338-1040.

Tableau 6: Les programmes PCR appliqués.

Tableau 7: Les résultats de mesures des densités optiques (DO) et du pH de l'*ortho*-Nitrophénol (ONP).

Tableau 8: Les résultats de mesures des densités optiques (DO) et du pH de l'*Para*-Nitrophénol (PNP).

Tableau 9: Les résultats des identifications biochimiques par le logiciel APIWEB de la souche 1.

Tableau 10: Les résultats des identifications biochimiques par le logiciel APIWEB de la souche 2.

Tableau 11: Les résultats des identifications biochimiques par le logiciel APIWEB de la souche 3.

Tableau 12: Les résultats des identifications biochimiques par le logiciel APIWEB de la souche 4.

Introduction

Les composés toxiques libérés dans l'environnement sont la cause de problèmes majeurs de pollution de l'environnement. L'activité humaine est la source de milliers de sites de déchets domestiques et industriels. Ces rejets et résidus sont souvent dangereux et incontrôlables, surtout quand ce sont des xénobiotiques qui s'accumulent dans le sol et dans les cours d'eau qui les disséminent sur des milliers de kilomètres. Le progrès industriel, l'augmentation exponentielle des population, la multiplication et la diversification considérables de leurs besoins rendent chaque jour plus complexe et plus coûteuse la problématique du traitement des déchets, des rejets et des sites pollués.

En Algérie, les cours d'eau fortement pollués traversent ou passent à proximité d'agglomérations urbaines et de zones industrielles majeures causant ainsi beaucoup de problèmes sanitaires et d'insalubrité aux riverains. Les oueds véhiculent de fortes charges polluantes et leur capacité de dilution et d'autoépuration ne suffit plus à résorber la charge polluante. Ils se sont transformés, pour la plupart, en égouts à ciel ouvert, notamment en été où leur débit baisse naturellement [1].

Les principaux polluants xénobiotiques de l'environnement sont les produits phénoliques : nitrophénols, chlorophénols et phénols méthylés. Ces substances entrent dans la composition de nombreux produits domestiques et industriels de grande diffusion. Elles intègrent l'environnement en l'état ou par leurs produits de dégradation : pesticides et leurs résidus, chloration et combustion de matières organiques composées, eaux résiduaires diverses, rejets des mines de charbon, dérivés de traitement du pétrole, colorants, produits pharmaceutiques et pétrochimiques...

Environ 165 composés phénoliques ont un effet toxique avéré sur l'homme, les plantes et les animaux [2]. Le *para*-nitrophénol, par exemple, est un polluant organique majoritairement surveillé dans les eaux naturelles et surtout dans l'eau potable. Il se forme naturellement lors de la biodégradation d'un insecticide: le parathion, et, à son tour, subit une biodégradation pour donner du 4-nitrocatéchol. En effet, une exposition excessive au *para*-nitrophénol peut provoquer une méthémoglobinémie: un pourcentage anormalement élevé du fer de l'hémoglobine se trouve à l'état de Fer (III) au lieu de Fer (II), ce qui diminue la capacité du sang à transporter l'oxygène dans les cellules [3].

Les nitrophénols et les chlorophénols sont répertoriés sur la liste des polluants majeurs, désormais présents dans la plupart des milieux naturels comme contaminants majeurs : lacs et cours d'eau, eaux souterraines, terres agricoles, atmosphère [2]. L'élimination de ces polluants phénoliques des milieux naturels peut résulter de différents processus physiques et chimiques, efficaces mais très coûteux. La dégradation des phénols par

la voie biologique, grâce à l'aptitude de multiples microorganismes à les décomposer est une stratégie très répandue dans la détoxification des environnements pollués. Afin de développer et d'optimiser les procédés de dépollutions d'effluents industriels et agricoles contenant de fortes concentrations de ces polluants phénoliques, en particulier les pesticides et leurs produits de dégradations.

Divers auteurs exposent des études basées sur l'utilisation de ces substances comme principale source de carbone et d'énergie par des microbiotes complexes ou par des souches pures [4]. Dans ce contexte, notre contribution par cette étude est orientée vers un objectif visant à mettre en évidence la biodégradation aérobie de fortes concentrations de deux isomères de nitrophénols: l'*ortho*-nitrophénol et le *para*-nitrophénol par le microbiote des eaux usées de la ville de Constantine.

La première partie de notre travail est consacrée à la description des données bibliographiques relatives aux eaux usées et aux composés nitroaromatiques. La seconde partie a trait au travail expérimental et est structurée en deux chapitres:

- Le chapitre 1 concerne l'étude de la biodégradation de l'ONP et du PNP et l'identification des métabolites produits par des techniques chromatographiques et spectroscopiques.
- Dans le second chapitre, nous nous intéressons à l'isolement et l'identification des bactéries dégradant les Nitrophénols et ce, par l'utilisation des techniques morphologiques, biochimiques et moléculaires. Une discussion appuiera les résultats obtenus dans les deux chapitres.

Enfin, ce travail sera clôturé par une conclusion générale et la mise en évidence des projections de recherche.

Revue bibliographique

La bioremédiation est un des domaines d'application des biotechnologies dans le secteur de l'environnement. Elle permet l'élimination de polluants environnementaux et la détoxification des écosystèmes par l'utilisation de microorganismes. Elle offre par cet aspect diverses options pour combattre les polluants organiques les plus dangereux, tel que les xénobiotiques et leurs résidus toxiques, ainsi que leurs devenir dans le sol et les cours d'eau. Elle présente des avantages écologiques et économiques par rapport aux autres types de traitement. Principalement elle évite la manipulation humaine directe des déchets dangereux.

Chapitre I: Les eaux usées

1. Définition des eaux usées

Les activités humaines, domestiques, agricoles et industrielles produisent toutes sortes de déchets et de souillures qui sont transportés par voie liquide. Ils sont susceptibles d'engendrer différentes sortes de pollution et de nuisance dans le milieu récepteur. Cet ensemble d'eau rejetée et de déchet constitue ce qu'on appelle les eaux usées [5]. Les eaux usées sont classées en quatre types :

1.1 Les eaux usées domestiques

Elles comprennent les eaux ménagères (eaux de toilettes, de lessive, de cuisine) et les eaux vannes (urines et matières fécales) dans le système dit « tout à l'égout ». Les eaux usées domestiques contiennent des matières minérales et des matières organiques.

1.2 Les eaux usées urbaines

Elles comprennent les eaux usées domestiques et les eaux de ruissellement (eaux pluviales, eaux d'arrosage et de lavage des voies publiques). Les eaux qui ruissellent sur les toitures, les cours, les jardins, les espaces verts, les voies publiques et les marchés entraînent toutes sortes de déchets minéraux et organiques: de la terre, des limons, des boues, des silts des sables, des déchets végétaux (herbes, pailles, feuilles, graines, etc.) et toutes sortes aussi de micropolluants (hydrocarbures, pesticides, détergents,...) [6].

1.3 Les eaux usées industrielles

Elles ont une composition très différente de celle des eaux usées domestiques. Leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre. En plus des matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des métaux lourds, des micropolluants organiques, des hydrocarbures. Certaines d'entre elles nécessitent

un prétraitement de la part des industriels avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte. Elles ne sont mêlées aux eaux domestiques que si elles ne présentent plus de danger pour les réseaux de collecte et ne perturbent pas le fonctionnement des usines de dépollution [7].

1.4 Les eaux agricoles

Ce sont des eaux qui ont été polluées par des substances utilisées dans le domaine agricole. Dans le contexte d'une agriculture performante et intensive, l'agriculteur est conduit à utiliser divers produits d'origine industrielle ou agricole dont certains présentent ou peuvent présenter, des risques pour l'environnement et plus particulièrement pour la qualité des eaux. Il s'agit principalement de fertilisants (engrais minéraux du commerce ou déjections animales produites ou non sur l'exploitation). Des produits phytosanitaires (herbicides, fongicides, insecticides,...). Ces eaux sont l'issus des apports directs dus aux traitements des milieux aquatiques et semi aquatiques tels que le désherbage des plans d'eau, des zones inondables (faucardage chimique) et des fossés, ainsi que la démoustication des plans d'eau et des zones inondables (étangs et marais). Des apports indirects dus en particulier à l'entraînement par ruissellement, aux eaux de rinçage des appareils de traitement, aux résidus présents dans des emballages non correctement rincés ou détruits, aux eaux résiduelles des usines de fabrication et de conditionnement [8].

Les eaux usées, contiennent, en plus de toutes ces matières, toutes sortes de microorganismes: champignons, protozoaires, bactéries et virus.

2. Caractéristiques des eaux usées

2.1 Paramètres physiques

2.1.1 Température

La température des eaux doit être connue avec une bonne précision. Elle est élevée par rapport à la température des eaux de consommation. En effet, la température joue un rôle dans la solubilité des sels et surtout des gaz, dans la dissociation des sels dissous donc sur la conductivité électrique, dans la détermination du pH, pour la connaissance de l'origine de l'eau et des mélanges éventuels [9].

2.1.2 Matière en suspension (MES)

C'est la masse de matières insolubles ou colloïdales retenues par filtration quantitative ou séparées par centrifugation, elles s'expriment en milligramme par litre (mg/L). Elles donnent également à l'eau une apparence trouble et, souvent, un mauvais goût et une

mauvaise odeur après une potabilisation éventuelle. Cependant, elles peuvent avoir un intérêt pour l'irrigation des cultures. Les matières en suspension ne sont des particules solides véritablement en suspension que dans des conditions moyenne d'écoulement des effluents correspondant à une vitesse minimale de 0,5 m/s. En fonction de la taille des particules, on distingue les matières grossières ou décantables (diamètre supérieur à 100 μm) et les matières en suspension. On peut également prendre en compte une partie des matières colloïdales, de dimension inférieure, qui constituent la limite entre la phase solide et la phase dissoute (entre 1 et 10^{-2} μm) [10].

2.2 Paramètres organoleptiques

2.2.1 Turbidité

La turbidité représente l'opacité d'un milieu trouble. C'est la réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de matières non dissoutes. Elle est causée, dans les eaux, par la présence de matières en suspension (MES) fines, comme les argiles, les limons, les grains de silice et les microorganismes. Une faible part de la turbidité peut être due également à la présence de matières colloïdales d'origine organique ou minérale. Les unités utilisées pour exprimer la turbidité proviennent de la normalisation ASTM (American Society for Testing Material) qui considère que les trois unités suivantes sont comparables:
Unité JTU (Jackson Turbidity Unit) = unité FTU (Formazine Turbidity Unit) = unité NTU (Nephelometric Turbidity Unit) [11].

2.2.2 Couleur

Une eau pure observée sous une lumière transmise sur une profondeur de plusieurs mètres émet une couleur bleu clair car les longueurs d'ondes courtes sont peu absorbées alors que les grandes longueurs d'onde (rouge) sont absorbées très rapidement [11]. La coloration d'une eau est dite vraie ou réelle lorsqu'elle est due aux seules substances en solution. Elle est dite apparente quand les substances en suspension y ajoutent leur propre coloration. En générale, la couleur des eaux usées est grisâtre qui devient noirâtre avec le temps [9].

2.3 Paramètres Chimiques

2.3.1 Potentiel Hydrogène

L'acidité, la neutralité ou l'alcalinité d'une solution aqueuse peut s'exprimer par la concentration en H_3O^+ (noté H^+ pour simplifier). De manière à faciliter cette expression, on utilise le logarithme décimal de l'inverse de la concentration en ion H^+ : c'est le pH [12].

2.3.2 Conductivité

La conductivité est la propriété que possède une eau de favoriser le passage d'un courant électrique. Elle est due à la présence dans le milieu d'ions qui sont mobiles dans un champ électrique. Elle dépend de la nature de ces ions dissous et de leurs concentrations. L'unité de conductivité est le siemens par mètre (S/m). $1 \text{ S/m} = 104 \mu\text{S/cm} = 103 \text{ mS/m}$ [13].

2.3.3 Oxygène Dissous

L'oxygène dissous est un composé essentiel de l'eau car il permet la vie de la faune. Cependant, il conditionne les réactions biologiques qui ont lieu dans les écosystèmes aquatiques. La solubilité de l'oxygène dans l'eau dépend de différents facteurs, dont la température, la pression et la force ionique du milieu. La concentration en oxygène dissous est exprimée en $\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$. C'est un paramètre très important qui se détermine in situ avec un oxymètre. L'oxygène dissous donne une mesure indirecte du degré de pollution d'une eau. [9], [14].

2.3.4 Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène englobe la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation de l'ensemble des matières minérales et organiques biodégradables ou non, présentes dans un milieu. Soit donc à la fois les matières oxydables par les processus purement chimiques et celles oxydables par les processus biochimiques. La DCO étant fonction des caractéristiques des matières présentes, de leurs proportions respectives, des possibilités de l'oxydation [15].

2.3.5 Demande Biochimique en Oxygène (DBO)

La demande biochimique en oxygène est, par définition, la quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes vivants présents dans le milieu pour assurer l'oxydation et la stabilisation des matières organiques présentes dans l'eau usée. Par convention la DBO_5 est la valeur de DBO obtenue après cinq jours d'incubation. L'essai normalisé prévoit un ensemencement microbien à l'aide d'eau usée domestique, d'une eau de rivière ou d'un effluent de station, avec une incubation à 20°C , à l'abri de la lumière [10]. Pratiquement, la demande biochimique en oxygène devrait permettre d'apprécier la charge du milieu considéré en substances putrescibles, son pouvoir auto-épuration et d'en déduire la charge maximale acceptable, principalement au niveau des traitements primaires des stations d'épuration [9].

2.3.6 Biodégradabilité

La biodégradabilité traduit l'aptitude d'un effluent à être décomposé ou oxydé par les microorganismes qui interviennent dans le processus d'épuration biologique des eaux. Elle est exprimée par le rapport DCO/DBO₅:

Si $DCO/DBO_5 < 1,5$ les matières oxydables sont constituées en grande partie de matières fortement biodégradables.

Si $1,5 < DCO/DBO_5 < 2,5$ les matières oxydables sont moyennement biodégradables.

Si $2,5 < DCO/DBO_5 < 3$ les matières oxydables sont peu biodégradables.

Si $DCO/DBO_5 > 3$ les matières oxydables sont non biodégradables.

Le rapport DCO/DBO₅ très élevé traduit la présence dans l'eau d'éléments inhibiteurs de la croissance bactérienne, tels que les sels métalliques, les détergents, les phénols, les hydrocarbures, etc. Ainsi, la valeur du rapport DCO/DBO₅ détermine le choix de la filière de traitement à adopter. Si l'effluent est biodégradable, on applique un traitement biologique. Si non, on applique un traitement physico-chimique [16].

2.3.7 Azote

L'azote présent dans l'eau peut avoir un caractère organique ou minéral. L'azote organique est principalement constitué par des composés tels que des protéines, des polypeptides, des acides aminés, de l'urée. Le plus souvent ces produits ne se trouvent qu'à de très faibles concentrations. Quant à l'azote minéral (ammoniacal, nitrate, nitrite), il constitue la majeure partie de l'azote total des eaux usées [17].

2.3.7.1 Nitrates

Les nitrates qui se trouvent naturellement dans les eaux proviennent, majoritairement, de l'action de l'écoulement des eaux sur le sol qui constitue le bassin versant. Leurs concentrations naturelles ne dépassent pas 3 mg /L dans les eaux superficielles et quelques mg/L dans les eaux souterraines. La nature des zones de drainage joue donc un rôle essentiel dans leur présence et l'activité humaine accélère le processus d'enrichissement des eaux en nitrates. La teneur en nitrates est en augmentation ces dernières années, de l'ordre de 0,5 à 1 mg/l/an, voire 2 mg/l/an dans certaines régions. Cette augmentation est due, principalement, à l'agriculture intensive avec utilisation massive d'engrais azotés et les rejets d'effluents d'élevage. Cette source représente les 2/3 de l'apport en nitrates dans le milieu naturel. Ainsi, les rejets des eaux épurées des stations d'épuration où l'élimination de l'azote n'est pas totale, donnent des nitrates ou des ions ammonium qui se transforment en nitrates

dans le milieu naturel. Une source urbaine qui représente les 2/9 des apports en nitrates. Sans oublier les rejets des industries minérales, en particulier, de la fabrication des engrais azotés, qui constituent la troisième source industrielle et qui représente 1/9 des apports en nitrates [11].

2.7.3.2 Azote ammoniacal

Pour désigner l'azote ammoniacal, on utilise souvent le terme d'ammoniaque qui correspond aux formes ionisées (NH_4^+) et non ionisées (NH_3) de cette forme d'azote. L'ammoniaque constitue un des maillons du cycle de l'azote. Dans son état primitif, l'ammoniac (NH_3) est un gaz soluble dans l'eau, mais, suivant les conditions de pH, il se transforme soit en un composé non combiné, soit sous forme ionisée (NH_4^+). Les réactions réversibles avec l'eau sont fonction également de la température et sont les suivantes :



2.3.8 Phosphore

Le phosphore peut exister dans les eaux en solution ou en suspension, à l'état minéral ou organique. Les composés phosphorés qui, sans hydrolyse ou minéralisation, répondent au test spectrophotométrique, sont considérés comme étant des *ortho*-phosphates. On distingue donc, le phosphore organique (résidu de la matière vivante) et le phosphore minéral ou les *ortho*-phosphates (PO_4^{3-}) (agent fertilisant). Le phosphore minéral représente entre 50 à 90% du phosphore total.

$$\text{P Total} = \text{P organique} + \text{P minéral} \text{ [18].}$$

2.3.9 Sulfate

La concentration en ion sulfate des eaux naturelles est très variable. Dans les terrains ne contenant pas une proportion importante de sulfates minéraux, elle peut atteindre 30 à 50 mg/L, mais ce chiffre peut être très largement dépassé (jusqu'à 300 mg/L) dans les zones contenant du gypse ou lorsque le temps de contact avec la roche est élevé. La teneur en sulfates des eaux doit être reliée aux éléments alcalins et alcalinoterreux de la minéralisation. Leur présence dans l'eau est généralement due à des rejets en provenance d'ateliers de blanchiment (laine, soie, etc.), d'usines de fabrication de cellulose (pâte à papier, etc.) et d'unités de déchloration. Sont utilisées, par ailleurs, les propriétés réductrices des sulfites dans les eaux de chaudières pour éviter la corrosion liée à la présence d'oxygène dissous; l'injection dans le circuit se fait habituellement en continu à la concentration de 20 mg/L.

Cependant un excès d'ions sulfites dans les eaux de chaudières peut avoir des effets néfastes car il abaisse le pH et peut alors développer la corrosion. En cas de rejet dans l'environnement, les sulfites se combinent à l'oxygène en donnant des sulfates [19].

2.4 Paramètres biologiques

La composition des eaux usées est extrêmement variable, en fonction de leur origine industrielle ou domestique. Elles peuvent contenir de nombreuses substances, sous forme solide ou dissoute, ainsi que de nombreux microorganismes [20]. Les eaux usées contiennent tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales. Cette flore entérique normale est accompagnée d'organismes pathogènes. L'ensemble de ces microorganismes est classé en quatre grands groupes: les bactéries, les protozoaires, les virus et les helminthes.

2.4.1 Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus communément rencontrées dans les eaux usées. Les eaux usées urbaines contiennent environ 10^6 à 10^7 bactéries/ml dont la plupart sont des *proteus* et des entérobactéries: 10^3 à 10^4 des streptocoques et de 10^2 à 10^3 de *Clostridium*. La concentration de bactéries pathogènes est très variable et peut atteindre 10^4 germes/L. Les pathogènes les plus détectées sont les Salmonelles, dont celles responsables de la typhoïde, la paratyphoïdes et les troubles intestinaux. Les coliformes thermotolérants sont des germes témoins de contamination fécale communément utilisés pour contrôler la qualité relative d'une eau [21]. En plus de ces germes, les eaux usées d'une station d'épuration contiennent des espèces autochtones considérées comme acteurs majeurs des biodégradations telles que: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* et autres [22].

2.4.2 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, ils peuvent survivre plusieurs semaines voir même plusieurs années [23]. Plusieurs protozoaires pathogènes sont identifiés dans les eaux usées [24]. Parmi les plus important du point de vue sanitaires sont *Entamoeba histolytica* responsable de la dysentérie amibienne, *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium paravum* [25]. Il est considéré que seulement de 10 à 30 kystes forment une dose suffisante pour causer des troubles sanitaires [23].

2.4.3 Les virus

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui ne peuvent se multiplier que dans leur cellule hôte. Leur concentration estimée dans les eaux usées urbaines est comprise entre 10^3 à 10^4 particule/L. Leur isolement et leur dénombrement des eaux usées restent difficile, ce qui conduit vraisemblablement à une sous estimation de leur nombre réel. Les virus entériques sont ceux qui se multiplient dans le trajet intestinal. Parmi les virus entériques humains, les plus nombreux, il faut citer: les entérovirus, les rotavirus, les rétrovirus, les adénovirus et les virus de l'hépatite A. Il semble que les virus sont plus résistants dans l'environnement que les bactéries, du fait qu'au cours du processus du traitement des eaux usées sont les plus difficile à être éliminer par rapport aux bactéries classiques couramment utilisées comme indicateurs de la qualité bactériologique des eaux [25].

2.4.4 Les helminthes

Les helminthes sont des parasites intestinaux, fréquemment rencontrés dans les eaux résiduaires. Dans les eaux usées urbaines, le nombre d'œufs d'helminthes peut être évalué de 10 à 10^3 germes/L. Beaucoup de ces helminthes ont un cycle de vie complexe qui comprend un passage obligatoire par une hôte intermédiaire [26]. Le stade infectieux de certains helminthes est l'organisme adulte ou la larve, alors pour d'autres c'est les œufs. Les larves et les œufs sont résistent dans l'environnement et le risque lié à leur présence est à considérer pour le traitement et la réutilisation des eaux résiduaires. En effet la persistance de ces organismes à différentes conditions environnementales ainsi que leur résistance à la désinfection permet leur reproduction, ce qui constitue leur risque potentiel. Les helminthes pathogènes rencontrés fréquemment dans les eaux usées sont: *Ascaris lumbricades*, *Oxyuris vermicularis*, *Tichuris trichuria*, *Taenia saginata*. L'analyse des risques sanitaires liés aux agents pathogènes susceptibles d'être transportés par les eaux usées est le fondement des recommandations proposées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1989 [27].

3. La pollution des eaux

Les eaux de surfaces constituent un écosystème où règne une communauté d'êtres vivants qui établissent des relations et interactions entre eux et leur milieu. Dans ce fragile équilibre, si un seul facteur de l'écosystème est modifié, l'équilibre qui est perturbé. C'est ainsi que la présence ou la surabondance d'un élément dans un écosystème dont il est normalement

absent constitue une pollution. Nos eaux usées contiennent de nombreux éléments polluants. Ces polluants, s'ils se retrouvent directement dans les milieux naturels, perturbent les écosystèmes. Les eaux usées nécessitent d'être traitées avant leur évacuation dans le milieu récepteur, la protection de l'environnement en dépend [15].

3.1 Définition

La pollution résulte de l'introduction dans un milieu de substances conduisant à son altération [28]. La pollution de l'eau dépend de son usage : les eaux de cuisine contiennent essentiellement des restes d'aliments, des graisses et des détergents. Les eaux de lavage sont souillées par les saletés, des savons et des détergents. Les eaux de W.C (eaux vannes) contiennent beaucoup de matières organiques. On y trouve l'azote qui va se transformer en nitrates ainsi que des germes parfois dangereux. L'industrie est susceptible de déverser les polluants suivants: des matières en suspension diverses telles que les fibres et les écorces, des matières organiques qui accroissent la DBO, des matières inorganiques diverses (métaux et oxyde métalliques), des hydrocarbures provenant de la fabrication des machines. Les rejets en milieux aquatiques contiennent également des substances phénoliques comme les crésols, les catéchols et d'autres composés [29] (Tableau1).

Tableau1: Les sources de pollution des eaux [30].

Substances	Origines	Effets
Hydrocarbures Essences, huiles, Ordures	Transports routiers, industries, accidents pétroliers, fuites lors des déchargements des pétroliers, lessivage par la pluie des zones urbaines (parking, route)	Altération des mécanismes physiologiques de tous les organismes vivants
Métaux lourds	Transports routiers, industries métallurgiques et pétrochimiques, peinture et carénage des bateaux	Affectent surtout les animaux Ralentissement de la croissance Altération des organes Classement par ordre de nocivité croissante : Hg>Ag>Cu>Cd>Zn>Pb>Cr>Ni>Co
Pesticides et Insecticides	Utilisation domestique, agriculture	Trouble du métabolisme et du système neurologique Altération des processus enzymatiques
Composés azotés et phosphatés	Agriculture, aquaculture, industries agroalimentaires, eaux usées domestiques	Phénomène d'anoxie et d'eutrophisation
Détergents	Eaux usées domestiques, industries	Affectent les plantes et les algues Effet amplifié si combinaison avec des hydrocarbures
Matières en Suspension MES	Eaux usées domestiques, lessivages des sols, industries	Diminution apport de lumière

3.2 Les micropolluants

Le terme « micropolluant » désigne un ensemble de substances qui, en raison de leur toxicité, de leur persistance et de leur bioaccumulation, sont de nature à engendrer des nuisances même lorsqu'elles sont rejetées en très faibles quantités. Les principaux micropolluants sont des métaux et des métalloïdes à base de mercure, cadmium, arsenic, plomb, chrome, sélénium, cuivre, thallium.... Ils comportent aussi des composés phénoliques, des organohalogénés (Lindane, DDT, PCB,...) des organophosphorés (parathion, malathion,...), certains hydrocarbures (HAP,...), des composés organotanniques ou encore des dérivés nitrates. Hormis les métaux, les métalloïdes et certains hydrocarbures, la presque totalité des micropolluants sont des molécules de synthèse. Leur diffusion vers le milieu naturel peut se faire, entre autres, à partir des effluents industriels de nature très diverses: industrie chimique, industrie des métaux, industrie papetière (synthèse d'organochlorés par blanchiment de la pâte au chlore), industrie textile (colorants), industrie de la tannerie (chrome), industrie du bois (phénols, crésols), etc. [31], [32].

4. Effets des eaux usées sur le milieu récepteur

On les observe dans plusieurs domaines, notamment dans les mers et les rivières où elles engendrent des marées noires ou encore la mort de poissons, suite à l'intoxication dues aux lessives ou à des rejets industriels. Ainsi, en 1975, le déversement de cyanure dans la Moselle détruisit 40 tonnes de poissons, alors que le rejet dans le Rhin d'un insecticide entraîna la mort de 50% des poissons. Quand les eaux résiduaires contiennent des huiles ou des graisses, la formation de films peut s'opposer à l'accès de l'oxygène dans les cours d'eau et provoquer des effets d'intoxication sur les microorganismes et les poissons. Les huiles et les graisses végétales et animales peuvent être assez facilement dégradées par voie biochimique mais c'est le contraire pour les huiles et les graisses minérales. Des effets toxiques sur les microorganismes et les poissons peuvent également être provoqués par des déversements d'eaux résiduaires industrielles contenant des tannins, des goudrons, des colorants. D'une manière générale, diverses substances toxiques, minérales ou organiques, peuvent être contenues dans les eaux résiduaires industrielles, elles peuvent détruire la faune des rivières ou remettre en question la potabilisation de l'eau des rivières pour les besoins domestiques.

En Algérie, les eaux usées sont généralement déversées en l'état dans les cours d'eau, ou en mer, avec dans les deux cas des problèmes de pollution biologique et chimique. Les cours d'eau fortement pollués traversent ou passent à proximité d'agglomérations urbaines et

de zones industrielles majeures (oued EL-HARRACH à ALGER, oued SOUMMAM à BEJAIA, oued RHUMEL à CONSTANTINE, oued SEYBOUSE à ANNABA...), causant ainsi beaucoup de nuisances, de problèmes sanitaires et d'insalubrité aux riverains. Les oueds véhiculent de fortes charges polluantes et leur capacité de dilution et d'autoépuration ne suffit plus à résorber la charge polluante. Ils se sont transformés, pour la plupart, en égouts à ciel ouvert, notamment en été où leur débit baisse naturellement [1].

5. Epuration des eaux usées

L'épuration des eaux usées est un ensemble de techniques qui consiste à purifier l'eau, un processus qui consiste en fait à éliminer le maximum de polluants exogène afin de rendre l'eau traitée acceptable par le milieu récepteur où elle est, par la suite, reversée. Cependant, la mission de l'assainisseur ne se limite pas uniquement à la mise en place d'un réseau de collecteurs qui déplace les eaux polluées avec leurs nuisances vers l'extérieur de l'agglomération, mais il a également la noble tâche de protéger le milieu récepteur et de préserver la qualité de l'environnement.

5.1 Epuration biologique

L'épuration dite biologique des eaux usées urbaines résulte en fait de deux mécanismes. D'une part, la sédimentation incomplète des matières en suspension et, d'autre part, l'activité biologique de nombreux microorganismes (bactéries, protozoaires...) qui se développent au détriment de la matière organique soluble. Trois types de système d'épuration peuvent être décrits : les étangs d'oxydation ou de stabilisation (ou lagunes d'eaux douces), les systèmes à biomasse fixée (lits bactériens, biodisques, lits fluidisés), les systèmes à biomasse floculée (boues activées). Les processus mis en œuvre dérivent des cycles biogéochimiques. Ces cycles, spécialement ceux du carbone, de l'azote, du phosphore, du soufre, du fer et du manganèse, rendent compte des transformations chimiques des corps organiques et inorganiques existants ou introduits dans le milieu. Ces substances sont soumises à des processus biologiques (biotransformation, biodégradation) et physicochimiques (hydrolyse, volatilisation, solubilisation...) [31].

Les procédés d'épuration biologiques les plus couramment utilisées se présentent selon deux systèmes différents:

Systèmes intensifs (ou systèmes compacts) qui font appel à des technologies appropriées et nécessitent plus d'énergie.

Systèmes extensifs qui font appel aux pouvoirs épurateur de la nature, mais nécessitent plus d'espace [32].

5.1.1 Les techniques intensives

5.1.1.1 Lits bactériens

Le principe de ce procédé consiste à faire ruisseler les eaux usées, préalablement décantées sur une masse de matériaux poreux ou caverneux qui sert de support aux bactéries épurateurs. L'aération est pratiquée soit par tirage naturel soit par ventilation forcée. Il s'agit d'apporter l'oxygène nécessaire au maintien des bactéries aérobies en bon état de fonctionnement. Les matières polluantes contenues dans l'eau et l'oxygène de l'air diffusent, à contre courant, à travers le film biologique jusqu'aux microorganismes assimilateurs. Le film biologique comporte des bactéries aérobies à la surface et des bactéries anaérobies près du fond. Les sous-produits et le gaz carbonique produits par l'épuration s'évacuent dans les fluides liquides et le gaz [33].

5.1.1.2 Disques biologiques ou biodisques

Le procédé de traitement des eaux usées par des disques biologiques ou biodisques, est un procédé de traitement biologique à cultures fixées. Le réacteur biologique est constitué de plusieurs disques minces en plastique montés sur un axe horizontal. Les microorganismes responsables de la dégradation de la matière organique sont fixés naturellement sur les disques et forment un biofilm d'une épaisseur d'environ 1 à 4 mm. Environ 40% de la surface des disques est immergée. Le mouvement rotatif des disques autour de l'axe expose alternativement la biomasse à l'atmosphère et aux eaux usées permettant ainsi l'aération et le mélange des eaux usées. Les forces de cisaillement créées par le mouvement de rotation limitent l'épaisseur du biofilm et entraînent un détachement de la biomasse excédentaire, qui est ensuite séparée de l'effluent au moyen d'un décanteur secondaire [34].

5.1.1.3 Procédé d'épuration par boue activée

Les boues activées constituent l'étape de traitement secondaire dans les stations d'épuration, cette étape a pour but d'éliminer la charge carbonée par une épuration biologique de l'eau usée. C'est un procédé mettant en œuvre un réacteur aérobie à biomasse en suspension. La dégradation des éléments polluants par les microorganismes (bactéries, protozoaires, métazoaires) est à le principe d'épuration par boues activées. Il est évident que la connaissance et la modélisation des cinétiques biologiques mises en jeu sont essentiellement utilisées pour assurer une bonne gestion des installations. Elles permettent

l'estimation des capacités d'élimination de la pollution, de la production de biomasse et la demande en oxygène. Les processus biologiques aérobies sont basés sur des transformations profondes des matières dissoutes, colloïdales, ou en suspension qui constituent le substrat. Ce procédé est actuellement le plus utilisé dans l'épuration des eaux usées [35]. Dans le bassin d'aération les microorganismes s'agglomèrent sous forme de floes et se développent en utilisant la pollution comme substrat nécessaire à la production d'énergie et à la synthèse de nouvelles cellules vivantes [36].

5.1.1.4 Procédé d'épuration par filtration biologique accélérée

La biofiltration est une technique biologique ayant fait l'objet de nombreuses applications industrielles pour la dépollution des gaz ou de l'eau. Cette technique consiste à forcer le passage du gaz ou l'effluent à traiter au travers d'un matériau granulaire sur lequel sont fixés les microorganismes épurateurs. Les biofiltres permettent d'augmenter l'activité d'une culture bactérienne grâce à une plus grande surface d'échange avec le substrat et le dioxygène. En effet les microorganismes sont fixés sur des supports granulaires de taille inférieure à 4 ou 5 mm avec une surface spécifique développée. Les biofiltres peuvent être à flux ascendant ou à flux descendant selon le sens de l'eau et le sens du gaz d'aération, la régénération du support doit être effectuée par un lavage périodique [36].

5.1.2 Les techniques extensives

5.1.2.1 Lagunage

Cette filière d'épuration s'appuie sur le pouvoir épurateur des végétaux aquatiques : algues, hydrophytes (plantes d'eau libre) et héliophytes (plantes du bord des eaux). Tous les lagunages appliquent le même principe. Après une première décantation, les eaux usées traversent des bassins de lagunage plantés ou non. L'épuration s'effectue par les plantes et par les microorganismes fixés sur leurs racines et sur des substrats (graviers, sable...), grâce à l'effet filtrant du sol. Dans certains types de lagunes, les conditions aérobies et anaérobies se succèdent ou coexistent, ce qui permet d'obtenir un bon rendement d'épuration des nutriments (azote et phosphore).

➤ ***Lagunage à microphytes (lagunage naturel)***

Un lagunage naturel est un procédé de traitement biologique des eaux usées. il se fait dans des bassins où est maintenue une tranche d'eau de 0,8 à 1,5 m. Les microphytes qui sont des algues, les petits animaux (protozoaires, rotifères, crustacés) et les bactéries en présence

d'oxygène, transforment les charges polluantes et stabilisent les boues. Les bactéries anaérobies jouent le même rôle dans les sédiments. Le fonctionnement de ce système repose sur l'action combinée des algues unicellulaires et des bactéries. Grâce au rayonnement lumineux, les algues produisent de l'oxygène qui permet la respiration et le développement des colonies bactériennes. Les bactéries ainsi que certains champignons microscopiques dégradent la matière organique en azote ammoniacal. Celui-ci, dans un milieu bien oxygéné, se transforme en nitrates assimilables par les algues, tout comme les phosphates qui proviennent en majeure partie des eaux de lessives. Les algues se multiplient alors dans le milieu et ainsi de suite [37].

➤ ***Lagunage à macrophytes (phytoépuration)***

Dans ce système, l'eau est apparente, de 30 à 40 cm d'eau au dessus d'un substrat composé, le plus souvent, de graviers ou de sable dans lequel sont repiqués les végétaux aquatiques. Ce système nécessite une superficie suffisamment grande: 10-12 m² par usager. Les eaux usées séjournent simplement dans une série de bassins à ciel ouvert peuplés de végétaux aquatiques. Le roseau (ou phragmite) et autres plantes vigoureuses ont été largement utilisés à cet effet sous le nom de «macrophytes ». Ces dernières consomment les composés polluants dissous dans l'eau (azote et phosphore), qui constituent pour eux des éléments nutritifs. Par ailleurs elles servent de supports à de nombreux organismes microscopiques (algues et bactéries) qui font la plupart du travail. Les végétaux fixent les colonies de bactéries sur la base de leurs tiges et leurs rhizomes (tiges souterraines), ce qui améliore les performances des organismes épurateurs. Par ailleurs, ils absorbent par leurs racines une partie (10 % environ) des sels minéraux (nitrates et phosphates) issus de la décomposition de la matière organique présente dans les eaux usées [38].

➤ ***Bassin de finition à hydrophytes***

Ce système comprend deux phases :

❖ **Décanteur-digesteur**

Les eaux usées sont dirigées dans une simple fosse étanche dite décanteur-digesteur. Les matières solides non liquéfiables remontent à la surface et forment une croûte flottante qui au boue d'une quinzaine de jours est suffisamment importante pour empêcher l'introduction de l'oxygène de l'air et la propagation des mauvaises odeurs. Les gaz malodorants (H₂S) sont oxydés par des bactéries lorsqu'ils diffusent à travers la croûte. Les

plantations d'espèces semi-aquatiques améliorent encore la désodorisation et rend l'ensemble plus esthétique. Les matières piégées sous la croûte se liquéfient progressivement et sont entraînées par le courant liquide. La digestion anaérobie des matières organiques est amorcée avec une production limitée de bio-gaz.

❖ **Lagunage à macrophytes**

Les eaux passent ensuite dans des bassins de lagunage couvert de plantes aquatiques flottantes. Le traitement devient aérobie dans la rhizosphère (autour des plantes) et continue à dégrader la matière organique. Les décomposeurs anaérobies du fond produisent des bulles de biogaz qui adhèrent aux particules organiques en suspension dans l'eau. Les allègent et les font remonter à la surface où elles sont piégées dans les racines des plantes. Les plantes libèrent suffisamment d'oxygène par leur racines, leurs feuilles en contact avec l'eau et les stolons pour que vivent dans leur entourage des bactéries aérobies et des invertébrés qui se nourrissent de la boue organique, pour la transformer en sels minéraux. Ces sels minéraux servent au développement des plantes. Le séjour prolongé de l'eau au contact des hydrophytes permet une absorption importante de sels minéraux, ce qui évite l'eutrophisation du milieu naturel récepteur. L'oxygène émis par les plantes favorise l'oxydation des ions ammonium résiduels. Là où il n'existe pas d'exutoires satisfaisants, les eaux du bassin de finition peuvent être épandues de façon diffuse dans un système boisé qui servira de piège pour les nitrates résiduels [39].

5.2. L'épuration physico-chimique

Les filières d'épuration physico-chimiques utilisent des moyens physiques (décantation, flottation, filtres et membranes) et/ou des produits chimiques, notamment des coagulants (chlorure ferrique, sulfate d'aluminium...) et des flocculants. On les utilise pour certains effluents industriels (toxiques) ou lorsque l'on doit gérer des variations rapides des flux à traiter, cas des stations d'épuration de communes touristiques, ou lorsque avec un réseau unitaire on veut faire face à l'arrivée d'eau de pluie [31].

6. Traitement des eaux usées dans les stations d'épuration

La station d'épuration (STEP) permet de traiter les eaux polluées de manière à réduire considérablement leur degré d'altération pour qu'elles puissent être réutilisées ou rejetées dans le milieu récepteur sans impacts. Les normes de rejet précisent les caractéristiques de

ces eaux selon l'usage ultérieur et imposent par conséquent le niveau d'épuration à atteindre. Une station d'épuration comprend en général les étapes de traitements suivantes :

6.1 Prétraitements

L'objectif principal de cette étape est de séparer de la phase liquide les matières solides grossières, parmi les étapes de prétraitements on peut citer: le dégrillage, le dessablage, déshuilage et le dégraissage.

6.1.1 Dégrillage

Il a pour but d'éliminer toutes les impuretés qui pourraient, par obstruction, provoquer dans les pompes des difficultés de fonctionnement, cette étape est très importante parce qu'elle permet de soumettre les eaux usées aux traitements ultérieurs sans problèmes.

6.1.2 Dessablage

Les dessableurs sont utilisés pour la sédimentation de particules minérales contenues dans les eaux usées et ayant une taille de 0,2 à 2 mm. Selon le principe de fonctionnement on distingue, deux types de bassin de dessablage: les dessableurs longitudinaux et les dessableurs circulaires.

6.1.3 Déshuilage et dégraissage

Des séparateurs d'huiles spéciaux ont été réalisés pour séparer l'huile minérale et les produits pétroliers provenant des eaux résiduelles des raffineries. La séparation des huiles se fait dans cette étape par flottation c'est pourquoi, il faut nettoyer aussi bien la surface que le fond du bassin. Pour le nettoyage on utilise des ponts racleurs et des racleurs à chaîne et à lames [40].

6.2 Traitement primaire

Dans l'épuration des eaux usées, le traitement primaire est une simple décantation qui permet d'éliminer la majeure partie des matières en suspension. Les bassins de traitement primaire sont souvent de forme conique mais il existe d'autres types de décanteurs. Cette étape permet d'éliminer 70% environ des matières minérales et organiques en suspension qui se déposent au fond du bassin où elles constituent les boues dites "primaires". Les performances de la décantation peuvent être améliorées en cas des eaux potables par l'ajout des produits chimiques (sulfate d'alumine, chlorure ferrique...) qui neutralisent les particules chargées, en augmentant ainsi la probabilité de collision entre les particules (coagulation

floculation), ainsi que la formation des floccs par la suite facilement décantables. Cette étape permet d'éliminer 90 % des matières colloïdales [41].

6.3 Traitement secondaire

Il consiste à utiliser les bactéries pour éliminer les polluants restants. Cette étape est accomplie en forçant le mélange entre les eaux usées, les bactéries et l'oxygène. L'oxygène aide les bactéries à éliminer plus rapidement les polluants. L'eau est ensuite acheminée dans d'autres réservoirs où les particules solides se déposent à nouveau dans le fond, le traitement secondaire élimine entre 90 et 95% des polluants, soit un abattement de 85 à 90% de la DBO₅ et 90 à 99% des bactéries coliformes [42].

6.4 Traitement tertiaire

L'expression «Traitement tertiaire» peut désigner plusieurs types de traitements ou différentes fonctions en vue d'atteindre un niveau de traitement de qualité supérieure à ce que l'on pourrait normalement atteindre d'un traitement secondaire. Le traitement tertiaire peut viser un enlèvement plus poussé pour des paramètres conventionnels comme les matières en suspension ou encore certains paramètres pour lesquels il y a peu d'élimination dans un traitement secondaire comme le phosphore, les nitrates ...etc. Parmi les étapes du traitement tertiaire :

6.4.1 Déphosphoration

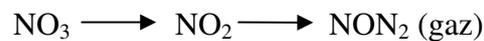
Le phosphore contenu dans les eaux usées domestique constitue un élément nutritif susceptible d'entraîner une croissance excessive d'organismes végétaux (algues, plantes aquatiques) et causer l'eutrophisation du milieu récepteur. Pour être enlevé des eaux usées, le phosphore doit être fixé à des solides qui pourront être séparés de l'effluent au moyen d'un processus physique. L'élimination du phosphore des eaux usées se fait essentiellement par précipitation chimique (sulfate d'alumine, chlorure ferrique, sulfate ferreux, chlorure ferreux, aluminat de sodium, chlorure d'aluminium prépolymérisé), par voie biologique (basée sur un traitement par culture en suspension ou par boues actives) et par l'utilisation des plantes aquatiques flottantes (utilisation de la jacinthe d'eau et la lenticule, ces deux plantes ont été utilisées au Etats-Unis et au Québec, les résultats trouvés sont encourageants) [43].

6.4.2 Désinfection

Les rejets d'eaux usées domestiques peuvent causer une contamination microbienne susceptible d'affecter une prise d'eau en aval ou de compromettre la pratique sécuritaire de nombreux usages de l'eau, comme la consommation de mollusques et les activités récréatives de contact direct avec l'eau (la baignade, le ski nautique et la planche à voile) ainsi que le contact indirect avec l'eau (la pêche sportive, le canotage et la voile). La désinfection des eaux usées s'avère donc nécessaire. La désinfection des eaux usées est exigée lorsque la protection des usagers du milieu récepteur le requiert et seulement durant les périodes de l'année où cette protection est nécessaire. Le désinfectant choisi doit être efficace pour la plupart des microorganismes pathogènes. Ainsi, n'engendre pas la formation de sous produits indésirables et non dangereux pour les humains et pour la vie aquatique. Les moyens de désinfection des eaux usées les plus couramment utilisés, pour les eaux à utilisation spécifique, dans le monde sont la chloration, l'ozonation, les rayons ultraviolets, etc [44].

6.4.3 Dénitrification

La dénitrification consiste à éliminer les nitrates présents dans un élément, en l'occurrence l'eau. L'élimination a lieu par la transformation des nitrates en gaz inerte, le processus peut s'opérer de façon naturelle selon le schéma :



La réaction globale de la dénitrification est la suivante :



La dénitrification aura lieu par l'intermédiaire d'organisme vivant, des bactéries qui ont besoin d'oxygène pour leur propre respiration. *Thiobacillus denitrificans* est une bactérie qui utilise l'oxygène des nitrates et réduit ces derniers en azote gazeux. Ce processus a donc lieu lorsque la bactérie se trouve en présence de nitrates dans un milieu pauvre en oxygène. Plus le milieu est pauvre en oxygène, plus les bactéries vont trouver l'oxygène qui leur manque dans les nitrates. Certaines plantes telles que la luzerne sont également propices à cette dénitrification naturelle. La dénitrification naturelle suppose certaines conditions à savoir, la rareté de l'oxygène, l'alimentation en eau non abondante et des bactéries dénitrifiantes [45].

6.4.4 Traitement des boues

Les boues de stations d'épuration sont des produits résiduaux qui résultent du traitement des eaux usées dans les stations d'épuration. Au cours des traitements primaires et secondaires des boues sont produites. Elles sont classées en trois catégories :

***Les boues primaires** qui sont obtenues au niveau du décanteur primaire, après séparation physique des matières en suspension par décantation, de nature fortement organique.

***Les boues secondaires** qui proviennent des traitements biologiques des eaux usées.

***Les boues mixtes** qui correspondent au mélange des boues primaires et secondaires.

Les constituants des boues les plus importants sont la matière organique, les nutriments, les pathogènes, les métaux et les composés organiques en traces [46]. Les étapes de traitement des boues sont les suivantes :

6.4.4.1 Epaissement

C'est une étape de réduction du volume des boues, elle est réalisée soit par décantation où les boues sont introduites dans un épaisseur où le temps de séjour est élevé. soit par flottation où les microbulles d'air injectées se fixent aux particules de boues et remontent en surface puis elles sont raclées.

6.4.4.2 Stabilisation

A pour objectif de réduire le pouvoir fermentescible des boues et leur nuisance olfactive. Elle est effectuée soit par digestion anaérobie, soit par digestion aérobie thermophile, soit par stabilisation chimique, soit par compostage.

6.4.4.3 Conditionnement

C'est une étape qui conduit à l'élimination d'environ 40 à 50 % de la phase liquide, elle est réalisée par centrifugation, par filtration ou par séchage.

6.4.4.4 Elimination finale

Les boues issues de traitement des eaux usées posent actuellement de réels problèmes environnementaux et économiques pour les collectivités locales, plusieurs filières d'élimination sont actuellement proposées aux producteurs de boues urbaines

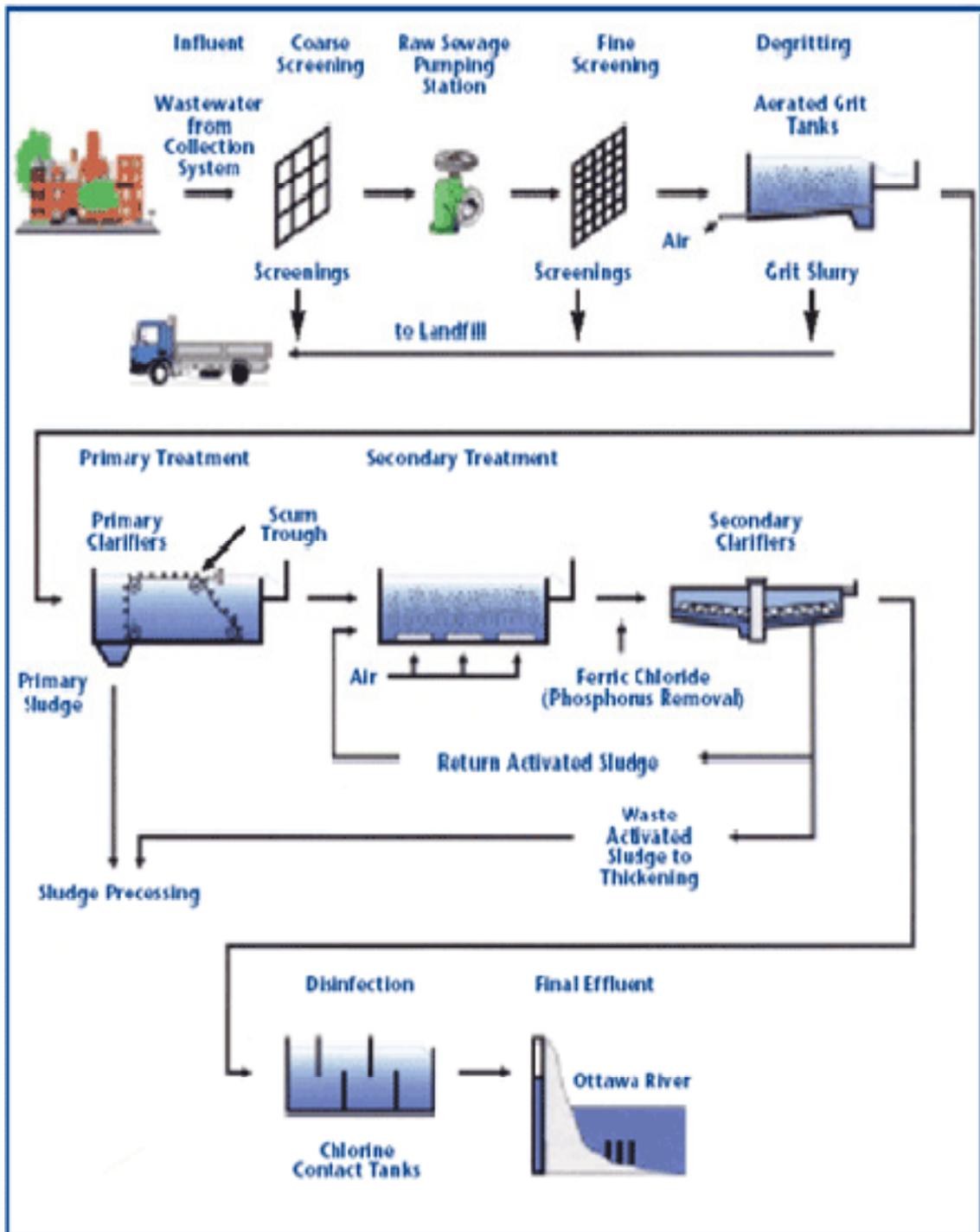


Figure 1: Traitement des eaux usées dans une station d'épuration [47].

Chapitre II: Les composés nitroaromatiques

Les composés nitroaromatiques constituent une classe majeure de xénobiotiques, par leur intégration dans de multiples produits domestiques et industriels. Ces substances nitrées entrent dans la synthèse de pesticides, de produits pharmaceutiques, de plastiques, de colorants, d'explosifs. Ils servent également de précurseurs dans la production de dérivés aminoaromatiques [48]. Par l'étendue de leurs usages et leur mobilité, ces composés sont devenus des polluants majeurs des rivières, des eaux usées, des eaux souterraines, des sols traités par les pesticides et de l'atmosphère urbaine [49]. Les composés nitroaromatiques sont également présents dans les émissions de l'air de combustion [50].

Parmi cette famille de produits, les nitrobenzènes, les nitrotoluènes, les nitrophénols et les nitrobèzoates. Ils sont utilisés dans la fabrication de pesticides, de colorants, d'explosifs, de mousses polyuréthanes, d'élastomères et de divers solvants industriels. Les nitrobiphenyls sont des plastifiants importants et des agents de préservation du bois [51], le chloramphénicol et le nitrozepam sont des médicaments. L' HMX, le RDX et le TNT ont été largement utilisés comme explosifs et posent actuellement un nombre de problèmes environnementaux [52]. La décharge des composés nitroaromatiques dans les eaux usées et l'application généralisée et incontrôlée de pesticides (Parathion, Dinosèbe, Fénitrothion) ont considérablement élargi leur impact sur l'environnement. Certains sont très mutagènes et toxiques: l'*ortho*-Nitrophénol (ONP), le 2,4-dinitrophénol et le *para*-nitrophénol (PNP) sont répertoriés comme polluants majeurs par la US Environmental Protection Agency [2]. L'exposition élevée à ces substances neurotoxiques engendre l'accumulation d'acétylcholine ce qui interfère avec la réponse musculaire et peut entraîner la mort. Une exposition répétée ou prolongée peut provoquer la toxicité cholinergique et la neurotoxicité [53]. Le parathion et le parathion méthylé sont deux pesticides organophosphorés très utilisés dans la protection des cultures [54]. Le *para*-nitrophénol (PNP) est non seulement largement utilisé dans les fabrications industrielles mais c'est un métabolite majeur dans l'hydrolyse du parathion méthylé et du parathion. Par conséquent, il peut s'accumuler dans le sol.

Ces composés peuvent aussi entrer dans les déchets industriels, où ils causent des conséquences néfastes. La majorité de ces composés nitroaromatiques sont hautement toxiques pour les microorganismes et peuvent déstabiliser les systèmes de traitements continus par inhibition de la croissance. Les groupements nitro et chloro, réduisent la densité d'électrons du cycle aromatique et entravant ainsi l'attaque électrophile des oxygénases et

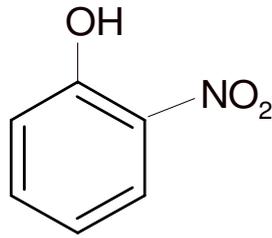
donc la dégradation oxydative des composés aromatiques nitrés. En raison de leur caractère électrophile, ils sont également soumis à la réduction des groupements nitro qui génèrent l'azo biologiquement inerte, l'azoxy et des composés polymérisés [55].

Biologiquement, les composés nitroaromatiques sont soit tout simplement transformés en dérivés, par plusieurs microorganismes, qui se révèlent souvent plus toxiques que la molécule.

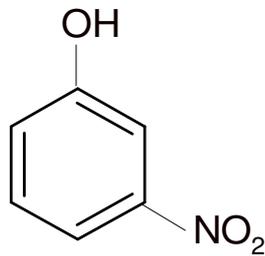
1. Les mononitrophénols

Les mononitrophénols sont des phénols nitrés dont la formule chimique brute est $C_6H_5NO_3$. Ils sont produits industriellement par l'action du chlorure avec l'hydroxyde de sodium à une température pouvant atteindre 200 °C. Trois isomères de Nitrophénols existent:

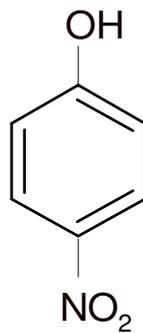
- Le **2-Nitrophénol** (appelé aussi ***o*-nitrophénol** ou **2-hydroxynitrobenzène**) est un composé phénolique qui comporte un groupement nitro sur le carbone 2 du cycle aromatique benzénique.
- Le **3-Nitrophénol** (appelé aussi ***m*-nitrophénol** ou **3-hydroxynitrobenzène**) est un composé phénolique qui comporte un groupement nitro sur le carbone 3 du cycle aromatique.
- Le **4-Nitrophénol** (appelé aussi ***p*-nitrophénol** ou **4-hydroxynitrobenzène**) est un composé phénolique qui comporte un groupement nitro sur le carbone 4, à l'opposé du groupement hydroxyle sur le cycle benzénique (Figure 2) [56].



ortho-Nitrophénol (ONP)



méta-Nitrophénol (MNP)



para-Nitrophénol (PNP)

Figure 2: Structure chimique des mononitrophénols.

Tableau 2: Les propriétés physiques et chimiques des Mononitrophénols [56].

Propriétés	<i>o</i> -Nitrophénol	<i>m</i> -Nitrophénol	<i>p</i> -Nitrophénol
Poids Moléculaire	139,11	139,11	139,11
Couleur	Jaune clair	Jaune foncé	Jaune clair
Aspect physique	Cristaux solides	Cristaux solides	Cristaux solides
Point de fusion	44 - 45°C	96 - 98°C	113 - 114°C
Point d'ébullition	216°C	194°C	287°C
Constante de Dissociation (pKa)	7,21 - 7,23	8,4	7,08 - 7,18
Solubilité dans l'eau distillée	1,4 g/L	Faible (0,1-1%)	16 g/L
Solubilité dans les solvants organiques	Soluble dans : CS ₂ , alkali hydroxydes Benzène, Ether éthylique et l'acétone	Soluble dans : CS ₂ , Benzène, Ether éthylique, chloroforme et l'acétone	Soluble dans : Toluène, Ethanol, chloroforme. Ether éthylique et l'hydroxyde alkyl

2. Toxicité

Les nitrophénols sont irritant pour les yeux, la peau et le système respiratoire et ils peuvent causer des inflammations. Ils ont des interactions avec le sang et forment de la méthémoglobine, responsable de la méthémoglobinémie qui peut causer des cyanoses et des pertes de connaissance. Lorsqu'ils sont ingérés, ils causent des douleurs abdominales et des vomissements. Un contact prolongé avec la peau peut créer une réponse allergique. L'inhalation de concentrations élevées peut causer un accroissement du métabolisme. Une contamination dangereuse de l'air est seulement atteinte lentement, lors de l'évaporation de ces substances à 20°C, ou beaucoup plus rapidement par dispersion de la poussière. La substance peut exploser après échauffement. Elle se décompose en chauffant fortement ou en brûlant, produisant des fumées toxiques comprenant des oxydes d'azote qui provoquent des

risques d'incendie et d'explosion. La substance est un oxydant fort qui réagit violemment avec les matières combustibles et les réducteurs. Les mélanges avec l'hydroxyde de potassium sont également explosifs [57].

3. Biodégradation des composés nitroaromatiques

Plusieurs travaux sont effectués sur le développement des systèmes de traitement par biodégradation. Il est constaté que les microorganismes ont la capacité de convertir les composés nitroaromatiques en intermédiaires qui peuvent servir de substrats de croissance. Les populations microbiennes dégradent les substances nitroaromatiques par différentes voies métaboliques, en particulier si le substrat chimique en question est un analogue d'un substrat microbien ubiquitaire. Les populations microbiennes dégradantes de polluants aromatiques peuvent encore résulter de la sélection naturelle dans des environnements contaminés. *In situ*, la biodégradation par les microorganismes devrait toujours être possible, puisque en général elle est surtout constatée sur des sites de déversements âgés. En raison des processus de la sélection naturelle, il est communément admis que les populations bactériennes les plus anciennes des sites de déversement fortement contaminés seront les plus adaptés à la dégradation du contaminant. De tels microorganismes peuvent être de bons candidats pour une utilisation dans la bioremédiation [58], [59]. En dépit de la toxicité des substances nitroaromatiques, de nombreux microorganismes sont capables de les transformer ou de les dégrader. Les mécanismes de réactions, leur régulation et la nature des enzymes impliquées dans la biodégradation, encore méconnus, laissent de vastes zones pour la recherche. Comprendre la base moléculaire des séquences de leur catabolisme permettra de mettre en valeur leurs capacités en vue de leur exploitation pratique.

Des progrès importants ont été réalisés récemment dans les études sur la biodégradation aérobie et la biodégradation anaérobie des composés nitroaromatiques. Ce qui rend la bioremédiation possible pour la restauration des sites contaminés par ces composés. D'autant que les processus physiques et chimiques sont relativement coûteux (l'incinération, solvants d'extractions). Les traitements peuvent être remplacés à l'avenir par des technologies de biorestoration efficaces et induisant une réduction des coûts [60].

Cependant, plusieurs obstacles doivent au préalable être surmontés avant que la biodégradation ne fournisse une stratégie de traitement efficace pour les composés nitroaromatiques:

*La toxicité des composés nitroaromatiques aux microorganismes.

*La biodisponibilité faible en raison de l'insolubilité ou la sorption du contaminant.

*Les complications causées par le mélange de polluants aromatiques nitrés.

*L'absence de systèmes cataboliques capables de dégrader ces composés dans la communauté microbienne.

Les microorganismes peuvent utiliser ces substrats chimiques comme sources d'énergie, de carbone et/ou d'azote, entraînant leur dégradation plus ou moins importante, parfois ils sont aussi utilisés comme cométabolite [61]. Ce dernier phénomène devient important, en particulier pour la métabolisation de composés chimique complexes par une communauté microbienne ou un consortium. Les conditions du milieu et la disponibilité de certains facteurs, tels que la température, la salinité, le pH, le potentiel redox, la biomasse microbienne et l'exposition antérieure, peuvent affecter le taux de dégradation. Diverses études existent quant à l'utilisation des nitrophénols comme sources de carbone, d'azote et/ou d'énergie par les microorganismes. Ainsi, *Pseudomonas putida* se développe en utilisant l'ONP (*ortho*-nitrophénol) comme seule source de carbone et d'azote [62]. Environ huit souches bactériennes ont été isolées à partir de différents sites pollués par les pesticides en Bulgarie et aux USA. Ces souches utilisent le PNP (*para*-nitrophénol) comme seule source de carbone et d'azote, trois souches d'entre elles utilisent le PNP comme seule source de carbone et d'azote alors que quatre souches utilisent le PNP en tant que source d'azote seulement. Une autre souche identifiée comme *Oachromobacter anthropi* B3 utilise le 2,4-dinitrophénol comme source d'azote [63]. *Pseudomonas cepacia* RKJ 200 isolée par enrichissement sélectif utilise le PNP comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie [64]. *Arthrobacter protophormiae* RKJ 100 est capable d'utiliser le PNP ou le 4-nitrocatéchol comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie produisant ainsi la *p*-benzoquinone (BQ) et l'hydroquinone (HQ) via la voie α -cétoadipate [65]. Les cultures bactériennes de *Ralstonia* sp. SJ 98, *Arthrobacter protophormiae* RKJ 100 et *Burkholderia cepacia* RKJ 200 métabolisent le PNP comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie [66]. Une population microbienne adapté isolée à partir d'une boue activée conservée dans des particules poreuses utilise le PNP comme seule source de carbone, elle dégrade le PNP en donnant le nitrite sans accumulation significative de métabolites intermédiaires [67]. *Pseudomonas* sp. A3, isolée du sol, dégrade le parathion méthylé (MP) et d'autres pesticides, en utilisant la partie aromatique du PNP en tant que source de carbone et d'énergie lors de l'hydrolyse de MP [68]. Trois souches d'*Arthrobacter* sp. Issues de sols contaminés métabolise aussi le PNP comme source de carbone [69]. Par ailleurs, Il est montré que d'autres sources de carbone et des nutriments inorganiques ont un effet profond sur la dégradation des nitrophénols. *Pseudomonas cepacia*, isolée à partir de boues industrielles, est capable d'utiliser le PNP, le DNP (Dinitrophénol), le

DNOC (Dinitro-*ortho*-crésol) ou le NB (Nitrobènzote) comme seule source d'azote mais en présence d'acide succinique comme source de carbone primaire [70]. L'addition de citrate, comme source de carbone secondaire, ne peut pas améliorer la croissance bactérienne de *Pseudomonas putida* 2NP8 aux dépens du nitrobenzène. Mais la souche a pu utiliser l'ONP (*o*-nitrophénol) et le MNP (*m*-nitrophénol) comme substrats de croissance [71]. Ainsi, le taux de la dégradation et de la croissance bactérienne d'une culture mixte de *Comomonas testosteronii* et *Acidovorax delafieldie* ne varie pas en présence de 20 mg/l de PNP, en milieu enrichi d'extrait de levure à 1% [72]. Il est observé que l'addition du glucose, de citrate de sodium et d'acétate de sodium accélère la dégradation du PNP par les bactéries inoculées. La croissance sur un second composé est susceptible d'altérer la cinétique de minéralisation à faible concentration de produits chimiques organiques dans le sol limoneux [73]. Stimulée par le glucose, le PNP est minéralisé par *Corynebacterium sp.*, prélevée du lac de Beebe, le lac du Cayuga [74]. Une boue activée est capable de digérer l'ONP à faible concentration et l'addition de glucose permet la digestion anaérobie des nitrophénols et améliore la tolérance à la toxicité de la boue. La constante de vitesse de la réaction augmente avec une concentration croissante du nitrophénol [75]. Cependant, l'addition de 100 µg/ml de glucose, comme second substrat, n'améliore pas la dégradation de 20µg/ml de PNP par *Corynebacterium sp.* Z4 dans les eaux du lac. Alors que la même concentration de glucose inhibe la dégradation de 20µg/ml du PNP dans les eaux usées par *Pseudomonas sp.* MS. La présence de phénol et du glucose augmente la dégradation du PNP par *Pseudomonas sp.* GR. Or, le phénol n'a aucun effet sur la dégradation du PNP par *Corynebacterium sp.* Z4 [76]. La minéralisation du phénol ou du PNP est rapide avec une croissance importante de *Corynebacterium*, en présence de 5 mM ou de 10 mM de phosphate. Cependant, la croissance est réduite dans un milieu contenant de fortes concentrations de Fer. A une concentration de phosphate de 0,2-0,5 mM et de 5 mM de calcium, la minéralisation du PNP par *Corynebacterium sp.* est inhibée [77]. L'addition de 10 mM de phosphate, ou de nitrate diminue la phase de latence dans le processus de minéralisation de faibles concentrations de PNP (2 µg/ ml à 2 mg /ml) dans les eaux du lac [78].

3.1 Biodégradation aérobie

Les bactéries peuvent souvent tirer du carbone, de l'azote et de l'énergie à partir de la dégradation de substrats nitroaromatiques. La capacité de bactéries à dégrader les nitrophénols et les nitrobènzotes est démontrée depuis plusieurs années. Les premières études sur la biodégradation aérobie des isomères des nitrophénols sont faites sur le lapin

[79], [80]. Ils ont montré, quantitativement, que chez le lapin, *in vivo*, l'*o*-nitrophénol, le *m*-nitrophénol et le *p*-nitrophénol sont conjugués en présence d'acide glucuronique et d'acide sulfurique. Une réduction du *mé*ta et du *para*-isomère est alors détectée. Il reste à démontrer que le PNP est plus toxique que son isomère MNP [81], [82].

Certaines bactéries sont aptes à dégrader en aérobiose une large gamme de composés nitroaromatiques polaires et non polaires. Ces bactéries utilisent une variété de stratégies pour l'élimination et/ou la transformation des groupements nitro. Il s'agit de :

- L'implication notamment de la monooxygénase qui catalyse la transition du groupement nitro en nitrite.
- L'implication de la dioxygénase qui catalyse l'insertion de deux groupements hydroxyles, avec élimination subséquente du groupement nitro en nitrite.
- La réduction partielle du groupement nitro en une hydroxylamine, qui est le substrat de réarrangement ou des réactions d'hydrolyse et d'élimination de l'ammoniac.
- La réduction partielle du noyau aromatique pour former un complexe de Meisenheimer et l'élimination du groupement nitro en nitrite.

3.2 Biodégradation anaérobie

Dans les systèmes anaérobies, les principales réactions de dégradation des composés nitroaromatiques impliquent exclusivement la réduction du groupement nitro. Il est clairement démontré que *Viellonella alkalescens* peut réduire le TNT en anaérobiose, avec une identification de certaines enzymes impliquées dans la dégradation [55]. Par la suite, plusieurs travaux sur une variété de bactéries ont montré leur capacité à réduire les composés nitroaromatiques dans des conditions anaérobies [83],[84],[85]. Des études menées sur *Desulfovibrio sp.* souche B, ont montré qu'il utilise le TNT et une variété d'autres composés nitroaromatiques comme source d'azote et également en tant qu'accepteur d'électrons terminal durant sa croissance [86],[87]. Les composés azotés sont réduits en amines correspondants et les groupements amines sont éliminés du cycle aromatique par un mécanisme analogue à la désamination réductrice [88]. Une souche de *Desulfovibrio* est réalisée par enrichissement sélectif en présence de pyruvate comme source de carbone, du sulfate comme accepteur d'électrons et du TNT en tant que source d'azote. La souche peut alors fixer l'azote atmosphérique et peut également utiliser l'ammoniac comme source d'azote [89]. Plusieurs souches de *Clostridium*, sont reconnues pour leur capacité à réduire les composés nitroaromatiques. Il est démontré que l'hydrogénase et la ferredoxine de *Clostridium kluyveri* sont responsables de la réduction de composés nitroaromatiques [83]. Une culture mixte

anaérobie permet la biodégradation du dinosèbe (2-sec-butyl-4,6-dinitrophénol), sous conditions méthanogéniques et en présence de l'amidon en tant que donneur d'électrons [90]. Des cultures d'enrichissement similaires dégradent le RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine) et le TNT à plusieurs niveaux dans des sols contaminés [59], [91].

Les mononitrophénols sont dégradés dans une moindre mesure que le 2,4-dinitrophénol en anaérobiose [92]. A l'exception de l'ONP qui est nettement métabolisé en l'absence d'O₂, en raison de la réduction anaérobie du groupement nitro. Une croissance faible et aucune excrétion de nitrites ne sont observées à des niveaux toxiques de mononitrophénols (0,5 mM), ce qui suggère l'élimination du groupement nitro sous anaérobiose. Les cellules de *Ralstonia eutropha* JMP134 au repos métabolisent le MNP en N-acetylaminohydroquinone dans des conditions anaérobies [93].

4. Principales réactions de dégradation des nitrophénols

4.1 Réaction d'oxygénation initiale qui donne le nitrite

L'élimination par oxydation du groupement nitro du noyau aromatique donnant le nitrite, est démontrée chez diverses bactéries. Certaines bactéries minéralisent ces composés complètement. Mais elles les utilisent comme source d'azote par élimination oxygénolytique du groupement nitro [94]. Les enzymes responsables de l'élimination du groupement nitro sont identifiées. La nitrophénoloxigénase est isolée et purifiée à partir de *Pseudomonas putida* B2. Cette enzyme convertit le PNP en catéchol et au nitrite (Figure 3) [95].

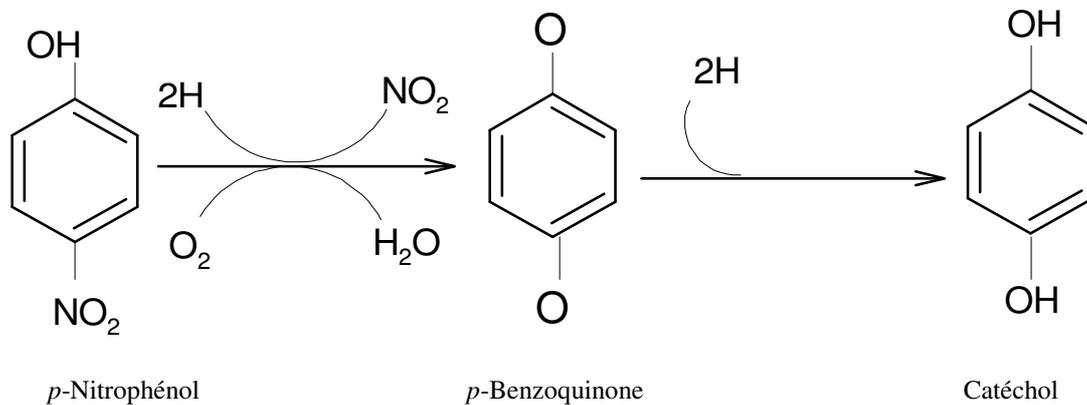


Figure 3: Réaction d'oxygénation initiale qui donne le nitrite.

4.2 Réaction de transformation réductrice

Plusieurs microorganismes dégradent les composés nitroaromatiques en réduisant d'abord le nitro-substituant en un groupement amine qui peut ensuite être libéré sous forme d'ammoniac [96]. L'action des nitroréductases a été démontrée dans des systèmes de cellules libres sous conditions aérobies et anaérobies. Il est constaté que *Ralstonia eutropha* JMP134 convertit les mononitrophénols [93]. Cependant, elle les utilise comme seule source d'azote, de carbone et d'énergie. La réduction se produit par l'intermédiaire d'un nitro-SO et un groupement hydroxylamine. Le composé ainsi produit est ensuite dégradé en ammonium et en catéchol, en présence d'oxygène par une aniline oxygénases. Le catéchol est minéralisé en outre par des enzymes de clivage des cycles. Cette voie est impliquée dans la dégradation de nitrobénzoates, de nitrotoluènes et de nitrophénols. Certaines bactéries ne sont pas capables de minéraliser complètement les composés nitroaromatiques, après réduction du groupement nitro, mais elles utilisent l'ammoniac libéré comme source d'azote (Figure 4)[86],[87],[89].

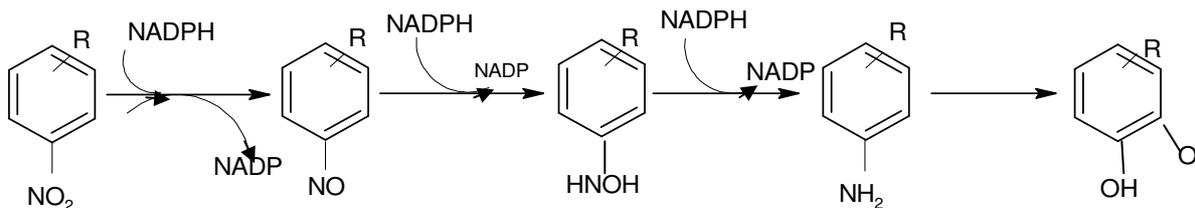


Figure 4: Voie d'élimination du groupement nitro par réaction de transformation réductrice.

4.3 Elimination réductrice complète du groupement nitro par la formation du complexe de Meisenheimer-hydrure

Cette voie est caractérisée par une réduction qui élimine complètement le groupement nitro, donnant le nitrite et la formation d'un complexe hydrure-Meisenheimer comme un des métabolites, indiquant un début d'attaque nucléophile sur le cycle aromatique (Figure 5, Figure 6) par l'ion hydrure. *Rhodococcus erythropolis* métabolise l'acide picrique pour former un complexe orange-rouge (le Meisenheimer-hydrure). Ce dernier est converti en 2,4,6-trinitro cyclohexane avec libération concomitante de nitrite [97].

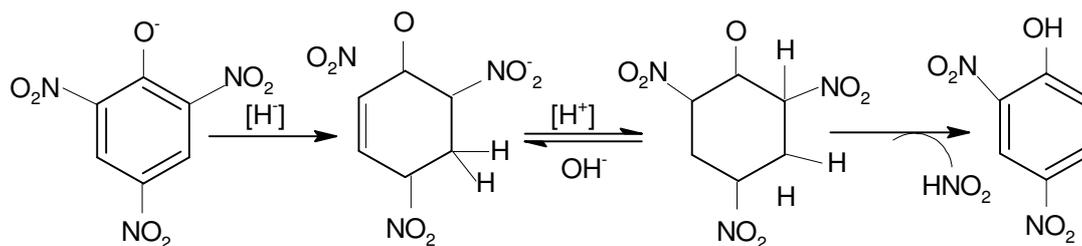
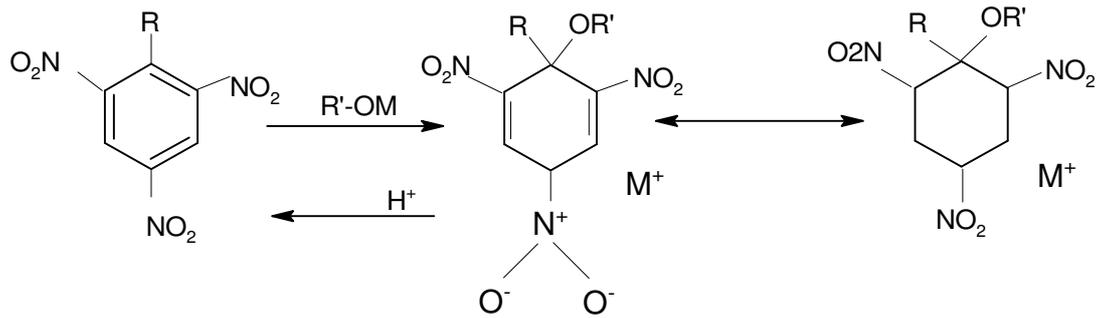


Figure 5: Elimination complète du groupement nitro par réduction complète.

4.4 Réduction du cycle aromatique

Les composés nitroaromatiques peuvent résister aux attaques microbiennes grâce à leurs propriétés d'élimination des électrons du groupement nitro du cycle aromatique, qui causent une déficience en électrons. Un mécanisme alternatif de transformation impliquant la réduction du cycle aromatique est démontré. Des souches de *Rhodococcus erythropolis* utilisent le 2,4-dinitrophénol comme source de carbone, d'énergie et d'azote. Les isolats produisent le nitrite à partir du 2,4-dinitrophénol avec une accumulation transitoire significative de 4,6-dinitrohexanoate. La présence d'enzymes capables de catalyser la réduction du cycle aromatique et l'accumulation de 4,6-dinitro-hexanoate suggèrent que les composés aliphatiques sont des métabolites inertes. Les cellules au repos de *Rhodococcus erythropolis*, cultivées sur le 2,4-dinitrophénol, donnent le nitrite à partir de l'acide picrique et des mutants spontanés qui ne peuvent pas utiliser l'acide picrique comme source d'azote. Les premières réactions de cellules et des extraits cellulaires montrent que l'ajout d'un second ion hydrure conduit à la formation éventuelle du 2,4,6-trinitrocyclo-hexanone qui se décompose pour former le 1,3,5-trinitropentane. En revanche, la protonation du complexe de Meisenheimer hydruré, catalysée par une enzyme, conduit à la réaromatisation de la molécule et à l'élimination de nitrite, qui peut être assimilé par les bactéries avec le 2,4-dinitrophénol généré au cours du processus [97].



R= H, OCH₃
 R'= CH₃, CH₂CH₃
 M= K, Na

Figure 6: Structure chimique du complexe de Meisenheimer.

Partie expérimentale

Chapitre I: Etude de la biodégradation de l'*ortho*-Nitrophénol et du *para*-Nitrophénol

Les microorganismes ont la capacité de convertir les composés nitroaromatiques en intermédiaires de substrats de croissance. Les populations microbiennes dégradent les substances nitroaromatiques par différentes voies métaboliques, en particulier si le substrat chimique en question est un analogue d'un substrat microbien ubiquitaire. Les populations microbiennes dégradantes de polluants aromatiques peuvent résulter de la sélection naturelle dans des environnements contaminés. *In situ*, la biodégradation par les microorganismes devrait toujours être possible, puisqu'en général, elle est constatée sur des sites de déversements âgés. En raison des processus de la sélection naturelle, il est communément admis que les populations bactériennes les plus anciennes des sites de déversement fortement contaminés seront les plus adaptés à la dégradation du contaminant.

La présente étude traite principalement la dégradation de l'*ortho*-nitrophénol (ONP) et du *para*-nitrophénol (PNP) par des cultures bactériennes complexes et non définies, issues des eaux usées de la station d'épuration d'Ibn Ziad / Constantine. La biodégradation est souvent assimilée au catabolisme de composés organiques par une souche microbienne unique. Toutefois, il est de plus en plus évident que la biodégradation dans l'environnement naturel est effectuée par des communautés bactériennes mixtes, présentées comme plus efficaces, même dans les conditions de laboratoire. Le premier objectif de ce travail est d'obtenir un consortium microbien (Microbiote) à partir d'un échantillon des eaux usées apte à dégrader les nitrophénols étudiés à concentration élevée (500 mg/L).

1. Matériel et Méthodes

1.1 Milieu de culture

Le milieu de culture est un milieu minimum où le nitrophénol ajouté est la seule source de carbone, d'énergie et d'azote. Sa composition est la suivante: K_2HPO_4 (0,75g/L), KH_2PO_4 (0,2g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,09g/L), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,06g/L), Nitrophénol (0,5g/L). Le pH du milieu est 7,02 [98].

1.2. Prélèvement de l'inoculum

L'inoculum est constitué du microbiote total des eaux usées de la ville de Constantine. Les prélèvements sont effectués à partir du canal d'entrée de la station d'épuration d'Ibn Ziad, qui est le collecteur général de toutes les eaux usées de la ville. Trois (03) échantillons sont

prélevés manuellement à partir de 8h 30min et à 5 min d'intervalle, par immersion d'un flacon de verre stérile à 20 cm de la surface. Leurs propriétés physico-chimiques : température, débit, conductivité, MES (matières en suspension), DCO (demande chimique en oxygène), DBO₅(demande biochimique en oxygène à 5 jours) sont mesurées *in situ*. Les échantillons prélevés sont alors transportés dans une glacière maintenue à 4°C jusqu'au laboratoire où ils sont traités dès leur arrivée (moins de 02 heures).

1.3 Cinétique de biodégradation et dosages

Les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyer de 250 ml. Le milieu minimum est ensemencé à raison de 3% et incubé à 30°C sous agitation (120 tours/min) pendant 30 jours. A chaque intervalle de temps d'incubation, des aliquotes sont prélevés pour le dosage de l'*o*-Nitrophénol et du *p*-Nitrophénol par méthode spectrophotométrique [100], effectuée par un spectrophotomètre UV-Visible de marque SHIMADZU (Biospec 1601 UV-VIS), selon les courbes d'étalonnage des deux isomères suivantes:

Concentration de l'ONP (mg/L)	0	50	100	150	200	250	300
Absorbance à $\lambda=278$ nm	0	0.166	0.266	0.471	0.623	0.776	0.929

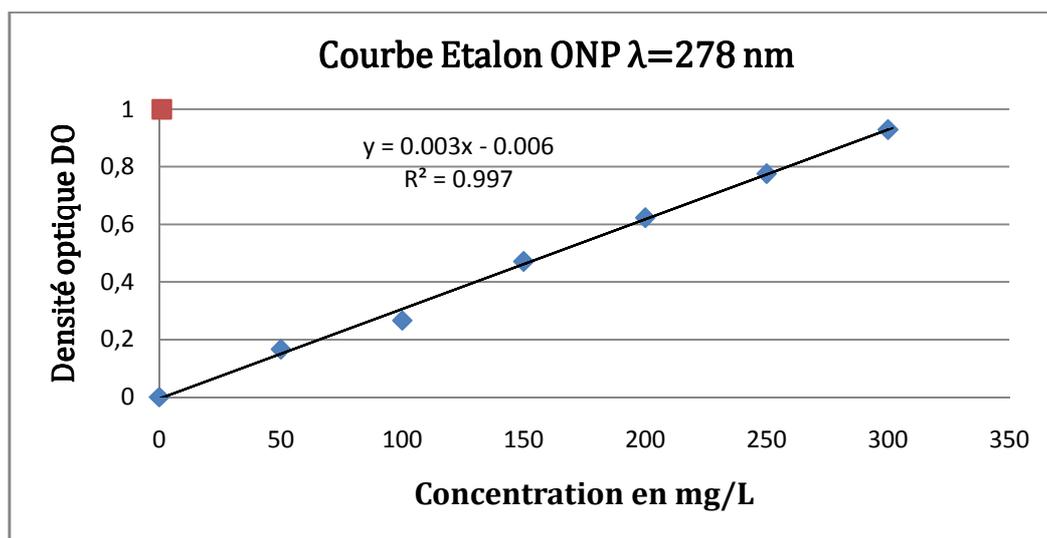


Figure 7: Courbe d'étalonnage de l'ONP.

Concentration du PNP (mg/L)	0	50	100	150	200	250	300
Absorbance à $\lambda=254\text{nm}$	0	0.129	0.205	0.306	0.436	0.507	0.632

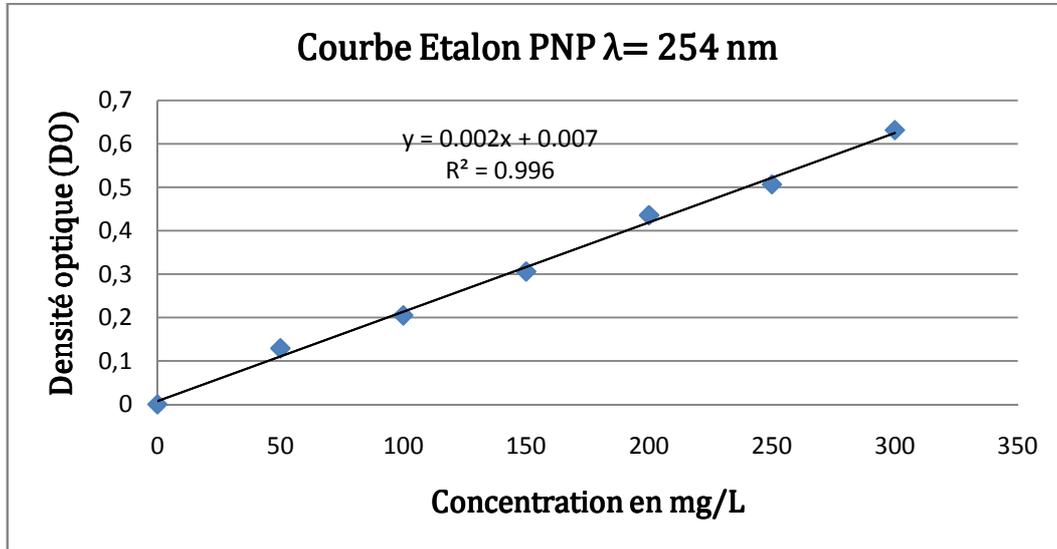


Figure 8: Courbe d'étalonnage du PNP.

Les manipulations sont réalisées en conditions stériles avec deux séries de témoins :

Témoin 1: le microbiote des eaux usées est incubé dans les mêmes conditions expérimentales mais en l'absence du Nitrophénol.

Témoin 2: la molécule est introduite dans les mêmes conditions mais sans le microbiote des eaux usées, afin de vérifier la présence d'une éventuelle dégradation abiotique. Le suivi cinétique de la biodégradation et le dosage de l'ONP et du PNP débutent dès les premières heures d'incubation.

1.4 Identification de métabolites produits de la biodégradation par HPLC

L'identification des produits de la biodégradation de l'*ortho*-nitrophénol et du *para*-nitrophénol est réalisée par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'HPLC utilisée est de type "SHIMADZU" où le système chromatographique utilisé est constitué d'un injecteur à boucle de 20 μl d'une pompe "Model 510", d'un détecteur UV-visible à longueur d'onde variable " LC spectrophotometer Lambda-Max Model 481", d'un intégrateur "Philips PU 4810" et une colonne " μ BONDAPAK" C18, de diamètre intérieur de 4,6 mm et de longueur de 25 cm. L'éluant utilisé est un mélange volumique de 40% de méthanol et de 60%

d'eau bidistillée. Le débit utilisé dans la colonne est de 1ml/min. La longueur d'onde de détection est fixée à 280 nm.

Le contenu de chaque Erlenmeyer est centrifugé à 10000 tours/min. Le surnageant récupéré est filtré puis injecté à la colonne. Après la séparation des métabolites, l'identification est faite par la comparaison des temps de rétentions des pics obtenus des produits par rapports aux standards externes des produits de la biodégradation connus tels que les catéchols, les hydroquinones...[100].

2. Résultats et Discussion

2.1 Evaluation de la biodégradabilité des échantillons des eaux usées prélevées

La charge polluante biodégradable ou non de l'inoculum est quantifiée par la détermination de sa DCO et de sa DBO₅ (Tableau 3). Le rapport DCO/DBO₅ montre, en première estimation, que la biodégradabilité de la matière organique de nos effluents est supérieure à 3 pour le premier échantillon, ce qui indique une charge en matières polluantes de nature non biodégradable. Le rapport DCO/DBO₅ des deux autres échantillons indique une charge organique biodégradable, avec des valeurs inférieures à 3, soit respectivement 2,03 et 1,48 [101].

Tableau 3: Les propriétés physico-chimiques des échantillons des eaux usées prélevés.

Propriétés	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Température	28°C	28°C	28°C
pH	7,96	7,96	7,96
Débit	265 L/s	265 L/s	265L/s
Conductivité	1822 µs/cm	1892 µs/cm	1972 µs/cm
MES	180 mg/L	189 mg/L	192 mg/L
DCO	326 mg/L	326 mg/L	326 mg/L
DBO ₅	100 mg/L	160 mg/L	220 mg/L
DCO/ DBO ₅	3,26	2,03	1,48

2.2 Biodégradation de l'ONP

Selon la figure 9, La biodégradation de l'ONP n'est déclenchée qu'après 2 heures . La dégradation commence avec un rythme très accéléré. En effet, 14% de la concentration initiale de l'ONP sont dégradées seulement après 6 heures d'incubation. Après 24 heures, 20% de la concentration de la molécule sont éliminées par le microbiote des eaux usées. La cinétique de la biodégradation suit le même rythme, selon un profil long, jusqu'au 30^{ème} jour d'incubation où 54% de la concentration initiale de l'ONP sont dégradés après 7 jours et 67% après 30 jours d'incubation. Au-delà, la cinétique de la biodégradation montre un ralentissement, où seulement 77% de la concentration de l'ONP sont décomposées après 60 jours. Situation constatée jusqu'au 80^{ème} jour.

La concentration cinétique de l'ONP dans le témoin stérile, à temps d'incubation égal, ne montre aucune décomposition abiotique de l'ONP, ce profil reste constant au-delà de 60 jours d'incubation (Figure 9).

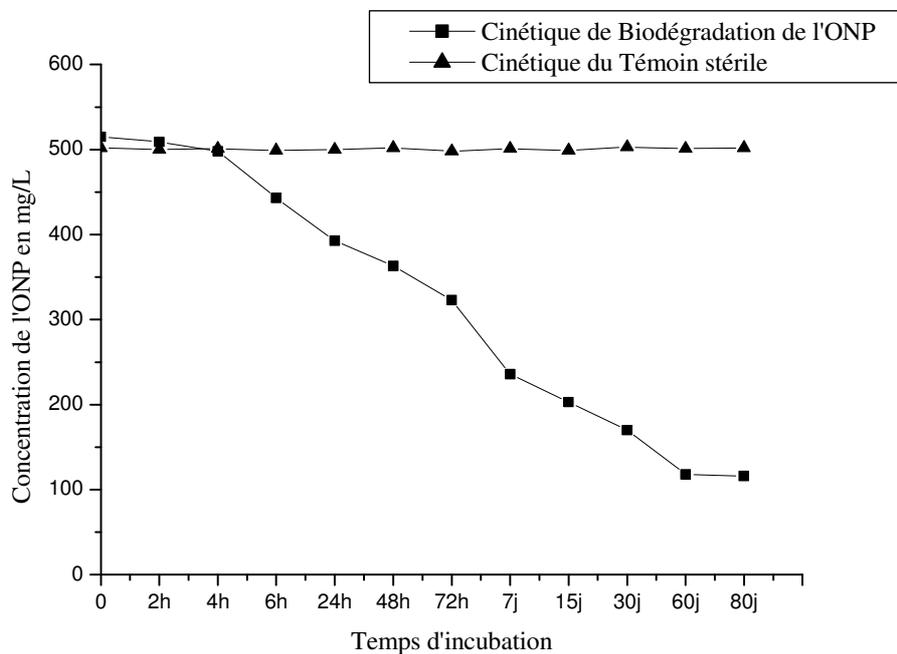


Figure 9: Cinétique de biodégradation de l'ONP après 80 jours d'incubation.

2.3 Biodégradation du PNP

La figure 10 montre que la biodégradation du PNP commence dès les premières heures d'incubation. Après seulement 6 heures, plus de 8% de la concentration initiale du substrat sont dégradés par le microbiote des eaux usées. Au bout de 24 heures ce taux atteint 28%, ce qui montre une accélération de la vitesse de dégradation du PNP qui suit le même rythme et atteint 60% au 7^{ème} jour et 78% au 15^{ème} jour d'incubation. Un ralentissement de sa vitesse de décomposition est constaté durant les 15 jours qui suivent, cependant 13% de la concentration initiale du PNP sont encore dégradés. Par conséquent, le taux de la biodégradation global est de l'ordre de 91% pendant les 30 premiers jours d'incubation. Durant le deuxième mois d'incubation, un ralentissement remarquable de la biodégradation est constaté. En effet, seulement 2% supplémentaires du substrat sont décomposés. Cette situation persiste jusqu'au 60^{ème} jour d'incubation. Au-delà, la biodégradation persiste en phase stationnaire.

La concentration cinétique du PNP dans le témoin stérile, à temps d'incubation égal, est identique à celle de l'ONP. Aucune décomposition abiotique du PNP n'est constatée. Ce profil reste constant au-delà de 60 jours d'incubation (Figure 10).

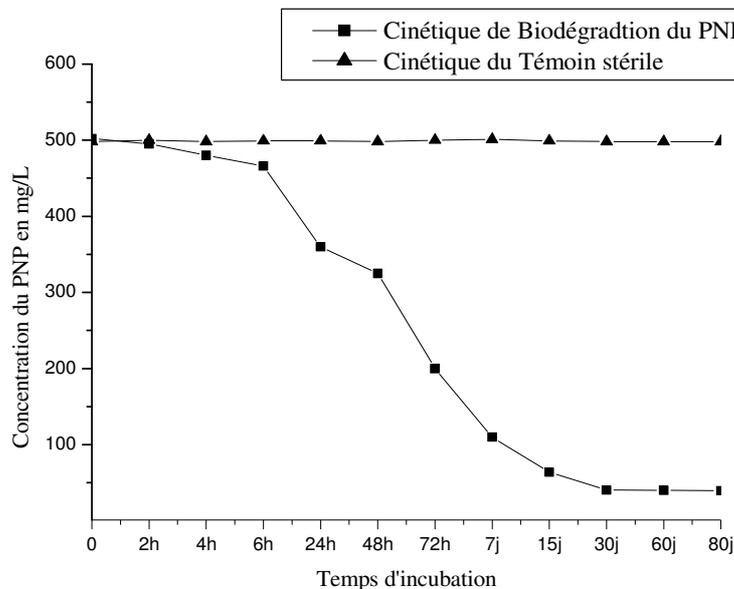


Figure 10: Cinétique de biodégradation du PNP après 80 jours d'incubation.

Les résultats obtenus montrent qu'après seulement 15 jours d'incubation, 78% des 500 mg du PNP initial sont éliminés par l'action du microbiote des eaux usées et sa presque totalité au bout de 30 jours. Ainsi, 77% des 500 mg de l'ONP sont décomposés durant la même période d'incubation. En effet, les concentrations élevées de substances toxiques sont considérées comme inhibitrices de la croissance des microorganismes, empêchant ainsi leur propre métabolisme. Les bactéries qui participent activement à l'épuration biologique des eaux résiduaires peuvent tolérer des concentrations de phénols de 40 à 50 mg/L, sans que leurs activités vitales ne soient compromises [102]. La diminution de la concentration de l'ONP et du PNP dès les premières heures d'incubation, indique une croissance microbienne significative, malgré la concentration du nitrophénol bien plus élevée. Cette situation est vérifiée par la croissance positive obtenue parallèlement sur milieu solide.

Les études menées sur la biodégradation aérobie de l'ONP et du PNP montrent une dégradation rapide et complète, dans la plupart des cas par des souches bactériennes pures et sur des milieux de cultures enrichis [103], [104]. Il apparait, dès lors, que la vitesse de biodégradation des nitrophénols dépend de plusieurs facteurs et des conditions du milieu: concentration du substrat et des nutriments, pH, température, croissance microbienne [105]. D'autres facteurs comme le volume de l'inoculum, l'adaptation de l'inoculum ont de profondes répercussions sur le taux de la dégradation et sur la minéralisation des nitrophénols. En effet, le taux de transformation du PNP en dégradant le pentachlorophénol par *Sphingomonas sp.* UG30 et par *Sphingomonas chloramphenolica* souches RA2 et ATCC 39723, dans un milieu contenant les sels minéraux et le glucose dépend de la concentration initiale du PNP. Dont le taux optimum est à 310 uM et l'inhibition se produit à 1.100 uM ou plus. Une phase de latence initiale est éliminée par la pré-exposition de la souche UG30 au PNP [106]. Ainsi, une boue activée digère de faibles concentrations de l'ONP en anaérobiose et l'addition du glucose favorise la digestion des nitrophénols ainsi que la mise à niveau et la tolérance à la toxicité de la boue [107]. Dans un lit biologique fluide anaérobie utilisé pour traiter les eaux usées synthétiques contenant trois types de nitrophénols, le PNP, est avéré, d'être le plus toxique des nitrophénols, aux bactéries productrices de méthane suivie du MNP et de l'ONP [108]. La détoxification complète de nitrophénols se manifeste à des niveaux sub-toxiques par des boues granulaires dans un digesteur anaérobie [109].

La taille de l'inoculum est importante pour accentuer la biodégradation de faibles concentrations de nitrophénols. En fonction de l'étude menée, lorsque 10.000 cellules/ml d'espèces de *Corynebacterium* sont rajoutés à des eaux souterraines contenant 26 mg de PNP/ml, seulement 5% de la molécule sont dégradées pendant 48 heures. Tandis que 70% de

la concentration initiale du PNP sont dégradées, lorsque la concentration de l'inoculum est apportée à 1×10^5 cellules/ml [81]. Une phase de latence est observée lorsque *Pseudomonas putida* JS444 est traitée avec 300 µg/L du PNP. La durée de la phase est inversement proportionnelle à la densité cellulaire [110].

La biodégradation du phénol, de l'ONP, du MNP et du PNP est à son maximum à un pH optimum de 7,2 et à une température optimale de 28° C, en utilisant 55 isolats de cultures provenant de sols pollués [111]. *Corynebacterium* sp. cultivée à 26°C et à pH 7,2, en aérobiose dans un milieu minérale, convertit 50 mg/l de PNP au 4-nitrocatechol. Cette conversion est affectée par le pH du milieu [112]. Une souche PNP1 dégradant le PNP progresse de façon optimale à pH 7 et à une température comprise entre 35°C et 30°C donnant le nitrite [113]. Les conditions optimales de la biodégradation des nitrobiphenyls à des nitrobenzoïques et la dégradation des nitrophénols et leurs substituant arrivant à l'obtention du nitrite est obtenue à pH de 7,5 à 30°C et avec une densité cellulaire de 1,5 DO à 590 nm [114].

Des études montrent que l'addition de 100 µg/ml de glucose, comme second substrat, n'améliore pas la dégradation de 20 µg/ml de PNP par *Corynebacterium* sp. Z4 dans les eaux du lac. Alors que la même concentration de glucose inhibe la dégradation de 20 µg/ml du PNP dans les eaux usées par *Pseudomonas* sp. MS. La présence de phénol et de glucose augmente la dégradation du PNP par *Pseudomonas* sp. GR. Or, le phénol n'a aucun effet sur la dégradation du PNP par *Corynebacterium* sp. Z4 [77]. La minéralisation du phénol ou du PNP est rapide avec une croissance importante de *Corynebacterium*, en présence de 5 mM ou de 10 mM de phosphate. Cependant, la croissance est réduite dans un milieu contenant de fortes concentrations de Fer. A une concentration de phosphate de 0,2-0,5 mM et de 5 mM de calcium, la minéralisation du PNP par *Corynebacterium* sp. est alors inhibée [115]. Ainsi, l'addition de 10 mM de phosphate, du nitrate ou du sulfate, diminue la phase de latence dans le processus de minéralisation de faibles concentrations de PNP (2 µg/ml à 2 mg/ml) dans les eaux du lac [116].

D'autres études montrent que l'action de souches microbiennes pures est réalisée en quelques heures seulement. Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa* HS-D38 minéralise le PNP à une concentration initiale de 500 mg/L en 24 heures [116]. Alors que *Pseudomonas putida* décompose 300 à 500 mg/L du PNP après 72 heures [97]. *Pseudomonas aeruginosa* est capable de dégrader d'autres types de polluants comme les phénols et l'indole, suggérant que la souche HS-D38 est plus performante car elle dégrade des concentrations plus élevées de PNP, d'où son utilisation comme élément de bioremédiation [117], [118]. Les phénols sont

complètement dégradés après 22 heures par des consortiums microbiens d'eaux usées d'usines productrices de phénols [119]. Des études récentes montrent que la mixture de cultures bactériennes, avec prédominance de *Pseudomonas putida*, dégrade complètement les phénols à une concentration initiale de 600 mg/L, au bout de 26 heures [120].

En général, une adaptation du microbiote est nécessaire pour obtenir la dégradation des phénols à des vitesses significatives.

2.4 Identification des produits de la biodégradation du PNP

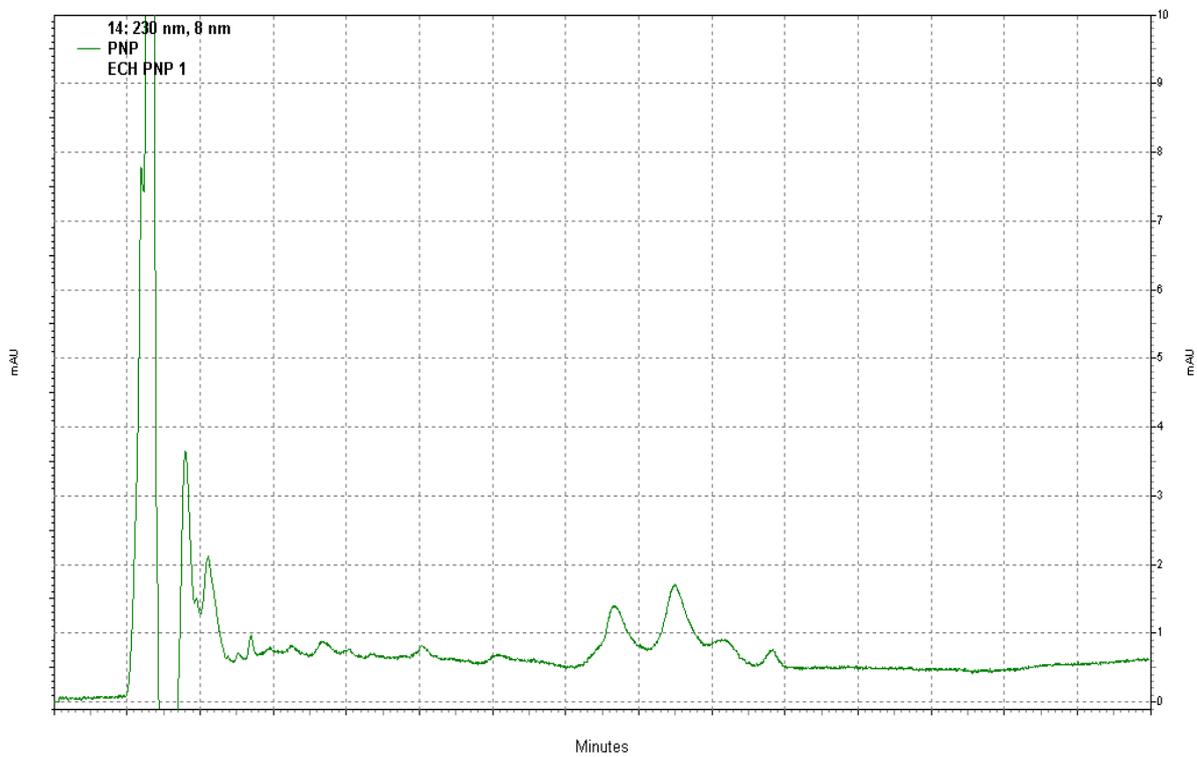
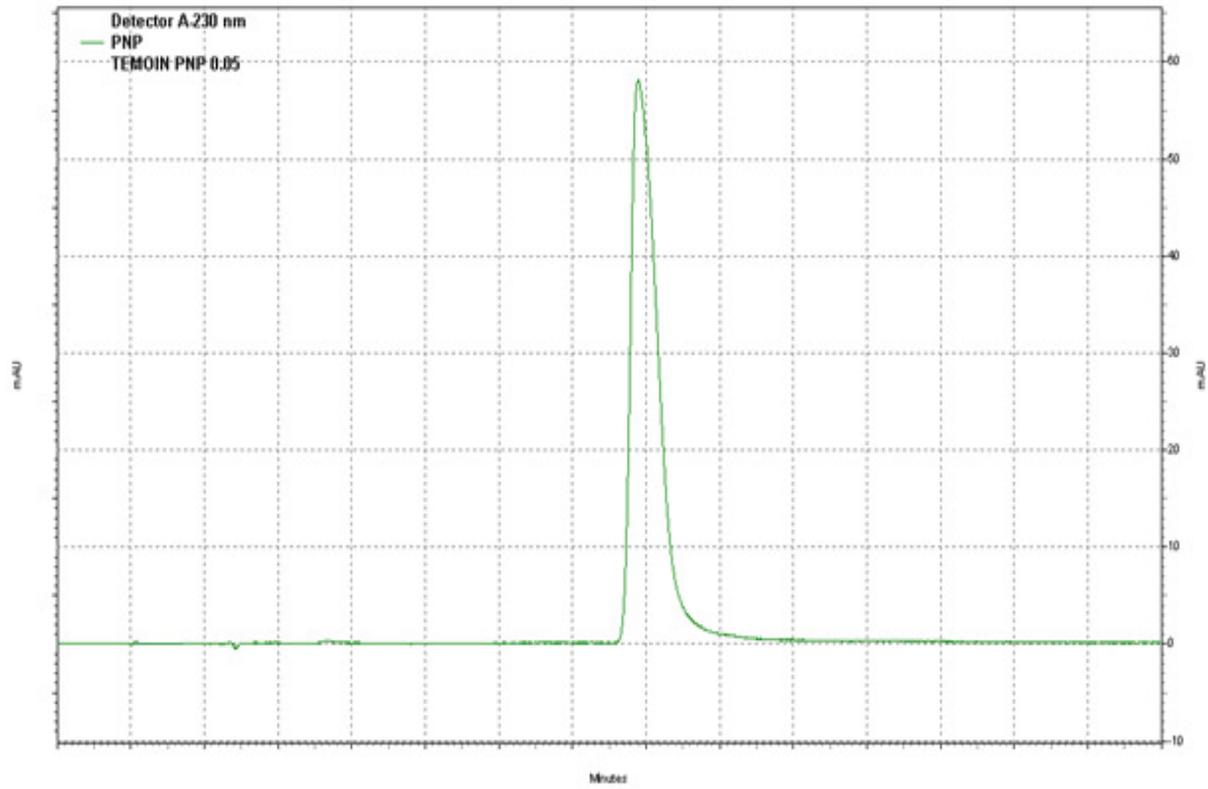
L'analyse par HPLC des échantillons du PNP à $\lambda=280$ nm n'a pas permis d'obtenir des chromatogrammes bien établis. De ce fait, un balayage de longueur d'ondes est effectué jusqu'à l'obtention des pics bien clairs, objectif atteint à $\lambda=230$ nm.

Les chromatogrammes obtenus montrent l'apparition de plusieurs pics, en plus du pic du PNP dont le temps rétention est de 9 min (Témoin PNP). Le chromatogramme de l'échantillon 1, montre l'apparition de 4 pics importants dans les premières minutes, bien plus avant l'élution du pic du PNP. Un pic moins important est obtenu à environ 12 min. Le chromatogramme de la deuxième répétitions (échantillon 2) montre l'apparition de 3 pics avant le PNP. Comme dans le cas de l'échantillon 1, deux petits pics sont observés à environ 4 à 5 min, signe d'éléments en trace. La troisième répétitions (échantillon 3) donne des résultats très proches à ceux obtenus de l'échantillon 2, le même nombre de pics est observé à temps de rétention égal (Figure 11).

Ces résultats confirment la présence dans le milieu de métabolites produits de la biodégradation du PNP.

La comparaison des temps de rétentions des pics obtenus avec ceux obtenus des produits de références permet d'assimiler le premier pic au HNO_2 (acide nitreux) et le deuxième pic au Benzoquinone et le troisième pic au Catéchol (Pyrocathécol).

L'apparition du pic du PNP indique qu'une concentration résiduelle de ce dernier reste non dégradée, ce qui confirme les résultats obtenus dans la cinétique de biodégradation.



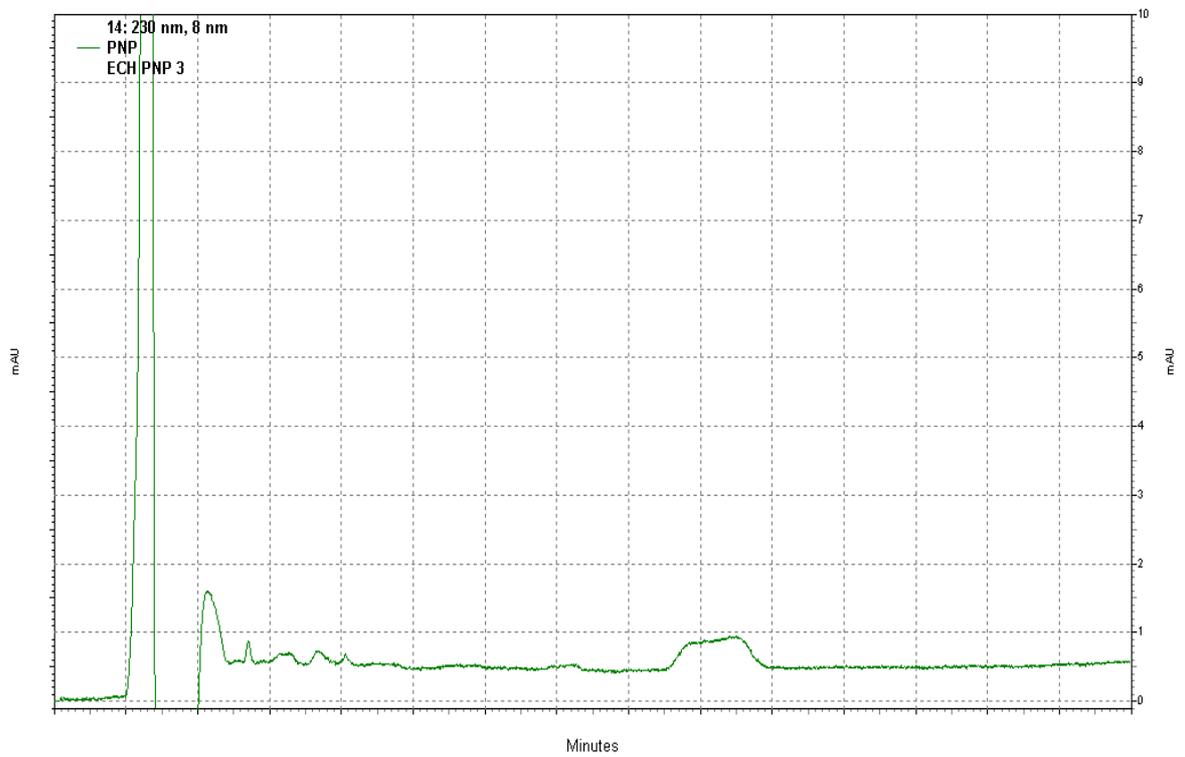
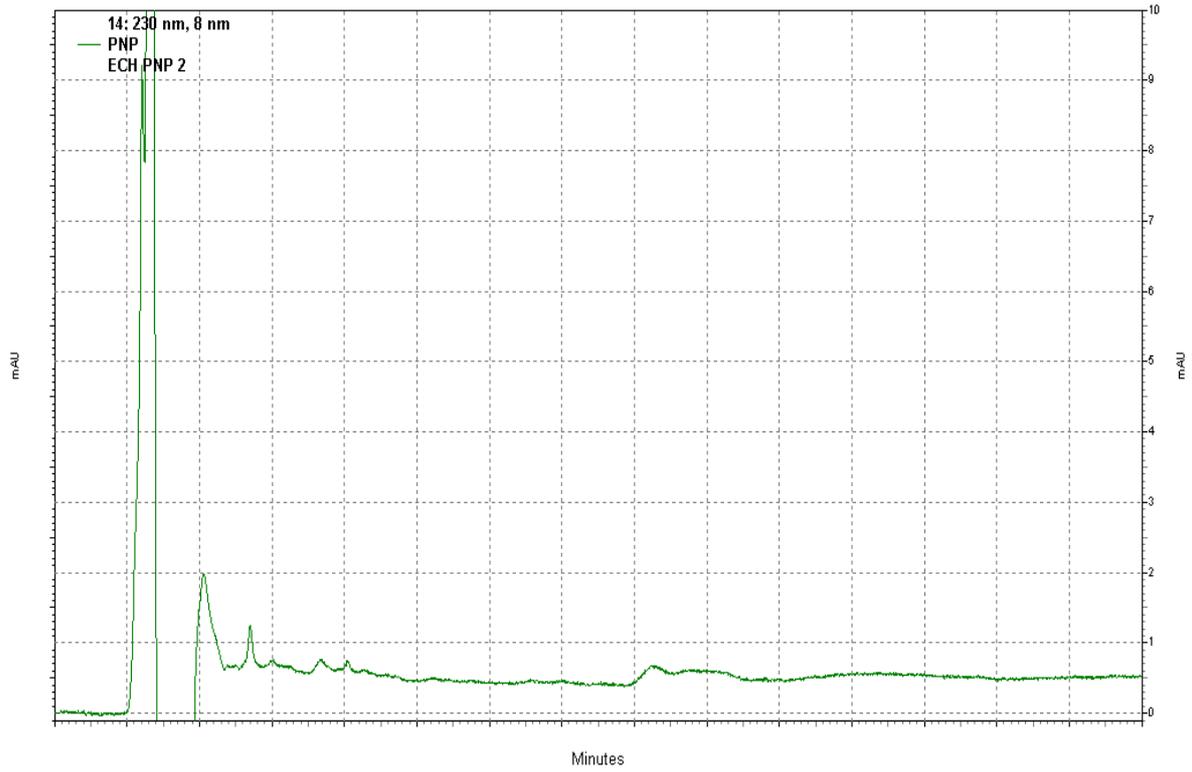


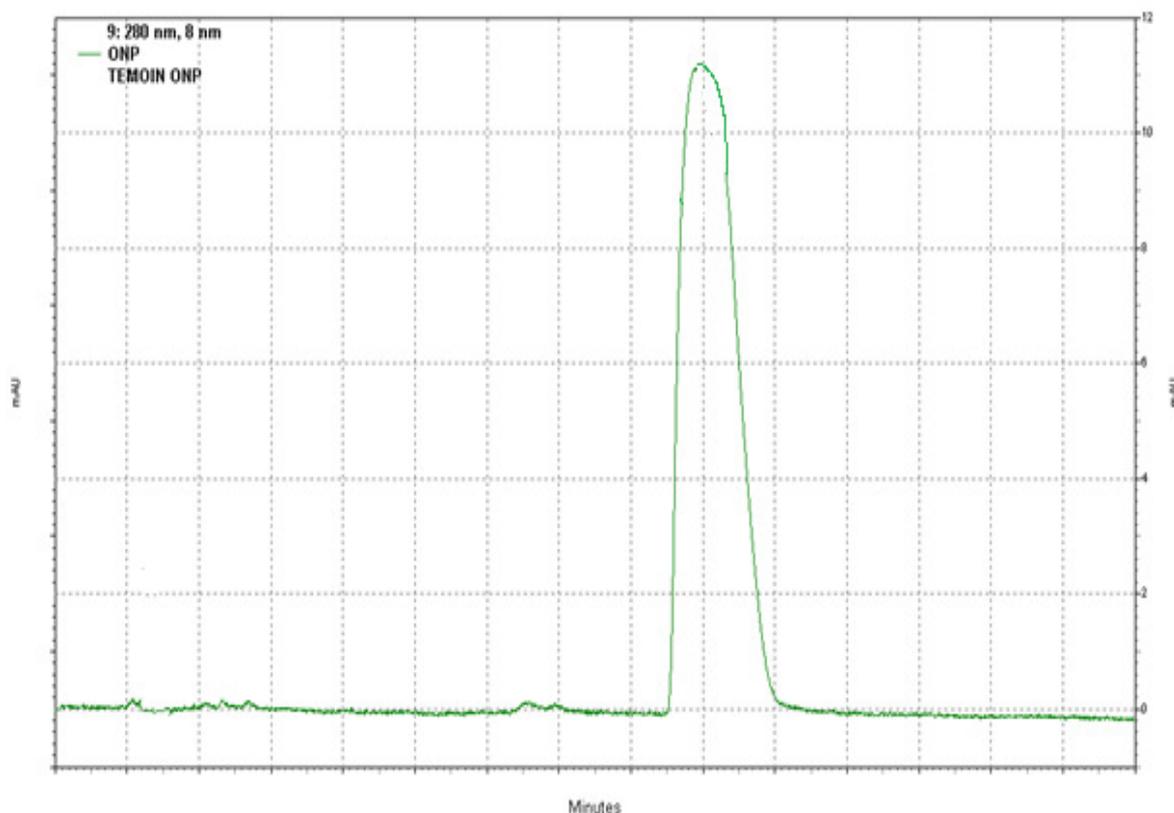
Figure 11: Les chromatogrammes HPLC obtenus de la biodégradation du PNP à $\lambda=230$ nm.

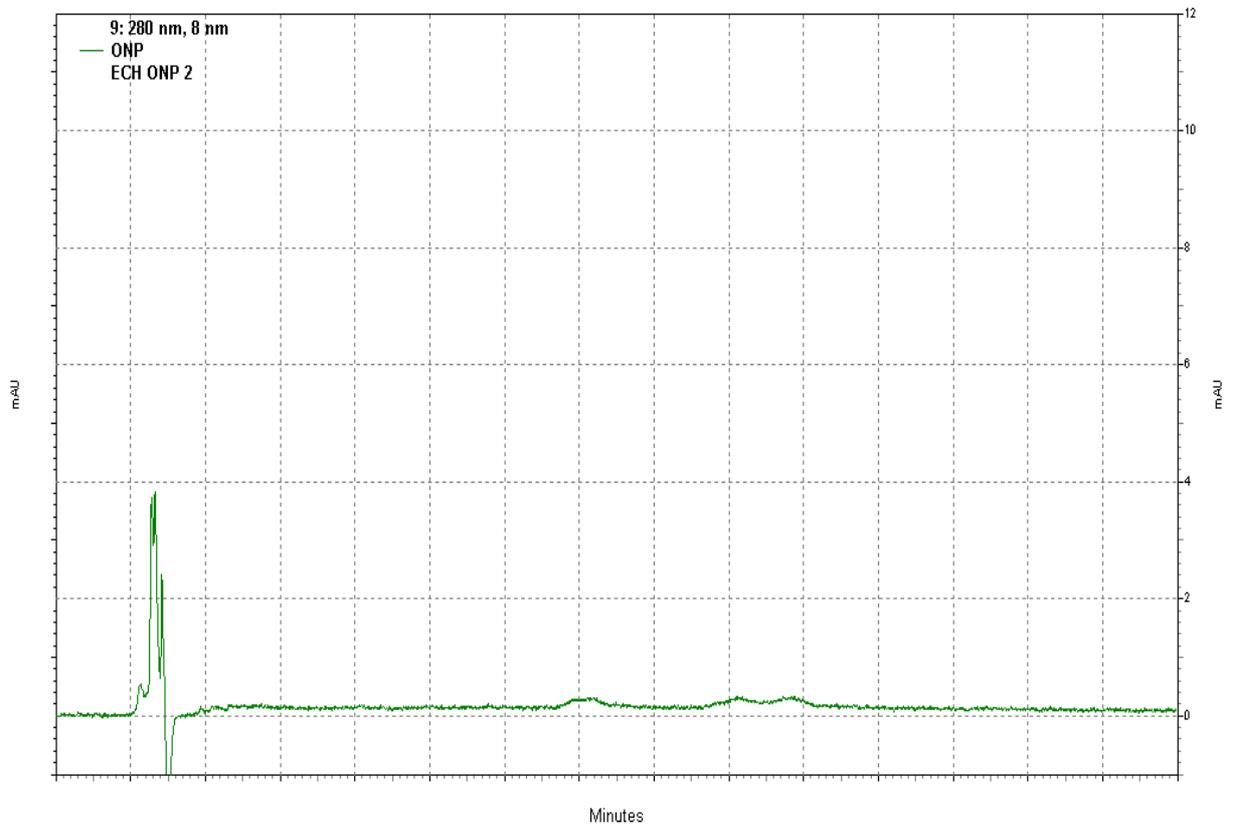
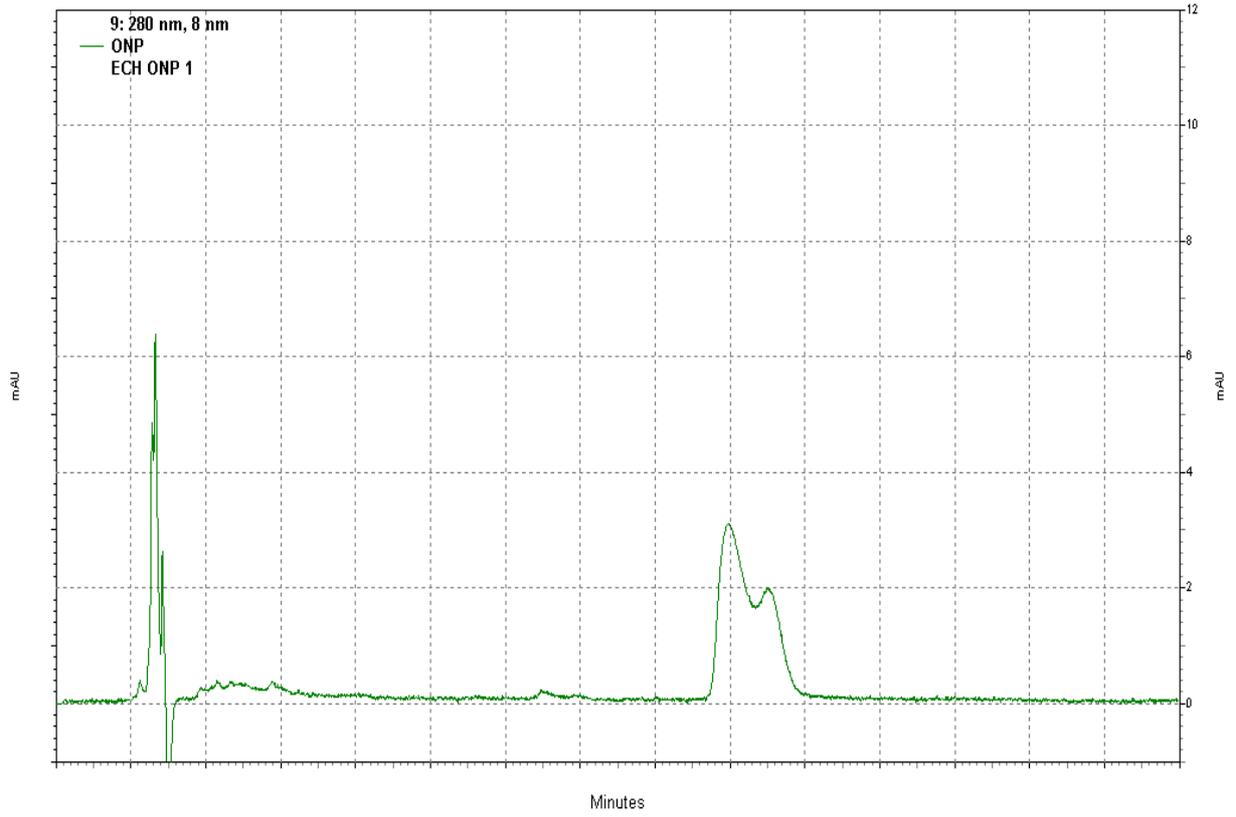
5. Identification des produits de la biodégradation de l'ONP

Les chromatogrammes obtenus après analyse par HPLC des échantillons de l'ONP, après traitement d'extraction de métabolites, montrent l'apparition de deux pics en plus du pic de l'ONP. Le temps de rétention de l'ONP est de 9 min (Témoin ONP). Les deux autres pics apparaissent bien plus avant que celui de l'ONP, à temps égal pour les trois répétitions. D'autres pics apparaissent à des temps très proches l'un de l'autre. Ces pics, en fait, signent des produits en trace (Figure 12). Ces résultats confirment la présence dans le milieu de métabolites produits de la biodégradation de l'ONP.

La comparaison des temps de rétentions des pics obtenus avec ceux obtenus des produits de références permet d'assimiler le premier pic au HNO_2 (acide nitreux). Les autres pics n'ont pas pu être assimilés par leurs temps de rétentions aux produits de références.

Comme dans le cas du PNP, l'apparition du pic de l'ONP indique qu'une concentration résiduelle de ce dernier reste non dégradée, ce qui confirme les résultats obtenus dans la cinétique de biodégradation..





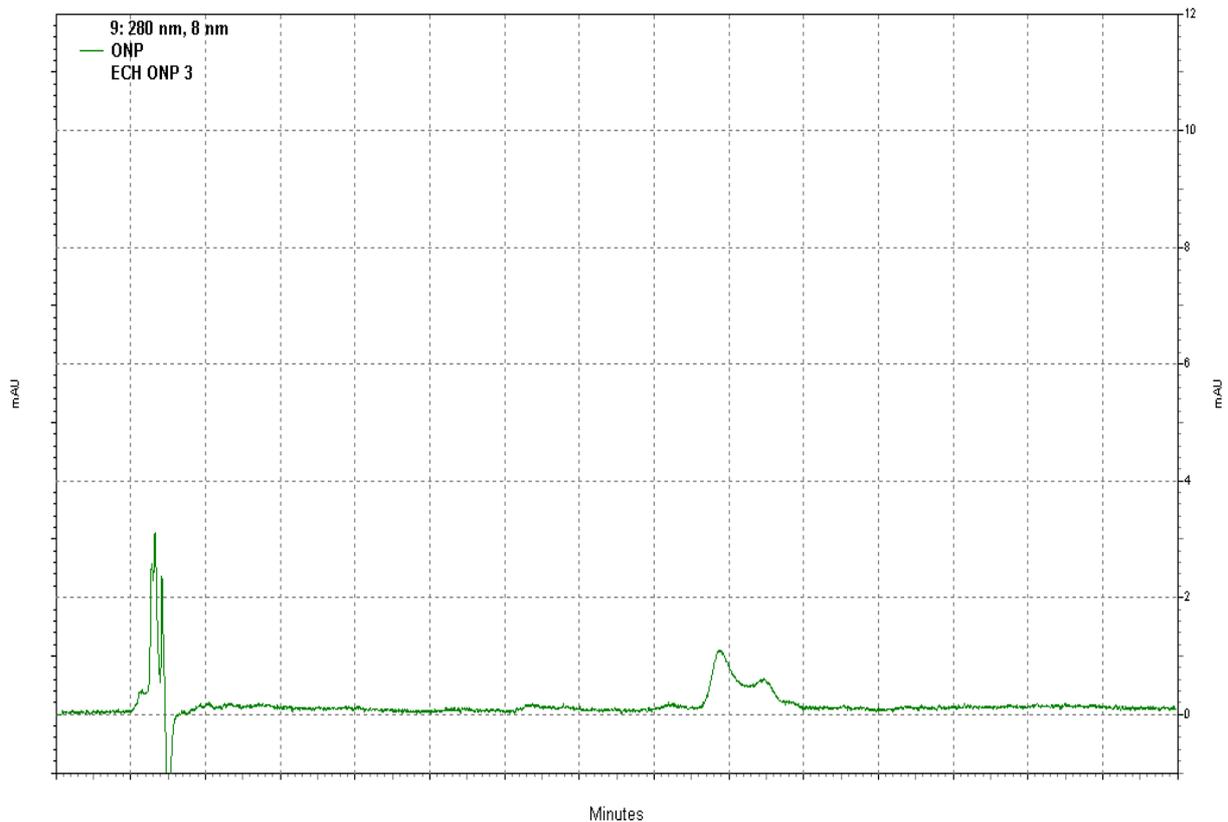


Figure 12: Les chromatogrammes HPLC obtenus de la biodégradation de l'ONP à $\lambda=280$ nm.

L'identification des produits de la biodégradation est nécessaire pour déterminer les voies biochimiques de biodégradation utilisées par les bactéries. La chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) est alors effectuée afin de compléter l'identification des métabolites de l'ONP et du PNP.

2.6 Analyse par GC-MS

La chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse utilisée, est de type "Agilent Technologies 19091S-433", simple, quadripôle équipée d'une colonne capillaire. La GC est de modèle 6890N avec une MS 5975B, à détecteur MSD dont le gaz vecteur est l'hélium. L'injecteur est automatique de série 7683B avec un débit de 1ml/min. Les caractéristiques de la colonne sont les suivantes:

Longueur: 30.0 m

Diamètre inférieur: 250.00um

Épaisseur du film: 0.25um

Température initiale: 50°C

Température finale: 250°C

Volume injecté: 1 µl

2.7 Résultats de la GC-MS

Les résultats obtenus donnent les spectres de masses suivants:

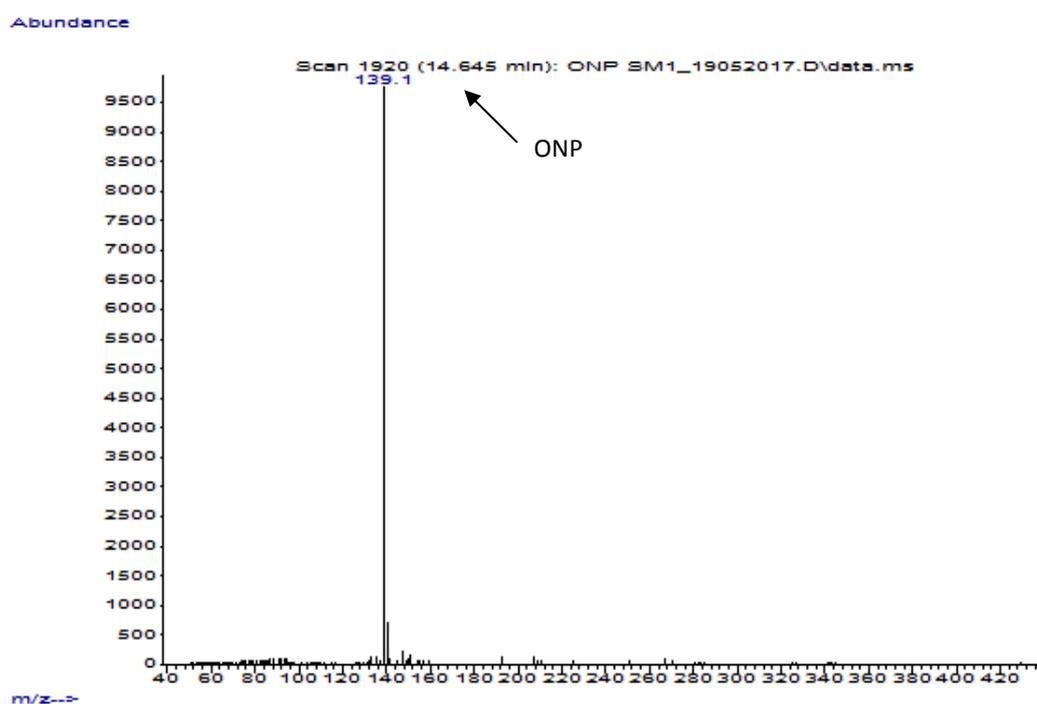


Figure 13: Spectre de masse obtenu par GC-MS du témoin de l'ONP.

Selon la figure 14, le spectre de masse obtenu, montre l'apparition de l'acide acétique (pic 1) et de l'éther éthylique (pic 2). Ce dernier n'est qu'un solvant utilisé dans la colonne de la GC-MS. Par contre, l'acide acétique est un produit de biodégradation de l'*ortho*-nitrophénol, comme c'est indiqué dans la figure 15. Cependant, aucun autre produit de dégradation n'est observé.

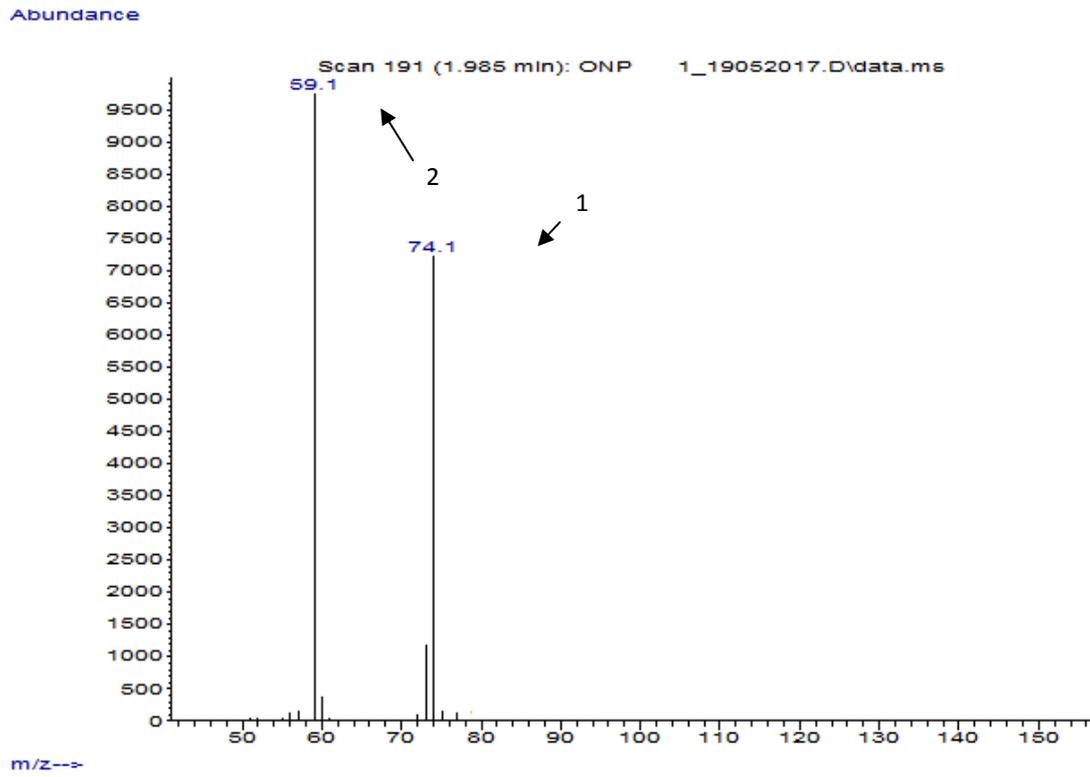


Figure 14: Spectre de masse obtenu par GC-MS de l'échantillon 1 de l'ONP.

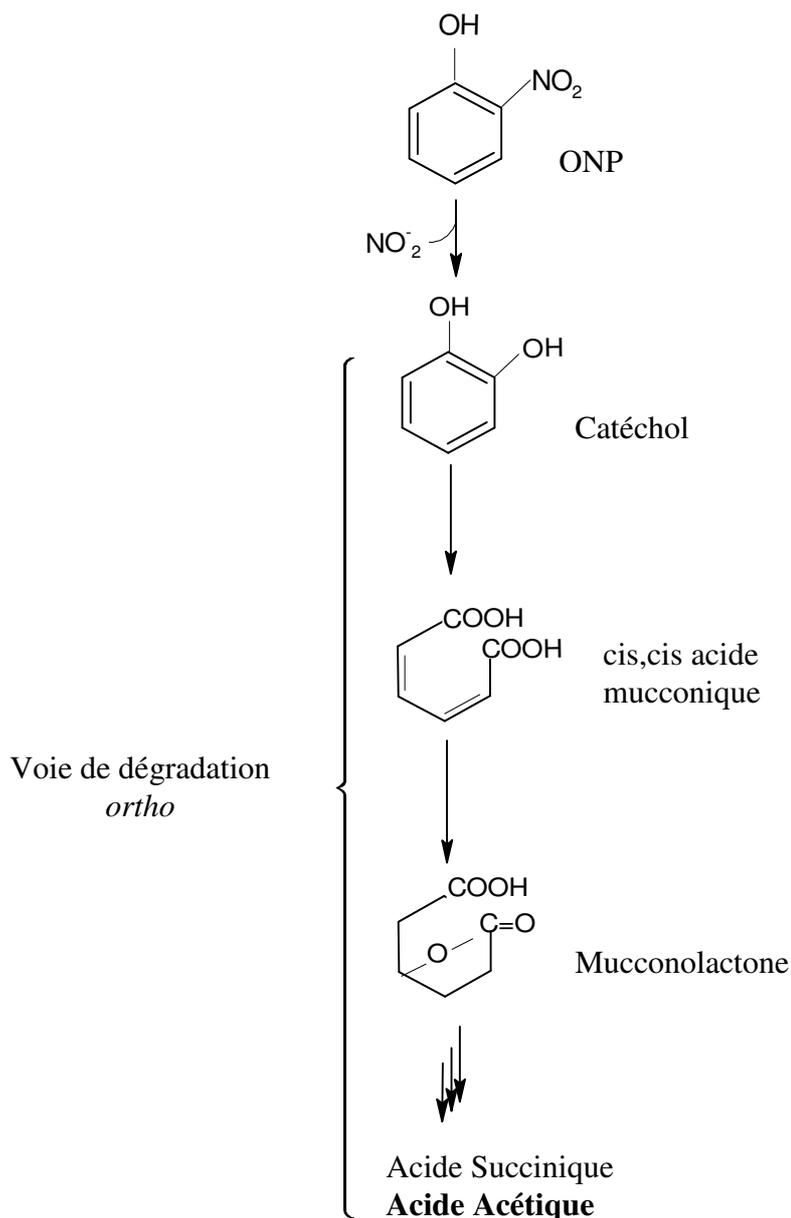


Figure 15: Voie de dégradation de l'ONP par *P.putida* [121].

Le spectre de masse obtenu du deuxième échantillon (répétition 2) montre la présence de plusieurs métabolites: le 1,2,4 triméthylbenzène (pic1), le 3-méthylbenzoquinone (pic 2), l'acide benzoïque (pic 3) et le 2-Cyclohexanylcarboxyl méthanol (pic 4) (Figure16). Cependant, le spectre de la troisième répétition, montre aussi la présence de plusieurs produits de dégradation dont deux qui sont identiques à ceux obtenus à partir du deuxième échantillon qui sont: le 2-cyclohexanylcarboxyl méthanol (pic 4) et l'acide benzoïque (pic 3). Ainsi, on

trouve l'apparition du 2-acétonitrile (pic 2) et de l' α -aminométhylbenzyl alcool (pic 1),(Figure16, Figure 17).

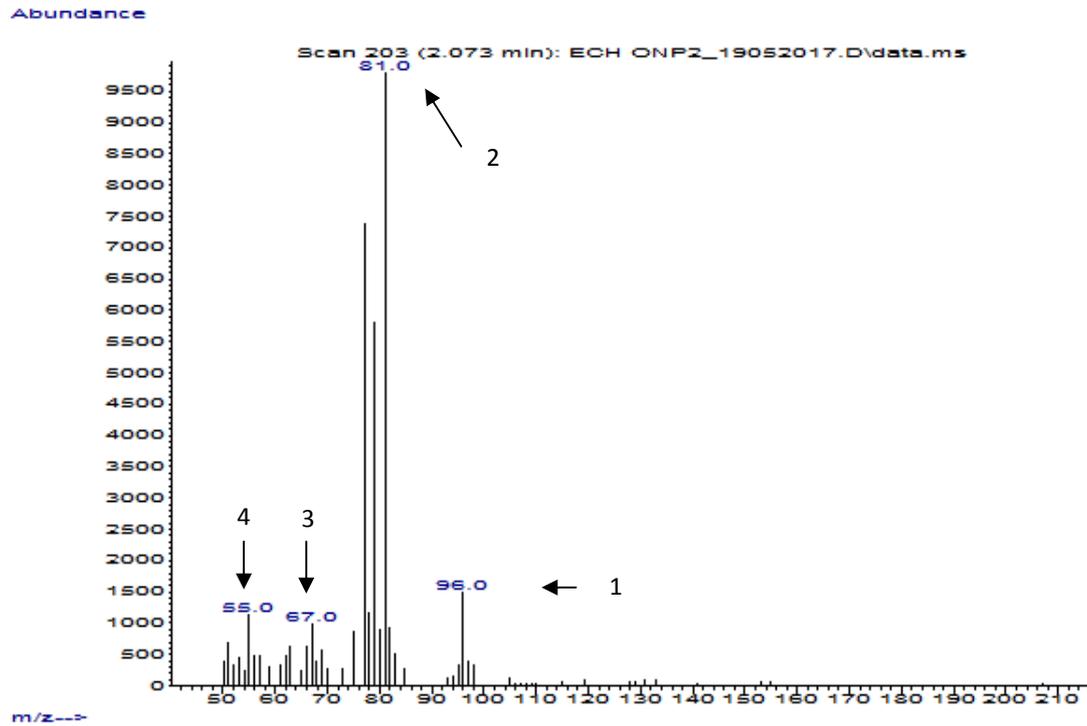


Figure 16: Spectre de masse obtenu par GC-MS de l'échantillon 2 de l'ONP.

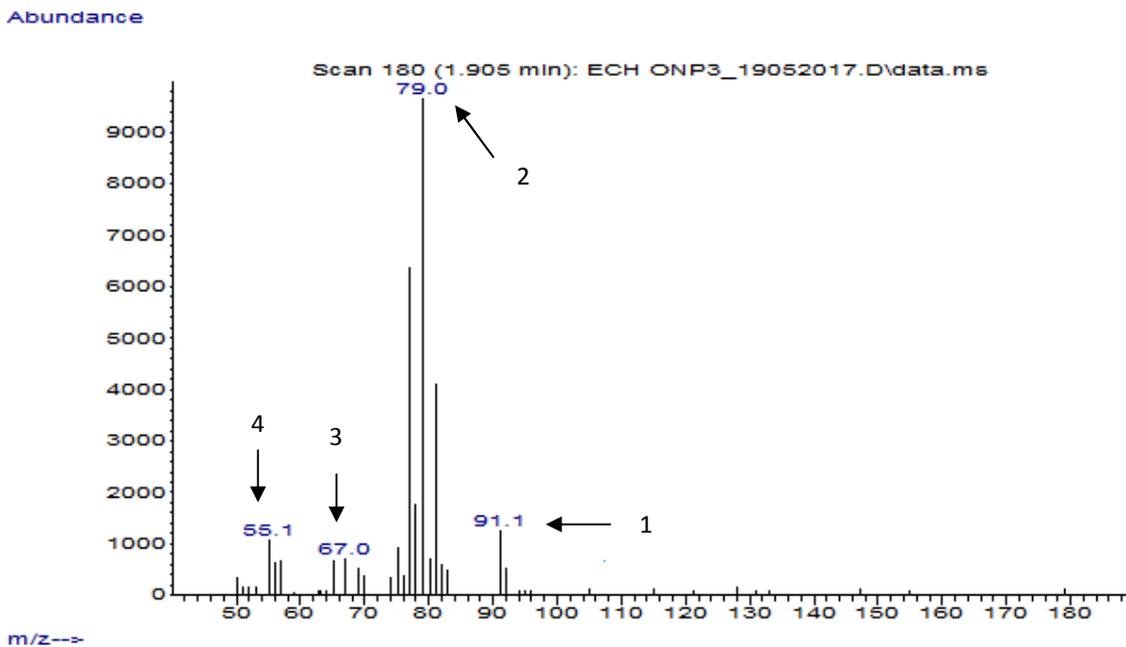


Figure 17: Spectre de masse obtenu par GC-MS de l'échantillon 3 de l'ONP.

Peu d'études sont réalisées sur la biodégradation aérobie de l'ONP, mais, les voies de dégradation de ce polluant sont quand même établies. Les voies de dégradation les plus simples sont *via* le malate acétate et le β -hydroxymalate acétate (Figure 18) [57].

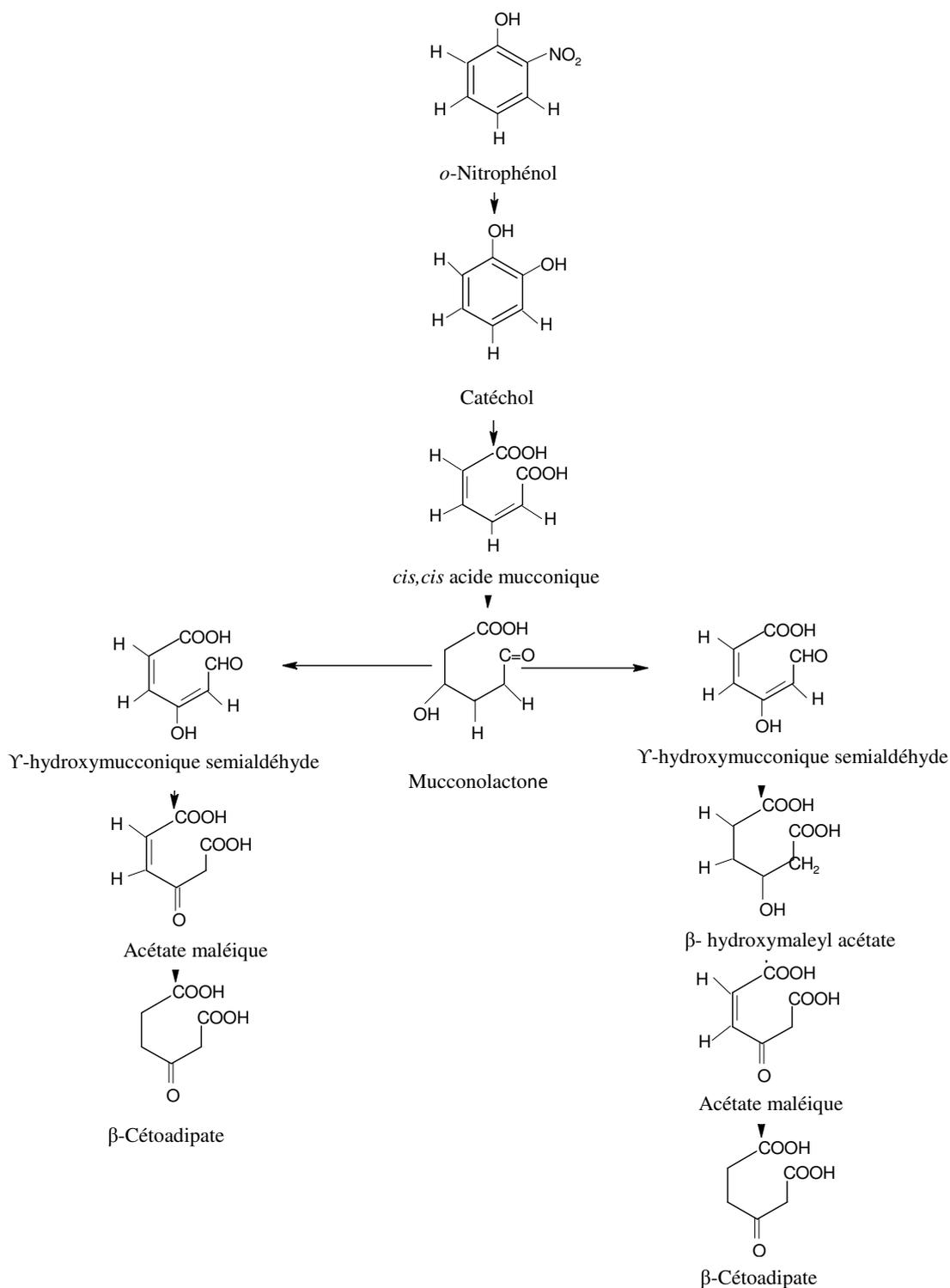


Figure 18: Les deux voies de dégradation de l'ONP *via* le malate acétate et le β -hydroxymalate acétate.

Les résultats de la GC-MS obtenus dans cette étude, montrent l'apparition d'une variété de métabolites produits de la biodégradation de l'ONP par le microbiote des eaux usées. Ce qui a permis de déterminer les voies de décomposition de ce polluant organique.

L'observation de l'acide acétique permet de confirmer que l'ONP est dégradée *via* la voie des catéchols (Figure 15).

Par contre, l'apparition des dérivés benzéniques: l'acide benzoïque, 3-méthylbenzoquinone, le 2-cyclohexanyle méthanol, l' α -aminométhyl benzylalcool et le 2-acétonitrile, permettent d'indiquer que l'ONP est aussi dégradé selon la voie des nitrobenzènes par l'intermédiaire des voies de dégradations des benzoates et du tryptophane (Figure 19, Figure 20, Figure 21)[122].

Légende de la Figure 19

- A: Nitrobenzene nitroreductase.
- B: Hydroxylaminobenzene mutase.
- C: 2-Aminophenol 1,6 dioxygenase.
- D: Nitrobenzene 1,2 dioxygenase.
- E: Catechol 2,3 dioxygenase.
- F: Catechol 1,2 dioxygenase.
- G: 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase.
- H: 2-oxopent-4-enoate hydratase.
- I: 4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase.

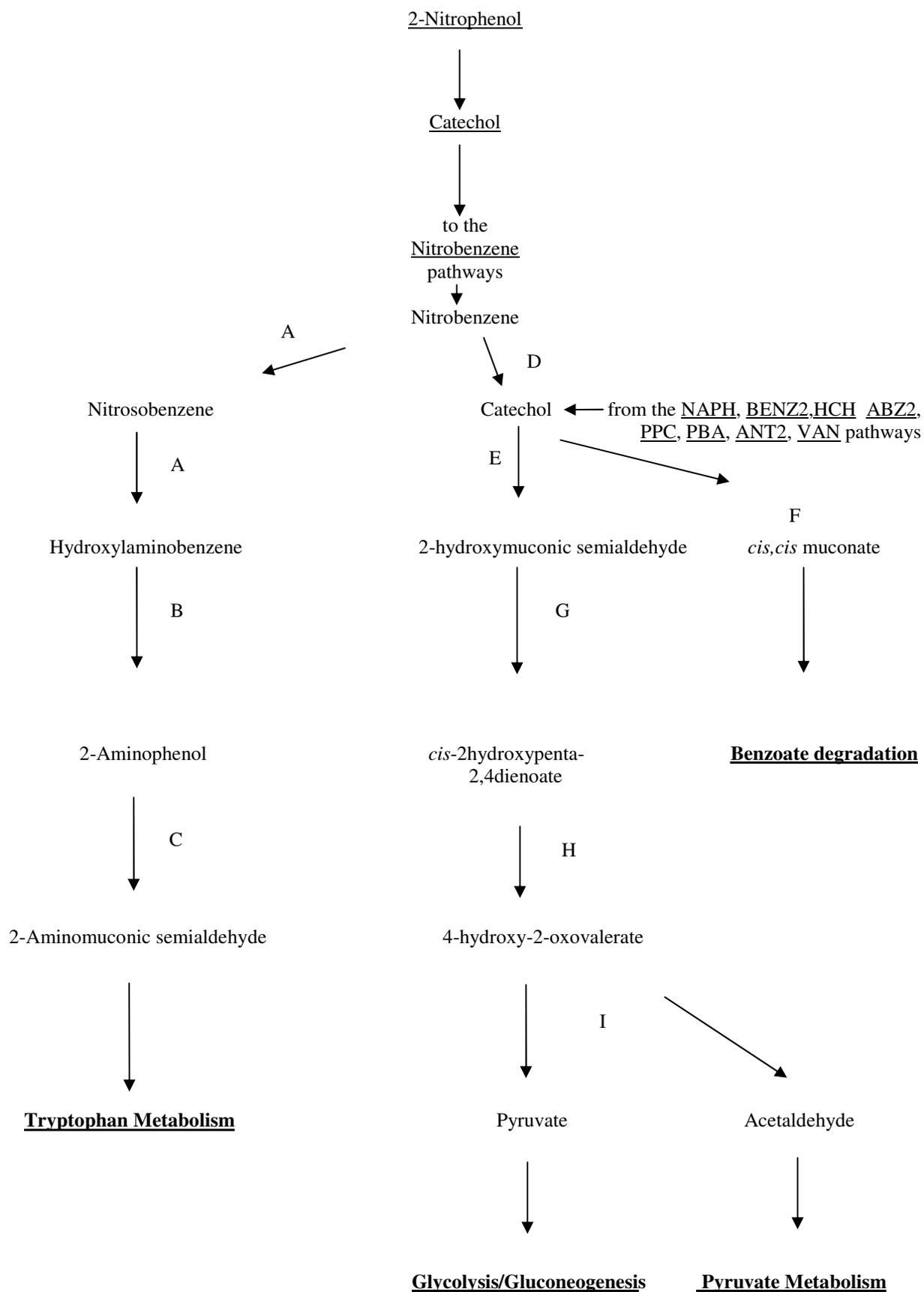


Figure 19: Biodégradation de l'*ortho*-nitrophénol selon la voie des Nitrobenzènes.

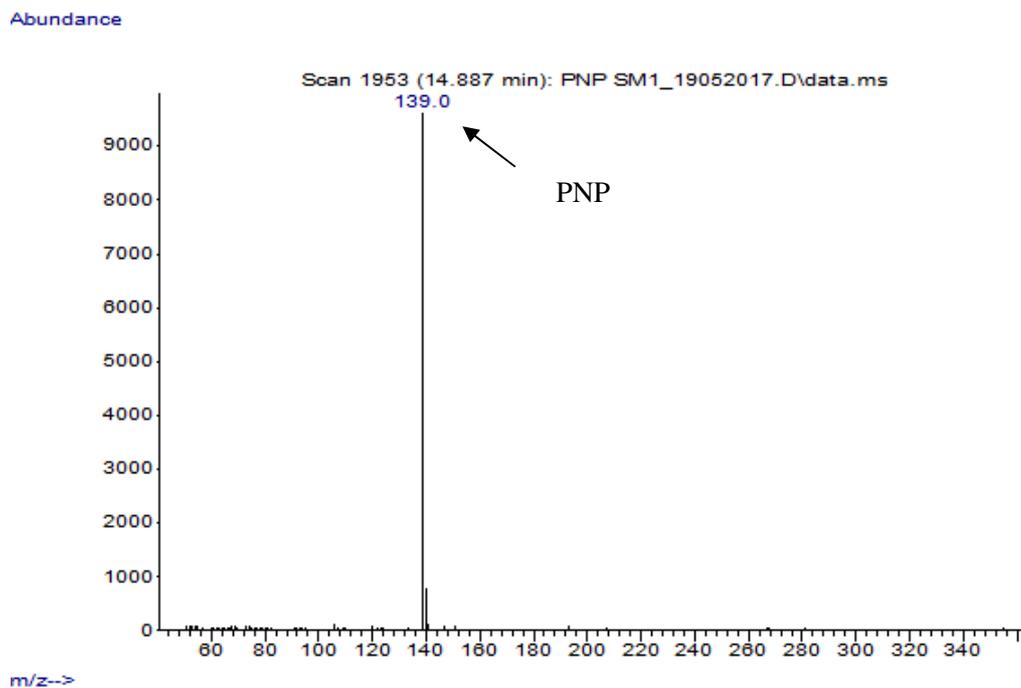
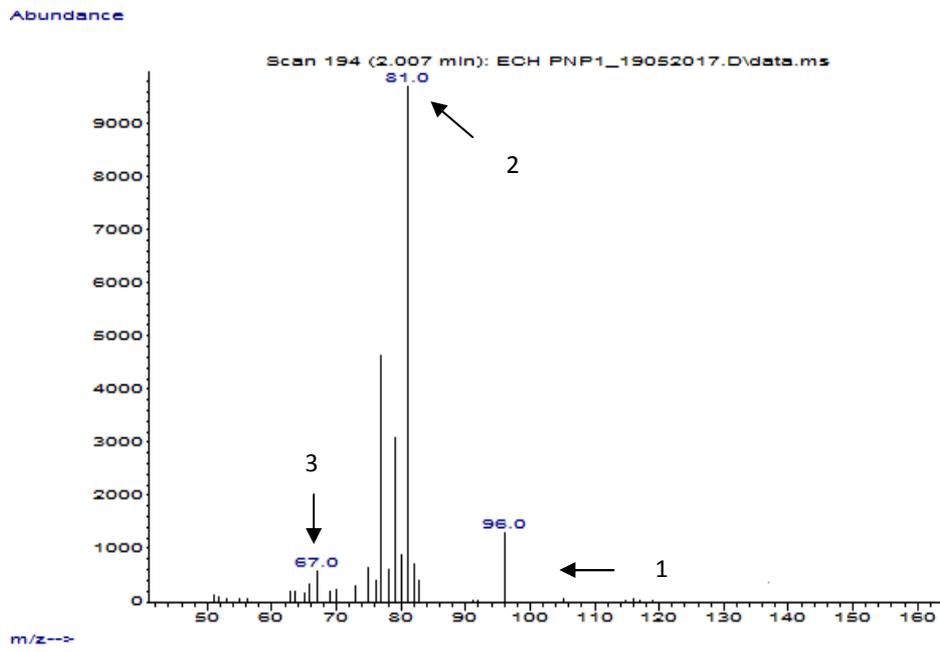
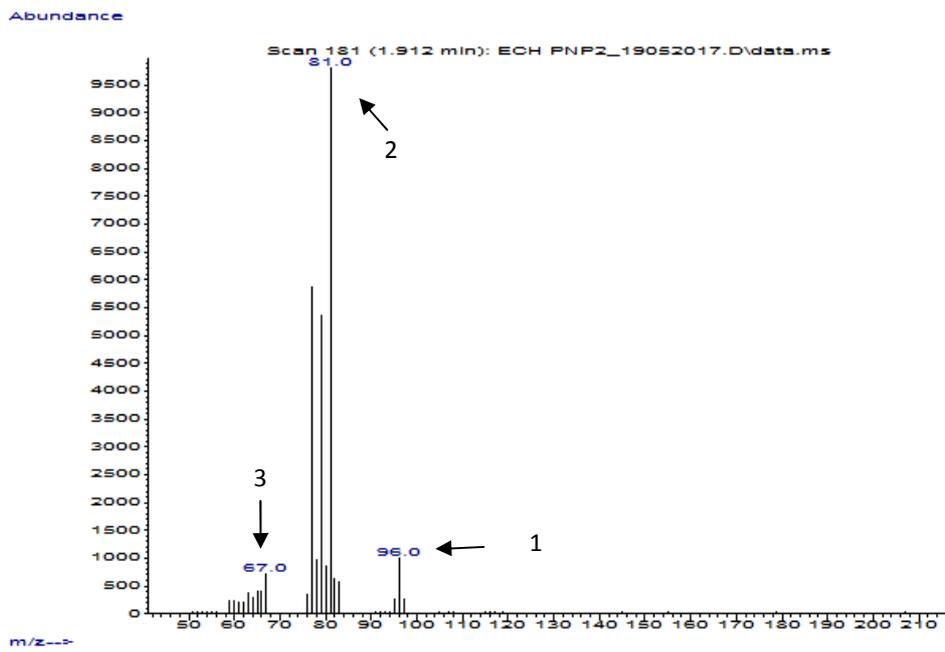


Figure 22: Spectre de masse obtenu par GC-MS du témoin du PNP.

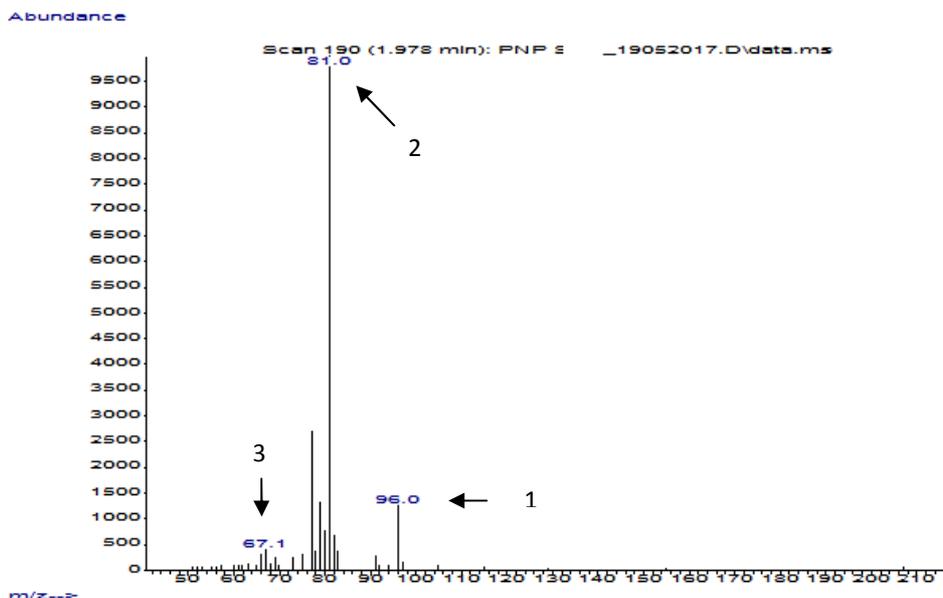
Selon la figure 23, les produits de biodégradation du *para*-nitrophéol sont les mêmes pour les trois répétitions. Les résultats obtenus montrent la présence du 1,2,4 triméthylbenzène (pic1), du 3-méthylbenzoquinone (pic 2) et l'acide benzoïque (pic3).



PNP₁



PNP₂



PNP₃

Figure 23: Spectre de masse obtenu par GC-MS du PNP.

Les résultats de l'HPLC et de la GC-MS montrent clairement, par la présence du benzoquinone (3-méthylbenzoquinone), du 1,2,4 triméthylbenzène et du catéchol, que le PNP est dégradé en premier temps par la réaction d'oxygénation initiale qui donne le nitrite. Cette réaction est initiée par l'élimination par oxydation du groupement nitro du noyau aromatique donnant le nitrite (Figure3, page 32). Certaines bactéries minéralisent ces composés complètement. Mais elles les utilisent comme source d'azote par élimination oxygénolytique du groupement nitro [96].

Jusqu'à présent plusieurs différentes bactéries dégradantes du PNP sont isolées. Ainsi, les voies de dégradation par ces isolats ont été largement étudiées. Par conséquent, deux voies de dégradation du PNP différentes, par l'intermédiaire de 4-nitrocatéchol (4CN) [123],[124] ou d'hydroquinone (HQ) [123], [125], [126] sont proposées (Figure 24).

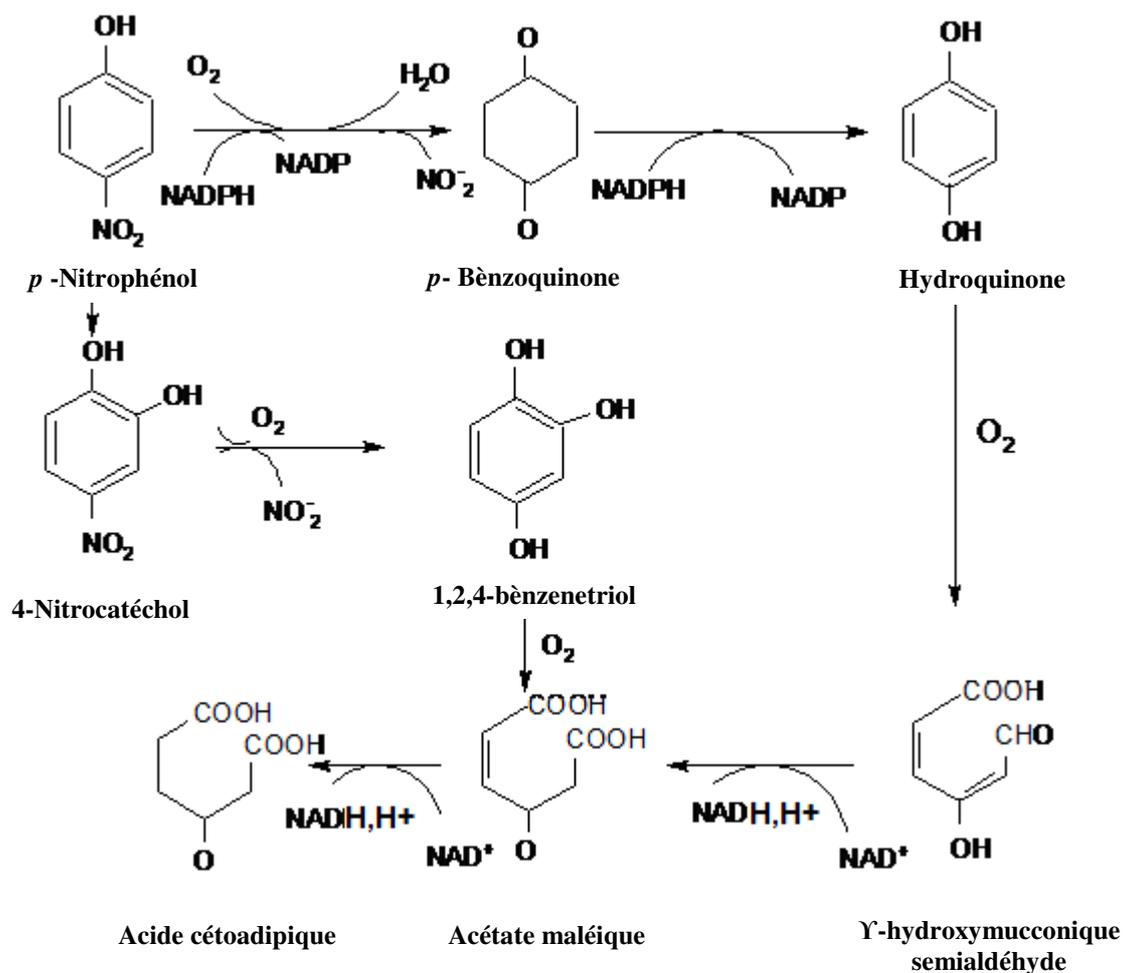


Figure 24: Les deux voies de dégradation du PNP via le 4-nitrocatéchol et l'hydroquinone.

La présence importante du HNO_2 , démontrée par l'apparition du pic référent à l'acide nitreux dans les chromatogrammes obtenus de l'ONP et du PNP, est expliquée par l'élimination complète réductive du groupement nitro du cycle aromatique. En générale l'élimination du groupement nitro des composés nitroaromatiques se fait selon une réaction réductive comme indiqué dans la Figure 5 (page 34).

Les résultats de l'HPLC et de la GC-MS confirment une autre fois par notre étude que le PNP est dégradé selon ces deux voies par le microbiote des eaux usées de la ville de Constantine.

Il est à noter que les voies de biodégradations démontrées sont appliquées sur un milieu qui ne contient que les nitrophénols. Mais, dans notre étude, le milieu de culture contient une fraction des eaux usées (l'inoculum). Cette dernière qui se compose de toutes sortes de substances ou de molécules organiques et inorganiques. Ce qui explique la nature des produits de biodégradation obtenus.

Actuellement, les études menées sur la biodégradation des nitrophénols sont basées sur l'isolement des gènes codants pour les enzymes impliquées dans les voies de dégradation. Il est démontré que *Rhodococcus sp.*PN1 peut assimiler le PNP comme la seule source de carbone et d'azote et le dégrade par la voie du 4-Nitrocatechol (4NC voie) [127],[128]. Les gènes codant pour les enzymes responsables de l'oxydation initiale de PNP en 4NC de la souche PN1 sont isolés pour la première fois. Les gènes comprennent une famille AraC / XylS [129], un gène régulateur (NPHR) et les gènes de monooxygénase (nphA1A2). En outre, les produits géniques sont purifiés et caractérisés [130].

Chapitre II: Isolement et Identification des bactéries dégradants les Nitrophénols

Différents types de microorganismes sont connus par leur capacité à dégrader les phénols et leurs dérivés, y compris les nitrophénols. Les bactéries sont majoritairement rencontrées dans ce domaine. En effet, *Pseudomonas aeruginosa* HS-D38 minéralise le PNP à une concentration initiale de 500 mg/L en 24 heures [116]. Alors que *Pseudomonas putida* décompose 300 à 500 mg/L du PNP après 72 heures [99]. Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa* est capable de dégrader d'autres types de polluants comme les phénols et l'indole, suggérant que la souche HS-D38 est plus performante car elle dégrade des concentrations plus élevées de PNP [117], [118]. *Pseudomonas cepacia* RKJ 200 isolée par enrichissement sélectif, utilise le PNP comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie [131]. Une autre souche identifiée comme *Oachromobacteranthropi*B3 utilise le 2,4-dinitrophénol comme source d'azote [132]. Par ailleurs, il est démontré qu'*Arthrobacter protophormiae* RKJ 100 est capable d'utiliser le PNP ou le 4-nitrocatechol comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie [133]. De même, les cultures bactériennes de *Ralstoniasp.*SJ 98, *Arthrobacter protophormiae* RKJ 100 et *Burkholderia cepacia* RKJ 200 métabolisent le PNP comme seule source de carbone, d'azote et d'énergie [134]. De tels microorganismes peuvent être de bons candidats pour le processus de bioremédiation.

1. Matériel et Méthodes

1.1 Isolement et purification des microorganismes

L'isolement des microorganismes impliqués dans la biodégradation est effectué après 15 jours, 30 jours et 60 jours d'incubation. Un ensemencement sur milieu minimum solide est réalisé, suivie d'une purification sur gélose nutritive.

1.2 Identification bactérienne

1.2.1 Etude macroscopique et microscopique

La description des colonies obtenues après l'isolement est réalisée à l'œil nu en tenant compte des critères des colonies suivants : forme, nature de surface, opacité, couleur, aspect et odeur. L'étude microscopique consiste en l'observation des bactéries isolées au microscope optique à l'état frais et après coloration de Gram.

1.2.2 Identification Biochimique

Deux galeries biochimiques sont utilisées dans l'identification des souches bactériennes: API 20 NE et API 50 CHB (Biomérieux SA, Marcy-L'étoile, France). Les galeries sont incubées à 30° C après ensemencement. La lecture des résultats est effectuée après 24 h et 48 h d'incubation. Le logiciel APIWEB (<http://APIWEB.biomérieux.com/servlet/Authenticate>) est utilisé pour le traitement des résultats en vue de déterminer l'espèce bactérienne.

1.3 Identification Moléculaire

1.3.1 Extraction de l'ADN

Des cultures de 24 heures en milieu liquide des souches bactériennes isolées sont centrifugées à 10000 g pendant 30 secondes. Le culot est lavé avec le Tris-EDTA à pH 8. Une deuxième et une troisième centrifugation à sec à 10000 g pendant 30 secondes sont effectuées. Après élimination du surnageant l'extraction de l'ADN est réalisée à l'aide d'un Kit (« Prep Man Ultra Sample Preparation Reagent », Applied Biosystems).

1.3.2 Amplification des séquences des gènes codant l'ARNr 16S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'ADNr 16S est amplifié par la Polymerase Chain Reaction (PCR). Deux PCR sont réalisées pour chaque ADN extrait. Les amorces utilisées sont: P8 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et P535 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'), dont la composition du milieu réactionnel est: 39,75 µL H₂O; 5 µL Tampon; 3 µL dNTP; 1 µL MgCl₂; 0,5µL Primer F; 0,5µL Primer R; 0,25µL Taq polymérase. Pour les amorces 338-1040F (5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3') et 338-1040R (5'-GACACGAGCTGACGACA-3'), le mélange réactionnel est: 37,75 µLH₂O; 5µL Tampon; 3 µL dNTP; 3µL MgCl₂; 0,5µL Primer F; 0,5µL Primer R; 0,25µL Taq polymérase (Tableau 4 et Tableau 5). Les programmes PCR appliqués sont mentionnés dans le Tableau 6.

Tableau 4: Les conditions PCR pour le couple P8-P535.

Réactifs	Concentration finale	Volume pour 1 puit
H ₂ O		39.75 µL
Tampon (10X)	1 X	5 µL
dNTP (4mM)	0.24 mM	3 µL
MgCl ₂ (25mM)	0.5mM	1µL
Primer F 10µM	0.5pmol	0.5µL
Primer R 10µM	0.5pmol	0.5µL
Taqpolymérase (5U/µL)	1U	0.25µL

Tableau 5: Les conditions PCR pour le couple 338-1040.

Réactifs	Concentration finale	Volume pour 1 puit
H ₂ O		37.75 µL
Tampon (10X)	1 X	5µL
dNTP (4mM)	0.24 mM	3 µL
MgCl ₂ (25mM)	1.5mM	3µL
Primer F 50µM	1pmol	0.5µL
Primer R 50µM	1pmol	0.5µL
Taqpolymérase (5U/µL)	1U	0.25µL

Tableau 6: Les programmes PCR appliqués.

Amorces P8-P535	Amorces 338-1040
95°C 12min 92°C 2min	95°C 12min
40 cycles 93°C 30s 55°C 30s 72°C 1min	50 cycles 95°C 30s 60°C 30s 72°C 30s
72°C 10min	72°C 10min

1.3.3 Électrophorèse et purification des produits PCR

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose 2% (p/v) dans un tampon TBE 0,5 X à un pH 9 (Tris-Borate-EDTA) contenant: 130 mM Tris, 45 mM Borate, 2,5 mM EDTA et une goutte de bromure d'éthyldium (BET). Le gel d'agarose à 2% a un bon pouvoir séparateur pour les bandes d'ADN de 100 pb à 2 Kb. Après solidification du gel, les puits sont rempli par 2 μ l de produit PCR. Les échantillons sont additionnés d'une proportion de 1/10^{ème} de volume de solution de chargement ADN (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol, 30% glycérol). Les puits des extrémités sont rempli par 2 μ l de marqueur de poids moléculaire (1000pb, 700pb, 500pb, 300pb, 150pb, 50pb, Promega). La migration se fait sous une tension de 100 volts pendant 45 min. Les fragments d'ADN sont visibles aux UV à 300 nm, grâce à la fluorescence du BET qui s'intercale entre les bases nucléotidiques. Le gel est photographié sur une table UV (Pharmacia Biotech. Imager Master®VDS). La purification des acides nucléique consiste à débarrasser les fragments d'intérêt des autres produits PCR (amorces, sels, enzymes, dNTP restants). Elle est effectuée après l'électrophorèse sur gel d'agarose. La purification des produits PCR est réalisée par aspiration sur plaque Nucleo Fast (Macherey Nagel).

1.3.4 Séquençage et analyse des séquences

Le séquençage est réalisée dans les deux sens par la technique de séquençage SANGER [135], selon des conditions optimisées (kit Bigdye terminator V3.1 et séquenceur

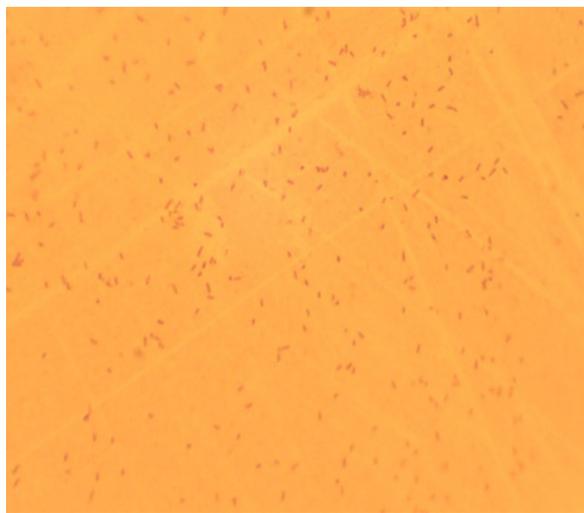
3730XL, Applied Biosystem). Les séquences obtenues sont assemblées et comparées dans les bases de données publiques: NCBI database (National Center for Biotechnology Information) et le Bibidatabase (Bio Informatic Bacteria Identification: <http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>), par le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Après avoir aligné les séquences, un arbre phylogénétique pour chaque souche bactérienne est élaboré. Cependant, l'analyse phylogénétique est réalisée à l'aide du logiciel MEGA 5.

2. Résultats et Discussion

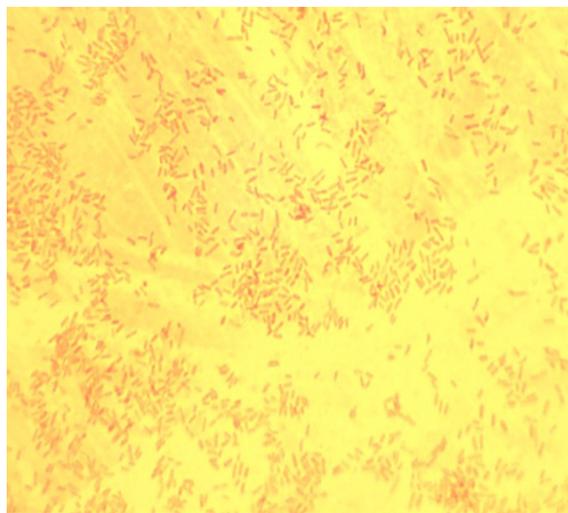
2.1 Identification des souches bactériennes

2.1.1. Examen microscopique après coloration de Gram

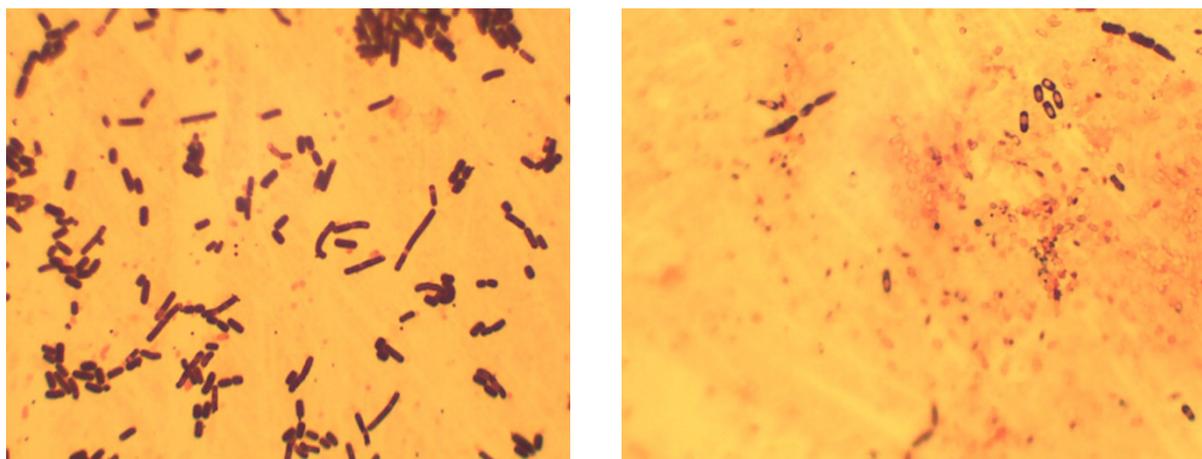
La culture gélosée donne quatre colonies macroscopiquement différentes, dont trois avec des pigments verts diffusibles. L'observation microscopique révèle que trois souches bactériennes sont des bacilles à Gram négatif, alors que, une est un bacille à Gram positif présentant des endospores (Figure 25). Cependant, un ensemencement des trois souches pigmentaires sur les milieux King A et King B est réalisé. Une couleur bleue sur le King A est obtenue, ce qui indique la sécrétion de la pyocyanine dans le milieu. Un jaune-vert fluorescent sur le King B est observé, caractéristique de la sécrétion de la pyoverdine.



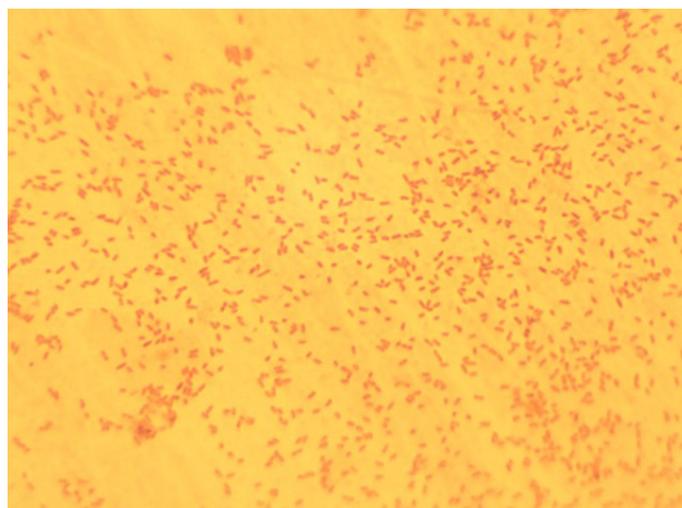
Souche 1



Souche 2



Souche 3



Souche 4

Figure 25: Observation microscopique des quatre souches obtenues après la coloration de Gram (grossissement X100).

2.1.2 Identification biochimique

➤ La souche 1

Les résultats obtenus des tests de la galerie API 20 NE après 48 heures, montrent que la souche 1 dégrade le glucose en aérobiose, ne produit pas l'indole à partir du tryptophane et réduit le nitrate en nitrite. La souche est catalase positive et oxydase positive (Galerie API 20 NE 1)(Annexe 2). L'examen du type respiratoire montre que la souche est

aérobie stricte. Selon le logiciel APIWEB, la souche 1 est assimilée avec 99,6% à l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* (Annexe 3).

➤ **La souche 2**

Les résultats obtenus des tests de la galerie API 20 NE après 48 heures, montrent que la souche 2 dégrade aussi le glucose en aérobiose, ne produit pas l'indole à partir du tryptophane, ne réduit pas le nitrate en nitrite et elle est catalase positive et oxydase positive (Galerie API 20 NE 2)(Annexe 2). L'examen du type respiratoire montre que la souche est aussi aérobie stricte. Selon le logiciel APIWEB, la souche 2 est assimilée avec 99,4% à l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* (Annexe 3).

➤ **La souche 3**

Selon les résultats de la galeries API 50 CHB (Annexe 2), la souche 3 est assimilée à l'espèce bactérienne *Bacillus cereus* avec 99%, selon le logiciel APIWEB (Annexe 3). Cependant, la souche 3 est aérobie, catalase positive et oxydase positive (Annexe 2).

➤ **La souche 4**

Les résultats obtenus de la quatrième souche en appliquant les tests de la galerie API 20 NE après 48 heures, montrent que la souche 4 dégrade encore le glucose en aérobiose, ne produit pas l'indole à partir du tryptophane et ne réduit pas le nitrate en nitrite. Elle est catalase positive et oxydase positive (Galerie API 20 NE 3) (Annexe 2). L'examen du type respiratoire montre que la souche est aussi aérobie stricte. Selon le logiciel APIWEB, la souche 1 est assimilée avec 98,9 % à l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* (Annexe 3).

2.1.3 Identification moléculaire

2.1.3.1 Analyse par PCR

Après l'électrophorèse des produits PCR des gènes de l'ARNr 16S des souches bactériennes, le gel d'agarose est photographié sur table UV qui montre la migration des bandes d'ADN (Figure 26). Selon la figure les bandes d'ADN ont migrés dans la région de 600 paires de bases dans la première PCR. Alors que dans la deuxième PCR, les bandes ont migrés jusqu'à la région de 700 paires de bases.

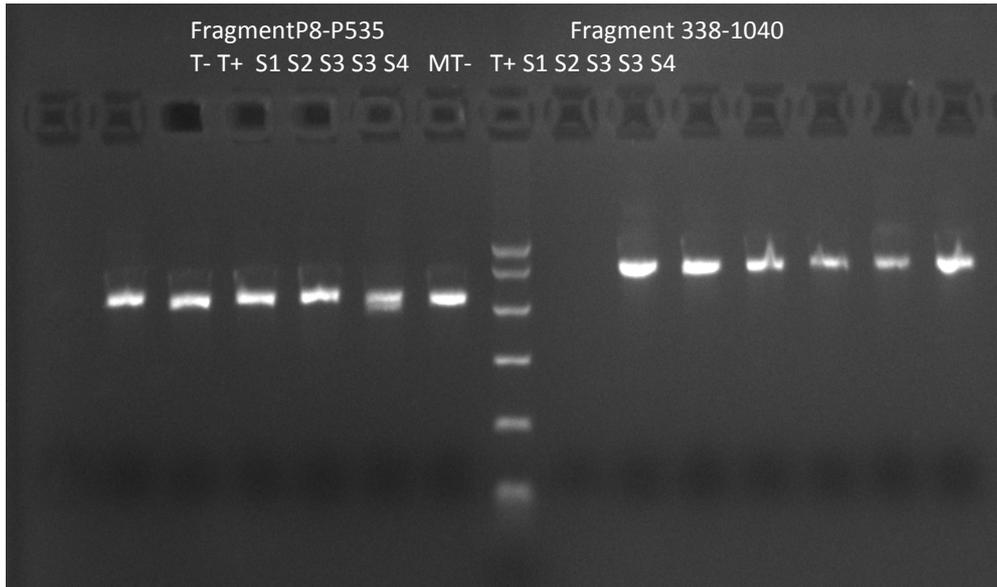


Figure 26: Résultats des tests PCR sur gel d'agarose de l'ADN des souches bactériennes isolées.

T-: contrôle négatif de PCR.

T+ : ADN contrôle positif.

M : Marqueur de taille (1000pb, 700pb, 500pb, 300pb, 150pb, 50pb).

S1: souche 1, S2: souche 2, S3: souche 3, S4: souche 4.

Les produits PCR sont purifiés par aspiration sur plaque Nucleo Fast(Macherey Nagel). Ils sont ensuite séquencés dans les deux sens par la technique de séquençage SANGER dans les deux sens [105], selon des conditions (kit Bigdye terminator V3.1 et séquenceur 3730XL commercialisés par Applied Biosystems).

Séquence de l'ADNr 16S obtenue de la Souche 1

```
GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTGAG
CGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAAACGGGCGCTAATACCG
CATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGT
TGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAG
CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCG
CGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGT
TTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG
GAACTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTA
GTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGG
```

GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGA
GAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTG

Séquence de l'ADNr 16S obtenue de la Souche 2

AGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCA
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCAATTTGA
GTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGTGCACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCC
CAACGGCTAGTCGACATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCAC
CTCAGTGT CAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTA
CACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTTC CAGGTTGAGCCCGGG
ATTTACATCCA ACTTGTGTAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCCTTCG
TATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGTATTATTCTGTTGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTA
TACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGTCTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAG
GCTTTCGCCCATTTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGA
CTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACCT
AGGCTCATCTGATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCCACTTTCTCCCTCAGGACGTATGCGGTATTAGCGCCCGTT
TCCGGACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTACCCGTC CGCCGCTGAATCCAGGAGCAAG
CTCCCTTCATCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGA

Séquence de l'ADNr 16S obtenue de la Souche 3

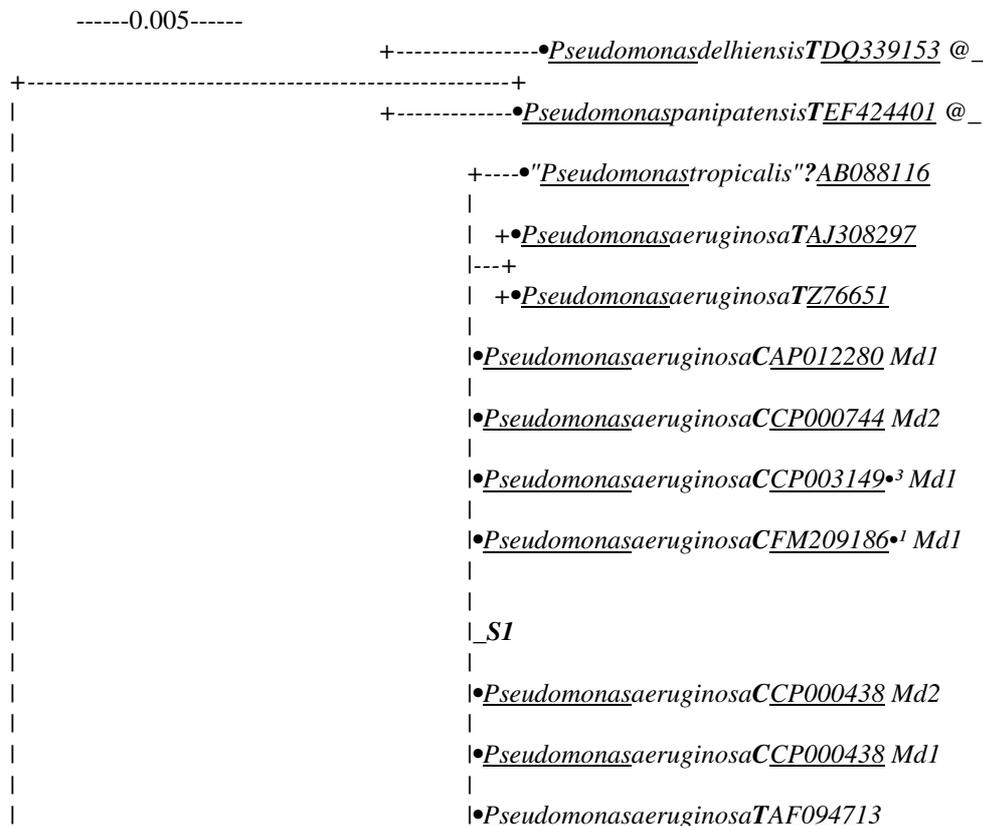
AACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTT CAGAGGATGTCAAGACCT
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCTTTGA
GTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGAGTGTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCT
CTAACACTTAGCACTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCG
CCTCAGTGT CAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCT
ACACATGGAATTCACTTTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGTTGAGCCGTGG
GCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCGGATAACGCTTGCACCTAC
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAA
CTAGCACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCAGCGGGCTTGTCTCCGTC
AGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGT
GGCCGATCACCCTCTCAGGTGCGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTACCTCACCAACTAGCTAATGCGAC
GCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCTTTCAATTTGAACCATGCRGTTCAAAATGTTATCCGGTAT
TAGCCCCGTTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTC CGCCGCTAAC
TTCATAAGAGCAAGCTCTTAATCCATTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCACTCTGAGCC

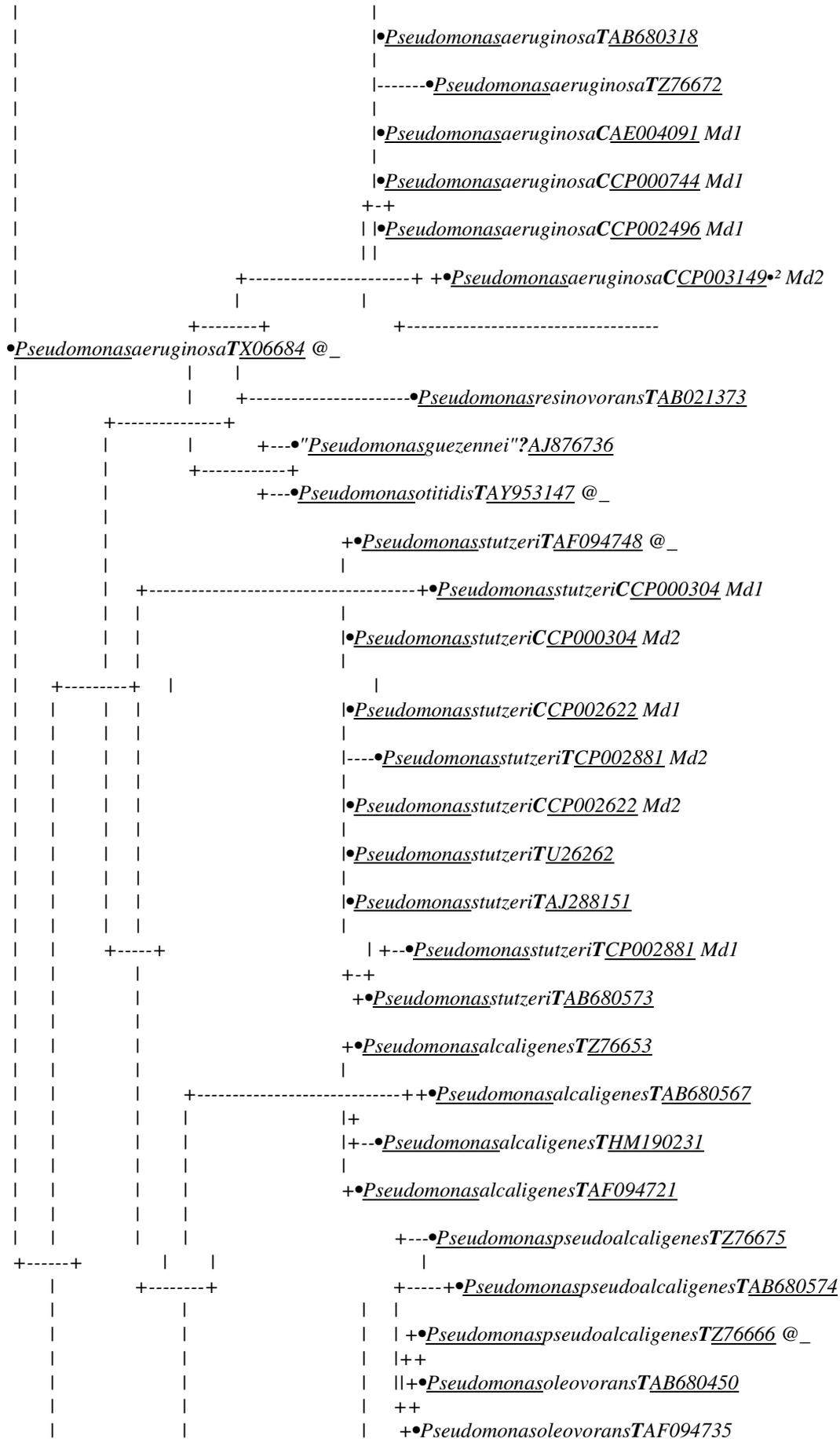
Séquence de l'ADNr 16S obtenue de la Souche 4

AGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCA
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCAATTTGA
GTTTTAACCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGTGCACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCC
CAACGGCTAGTCGACATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCAC
CTCAGTGT CAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTA
CACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTTC CAGGTTGAGCCCGGG

ATTTACATCCAACCTTGCTGAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTTCG
TATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGTATTCTGTTGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTA
TACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCGGCATGGCTGGATCAG
GCTTTCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGA
CTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACCT
AGGCTCATCTGATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCCACTTTCTCCCTCAGGACGTATGCGGTATTAGCGCCCGTT
TCCGACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATTCTAGGCATTACTACCCCGTCCGCCGCTGAATCCAGGAGCAAG
CTCCCTTCATCCGCTCGACTTGATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGA

Les séquences obtenues sont assemblées et comparées dans les bases de données publiques: NCBI database et Le Bibi database (<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) en utilisant l’outil : BLAST. Ces bases de données ont permis d’identifier les espèces bactériennes de chaque échantillon reçu et de construire un arbre phylogénétique pour chacune. Cependant, l'examen des dendrogrammes obtenus montre que la souche 1, la souche 2 et la souche 4 donnent des séquences similaires à l’espèce *Pseudomonas aeruginosa* à 100% de similarité sur des fragments de 1034pb, 1031 pb et 1031 pb respectivement. Par contre, la souche 3 donne une séquence similaire à l'espèce *Bacillus cereus* à 99% de similarité sur un fragment de 1050pb.





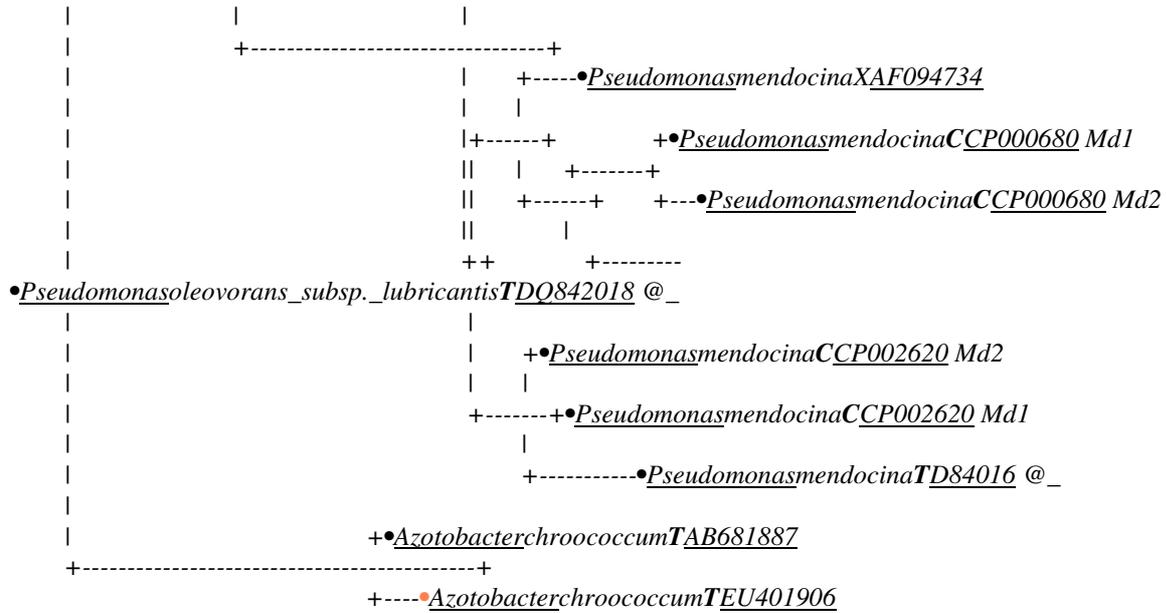
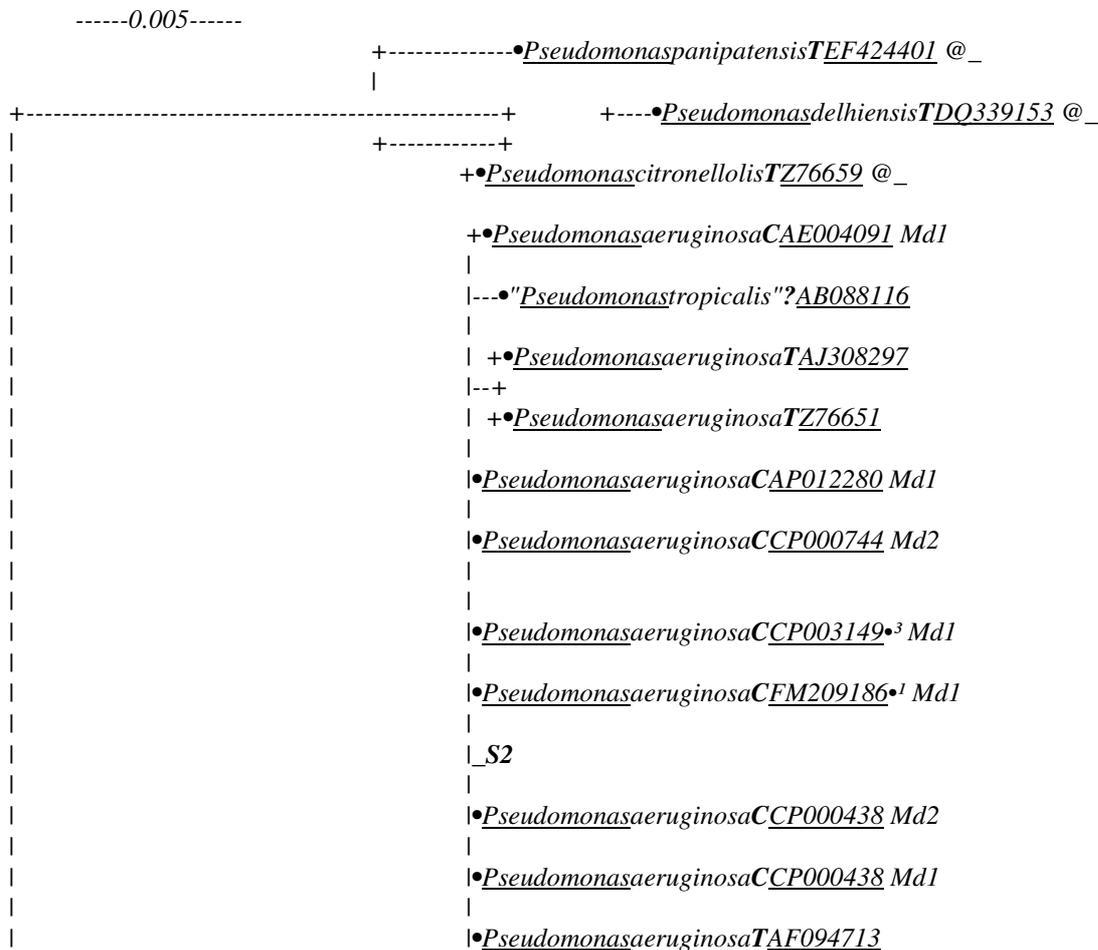


Figure 27: Arbre phylogénétique des séquences du gène ARNr16S de la souche 1 (*Pseudomonas aeruginosa*).



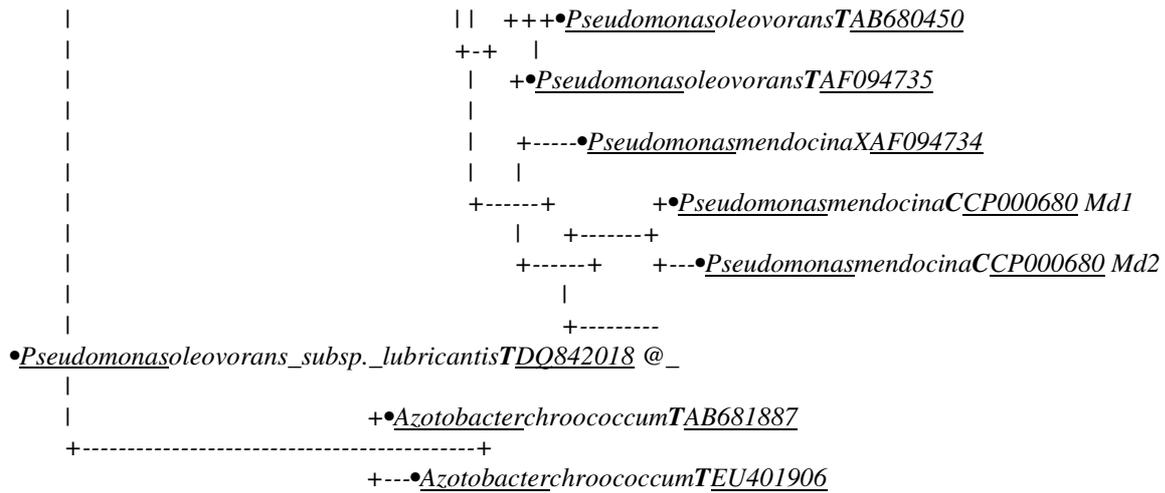
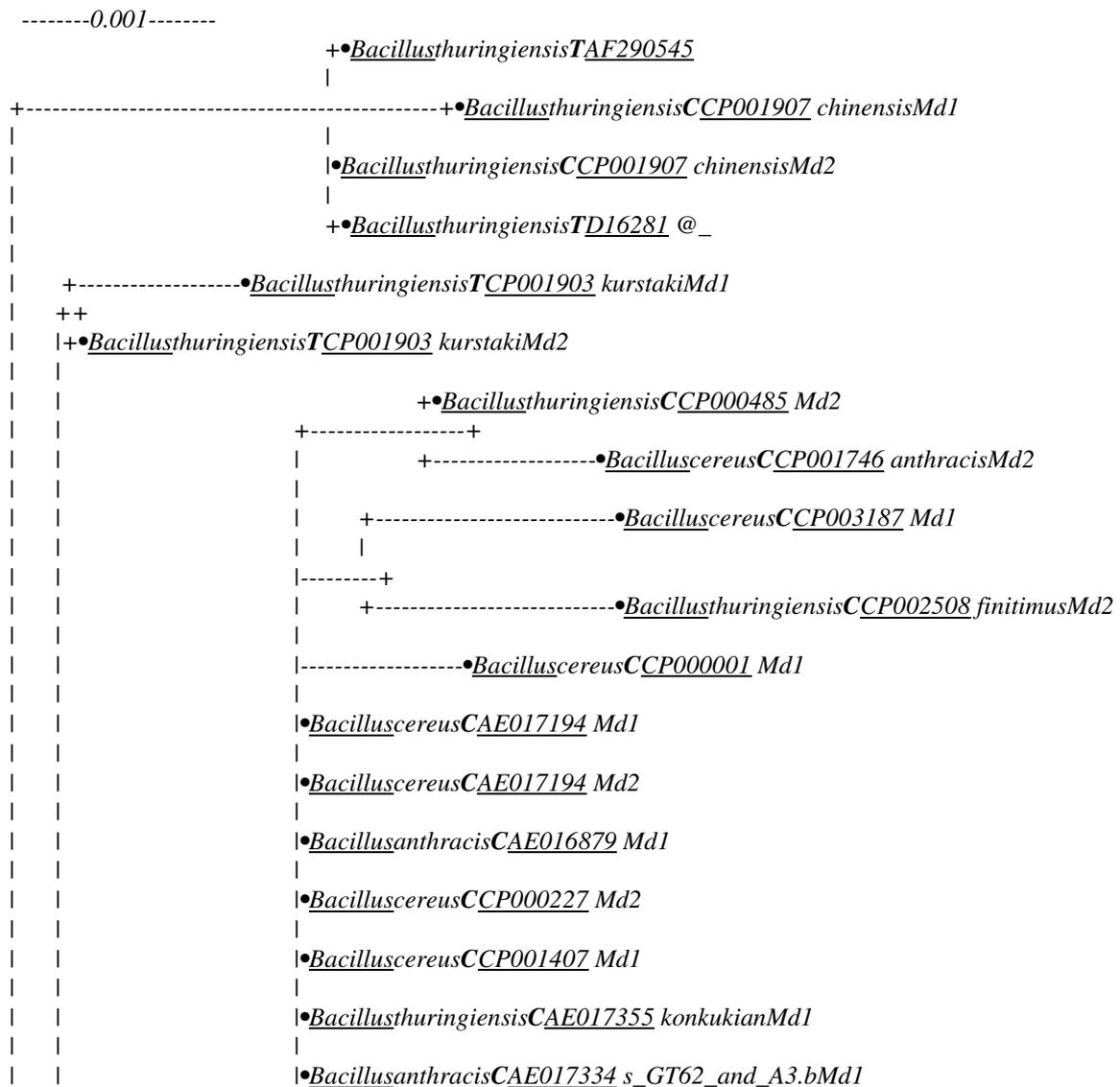


Figure 28: Arbre phylogénétique des séquences du gène ARNr16S de la souche 2 (*Pseudomonas aeruginosa*).



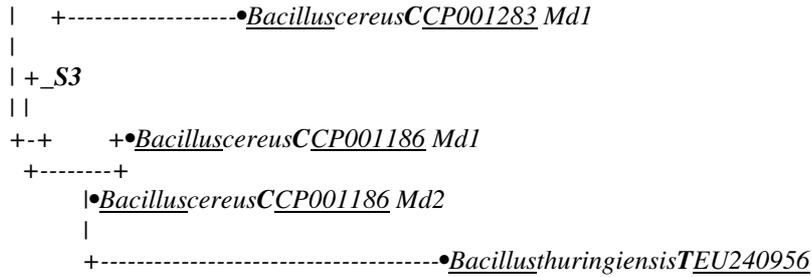
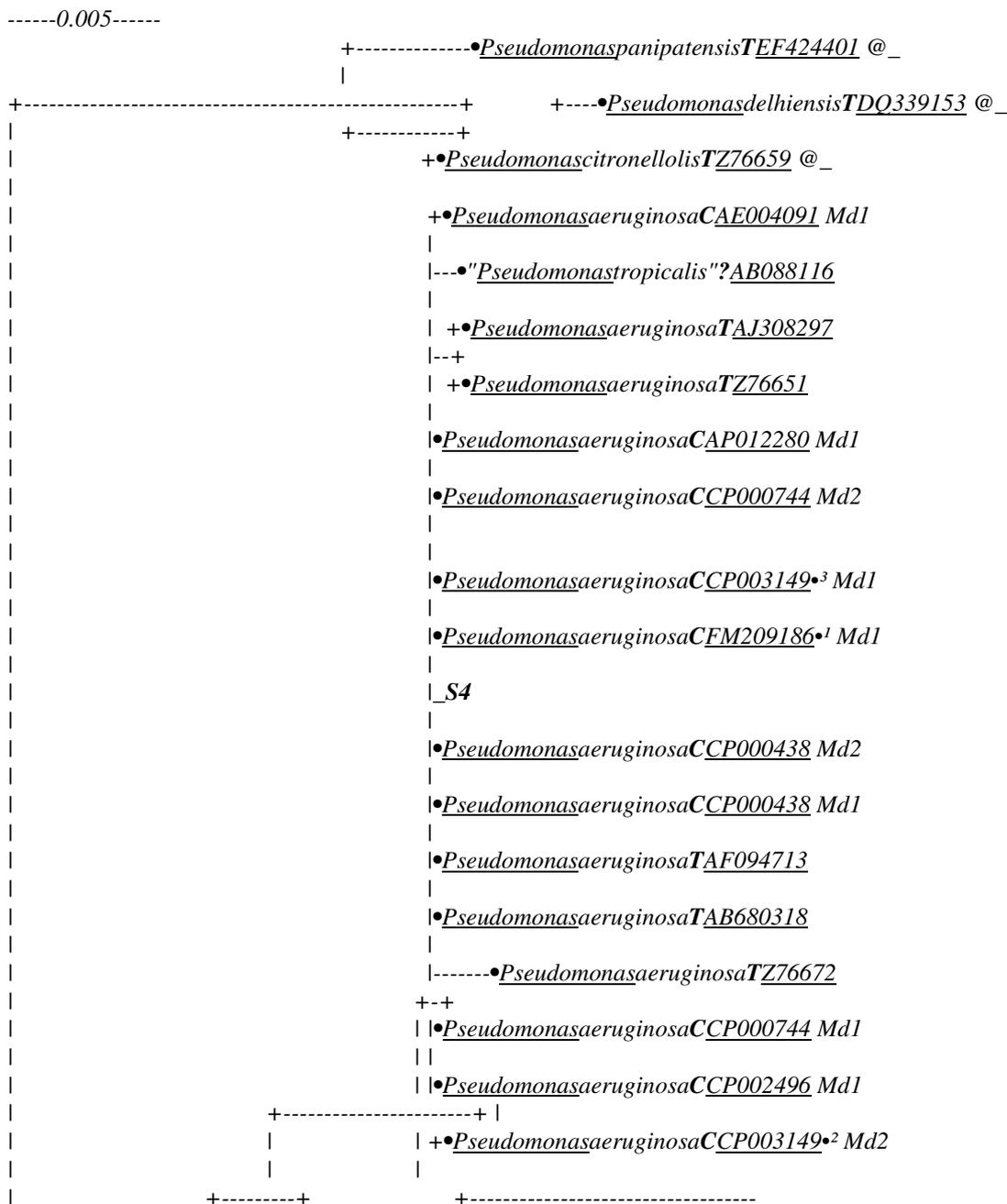


Figure 29: Arbre phylogénétique des séquences du gène ARNr 16S de la souche 3 (*Bacillus cereus*).



```

•PseudomonasaeruginosaTX06684 @ _
|
| +-----+ | +-----•PseudomonasresinovoransTAB021373
| | | |
| | | | +---•"Pseudomonasguzeneni"?AJ876736
| | | | +-----+
| | | | +---•PseudomonasotitidisTAY953147 @ _
|
| | | | +•PseudomonasstutzeriTAF094748 @ _
| | | | |
| | | | +-----+•PseudomonasstutzeriCCP000304 Md1
| | | | |
| | | | | |•PseudomonasstutzeriCCP000304 Md2
| | | | | |•PseudomonasstutzeriCCP002622 Md1
| | | | | |•PseudomonasstutzeriTCP002881 Md2
| | | | | |•PseudomonasstutzeriCCP002622 Md2
| | | | | |•PseudomonasstutzeriTU26262
| | | | | |•PseudomonasstutzeriTAJ288151
| | | | | | |
| | | | | | +---•PseudomonasstutzeriTCP002881 Md1
| | | | | | +-+
| | | | | | +•PseudomonasstutzeriTAB680573
| | | | | |
| | | | | | +•PseudomonasalcaligenesTZ76653
| | | | | | |
| | | | | | +-----+ +•PseudomonasalcaligenesTAB680567
| | | | | | | +
| | | | | | | +---•PseudomonasalcaligenesTHM190231
| | | | | | | |
| | | | | | | +•PseudomonasalcaligenesTAF094721
| | | | | | |
| | | | | | | +•PseudomonasmendocinaCCP002620 Md2
| | | | | | | +-----+
| | | | | | | | +•PseudomonasmendocinaCCP002620 Md1
| | | | | | | | +---•PseudomonaspseudoalcaligenesTZ76675
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |•PseudomonaspseudoalcaligenesTAB680574
| | | | | | | | +-----+ +-----+
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | +•PseudomonaspseudoalcaligenesTZ76666 @ _
| | | | | | | | | | | +
| | | | | | | | | | | + + +•PseudomonasoleovoransTAB680450
| | | | | | | | | | | +-+ |
| | | | | | | | | | | | +•PseudomonasoleovoransTAF094735
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | +-----•PseudomonasmendocinaXAF094734
| | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | +-----+ +•PseudomonasmendocinaCCP000680 Md1
| | | | | | | | | | | | | +-----+
| | | | | | | | | | | | | +-----+ +---•PseudomonasmendocinaCCP000680 Md2
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | +-----
|
•Pseudomonasoleovorans_subsp._lubricantisTDQ842018 @ _

```

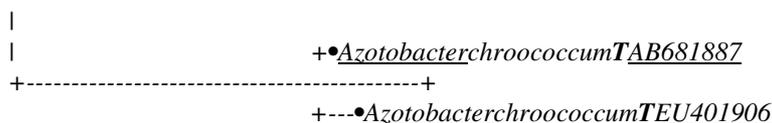


Figure 30: Arbre phylogénétique des séquences du gène ARNr16S de la souche 4 (*Pseudomonas aeruginosa*).

Les espèces du genre *Pseudomonas* ont un potentiel de dégradation des phénols très élevé. Elles sont considérées, par cet aspect, comme les espèces bactériennes les plus efficaces dans les processus de bioremédiation des phénols des eaux usées, grâce à leur aptitude à les dégrader même si leur présence dans le milieu est importante. L'adaptation des souches bactérienne, la libération de nitrites et de CO₂, les changements de comportement des organismes dégradants vis-à-vis des substances phénoliques, la capacité des enzymes à dégrader des composés connexes, donnent des idées à se pencher sur les aspects génétiques de la dégradation des nitrophénols. Les *Pseudomonas* isolées sont capables d'utiliser le PNP et le parathion méthylé (MP), tels que le glucose et le fructose, comme la seule source de carbone. La dégradation de ces composés par les isolats de *Pseudomonas* est jugée plasmidique. La taille du plasmide de bactéries dégradantes le PNP est d'environ 36 kb, tandis que les bactéries dégradantes le parathion méthylé (MP) possèdent de nombreux plasmides [136]. Les Actinomycètes sont aussi capables de dégrader le PNP. Ils contiennent de grands plasmides. Cependant, un isolat peut perdre sa capacité à dégrader le PNP spontanément. Le transfert conjugal permet alors à la souche utilisée de restaurer sa capacité à dégrader le PNP, indiquant ainsi que les gènes de dégradation des isolats est un plasmide codé [137]. Un plasmide de 50 kb porte les gènes de dégradation du PNP dans la souche *Pseudomonas cepacia* RKJ 2000, qui également code la résistance aux ions de zinc inorganiques [131].

Des études menées sur un dérivé de PNP et PNP + transconjugant démontrent que les gènes de la voie 4-nitrocatéchol résident sur le plasmide présent dans *Pseudomonas cepacia* RKJ200 (maintenant *Burkholderia cepacia*). Le PNP et le 4-nitrocatéchol sont dégradés en passant par la formation de l'hydroquinone (HQ) et qu'il est probable que le même ensemble de gènes codent encore le métabolisme du HQ dans la dégradation du nitrocatéchol (NC) et du PNP [134]. Des études similaires menées sur *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 indiquent que les mêmes gènes sont probablement impliqués dans la dégradation du PNP et du NC. En révélant un plasmide de 65.000 pb contenant des gènes pour la dégradation de NC et du PNP et qui a des applications potentielles dans la bioremédiation et la décontamination des sols [133].

Diverses études existent quant à l'utilisation des nitrophénols comme sources de carbone, d'azote et/ou d'énergie par les microorganismes [138]. Ainsi, *Pseudomonas putida* se développe en utilisant l'ONP comme seule source de carbone et d'azote. Environ huit souches bactériennes ont été isolées à partir de différents sites pollués par les pesticides en Bulgarie et aux USA. Ces souches utilisent le PNP comme seule source de carbone et d'azote, trois souches d'entre elles utilisent le PNP comme seule source de carbone et d'azote alors que quatre souches utilisent le PNP en tant que source d'azote seulement [132]. Une population microbienne adaptée isolée à partir d'une boue activée conservée dans des particules poreuses utilise le PNP comme seule source de carbone, elle dégrade le PNP en donnant le nitrite sans accumulation significative de métabolites intermédiaires [139]. *Pseudomonas* sp. A3, isolée du sol, dégrade le parathion méthylé (MP) et d'autres pesticides, en utilisant la partie aromatique du PNP en tant que source de carbone et d'énergie lors de l'hydrolyse de MP [69]. Trois souches d'*Arthrobacter* sp. issues de sols contaminés métabolise aussi le PNP comme source de carbone [70]. Par ailleurs, Il est montré que d'autres sources de carbone et des nutriments inorganiques ont un effet profond sur la dégradation des nitrophénols. *Pseudomonas cepacia*, isolée à partir de boues industrielles, est capable d'utiliser le PNP, le DNP (dinitrophénol), le DNOC (Dinitro-*ortho*-crésol) ou le NB (nitrobenzoïque) comme seule source d'azote mais en présence d'acide succinique comme source de carbone primaire [71]. L'addition de citrate, comme source de carbone secondaire, ne peut pas améliorer la croissance bactérienne de *Pseudomonas putida* 2NP8 aux dépend du nitrobenzène. Mais la souche a pu utiliser l'ONP et le MNP (*m*-nitrophénol) comme substrats de croissance [72]. Ainsi, le taux de la dégradation et de la croissance bactérienne d'une culture mixte de *Comomonas testosteronii* et *Acidovorax delafieldie* ne varie pas en présence de 20 mg/l de PNP, en milieu enrichi d'extrait de levure à 1% [73].

Il est démontré que *Pseudomonas aeruginosa*, isolée à partir des eaux usées d'industries pharmaceutiques, dégrade les phénols jusqu'à une concentration initiale de 2600 mg/L en 150 heures. Simultanément, *Pseudomonas pseudomallei* dégrade 1500 mg/L de phénols durant la même période. Ce processus est aussi observé en présence de fortes concentrations salines [102]. Ainsi, *Pseudomonas putida* assimile 85% d'une concentration de phénols de 500 mg/L [140].

La biodégradation des phénols, et particulièrement des nitrophénols, n'est pas limitée aux bactéries du genre *Pseudomonas*. Bien que rarement impliquées dans la bioremédiation et bien moins connu en ce domaine, des bactéries du genre *Bacillus* semblent aussi jouer un rôle important dans l'élimination de l'ONP et du PNP des milieux naturels

[141]. En effet, des études récentes montrent que des souches pures du *Bacillus cereus* AKG1 MTCC9817 et AKG2 MTCC 9818 immobilisées sont capable de dégrader plus de 50% de 2000 mg/L de phénols après 36 jours [142]. Cependant, les voies biochimiques de dégradation de ces polluants phénoliques sont démontrées [143].

Dans cette étude, l'identification moléculaire montre la présence dominante et de manière permanente durant les deux mois de cinétique de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Bacillus cereus*. Si la présence de *Pseudomonas aeruginosa*, est commune dans de telles situations, celle de *Bacillus cereus* est bien plus rarement établie, elle en est en souche pure mais pas encore en consortium microbien, ce que montrent nos résultats.

Conclusion générale

Notre travail avait pour objectif principal, l'étude de la biodégradation de l'*ortho*-Nitrophénol (ONP) et du *para*-Nitrophénol (PNP). Deux isomères de mononitrophénols qui ont des effets toxiques sur l'homme, les plantes et les animaux, répertoriés comme polluants phénoliques majeurs de l'environnement à cause de leurs présence dans la plupart des milieux naturels: lacs et cours d'eau, eaux souterraines, terres agricoles, atmosphère.

L'étude repose sur l'utilisation d'un consortium microbien complexe à partir d'un échantillon des eaux usées, de la ville de Constantine, apte à dégrader de fortes concentrations de nitrophénols (500 mg/L) en aérobiose et en cultures discontinues. Une analyse par HPLC et GC-MS est appliquée pour l'identification des métabolites produits de la biodégradation. Un isolement et une identification biochimique et moléculaire par le séquençage de l'ARNr 16S, des bactéries dominantes, responsables de la biodégradation, sont également réalisés.

Les résultats obtenus montrent la capacité intrinsèque du microbiote des eaux usées à croître aux dépens de l'ONP et du PNP. Après 30 jours d'incubation, 90 % des 500 mg du PNP initial sont éliminés par l'action du microbiote des eaux usées. Après une phase de latence de 2 heures, 77% des 500 mg de l'ONP sont décomposés durant la même période d'incubation. Cependant, aucune dégradation abiotique n'est constatée pour les deux isomères. En effet, les études menées sur la biodégradation des nitrophénols ont montré que la vitesse de décomposition de ces substances chimiques n'est pas constante et dépend de plusieurs facteurs du milieu de culture [102],[114],[115]. Ainsi, une dégradation rapide et complète de fortes concentrations de polluants phénoliques est obtenues dans la plupart des cas par des souches bactériennes pures et sur des milieux de cultures enrichis [103], [104], [120]. Sans oublier l'effet de l'adaptation des microorganismes qui joue un rôle majeur dans la détermination du taux de la biodégradation [144],[145],[146],[147]. L'adaptation peut se produire par l'induction d'enzymes spécifiques non présent (ou présents à des niveaux bas) par exposition de la population au nouveau substrat à dégrader. Aussi, par la sélection de nouvelles capacités métaboliques produites par des modifications génétiques et une augmentation du nombre d'organismes capables de catalyser une transformation particulière [148]. Dans ce contexte, les constantes de vitesse déterminées en utilisant la population adaptée sont incomparables à celles déterminées en utilisant la population inadaptée [149]. Ainsi, il est rapporté que l'expression des gènes qui codent pour la dégradation des composés aromatiques est souvent plutôt inductible que constitutive [150],[151].

Nos résultats montrent donc la capacité importante du microbiote des eaux usées à dégrader une forte concentration de nitrophénols en milieu de culture minimum. D'autant plus que les concentrations élevées de ces substances toxiques peuvent être inhibitrices de l'activité microbienne [101]. La diminution de la concentration de l'ONP et du PNP dès les premières heures d'incubation, indique une croissance microbienne significative, malgré la concentration du nitrophénol bien plus élevée. Cette situation est vérifiée par la croissance positive obtenue parallèlement sur milieu solide.

L'analyse par HPLC et GC-MS a permis d'identifier les produits de la biodégradation des deux isomères, qui sont: le 3-méthylbenzoquinone, le 1,2,4 triméthylbenzène, le catéchol et l'acide nitreux (HNO_2) pour le PNP. Cependant, les résultats de la GC-MS obtenus, montrent l'apparition d'une variété de métabolites produits de la biodégradation de l'ONP: l'acide acétique, l'apparition des dérivés benzéniques: l'acide benzoïque, 3-méthylbenzoquinone, le 2-cyclohexanylecarboxyle méthanol, l' α -aminométhylbenzyle alcool et le 2-acétonitrile, en plus, de l'acide nitreux. Ces résultats confirment que l'ONP et le PNP sont dégradés selon les voies de dégradation déjà prescrites [121], [122].

La comparaison de la biodégradation entre les deux isomères, révèle que le PNP est dégradé plus que l'ONP. Suggérant ainsi, que chaque isomère est dégradé par une population bactérienne différente. Cependant, l'ensemencement sur milieu solide confirme que le l'ONP et le PNP sont dégradés par la même population bactérienne. En effet quatre souches bactériennes macroscopiquement différentes sont observées après ensemencement sur le milieu solide pour les deux isomères de nitrophénol. L'examen microscopique après coloration de Gram montre que trois souches bactériennes sont des bacilles à Gram négatif alors que la quatrième est un bacille à Gram positive avec présence d'endospore. Les résultats de l'identification biochimique et moléculaire par séquençage de l'ARNr 16S, montrent que les espèces bactériennes responsables de la biodégradation de l'ONP et du PNP sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*.

Ces résultats sont similaires à ce qui est obtenu dans la plupart des études menées sur la biodégradation de faibles et de fortes concentrations des nitrophénols [77],[116],[142],[143]. En effet, les espèces du genre *Pseudomonas* ont un potentiel de dégradation des phénols très élevé. Elles sont considérées, par cet aspect, comme les espèces bactériennes les plus efficaces dans les processus de bioremédiation des phénols des eaux usées, grâce à leur aptitude à les dégrader même si leur présence dans le milieu est importante. Bien que moins connu en ce domaine, des bactéries du genre *Bacillus* semblent aussi jouer un rôle important dans l'élimination des nitrophénols des milieux naturels [144].

L'absence d'une dégradation abiotique confirme, encore une fois par notre étude, la persistance de ces polluants phénoliques dans l'environnement.

Une étude similaire est menée sur la biodégradation de phénols méthylés (Crésols), par le microbiote des eaux usées de la ville de Constantine [152].

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la vitesse de la biodégradation des trois isomères augmente selon l'ordre : *m*-crésol > *p*-crésol > *o*-crésol. Le *m*-crésol est dégradé presque totalement (90% en moyenne), au bout de 14 jours d'incubation, par l'action prépondérante du microbiote. Le *p*-crésol est dégradé partiellement durant les premiers 14 jours d'incubation, où plus de la moitié de sa concentration initiale est décomposée par l'inoculum (60% en moyenne). La biodégradation de l'*o*-crésol n'est déclenchée qu'après 72 heures d'incubation par le microbiote. Après 30 jours d'incubation, la biodégradation de l'*o*-crésol s'accroît, où 75% de la concentration de la molécule sont décomposés par la voie biologique. L'étude morphologique et biochimique des cellules bactériennes isolées, a permis de les rapprocher aux genres: *Alcaligenes* et *Pseudomonas*.

La variété des microorganismes constituant l'inoculum des différents échantillons des eaux usées prélevées, expliquerait probablement la modification ou la préservation de l'activité et/ou de l'équilibre initial de l'inoculum. Ce qui montre clairement la capacité des microorganismes à croître, en présence de concentrations élevées de phénols, ou même lorsqu'ils se présentent à de très faibles concentrations.

La comparaison des deux études montre que les bactéries du genre *Pseudomonas* sont toujours prédominantes dans notre inoculum constitué des eaux usées de la ville de Constantine. On confirme de ce fait, qu'elles sont capables de résister aux fortes concentrations de molécules phénoliques, les consommer au profit de leurs croissances, en les dégradant partiellement ou totalement, quelque soit la diversité de leur nature chimique.

Il est à signaler que plusieurs auteurs montrent la capacité des champignons à dégrader une large variété de produits chimiques dont les composés nitroaromatiques. Ces études rapportent la dégradation, voire la minéralisation des composés nitroaromatiques par *Phanerochaete chrysosporium* [153], [154], [155], [156]. Il a aussi démontré que la dégradation co-métabolique de l'ONP, MNP et PNP par *Penicillium sp.* B 7/2 est de plus en plus importantes en présence du glucose [157].

Nos travaux sur la biodégradation des nitrophénols et des crésols, montrent la présence d'autres genres bactériens: *Alcaligenes sp.* et *Bacillus cereus*, qui sont rarement impliqués dans le processus de bioremédiation. Si la présence de *Pseudomonas aeruginosa*,

est commune dans de telles situations, celle de *Bacillus cereus* et d'*Alcaligenes sp* est bien plus rarement établie, elle en est en souche pure mais pas encore en consortium microbien, ce que montrent nos résultats.

Notre étude montre une nouvelle fois le rôle prépondérant que jouent les bactéries dans la détoxification des milieux naturels pollués, même si elles se présentent en consortium microbien. En perspectives, Il serait vraiment intéressant, d'optimiser le milieu de culture pour une biodégradation rapide et totale, afin de les utiliser dans les processus de bioremédiation et de détoxification des environnements pollués.

Références bibliographiques

1. Metiche M., 2004. Environnement: phénomènes de pollution et techniques de protection. Centre Universitaire de Béchar, Algérie.
2. U.S. EPA. Water Quality Standards Database. U.S. 2006. EPA, Washington, DC.
3. OMS., 2012. Eau, Assinissement et Santé, Maladies liées à l'eau.
4. Afzal M., Iqbal S., Rauf S., Khalid Z.M., 2007. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. *J. Hazard. Mater.*, 149: 60–66.
5. Glanic R., Bennton J.P., 1989. Caractérisation d'effluents d'assainissement individuel et essais de matériels d'assainissement autonome TSM- L'eau 84 années., 11: 573-584.
6. Vaillant J.R., 1974. Perfectionnement et nouveautés pour l'épuration des eaux résiduaires. Eyrolles, Paris: 21-24, 236-237.
7. Direction de l'environnement et des établissements classés., 2007. Normes Sénégalaise, eaux usées, Normes de Rejet.
8. Grosclaude G., 1999. L'eau, tome 1 : Milieu naturel et maîtrise. Versailles, Institut National de la recherche Agronomique: 204, 210.
9. Rodier J., 2005. L'analyse de l'eau naturelle: eaux naturelles, l'eaux résiduaires, eaux de mer. Dunod, Paris (8^{ème} ed): 535-540.
10. Martin G., 1982. Point sur l'épuration et le traitement d'effluents (eau, air). Volume 1. Tec & Doc, Lavoisier, Paris(ed).
11. Rejesek F., 2002. Analyse des eaux - Aspects réglementaires et techniques. Canopé-CRDP de Bordeaux(ed).
12. Mathieu C., Pieltain F., 2003. Analyse chimique des sols, méthodes choisies, Lavoisier, Tec & Doc, Paris(ed): 575, 576.
13. Salghi R., 2011. Chimie des eaux. L'Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir: 8-9.

14. Zourez O., Ferhani., 2003. Etude physico-chimique et biologique d'un écosystème aquatique: Barrage de Boukourdane (wilaya de Tipaza). Mémoire d'ingénieur d'état en aquaculture, ISMAL.
15. Yahiatene S., Tahirim T., 2010. Réflexion sur la caractérisation physico-chimique des effluents liquides rejetés dans la grande sebkha d'Oran. Université d'Oran.
16. Metahri M.S., 2012. Elimination simultanée de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitées par des procédés mixtes. Cas de la STEP et de la ville de Tizi- Ouzou. Thèse de Doctorat. Université de Tizi-Ouzou.
17. Deronzier G., Schétrite S., Racault Y., Canler J P., Liénard A., Héduit A., Duchène P., 2001. Groupement d'Antony UR Qualité et fonctionnement hydrologique des systèmes aquatiques, Parc de Tourvoie.
18. Abaki R., 2012. Elimination des métaux lourds (Cd, Pbn Cr, Zn et As) des eaux usées industrielles et naturelles par le procédé d'infiltration-percolation. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Aghadir.
19. FABY J.A., BRISSAUD F., 1998. L'utilisation des eaux usées épurées en irrigation. Office International de l'Eau: 18.
20. Microsoft Corporation., 2007. Encyclopédie Microsoft Encarta, Redmond, USA.
21. Toze S., 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewaters. *Water. Res.*, 33: 3545-3556.
22. Pelmont J., 2005. Biodégradation et métabolismes: Les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP. Sciences (ed): 10,11.
23. Campos C., 2008. New perspectives on microbiological water control for wastewater reuse. *Desalination.*, 218: 34-42.

24. Gennaccaro A.L., Mc Laughlin M.R., Quintero-Betancourt W., Huffman D.E., Rose J.B., 2003. Infectious *Cryptosporidium paravum* oocysts in final reclaimed effluent. *Appl. Envi. Microbio.*,69: 4983-4984.
25. Toze S., 2006. Reuse of effluent water-benefit and risks. *Agricul. Water. Manag.*, 80: 147-159.
26. Aulicino E.A., Mastrantonio A., Orsini E., Bellucci C., Muscillo M., Larosa G., 1996. Enteric viruses in wastewater treatment plant in Rome. *Water. Air. Soil. Pollut*, 91: 327-334.
27. OMS., 1989. L'utilisation des eaux usées en agriculture et en aquaculture : recommandations à visées sanitaires. Genève, Série de rapports techniques n° 778: 81.
28. Gaujous. D., 1995. La pollution des milieux aquatiques: aide-mémoire. Tec & Doc, Lavoisier, Paris(ed).
29. Libes Y., 2010. Les eaux usées et leur épuration, Académie de Nancy-Metz.
30. Vincent M., 2003. Aquaculture Environnement, institut français de l'environnement: 216- 220.
31. Guide d'assainissement., 2007. Direction Assainissement et Environnement de l'ONEP (Office Nationale de l'Eau Potable), Maroc.
32. Satin M., Belmi S., 2001. Agence de l'eau Seine-Normandie, Guides des procédés épuratoires intensifs proposés aux petites collectivités, Nanterre.
33. Ferchich M., Ghrabi A., Grasmick A., 1994. Epuration d'eau usée urbaine par biodisques et lit bactérien .*Water. research.*, 437- 443.
34. Chaisemartin D., 2005. Rôle des bassins à boues activées classiques. Ingénieur d'études de la spécialité Eau et Environnement de L'ENSIL.
35. Dégrémont., 2005. Mémento Technique de l'Eau Tome 1, Lavoisier, Paris (10^{ème} ed).
36. Joseph S. Deviny, Marc A. Deshusses, Todds.Webster., 1999. Biofiltration for air pollution control, University of california.USA, CRC press: 299.

37. Morel M. A., Kane M., 2003. Lagunage à macrophytes à Dakar : Lagunage à macrophytes, une technique permettant l'épuration, le recyclage des eaux usées et la valorisation de la biomasse. *Sud Science & Technologie*.
38. Chaib J., 2002., L'épuration des eaux usées par les plantes. Connaître pour agir, l'Agence Régionale de l'Environnement de la Haute-Normandie.
39. Pöppinghaus K., Filla W., Sensen S., Schneider W., 1994. Abwassertechnologie Entstehung, Ableitung, Behandlung, Analytik der Abwässer (Technologie des eaux résiduaires: production, collecte, traitement et analyse des eaux résiduaires). Pöppinghaus, Klaus, Schneider, W., Fresenius, W. (Hrsg.) (ed).
40. Aussel H., Dornier G., 2004. Le traitement des eaux usées (Institut national de recherche et de sécurité), Paris.
41. FEPS (Fondation de l'Eau Potable Sûre), 2013. Traitement des eaux usées: 11.
42. Gouvernement du Québec., 2002. Guide pour l'étude des technologies conventionnelles de traitement des eaux usées d'origine domestique.
43. Chaisemartin D., 2005. La dénitrification. Ingénieur d'études de la spécialité Eau et Environnement de l'ENSIL.
44. Michelin J., 2003. La qualité de l'eau et assainissement en France, la dénitrification naturelle (Institut agronomique de Paris –Grignon).
45. Bernal-Martinez A., 2005. Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage ozonation-digestion anaérobie. Thèse en génie des procédés, Montpellier II France.
46. Duvand J., Mugnier E., Gazzo E., Aubain A., Wiart P., 1999. Situation du recyclage agricole des boues d'épuration urbaines en Europe et dans divers autres pays du monde. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. ADEME. Centre Angers.

47. Schwarzenbach R.P., Stierli R., Folsom B.R., Zeyer J., 1988. Compound properties relevant for assessing the environmental partitioning of nitrophenols. *Environ. Sci. Technol.*, 22: 83-92.
48. Piet G.J., Smeenk J.G.M.M., 1985. Behaviour of organic pollutants in pretreated Rhine water during dune infiltration. In Ward CH, Giger HL and McCarty PL (ed).
49. Tokiwa H., Ohnishi Y., 1986. Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.*, 17: 23-60.
50. Masse R., Badr M., Ayotte C., Sylvestre M., 1985. Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of bacterial metabolites of 4-nitrobiphenyl formed in gram negative strain B206. *Toxicol. Environ. Chem.*, 10: 225-46.
51. Hartter D.R., 1985. The use and importance of nitroaromatic chemicals: in the chemical industry in "Toxicity of Nitroaromatic compounds" (Rickert D.E. ed.) Chemical Industry Institute of Toxicology Series. *Hemisphere*. Washington. DC: 1-14.
52. Tuovinen K., Kalislekorhonen E., Raushel F.M., Hanninen O., 1994. Phosphotriesterase-(A) promising candidate for use in detoxification of organophosphates. *Fundam. Appl. toxicol.*, 23: 578-84.
53. Kumar S., Mukerji K.G., Lai R., 1996. Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.*, 22: 1-26.
54. McCormick N.G., Feeherry F.F., Levinson H.S., 1976. Microbiol transformation of 4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31: 949-58.
55. Gerald Booth., 2007. Nitro Compounds, Aromatic in "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry"., John Wiley & Sons: New York (ed).
56. Shabana B., 2003. Studies on biodegradation of nitrophenols isomers by mixed bacterial cultures. Thesis of University of Mysore, India.

57. Brecken-Folse, J.A., Mayer F.L., Pedigo L.E., Marking L.L., 1994. Acute Toxicity of 4-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol, Terbufos and Trichlorfon to Grass Shrimp (*Palaemonetes sp.*) and Sheepshead Minnows (*Cyprinodon variegatus*) as Affected by Salinity and Temperature. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13(1):67-77.
58. Crawford R.L., 1995. Biodegradation of nitrated munition compounds and herbicides by obligately anaerobic bacteria. In Spain JC (ed.). Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Plenum Press*, New York, N.Y: 87-98.
59. Kaake R.H., Crawford D.L., Crawford R.L., 1994. Optimization of an aerobic bioremediation process for soil contaminated with the nitroaromatic herbicide: Dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol). In "Applied Biotechnology for Site Remediation", ed. Henchee RE, Anderson DB, Metting Jr. FB and Sayles GD. Boca Raton: Lewis. 337- 341.
60. Marvin-Sikkema F.D., de Bont J.A.M., 1994. Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 499-507.
61. Alexander M., 1979. In "Microbial degradation of Pollutants in Marine environments" (Bourquin AW and Pritchard PH, eds.), *United States Environment Protection Agency*, Gulf Breeze, Flor: 67.
62. Folsom B.R., Stierli R., Schwarzenbach R.P., Zeyer J., 1993. Comparison of substituted 2-nitrophenol degradation by enzyme extracts and intact cells. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 306-11.
63. Petrova K.P., Laha S., 1995. Characteristics of nitrophenols degrading bacteria, isolated from various contaminated soils. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 95: 437.
64. Prakash D., Chauhan A., Jain R.K., 1996. Plasmid encoded degradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas cepacia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 224: 75-81.
65. Chauhan A., Samanta S.K., Jain R.K., 2000. Degradation of 4-nitrocatechol by *Burkholderia cepacia*: a plasmid-encoded novel pathway. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 764-72.

66. Bhushan B., Chauhan A., Samanta S.K., Jain R.K., 2000. Kinetics of biodegradation of *p*-Nitrophenol by different bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274: 626-30.
67. Xing X.H., Inoue T., Tanji Y., Unno H., 1999. Enhanced microbial adaptation to *p*-nitrophenol using activated sludge retained in porous carrier particles and simultaneous removal of nitrite released from degradation of *p*-nitrophenol. *J. Ferment. Bioeng.*, 87: 372-77.
68. Ramanathan M.P., Lalitha Kumari D., 1999. Complete mineralization of methylparathion by *Pseudomonas sp.* A3. *Appl. Environ. Biochem. Biotechnol.*, 80:1-12.
69. Hanne L.F., Kirk L.L., Alger D., Woodruff T., Casadevall M., 1991. Characterization of soil actinomycetes capable of degrading *para*-nitrophenol. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 91: 303.
70. Mohammed T., Bartha R., Antonie A., 1994. Biodegradation of three nitrophenols and of 2-nitrobenzoate by *Pseudomonas cepacia*. *Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 13. pp
71. Zhao J.S., Ward O.P., 2000. Cometabolic transformation of nitrobenzene by 3-nitrophenol degrading *Pseudomonas putida* 2NP8. *Can. J. Microbiol.*, 46: 643-52.
72. Zhao J.S., Ward O.P., 1999. Microbial degradation of nitrobenzene and mononitrophenol by bacteria enriched from municipal activated sludge. *Can. J. Microbiol.*, 45: 427-32.
73. Scow K.M., Schmidt S.R., Alexander M., 1989. Kinetics of biodegradation of mixtures of substrates in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 21: 703-08.
74. Zaidi B.R., Murakami Y., Alexander M., 1989. Predation and inhibitors in lake water affect the success of inoculation to enhance biodegradation of organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 23: 859-63.
75. Tseng S.K., Haung S.H., Huang S.K., 1996. Anaerobic digestion of nitrophenol in the presence of glucose. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.*, 61: 2085-92.

76. Zaidi B.R., Mehta N., 1994. The role of inoculum size in the success of inoculation to enhance biodegradation of toxic chemicals at high and low concentrations. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 134(19): 94-407.
77. Robertson B.K., Alexander M., 1991. Influence of calcium, iron and pH on phosphate availability for microbial mineralization of organic chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 38-41.
78. Jones S.H., Alexander M., 1988. Effect of inorganic nutrients on the acclimation period preceding mineralization of organic chemicals in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 3177-79.
79. Baumann E., Herter E., 1978. *Hoppe-Seyl. Z.* 1: 244. In Robinson et al., (1951). Studies in Detoxication.39. Nitro Compounds. *Biochem. J.*, 50: 221.
80. Meyer E., 1905. *Hoppe Seyl. Z.* 46: 497. In Robinson et al., (1951). Studies in Detoxication.39. Nitro Compounds. *Biochem. J.*, 50: 221.
81. Oettingen., Von W.F., 1949. *Nat. Inst. Hlth. Bull.* No. 190: 232. In Robinson et al., (1951) Studies in Detoxication.39. Nitro Compounds. *Biochem. J.*, 50: 221.
82. Robinson D., Smith J.N., Williams R.T., 1951. Studies in detoxification of 39 nitro compounds. *Biochem. J.*, 50: 221-227.
83. Angermaier L., Simon H., 1983. On nitroaryl reductase activities in several *Clostridia*. *Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem.*, 364: 1653-64.
84. Oren A., Gurevich P., Hems Y., 1991. Reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic *Haloanaerobacterium praevalens* and *Sporohalobacter marismortui*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 3367-70.
85. Rafii F., Franklin W., Heflich R.H., Cerniglia C.E., 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 962-68.

86. Boopathy R., Kulpa C.F., 1993. Nitroaromatic compounds serve as nitrogen for *Desulfovibrio* sp. (B strain). *Can. J. Microbiol.*, 39: 430-33.
87. Boopathy R., Kulpa C.F., Wilson M., 1993. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Desulfovibrio* sp. (B strain). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 270-75.
88. Schnell S., Schink B., 1991. Anaerobic aniline degradation via reductive desamination of 4-amino benzoyl-Co.A in *Desulphobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.*, 155: 183-90.
89. Preuss A., Fimpel J., Dickert G., 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6- trinitrotoluene (TNT). *Arch. Microbiol.*, 159: 345-53.
90. Kaake R.H., Roberts D.J., Stevens T.O., Crawford R.L., Crawford D.L., 1992. Bioremediation of soils contaminated with the herbicide 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (Dinoseb). *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1683-89.
91. Funk S.B., Roberts D.T., Crawford D.L., Crawford R.L., 1993. Degradation of trinitrotoluene (TNT) and sequential accumulation of metabolic intermediates by an anaerobic bioreactor during its adaptation to a TNT feed. *Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*: 421.
92. Blasco R., Castillo F., 1992. Light dependent degradation of nitrophenols by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 690-95.
93. Schenzle A., Lenke H., Fischer P., Williams R.A., Knackmuss H.J., 1997. Catabolism of 3-nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP 134. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 1421-27.
94. Dickel O., Knackmuss H.J., 1991. Catabolism of 1,3-dinitrobenzene by *Rhodococcus* sp. QT-1. *Arch. Microbiol.*, 157: 76-79.
95. Zeyer J., Kocher H.P., 1988. Purification and characterization of a bacterial nitrophenol oxygenase which converts *ortho*-nitrophenol to catechol and nitrite. *J. Bacteriol.*, 170: 1789-94.
96. Zeyer J., Kearney P.C., 1984. Degradation of *o*-nitrophenol and *m*-nitrophenol by a *Pseudomonas putida*. *J. Agric. Food. Chem.*, 32: 238-42.

97. Lenke H., Knackmuss H.J., 1992. Initial hydrogenation during catabolism of picric acid by *Rhodococcus erythropolis* HL 24-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2933-37.
98. Kulkarni M., Chaudhari A., 2006. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *P.putida*, *Bioresour. Technol.*, 97: 982–988.
99. Debananda S., Ningthoujam Sanasam S., Mutum A., 2012. Characterization of *p*-nitrophenol degrading actinomycetes from Hundung limestone deposits in Manipur, India. *Afr. J. Biotechnol.*, 11(44): 10210-10220.
100. Essama T., Aly Amin M., El Tayeb O., Mattiasson B., Guieysse B., 2007. Solar-based detoxification of phenol and *p*-nitrophenol by sequential TiO₂ photocatalysis and photosynthetically aerated biological treatment. *Water. Res.*, 41: 1697 – 1704.
101. Boualla N., Benziane A., Charaoui F., 2011. Étude de l'état des eaux usées rejetées dans la grande sebkha d'Oran par l'analyse en composantes principales (ACP). *Science Lib. Mersenne* (ed).
102. Malouki M.A., Sehili T., Boule P., 1996. Photocatalytic oxidation of cresols on Zinc oxide. *J. Toxicol. Environ. Chem.*, 55: 235-246.
103. Banik R.M., Prakash M.R., Upadhyay S.N., 2008. Microbial biosensor based on whole cell of *Pseudomonas sp.* for online measurement of *p*-Nitrophenol. *Sensor. Actuat. B.*, 131: 295–300.
104. Salehi Z., Yoshikawa H., Mineta R., Kawase Y., 2011. Aerobic biodegradation of *p*-nitrophenol by acclimated waste activated sludge in a slurry bubble column. *Process. Biochem.*, 46: 284–289.
105. Leung K.T., Tresse O., Errampalli D., Lee H., Trevors J.T., 1997. Mineralization of *p*-nitrophenol by pentachlorophenol degrading *Sphingomonas sp.* *FEMS- Microbiol. Lett.*, 16: 4107-14.

106. Tseng S.K., Haung S.H., Huang S.K., 1996. Anaerobic digestion of nitrophenol in the presence of glucose. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.*, 61: 2085-92.
107. Tseng S.K., Yang C.J., 1995. The reaction characteristics of wastewater containing nitrophenol, treated using an anaerobic biological fluidized bed *Water. Sci. Technol.* 30: 233-40.
108. Donlon B.A., Razo-Flores E., Lettinga G., Field J.A., 1996. Continuous detoxification, transformation and degradation of nitrophenols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 5: 439- 49.
109. Nishino S.F., Spain J.C., 1993. Cell density dependent adaptation of *Pseudomonas putida* to biodegradation of *p*-nitrophenol. *Environ. Sci. Technol.*, 27: 489-94.
110. Dimkov R., Topalova Y., 1994. Dependence of the microbiological degradation of aryl-containing xenobiotics on their concentration. *Acta-Microbiol. Bulg.*, 29: 9-16.
111. Kotouchkova L., Vavrik J., Nemeč M., Ploček J., Zdrahal Z., 1997. Use of immobilised cells of the strain *Corynebacterium sp.* for 4-nitrophenol degradation. *Folia. Microbiol.*, 42: 509-12.
112. Loeser C., Ait-Oubelli M., Hertel T., 1998. Growth kinetics of the 4-nitrophenol degrading strain *Pseudomonas putida* PNP1. *Acta. Biotechnol.*, 1: 29-41.
113. Ali Sadat S., Walia S.K., 1996. Biodegradation of nitrobiphenyl and nitrotoluene by *Pseudomonas putida*. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 15 (11): 437.
114. Robertson B.K., Alexander M., 1991. Influence of calcium, iron and pH on phosphate availability for microbial mineralization of organic chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 38-41.
115. Jones S.H., Alexander M., 1988. Effect of inorganic nutrients on the acclimation period preceding mineralization of organic chemicals in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 3177-79.

116. Zheng Y., Liu D., Xu H., Zhong Y., Yuan Y., Xiong L., Li W., 2009. Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas aeruginosa* HS-D38 and analysis of metabolites with HPLC–ESI/MS, *Int. Biodeterior. Biodegradation.*, 63:1125–1129.
117. Yin B., Gu. J.D., Wan N., 2005. Degradation of indole by enrichment culture and *Pseudomonas aeruginosa* Gs isolated from mangrove sediment, *Int. Biodeterior. Biodegradation.*, 56: 243–248.
118. Yin B., Huang L., Gu J.D., 2006. Biodegradation of 1-methylindole and 3-methylindole by mangrove sediment enrichment cultures and an isolated *Pseudomonas aeruginosa* Gs, *Water. Air. Soil. Pollut.*, 176:185–199.
119. Monteiro A.A.M.G., Boaventura R.A.R., Rodrigues A.E., 2000. Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochem. Eng. J.*, 6: 45-49.
120. 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, *Bioresour. Technol.*, 99(18): 8553-8.
121. Zeyer J., Kocher H.P, Timmis K.N. 1986. Influence of *para*-substituents on the oxidative metabolism of *o*-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(2): 334–339.
122. Aoki-Kinoshita, K.F., 2007. KEGG Primer: An Introduction to Pathway Analysis Using KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Kanehisa Laboratories.
123. Hanne, L. F., Kirk, L. L., Appel, S. M., Narayan, A. D., Bains, K. K., 1993. Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade *p*-nitrophenol, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3505–3508.
124. Sudhakar, B., Siddaramappa, R., Wahid, P. A., Sethunathan, N., 1978. Conversion of *p*-nitrophenol to 4-nitrocatechol by a *Pseudomonas* sp., *Antonie van Leeuwenhoek*, 44: 171–176.

125. Chauhan, A., Chakraborti, A. K., Jain, R. K., 2000. Plasmid-encoded degradation of *p*-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270: 733–740.
126. Zylstra, G. J., Bang, S.-W., Newman, L. M., Perry, L. L., 2000. Microbial degradation of mononitrophenols and mononitrobenzoates: 145–160, Spain, J. C., Hughes, J. B., Knackmuss, H. J. (ed).
127. Takeo, M., Yasukawa, T., Abe, Y., Niihara, S., Maeda, Y., Negoro, S., 2003. Cloning and characterization of a 4-nitrophenol hydroxylase gene cluster from *Rhodococcus sp.* PN1, *J. Biosci. Bioeng.*, 95: 139–145.
128. Takeo M., Abe Y., Negoro S., 2003. Simultaneous degradation of 4-nitrophenol and picric acid by two different mechanisms of *Rhodococcus sp.* PN1, *J. Chem. Eng. Japan.*, 36: 1178–1184.
129. Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., Ramos J. L., 1997. AraC/XylS family of transcriptional regulators, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61: 393–410.
130. Yamamoto, K., Munehiro Nishimura, Dai-ichiro Kato, Masahiro Takeo, Seiji Negoro, 2011. Identification and characterization of another 4-nitrophenol degradation gene cluster, *nps*, in *Rhodococcus sp.* strain PN1, *J. Biosci. Bioeng.*, 1010-1016.
131. Prakash D., Chauhan A., Jain R.K., 1996. Plasmid encoded degradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas cepacia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 224: 75-81.
132. Petrova K.P., Laha S., 1995. Characteristics of nitrophenols degrading bacteria, isolated from various contaminated soils. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 15(11): 95-437.
133. Chauhan A., Chakraborti A.K., Jain R.K., 2000. Plasmid-encoded degradation of *p*-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae*. *Biochem. Biophys. Res.*, 270: 733-740.

134. Chauhan A., Samanta S.K., Jain R.K., 2000. Degradation of 4-nitrocatechol by *Burkholderia cepacia*: a plasmid-encoded novel pathway. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 764-72.
135. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 74 : 5463-5467.
136. Cortez L., Chapalamadugu S.N., Chaudhry G.R., 1989. The biodegradation of methylparathion and *p*-nitrophenol by a *Pseudomonas*. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 89: 274.
137. Hanne L.F., Kirk L.L., Alger D., Woodruff T., Casadevall M., 1991. Characterization of soil actinomycetes capable of degrading *para*-nitrophenol. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 91: 303.
138. Folsom B.R., Stierli R., Schwarzenbach R.P., Zeyer J., 1993. Comparison of substituted 2-nitrophenol degradation by enzyme extracts and intact cells. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 306-11.
139. Bhushan B., Chauhan A., Samanta S.K., Jain R.K., 2000. Kinetics of biodegradation of *p*-Nitrophenol by different bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274: 626-30.
140. Annadurai G., Juang R.S., Lee D.J., 2002. Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge, *Waste. Manage.*, 22: 703-710.
141. Kadiyala V., Spain. J.C., 1998. A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of *p*-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2479–2484.
142. Banerjee A., Ghoshal A.K., 2011. Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate, *Int. Biodeterior. Biodegradation.*, 65 (7): 1052-1060.
143. Banerjee A., Ghoshal A.K., 2010. Phenol degradation by *Bacillus cereus*: pathway and kinetic modeling, *Bioresour. Technol.*, 101: 5501–5507.

144. Simon-Sylvestre G., Fournier J.C., 1979. Effects of pesticides on the soil microflora. *Adv. Agron.*, 31: 1-81.
145. Felset A., Maddox J.V., Bruce W., 1981. Enhanced microbial degradation of carbofuran in soils with histories of Furadan use. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26: 781-88.
146. Fournier J.C., Cadaccioni P., Soulas G., 1981. Soil adaptation to 2,4-D degradation in relation to the application rates and the metabolic behavior of the degrading microflora. *Chemosphere.*, 10: 977-84.
147. Zaidi B.R., Imam S.H., 1995. Isolation, purification and characterization of bacterial strains capable of enhancing degradation of *p*-nitrophenol (PNP) when inoculated into Barcelona industrial waste water. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 95: 430.
148. Spain J.C., Pritchard P.H., Bourquin A.W., 1980. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 726-34.
149. Larson J.T., 1979. Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 1153-61.
150. Baughmann G.L., Paris D.F., Stun W.C., 1980. Quantitative expression of biotransformation rate: 105-111. Maki AW, Dickinson KL and Cairns J. Jr (ed).
151. Bayly R.C., Barbour M.G., 1984. The degradation of aromatic compounds by the *meta* and gentisate pathways: 253-294. Gibson DT (ed).
152. Daffri A., 2008. Biodégradation des crésols par le microbiote des eaux usées de la ville de Constantine. Thèse de Magister. Université Mentouri de Constantine. Algérie.
153. Bumpus J.A., Tatarko M., 1994. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*, identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidases. *Curr. Microbiol.*, 28: 185-90.

154. Michels J., Gottschalk G., 1994. Inhibition of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxyl amino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 187-194.

155. Spiker J.K, Crawford D.L., Crawford R.L., 1992. Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive contaminated soils by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3199-3202.

156. Valli K., Brock B.J., Joshi D.K., Gold M.E., 1992. Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 221-28.

157. Hoffrichter M., Günther T., Fritsche W., 1993. Metabolism of phenol, chloro and nitrophenol by the *Pencillium* strain Bi. 7/2 isolated from a contaminated soil. *Biodegradation.*, 3: 415-21.

<http://www.safewater.org/PDFS/resourcesknowthefacts/traitement+eaux+usees.pdf>.

[http://oaspub.epa.gov/wqsdatabase/wqsi_epa_criteria.rep_parameter.\)posting date](http://oaspub.epa.gov/wqsdatabase/wqsi_epa_criteria.rep_parameter.)posting date).

<http://APIWEB.biomérieux.com/ servlet/Authenticate>.

<http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>.

Annexes

Annexe 1:

Résultats de mesures des densités optiques (DO) et du pH.

Tableau 7: Résultats de mesures des densités optiques (DO) et du pH del'*ortho*-Nitrophénol(ONP).

Temps d'incubation	Herlen 1	Herlen 2	Herlen 3	Herlen 4	Herlen 5	Herlen 6	Herlen 7	Herlen 8	Herlen 9
2heures	1,522 7,01	1,543 7,03	1,522 7,03	1,522 7,02	1,522 7,03	1,543 7,03	1,522 7,03	1,522 7,03	1,531 7,01
4heures	1,488 7,03	1,488 7,03	1,488 7,03	1,488 7,01	1,479 7,00	1,479 7,01	1,488 7,02	1,488 7,02	1,488 7,02
6heures	1,322 7,03	1,322 7,00	1,322 7,00	1,322 7,00	1,322 6,99	1,322 7,00	1,322 6,99	1,322 7,00	1,322 6,99
24heures	1,177 7,13	1,177 7,12	1,177 7,12	1,176 7,13	1,176 7,13	1,176 7,12	1,177 7,12	1,176 7,13	1,177 7,13
48heures	1,088 7,22								
72heures	1,001 7,15	0,969 6,97	0,969 6,97	0,969 6,97	0,967 6,95	0,967 6,95	0,967 6,95	0,969 6,97	0,967 6,95
7jours	0,701 6,88	0,703 6,88	0,701 6,88	0,702 6,88	0,702 6,88	0,701 6,88	0,701 6,88	0,701 6,88	0,703 6,88
15jours	0,602 6,83	0,602 6,83	0,602 6,82	0,601 6,83	0,601 6,83	0,601 6,83	0,602 6,84	0,600 6,82	0,601 6,83
30jours	0,555 7,48	0,539 7,40	0,539 7,42	0,555 7,47	0,554 7,44	0,555 7,47	0,539 7,42	0,539 7,42	0,539 7,42
60jours	0,299 7,52	0,299 7,49	0,299 7,52	0,299 7,50	0,299 7,52	0,299 7,50	0,299 7,52	0,299 7,50	0,297 7,49
80jours	0,288 7,50	0,288 7,50	0,289 7,51	0,288 7,50	0,288 7,50	0,288 7,50	0,288 7,50	0,289 7,50	0,288 7,50
Témoin	1,490 7,03	1,490 7,03	1,490 7,03	1,490 7,01	1,490 7,02	1,501 7,02	1,501 7,03	1,490 7,00	1,490 7,01

Tableau8: Résultats de mesures des densités optiques (DO) et du pH du *para*-Nitrophénol(PNP).

Temps d'incubation	Herlen 1	Herlen 2	Herlen 3	Herlen 4	Herlen 5	Herlen 6	Herlen 7	Herlen 8	Herlen 9
2heures	0,997 7,01	0,997 7,01	0,997 7,02	0,997 7,01	0,997 7,01	0,997 7,01	0,997 7,01	0,997 7,01	0,997 7,01
4heures	0,967 7,02	0,965 7,02	0,965 7,02	0,966 7,02	0,965 7,01	0,967 7,02	0,967 7,02	0,967 7,02	0,967 7,02
6heures	0,939 7,03	0,939 7,03	0,939 7,03	0,940 7,03	0,938 7,03	0,938 7,03	0,939 7,03	0,938 7,03	0,939 7,03
24heures	0,727 7,15	0,725 7,12	0,726 7,12	0,725 7,15	0,727 7,15	0,727 7,15	0,727 7,15	0,727 7,15	0,727 7,15
48heures	0,657 7,03	0,660 7,03	0,660 7,03	0,657 7,03	0,657 7,03	0,658 7,03	0,658 7,03	0,657 7,03	0,658 7,03
72heures	0,400 7,07	0,399 7,07	0,400 7,07	0,395 7,04	0,395 7,04	0,396 7,04	0,400 7,04	0,400 7,04	0,400 7,04
7jours	0,227 6,90	0,228 6,95	0,227 6,90						
15jours	0,135 6,70	0,135 6,73	0,135 6,70						
30jours	0,088 7,68	0,088 7,67	0,088 7,68	0,088 7,70	0,087 7,68	0,087 7,68	0,088 7,68	0,090 7,71	0,090 7,71
60jours	0,087 7,68	0,087 7,67	0,088 7,68	0,088 7,70	0,087 7,68	0,087 7,68	0,088 7,68	0,090 7,71	0,090 7,71
80jours	0,086 7,68	0,086 7,67	0,087 7,68	0,088 7,70	0,086 7,68	0,086 7,68	0,086 7,68	0,088 7,71	0,090 7,71
Témoin	1,003 7,02	1,000 7,01	0,999 7,03	1,003 7,02	1,002 7,02	1,003 7,02	0,999 7,03	0,999 7,01	0,999 7,01

Annexe 2:

Photographies des galeries biochimiques API 20 NE et 50 CHB des souches bactériennes isolées.

Galerie biochimique API 20 NE 1 (Souche 1)

API 20 NE V7.0 [Instructions](#) [Vérification des couleurs](#) [Réinitialiser](#)

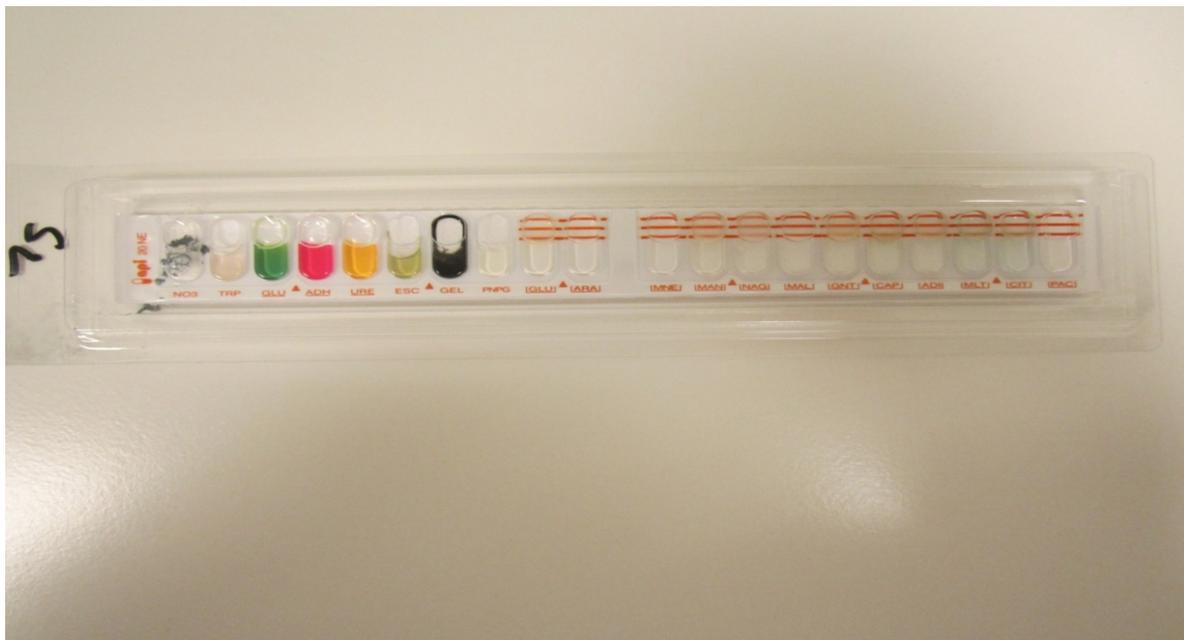
+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
↑	1	↑	0	↑	5	↑	4	↑	4	↑	7	↑	5	↑	Valider					



Galerie biochimique API 20 NE 2 (Souche 2)

API 20 NE V7.0 [Instructions](#) [Vérification des couleurs](#) [Réinitialiser](#)

-	-	-	+	+		+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
↑	0	↑	1	↑	5	↑	4	↑	5	↑	7	↑	5	↑	↑ Valider					



Galerie biochimique API 50 CHB (Souche 3)

API 50 CHB V4.0

[Instructions](#)

[Vérification des couleurs](#)

[Réinitialiser](#)

-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
-	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
-	-	-	-	+	+	-	+	+	-		
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
-	+	+	-	-	-	-	+	-	-		
30	31	32	33	34	35	36	37	38	39		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49		
-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4

ONPG ADH LDC ODC CIT H₂S URE TDA IND VP GEL NIT



Galerie biochimique API 20 NE 3 (Souche 4)

API 20 NE V7.0 [Instructions](#) [Vérification des couleurs](#) [Réinitialiser](#)

-	-	-	+	+		+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
↑	0	↑	1	↑	5	↑	4	↑	5	↑	7	↑	5	↑	Valider					



Annexe 3:**Tableau 9:** Les résultats des identifications biochimiques par le logiciel APIWEB de la souche 1.

TRES BONNE IDENTIFICATION

Galerie	API 20 NE V7.0				
Profil	1 0 5 4 4 7 1				
Note(s)					
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre		
Pseudomonas aeruginosa	99.6	0.53	ADH80%	NAGa84%	OX98%
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre		
Ralstoniapickettii	0.3	0.18	GEL1%	MANa10%	OX99%

Tableau 10: Les résultats des identifications biochimiques par le logiciel APIWEB de la souche 2.

TRES BONNE IDENTIFICATION

Galerie	API 20 NE V7.0				
Profil	1 0 5 4 4 7 5				
Note(s)					
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre		
Pseudomonas aeruginosa	99.4	0.78	ADH80%	NAGa84%	
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre		
Ralstoniapickettii	0.4	0.46	GEL1%	MANa10%	

Tableau 11: Les résultats des identifications biochimiques par le logiciel APIWEB de la souche 3.

BONNE IDENTIFICATION AU GENRE						
Galerie	API 50 CHB V4.0					
Profil	-----+-----++-----++-+-+-----+----- -----+-----++++-					
Note(s)	POSSIBILITE DE Bacillus thuringiensis					
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Bacillus cereus 1	74.1	0.35	NAG97%	SAL88%	AMD83%	TDA1%
			IND 1%			
Bacillus cereus 2	15.6	0.31	NAG99%	CEL 2%	TDA 1%	IND 1%
Bacillus mycoides	7.3	0.28	NAG99%	SAL80%	AMD99%	TDA1%
			IND 1%			
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Bacillus anthracis	2.7	0.2	NAG99%	ADH1%	TDA 1%	IND 0%
			NIT 78%			

Tableau 12: Les résultats des identifications biochimiques par le logiciel APIWEB de la souche 4.

BONNE IDENTIFICATION						
Galerie	API 20 NE V7.0					
Profil	0 1 5 4 5 7 5					
Note(s)						
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Pseudomonas aeruginosa	98.9	0.79	NO396%			
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre			
Pseudomonas fluorescens	0.9	0.51	MNEa97%	AD1a10%		

Résumé

La biodégradation de l'*ortho*-Nitrophénol (ONP) et du *para*-Nitrophénol (PNP) par le microbiote des eaux usées de la ville de Constantine, est étudiée en cinétique de temps à une concentration initiale de 500 mg/L. Une identification des bactéries impliquées dans le processus constaté, est également réalisée par des techniques d'identification biochimique classique et par une analyse moléculaire. Les cultures sont menées sur un milieu minimum où le Nitrophénol est la seule source de carbone, d'énergie et d'azote. La cinétique de biodégradation est suivie au delà de 30 jours d'incubation à 30°C. Les résultats obtenus montrent la capacité intrinsèque du microbiote des eaux usées à croître aux dépens de l'ONP et du PNP, dont plus de 90% de la concentration initiale du PNP est décomposée au bout de 30 jours d'incubation et 77% de l'ONP durant la même période. L'analyse par HPLC et GC-MS a permis d'identifier les produits de biodégradations et de déterminer leurs voies biochimiques de décomposition. L'étude des populations microbiennes majeures impliquées dans la dégradation montre quatre types de colonies bactériennes, dont trois pigmentées. L'identification des bactéries isolées par le séquençage de leur ARNr 16S a permis d'identifier deux espèces bactériennes: *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*.

Mots clés: Biodégradation du PNP, Biodégradation de l'ONP, Microbiote des eaux usées, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

Abstract

Biodegradation of *ortho*-Nitrophenol (ONP) and *para*-Nitrophenol (PNP) by wastewater's microflora is studied. Isolation and identification of microorganisms implicated is also carried out. The cultures are performed using a minimum medium, where Nitrophenol is the sole source of carbon, energy and nitrogen at 500 mg/L. The kinetic of biodegradation is followed for more than 30 days of incubation. The obtained results show that more than 90% of initial concentration of PNP is decomposed at the end of 30 days of incubation and 77% of ONP in the same time of incubation. HPLC and GC-MS analysis permit to identify products and pathway's biodegradation of the two isomers. The isolation of microorganisms degrading PNP gave four bacterial colonies of different macroscopic aspects. However, three types of these bacterial are pigmented. Sequence analysis of 16S ribosomal RNA indicated that the ONP and the PNP degrading isolates were closely related to members of the species: *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*.

Key words: Biodegradation, ONP, PNP, Microflora, Wastewater, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

المخلص

بغرض دراسة الهدم الحيوي للنيتروفينولات و عزل البكتيرى المسؤولة عن ذلك، أخذت ميكروفلورا المياه المستعملة لمدينة قسنطينة و استعملت لزراع وسط أولي حيث النترفينول هو المصدر الوحيد للكربون , الطاقة و النتروجين . تمت عملية الزرع في مخمرات مصغرة بطريقة غير مستمرة. اتبعت حركية الهدم الحيوي للمركبين لأكثر من 30 يوم، حيث احتضنت المخمرات في درجة حرارة ° 30 م و تم قياس تراكيزها بواسطة قياس الكثافة الضوئية. أظهرت النتائج أن أكثر من 90 ٪ من التركيز الأولي من التركيز الأولي لـ *p*-نيتروفينول قد تم هدمها من طرف ميكروبات المياه المستعملة بعد 30 يوم من الحضان و تم هدم 77 ٪ من التركيز الأولي لـ *o*-نيتروفينول خلال نفس مدة الحضان. مكن تحليل HPLC و GC-MS من تعريف نواتج الهدم الحيوي للـ *P*-نيتروفينول والـ *O*-نيتروفينول. سلالات بكتيرية متنوعة المظهر تم عزلها . أظهرت عملية التعرف على صنف البيكتيريا أنها تنتمي إلى صنفى *Bacillus cereus* و *Pseudomonas aeruginosa*.

الكلمات المفتاحية:

o-نيتروفينول، *p*-نيتروفينول، الهدم الحيوي، ميكروفلورا المياه المستعملة، *Bacillus cereus*، *Pseudomonas aeruginosa*.
.cereus

DAFFRI Amel

Date de soutenance : 10 / 12 / 2017

Thème :

Etude de la biodégradation de l'*ortho*-nitrophénol et du *para*-nitrophénol par le microbiote des eaux usées et mise en évidence des bactéries dominantes impliquées dans ce processus.

Thèse de Doctorat en Sciences
Option : Biotechnologie microbiennes

Résumé

La biodégradation de l'*ortho*-Nitrophénol (ONP) et du *para*-Nitrophénol (PNP) par le microbiote des eaux usées de la ville de Constantine, est étudiée en cinétique de temps à une concentration initiale de 500 mg/L. Une identification des bactéries impliquées dans le processus constaté, est également réalisée par des techniques d'identification biochimique classique et par une analyse moléculaire. Les cultures sont menées sur un milieu minimum où le Nitrophénol est la seule source de carbone, d'énergie et d'azote. La cinétique de biodégradation est suivie au delà de 30 jours d'incubation à 30°C. Les résultats obtenus montrent la capacité intrinsèque du microbiote des eaux usées à croître aux dépens de l'ONP et du PNP, dont plus de 90% de la concentration initiale du PNP est décomposée au bout de 30 jours d'incubation et 77% de l'ONP durant la même période. L'analyse par HPLC et GC-MS a permis d'identifier les produits de biodégradations et de déterminer leurs voies biochimiques de décomposition. L'étude des populations microbiennes majeures impliquées dans la dégradation montre quatre types de colonies bactériennes, dont trois pigmentées. L'identification par séquençage de l'ARNr 16S, des bactéries impliquées dans la dégradation, a permis d'identifier deux espèces: *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*.

Mots clés: Biodégradation, PNP, ONP, Microbiote, Eaux usées, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne

Présidente:	M^{me} SATTA D.	Prof. Université des frères Mentouri-Constantine 1.
Directrice de thèse:	M^{me} MIHOUBI I.	Prof. Université des frères Mentouri-Constantine 1.
Examineurs:	M^r BRANES Z.	Prof. Université Badji-Mokhtar-Annaba.
	M^r KECHA M.	Prof. Université Abderhahmane Mira-Bejaïa.
	M^{me} BENLOUNISSI A.	MCA E.N.S.B Taoufik Khaznadar-Constantine 3.

