

République Algérienne Démocratique et Populaire

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.**

**Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

Département de Biochimie et de Microbiologie

N° d'ordre : 308/Mag/2008.....

N° de série : 025/SN/2008.....

Mémoire

**Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister
En Microbiologie appliquée.
Option : Biotechnologies microbiennes.**

Par : DAFFRI AMEL

Thème

**Biodégradation des crésols par le
microbiote des eaux usées de la
ville de Constantine**

Soutenu le:...02/07/2008

Devant le jury :

Président :	MERAIHI Z.	Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.
Rapporteur :	BOUSSEBOUA H.	Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.
Examineurs :	SEHILI T.	Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. Chimie.
	HAMIDECHI A.	M.C. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.

2007-2008

Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer ma profonde gratitude à monsieur BOUSSEBOUA H. Professeur à l'université Mentouri de Constantine d'avoir accepté d'être mon directeur de mémoire. Je le remercie pour ses conseils, ses encouragements et sa patience.

Mes remerciements s'adressent également à madame MERAIHI Z. Professeur à l'université Mentouri de Constantine qui me fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie sincèrement monsieur SEHILI T. Professeur à l'université Mentouri de Constantine de sa précieuse assistance technique et de faire partie de ce Jury.

Je remercie également Monsieur HAMIDECHI A. Maître de conférence à l'université Mentouri de Constantine d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Enfin, je remercie vivement tous mes collègues qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. Les eaux usées.....	2
1.1. Nature et origine.....	2
1.1.1. Les eaux usées domestiques.....	2
1.1.2. Les eaux usées urbaines.....	2
1.1.3. Les eaux usées industrielles.....	2
1.2. Composition des eaux usées.....	3
1.2.1. Les matières en suspension.....	3
1.2.2 Analyse en oxygène.....	3
a. La demande biochimique en oxygène (DBO).....	3
b. La demande chimique en oxygène (DCO).....	3
1.3. La pollution des eaux.....	4
1.4. Effets des eaux usées sur le milieu récepteur.....	5
1.5. Epuration des eaux usées.....	5
1.5.1. Epuration biologique.....	6
1.5.2. Epuration physico-chimique.....	9
2. Les Crésols.....	10
2.1. Définition.....	10
2.2. Origine.....	10
2.3. Propriétés physiques.....	12
2.4. Propriétés chimiques.....	12
2.5. Utilisation.....	12
2.6. Toxicité.....	14
2.6.1. Source d'exposition.....	14
2.6.2. Toxicocinétique-Métabolisme.....	14
2.6.3. Toxicité aigue.....	15
2.6.4. Toxicité chronique.....	16
2.7. Transport et distribution dans l'environnement.....	17
2.7.1 Dans l'air.....	17
2.7.2. Dans le sol.....	17

2.7.3. Dans l'eau.....	18
2.8. Dégradation.....	18
2.8.1. Dégradation abiotique.....	18
a. Dans l'air.....	18
b. Dans l'eau.....	19
c. Dans le sol.....	19
2.8.2. Biodégradation.....	19

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Milieu de culture.....	23
2. Prélèvement de l'inoculum.....	23
3. Cinétique de la biodégradation et dosage.....	23
4. Analyse par HPLC.....	25
5. Isolement et purification des microorganismes.....	25
6. Etude des bactéries isolées.....	25
6.1. Mobilité et morphologie microbienne.....	25
6.2. Coloration de Gram.....	25
6.3. Détermination du type respiratoire.....	25
6.4. Mise en évidence de l'existence de la cytochrome oxydase.....	25
6.5. Test de la catalase.....	25
6.6. Mise en évidence de la nitrate réductase.....	26
6.7. Hydrolyse de la cellulose.....	26
6.8. Hydrolyse de la gélatine.....	26
6.9. Production d'indole.....	26
6.10. Mise en évidence de la pyocyanine et de la pyoverdine.....	27
7. Analyse statistique.....	27

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Evaluation de la biodégradabilité des échantillons des eaux usées prélevées.....	28
2. Cinétique de biodégradation du <i>m</i> -crésol.....	28
3. Cinétique de biodégradation de l' <i>o</i> -crésol.....	33
4. Cinétique de biodégradation du <i>p</i> -crésol.....	35
5. Isolement et purification des microorganismes.....	38
6. Etude des bactéries isolées.....	39

Conclusion générale.....	44
Références bibliographiques.....	47
Annexes.....	57

Liste des figures

Figure 1: Structures chimiques des crésols.

Figure 2 : Dégradation de l'*o*-crésol, le *m*-crésol et le *p*-crésol par *pseudomonas* sp.CP4.

Figure 3 : Cinétiques de biodégradation du *m*-crésol après 14 jours d'incubation.

Figure 4 : Chromatogramme détection à $\lambda = 280$ nm.

Figure 5 : Cinétiques de biodégradation de l'*o*-crésol après 30 jours d'incubation.

Figure 6 : Cinétiques de biodégradation du *p*-crésol après 14 jours d'incubation.

Figure 7 : Les coques et les bacilles obtenus après la coloration de Gram sous microscope optique (grossissement x 100).

Introduction

L'humanité se trouve devant une croissance alarmante de la pollution des eaux par des matières organiques diverses, des pesticides, des détergents, des métaux lourds, et autres substances toxiques. Elle voit s'aggraver les difficultés de l'alimentation en eau potable dont l'obtention est une opération de plus en plus onéreuse. Les effets de la pollution des cours d'eau, des lacs, des mers, sont souvent spectaculaires. Les eaux usées quand elles sont en excès, les déchets industriels, les pesticides, les détergents, et autres polluants, détruisent la flore et la faune aquatiques. En Algérie, les eaux usées sont généralement déversées à l'état brut, soit directement à la mer, soit vers les oueds, 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 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.

Les phénols sont des composés majeurs de la pollution toxique de l'environnement. Leur présence dans les eaux usées résulte de nombreuses activités domestiques et industrielles : production d'huile, conversion du charbon, production du papier et autres. Les crésols sont des phénols utilisés comme agents antiseptiques et désinfectants, ils entrent aussi dans la composition de nombreux produits organiques d'usages multiples : produits phytosanitaires, agents antioxydants, résines phénoliques... L'élimination des crésols des milieux naturels est réalisée par différents processus physiques et chimiques, leur dégradation par la voie biologique, grâce à l'aptitude de nombreux microorganismes à les décomposer, est une stratégie très répandue dans la détoxification organisée des environnements pollués.

La biodégradation des crésols est largement étudiée en aérobiose. Divers auteurs exposent des études basées sur l'utilisation de ces substances comme principale source de carbone et d'énergie par une microflore complexe ou par des souches bactériennes pures. C'est dans ce contexte que nous avons entamé l'étude de la biodégradation de l'*o*-crésol, du *m*-crésol et du *p*-crésol par le microbiote des eaux usées de la ville de CONSTANTINE, prélevées de la station d'épuration d'IBN ZIAD, récemment mise en service. Des cultures discontinues statiques et sous aérobiose sont menées dans des fermenteurs miniaturisés, incubés pendant 30 jours. L'évolution cinétique

de la biodégradation des trois isomères est établie par la mesure de la concentration des substrats.
Une identification des microorganismes dominants est également réalisée.

Revue bibliographique

1. Les eaux usées

1.1. Nature et origine

Les eaux usées sont des eaux initialement potables ou à usage domestique ou industrielle, souillées par les activités domestiques et/ou industrielles humaines (17). Elles proviennent de trois sources principales

1.1.1. 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.

1.1.2. 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 sorte 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 de micropolluants (hydrocarbures, pesticides, détergents,...) (102).

1.1.3. 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 de 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 (30). Les eaux usées, contiennent, en plus de toutes ces matières, toutes sortes de microorganismes : champignons, protozoaires, bactéries, virus.

1.2. Composition des eaux usées:

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.

La composition des eaux usées s'analyse par le biais de diverses mesures physiques, chimiques et biologiques. Les analyses les plus fréquentes comportent des mesures de déchets solides, de la demande biochimique en oxygène mesurée après cinq jours (DBO_5), de la demande chimique en oxygène (DCO) et du pH (71).

1.2.1. Les matières en suspension

C'est la masse de matières insolubles ou colloïdales retenues par filtration quantitative ou séparées par centrifugation, elles s'expriment en milligramme par litre. Elles donnent également à l'eau une apparence trouble et, souvent, un mauvais goût et une mauvaise odeur. Cependant, elles peuvent avoir un intérêt pour l'irrigation des cultures (12).

1.2.2. Analyse en oxygène

a. La 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 est la valeur obtenue après cinq jours d'incubation, DBO_5 . 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, et une incubation à 20°C, à l'abri de la lumière (64).

b. La demande chimique en oxygène (DCO)

Elle regroupe 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 chimique et celles oxydables par les processus biochimiques (17).

1.3. La pollution des eaux

La pollution résulte de l'introduction dans un milieu de substances conduisant à son altération (41). La pollution de l'eau dépend de son usage : les eaux de cuisines 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 de vannes) contiennent beaucoup de matières organiques. On y trouve l'azote qui va se transformer en nitrates ainsi que des germes parfois dangereux (71).

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 milieu aquatiques contiennent également des substances phénoliques comme les crésols, les catéchols, le guai col et d'autres composés (5).

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, etc. Il 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 et 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, 36, 104).

1.4. Effets des eaux usées sur le milieu récepteur

On les observe dans plusieurs domaines, notamment dans les mers et les rivières où s'observent parfois 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 détruit 40 tonnes de poissons, alors que le rejet dans le Rhin d'un insecticide entraîna la mort de 50% des poissons. En effet, 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, peuvent détruire la faune des rivières ou mettre en question l'utilisation de l'eau des rivières pour l'alimentation humaine (103).

En Algérie, les eaux usées sont généralement déversées à l'état brut, soit directement à la mer, soit vers les oueds, 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 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 (70).

1.5. L'épuration des eaux usées

L'épuration des eaux est un ensemble de techniques qui consiste à purifier l'eau, soit pour recycler les eaux usées dans le milieu naturel, soit pour transformer les eaux naturelles en eau potable.

1.5.1. L'épuration biologique

L'épuration dite biologique des eaux usées urbaines résulte en fait de deux mécanismes. D'une part, la sédimentation incomplète de matières en suspension et, d'autre part, l'activité biologique de nombreux microorganismes qui se développent au détriment de la matière organique soluble (algues, bactéries, protozoaires saprozoïques ou particulaire protozoaires holozoïques).

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) (12).

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, etc.)

La biodégradation :

La biodégradation désigne un phénomène naturel, général dans le monde, tendant à transformer et à minéraliser les déchets organiques, grâce à l'action des microorganismes, notamment les bactéries. L'homme peut aussi accélérer artificiellement ce processus en favorisant le développement des bactéries. Ce phénomène de biodégradation se produit en particulier dans les eaux stagnantes ou courantes, qui subissent une épuration biologique naturelle, plus ou moins poussée.

C'est seulement depuis une centaine d'années qu'on a compris que l'épuration naturelle des eaux polluées n'est qu'une phase du cycle naturel d'évolution de toute matière organique. En effet, les plantes vertes, terrestres, aquatiques ou marines (algues ou phytoplancton), sont aptes à faire la synthèse de leurs substances à partir d'éléments minéraux, tels que l'eau, le gaz carbonique, les nitrates, les sulfates, les phosphates, etc. La source d'énergie qui permet ces réactions de synthèse est le rayonnement solaire. Les animaux, incapables de s'alimenter à des sources strictement minérales, ne peuvent que se nourrir de matières organiques déjà formées,

qu'ils transforment ensuite plus ou moins. C'est ainsi qu'ils se nourrissent soit uniquement de plantes ou de produits du règne végétal (cas des herbivores), soit de plantes et d'animaux. Les organismes animaux brûlent alors les matières absorbées (phénomène de la respiration), pour fournir à leurs cellules toute l'énergie nécessaire (énergie de synthèse, énergie musculaire,...). Simultanément, une partie des éléments ingérés est restituée au monde minéral sous forme de gaz carbonique et de vapeur d'eau. De plus, les produits azotés sont éliminés sous forme de déchets liquides ou d'excréments. Il s'ensuit que tous les organismes vivants, végétaux ou animaux, abandonnent sans cesse des déchets divers, des produits de sécrétion, des matières fécales. A la mort des être vivants, les cadavres sont aussi abandonnés dans le milieu ambiant, enterrés ou non.

Sous ces formes, la majeure partie des substances se trouve inutilisable par le monde végétal. L'azote combiné et l'anhydride carbonique n'existant dans le monde qu'en quantités limitées, la vie deviendrait vite impossible si les éléments composant les déchets ne revenaient pas au monde minéral. C'est alors qu'interviennent les microorganismes, pour assurer le retour des déchets au monde minéral et fermer ainsi le cycle. Les déchets deviennent la proie des microorganismes qui dégradent la matière organique et minéralisent les résidus de façon que ne reste plus finalement que des nitrates, des phosphates, des sulfates, des carbonates. Cela montre l'importance capitale des microorganismes dans le monde vivant.

Ajoutons que les réactions de dégradation, combustion, minéralisation, ne s'accomplissent normalement à froid qu'à des vitesses presque nulles. On peut alors s'étonner de ce que les matières organiques puissent être transformées à un tel rythme sous l'action des microorganismes, dans les conditions ambiantes et sans accroissement considérable de la température. L'explication est que toutes ces réactions sont activées par un nombre considérable de catalyseurs enzymatiques. Les microorganismes permettent donc de multiples transformations de molécules minérales ou organiques en réalisant des synthèses ou des dégradations cycliques.

En présence d'oxygène libre, les bactéries aérobies peuvent dégrader des molécules telles que des sucres, des acides gras, des protéines, etc., en substances de faibles masses moléculaires, puis en anhydride carbonique, eau, nitrate ou ammoniac. Par contre, en l'absence d'oxygène libre, les bactéries anaérobies fermentent les matières organiques au cours de phénomènes d'oxydoréduction complexes mais incomplets. Il se forme d'abord des acides, des alcools ou des aldéhydes de faibles masses moléculaires (acide lactique, acide formique, etc.), puis de l'anhydride carbonique, du méthane et de l'ammoniac. Cette fermentation anaérobie

s'accompagne aussi de la production de substances intermédiaires malodorantes, telles que le phénol, l'indole, l'hydrogène sulfuré, les mercaptans, etc.

Ces deux processus de biodégradation interviennent parallèlement dans la nature et peuvent être utilisés dans les stations d'épuration.

Pour se développer et se multiplier, les bactéries ont besoin de sources d'énergie et de nutriments. L'énergie est fournie soit par les radiations lumineuses, pour les espèces possédant des pigments photosynthétiques, soit par la réduction ou l'oxydation de composés minéraux ou organiques. Au point de vue de la nutrition des bactéries, on distingue les espèces autotrophes et les espèces hétérotrophes.

Les bactéries autotrophes se développent dans des milieux strictement minéraux, en faisant la synthèse de matières organiques complexes à partir de carbone, de carbonates et de bicarbonates, ainsi que d'azote, des nitrates ou de sels ammoniacaux. Ces espèces bactériennes jouent un rôle considérable dans le sol. Mais pour l'épuration des effluents, leurs activités sont limitées et généralement contrariées par un excès de matières organiques. Néanmoins, dans les cours d'eau ou les lacs, ou dans les installations d'épuration d'eaux usées, elles interviennent dans tous cycles biogéochimiques majeurs : carbone, azote, fer, soufre, phosphore.

D'autre part, les espèces de bactéries hétérotrophes, les plus nombreuses, métabolisent les matières organiques complexes et jouent un rôle capital dans les processus d'épuration. Mais, si cette métabolisation est due principalement aux bactéries hétérotrophes, les autres organismes pouvant se trouver dans les eaux polluées, tels que les protozoaires, les nématodes, les algues, les champignons, les larves, les mollusques, etc., peuvent aussi métaboliser des substances partiellement dégradées. Ils peuvent également intervenir de diverses autres manières, par exemples en maintenant une teneur suffisante en oxygène dissous, en éliminant des substances apportées par des déchets toxiques, en éliminant les cadavres des bactéries.

Ajoutons que le pouvoir d'adaptation des enzymes est si remarquable que les flores des lits bactériens ou des bassins de boues activées parviennent à métaboliser même des substances très différentes des substances nutritives courantes : détergents, phénols, cyanures (56, 103).

En général, si le milieu ne renferme pas d'inhibiteurs, les microorganismes vivants au sein des eaux, des sédiments ou dans le sol transforment et dégradent partiellement ou totalement les substances organiques ou inorganiques.

Grâce à leurs systèmes enzymatiques, les microorganismes chimioorganotrophes peuvent métaboliser de nombreux corps organiques. Les processus impliqués sont très divers et impliquent des oxydo-réductions et des hydrolyses par le biais de diverses enzymes : oxydases, déshydrogénases, hydrolase, etc. Le catabolisme correspond à une simplification progressive de la matière organique avec une tendance à sa minéralisation (C-CO₂, N-NH₃...) ou, tout au moins, à la formation de métabolites de faibles masses molaires. Les dérivés formés préexistants permettent alors l'anabolisme. Les caractéristiques du milieu, spécialement sa teneur en oxygène, orientent les voies de dégradation impliquant la fourniture de nombreux métabolites. Certaines substances chimiques sont ainsi métabolisées, alors que d'autres ne sont que peu ou pas dégradées. Ces derniers corps s'accumulent, en faibles quantités souvent dans les biomasses finales et contaminent les chaînes alimentaires en quantités appréciables. Ils peuvent aussi inhiber l'activité biologique. Dans certaines conditions, un corps peut bloquer un système biologique mais être métabolisé lorsque les conditions du milieu changent, à l'exemple des phénols (22, 25, 64).

1.5.2. 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 floculants. 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) (71).

2. les crésols

2.1. Définition

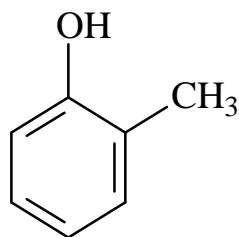
Les crésols sont des alcools aromatiques présents dans les goudrons d'houille ou dans le pétrole. Ils sont considérés comme des dérivés hydroxylés de toluène ou des dérivés méthyles de phénol. On distingue trois isomères des crésols, selon la position du groupement méthyle par rapport au radical hydroxyle sur le cycle benzène (Figure.1).

La mixture des crésols extraite des goudrons d'houille est appelée : acide crésylique (33).

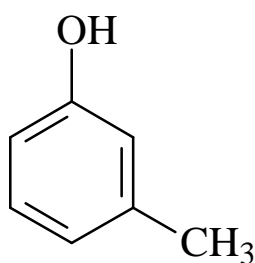
2.2. Origine

Les crésols sont extraits des goudrons d'houille ou du pétrole, ce sont des éléments constitutifs du bois et d'autres matériaux biogènes. Ils parviennent donc dans l'atmosphère au travers des processus de combustion des véhicules automobiles et des chauffages domestiques : abrasion de l'asphalte, émanations de plastique, parfum, dégraissage des métaux. Ils peuvent aussi provenir des raffineries d'huile. Le crésol « brut » extrait d'huile lourde du goudron d'houille contient de grandes quantités d'isomères *méta* et *para*. Le *p*-crésol est un métabolite endogène de l'acide aminé Tyrosine chez l'homme et chez les animaux à sang chaud (33, 91).

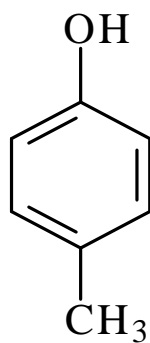
Les crésols et leurs dérivés existent à l'état naturel dans les huiles essentielles de diverses plantes telles que les fleurs de *Yucca gloriosa*, dans le jasmin, le lys, les conifères, les chênes et le santal. Ils constituent également un produit de la combustion naturelle de certaines substances et de l'activité volcanique. Les crésols du commerce sont des sous-produits de la distillation fractionnée du pétrole brut et du goudron de houille. La fumée de cigarettes contient également des crésols. On ignore quelle est la production mondiale totale de crésols. Pour les Etats-Unis d'Amérique, on indiquait en 1990 une production annuelle totale de 38300 tonnes (110).



ortho-Crésol (*o*-Crésol)



méta-Crésol (*m*-Crésol)



para-Crésol (*p*-Crésol)

Figure 1 : Structures chimiques des crésols.

2.3. Propriétés physiques

Les crésols se présentent sous la forme de cristaux (*o*-crésol et *p*-crésol) ou de liquide (*m*-crésol et mélange d'isomères) incolore qui brunit à l'air. Ils possèdent une odeur particulière, à la fois acre et douceâtre (limite olfactive inférieure à 0.001ppm). Solubles dans l'eau, ils sont facilement solubles dans les alcalis dilués et miscibles à de très nombreux solvants organiques : éthanol, acétone, oxyde de diéthyle, hydrocarbures aromatiques. Leurs autres caractéristiques physiques sont rassemblées dans le tableau. 1 (54, 71, 109).

2.4. Propriétés chimiques

Les crésols s'oxydent facilement sous l'action de l'air et de la lumière, ils peuvent réagir vivement avec des oxydants puissants. A température élevée, ils se décomposent avec émission de vapeurs toxiques et inflammables.

Leur réactivité chimique est très semblable à celle du phénol : de nombreuses réactions de condensation sont notamment possibles avec des acides, des aldéhydes, des cétones, etc.

Le *m*-crésol est le seul isomère pouvant donner un dérivé trinitré : le trinitro-*m*-crésol qui est un explosif, il est obtenu par action d'un mélange d'acide sulfurique et nitrique sur le *m*-crésol. Les crésols attaquent le cuivre et ses alliages et de nombreuses peintures, ils sont sans action sur les résines phénoliques (34, 65, 76).

2.5. Utilisation

Une considérable quantité d'*o*-crésol est consommée directement comme solvant ou désinfectant. L'*o*-crésol est aussi utilisé comme intermédiaire chimique de plusieurs produits : désodorisants, produits pharmaceutiques, parfums, antioxydants, teintures, colorants, pesticides et résines, ainsi qu'en additif des résines phénoliques.

Le *p*-crésol intervient aussi dans la synthèse des antioxydants : 2,6-di-ter-butyl-*p*-crésol, des parfums et des teintures.

Le *m*-crésol est utilisé dans la production des herbicides et des insecticides ainsi que des explosifs. La mixture du *m*-et *p*-crésol est utilisée comme désinfectants et agents de préservation. Les crésols « bruts » sont utilisés comme agents de préservation du bois. La mixture condensée

de crésols avec le formaldéhyde est importante pour la modification des résines phénoliques, elle est utilisée aussi dans le traitement des fibres (38, 88, 111).

Tableau 1 : Propriétés physiques des crésols

Propriétés physiques	<i>o</i>-Crésol	<i>m</i>-Crésol	<i>p</i>-Crésol
Masse molaire	108,14	108,14	108,14
Point de fusion	30,9°C	11,5°C	34,8°C
Point d'ébullition (à la pression atmosphérique)	191°C	202,7°C	201,8°C
Densité du solide D_4^{20} (Kg/L)	1,047	-	1,034
Densité du liquide D_4^{20} (Kg/L)	1,0273	1,034	1,0178
Densité de vapeur (air =1)	3,72	3,72	3,72
Tension de vapeur à 25°C	33,3 Pa	20 Pa	14,7 Pa
Tension de vapeur à 60°C	473 Pa	236 Pa	226 Pa
Point d'éclair (coupelle fermée)	81°C	86°C	86°C
Limite inférieure d'explosivité en Volume% dans l'air	1,35 à 149°C	1,1 à 150°C	1,1 à 150°C
Température d'auto inflammation	599°C	599°C	599°C
Solubilité dans l'eau à 25°C	2,5%	2,2%	1,9%

2.6. Toxicité

2.6.1. Source d'exposition

Il peut y avoir exposition aux crésols par l'intermédiaire de l'air, de l'eau ou de la nourriture. L'homme peut s'exposer aux crésols en inhalant l'air ou en buvant l'eau et en mangeant des aliments pouvant être contaminés par ces molécules : tomates, ketchup, fromage, beurre, café, thé noir, vin, etc.

Les industries productrices ou utilisatrices de crésols constituent la source majeure de l'exposition. Cependant, les habitants environnants et ceux des sites d'incinération des ordures peuvent aspirer ces substances. Les maisons bâties en bois ou utilisatrices de charbon peuvent émettre des crésols à travers les cheminées (29).

2.6.2. Toxicocinétique et Métabolisme

Les crésols peuvent pénétrer dans l'organisme par voie percutanée, digestive ou pulmonaire (sous forme de vapeur à haute température ou d'aérosols). Les conditions d'absorption, de détoxification et d'excrétion sont très semblables à celles du phénol. La vitesse d'absorption cutanée dépend plus de la surface exposée que de la concentration du produit en contact.

La voie principale de métabolisation comporte une oxydation puis une conjugaison avec les acides sulfuriques ou glucuronique. L'excrétion se fait principalement dans l'urine mais des quantités non négligeables sont éliminées dans la bile et des traces se retrouvent dans l'air expiré (24, 75).

2.6.3. Toxicité aiguë

Les intoxications peuvent se produire par ingestion, inhalation ou lors de projections du produit sur de grandes surfaces de peau. Les signes les plus importants sont rapportés lors d'ingestion (même accidentelles) où l'on peut noter, après une phase de latence de l'ordre de 20 à 30 minutes, des troubles digestifs liés à l'effet caustique du produit (brûlures bucco-oesophagiennes, douleurs abdominales et rétrosternales, nausées, vomissement), puis une atteinte systémique avec des troubles neuromusculaires (coma, myoclonies, convulsions), cardiovasculaires (hypotension et bradycardie) et, dans certains cas, une méthémoglobinémie,

une acidose métabolique et une coagulopathie de consommation. Ultérieurement, ces cas peuvent se compliquer d'une cytolyse hépatique, d'une nécrose tubulaire rénale (par action directe ou par précipitation de myoglobine dans les tubules) et d'œdème aigue du poumon, parfois retardé.

Localement, les crésols ont une action caustique sur la peau et les muqueuses. Sur la peau, les lésions, au début douloureuses, deviennent ensuite indolentes. Les tissus touchés ont un aspect blanchâtre, épaissi et ridé, puis ils prennent un aspect noirâtre ou brun signant la nécrose.

Sur l'œil, on peut observer une conjonctivite et une kératite avec parfois une réduction séquellaire de l'acuité visuelle. L'importance des troubles est liée à la concentration de la solution et à la rapidité du lavage oculaire (24, 75, 93).

2.6.4. Toxicité chronique

Une absorption prolongée ou répétée de faibles quantités de crésols à travers la peau ou par voie respiratoire peut provoquer, à terme, une intoxication systémique : les troubles fonctionnels consistent essentiellement en céphalées, nausées, dysphagie, hypersalivation, diarrhée, anorexie, hypertension, tremblements. Le pronostic est réservé lorsque surviennent des lésions hépatiques, rénales ou pancréatiques. Localement, des dermatoses peuvent survenir par contact répété avec des solutions de crésols faiblement concentrées (jusqu'à moins de 0,1% pour certains sujets hypersensibles). Ces lésions peuvent aboutir à des nécroses tissulaires et, exceptionnellement, à des troubles de pigmentation (ochronose) intéressant la peau, la sclérotique, le nez, les oreilles et certains tissus fibreux (75, 95).

Les observations effectuées sur des microorganismes, des invertébrés et des poissons montrent que les crésols peuvent constituer un risque pour les organismes non mammaliens là où des sources ponctuelles de pollution déterminent de fortes concentrations. Mais ce n'est pas le cas dans l'environnement en général.

2.7. Transport et distribution dans l'environnement

Le transport et la distribution d'un composé organique à travers les différents compartiments de l'environnement sont fonction de ses propriétés physico-chimiques et du site spécifique caractéristique du compartiment environnemental, le pourcentage de matière organique dans le sol, par exemple (110).

2.7.1. Dans l'air

La présence des crésols dans l'atmosphère est régulée par leurs propriétés physiques, leur réactivité chimique et par les conditions météorologiques : précipitation, température, vent, etc.

La pression atmosphérique des crésols varie de 0,13 à 0,31 mmHg (102), une valeur supérieure à 0,0001 mmHg suggère que ces molécules restent dans la phase gazeuse (34), plutôt que liées aux particules atmosphériques (18).

L'attaque photochimique et les précipitations débarrassent rapidement les crésols de la phase gazeuse (26, 56).

2.7.2. Dans le sol

Les études sur l'adsorption des crésols dans le sol montrent que ces molécules ont une grande mobilité dans le sol (101). La mobilité des trois isomères n'a pas pu être bien décrite à cause de leur tendance à cloisonner avec l'eau. En effet, le radical hydroxyle des crésols est capable de former une molécule d'hydrogène capable de s'attacher avec les sites actifs du sol, la mobilité des isomères dépend en fait du degré de leur attachement avec les particules du sol (7, 18, 96).

L'attachement de l'hydrogène formé avec les sites actifs du sol est fonction de plusieurs facteurs : pH et type du sol, sa capacité à échanger les ions, l'oxyde de fer qu'il contient et la quantité de matière organique présente (110).

Selon la littérature, le comportement ou l'adsorption des crésols dans le sol n'ont pu être généralisés sur les trois isomères : le *m*-crésol adsorbe bien dans un sol très argileux (96), mais ce n'est pas le cas pour l'*o*-crésol et le *p*-crésol (67, 68).

2.7.3. Dans l'eau

Le transport et la distribution des crésols dans l'eau sont contrôlés par leur volatilité, leur coefficient de sorption aux suspensions solides et aux sédiments (K_{oc}) et leur bioaccumulation par les organismes aquatiques. La volatilité d'un composé peut être prédictee qualitativement à partir de la constante de la loi d'Henry (H). La vitesse de la volatilisation est élevée pour des composés avec une valeur de H variant de 10^{-2} à 10^{-3} atm-m³/mol, elle est lente lorsque la valeur de H est inférieure ou égale à 10^{-7} atm-m³/mol (56). Par conséquent, le transport des crésols, qui possèdent une valeur de H de $1,26 \times 10^{-6}$ à $7,92 \times 10^{-7}$ atm-m³/mol de l'eau à l'atmosphère, est non significatif. En outre, ces composés phénoliques sont capables de se dissocier et former des molécules d'hydrogène qui s'attachent aux suspensions solides et aux sédiments, diminuant ainsi la vitesse de la volatilisation.

Lorsque les crésols sont solubles dans l'eau, la petite quantité de ces molécules, généralement rencontrée dans les milieux aquatiques, se présente essentiellement dans la phase aqueuse. Le transport des crésols à partir de l'eau vers les fonds sédimentaires est possible, suite aux précipitations (60).

Les mesures des facteurs de la bioconcentration (BCFs) de l'*o*-crésol et du *m*-crésol sur les organismes aquatiques donnent 14,1 pour l'*o*-crésol et 19,9 pour le *m*-crésol. Ces résultats indiquent que les isomères des crésols ne s'accumulent pas chez les poissons et les organismes aquatiques (83).

2.8. Dégradation

2.8.1. Dégradation abiotique :

a. Dans l'air

Deux réactions dominantes sont responsables de la dégradation des crésols dans l'air : la première se déroule pendant le jour par leur réaction avec le radical hydroxyle et la seconde avec le radical nitrate pendant la nuit. Ils peuvent réagir également avec les autres oxydes dans l'air, ozone, par exemple. Une photolyse directe peut également se produire, or ces deux processus sont moins rapides que leurs réactions avec les radicaux atmosphériques (8).

Les isomères des crésols peuvent absorber une petite quantité de lumière UV au dessus de la longueur d'ondes 290 nm (84, 85, 86).

b. Dans l'eau

Les réactions de dégradation abiotique : photolyse, hydrolyse et oxydation jouent un rôle mineur dans la dégradation des crésols dans l'eau (36, 94). La photolyse de l'*o*-crésol et du *p*-crésol est accélérée en présence de matériaux humiques et flaviques, présents dans les milieux aquatiques. Les expérimentations de laboratoires montrent que l'oxyde de fer (FeOOH) et les oxydes de manganèses (MnOOH et MnO₂), généralement rencontrés dans des sols et à la surface des eaux, peuvent oxyder les crésols en solution à un pH inférieur à 4. L'oxydation des crésols est très rapide dans le brouillard et dans l'eau de pluie, à cause de leur haute concentration en oxydes de manganèse et de fer et à cause du bas pH (96). L'attaque directe des crésols par l'ozone peut également se produire dans l'eau (113, 114).

c. Dans le sol

Dans le sol, les réactions photochimiques surviennent seulement dans les millimètres supérieurs du sol, c'est un processus mineur dans l'élimination des crésols. L'hydrolyse abiotique de ces molécules dans les sols humides est non significative car les constituants de ces derniers sont incapables d'accélérer cette réaction. L'oxydation avec le fer et les oxydes de manganèse se produit également à bas pH (110).

2.8.2. Biodégradation :

La dégradation biotique est le processus principal d'élimination des crésols en milieux aquatiques (94). Les études simulées au fonctionnement des installations de traitement d'eaux d'égouts et les tests de criblage de la biodégradation aérobie montrent une dégradation rapide des crésols (2, 9, 20, 23, 59, 78, 101).

La vitesse de biodégradation des trois isomères en aérobiose augmente selon l'ordre : *p*-crésol > *m*-crésol > *o*-crésol. Cependant, aucune phase de latence n'est observée pour le *m*-crésol et le *p*-crésol, or l'*o*-crésol a une phase de latence de six jours (57). La biodégradation dans les eaux salées, eau de mer par exemple, est moins rapide que dans les eaux douces (77).

La vitesse de biodégradation est variable, elle dépend de plusieurs facteurs et des conditions du milieu aquatique. Les résultats de nombreuses investigations montrent que la concentration du substrat et des nutriments, la croissance bactérienne, la formation de bio film, le pH et la température influencent la vitesse de la biodégradation aérobie des crésols. Généralement, une concentration importante de nutriments, ainsi qu'une haute température, accélèrent la vitesse de la biodégradation. Cette dernière diminue, en présence de grandes quantités d'acide humique (94, 104).

En anaérobiose, les isomères des crésols sont dégradés en présence d'accepteurs d'électrons dans les milieux aquatiques, de la même manière que la réduction des nitrates, la méthanogénèse et la réduction des sulfates (13, 20, 37, 47, 82, 89). La biodégradation anaérobie des crésols est beaucoup plus lente que leur biodégradation en conditions aérobies. Cependant, une phase de latence est observée avant son déclenchement en anaérobiose (15, 57, 106).

La vitesse de biodégradation anaérobie des trois isomères obéit à l'ordre suivant : *p*-crésol > *m*-crésol > *o*-crésol (15, 106, 107). Selon d'autres études, le *m*-crésol est le moins biodégradable tandis que l'*o*-crésol se dégrade plus rapidement (57).

La biodégradation anaérobie de l'*o*-crésol et du *p*-crésol procède par l'oxydation du groupement méthyle donnant en premier l'hydroxybenzaldehyde, suivi de l'acide hydroxybenzoïque. Ce dernier est alors décarboxylé ou déhydroxylé, produisant le phénol ou le benzaldehyde respectivement (53, 95, 107).

Dans le sol et en aérobie, la dégradation biotique des crésols se déroule rapidement. Mais la minéralisation de leurs métabolites intermédiaires prend beaucoup de temps (31, 65, 66, 74). La demi-vie de la minéralisation des crésols dans différents types du sol varie de 39 jours à un an (31, 100).

Les études menées sur des cultures bactériennes pures et mixtes dégradant les crésols en aérobie montrent que leur décomposition commence par la formation de produits hydroxylés, suivie de l'ouverture du cycle benzène (74).

En effet, sur le plan physiologique et chez certaines espèces de *Pseudomonas*, la voie principale de dégradation des crésols est initiée par la formation du 3-méthyle et 4-méthyle catéchols. Cependant, lorsque la dégradation de l'*o*-crésol est initiée par la formation du 3-méthylcatéchol. Celle du *p*-crésol procède par la formation du 4-méthylcatéchol (73). Ainsi, une

mixture du 3-méthyl et du 4-méthyl catéchols est obtenue à partir du *m*-crésol. Par la suite, toutes les séquences de dégradation seront produites à partir du 3-méthylcatéchol ou du 4-méthylcatéchol, où chaque composé donnera naissance à une cascade d'intermédiaires selon le type du clivage dicté par les enzymes impliquées (15, 27, 81).

De nombreuses variantes de ce schéma, (Figure. 2), sont connues, spécialement celles concernant la dégradation du 3-méthylcatéchol. Chez *Achromobacter* sp, par exemple, l'enzyme : catéchol 1, 6-dioxygénase engendre la formation du 2-hydroxy-3-méthylmucic semialdehyde à partir du 3-méthylcatéchol (49). D'où la proposition de formation du protocatéchuate à partir du 4-méthylcatéchol (28).

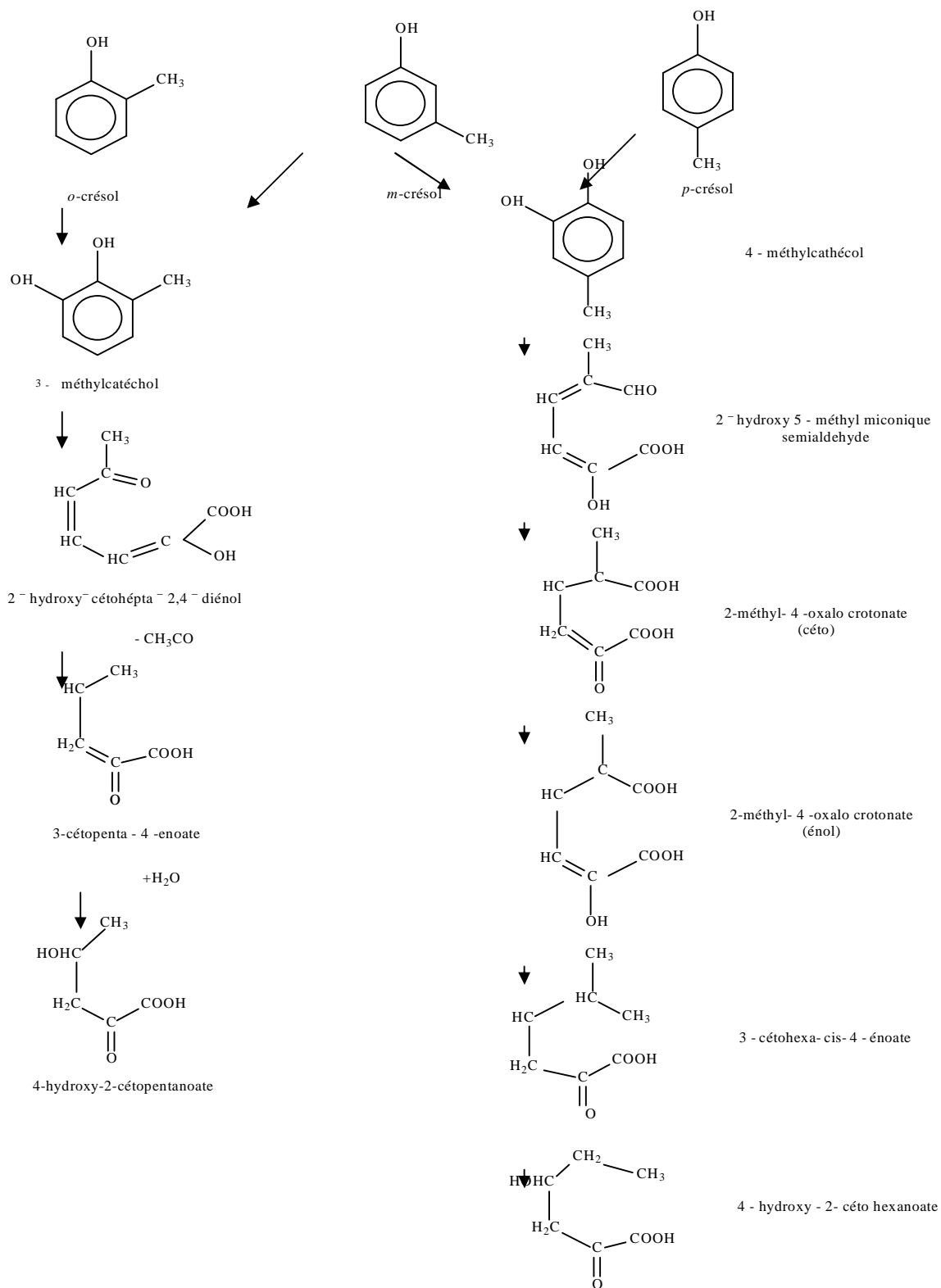


Figure 2 : Dégradation de l'*o*-crésol, le *m*-crésol et le *p*-crésol par *Pseudomonas* sp.CP4. (16, 27, 47, 105)

Matériel et Méthodes

1. Milieu de culture

Le milieu de culture est un milieu minimum où le crésol est la seule source de carbone et d'énergie. Sa composition est la suivante : NaHCO_3 (0,125g/L), KH_2PO_4 (0,1g/L), NH_4Cl (0,07g/L), Na_2SiO (0,02g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01g/L), MnCl_2 (0,007g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0015g/L), crésol (0,2g/L). Le pH du milieu est 7,02 (79).

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 collecte l'ensemble des eaux usées de la ville.

Le premier échantillon est prélevé le matin à 8h 30min, ses propriétés physico-chimiques sont les suivantes : T° : 28°C, pH : 8,12, Débit : 265L/s, Conductivité : 1822 $\mu\text{s}/\text{cm}$, MES : 171 mg/L, DCO : 326 mg/L, DBO_5 : 100 mg/L.

Le deuxième échantillon est prélevé à 8h 47min avec les propriétés physico-chimiques suivantes : T° : 24 °C, pH : 7,90, Débit : 265L/s, Conductivité : 1972 $\mu\text{s}/\text{cm}$, MES : 212mg/L, DCO : 329 mg/L, DBO_5 : 220 mg/L.

Le troisième échantillon est effectué à 8h 35min, ses propriétés physico-chimiques sont les suivantes : T° : 23°C, pH : 7,96, Débit : 265L/s, Conductivité : 1892 $\mu\text{s}/\text{cm}$, MES : 189 mg/L, DCO : 326 mg/L, DBO_5 : 160 mg/L.

Une fois l'échantillon prélevé, il est transporté dans une glacière maintenue à 4°C jusqu'au laboratoire où il est traité dès son arrivée (80).

3. Cinétique de biodégradation et dosage

Des séries de dilutions décimales de l'échantillon des eaux usées (de 10^{-1} à 10^{-9}) sont effectuées dans de l'eau distillée stérile. Le milieu minimum estensemencé à raison de 3% par dilution (10^0 à 10^{-9}), il est incubé en fermenteurs miniaturisés : trois seringues pour chaque dilution et pour chaque intervalle de temps d'incubation. Les fermenteurs sont standardisés aux mêmes volumes d'air et de milieu minimum : 1/1(V/V).

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

Témoin1 : le microbiote des eaux usées est incubé dans les mêmes conditions expérimentales mais en l'absence de crésol.

Témoin2 : la molécule est introduite dans les mêmes conditions mais sans le microbiote des eaux usées (vérification de la présence d'une éventuelle dégradation abiotique), c'est le témoin stérile.

Les fermenteurs sont incubés à 30°C en cultures discontinues sans agitation pendant 30 jours d'incubation. Le suivi cinétique de la biodégradation et le dosage du crésol débutent dès les premières heures d'incubation. Selon les intervalles cinétiques de mesure suivants : 2h, 6h, 18h, 24h, 72h, 7 jours, 14 jours et 30 jours. A chaque intervalle de temps, la concentration de crésol est dosée par méthode spectrophotométrique (61) et le pH du milieu est mesuré.

Protocole de dosage de la concentration de crésols

- Centrifugation à 4°C : 5000 tours/min pendant 10min.
- Récupération du surnageant.
- Addition de 0,25 ml de l'hydroxyle d'ammonium (NH₄OH) préparée à 0,5N.
- Agitation.
- Ajustement du pH à 7,9 (≈ 0,1) avec 200 µl du tampon phosphate (KH₂PO₄ / K₂HPO₄, pH 6,80).
- Agitation.
- Addition de 100 µl de la solution de 4-aminoantipyrine préparée à 2%.
- Agitation.
- Addition de 100 µl de la solution de potassium hexacyanoferrate (K₃Fe (CN)₆) préparée à 8%.
- Agitation.
- Lecture à la longueur d'onde $\lambda = 510$ nm, après 15min d'incubation à température ambiante.

4. Analyse par HPLC

Le surnageant est analysé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) d'une colonne C18 Nucléosil (250 nm x 4,6 nm, Shimadzu), à pompe type: LC8A, appareil à barette d'iode, avec une phase mobile constituée à 50/50 Méthanol/ Eau, à un flux de 1,0 ml/min. La détection est réalisée par un détecteur UV à 280 nm.

5. Isolement et purification des microorganismes

L'isolement des microorganismes dominants est effectué au fur et à mesure de la biodégradation de la molécule, par la méthode de la dilution-extinction (17), suivie d'une purification sur gélose nutritive. L'ensemencement est fait à partir des fermenteurs inoculés par les dilutions les plus importantes (10^{-8} , 10^{-9}), respectivement après 7 jours, 14 jours et 30 jours d'incubation.

6. Etude des bactéries isolées

6.1. Mobilité et morphologie microbienne

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries. Une fraction de colonie sur gélose est prélevée, une suspension homogène dans une goutte d'eau stérile est faite en incorporant progressivement l'inoculum. La préparation est recouverte par la lamelle. Le courant liquidien est limité par la technique de lutage (52).

6.2. Coloration de Gram

Des frottis sont préparés à partir des souches pures cultivées en milieu solide. Les frottis sont colorés par la méthode de Gram, puis ils sont observés au microscope optique (grossissement x 100).

6.3. Détermination du type respiratoire

Les souches pures sont cultivées sur le milieu gélosé Viande-Foie (VF). Les tubes sont incubés à 30°C. La profondeur des zones de croissances bactériennes indique le type respiratoire des bactéries.

6.4. Mise en évidence de l'existence de la cytochrome oxydase

Le test de l'oxydase est réalisé par la méthode des disques. L'apparition de la couleur violette au disque indique que les bactéries sont oxydase-positives.

6.5. Test de la catalase

Le matériel bactérien prélevé est mis dans une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La présence de la catalase s'exprime par un dégagement gazeux.

6.6. Mise en évidence de la nitrate réductase

Les cultures sont réalisées dans le Bouillon-Nitrate et sont incubées à 30°C. L'apparition de la couleur rouge, après l'addition des deux réactifs (nitrite1 et nitrite2), est un indicateur coloré de la réduction des nitrates.

6.7. Hydrolyse de la cellulose

Les souches sont cultivées sur le milieu solide Extrait de levure-Cellulose contenant 0,7% (P/V) de l'extrait de levure et 0,5% (P/V) de la cellulose cristalline (Sigmacell, Type101). Après incubation à 30°C, les cultures sont recouvertes par la solution du rouge Congo (0,03%). L'activité cellulolytique est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies (19).

6.8. Hydrolyse de la gélatine

Les souches sont cultivées sur le milieu Nutrient-Agar, contenant 4%(P/V) de gélatine, à 30°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique ($HgCl_2$) est ajoutée. Les zones claires correspondent aux zones de l'hydrolyse.

6.9. Production d'indole

Les souches sont cultivées dans de l'Eau peptonée exempte d'indole à 30°C. L'apparition d'un anneau rouge, après l'addition du réactif de KOVACS, traduit la présence d'indole.

6.10. Mise en évidence de la pyocyanine et de la pyoverdine

Les bactéries produisant des pigments sont ensemencées sur les milieux de KING (KING A et KING B), puis incubées à 30°C. La production de la pyocyanine est indiquée par la coloration bleue sur le KING A, tandis que le jaune-vert fluorescent sur le KING B montre la production de la pyoverdine.

7. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats est réalisée par l'ANOVA pour tester l'effet « dilution » sur la biodégradation des crésols, selon la méthode de Fischer-Snedecor, suivant le modèle : $Y_{ij} =$

$\mu_{ij} + \alpha_i + \varepsilon$ où :

Y_{ij} : L'observation générale de la variation de la concentration des crésols.

μ_{ij} : La moyenne générale.

α_i : Effet dilution.

ε : Erreur standard.

Le test de Student est appliqué pour la comparaison de la dégradation des crésols par les deux processus : biologique et non biologique. Ces analyses sont réalisées par le logiciel Minitab/version 13.31 (2000).

Résultats et Discussion

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. Le rapport DCO/DBO₅ donne une première estimation de la biodégradabilité de la matière organique de nos effluents. La valeur supérieure à 3 de l'échantillon utilisé pour inoculer le milieu, où le *m*-crésol est la seule source de carbone et d'énergie, indique qu'il est chargé en matières polluantes, considérées non biodégradables. Le rapport DCO/DBO₅ du deuxième échantillon, utilisé pour inoculer le milieu où l'*o*-crésol est la seule source de carbone et d'énergie, est inférieur à 2. L'effluent cette fois ci, n'est pas chargé en matière organique, il est présumé facilement biodégradable. Le troisième échantillon des eaux usées prélevé est moyennement chargé en matière organique considérée biodégradable par des souches activées, car le rapport DCO/DBO₅ = 2,03. Cette dernière solution est utilisée pour inoculer le milieu où le *p*-crésol est la seule source de carbone et d'énergie (6).

La vérification de la présence éventuelle de phénols dans nos échantillons d'inoculation se révèle positive, avec des concentrations initiales de : 40,91mg/L, 59,39mg/L, 6,36 mg/L, respectivement pour le premier, le second et le dernier échantillon des eaux usées prélevées. Ces résultats montrent donc que les eaux usées contiennent déjà des phénols, dont probablement des crésols d'origine domestique, le dosage de ces molécules ne pouvant être dissocié par notre technique de mesure, puisqu'elles absorbent toutes à la même longueur d'onde.

2. Cinétique de biodégradation du *m*-crésol

La figure. 3 montre qu'après 7 jours d'incubation, au delà de 75% de la concentration initiale du *m*-crésol sont dégradés par le microbiote des eaux usées, aussi bien au niveau de l'échantillon non dilué que de ses dilutions, mais seulement jusqu'à la dilution 10⁻⁴. Dans tous ces cas, la différence des concentrations du *m*-crésol résiduel est non significative ($p > 0,05$) (Annexe. 3). Par contre, pour le reste des dilutions étudiées, (dilution 10⁻⁵ à 10⁻⁹), on constate une dégradation nettement plus réduite, 17 à 25%, de la concentration initiale du *m*-crésol. De plus, la variation du niveau de dégradation du *m*-crésol dans ces dernières dilutions est là aussi non significative ($p > 0,05$) (Annexe. 3).

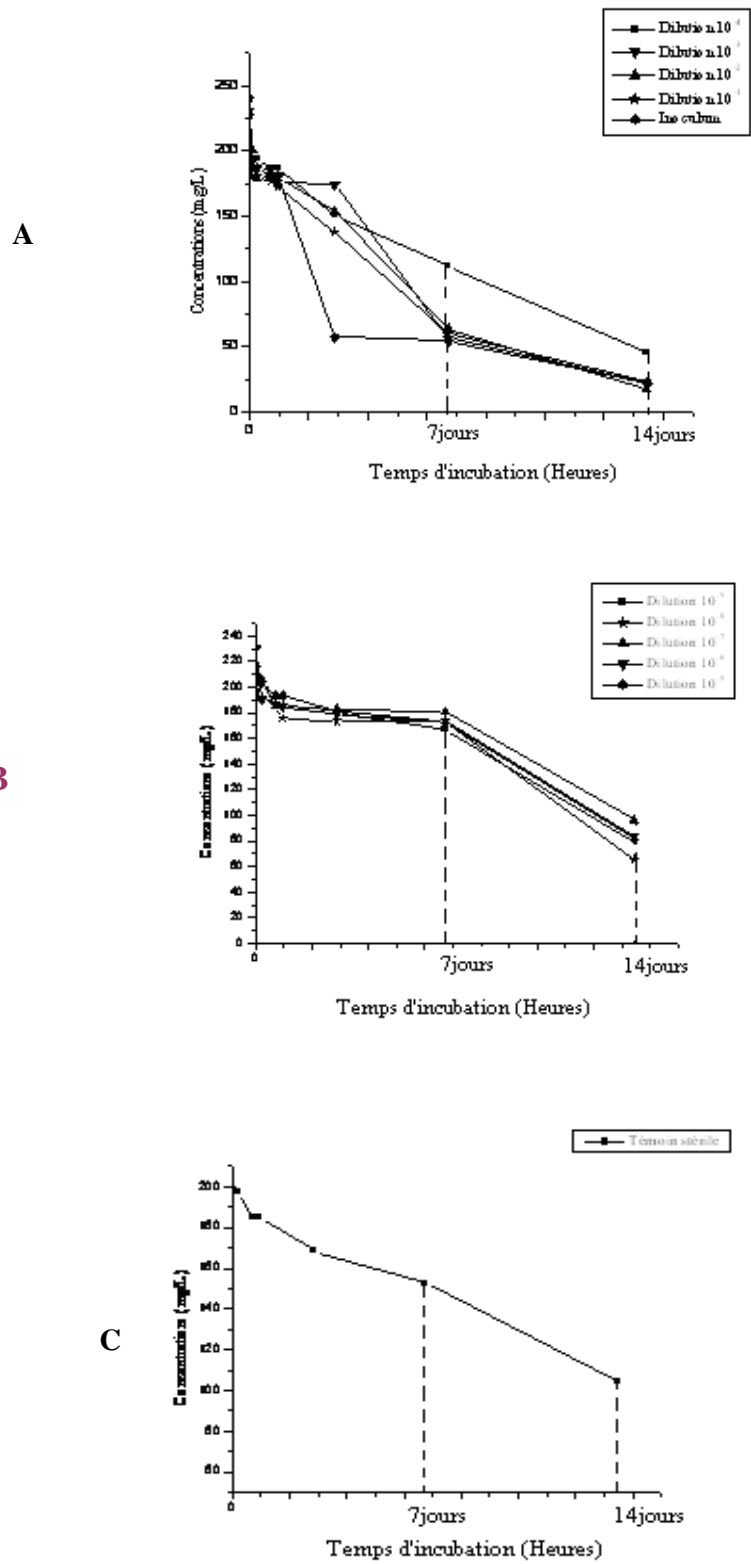


Figure 3 : Cinétiques de biodégradation du *m*-crésol après 14 jours d'incubation.

A : Inoculum et ses dilutions jusqu'à 10^{-4} , **B** : Dilutions de 10^{-5} jusqu'à 10^{-9} , **C** : Témoin stérile.

Après 14 jours d'incubation, le niveau de biodégradation du *m*-crésol s'accroît dans tous les cas, mais toujours dans une plus grande proportion au niveau des plus faibles dilutions de l'échantillon (de 10^0 à 10^{-4}) : 90% en moyenne, contre 60% pour les dilutions supérieures à 10^{-4} . En effet, la cinétique de dégradation du témoin stérile, à temps d'incubation égal, montre une décomposition abiotique parallèle de la molécule à hauteur de 45% de sa concentration initiale. La dégradation abiotique du substrat suit un profil de dégradation bien plus faible et il reste constant jusqu'au 14^{ème} jour.

Ces résultats indiquent que la modification de l'équilibre écologique introduite, forcément, par la dilution de l'inoculum joue probablement un rôle significatif dans la dégradation du *m*-crésol. Cette situation persiste jusqu'au 30^{ème} jour d'incubation, ce qui indique que l'équilibre écologique initial du microbiote n'est pas rétabli.

Nos résultats montrent, qu'après seulement 14 jours d'incubation, la presque totalité du *m*-crésol initial est éliminée, par l'action prépondérante du microbiote inoculé. La différence entre les deux processus de dégradation du *m*-crésol, biotique et abiotique, est en effet très significative ($p < 0,05$) (Annexe. 3).

Après 30 jours d'incubation, la DO remonte pour toutes les dilutions, par rapport au 14^{ème} jour d'incubation, ainsi que pour le témoin stérile. Le pH suit le même profil de hausse (Annexe. 2), indiqué par le changement de couleur des milieux de culture.

A ce niveau, le surnageant récupéré de la centrifugation du contenu des fermenteurs est analysé par HPLC pour la détection des produits de la biodégradation.

Résultat de l'HPLC

Le chromatogramme montre l'apparition de six pics en plus du pic du *m*-crésol (Figure. 4). Le temps de rétention du *m*-crésol est de 10,21min, celui du produit 1 (P_1) est de 3,27 min et du produit 2 (P_2) de 3,63 min. Le reste des pics (P_3 , P_4 , P_5 , et P_6) apparaissent à des temps très proches l'un à l'autre : de 5 à 6 min. Ces pics en fait signent des produits en traces.

Ces résultats confirment la présence dans le milieu de métabolites de dégradation qui absorbent à la même longueur d'onde que le *m*-crésol. Ces métabolites par leur temps de rétention, semblent correspondre aux photoproduits du *m*-crésol (62). L'apparition du pic du *m*-crésol indique qu'une concentration résiduelle de ce dernier reste non dégradée.

Le profil de notre chromatogramme HPLC est significativement différent des chromatogrammes HPLC de la photodégradation du *m*-crésol (62). Ce qui montre que la voie de dégradation photochimique et la voie de dégradation biologique sont différentes.

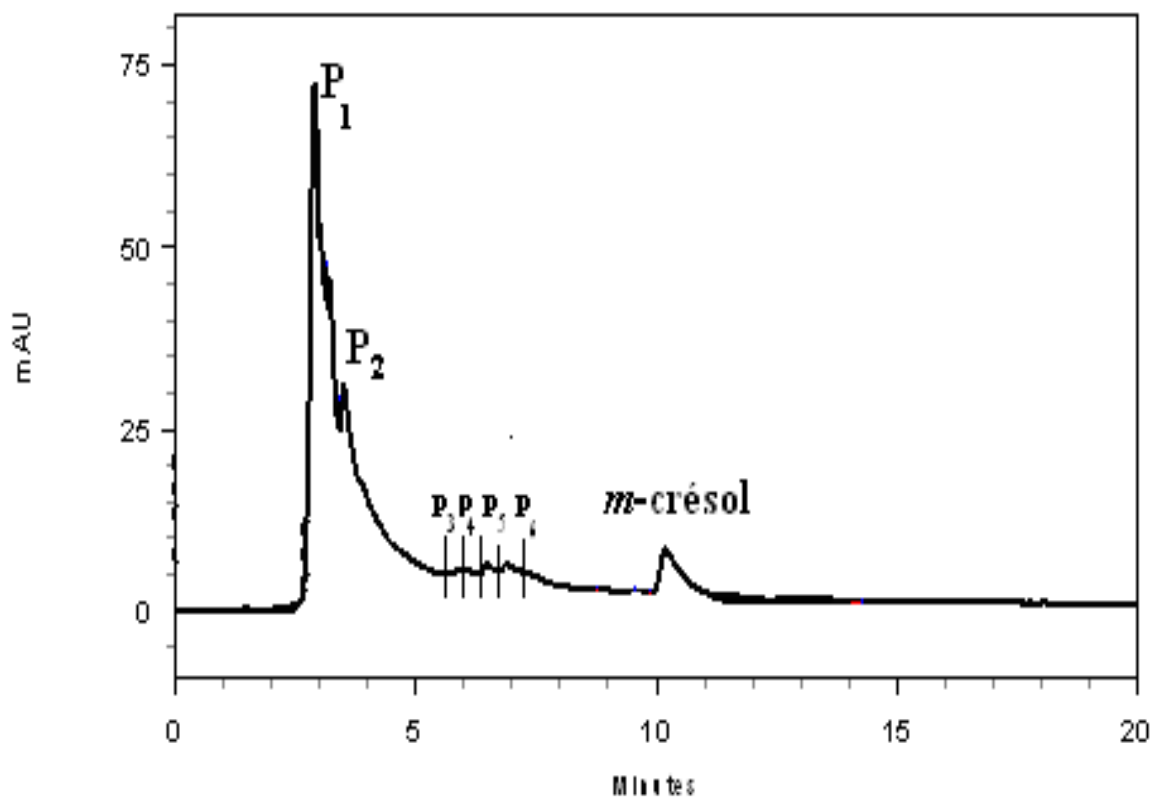


Figure 4 : Chromatogramme de la biodégradation du *m*-crésol à $\lambda = 280$ nm

3. Cinétique de biodégradation de l'*o*-crésol

Selon la figure. 5, une phase de latence de 24 à 72 heures est constatée, avant le déclenchement de la biodégradation de l'*o*-crésol. La dégradation commence après 24 heures et 72 heures, mais selon un profil long. Seulement de 9 à 30% de la molécule sont dégradés après 7 jours d'incubation. La biodégradation suit le même rythme jusqu' 14^{ème} jour d'incubation. Cependant les pourcentages de la biodégradation de la molécule augmentent : de 30 à 58% de la concentration initiale de l'*o*-crésol sont décomposés. La variation de la concentration de l'*o*-crésol résiduel entre toutes les dilutions n'est pas significative, ainsi qu'entre l'échantillon des eaux usées et la plupart de ses dilutions ($p > 0,05$) (Annexe. 3).

La biodégradation s'accroît à 30 jours d'incubation. En effet, 75% de l'*o*-crésol sont dégradés par le microbiote des eaux usées et sa dilution 10^{-1} , et de 48 à 65% sont consommées dans le reste des dilutions (dilution 10^{-2} à 10^{-9}). Cependant la variation de la concentration résiduelle de la molécule entre les dilution est encore non significative ($p > 0,05$) (Annexe. 3).

Ces résultats montrent que le taux de dégradation de l'*o*-crésol est presque le même, aussi bien par l'inoculum non dilué que par ses dilutions. Ce qui indique que l'inoculum garde son équilibre initial. La dilution du microbiote n'a pas changé l'équilibre écologique du milieu.

La cinétique du témoin stérile montre que l'*o*-crésol est décomposé dès les premières heures d'incubation. Après le 7^{ème} jour d'incubation, seulement 12% de l'*o*-crésol sont dégradés. Cette situation persiste jusqu'au mois d'incubation où 25% de la concentration initiale de la molécule sont dégradés. La différence entre la biodégradation et la dégradation abiotique et là aussi très significative ($p < 0,05$) (Annexe. 3).

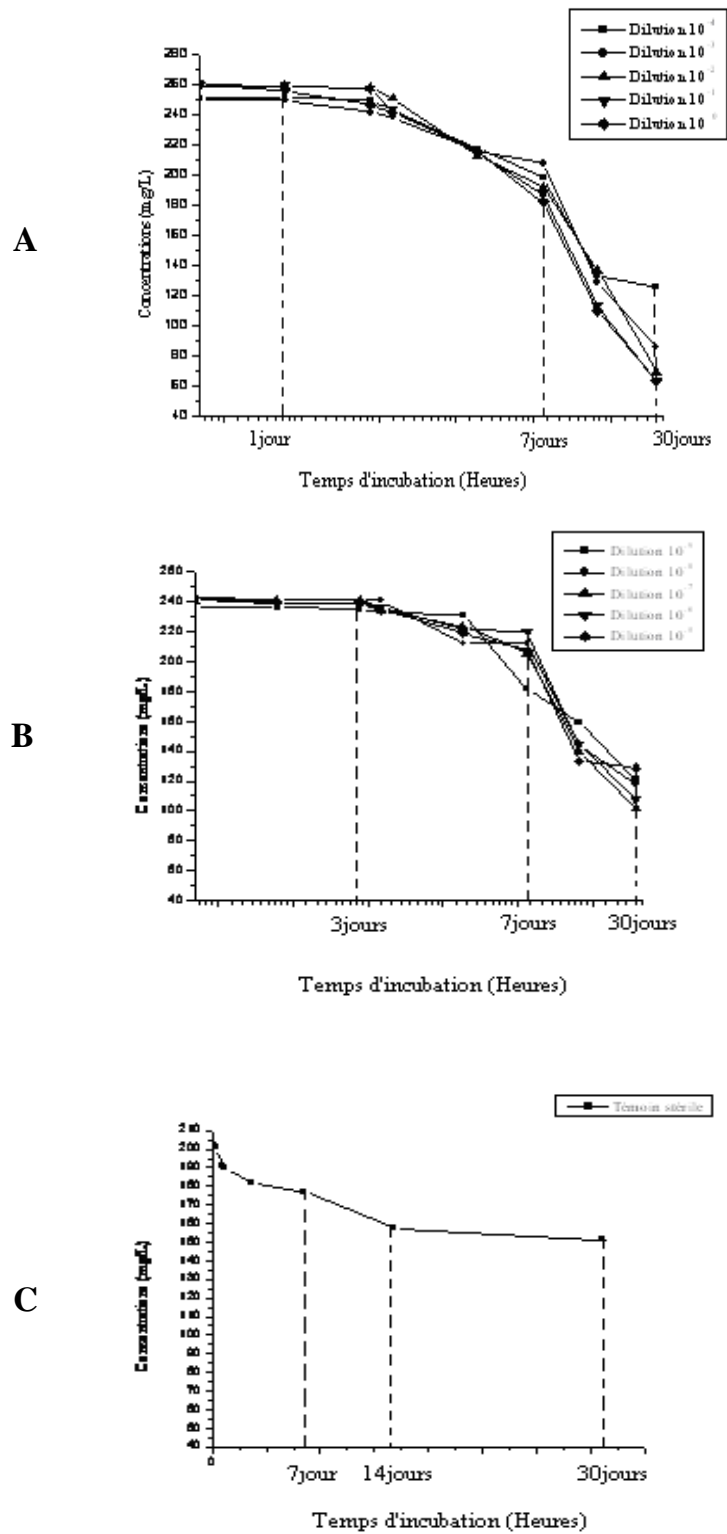


Figure 5 : Cinétiques de biodégradation de l'*o*-crésol après 30 jours d'incubation.
A : Inoculum et ses dilutions jusqu'à 10^{-4} , **B** : Dilutions de 10^{-5} jusqu'à 10^{-9} , **C** : Témoin stérile.

4. Cinétique de biodégradation du *p*-crésol

Les cinétiques de la biodégradation du *p*-crésol par le microbiote des eaux usées et ses dilutions (Figure. 6), montrent qu'après 7 jours d'incubation, de 44 à 56% de la concentration initiale de la molécule sont consommés. Or, une phase de latence de 6 heures est observée, seulement pour les dilutions 10^{-8} et 10^{-9} . La biodégradation se poursuit pendant la deuxième semaine d'incubation. Cependant un ralentissement de la dégradation est constaté : après 14 jours d'incubation, de 60 à 65% du *p*-crésol sont décomposés. L'effet dilution est là aussi non significatif ($p > 0,05$) (Annexe. 3). Une dégradation abiotique est également constatée durant la même période d'incubation et toujours selon un profil long par rapport à celui de la biodégradation. En effet, seulement 23% et 35% du *p*-crésol sont dégradée après 7 jours et 14 jours d'incubation respectivement. La différence entre les deux voies de dégradation, biotique et abiotique, est toujours très significative ($p < 0,05$) (Annexe. 3).

Les résultats obtenus montrent que l'effet de la dilution de l'inoculum est inexistant, comme dans le cas de l'*o*-crésol. Le microbiote préserve donc son équilibre initial. Les populations microbiennes dégradent la molécule, persistent donc dans les dilutions les plus importantes.

Par contre, une situation semblable à celle observée dans la biodégradation du *m*-crésol est constatée après 30 jours d'incubation. La DO remonte pour toutes les dilutions, par rapport au 14^{ème} jour d'incubation, ainsi que pour le témoin stérile. Le pH suit le même profil de hausse (Annexe. 2), indiqué par le changement de couleur des milieux de culture.

La situation observée dans nos cultures au bout de 30 jours d'incubation pourrait s'expliquer par la production de métabolites dérivés et du *p*-crésol qui absorberaient à la même longueur d'onde. D'autant que le milieu abiotique ne change pas significativement de pH et garde donc sa couleur d'origine, ce qui indiquerait la préservation de l'essentiel de la concentration du *p*-crésol initial. L'analyse en cours de l'ensemble des cultures résiduelles apportera la réponse à cette situation.

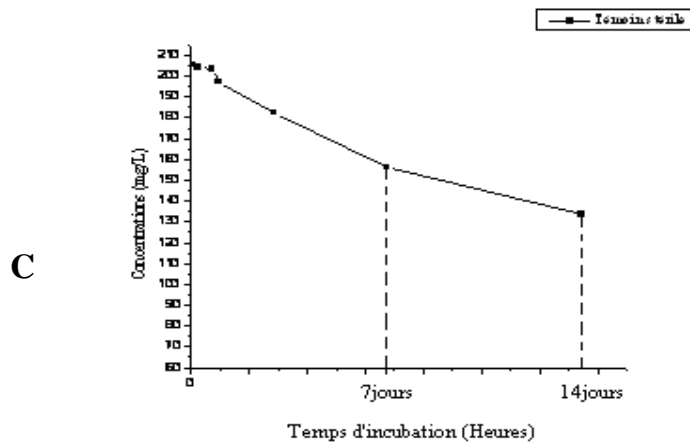
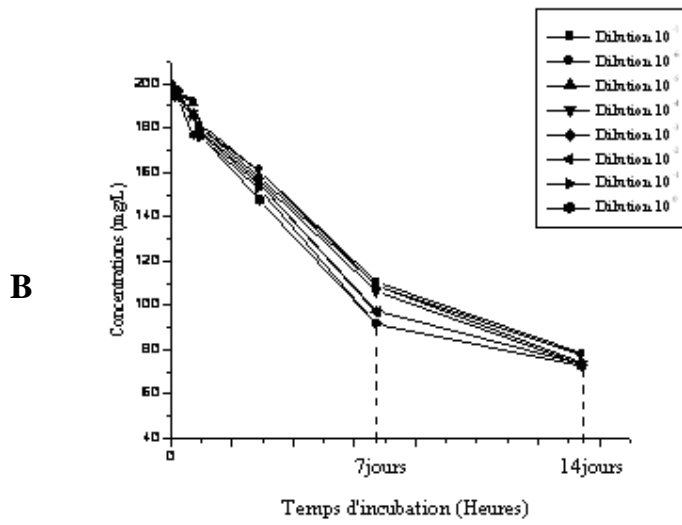
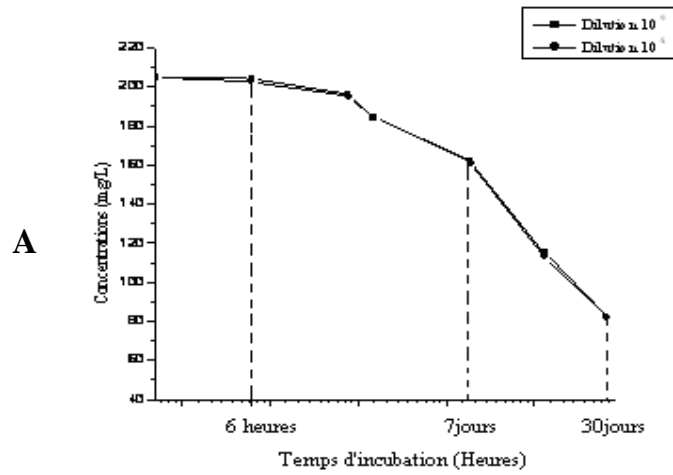


Figure 6 : Cinétiques de biodégradation du *p*-crésol après 14 jours d'incubation.
A : Dilutions 10^{-8} et 10^{-9} , **B** : Inoculum et ses dilutions jusqu'à 10^{-7} , **C** : Témoin stérile.

Les concentrations élevées de substances toxiques sont considérées comme inhibitrices de la croissance des microorganismes, empêchant ainsi leur propre dégradation. 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 (62). La diminution de la concentration du *m*-crésol, de l'*o*-crésol et du *p*-crésol, dès les premières heures d'incubation, indique que la croissance microbienne n'est pas inhibée, malgré la concentration initiale des crésols bien plus élevée dans notre étude que dans celles d'autres auteurs (3, 104). Situation vérifiée par la croissance microbienne positive obtenue après un ensemencement sur milieu solide.

Nos résultats montrent que la vitesse de la biodégradation des trois isomères durant les 14 jours d'incubation augmentent selon l'ordre *m*-crésol > *p*-crésol > *o*-crésol. Cependant, une phase de latence de 72 heures au maximum est observée pour l'*o*-crésol. Six heures de latence sont constatées dans les dilutions les plus importantes, au cours de la biodégradation du *p*-crésol. Les études menées sur la biodégradation aérobie des crésols montrent une dégradation rapide des trois isomères (14, 23, 59, 78, 101, 105). Cependant la vitesse de la biodégradation augmente selon l'ordre : *p*-crésol > *m*-crésol > *o*-crésol. Mais, une phase de latence de 6 jours est observé pour le *o*-crésol (57).

En milieu naturel, la position du groupement méthyle sur le noyau aromatique influence la facilité de biotransformation (62). Ainsi, la vitesse de biodégradation dépend de plusieurs facteurs et des conditions du milieu aqueux : concentration du substrats et des nutriments, pH, température, croissance microbienne, etc. (94, 105). La quantification de la charge polluante des échantillons des eaux usées prélevées donne une indication sur la composition des effluent en matière organique biodégradable ou non, et montre ainsi la différence de la composition des trois inoculum utilisés. Ce qui pourrait probablement expliquer la différence des vitesses de biodégradation entre les trois isomères des crésols.

De nombreuses études montrent que la biodégradation des crésols et, plus généralement, des phénols par des souches microbiennes pures est réalisée en quelques heures seulement. Ainsi, *Pseudomonas putida* dégrade les phénols des milieux aquatiques à une concentration initiale de 23,4mg/L en 14 heures (72). Alors que les phénols sont complètement dégradés par le consortium microbien isolé à partir des eaux usées d'usines productrices de phénols au bout de 22 heures (72). Cependant, une phase de latence de 6 à 16 heures est alors observée pour la biodégradation complète des phénols à une concentration initiale de 200mg/L (43). De même que la

biodégradation de phénols, à une concentration dans le milieu de 150mg/L, est achevée au bout de 3 heures par des boues activées (61). En général, une adaptation de la microflore est nécessaire pour obtenir la dégradation des crésols à des vitesses notables.

En milieux aquatiques naturels, la principale voie d'élimination des crésols est biologique. Mais des voies abiotiques diversifiées : photolyse, hydrolyse, oxydation, peuvent également se produire (36, 95). Ces processus pourraient bien expliquer la diminution de la concentration des trois isomères de crésol dans notre témoin stérile.

Après 30 jours d'incubation, la DO du *m*-crésol et du *p*-crésol remonte pour toutes les dilutions, par rapport au 14^{ème} jour d'incubation, ainsi que pour le témoin stérile. Le pH suit le même profil de hausse, indiqué par le changement de couleur des milieux de culture. Ce cas de figure n'a pas été signalé, probablement parce que les études cinétiques rapportées n'ont pas été menées sur des temps d'incubation aussi longs que les nôtres (61). L'analyse par HPLC de l'ensemble des cultures résiduelles du *m*-crésol répond à cette situation.

En effet, la situation observée après 30 jours d'incubation s'explique par la production de métabolites dérivés du *m*-crésol qui absorbe à la même longueur d'onde. Cependant, l'analyse de l'ensemble des cultures résiduelles du *p*-crésol est en cours.

Ce cas de figure, observé seulement pour les deux isomères *mé*ta et *para*, indique qu'ils sont probablement biodégradés selon la même voie métabolique, donnant les mêmes produits de dégradation. Ceci est confirmé par de nombreuses études du métabolisme des crésols par certaines espèces bactériennes de *Pseudomonas* en aérobiose (16, 28, 47, 81, 105).

Notre étude montre la capacité des microorganismes à dégrader les composés phénoliques. Les 200mg/L du crésol, auxquels s'ajoutent les concentrations de phénols polluants, sont dégradés au bout de 14 jours par le microbiote total des eaux usées, à hauteur de 90% pour le *m*-crésol, de 65% pour le *p*-crésol et de 75% après 30 jours d'incubation pour l'*o*-crésol. Une situation de même nature mais de moindre ampleur est observée pour les dilutions les plus importantes de l'inoculum (10^{-8} , 10^{-9}), où en moyenne de 60% de la concentration initiale du *m*-crésol et du *p*-crésol sont dégradés durant la même période d'incubation, et 48% de l'*o*-crésol sont dégradés après 30 jours d'incubation. Ce qui montre clairement le rôle prépondérant que joue les microorganismes dans la détoxification du milieu pollué, quelle que soit la concentration

de l'inoculum. Ce dernier aspect pourrait indiquer des aptitudes métaboliques spécifiques qu'il s'agira de déterminer.

La dégradation totale des molécules organiques se traduit par la production de CO₂ et de H₂O. Cependant, dans notre étude, aucune production de gaz n'est constatée durant toute la période d'incubation. Ce qui montre que le *m*-crésol, l'*o*-crésol et le *p*-crésol ne sont pas minéralisés, aussi bien par la voie biologique que par la voie abiotique même après 90 jours d'incubation.

5. Isolement et purification des microorganismes dominants

L'isolement des microorganismes dominants dégradant le *m*-crésol a donné des colonies bactériennes de six types macroscopiques différents, dont une d'entre elles est pigmentée. Cependant, deux types de colonies bactériennes dégradant l'*o*-crésol sont sélectionnés. Le *p*-crésol est dégradé par trois types de colonies bactériennes d'aspects macroscopiques différents. Une d'entre elles est aussi pigmentée.

Les cultures de cette dernière souche et celles isolée de la biodégradation du *m*-crésol montrent qu'elles sont pigmentées en vert et que leurs pigments sont diffusibles, puisqu'ils ont fini par colorer toute la gélose.

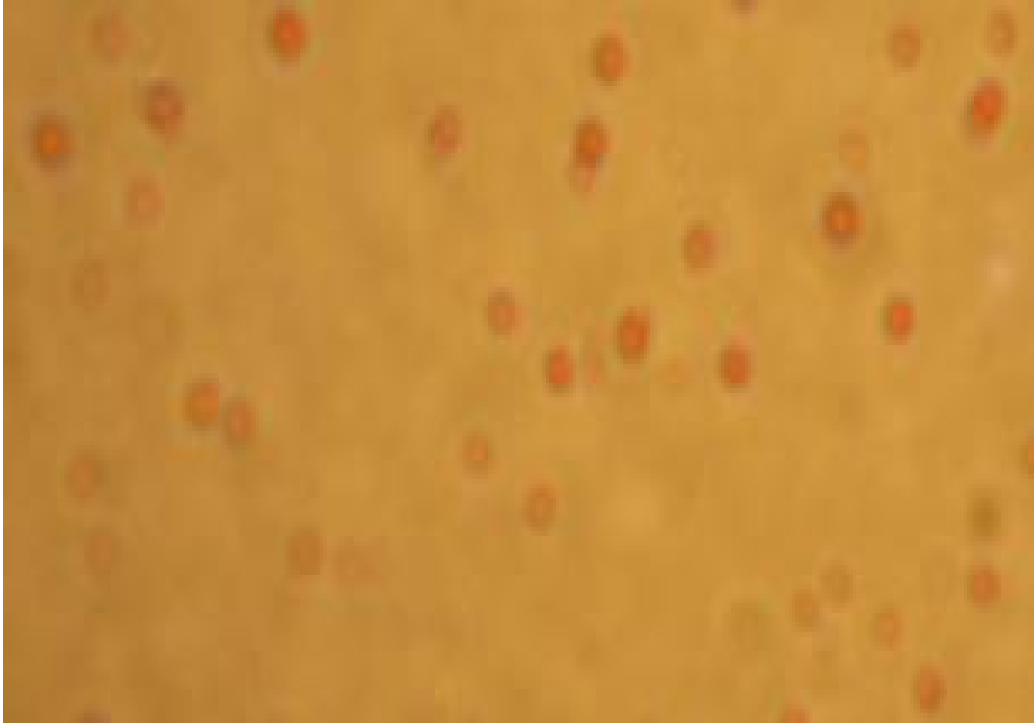
6. Etude des bactéries isolées

6.1. Mobilité et morphologie microbienne

L'observation microscopique à l'état frais des souches bactériennes isolées montre que parmi les souches dégradant le *m*-crésol, cinq d'entre elles sont des coques et une seule se présente sous forme bacillaire. Ainsi, les deux souches isolées de l'*o*-crésol sont des coques. Comme dans le cas du *m*-crésol, le *p*-crésol est dégradé par deux souches bactériennes coccoides et une bacillaire. Toutes les souches dégradant les isomères du crésol sont mobiles. Les bacilles obtenus de la dégradation du *m*-crésol et du *p*-crésol sont les souches pigmentées en vert.

6.2. Coloration de Gram

L'observation microscopique après la coloration de Gram révèle que toutes les souches, aussi bien les coques que les bacilles, sont à Gram négatif (Figure. 7).



1



2

Figure 7 : Les coques et les bacilles obtenus après la coloration de Gram, sous microscope optique (grossissement x 100).

1 : *Alcaligenes*.

2 : *Pseudomonas*.

6.3. Détermination du type respiratoire

Les résultats de l'ensemencement des cellules bactériennes sur le milieu gélosé (VF) montrent que la croissance bactérienne de toutes les souches est en surface. Ces résultats indiquent que toutes les bactéries sont aérobies microaerophiles.

6.4. Mise en évidence de l'existence de la cytochrome oxydase

Une coloration violette apparaît après l'étalement des bactéries sur les disques oxydase. Tous les cocci et les bacilles sont oxydase positive.

6.5. Test de la catalase

Un dégagement gazeux est observé dès l'étalement des suspensions bactériennes dans le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Toutes les bactéries sont catalase positive.

6.6. Mise en évidence de la nitrate réductase

Une coloration rouge est obtenue après l'addition des réactifs des nitrites au bouillon nitrate ensemencé par les coques. Ce qui montre la présence des nitrites dans le milieu, provenant certainement de la réduction des nitrates. Par contre, le bouillon nitrate, ensemencé par les bactéries bacillaires, donne un résultat négatif. Après l'addition de la poudre de Zinc, une coloration rouge est obtenue, ce qui indique que les bactéries n'ont pas réduit les nitrates.

Les résultats obtenus montrent que les coques sont nitrate réductase positive, par contre les bacilles sont nitrate réductase négatif.

6.7. Hydrolyse de la cellulose

Les zones claires, autour des colonies bactériennes, caractéristiques de la dégradation de la cellulose ne sont pas observées. Ce qui indique que les bactéries sont incapables de dégrader la cellulose. Ce test est appliqué seulement pour les coques.

6.8. Hydrolyse de la gélatine

Des zones opacifiantes sont obtenues, après l'addition de la solution de chlorure mercurique à la gélose gélatinée ensemencée par les souches bactériennes coccoïdes. Ce qui indique que la gélatine n'est pas dégradée par les cellules bactériennes.

6.9. Production d'indole

Un anneau jaune est obtenu après l'addition du réactif de KOVACS aux tubes ensemencés par les souches bactériennes isolées. Les bactéries dégradant les crésols ne produisent pas d'indole, elles ne possèdent pas donc la Tryptophanase.

6.10. Mise en évidence de la pyocyanine et de la pyoverdine

L'ensemencement des bacilles sur les milieux de KING a donné une coloration jaune-verte fluorescente sur le KING B tandis que le KING A reste incolore. Ces résultats montrent que les souches bactériennes secrètent la pyoverdine et non pas la pyocyanine.

L'étude des bactéries responsables de la dégradation de l'*o*-crésol, du *m*-crésol et du *p*-crésol, montre que les trois isomères sont dégradés par au moins deux populations bactériennes de morphologie différente. En effet, l'examen microscopique révèle qu'une des souches est coccoïde alors que l'autre est bacillaire. Les deux souches sont mobiles. Elles sont à Gram négatif, aérobies microaérophiles, oxydase positive et catalase positive. Cependant, les cocci sont nitrate réductase positive, alors que les bacilles sont nitrate réductase négative. Les deux bactéries ne produisent pas l'indole. Les cocci sont incapable d'hydrolyser la cellulose et la gélatine. Les bacilles secrètent la pyoverdine, ce qui explique la pigmentation de la gélose nutritive.

La sécrétion de la pyocyanine et de la pyoverdine est caractéristique des bactéries du genre : *Pseudomonas*. Les souches typiques de *Pseudomonas aeruginosa* secrètent les deux pigments, pyocyanine et pyoverdine. L'observation de la pyocyanine identifie même l'espèce car c'est la seule à produire ce pigment. Cependant *Pseudomonas aeruginosa* peut perdre par mutation la capacité de synthèse de l'un ou l'autre des pigments. Les espèces de *Pseudomonas* produisant la pyoverdine sont essentiellement *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* (52).

Le *m*-crésol et le *p*-crésol sont dégradés par les mêmes souches bactériennes : les coques et les bacilles. Probablement selon les mêmes voies métaboliques incomplètes et donnant les mêmes produits de dégradation sans production de gaz.

La comparaison des caractères étudiés avec ceux des genres bactériens publiés dans la 9^{ème} édition du « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology » (46) a permis d'affecter les coques au genre : *Alcaligenes* et les bacilles au genre : *Pseudomonas*.

Par ce profil, nos résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs qui ont aussi utilisé des souches des genres : *Alcaligenes*, *Pseudomonas* (10, 14).

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 de la bioremédiation des phénols des eaux usées (1). Grâce à leur aptitude à les dégrader, même lorsqu'ils se présentent dans le milieu à de très fortes concentrations. Il est démontré que *Pseudomonas putida* assimile 85% d'une concentration de phénols de 500 mg/L, sous des conditions contrôlées (4). *Pseudomonas putida* est capable de dégrader 1000 mg/L de phénols en 260 heures (42). Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa*, isolée à partir des eaux usées des industries pharmaceutiques, dégrade les phénols à une concentration initiale de 2600 mg/L en 150 heures. Simultanément, *Pseudomonas pseudomallei* dégrade 1500mg/L de phénols durant la même période. Ces deux espèces décomposent les phénols même en présence de très fortes concentrations salines (1). Des études récentes montrent que la mixture des cultures bactériennes, avec la prédominance de *Pseudomonas putida*, dégradent complètement les phénols à une concentration initiale de 600mg/L durant 26 heures (87).

Peu d'études sont menées sur la biodégradation des crésols et des phénols, par les espèces du genre *Alcaligenes*. En effet, *Alcaligenes faecalis* est l'espèce majoritairement isolée et identifiée. Comme les espèces de *Pseudomonas*, elle est capable de dégrader des concentrations élevées de phénols: 1600 mg/L durant 76 heures (50).

La biodégradation des crésols n'est pas limitée à ces deux genres bactériens. Des bactéries du genre *Bacillus* et *Acinetobacter* jouent aussi un rôle important dans l'élimination des phénols des milieux naturels (44).

La finalisation de l'identification en cours de nos souches déterminera les espèces bactériennes responsables de la biodégradation des crésols dans la station d'épuration de la ville de CONSTANTINE.

Conclusion générale

Notre travail avait pour objectifs, l'étude de la biodégradation des trois isomères des crésols par le microbiote total des eaux usées de la ville de CONSTANTINE, l'isolement et l'identification de microorganismes dominants, responsables de la biodégradation. Pour cela, des échantillons des eaux usées sont prélevés à partir du canal d'entrée de la station d'épuration d'IBN ZIAD, récemment mise en service. Ils sont utilisés pour inoculer un milieu minimum où l'un des isomères : *o*-crésol, *m*-crésol et *p*-crésol, constitue, à chaque fois, la seule source de carbone et d'énergie à une concentration initiale de 200 mg/L. Les cultures discontinues, sont menées dans des fermenteurs miniaturisés en aérobiose. Ils sont incubés à 30°C, pendant de longues périodes d'incubation sans agitation. La vérification de la présence d'une éventuelle dégradation abiotique est faite par l'incubation parallèle de fermenteurs stériles. La concentration de la molécule est mesurée par la méthode spectrophotométrique (61). L'isolement de microorganismes dominants est effectué en milieu liquide, au fur et à mesure de la biodégradation de la molécule, par la méthode de la dilution-extinction (17). L'isolement est suivi d'une purification sur gélose nutritive. L'identification des genres bactériens responsables de la biodégradation des crésols est réalisée par l'étude des caractères morphologiques et de caractères biochimiques des souches isolées.

Les résultats obtenus 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 et par toutes ses dilutions. Une dégradation abiotique est également observée durant la même période d'incubation, mais avec des pourcentages bien plus inférieurs que ceux de la biodégradation (45%).

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 et toutes ses dilutions (60% en moyenne). Une dégradation abiotique est également constatée durant la même période d'incubation. Seulement 35% de la concentration initiale du *p*-crésol sont dégradés.

La biodégradation de l'*o*-crésol n'est déclenchée qu'après 72 heures d'incubation par le microbiote et la majorité de ses dilutions. En moyenne 58% de la concentration initiale de la molécule sont consommés par les microorganismes des eaux usées et toutes leurs dilutions, cependant 12% de l'*o*-crésol sont décomposés abiotiquement, durant les 14 jours d'incubation.

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, et seulement 25% sont dégradés par voie abiotique. Singulièrement la DO et le pH remontent, après 30 jours d'incubation, au cours de la biodégradation du *m*-crésol et du *p*-crésol. Cette situation est observée dans toutes les dilutions ainsi que dans le témoin stérile, ce qui indiquerait une évolution des produits de dégradation indépendamment de l'action du microbiote présent dans le milieu.

La comparaison de la biodégradation entre les trois isomères, révèle que le *m*-crésol et le *p*-crésol sont probablement dégradés selon la même voie (16, 27, 81), donnant ainsi les mêmes produits de dégradation, ce qui pourrait expliquer la situation identique observée après 30 jours d'incubation. Cependant, la dilution de l'inoculum modifie irrémédiablement l'équilibre écologique du milieu au cours de la biodégradation du *m*-crésol. Mais ce n'est pas le cas pour le *p*-crésol, car l'inoculum préserve son activité initiale, probablement par l'implication de populations microbiennes différentes. Ce qui est constaté aussi pour l'*o*-crésol. 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. Les études menées sur la biodégradation de l'*o*-crésol montrent l'apparition d'une phase de latence (57). Ce qui est observé dans notre étude. La dégradation abiotique est constatée pour les trois isomères mais toujours avec des taux très faibles par rapport à la biodégradation. 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.

Les crésols ne sont pas minéralisés, aussi bien par le processus biologique que par voies abiotiques, car aucune production de gaz n'est constatée même après 90 jours d'incubation.

L'isolement de microorganismes dominants a permis de sélectionner des souches bactériennes macroscopiquement différentes. L'examen microscopique révèle que le *m*-crésol et le *p*-crésol sont dégradés par seulement deux souches bactériennes, dont une secrète des pigments diffusibles. Cependant, l'*o*-crésol est dégradé par une seule souche bactérienne. L'étude morphologique et biochimique des cellules bactériennes a permis de les affecter aux genres : *Alcaligenes* et *Pseudomonas*.

Notre travail montre une nouvelle fois le rôle prépondérant que jouent les bactéries dans la détoxification des milieux naturels pollués. Pour compléter cette étude, il serait intéressant d'identifier les produits de dégradation des crésols, d'identifier les espèces bactériennes par des tests biochimiques supplémentaires et par des analyses phylogénétiques, et d'optimiser leur milieu de culture pour une biodégradation rapide et totale des crésols.

Références bibliographiques

- 1. Afzal M., Lqbal S., Rauf S., Khalid Z.M., 2007.** Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. J. Hazard. Mater., **149**: 60-66.
- 2. Alexander M., Lustigman B.K., 1966.** Effect of chemical structure on microbial degradation of substituted benzenes. J. Agric. Food. Chem., **14**: 410-413.
- 3. Allsop P.J., Chisti Y., Moo-Yong M., Sullivan G.R., 1993.** Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. Biotechnol. Bioeng., **41**: 572-580.
- 4. 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.
- 5. Anonyme., 1999.** Guide canadien d'évaluation des incendies sur la santé: 261-263.
- 6. Anonyme., 2006.** La biodégradabilité des effluents urbains. Memotec., 19.
- 7. Artiola-Fortuny J., Fuller W.H., 1982.** Adsorption of some monohydroxybenzene derivatives by soils. Soil. Sci., **133**: 18-26.
- 8. Atkinson R., Carter W.P.L., Plum C.N., et al. 1984.** Kinetics of the gas-phase reactions of NO₃ radicals with a series of aromatics at 296±2 K., Int. J. Chem. Kinetics. **16**: 887-898.
- 9. Babeu L., Vaishnav D.D., 1987.** Prediction of biodegradability for selected organic chemicals., J. Ind. Microb. **2**: 107-115.
- 10. Bai J., Wen J.P., Li H.M., Jiang Y., 2007.** Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and *m*-cresol using *Alcaligenes faecalis*. Process. Biochem., **42**: 510-517.
- 11. Bak F., Widdel F., 1986.** Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* new species. Arch. Microbiol., **146 (2)**: 177-180.
- 12. Baumont S., Camard J.P., Lefranc A., Francon A., 2000.** Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaire et faisabilité en Ile-de France, Paris: 12-13, 27-29.
- 13. Battersby N.S., Wilson V., 1988.** Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere., **17**: 2441-2460.

- 14. Baylay R.C., Dagley S., 1966.** The metabolism of cresols by a species of *Pseudomonas*. *Biochem. J.*, **101**: 293-301.
- 15. Baylay R.C., Dagley S., 1969.** Oxobenzoic acids as metabolites in the bacterial degradation of catechols. *Biochem. J.*, **111**: 303-307.
- 16. Bayly R.C., Wiggmore G.J., 1973.** Metabolism of phenol and cresols by mutants of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, **113**: 1112-1120.
- 17. Bousseboua H., 2005.** *Eléments de microbiologie*. 2^{ème} édition, Campus-Club, Algérie.
- 18. Boyd S.A., 1982.** Adsorption of substituted phenols by soil. *Soil. Sci.*, **134**: 337-343.
- 19. Brizzio S., Turchetti B., Garcia V., Libkind D., Buzzini P., Brook M., 2007.** Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Can. J. Microbiol.*, **53**: 519-525.
- 20. Brown S.C., Grady C.P.L Jr., 1990.** Biodegradation kinetics of substituted phenolics: Demonstration of a protocol based on electrolytic respirometry. *Water. Res.*, **24 (7)**: 853-862.
- 21. Buswell J.A., 1975.** Metabolism of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.*, **124**: 1077-1083.
- 22. Cabridenc R., 1981.** *Qualités hydrologiques des milieux aquatiques*, 4^{ème} JERE du Ministère de l'environnement, Paris.
- 23. Chambers C.W., Tabak H.H., Kabler P.W., 1963.** Degradation of aromatic compounds by phenol-adapted bacteria. *J. Water. Pollut. Contr. Fed.*, **35**: 1517-1528.
- 24. Clayton G.D., Clayton F.E., 1981.** *Patty's industrial hygiene and toxicology*, 3rd edition, vol. IIA. New York, John Wiley and sons: 2597-2601.
- 25. Colin F., 1981.** *Qualités hydrologiques des eaux*, 4^{ème} Journée, l'Eau, la Recherche et l'Environnement, Paris.
- 26. Czuczwa J., Levenberger C., Tremp J., Giger W., 1987.** Determination of trace levels of phenol and cresols in rain by continuous liquid-liquid extraction and high-performance chromatography. *J. Chromatogr.*, **403**: 233-241.

- 27. Dagley S., Gibson D.T., 1965.** The bacterial degradation of catechol. *Biochem. J.*, **95**: 466-474.
- 28. Dagley S., Patel M.D., 1957.** Oxidation of *p*-cresol and related compounds by a *Pseudomonas*. *Biochem. J.*, **66**: 227-223.
- 29. Department of Health and Human Services., 2006.** Public Health Service, Agency for toxic substances and disease registry.
- 30. Direction de l'environnement et des établissements classés., 2007.** Normes Sénégalaise, eaux usées Normes de Rejet.
- 31. Dobbins D.C., Pfaender F.K., 1988.** Methodology for assessing respiration and cellular incorporation of radiolabeled substrates by soil microbial communities. *Microbiol. Ecol.*, **15**: 257-273.
- 32. Eisenreich S.J., Looney B.B., Thornton J.D., 1981.** Airborne organic contaminants in Great Lakes ecosystem. *Env. Sci. Tech.* **15**: 30-38.
- 33. Encyclopaedia information about Cresol, 2003.** The Columbia Electronic Encyclopaedia, 6th edition.
- 34. Encyclopaedia of occupational health and safety., 1983.** 3rd edition, vol.1. Genève, BIT: 569.
- 35. Faby J.A., Brissaud F., 1997.** L'utilisation des eaux usées épurées en irrigation. Office international de l'eau.
- 36. Faust B.C., Holgné J., 1987.** Sensitized photooxidation of phenols by fluvic acid in natural waters. *Environ. Sci. Technol.*, **21**: 957-964.
- 37. Fedorak P.M., Hrudey S.E., 1984.** The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis. *Water. Res.*, **18**: 361-367.
- 38. Fiege H., Bayer A.G., 1987.** Cresols and xylenols. In: Gerharte Wed. Ullman's encyclopaedia of industrial chemistry, 5th edition. New York, VCH Publishers, vol. 8A: 25, 59.

- 39. Freitag D., Geyer H., Kraus A., Viswanathan R., Kotzias D., Attar A., Klein W., Korte F., 1982.** Ecotoxicological profile analysis: VII. Screening chemicals for their environmental behaviour by comparative evaluation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **60**: 60-81.
- 40. Gallego A., Fortunato M.S., Foglia J., Rossi S., Gemini V., Gomez L., Gomez C.E., Higa L.E., Korol S.E., 2003.** Biodegradation and detoxification of phenolic compounds by pure and mixed indigenous cultures in aerobic reactors. *Int. Biodeterio. Biodegrad.*, **52**: 261-267.
- 41. Gaujous. D., 1995.** La pollution des milieux aquatiques : aide-mémoire. Tec & Doc, Lavoisier, Paris: 15.
- 42. Gonzalez G., Herrera G., Garcia M.T., 2001.** Biodegradation of phenol industrial wastewater in fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Bioresour. Technol.*, **80**: 137-142.
- 43. Goudar C.T., Ganji S.H., Pujar B.G., Strevett K.A., 2000.** Substrate inhibition kinetics of phenol biodegradation. *Water. Environ. Res.*, **72**: 50-55.
- 44. Grima S., 2002.** Biodégradation de matériaux polymères à usage agricole: étude et mise au point d'une nouvelle méthode de test, analyse des produits de dégradation et impact environnemental. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse (France).
- 45. Hao O.J., Kim M.H., Seagren E.A., Kim H., 2002.** Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species. *Chemosphere.*, **46**: 797-807.
- 46. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staly J.T., Williams S.T., (1994).** Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 47. Hopper D.J., Taylor D.G., 1974.** Pathways for degradation of *m*-cresol and *p*-cresol by *Pseudomonas putida*. *J. Bactriol.* **122**: 1-6.
- 48. Horowitz A., Shelton D.R., Cornell C.P., Tiedje J.M., 1982.** Anaerobic degradation of aromatic compounds in sediments and digested sludge. *Dev. Ind. Microbiol.*, **23**: 435-444.
- 49. Horvath R.S., 1970.** Cometabolism of methyl- and chloro-substituted catechols by an *Achromobacter sp.* Possessing a new meta-cleaving oxygenase. *Biochem. J.*, **119**: 871-876.

- 50. Hughes E.J.L., Baylay R.C., Shurray R.A., 1984.** Evidence for isofunctional enzymes in the degradation of phenol; *m*-, and *p*-toluene, and *p*-cresol via catechol *meta*-cleavage pathways in *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol., **158**: 79-83.
- 51. Jiang Y., Wen J., Bai J., Jia X., Hu Z., 2007.** Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. J. Hazard. Mater., **147**: 672-676.
- 52. Joffin J.N., Leyral G., 1995.** Microbiologie Technique. Tome1. Centre régional de documentation pédagogique d'aquitaine, Bordeaux.
- 53. Kühn E.P., Zeyer J., Eicher P., Schwarzenbach R.P., 1988.** Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 490-496.
- 54. Kuhn R., Birett K., 1981.** Merkbatter gefährliche Arbeitsstoffe, Lech, Verlag Moderne Industrie, Blatt Nr K 20.
- 55. Lecler E.D.M., 1970.** Notes du cours d'épuration des eaux à l'université de Liège, CEDEBOC.
- 56. Leuenberger C., Ligocki M.P., Pankow J.F., 1985.** Trace organic compounds in rain.4. Identities, concentrations, and scavenging mechanisms for phenols in urban air and rain. Environ. Sci. Technol. **19 (11)**: 1053-1058.
- 57. Liu D., Pacepavicius G., 1990.** A systematic study of the aerobic and anaerobic biodegradation of 18 chlorophenols and 3 cresols. Toxic. Assess. Int. J., **5 (4)**: 367-388.
- 58. Luh M.D., Baker R.A., 1970.** Organic sorption from aqueous solution by two clays. Proceedings of the 25th Industrial Waste Conference, Purude University, Eng. Bull. Ext. Series. **25**: 534-542.
- 59. Lund F.A., Rodriguez D.S., 1984.** Acclimation of activated sludge to mono-substituted derivatives of phenol and benzoic acids. J. Gen. Appl. Microbiol., **30**: 53-61.
- 60. Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H., 1990.** Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds. Washington, DC, American Chemical Society: 15-16.

- 61. Maeda M., Itoh A., Kawase Y., 2005.** Kinetics for aerobic biological treatment of *o*-cresol containing wastewaters in slurry bioreactor: biodegradation by utilizing waste activated sludge. *Biochem. Eng. J.*, **22**: 97-103.
- 62. Malouki M.A., 1995.** Traitement des eaux par photocatalyse hétérogène: dégradation des crésols. Thèse de Magister. Institut de chimie. Université de Constantine.
- 63. Manufacturing chemists'association., 1952.** Cresol Chemical safety data sheet-SD-48, Washington: 12.
- 64. Martin G., 1982.** Point sur l'épuration et le traitement d'effluents (eau, air). Vol. 1. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- 65. Masunaga S., Urushigawa Y., Yonezawa Y., 1983.** Microbial transformation of *o*-cresol to dihydroxytoluenes by phenol acclimated activated sludge. *Chemosphere.*, **12**: 1075-1082.
- 66. Masunaga S., Urishigawa Y., Yonezawa Y., 1986.** Biodegradation pathway of *o*-cresol by heterogeneous culture. Phenol activated sludge. *Water. Res.*, **20**: 477-484.
- 67. Medvedev VA., Davidov VD., 1981.** The influence of isomers on the transformation rate of phenols in Chernozem soil. In: Overcash MR edition. Decomposition of toxic and nontoxic organic compounds in soil. Ann Arbor, Michigan, Ann Arbor Scientific Publishers: 175-181.
- 68. Medvedev VA., Davidov VD., 1981.** The transformation of various coke industry products in Chernozem soil. In: Overcash MR ed. Decomposition of toxic and nontoxic organic compounds in soil. Ann Arbor, Michigan, Ann Arbor Scientific Publishers.
- 69. Merkblatt fur das Arbeiten mit Phenol und Kresolen. G 15. 1972.** Weinheim, Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie: 4.
- 70. Metiche M., 2004.** Environnement : phénomènes de pollution et techniques de protection. Centre Universitaire de Béchar, Algérie.
- 71. Microsoft Corporation., (2007).** Encyclopédie Microsoft Encarta, Redmond, USA.
- 72. 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.

- 73. Nakagawa H., Takeda Y., 1962.** Phenyl hydroxylase. *Biochemica & Biophysica Acta.*, **62**: 423-426.
- 74. Namkoong W., Loehr R.C., Malina J.F., 1988.** Kinetics of phenolic compounds removal in soil. *Hazard Waste Hazard Mater.*, **5 (4)**: 321-328.
- 75. NIOSH., 1978.** Criteria for a recommends standard, Occupational exposure to cresol., Cincinnati, DHEW: 117.
- 76. Norsolor Groupe ORKEM.,** Crésols (Mélanges isomères). Fiche de données de sécurité. Paris-La Défense.
- 77. Palumbo A.V., Pfaender F.K., Paerl H.W., 1988.** Biodegradation of NTA and *m*-cresol in coastal environments. *Environ. Toxicol. Chem.*, **7**: 573-585.
- 78. Pitter P., 1976.** Determination of biological degradability of organic substances. *Water. Res.*, **10**: 231-235.
- 79. Ralston J.R., Vela G.R., 1974.** Medium of detecting phenol degrading bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **37**: 347-351.
- 80. Rodier J., 2005.** L'analyse de l'eau naturelle. 8^{ème} édition. Dunod, Paris: 535-540.
- 81. Ribbons D.W., 1966.** Metabolism of *o*-cresol of *Pseudomonas aeruginosa* strain T1. *J. Gen. Microbiol.*, **64**: 221-231.
- 82. Roberts D.J., Fedorak P.M., Hrudey S.E., 1987.** Comparison of the fates of the methyl carbons of *m*-cresol and *p*-cresol in methanogenic consortia. *Can. J. Microbiol.*, **33**: 335-338.
- 83. Sabljic A., 1987.** The prediction of fish bioconcentration factors of organic pollutants from the molecular connectivity model. *Z Gesamte Hyg Grenzgeb.*, **33**: 493-496.
- 84. Sadtler Index., 1960.** UV spectrum for *m*-cresol (622). Philadelphia: Samuel Sadtler and Sons, Inc.
- 85. Sadtler Index., 1960.** UV spectrum for *o*-cresol (259). Philadelphia: Samuel Sadtler and Sons, Inc.

86. Sadtler Index., 1960. UV spectrum for *p*-cresol (15). Philadelphia: Samuel Sadtler and Sons, Inc.

87. 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., Article in Press.

88. Sax N.I., Lewis R.J., 1987. Hawley's condensed chemical dictionary, 11th edition. New York, Van Nostrand Reinhold Co: 320-321.

89. Shelton DR., Tiedje JM., 1981. Development of test for determining anaerobic biodegradation potential. Washington, DC, US Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances.

90. Shimp R.J., Pfaender F.K., 1987. Effect of adaptation to phenol on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic microbial communities. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 1496-1499.

91. SIDS Initial Assessment Report (SIAR),, 2003. *m*-cresol and *p*-cresol. SIAM **16**: 27-30.

92. Sikkema J., Bont J.A.M., Poolman B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev., **59**: 201-222.

93. Sittig M., 1985. Handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens, 2th edition, Park Ridge, Noyes Data Corp: 263-264.

94. Smith J.H., Mabey W.R., Bohonos N., 1978. Environmental pathways of selected chemicals in freshwater systems. Part II: Laboratory studies. Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC.

95. Smolenski W.J., Suflita J.M., 1987. Biodegradation of cresol isomers in anoxic aquifers. Appl. Environ. Microbiol., **58**: 710-716.

96. Southworth G.R., Keller J.L., 1986. Hydrophobic sorption of polar organics by low organic carbon soils. Water. Air. Soil. Pollut., **28 (3)**: 239-248.

- 97. Stone, A.T., 1987.** Reductive dissolution of manganese (III/IV) oxides by substituted phenols. *Environ. Sci. Technol.*, **15**: 979-988.
- 98. Suflita J.M., Gibson S.A., Beeman R.E., 1988.** Anaerobic biotransformation of pollutant chemicals in aquifers. *J. Ind. Microbiol.*, **3 (3)**: 179-194.
- 99. Suflita J.M., Liang L.N., Saxena A., 1989.** The anaerobic biodegradation of *o*-, *m*-, and *p*-cresol by sulfate-reducing bacterial enrichment cultures obtained from a shallow anoxic aquifer. *J. Ind. Microbiol.*, **4 (4)**: 255-266.
- 100. Swindoll C.M., Aelion C.M., Dobbins D.C., Jiang O., Long S.C., Pfaender F.K., 1988.** Aerobic biodegradation of natural and xenobiotic organic compounds by subsurface microbial communities. *Environ. Toxicol. Chem.*, **7 (4)**: 291-299.
- 101. Tabak H.H., Chambers C.W., Kabler P.W., 1964.** Microbial metabolism of aromatic compounds. I. Decomposition of phenolic compounds and aromatic hydrocarbons by phenol-adapted bacteria. *J. Bacteriol.*, **87**: 910-919.
- 102. Vaillant J.R., 1974.** Perfectionnement et nouveautés pour l'épuration des eaux résiduaires. Eyrolles, Paris: 21-24, 236-237.
- 103. Vincent M., 2003.** Aquaculture Environnement, institut français de l'environnement: 216-220.
- 104. Visser S.A., Lamontagne G., Zoulalian V., Tessier A., 1977.** Bacteria active in the degradation of phenols in polluted waters of the St. Lawrence River. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **6**: 455-469.
- 105. Wang S.J., Loh K.C., 1999.** Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme. Microb. Tech.*, **25**: 177-184.
- 106. Wang Y.T., Suidan M.T., Pfeffer J.T., Najm I., 1988.** Effects of some alkyl phenols on methanogenic degradation of phenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54 (5)**: 1277-1279.
- 107. Wang Y.T., Suidan M.T., Pfeffer J.T., Najm I., 1989.** The effect of concentration of phenols on their batch methanogenesis. *Biotechnol. Bioeng. J.*, **33 (10)**: 1353-1357.

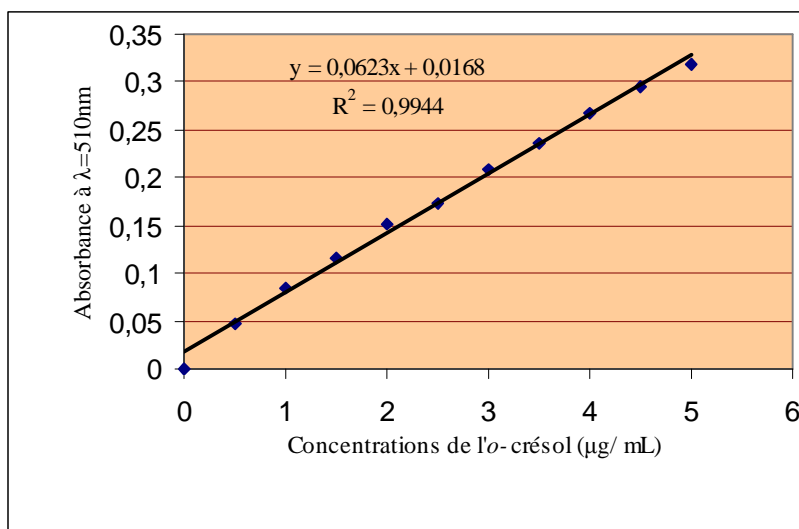
- 108. Watanabe K., Teramoto M., Futamata H., Harayama S., 1998.** Molecular detection, isolation and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4396-4402.
- 109. Weiss G., 1986.** Hazardous chemicals data book, 2th edition. Park Ridge, Noyes Data Corp: 310.
- 110. William L., Roper M.D., 1992.** Toxicological profile for cresols, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Public Health Service.
- 111. Windholz M., Budavini S., Blumetti R.F., Otterbein E.S., 1983.** The Merck index: an encyclopaedia of chemicals, drugs, and biologicals, 10th edition. Rahway, New Jersey, Merck and Co., Inc.
- 112. Yalkowsky S.H., Valvani S.C., Kun W., 1987.** Arizona database of aqueous solutions.
- 113. Zheng Y., Hill D.O., Kuo C.H., 1993.** Destruction of cresols by chemical oxidation. *J. Hazard. Mater.*, **34**: 245-260.
- 114. Zheng Y., Hill D.O., Kuo C.H., 1993.** Rates of ozonation of cresol isomers in aqueous solutions. *Ozone. Sci. Eng.*, **15**: 267-278.

Annexes

Annexe 1 : Courbes étalons des crésols.

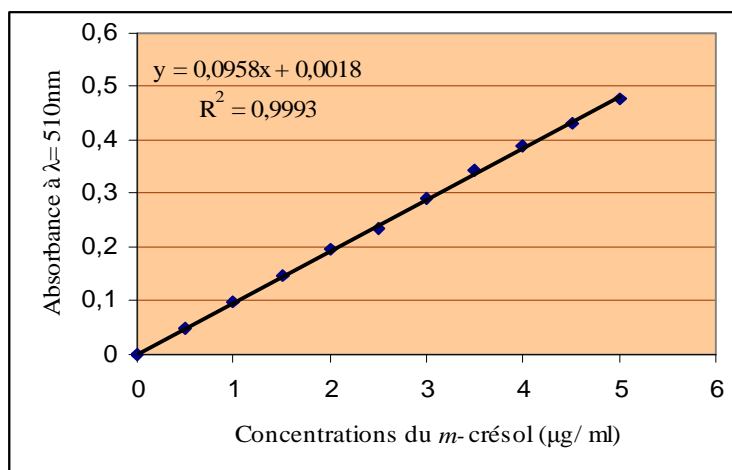
a. Courbe étalon de l'*o*-crésol

Concentrations du <i>o</i> -crésol ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Absorbance à $\lambda=510\text{nm}$	0,000	0,047	0,084	0,116	0,152	0,174	0,209	0,236	0,268	0,294	0,318



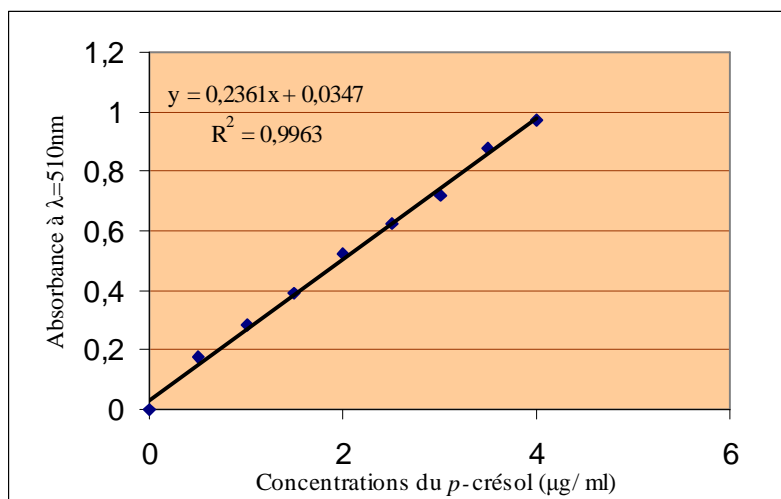
b. Courbe étalon du *m*-crésol

Concentrations du <i>m</i> -crésol ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Absorbance à $\lambda=510\text{nm}$	0,000	0,049	0,100	0,150	0,200	0,236	0,291	0,344	0,391	0,430	0,476



c. Courbe étalon du *p*-crésol

Concentrations du <i>p</i> -crésol (µg/ ml)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Absorbance à λ=510nm	0,000	0,176	0,284	0,390	0,523	0,626	0,718	0,876	0,970



Annexe 2 : Les résultats de mesures des densités optiques (DO) et du pH

Les résultats mentionnés dans les tableaux sont des moyennes de trois répétitions.

Tableau 1 : *o*-crésol

Dil\Tp	0h	2h	6h	18h	24h	72h	7 jours	14 jours	1 mois
10 ⁻⁹	0,164 7,69	0,164 7,68	0,163 7,69	0,156 7,59	0,154 7,66	0,148 7,71	0,114 7,01	0,088 6,83	0,060 6,53
10 ⁻⁸	0,168 7,90	0,168 7,86	0,166 7,76	0,160 7,67	0,159 7,53	0,141 7,62	0,133 7,47	0,079 7,26	0,058 6,82
10 ⁻⁷	0,168 7,88	0,167 7,90	0,166 7,85	0,160 7,60	0,155 7,58	0,143 7,36	0,129 7,38	0,076 6,74	0,048 6,70
10 ⁻⁶	0,168 7,87	0,167 7,85	0,165 7,88	0,159 7,66	0,156 7,30	0,142 7,28	0,138 7,11	0,079 6,74	0,052 6,71
10 ⁻⁵	0,168 7,77	0,168 7,77	0,165 7,75	0,159 7,55	0,155 7,58	0,140 7,13	0,130 7,22	0,069 6,30	0,068 6,28
10 ⁻⁴	0,173 7,84	0,172 7,83	0,172 7,86	0,165 7,61	0,160 7,61	0,139 7,02	0,124 6,60	0,067 6,69	0,068 6,57
10 ⁻³	0,173 7,69	0,172 7,69	0,171 7,58	0,160 7,55	0,157 7,44	0,138 6,87	0,130 6,85	0,069 6,34	0,038 6,85
10 ⁻²	0,179 7,52	0,179 7,54	0,177 7,50	0,170 7,45	0,165 7,20	0,136 6,68	0,120 6,57	0,074 6,87	0,028 6,61
10 ⁻¹	0,178 7,58	0,177 7,59	0,177 7,47	0,170 7,41	0,160 7,51	0,137 6,16	0,117 6,51	0,059 6,26	0,09 6,57
10 ⁰	0,180 7,92	0,179 7,94	0,175 7,89	0,163 7,37	0,159 7,34	0,138 6,16	0,114 6,52	0,057 6,56	0,09 6,65
T	0,143 7,02	0,143 7,90	0,142 7,93	0,136 7,87	0,135 7,57	0,130 7,79	0,127 7,53	0,115 7,02	0,111 7,31

Tableau 2 : m-crésol

Dil\Tp	0h	2h	6h	18h	24h	72h	7 jours	14 jours	1 mois
10 ⁻⁹	0,202 7,71	0,198 8,02	0,197 7,96	0,165 7,89	0,164 7,84	0,144 7,95	0,117 7,02	0,032 6,58	0,092 7,02
10 ⁻⁸	0,202 6,68	0,183 7,61	0,183 7,72	0,166 7,52	0,156 7,44	0,138 7,80	0,123 7,18	0,019 7,40	0,091 7,30
10 ⁻⁷	0,210 7,56	0,201 7,82	0,197 7,73	0,165 7,50	0,165 7,57	0,147 6,90	0,130 6,92	0,048 6,34	0,075 6,67
10 ⁻⁶	0,223 7,56	0,198 7,67	0,182 7,68	0,167 7,65	0,165 7,77	0,143 7,28	0,123 6,96	0,017 6,31	0,071 6,70
10 ⁻⁵	0,223 7,56	0,198 7,67	0,195 7,74	0,173 7,41	0,173 7,27	0,146 6,86	0,122 6,81	0,034 6,27	0,067 6,65
10 ⁻⁴	0,221 7,63	0,193 7,71	0,186 7,73	0,167 7,72	0,167 7,92	0,116 6,59	0,064 6,60	0,045 6,22	0,089 6,86
10 ⁻³	0,219 7,67	0,180 7,79	0,179 7,84	0,166 7,57	0,156 7,81	0,139 6,76	0,011 6,64	0,005 6,27	0,017 6,69
10 ⁻²	0,222 7,71	0,194 7,75	0,172 7,79	0,160 7,66	0,160 7,61	0,119 6,89	0,018 6,3	0,006 6,46	0,010 6,64
10 ⁻¹	0,224 7,70	0,174 7,56	0,173 7,58	0,157 7,19	0,153 7,23	0,104 6,48	0,014 6,64	0,005 6,37	0,022 6,63
10 ⁰	0,232 7,69	0,186 7,67	0,179 7,51	0,162 7,18	0,162 7,17	0,027 6,36	0,009 6,67	0,008 6,49	0,022 6,68
T	0,193 7,02	0,192 7,9	0,191 7,93	0,179 7,83	0,179 7,18	0,163 7,03	0,148 6,67	0,020 6,55	0,079 6,60

Tableau 3 : p-crésol

Dil\Tp	0h	2h	6h	18h	24h	72h	7 jours	14 jours	1 mois
10 ⁻⁹	0,522 7,80	0,518 8,14	0,510 8,05	0,495 8,01	0,450 7,89	0,363 7,62	0,119 6,85	0,059 6,48	0,086 7,03
10 ⁻⁸	0,522 7,98	0,518 8,03	0,511 8,04	0,493 8,12	0,450 7,86	0,360 7,59	0,188 6,88	0,059 6,45	0,088 7,14
10 ⁻⁷	0,523 7,88	0,504 8,02	0,496 7,96	0,485 7,79	0,443 7,49	0,360 7,51	0,180 6,70	0,050 6,54	0,079 6,97
10 ⁻⁶	0,523 7,89	0,505 8,02	0,497 7,84	0,485 7,89	0,440 7,90	0,360 7,86	0,175 7,15	0,048 6,91	0,071 7,08
10 ⁻⁵	0,523 7,77	0,505 7,96	0,493 7,84	0,485 7,90	0,440 7,76	0,353 7,75	0,175 7,07	0,040 6,87	0,067 6,85
10 ⁻⁴	0,524 7,81	0,500 7,98	0,495 7,88	0,473 7,85	0,435 7,80	0,349 7,79	0,169 6,43	0,038 6,21	0,060 6,80
10 ⁻³	0,525 7,97	0,500 8,00	0,495 8,03	0,470 8,04	0,433 7,89	0,345 7,96	0,149 6,95	0,038 6,30	0,069 6,93
10 ⁻²	0,530 7,93	0,498 8,00	0,490 8,00	0,469 7,90	0,433 7,73	0,345 7,40	0,148 6,64	0,037 6,39	0,073 6,92
10 ⁻¹	0,530 7,88	0,497 8,05	0,489 7,93	0,469 7,81	0,430 7,54	0,340 7,11	0,135 6,66	0,037 6,29	0,077 6,95
10 ⁰	0,535 7,94	0,495 7,92	0,485 7,92	0,450 7,88	0,430 7,11	0,328 6,54	0,135 6,85	0,036 6,18	0,090 6,98
T	0,520 7,02	0,520 7,04	0,520 7,03	0,517 7,30	0,500 7,18	0,465 7,53	0,403 7,95	0,350 6,55	0,388 6,95

(Dil) Dilution, (Tp) Temps, (h) Heure, (T) Témoin stérile.

Annexe 3 : Résultats de l'analyse statistique.

Tableaux 1: Analyse de la variance de l'effet « Dilution » sur la biodégradation du *m*-crésol.

a. Entre toutes les dilutions

.Facteur	ddl	MC	F	P
1	9	4374,266	2,965550	0,002479
Erreur	230	1475,027		

b. Entre les dilutions : 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} .

Facteur	ddl	MC	F	P
1	4	402,2411	1,624515	0,173962
Erreur	115	247,6069		

c. Entre les dilutions : 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 .

Facteur	ddl	MC	F	P
1	4	1641,244	0,607318	0,658282
Erreur	115	2702,447		

Tableau 2: Analyse de la variance de l'effet « Dilution » sur la biodégradation de l'*o*-crésol.

.Facteur	ddl	MC	F	P
1	9	238,0349	0,078993	0,999857
Erreur	260	3013,374		

Tableau 3: Analyse de la variance de l'effet « Dilution » sur la biodégradation du *p*-crésol.

.Facteur	ddl	MC	F	P
1	9	340,7294	0,157493	0,997604
Erreur	230	2163,454		

(1) Dilution, (MC) Sommes des carrées moyennes, (ddl) Degrés de liberté, (F) Statistique du test Fischer, (p) Probabilité attachée à la valeur de Fischer.

Tableaux 4 : Test de Student (t) pour des échantillons appariés.

a. *m*-crésol

Variabes	Moyennes	Ec-Type	ddl	Différence	t	P
BD	179,9979	39,99843	23	-10,1965	-4,06960	0,000067
DA	169,8014	48,30579				

b. *o*-crésol

Variabes	Moyennes	Ec-Type	ddl	Différence	t	P
BD	202,9485	68,96183	26	-19,2051	-5,09923	0,00006
DA	183,7456	18,58307				

c. *p*-crésol

Variabes	Moyennes	Ec-Type	ddl	Différence	t	P
BD	158,4163	48,07683	23	-27,2854	-5,75462	0,00007
DA	185,7017	25,92821				

(BD) Biodégradation, **(DA)** Dégradation abiotique, **(ddl)** Degrés de liberté, **(t)** Statistique du test Student, **(p)** Probabilité attachée à la valeur de Student.

Résumé

La capacité de biodégradation de l'*o*-crésol, du *m*-crésol et du *p*-crésol, par le microbiote des eaux usées de la ville de CONSTANTINE, est étudiée en cinétique de temps. Un essai d'identification de microorganismes dominants est également réalisé. Les cultures cinétiques sont menées en fermenteurs miniaturisés, où les différents isomères du crésol sont la seule source de carbone et d'énergie d'un milieu minimum. La cinétique de la biodégradation est suivie pendant 30 jours d'incubation à 30°C, en cultures discontinues, statiques. Le suivi de la concentration des trois isomères dans le milieu est déterminé par spectrométrie.

Les résultats obtenus montrent la capacité des microorganismes à croître en dégradant les crésols. Plus de 90% en moyenne de la concentration initiale du *m*-crésol et 60% en moyenne de la concentration initiale du *p*-crésol, sont décomposés au bout de 14 jours d'incubation. Après 72 heures de latence, 75% de l'*o*-crésol sont dégradés en 30 jours d'incubation. Une dégradation abiotique est également constatée, avec un pourcentage de 41% du *m*-crésol, 25% de l'*o*-crésol, et 35% du *p*-crésol durant les mêmes périodes d'incubation. Cependant, la différence entre la biodégradation et la dégradation abiotique est très significative ($p < 0,05$), pour les trois isomères. La recherche des microorganismes dominants a permis d'identifier deux genres bactériens : *Alcaligenes* et *Pseudomonas*.

Mots clés : Biodégradation de pesticides, *o*-Crésol, *m*-Crésol, *p*-Crésol, Microbiote des eaux usées.

Abstract

Biodegradation of *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol by the total microflora of wastewater of CONSTANTINE is studied. A test of identification of dominant microorganisms is also carried out. The cultures are performed in miniaturized fermentors, using a minimum medium, where cresols are the sole source of carbon and energy. The kinetic of the biodegradation is followed for 30 days of incubation at 30°C, in discontinuous cultures and static mode. The concentration of cresols in the medium is measured by spectrometry.

The obtained results show the capacity of microorganisms to develop by degrading cresols. More than 90% of initial concentration of *m*-cresol and 60% of initial concentration of *p*-cresol are decomposed at the end of 14 days of incubation. After a lag phase of 72 hours, 75% of *o*-cresol are decomposed at 30 days of incubation. An abiotic degradation is also noted, with a percentage of 41%, 25% and 35% of *m*-cresol, *o*-cresol and *p*-cresol respectively, during the same incubation period. However, the difference between the two ways of degradation is very significant ($p < 0.05$).

Research of dominants microorganisms permet to identify two bacterial genus : *Alcaligenes* and *Pseudomonas*.

Key words: Biodegradation of pesticides, *o*-Cresol, *m*-Cresol, *p*-Cresol, Total microflora of wastewater.

ملخص

بغرض دراسة الهدم الحيوي لـ *o*-كريزول، *m*-كريزول، *p*-كريزول، و عزل البكتيريا المسؤولة عن ذلك، أخذت ميكروفلورا المياه المستعملة لمدينة قسنطينة و استعملت لزرع وسط أولي سائل حيث يشكل *o*-كريزول، *m*-كريزول و *p*-كريزول المصدر الوحيد للكربون و الطاقة. تمت عملية الزرع في مخمرات مصغرة، دون رج و بطريقة غير مستمرة. اتبعت حركية الهدم الحيوي للمأكبات الثلاثة لمدة 30 يوم، حيث احتضنت المخمرات في درجة حرارة 30° م و تم قياس تراكيدها بواسطة قياس الكثافة الضوئية.

أظهرت النتائج أن أكثر من 90% من التركيز الأولي لـ *m*-كريزول و 60% من التركيز الأولي لـ *p*-كريزول قد تم هدمها من طرف ميكروبات المياه المستعملة بعد 14 يوم من الحضان. بعد 72 ساعة من الكمون، تم هدم 75% من التركيز الأولي لـ *o*-كريزول بعد 30 يوم من الحضان. لوحظت خلال نفس مدة الحضان عملية هدم غير حيوي بنسبة 41% من تركيز الـ *m*-كريزول، 25% من تركيز الـ *o*-كريزول و 35% من تركيز الـ *p*-كريزول. أكدت الدراسة الإحصائية أن هناك فرق شاسع بين عمليتي الهدم.

سلالات بكتيرية متنوعة المظهر تم عزلها. أظهرت عملية تحديد صنف البكتيريا أنها تنتمي إلى صنف:

Pseudomonas و *Alcaligenes*.

الكلمات المفتاحية:

الهدم الحيوي لمبيد، *o*-كريزول، *m*-كريزول، *p*-كريزول، ميكروفلورا المياه المستعملة.