

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Microbiologie Appliquée et
Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم : الميكروبيولوجيا التطبيقية و
علوم التغذية

Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière: Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Etude du comportement d'un consortium bactérien sélectionné vis-à-vis de la pénicilline G

Membres de Jury

Présidente : Dr. AMIRA Samiya.

Examinateur : Pr. IDOUI Tayeb.

Encadrant : Pr. OULED HADDAR Houria.

Présenté par

M^{elle} : BOUTAGHANE Manal.

M^{elle} : BRIHOUM Rayane.

M^{elle} : YKHELFOUNE Loubna.



Année Universitaire 2021-2022

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

REMERCIEMENTS

Allah Le tout Puissant merci d'être toujours auprès de nous

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre gratitude et nos remerciements pour toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation

Nous tenons tout d'abord à remercier notre encadreur, « Pr. OULED HADDAR Houria » pour son dévouement, et son sérieux : merci pour le temps que vous nous avez accordé, votre patience, vos conseils et vos commentaires constructifs. Merci d'avoir partagé votre savoir avec nous, pour votre accueil chaleureux au niveau du laboratoire de microbiologie, mais avant tout, pour l'exemple que vous êtes pour nous étudiants, et pour tout autre enseignant. Nous avons eu l'immense honneur d'avoir travaillé avec vous.

Nous exprimons notre profond respect et un remerciement particulier à « M^{lle} CHEKIRED Ibtissem » pour sa participation active dans ce travail, son aide précieuse, ses conseils judicieux, ainsi que le temps qu'elle nous a consacré.

Nous exprimons notre profond respect et un remerciement particulier au « Pr. SIFOUR Mohammed » pour son aide précieuse, sa disponibilité et surtout pour sa patience pendant la réalisation de ce travail.

Nous remercions également « Pr. IDOUI Tayeb » et « Dr. AMIRA Samiya » d'avoir accepté de juger et d'examiner ce travail. Nous vous remercions pour le temps que vous avez consacré pour lire le manuscrit.

Nous tenons finalement à remercier toutes les personnes qui ont su se mobiliser autour de nos recherches, et nous apporter leur expertise technique, leur temps, et leurs conseils avisés, notamment aux techniciennes des laboratoires de microbiologie appliquée et sciences alimentaires.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Partie I : synthèse bibliographique	
I. Histoire des produits pharmaceutiques dans l'environnement	2
II. Classes des produits pharmaceutiques retrouvés dans l'environnement	2
II.1. Pénicilline G.....	3
III. Transfert et devenir des produits pharmaceutiques dans l'environnement	5
IV. Impacts et risques des produits pharmaceutiques dans l'environnement	6
IV.1. Impact éco-toxicologique	6
IV.2. Impact toxicologique	7
V. Méthodes d'élimination des produits pharmaceutiques dans l'environnement	8
V.1. Dégradation abiotique	8
V.1.1. Les procédés d'oxydation avancée (POAs)	8
V.1.2. La sorption	9
V.1.3. La photodégradation	10
V.2. Dégradation biotique	11
V.2.1. La biodégradation	11
V.2.2. Bioréacteur à membrane.....	12
V.2.3. Les biofilms	12
Partie II : matériel et méthodes	
I. Matériel	13
I.1. Isolats bactériens	13
I.2. Milieux de culture	13
I.3. Produits chimiques et réactifs pour l'identification partielle des souches	14

I.1.	Appareillage	14
II.	Méthodes.....	15
II.1.	Purification des souches	15
II.2.	Préparation de la solution mère de la PENG	15
II.3.	Etude macroscopique	15
II.4.	conservation des isolats bactériens	15
II.5.	Identification des souches bactériens	15
II.5.1.	Etude microscopique	15
II.5.2.	Tests biochimiques	16
II.6.	Test d'antagonisme sur milieu solide	18
II.7.	Screening des souches bactériennes capables de croître en présence de la PENG comme seule source de carbone et d'énergie	19
II.8.	Test de biodégradation de la pénicilline G par un consortium bactérien	19
II.8.1.	Biodégradation de la pénicilline G comme seule source de carbone	19
II.8.2.	Biodégradation en présence d'une autre source de carbone (Co-métabolisme)	20
II.9.	Estimation de la dégradation de la pénicilline G	20

Partie III : Résultats et discussion

I.	Identification morphologique des isolats bactériens.....	22
I.1.	Observation macroscopique	22
I.2.	Observation microscopique	22
I.3.	Résultats des tests biochimiques	23
II.	Test d'antagonisme sur milieu solide	25
III.	Screening des souches bactériennes capables de croître en présence de la PENG comme seule source de carbone et d'énergie	26
IV.	Test de biodégradation de la PENG par un consortium bactérien en conditions de métabolisme et en co-métabolisme	28
	Conclusion	33
	Références bibliographiques	34

Annexes

Résumé

AINS: Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

BN : Bouillon nutritif

DCO: Demande chimique en oxygène

DO : Densité optique

EE2 : L'hormone 17 α -éthinyloestradiol

IBU : Ibuprofène

GN : Gélose nutritive

LOEC : La concentration minimale avec effet observé

MBR : Bioréacteur à membrane

MMM : Milieu minéral minimum

PA : Paracétamol

PBS : Tampon phosphate salin

PENG : Pénicilline G

POAs : Procédés d'oxydation avancés

PVK : Pénicilline V de potassium

rpm : Révolution par minute

SMT : Sulfaméthazine

SMX : Sulfaméthoxazole

STEP : Stations d'épuration des eaux usées

UV : Ultra-violet

μ : Taux de croissance

Tableau 1. Différentes classes de produits pharmaceutiques trouvés dans l'environnement	3
Tableau 2. Propriétés physico-chimiques de la Pénicilline G	4
Tableau 3. Avantages et enjeux des procédés des POAs	9
Tableau 4. Exemple de la biodégradation de quelques médicaments	11
Tableau 5. Origine des souches bactériennes utilisées	13
Tableau 6. Caractères macroscopiques des cinq souches	22
Tableau 7. Aspect microscopique des souches isolées	23
Tableau 8. Caractéristiques biochimiques des cinq souches	24
Tableau 9. Identification probable du genre et de l'espèce des dix isolats	25
Tableau10. Taux de croissance des cinq souches bactériennes	27

Figure 1. Structure de Pénicilline G	4
Figure 2. métabolites de la Pénicilline G	5
Figure 3. Photolyse directe et photolyse indirecte dans le système aqueux	10
Figure 4. Photographie des résultats de test d'antagonisme des cinq souches sur milieu solide	25
Figure 5. Cinétique de croissance des cinq souches isolées en fonction du temps sur milieu MMM en présence de la PENG à 10 mg. L ⁻¹ à 37°C. (a) : les souches P2, P4, P7. (b) : les souches P19, P22	26
Figure 6. Courbe de croissance des souches bactériennes pures et du consortium durant le test de biodégradation : (a) PENG comme seule source de carbone, (b) PENG + glucose	28
Figure 7. Biodégradation de la PENG à une concentration initiale de 10 mg. L ⁻¹ par les cultures pures (P2, P19, P22) et le consortium en conditions métaboliques	30
Figure 8. Biodégradation de la PENG à une concentration initiale de 10 mg. L ⁻¹ par les cultures pures (P2, P19, P22) et le consortium bactérien en conditions co- métaboliques	31
Figure 9. Biodégradation de la PENG à une concentration initiale de 10mg. L ⁻¹ par le consortium bactérien en conditions métaboliques et co-métaboliques	32

Introduction

Au cours de la dernière décennie, la pollution de l'environnement par les produits pharmaceutiques a de plus en plus suscité l'intérêt des chercheurs en raison de leur distribution mondiale et dans différents compartiments de l'écosystème **(Aissaoui et al., 2017)**.

Les produits pharmaceutiques sont des composés biologiquement actifs avec diverses modes d'action et propriétés physico-chimiques, est utilisés pour diagnostiquer, traiter ou prévenir les maladies chez les humains et les animaux. Lorsqu'ils sont consommés, la plupart de ces composés ne sont pas complètement métabolisés dans le corps et sont excrétés, ils pénètrent donc dans l'environnement à des niveaux allant du ng au µg/L. Ceci constitue une menace sérieuse pour les organismes aquatiques et terrestres **(Aissaoui et al., 2017; Gomes et al., 2017)**. Ces produits provoquent plusieurs effets indésirables assez connus ; tels que la perturbation du système endocrinien dues aux hormones et molécules apparentées, la résistance bactérienne associée aux antibiotiques etc... **(Defarges et al., 2011)**.

Les sources des produits pharmaceutiques dans l'environnement sont différentes, ils arrivent soit directement via les excréments des patients, les activités industrielles et les activités d'élevage (médicaments vétérinaires), soit indirectement via des rejets inappropriés dans les égouts municipaux et les stations d'épuration des eaux usées qui sont incapables d'éliminer ce type de micropolluants. Pour cette raison, plusieurs méthodes ont été développées pour l'élimination de ces produits telles que la photodégradation, l'adsorption, les procédés d'oxydation avancés, mais en raison de la difficulté et le coût de leur application à grande échelle, les chercheurs se sont orientés vers la biodégradation qui pourrait être plus robuste, économique et respecte l'environnement, cette méthode est basée sur l'élimination des micropolluants ou au moins leurs métabolisation à des produits moins toxiques par l'activité métaboliques des microorganismes **(Defarges et al., 2011; Li et Shi, 2016 ; Aissaoui et al., 2017 ; Costa et al., 2019)**.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la biodégradation de la pénicilline G par un consortium bactérien composé de trois souches bactériennes isolées préalablement à partir d'une boue activée de la station d'épuration des eaux usées d'ERABTA (JIJEL) et à partir du sol du centre d'enfouissement technique de la région d'EL AOUANA (JIJEL). La formation du consortium sera précédée d'un test d'antagonisme afin de déterminer si les souches bactériennes sélectionnées sont capables de croître ensemble sans effets inhibiteurs. L'étude comportera également une estimation de la biodégradation de la PENG par ce consortium dans les conditions Métaboliques et co-métaboliques.

Synthèse
bibliographique

I. Histoire des produits pharmaceutiques dans l'environnement

Les produits pharmaceutiques font partie des produits les plus utilisés par l'Homme pour vivre en bonne santé et en mode de vie sain; mais en raison de l'utilisation non contrôlée ainsi que l'élimination inappropriée, plusieurs résidus et métabolites d'origine pharmaceutique ont été trouvés dans différents compartiments de l'environnement depuis 1970 (**Kar et al., 2018**).

En effet, la première détection des produits pharmaceutiques dans l'environnement remonte à 1976 grâce à une collaboration entre les deux chercheurs Hignite et Azarnoff qui ont mis en évidence des traces d'acide salicylique (précurseur de l'aspirine) à une concentration de 28.79 µg/L et d'acide clofibrrique (métabolite actif du clofibrate, un hypolipémiant) à une concentration de 7,09 µg/L dans les eaux usées traitées aux Etats-Unis (**Deblonde, 2013**); leur présence a également été confirmée dans les eaux de surface et souterraines ainsi que dans les tissus des poissons (**Fent et al., 2006; Beek et al., 2016; Desbiolles et al., 2018; Quesada et al., 2019**).

Grâce au développement des méthodes d'analyse physico-chimique, d'autres types de produits pharmaceutiques et leurs résidus ont été détectés à une concentration allant de 0.019 µg/L à 0.30 µg/L dans les eaux potables aux Etats-Unis, au Canada et dans d'autres pays européens (**Sun et al., 2015**).

II. Classes des produits pharmaceutiques retrouvés dans l'environnement

Actuellement plus de 300 produits pharmaceutiques de différentes classes thérapeutiques ont été détectés dans l'environnement (**Mazzelani et al., 2018**). Au sein de ces catégories, les antibiotiques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) représentent la majorité des médicaments présents dans l'environnement, car ils sont couramment utilisés en vente libre et sont considérés comme les plus largement utilisés dans le monde (**Inouss et al., 2015 ; Lai-Cheung-Kit et al., 2019 ; Zoubek et al., 2019**). Les différentes classes de produits pharmaceutiques couramment retrouvés dans l'environnement sont résumées dans le tableau 01.

Tableau 01: Différentes classes de produits pharmaceutiques trouvés dans l'environnement (Madikizela et al., 2018).

Groupe	Produits pharmaceutiques
Antibiotiques	Sulfamethazine, Sulfamethoxazole, Sulphadimethoxine, Sulfadiazine, Pénicilline G, Trimethoprim, Oxytetracycline, Tetracycline
Antidépresseurs	Fluoxetine
Tranquillisants	Meprobamate
Antiépileptiques	Carbamazépine, Dilantin, Primidone
Anti-inflammatoires non stéroïdiens	Ibuprofène, Naproxen, Diclofenac, Ketoprofène
Agents de contraste pour rayons X	Iopromide
Hormones stéroïdiennes	17- <i>a</i> -éthinyloestradiol
Bétabloquants	Propranolol, Atenolol
Antibactériens	Carbadox
Antidiabétiques	Metformin, Gliclazide, Glyburide
Antihistamine	Diphenhydramine
Agents antinéoplasiques	Cyclophosphamide
Anti-démangeaisons	Crotamiton
Agents hypolipémiants	Atorvastatin, Gemfibrozil

II.1. Pénicilline G

Les antibiotiques sont utilisés en médecine vétérinaire et humaine depuis des décennies, ils sont classés selon le type d'organisme qu'ils ciblent (Monteiro et al., 2010 ; Balarak et al., 2016).

La pénicilline G (PENG) ou benzylpénicilline, est l'un des antibiotiques largement utilisés en médecine humaine, animale et agricole en raison de sa forte activité antibactérienne, de son faible coût, de ses caractéristiques non toxiques et non irritantes. La pénicilline G, le premier antibiotique découvert par Alexander Fleming en 1929 (Kumar et al., 2019), est considérée comme la matière de base des pénicillines semi-synthétiques, c'est un acide monocarboxylique faible, ses propriétés physico-chimiques sont montrées dans le tableau 02.

Elle est généralement produite par fermentation aérobie immergée par des souches de *Penicillium chrysogenum* (Balarak et al., 2016). C'est un antibiotique β -lactamine largement utilisé pour traiter les infections bactériennes modérées à sévères, et il possède un anneau β -lactame responsable de son activité biologique (Kumar et al., 2019).

Tableau 02 : Propriétés physico-chimiques de la pénicilline G (Monteiro et al., 2010; Zhang et Dick, 2014; Chavoshan et al., 2020).

Formule chimique	Masse moléculaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau (mg/l)	Log Kow	pKa
$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	334.4	210	1.83	2.75

Il se distingue par une activité antimicrobienne significative; tue les bactéries en se liant à la protéine de liaison à la pénicilline et en l'inactivant, ce qui entraîne une inhibition de la réticulation des brins de peptidoglycane dans la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne (Kumar et al., 2019). La structure chimique de la pénicilline G est montrée dans la figure 01.

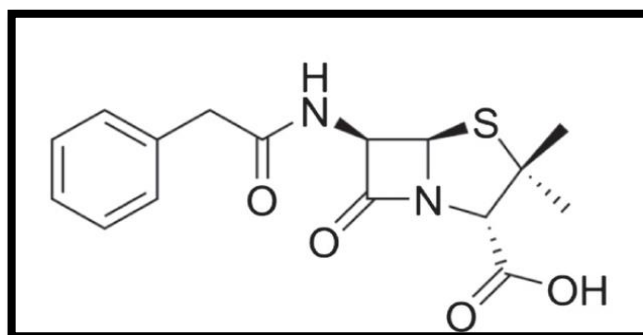


Figure 01 : Structure chimique de la pénicilline G (Zhang et Dick., 2014).

L'anneau β -lactame s'ouvre après l'entrée de la PENG dans le corps humain avec une attaque de nucléophile, ce que conduit à la formation de métabolites de pénicilloyle. Ces derniers sont divisés en deux groupes: déterminants majeurs et déterminants mineurs qui représentent respectivement 95% et 5% des métabolites de la pénicilline, respectivement. Sept métabolites (M) de déterminants mineurs ont été identifiés dans le sérum humain; ils sont constitués de la pénicilline mère, pénicilloate, pénicillamine, penilloate, et d'autres produits chimiques simples de La pénicilline. Cinq métabolites (M3, M4, M5, M6, M7) n'ont pas été détectés dans les études précédentes. La PENG est métabolisée, d'abord en ouvrant le cycle β -lactame quaternaire, un

produit pénicilloate (M1) contenant un groupe acide carboxylique libre est généré, donnant la polarité de la molécule. Deuxièmement, la décarboxylation du pénicilloate entraîne la formation D'un produit penilloate. Après hydroxylation et glucuronidation de métabolite M1, les nouveaux produits M5 et M6 sont obtenus, respectivement. On pense que M3 se forme dans le corps en réagissant avec le glycérol. M4 est dérivé de M3 en réduisant le glycérol. Enfin, la cystine attaque le cycle β -lactame de la pénicilline G pour générer le métabolite M7 (Ho et al., 2011). Les métabolites détectés sont présentés dans la figure 02.

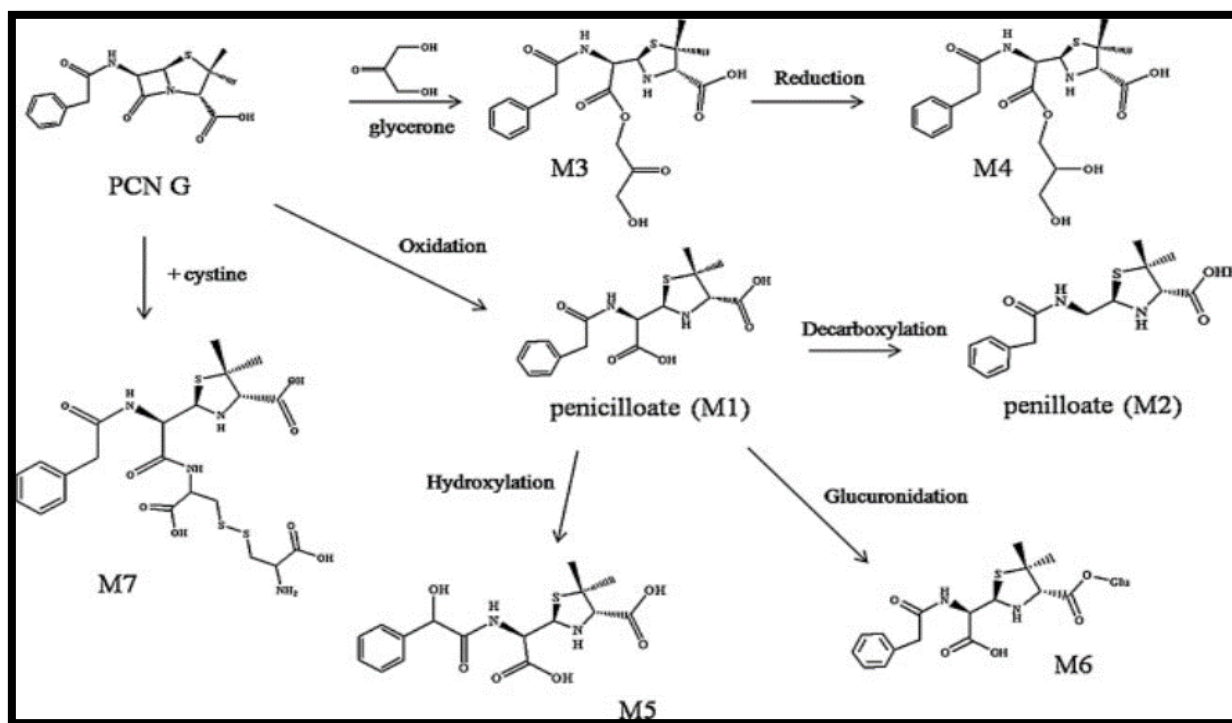


Figure 02 : Les métabolites de la pénicilline G (Ho et al., 2011).

III. Transfert et devenir des produits pharmaceutiques dans l'environnement

Les principales sources de transfert des produits pharmaceutiques dans l'environnement sont la médecine humaine, la médecine vétérinaire et l'industrie pharmaceutique. Dans la médecine humaine, et après passage dans l'organisme, les substances actives contenues dans le médicament sont excrétées sous forme active non altérée ou sous forme de métabolites dans les eaux usées urbaines qui collectent toutes sortes de produits pharmaceutiques provenant des hôpitaux et aussi les médicaments non utilisés qui sont éliminés de façon inadaptée dans les éviers et les toilettes (Parezanović et al., 2019). Les stations d'épuration des eaux usées n'éliminent pas complètement les produits pharmaceutiques: les taux d'élimination oscillent entre 0 % pour certains composés et plus de 90 % pour d'autres molécules (Defarges et al., 2011). Une partie variable des médicaments est rejetée par les effluents des stations d'épuration des eaux usées

dans les rivières (eaux de surface), lorsque ces dernières sont la source d'eau brute, elles affectent la production d'eau potable (**Zwiener et Frimmel, 2003**).

Les médicaments vétérinaires utilisés dans l'élevage sont rejetés dans le sol dans lequel le fumier est utilisé comme engrais. Les résidus de ces médicaments au fil du temps s'accumulent dans le sol ou s'écoulent dans les eaux souterraines ou de surface; ils peuvent également être absorbés par les plantes. Les médicaments vétérinaires utilisés en aquaculture vont directement dans les eaux de surface (**Carter et al., 2014**).

Les émissions des usines pharmaceutiques sont la source la plus importante de pollution de l'environnement, d'ailleurs, ils peuvent entraîner des pics de contamination localisés et affecter les organismes exposés (**Larsson et al., 2007**).

Le devenir des produits pharmaceutiques dans l'environnement dépend de plusieurs phénomènes ; les plus importants sont la photolyse et la biodégradation. Ces produits subissent soit une minéralisation totale ou partielle tels que l'ibuprofène qui est éliminé par biodégradation avec un pourcentage de 90%, tandis que certains produits sont plus résistants à la biodégradation comme la carbamazépine et la ciprofloxacine, soit une transformation donnant lieu à la formation de sous-produits de dégradation, qui peuvent être plus toxiques que le produit initial, par exemple le propranolol qui par photo transformation se transforme en produits plus hydrophiles et plus polaires et cela conduit à une toxicité aiguë (**Parezanović et al., 2019**).

IV. Impacts et risques des produits pharmaceutiques dans l'environnement

L'utilisation mondiale de médicaments à des fins thérapeutiques et préventives est en augmentation accrue, entraînant une pollution de l'environnement par ces molécules. Ces produits sont considérés comme des « polluants émergents » depuis plus de 20 ans (**Miller et al., 2018**). Dans l'environnement, ils ont un impact négatif sur la santé humaine, les animaux et les végétaux (**Naidu et al., 2016**). Ils sont détectés dans les eaux de surface et les sols, où ils affectent les systèmes vivants (**Kar et al., 2018**).

IV.1. Impact éco-toxicologique

L'étude des effets possibles de ces micropolluants sur des organismes non ciblés par la thérapie est aujourd'hui considérée comme un enjeu important et un défi futur pour les chimistes et les scientifiques de l'environnement (**Courtier et al., 2018**). Les cibles principales des produits pharmaceutiques sont les organismes aquatiques; les bactéries, les algues, les crustacés, les poissons qui sont les principaux organismes utilisés dans la recherche éco-toxicologique. A cet effet, l'hormone dite 17 α -éthinyloestradiol (EE2) est considérée comme l'une des classes des

médicaments les plus dangereux dans les milieux aquatiques (**Li et al., 2014; Desbiolles et al., 2018**), elle provoque une féminisation des poissons mâles via la production de la vitellogénine (une protéine normalement synthétisée par les femelles), de plus, l'exposition du vairon, petit poisson (cyprinidé) des eaux douces (*Pimephalespromelas*) à des faibles niveaux d'EE2 tout au long de son cycle de vie cause des effets remarquables sur la reproduction (**Parrott et Blunt, 2005; Forrez et al., 2011; Li et al., 2014**).

Selon **Marques et al., (2004)**, l'aspirine affecte la reproduction de *Daphnia magna*, et *Daphnia longispina* à des concentrations de 1.8 mg/l. Les vautours d'Asie étaient proches de l'extinction en raison de la toxicité aiguë suite à la consommation d'animaux contaminés au diclofénac (**Chen et al., 2021**). Ce dernier induit aussi des altérations histopathologiques (lésions rénales et altérations des branchies) chez la truite arc-en-ciel qui apparaissent au bout de 28 jours d'exposition : LOEC (la concentration minimale avec effet observé) : 5 µg/l (**Schwaiger et al., 2004**).

Le naproxène provoque des effets toxiques à des concentrations variant de 0.33 mg/l pour le crustacé *Ceriodaphniadubia* à 31.82 mg/l pour l'algue *P. subcapitata* (**Isidori et al., 2005**).

IV.2. Impact toxicologique

Dans l'environnement l'être humain peut être exposé à différents produits pharmaceutiques de plusieurs façons, soit en ingérant de l'eau potable, soit en ingérant des aliments contaminés. Les populations sensibles à ces composés sont généralement les enfants, les femmes enceintes et les fœtus (**Daughton, 2008 ; Haguenoer, 2010**).

Les médicaments peuvent affecter non seulement l'eau destinée à la consommation humaine mais également les produits alimentaires. En effet, les sols affectés par les résidus médicamenteux peuvent être contaminés par l'épandage des boues ou l'irrigation et affecteront par la suite les plantes. Les viandes animales, le lait et les produits destinés à la consommation humaine peuvent aussi être contaminés par des antibiotiques et des hormones utilisées à des fins de production ainsi que par des médicaments vétérinaires. Les antibiotiques libérés dans l'environnement peuvent se concentrer dans les chaînes alimentaires et poser des risques pour la santé publique. L'utilisation massive des antibiotiques en élevage fait naître des bactéries résistantes au sein des espèces qui composent la flore intestinale des animaux, et ces bactéries sont transmises à l'Homme par la consommation des aliments contaminés tels que les poissons, les viandes, etc..., ce qui entraîne des perturbations de la flore intestinale normale, des problèmes d'allergie et de toxicité (**Haguenoer, 2010**).

V. Méthodes d'élimination des produits pharmaceutiques dans l'environnement

Pour prévenir l'environnement de toute pollution et tout effet indésirable possible d'être induit par les produits pharmaceutiques, l'élimination de ces derniers est nécessaire (Tran et al., 2009). Cette élimination peut avoir lieu par plusieurs méthodes, y compris les processus d'élimination biotiques par l'action des microorganismes et les processus abiotiques tels que la sorption, la photo-dégradation ...etc. afin d'aboutir à des substances généralement moins toxiques appelées « produits de transformation » ou à une minéralisation dans le cas idéal (Li et Shi, 2016). L'élimination biotique et la sorption sont les plus importantes et les plus mises en jeu (Sipma et al., 2010).

Par ailleurs, les procédés d'oxydation avancée jouent un rôle important dans la dégradation totale ou partielle des produits pharmaceutiques persistants (Ikehata et al., 2006).

V.1. Dégradation abiotique

Elle a pour principe de dégrader les substances polluantes en se basant sur des réactions chimiques (oxydation, hydrolyse) ou physiques (la photo-dégradation) (Omil et al., 2010).

V.1.1. Les procédés d'oxydation avancée (POAs)

Ce terme est défini par les processus qui génèrent des espèces radicalaires très actives, le plus souvent, des radicaux hydroxyles (OH^*) afin d'accélérer la minéralisation des produits organiques récalcitrants en CO_2 et H_2O au moyen du rayonnement UV. Les POAs peuvent être subdivisés en quatre groupes : les procédés d'oxydation chimique en phase homogène ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ et $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$), les procédés photocatalytiques en phase homogène et/ou hétérogène ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, O_3/UV et $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$; TiO_2/UV), les procédés d'oxydation sonochimique et les procédés d'oxydation électrochimique (Zaviska et al., 2009).

Quelques avantages et enjeux des procédés des POAs sont récapitulés dans le tableau 03.

Tableau 03 : Avantages et enjeux des procédés des POAs (Mansour et al., 2011 ; Ahmed et al., 2017)

Procédés	Avantages	Enjeux
Ozonation	<ul style="list-style-type: none"> - Forte affinité aux contaminants émergents en présence de H₂O₂. 	La très faible solubilité de O ₃ dans l'eau: environ 0,1 mM à 293 K et son transfert de masse est un facteur limitant.
Fenton et photo-phenton	<ul style="list-style-type: none"> - Dégradation et Minéralisation des contaminants émergents. - Possible utilisation des Rayons solaires au lieu des UV. - Dégrade les composés organiques persistants. 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficile de traiter de grands volumes d'eau usée. - Le coût associé à la lampe UV artificielle et l'électricité
Photo catalyse (TiO₂)	<ul style="list-style-type: none"> - Fort taux de réaction en utilisant des catalyseurs <p>Coût faible et stabilité chimique et récupération facile du catalyseur TiO₂</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Le manque de connaissance des produits de dégradation générés, Les produits finaux pouvant être plus toxiques que le produit de départ

V.1.2. La sorption

La sorption est l'une des techniques d'élimination des substances polluantes y compris les produits pharmaceutiques lors du traitement des eaux usées (Lucas et al., 2018). Elle comprend deux principaux mécanismes : l'absorption et l'adsorption.

L'absorption consiste à faire pénétrer les micropolluants présents dans la phase aqueuse dans la membrane cellulaire lipophile de la biomasse ou dans la fraction lipidique de la boue en raison de leur hydrophobicité ; quant à l'adsorption, elle résulte des interactions électrostatiques entre les composés chargés positivement et la surface des microorganismes chargée négativement pour retenir les micropolluants sur la surface des solides (Alvarino et al., 2018).

La sorption peut être influencée par plusieurs paramètres tels que le pH, la solubilité des micropolluants dans l'eau et le type de sédiment (Liu et al., 2011).

Plusieurs études ont été réalisées sur la sorption des produits pharmaceutiques, citons l'étude menée par Hiller et al. en 2017 qui ont étudié la sorption de l'ibuprofène (IBU) présent dans le sol en fonction de quelques conditions physico-chimiques (pH ; température) du sol, leur étude a montré que la sorption a augmentée avec la diminution du pH et de la température du sol ; et l'étude menée par Nadir et al. en 2021 qui ont étudié l'efficacité de l'élimination de la

sulfaméthazine (SMT) en tant qu'antibiotique représentatif sur un nouveau charbon actif écologique fourni à partir d'espèces de graines de pastèque en tant qu'adsorbant, ils ont montré que la présence d'adsorbant joue un rôle important en améliorant la sorption.

V.1.3. La photodégradation

Plusieurs expériences ont montré l'efficacité du processus de photodégradation pour la transformation des micropolluants persistants dont les produits pharmaceutiques dans l'eau libre exposée aux rayonnements solaires; cette transformation implique une réaction chimique appelée **photolyse**, lors de laquelle les substances photosensibles sont décomposées par la lumière (Mathon et al., 2017).

Comme montré dans la figure 03, il existe deux types de mécanismes, la photolyse directe qui consiste en une action directe des UV sur les molécules organiques, et la photolyse indirecte qui consiste en l'action d'intermédiaires chimiques très oxydants avec les molécules organiques, créés sous l'action des UV.

Les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens sont parmi les classe les plus polluantes de l'environnement et qui peuvent être photodégradés (Ahmed et al., 2017). Le taux de photodégradation diffère d'un composé à l'autre en fonction de différents facteurs comme montré par les travaux de Rania et al., 2017 Qui a porté sur la photodégradation de la sulfaméthazine, de la sulfaméthoxy-pyridazine, l'amitriptyline et la clomipramine en milieu aqueux.

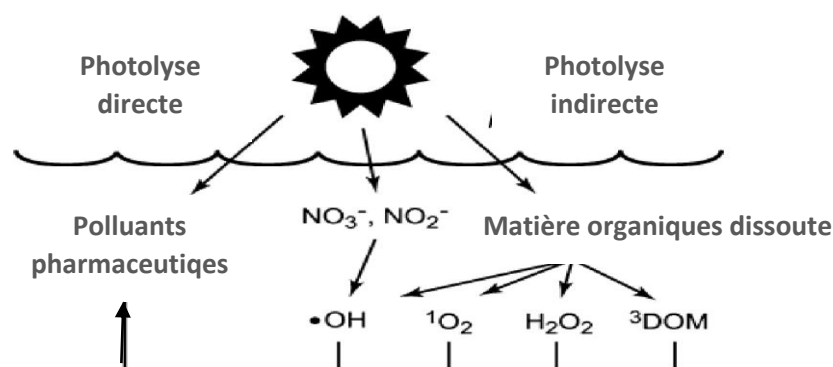


Figure 03. Photolyse directe et photolyse indirecte dans le système aqueux

(Arnold et McNeill., 2007).

V.2. Dégradation biotique

V.2.1. La biodégradation

La biodégradation des composés pharmaceutiques est une option écologique peu coûteuse. Il a été démontré qu'elle a le potentiel d'éliminer les médicaments en les dégradant en produits finaux inoffensifs tels que le CO₂ et le H₂O (Wu et al., 2012). En microbiologie, le terme biodégradation signifie la décomposition de la matière organique en composés plus petits par un mélange de champignons, de bactéries et d'autres organismes. C'est aussi un moyen naturel pour décomposer ou convertir la matière organique en nutriments qui peuvent être utilisés et réutilisés par d'autres organismes (Akpotu et al., 2019).

Tableau 04. Exemple de la biodégradation de quelques médicaments.

Consortium	Médicament à dégrader	Taux d'élimination	Référence
<i>Stenotrophomonas</i> sp. F1 <i>Pseudomonas</i> sp. F2 <i>Pseudomonas</i> sp. Fg-2	Paracétamol	Éliminé 2000mg /L à 100% en 37h	Zhang et al., (2013)
<i>Enterococcus lactis</i> <i>Bacillus paranthracis</i> <i>Citrobacter portucalensis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	diclofenac	90% en 20 jours	Chopra et Kumar, (2020)
<i>Paenarthrobacter ureafaciens</i> YL1 <i>Pseudomonas koreensis</i> YL2	sulfaméthoxazole	Éliminé 100mg/L à 100% en 48h	Yu et al., (2022)
<i>Achromobacter</i> <i>Bacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Ochrobactrum</i> <i>Enterococcus</i>	ciprofloxacine	61,4% en 14 jours	Feng et al., (2019)
<i>Raoultella</i> sp. XY-1 <i>Pandoraea</i> sp. XY-2.	tétracycline	81,72% en 12 jours	Wu et al., (2020)

V.2.2. Bioréacteur à membrane

Le bioréacteur à membrane (MBR) est une technologie récente pour le traitement des eaux usées qui contiennent des micropolluants notamment les produits pharmaceutiques (**Goswami et al., 2018**).

Certains produits pharmaceutiques peuvent être bien éliminés tandis que d'autres, ils sont mal dégradés dans le MBR. L'efficacité du traitement avec le MBR est supérieure à celle des autres systèmes biologiques car l'abondance des micro-organismes près de la surface de la membrane assure une élimination complète des contaminants avant que les eaux usées n'entrent et ne soient filtrées à travers la membrane (**Ahmed et al., 2017; Goswami et al., 2018**).

Dans une étude de **Ahmed et al., (2017)**; les antibiotiques, (azithromycine, clarithromycine, érythromycine, ofloxacine et sulfaméthaxazole), les analgésiques (carbamazépine, citalopram, ibuprofène, lorazépane, métronidazole, préimidone et trazodone) et les anti-inflammatoires (acétaminophène) ont été éliminés par la population microbienne d'un MBR à 75–95 %.

V.2.3. Les biofilms

Les communautés bactériennes sont capables de métaboliser et minéraliser les produits pharmaceutiques. Les biofilms bactériens sont largement utilisés dans la bioremediation pour éliminer les contaminants (**Edwards et Kjellerup, 2013**).

Les biofilms sont des agrégats organisés de micro-organismes qui vivent dans une matrice de matériaux extracellulaires polymériques liée à des surfaces biotiques ou abiotiques (**Yin et al., 2019**). Leur structure offre à la communauté des biofilms de nombreux avantages, les plus importants sont la capacité d'échanger des nutriments et des gènes entre les microorganismes du biofilm. La résolution de la structure des biofilms et les caractéristiques structurelles et métaboliques font de ces communautés des acteurs importants dans les solutions de remédiation par biofilm et de surveillance des écosystèmes (**Edwards et Kjellerup, 2013**).

Le procédé conventionnel des boues activées est couramment utilisé pour éliminer les produits pharmaceutiques des eaux usées, mais l'efficacité de leur élimination est très variable en fonction de plusieurs facteurs, tels que la composition des produits, la saisonnalité et les procédés de traitement, néanmoins l'utilisation des réacteurs à biofilms peut résoudre ces problèmes et augmenter ainsi l'efficacité de l'éliminations des produits pharmaceutiques (**Chen et al., 2021**).

*Matériel et
méthodes*

L'intégralité de notre travail a été réalisée au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de JIJEL, durant la période Mai -Juin de l'année universitaire 2021/2022.

I. Matériel

I.1. Isolats bactériens

Nous avons utilisé dans notre travail cinq isolats bactériens qui étaient isolées à partir de la boue activée de la station d'épuration des eaux usées d'ERABTA (JIJEL) et le sol du centre d'enfouissement technique d'El AOUANA (JIJEL) (**tableau 5**)

Tableau 5. Origine des souches bactériennes utilisées

Isolat	Origine
P2	boue activée
P4	boue activée
P7	boue activée
P19	centre d'enfouissement
P22	centre d'enfouissement

L'isolement a été préalablement réalisé dans le Laboratoire de Toxicologie Moléculaire de l'Université de Jijel par M^{elle} Chekired Ibtissem.

I.2. Milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés sont

- Le milieu minéral minimum (MMM) préparé au laboratoire, il contient la composition suivante :
K₂HPO₄ (1.60 g/L), KH₂PO₄ (0.40 g/L), MgSO₄ .7H₂O (0.20 g/L), CaCl₂.2H₂O (0.03 g/L), FeCl₃ .6H₂O (0.02 g/L), NH₄NO₃ (0.50g/L), extrait de levure (0.50g/L) et 1000 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 7.0± 0.2 et l'autoclavage a été effectué à une température de 120°C pendant 15 minutes (**Wang et al., 2020**).
- Gélose nutritive (GN) déshydratée ou prête à l'emploi (établissement HARKOUK)
- Gélose TSI (Institut Pasteur-Alger)
- Bouillon nutritif (BN) déshydraté ou prêt à l'emploi (établissement HARKOUK, BioKar®)
- Bouillon nitrate (Institut Pasteur-Alger)
- Milieu mannitol mobilité (Ideal Labo)

- Milieu MEVAG (Ideal Labo)
- Milieu citrate de Simmons (Ideal Labo)
- Milieu Clark et Lubs (Institut Pasteur-Alger)
- Milieu urée-Indole (Institut Pasteur-Alger)

I.3. Produits chimiques et réactifs pour l'identification partielle des souches

Durant notre étude, les tests de biodégradation ont été basés sur la pénicilline G le principe actif de la pénicilline pure (Sandoz), ce dernier a été fourni par le groupe industriel SAIDAL, Algérie, sous forme d'une poudre blanche.

Les autres produits chimiques utilisés sont :

- Eau distillée stérile
- Eau physiologique stérile (NaCl 9‰)
- Tampon phosphate salin (PBS)
- Hydroxyde de sodium (NaOH)
- Réactif de Kovac's
- Réactifs de Vogues Proskauer 1 et 2 (VP1 et VP2)
- Réactifs de nitrate réductase I et II (NR I et NR II)
- Rouge de méthyl
- Poudre de zinc
- Méthanol (SIGMA-ALDRICH)
- Eau oxygénée (H₂O₂)
- Violet de gentiane
- Fushine
- Lugol
- Huile de vaseline
- Huile à immersion

I.4. Appareillage

- Autoclave
- Bain-marie
- Balance (KERN)
- Balance analytique (KERN ALS220-4N)
- Bec Bunsen
- Centrifugeuse (Hettich ZENTRIFUGEN)
- Etuve (Memmert)
- Microscope optique (Motic)

- Microfiltres(iSOLAB PTFE 0.22 μ m)
- Réfrigérateur
- pH mètre (Hanna Instruments)
- Plaque chauffante agitatrice
- Etuve agitatrice (INFORS HT Ecotron)
- Spectrophotomètre (SPECORD® 50)

II. Méthodes

II.1. Purification des souches

La pureté des souches a été vérifiée sur gélose nutritive à partir d'une culture jeune dans le bouillon nutritif. L'incubation était faite à 37°C pendant 24h, les souches sont dites pures si on obtient des colonies homogènes de même forme, même taille et même couleur.

II.2. Préparation de la solution mère de la PENG

La solution mère de la PENG a été préparée dans l'eau distillée stérile pour donner une concentration finale de 1 mg/ml et stérilisée par un microfiltre (iSOLAB PTFE 0.22 μ m). La solution était, par la suite, bien conservée dans l'obscurité à 5°C.

II.3. Etude macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies vues à l'œil nu est le premier critère d'identification, il permet de distinguer les bactéries les unes des autres selon les critères : forme de la colonie, taille, couleur, opacité, contour, aspect extérieur, transparence et aspect de surface.

II.4. Conservation des isolats bactériens

Les isolats bactériens revifiés et purifiés ont été conservés dans des tubes à essai contenant la GN inclinée. Les bactéries ont étéensemencées sur la pente par stries. Après incubation à 37°C les tubes sont placés dans un réfrigérateur à 4°C.

II.5. Identification des isolats bactériens

L'identification des isolats bactériens était basée sur les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques.

II.5.1. Etude microscopique

La coloration de Gram est une coloration différentielle, elle permet de distinguer les bactéries et de les classer en Gram positif ou Gram négatif.

Après préparation du frottis, il a été recouvert de violet de gentiane et laissé pendant 1 minute. L'eau a été ajoutée pour éliminer l'excès de colorant en veillant à ne pas détacher le frottis. Après, ce dernier a été recouvert de quelques gouttes de lugol pendant 30 s, puis rincé à l'eau.

L'alcool a été ensuite ajouté au frottis goutte à goutte jusqu'à ce que le violet de gentiane disparaisse.

Enfin, la fuschine a été ajoutée puis laissée pendant 1 min. La lame a été ensuite rincée à l'eau et séchée à l'air.

Après avoir recouvert le frottis par l'huile à immersion, l'objectif X100 a été choisi pour effectuer les observations.

II.5.2. Tests biochimiques

Les tests biochimiques suivants ont été réalisés selon **Tork et al., (2010)**

➤ Recherche de la catalase

Sur une lame propre, une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes a été déposée et émulsionnée avec un peu de la colonie. La décomposition de l'eau oxygénée se traduit par un dégagement de bulles de gaz selon la réaction suivante:



➤ Recherche de l'oxydase

Le test de l'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase qui est présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes.

Sur une lame un disque à oxydase a été déposé et à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie a été étalée sur le disque.

Une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque ce qui signifie que le test oxydase est positif.

➤ Recherche de la mobilité/ fermentation du mannitol

Le milieu mannitol mobilité est une gélose semi molle, utilisé pour étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries.

Les résultats ont été obtenus après 24 heures d'incubation à 37°C.

La fermentation du mannitol se traduit par un virage du milieu au jaune. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la pique d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement.

➤ Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons. La pente a étéensemencée par une strie centrale et longitudinale d'une culture pure et fraîche. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h.

Une culture bactérienne abondante avec bleuissement du milieu démontre l'utilisation du citrate.

➤ Recherche de la nitrate réductase

La nitrate réductase est une enzyme localisée dans la membrane plasmique bactérienne.

Le bouillon nitraté a été ensemencé et incubé à 37°C pendant 24 h. Quelques gouttes de réactif NRI et NRII ont été ajoutées après incubation.

- Une coloration rouge signale la présence de nitrites dans le milieu, donc nitrate réductase positive.
- S'il n'y a pas de changement de couleur, on ajoute la poudre de zinc pour jouer le même rôle que la nitrate réductase vis-à-vis des nitrates:
- La présence d'une couleur rouge indique une réaction négative.
- L'absence de la couleur rouge signifie que la bactérie est nitrate réductase positive.

➤ **Mise en évidence de la production d'acides mixtes et d'acétyl-méthyl-carbinol (acétoïne)**

Ces tests ont été effectués dans le bouillon Clark et Lubs. Deux tubes de ce dernier ont été inoculés par une goutte d'une suspension trouble de bactéries.

Après 24h d'incubation 37°C, chaque tube sert à révéler une des 2 voies :

- Voie des acides mixtes : Addition d'une goutte de rouge de méthyl (RM).
- Voie Butylène-Glycolique : l'ajout de d'une goutte de la solution alcoolique d' α -naphthol (VP1) et une goutte d'une solution aqueuse de soude à 16% (VP2).

L'apparition d'une coloration rose cerise pour les deux tests indique un résultat positif.

➤ **Mise en évidence de l'utilisation du glucose, du lactose et de la production d'H₂S**

Ce test est réalisé sur le milieu TSI. Nous avons ensemencé la surface de la pente de la gélose par stries serrées et le culot par piqure centrale. La lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C :

- une coloration jaune du culot indique une fermentation du glucose.
- la pente inclinée est jaune ceci indique que le lactose/saccharose est fermenté.
- un décollement de la gélose signifie une production du gaz.
- une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqure indique la formation d'H₂S.

➤ **Etude de la voie d'attaque de glucose**

Le milieu MEVAG permet de déterminer le type de métabolisme glucidique (fermentaire ou oxydative).

Deux tubes de milieu MEVAG ont été utilisés, l'ensemencement a été effectué par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur, sur l'un on ajoute l'huile de vaseline pour créer l'anaérobiose.

L'incubation a été faite à 37°C pendant 24h, bouchon dévissé.

- Si les deux tubes sont jaunes donc acidification dans les deux tubes: la bactérie a un **métabolisme fermentatif et oxydatif du glucose**.
- Si dans le tube anaérobie, il n'y a pas d'acidification et dans le tube aérobie il y a une acidification modérée, généralement le haut du tube est jaune et le reste inchangé on parle donc d'un **métabolisme oxydatif**.
- Si le tube avec l'huile seulement est jaune, il y a acidification il s'agit donc d'un **métabolisme fermentatif**.
- Si les deux tubes restent inchangés: le glucose n'est pas fermenté (**métabolisme inerte**).
- Si le haut du tube est bleu, les bactéries sont inertes au glucose il y a donc utilisation des peptides comme source d'énergie.

➤ **Recherche de l'uréase, l'indole et la tryptophane désaminase**

Le **milieu Urée Indole** permet la mise en évidence de l'uréase, de la tryptophane désaminase et de la production d'indole.

Quelques gouttes de solution bactérienne ont été délivrées dans trois tubes contenant le milieu Urée Indole, incubation à 37°C pendant 24h.

Les résultats se traduisent par des virages colorés spontanés pour la recherche de l'uréase ou détectés par l'ajout de réactifs TDA et Kovac's pour la recherche de la tryptophane désaminase et l'indole, respectivement.

➤ **Teste ONPG**

La β -galactosidase est une enzyme qui intervient dans le métabolisme du lactose.

Ce test consiste à faire une suspension dense en eau stérile, puis déposer un disque d'ONPG et placer en bain marie à 37°C, la lecture est faite après 30 minutes.

L'apparition d'une coloration jaune indique que le test ONPG est positif.

II.6. Test d'antagonisme sur milieu solide

Avant de lancer le test de la biodégradation de la PENG sur milieu liquide, les bactéries sélectionnées pour former un consortium ont été testées les unes contre les autres pour leur compatibilité par la méthode des stries croisées afin de déterminer si les cinq souches bactériennes (P2, P4, P7, P19, P22) sont capables de croître ensemble sans effets inhibiteurs. A l'aide d'un écouvillon stérile, les cultures jeunes des isolats bactériens ont été striées verticalement et horizontalement les uns aux autres sur une gélose nutritive déjà coulée et refroidie dans une boîte de Pétri. L'incubation a été faite à 37°C/24h. L'incompatibilité (l'effet

antagonistique) dessouches se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des points de croisement de chaque deux souches (Hadi et al., 2021).

II.7. Screening des souches bactériennes capables de croître en présence de la PENG comme seule source de carbone et d'énergie

C'est un test préliminaire qui a été réalisé dans le but de sélectionner les isolats bactériens les plus performants qui peuvent se développer dans un MMM où la PENG est la seule source de carbone et d'énergie.

Pour la préparation de l'inoculum une colonie de chaque isolat a été ensemencée dans un flacon de 200ml contenant 10ml de BN. Après 24h d'incubation à 37°C les cultures ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 10 min. Le lavage du culot a été fait par la solution PBS. Une deuxième centrifugation a été réalisée pendant 10 min à 6000 rpm. Le culot était ensuite suspendu dans 1ml de la solution PBS (DO= 0.3) et bien agité par le vortex.

Un volume de 10% de l'inoculum de chaque isolat bactérien a été inoculé dans des erlenmeyers stériles contenant 20 ml de MMM et additionnés de 200 µl de la solution mère de la PENG (concentration finale 10 mg/l) comme seule source de carbone et d'énergie ; les erlenmeyers ont été couverts par du papier aluminium pour éviter l'effet de la photodégradation. Puis incubés dans l'agitateur-incubateur à 37°C /150 rpm et la cinétique de croissance bactérienne a été suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm chaque 24h pendant 4 jours (Žur et al., 2018).

➤ Calcul du taux de croissance

Le taux de croissance a été calculé par l'équation suivante (Wei et al., 2009)

$$\text{Taux de croissance } (\mu) = \frac{1}{DO_0} \times \frac{DO_t - DO_0}{T_t - T_0}$$

μ : le taux de croissance.

DO_t : densité optique dans une valeur du temps.

DO_0 : densité optique du temps initial.

T_t : le temps après l'incubation.

T_0 : le temps initial.

II.8. Test de biodégradation de la pénicilline G par un consortium bactérien

II.8.1. Biodégradation de la pénicilline G comme seule source de carbone

Dans cette expérience, nous avons utilisé trois souches bactériennes P2, P19 et P22.

Les cultures jeunes de ces souches ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 10 min pour récupérer les cellules. Les culots ont été lavés avec du PBS et une deuxième centrifugation a été faite à 60000

rpm pendant 10 min. Les culots étaient ensuite suspendus dans 1 ml de la solution PBS (DO = 0.3) et bien agité par le vortex.

Nous avons utilisé quatre erlenmeyers de 100 ml. Dans des conditions d'asepsie totale et dans trois erlenmeyers on ajoute un volume de 38 ml de MMM contenant 2 ml de la suspension bactérienne de chaque souche testée.

Et dans le dernier erlenmeyer nous avons ajouté 38 ml de MMM contenant 2 ml d'une culture bactérienne mixte (P2, P19, P22) de 0,6 ml pour chaque souche, La pénicilline G a été ajoutée au milieu à une concentration finale de 10 mg /L en tant que source unique de carbone organique.

Les erlenmeyers ont été couverts avec du papier aluminium pour éliminer l'effet de la photodégradation et fermés par des bouchons en coton couverts de gaze pour assurer l'aération.

L'incubation a été faite dans l'agitateur-incubateur à 37°C sous agitation à 150 rpm. Au cours de l'incubation, la croissance bactérienne a été estimée par mesure de la DO à 600 nm pendant quatre jours (Aissaoui et al., 2017).

II.8.2. Biodégradation en présence d'une autre source de carbone (co-métabolisme)

La deuxième étape du test de biodégradation de la pénicilline G a été réalisée en condition de co-métabolisme, les mêmes étapes et les mêmes composants du test II.9.1 sont utilisés avec addition d'une deuxième source de carbone qui est le glucose à une concentration de 50 mg/L (Aissaoui et al., 2017).

II.9. Estimation de la dégradation de la pénicilline G

La dégradation de la pénicilline G a été suivie par spectrophotométrie UV-Visible à une longueur d'onde de 270 nm. Pour estimer la concentration de la pénicilline G dégradée, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage, cette courbe a été faite avec différentes concentrations de pénicilline G (1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L et 8 mg/L) dont la densité optique est mesurée.

Les échantillons de (2 ml) prélevés des expériences précédentes ont été centrifugés pendant 20 min à 14000 rpm afin d'obtenir un surnageant exempt de cellules microbiennes. Les surnageants sont récupérés et filtrés en utilisant des micro-filtres (0,22 µm). Cette opération est faite pendant quatre temps différents (le temps 0, 24h, 48h et 72h). Le taux de dégradation Y % a été calculé comme indiqué dans la formule suivante (Berkani et al., 2022)

$$y = \frac{C_i}{C_0} \times 100$$

C_i : la concentration mesurée à T

C_0 : la concentration initiale à T_0



Résultats et discussion

I. Identification morphologique des isolats bactériens

I.1. Observation macroscopique

Dans notre collection de bactéries, le type de colonies dominant se caractérise par une forme ronde, une taille grande, un aspect aplati et lisse, une couleur crème, un contour irrégulier et une consistance crémeuse.

Les caractères culturels et la morphologie des colonies bactériennes sont présentés dans le **tableau 6** et **l'annexe 3**

Tableau 6. Caractères macroscopiques des cinq isolats bactériens.

Souches	P2	P4	P7	P19	P22
Forme de la colonie	Ronde	Ronde	Ronde	Ronde	Ronde
Taille	Grande	Petite	Grande	Grande	Grande
Couleur	Crème	Crème	Crème	Crème	Crème
Contour	Régulière	Irrégulière	Irrégulière	Régulière	Irrégulière
Élévation	Aplati	Aplati	Aplati	Aplati	Aplati
Opacité	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque	Opaque
Consistance	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse
Aspect	Lisse	Lisse	Lisse	Lisse	Lisse

I.2. Observation microscopique

L'observation se fait en lumière blanche, éclairage direct de la préparation (grossissement : objectif x100). Les résultats de la coloration de Gram ont montré que les cinq souches sont à Gram positif, elles sont apparues sous forme de bacille (**tableau 7 et annexe3**).

Tableau 7. Aspect microscopique des isolats bactériens.

Souches	Gram	Forme cellulaire	mode de regroupement	Spores
P2	+	Bacille	Isolés	Terminal non déformante
P4	+	Bacille	Isolés	Terminal non déformante
P7	+	Bacille	En chaînette	Terminal non déformante
P19	+	Bacille	En palissade	Terminal non déformante
P22	+	Bacille	Diplobacille	Terminal non déformante

Non déformante : observation microscopique.

I.3. Résultats des tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sur tous les isolats ont montré que toutes les bactéries avaient des activités positives d'oxydase et de catalase et étaient capables de fermenter le mannitol. Les isolats P2, P4 et P19 sont mobiles, tandis que les autres sont immobiles.

Tous les isolats étaient positifs à la nitrate réductase, positifs au MR et négatifs au test VP.

Pour les autres tests les résultats sont montrés dans le **tableau 8**.

Selon les résultats des tests biochimiques réalisés, on estime la probabilité d'appartenance aux genres et espèces de chaque isolat bactérien. Mais cette identification reste présomptive et non confirmative.

Tableau 8. Caractéristiques biochimiques des cinq isolats bactériens.

Souches	P2	P4	P7	P19	P22
Tests					
Catalase	+	+	+	+	+
Oxydase	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-
Citrate	-	+	+	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+
Mobilité	+	+	-	+	-
Nitrate réductase	+	+	+	+	+
RM	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-
MEVAG					
Ouverte	+	+	+	+	+
Fermé	+	+	+	+	+
TSI :					
Glucose	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-
H₂S	-	-	-	-	-
GAZ	-	-	-	-	-

+ : positive, - : négative.

D'après une comparaison des caractères étudiés avec ceux des Genres bactériens publiés dans la seconde édition du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ». Nous avons pu assimiler que tous les isolats sont du genre *Bacillus*. L'identification probable du genre et de l'espèce de nos isolats est mentionnée dans **le tableau 9**.

Tableau 9. Identification probable du genre et de l'espèce des cinq isolats.

Souches	Identification
P2	<i>Bacillus</i> sp
P4	<i>Bacillus</i> sp
P7	<i>Bacillus</i> sp
P19	<i>Bacillus</i> sp
P22	<i>Bacillus</i> sp

II. Test d'antagonisme sur milieu solide

Ce test a été réalisé dans le but d'évaluer la capacité des cinq souches bactériennes de croître ensemble avec succès sans effet inhibiteur.

Comme les résultats obtenus le montrent (**figure 04**), il n'existe pas d'inhibition entre les cinq souches vu qu'aucune zone d'inhibition n'est apparue après le temps d'incubation ; les souches qui ont été préalablement isolées à partir de la boue activée de la station d'épuration des eaux usées et du sol du centre d'enfouissement technique peuvent interagir de manière synergique et se développent en consortium probablement par une coopération métabolique. Ce consortium bactérien permettra une meilleure optimisation de la biodégradation de la pénicilline G.

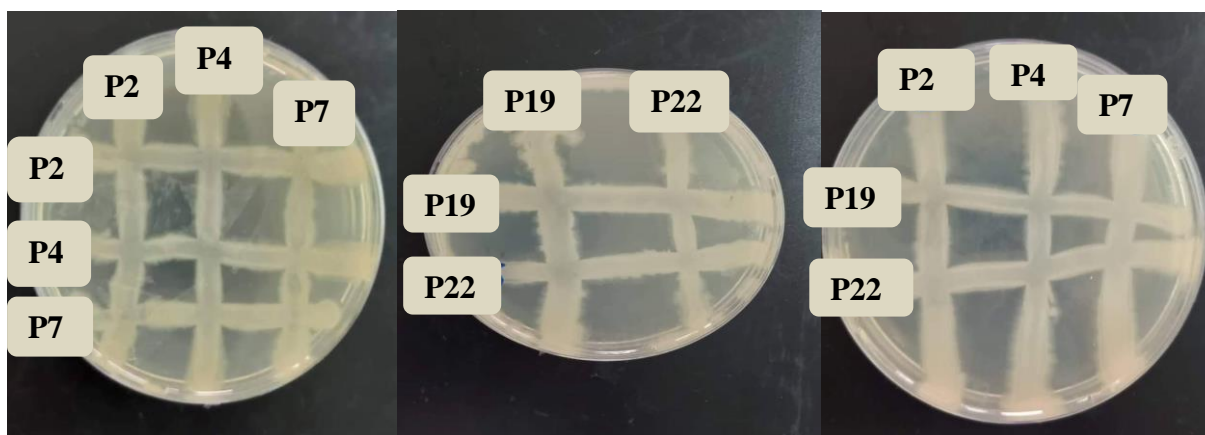


Figure 04. Test d'antagonisme des souches (P2, P4, P7, P19 et P22) sur gélose nutritive.

Nos résultats sont pareils à ceux obtenus par **Kannan et ses collaborateurs (2021)** qui ont montré l'absence d'antagonisme entre les bactéries du sol appartenant au genre *Bacillus* (*B.*

velezensis, *B. subtilis*, *B. paralicheniformis*) ; de même pour Hadi et al., (2021) qui ont constaté la présence de réaction synergétique entre *Staphylococcus arlettae* et *Bacillus cereus*.

III. Screening des souches bactériennes capables de croître en présence de la PENG comme seule source de carbone et d'énergie

Ce test a été conçu pour choisir parmi les isolats bactériens purs ceux qui sont capables de résister et croître à une concentration finale de 10 mg/ml de la PENG. La DO a été mesurée pour les cinq souches à 600 nm chaque 24h pendant quatre jours et les résultats sont illustrés dans la figure 05.

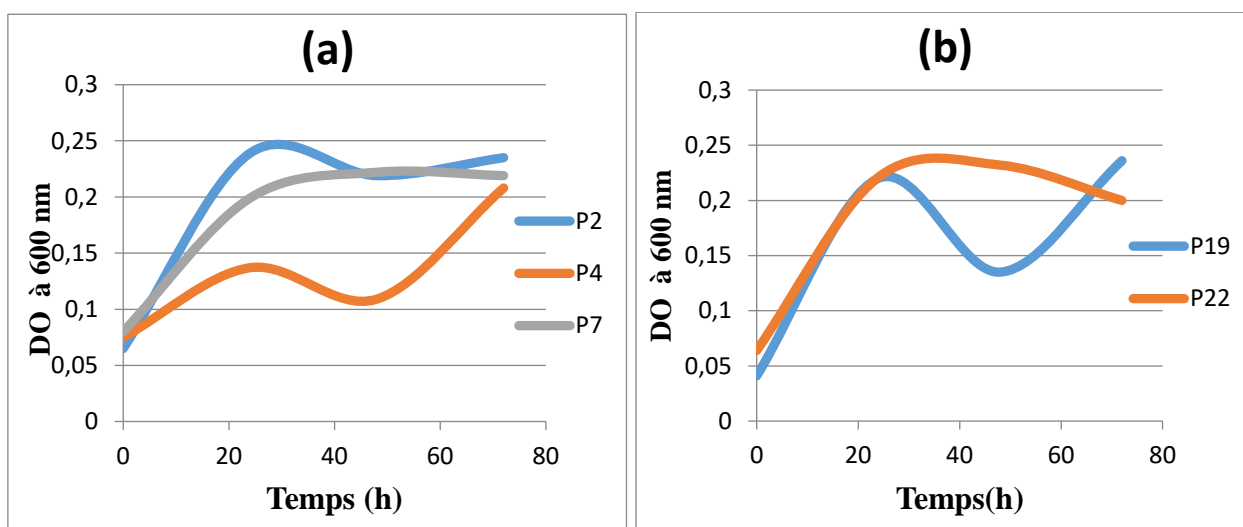


Figure 05. Cinétique de croissance des cinq souches isolées en fonction du temps sur milieu MMM en présence de la PENG à 10 mg. L⁻¹ à 37°C.

(a) : les souches P2, P4, P7.

(b) : les souches P19, P22.

Comme montré dans la figure 05 et l'annexe4, la DO est très faible pour toutes les souches bactériennes au T0 avec des DO entre 0.041 et 0.08, la multiplication des isolats débute dès les premières heures d'incubation avec des valeurs de DO allant de 0.04 à 0.329.

Dans les premiers temps, une multiplication croissante a été remarquée chez toutes les souches avec l'absence de phase de latence ce qui peut être justifié par l'adaptation des souches à l'antibiotique dans la phase d'enrichissement.

La multiplication se poursuit toutes les 24h durant incubation pour les cinq isolats jusqu'à atteindre son maximum pour la souche P2, cela peut être dû à l'utilisation de la PENG comme seule source de carbone grâce à une machinerie enzymatique qui été probablement induite lors la phase d'adaptation.

Après 24 h, les souches P7 et P22 (qui ont probablement un temps de croissance plus long) continuent à croître lentement puis P7 se stabilise et P22 atteint la phase de déclin; le

ralentissement de la croissance remarquable pour les souches P2, P4, P19 peut être expliqué par l'accumulation des dérivés toxiques produits de la métabolisation du substrat dans le milieu, déficience des nutriments

dans le milieu minimum ou probablement une phase d'adaptation aux nouveaux métabolites accumulés dans le milieu.

Après 48h, la DO augmente sauf pour P7 et P22, cette augmentation peut être due à la dégradation des métabolites issus de la biodégradation de la PENG accumulés dans le milieu et leur utilisation comme substrats.

Après avoir réalisé ce test, nous avons constaté que les cinq souches sont aptes de croître et résister à une concentration finale de 10 mg/L de la PENG et peuvent probablement la biodégrader et/ou la minéraliser avec différents taux, dont les souches P2, P7, P22 identifiés comme *Bacillus sp P2*, *Bacillus sp P19* et *Bacillus sp P22*, respectivement, étaient les plus performantes et les plus stables en présence de la PENG avec un taux de croissance de 0.0334 h^{-1} , 0.0339 h^{-1} et

0.0296 h^{-1} , respectivement (**tableau 9**). Pour cela et selon les résultats du test d'antagonisme elles ont été choisies pour former notre consortium bactérien.

Nos résultats sont proches de ceux obtenus par **Yang et al., (2019)** qui ont montré que deux souches isolées du sol et criblées par la méthode classique de criblage bactérien appartenant au genre *Bacillus*, notamment *B. cereus* et *B. pumilus* sont capables d'utiliser la pénicilline V potassium (PVK) à une concentration initiale de $100 \mu\text{g. L}^{-1}$ comme seule source de carbone et d'énergie.

Une autre étude a montré que *Serratia sp.* Isolée de l'eau d'une rivière et caractérisée par le séquençage du gène 16S avait une grande capacité à dégrader la pénicilline G à une concentration initiale de 10 mg. L^{-1} et l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie (**Kumar et al., 2019**).

Tableau10. Taux de croissance des cinq souches bactériennes.

Isolats	P2	P4	P7	P19	P22
Taux de croissance $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.0334	0.0188	0.0249	0.0339	0.0296

VI. Test de biodégradation de la PENG par un consortium bactérien en conditions de métabolisme et en co-métabolisme

Le but de ce test est l'étude de la biodégradabilité de la PENG en utilisant un consortium bactérien formé de trois souches isolées à partir de la boue activée de de la station d'épuration des eaux usées (*Bacillus* sp P2) et du sol du centre d'enfouissement technique (*Bacillus* sp P19 et *Bacillus* sp. P22).

Le test a été réalisé pendant 72h dans les conditions de métabolisme et de co-métabolisme en présence des trois souches pures et mixtes (consortium), à l'obscurité afin d'éviter la photodégradation du substrat.

Les profils de croissance des trois souches pures et du consortium en présence de la PENG comme seule source d'énergie et de carbone à une concentration finale de 10 mg. L⁻¹ et en présence d'une autre source de carbone et d'énergie (glucose) à une concentration finale de 50 mg. L⁻¹ ont été suivis par mesure de la DO après chaque 24h (t₀, t₂₄, t₄₈ et t₇₂). La figure 7 montre les résultats obtenus.

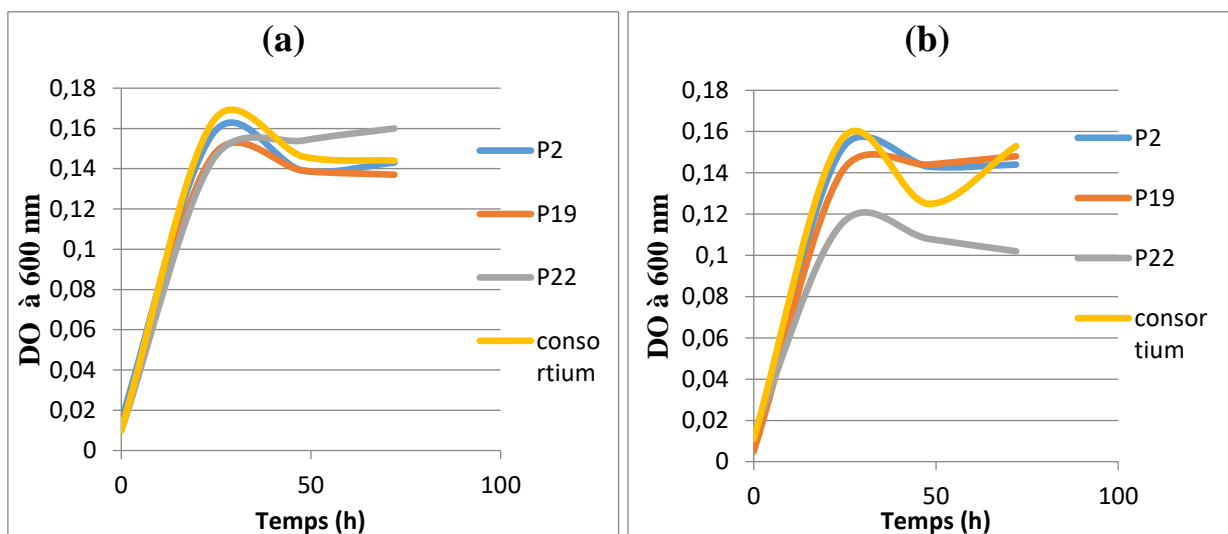


Figure 06. Courbe de croissance des souches bactériennes pures et du consortium durant le test de biodégradation : (a) PENG comme seule source de carbone, (b) PENG + glucose.

La figure 06 montre que les trois souches sont capables de croître dans le milieu MMM contenant 10 mg. L⁻¹ de la PENG comme unique source de carbone et d'énergie. La mesure de la DO pour *Bacillus* sp P2 correspond à 0.015 en t₀, 0.157 en t_{24h}, 0.139 en t_{48h} et 0.122 en t_{72h}, alors que pour *Bacillus* sp P19 0.012 en t₀, 0.146 en t_{24h}, 0.139 en t_{48h} et 0.128 en t_{72h}, tandis que pour *Bacillus* sp. S22 0.01 en t₀, 0.144 en t_{24h}, 0.154 en t_{48h} et 0.160 en t_{72h}. La croissance bactérienne a atteint son maximum après 24h pour les souches *Bacillus* sp P2 et *Bacillus* sp P19. Et après 72h

pour la souche *Bacillus* sp P22. Ces résultats indiquent que l'antibiotique favorise la croissance des trois souches ce qui confirme nos résultats précédents, donc la concentration 10 mg. L⁻¹ de PENG n'a aucun effet négatif sur les trois souches.

Parallèlement, la croissance du consortium atteint une valeur maximale après 24h d'incubation (0.163), ensuite une diminution de la croissance jusqu'à 0,144 est observée après 72 heures d'incubation. Cette diminution peut être liée à une baisse de la quantité de la PENG, à une accumulation des métabolites dans le milieu, ou à une interaction entre les souches par exemple une compétition pour les nutriments. **Garro et al., (2004)**, ont montré que les interactions entre différentes souches peuvent soit stimuler soit inhiber la croissance microbienne.

D'après les résultats de la croissance des souches pures et du consortium en présence de la PENG et de glucose (condition co-métabolisme), on remarque que les résultats sont presque les mêmes que ceux qui se sont révélés dans les conditions métaboliques, il y a une croissance bactérienne dans le MMM contenant 10 mg. L⁻¹ de la PENG et 50mg. L⁻¹ de glucose.

La mesure de la DO pour les souches *Bacillus* sp P2 et *Bacillus* sp. P22 montre que la croissance atteint son maximum après 24h 0,151 et 0,115, respectivement et après 72h pour *Bacillus* sp P19 0.148.

Pour le consortium, la croissance atteint une valeur maximale après 24h d'incubation (0.156) puis il ya une diminution remarquable. Cette dernière peut être expliquée par une carence des nutriments dans le MMM ou l'une ou les deux sources de carbonées, ou une interaction entre les souches au cours de cette phase, les souches commencent également à s'adapter aux composés de dégradation, il s'agit donc probablement d'une phase d'adaptation aux métabolites issus de la transformation des sources carbonées.

Après 48h on observe une augmentation de la croissance (0.153). Cette augmentation est probablement liée à l'utilisation des métabolites issus de la biodégradation des sources de carbone ou à l'utilisation des cellules mortes par les cellules vivantes. Le taux d'élimination de la PENG est résumé en **annexe 6**. **La figure 07** montre le taux d'élimination de la PENG par les souches bactériennes pures et en consortium dans des conditions métaboliques.

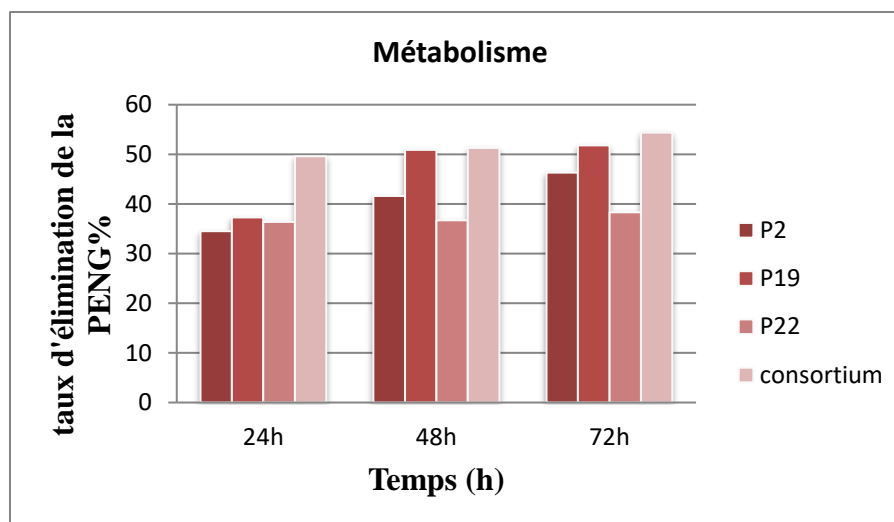


Figure 07. Biodégradation de la PENG à une concentration initiale de 10 mg. L⁻¹ par les cultures pures (P2, P19, P22) et le consortium en conditions métaboliques.

En se basant sur ces résultats nous pouvons dire que, le consortium bactérien est capable de dégrader la PENG avec des taux d'élimination remarquables au fil du temps : 49.6% en 24h, 51.3% en 48h et 54.4% en 72h.

On note que le taux d'élimination de la pénicilline G par le consortium est supérieur à celui des souches pures *Bacillus sp* P2, *Bacillus sp* P19 et *Bacillus sp* P22 qui dégradent la PENG à un taux de 46.3%, 51.8%, 38.3%, respectivement après 72h.

Ces données peuvent être soutenues par les résultats des travaux effectués par **Yu et ses collaborateurs, (2022)** qui ont étudié la biodégradation de la SMX à une concentration initiale de 100 mg. L⁻¹ par un consortium bactérien formé de *Paenarthrobacter ureafaciens* YL1 et *Pseudomonas koreensis* YL2. Ce dernier est capable de dégrader complètement cette concentration en 48h par rapport à la dégradation de la même concentration en un temps plus long (56 h) par la souche *P. ureafaciens* YL1 seule. Ainsi, selon **Nguyen et al., (2013)**, l'élimination des micro-contaminants par des cultures mixtes de bactéries et de champignons serait préférable à l'utilisation de cultures pures.

D'autres études menées par **Wu et al., (2020)** a démontré que le taux d'élimination de la tétracycline est de 81,72% par un consortium bactérien composé de *Raoultella sp.* XY-1 et *Pandoraea sp.* XY-2.

La deuxième étape du test de biodégradation est réalisée pour étudier la transformation de la pénicilline G en présence du glucose, les résultats ont montré que le taux d'élimination de la PENG par le consortium est élevé par rapport aux souches pures (**la figure 08**).

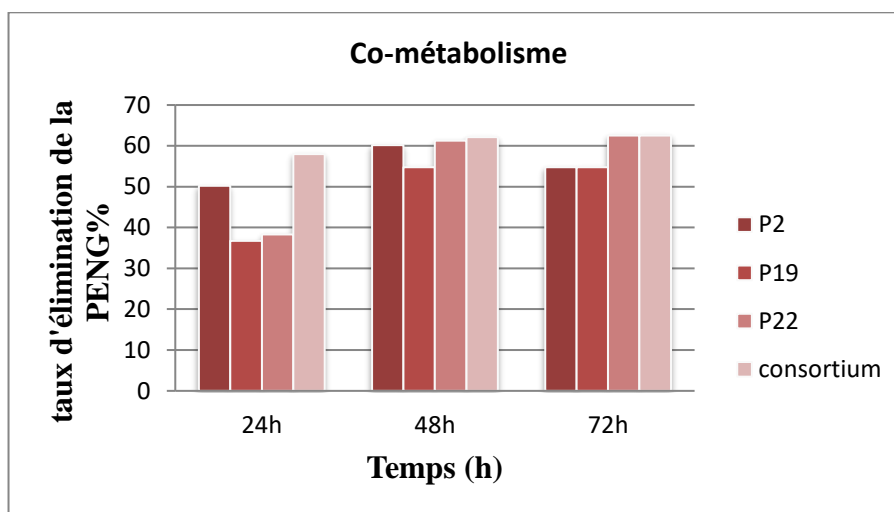


Figure 08. Biodégradation de la PENG à une concentration initiale de 10 mg. L^{-1} par les cultures pures (P2, P19, P22) et le consortium bactérien en conditions co- métaboliques.

Après 72h, le consortium dégrade le médicament à 62.5% contre 61.7% par *Bacillus* sp P2 et 54.8% par *Bacillus* sp P19. Le taux d'élimination par *Bacillus* sp P22 est égal au taux du consortium.

D'après **Feng et al., (2019)** la ciprofloxacine est dégradée par l'espèce bactérienne *Ochrobactrum* sp. YJ17 jusqu'à 34.3%, et par le consortium bactérien composé de *Achromobacter*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Ochrobactrum* et *Enterococcus* à 61,4% en présence du glucose ce qui indique que les souches mixtes sont plus efficaces que les souches pures. Par contre **Larcher et Yargeau, (2012)** ont montré que les souches pures ont un meilleur pouvoir d'élimination que les cultures mixtes selon l'expérience qui indique que le Sulfamethoxazole est éliminé par des cultures pures de *Rhodococcus equi* en présence de glucose d'un pourcentage de 29%, et par la même bactérie en présence d'autres microorganismes (consortium), l'élimination maximale est de 5%.

Selon les résultats de la biodégradation de la PENG par les cultures pures dans les deux conditions métabolique et co-métabolique, on constate que le taux d'élimination dans les conditions co-métaboliques est plus élevé par rapport à celui obtenu dans les conditions métaboliques. Cela a aussi été observé pour le consortium (**figure 9**).

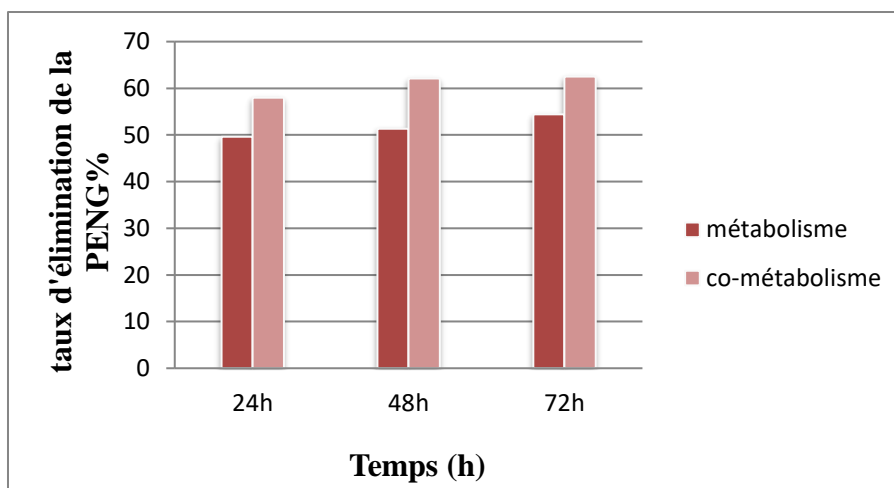


Figure 9. Biodégradation de la PENG à une concentration initiale de 10mg. L⁻¹parle consortium bactérien en conditions métaboliques et co-métaboliques.

Selon **la figure 9** le taux d'élimination par le consortium bactérien dans les conditions co-métaboliques après 24h est de 57.2% et de 49.6% pour le même consortium mais en conditions métaboliques. Ces valeurs ont augmenté après 48h à 62.1% et 51.3% respectivement, et ont atteint 62.5% en présence du glucose et 54.4% en l'absence du glucose. Ces résultats peuvent être soutenues par certaines études indiquant que le co-métabolisme permet d'initier une réaction pour convertir des composés persistants en leurs composés potentiellement plus biodégradables et rejoindraient la voie métabolique centrale pour la poursuite de la biotransformation (**Groning et al., 2007**).

Selon l'étude de **Feng et al., (2019)**, le glucose permet aux cellules d'atténuer la toxicité de la ciprofloxacine en leur fournissant suffisamment de nutriments. Ce qui donne plus de biocatalyseurs qui peuvent réagir avec la ciprofloxacine et provoquer une dégradation plus rapide induite par l'énergie. En outre, le glucose qui est structurellement lié à la ciprofloxacine peut induire les enzymes nécessaires pour initier la conversion la ciprofloxacine.

Conclusion

Notre étude expérimentale a été réalisée dans le but d'évaluer la biodégradation de la PENG par un consortium bactérien formé de trois souches isolées à partir de différentes origines (boue activée de la station d'épuration des eaux usée d'ERABTA (JIJEL) et à partir du centre d'enfouissement technique d'EL AOUANA (JIJEL)).

Les cinq souches isolées et identifiées comme étant des *Bacillus* étaient capables de vivre en association sans présenter d'effet antagonistique. Elles sont capables de croître dans un milieu minéral minimum contenant la PENG à une concentration finale de 10mg/l comme seule source de carbone et d'énergie.

Les trois souches P2, P19 et P22 identifiées par des tests biochimiques comme étant *Bacillus* sp, ont été sélectionnées pour former un consortium bactérien, vu qu'elles présentaient une bonne croissance avec un taux de croissance de 0.0334 h^{-1} , 0.0339 h^{-1} et 0.0296 h^{-1} , respectivement.

Afin d'étudier la biodégradation de la PENG par ce consortium bactérien, une courbe d'étalonnage a été utilisée pour le dosage spectrophotométrique de la molécule. La PENG (10mg/L) est partiellement biodégradée par les trois souches pures *Bacillus* sp P2, *Bacillus* sp P19 et *Bacillus* sp. P22 et par le consortium bactérien avec des potentiels de biodégradation de 46,3 %, 51,8 % et 38,3 %, 54,4%, respectivement après 72h et en présence de la PENG comme seule source de carbone, et de 54,8%, 54,8%, 62,5%, 62,5%, respectivement en présence du glucose à concentration de 50mg/L.

Le potentiel de biodégradation de la PENG par le consortium bactérien en présence du glucose est supérieur à celui en son absence.

D'après notre étude et les efforts effectués dans le domaine de la bioremédiation, on peut conclure que les consortiums bactériens pourraient être utilisés efficacement comme catalyseurs puissants pour le traitement des stocks des médicaments éliminés. L'élimination biologique des polluants rejetés dans l'environnement reste une stratégie respectueuse de l'environnement et alternative aux traitements physico-chimiques, ceci nécessite plus d'investigations approfondies afin de :

- Identifier les métabolites intermédiaires pour évaluer leur toxicité éventuelle sur les animaux ainsi que sur les microorganismes.
- Etudier les conditions optimales de culture pour augmenter leur performance.
- Utiliser cette biotechnologie à l'échelle industrielle (*in situ*) comme dans les stations d'épuration des eaux usées.

*Références
bibliographiques*

A

Ahmed, M.B., Zhou, J.L., Ngo, H.H., Guo, W., Thomaidis, N.S., & Xu, J. (2017). Progress in the Biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from Wastewater: A critical review. *Journal of Hazardous Materials* 323, 274–298.

Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Beggah, C., & Benhamada, F. (2017). Biological removal of the mixed pharmaceuticals: diclofenac, ibuprofen, and sulfamethoxazole using a bacterial consortium. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(2), 135.

Akpotu, S. O., Oseghe, E. O., Ayanda, O. S., Skelton, A. A., Msagati, T. A., & Ofomaja, A. E. (2019). Photocatalysis and biodegradation of pharmaceuticals in wastewater: effect of abiotic and biotic factors. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 21(9), 1701-1721.

Alvariño Pereira, T., Suárez Martínez, S., LemaRodicio, J. M., & Omil Prieto, F. (2018). Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment*, 615, 297-306.

Arnold, W. A., & McNeill, K. (2007). Transformation of pharmaceuticals in the environment: Photolysis and other abiotic processes. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 50, 361-385.

B

Balarak, D., Mostafapour, F. K., & Joghataei, A. (2016). Experimental and kinetic studies on penicillin G adsorption by Lemna minor. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 9(5), 1-10.

Beek, T.A.D.; Weber, F.A.; Bergmann, A.; Hickmann, S.; Ebert, I.; Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 35 (4), 823-835.

Berkani, M., Smaali, A., Kadmi, Y., Almomani, F., Vasseghian, Y., Lakhdari, N., & Alyane, M. (2022). Photocatalytic degradation of Penicillin G in aqueous solutions: Kinetic, degradation pathway, and microbioassays assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 421, 126719.

Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.

C

Carter, L. J., Harris, E., Williams, M., Ryan, J. J., Kookana, R. S., & Boxall, A. B. (2014). Fate and uptake of pharmaceuticals in soil–plant systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(4), 816-825.

Chen, S., Xie, J., & Wen, Z. (2021). Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from waterbody using a revolving algal biofilm (RAB) reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124284.

Chopra, S., & Kumar, D. (2020). Characterization, optimization and kinetic study of diclofenac degradation by novel bacterial strains and their synthetic consortia. *Bioremediation Journal*, 24(2-3), 150-170.

Costa, F., Lago, A., Rocha, V., Barros, O., Costa, L., Vipotnik, Z., ...& Tavares, T. (2019). A review on biological processes for pharmaceuticals wastes abatement—a growing threat to modern society. *Environmental Science & Technology*, 53(13), 7185-7202.

Courtier, A.; Cadiere, A., & Roig, B. (2018). Human Pharmaceuticals: Why and how to reduce their presence in the environment. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 15, 77-82.

D

Daughton, C. G. (2008). Pharmaceuticals as environmental pollutants: the ramifications for human exposure. *International encyclopedia of public health*, 5, 66-102.

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433.

Deblonde, T. (2013). Évaluation des risques sanitaires de la consommation d’eaux potentiellement chargées en résidus de médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. France.

Defarges, T. M., Guerbet, M., Massol, J., Aumonier, J., Billon, N., Casellas, C., & Sibener, C. (2011). Impact des médicaments sur l’environnement: état des lieux, évaluation des risques, communication. *Therapies*, 66(4), 335-340.

Desbiolles, F.; Malleret, L.; Tiliacos, C.; Wong-Wah-Chung, P., & Laffont-Schwob, I. (2018). Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? *Science of the Total Environment*. 639, 1334-1348

E

Edwards, S. J., & Kjellerup, B. V. (2013). Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(23), 9909-9921.

F

Feng, N. X., Yu, J., Xiang, L., Yu, L. Y., Zhao, H. M., Mo, C. H., ... & Li, Q. X. (2019). Co-metabolic degradation of the antibiotic ciprofloxacin by the enriched bacterial consortium XG and its bacterial community composition. *Science of the Total Environment*, 665, 41-51.

Fent, K.; Weston, A.A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*. 76(2), 122-159.

Forrez, I., Carballa, M., Fink, G., Wick, A., Hennebel, T., Vanhaecke, L. ... & Verstraete, W. (2011). Biogenic metals for the oxidative and reductive removal of pharmaceuticals, biocides and iodinated contrast media in a polishing membrane bioreactor. *Water Research*, 45(4), 1763-1773.

G

Garro, M. S., de Valdez, G. F., & de Giori, G. S. (2004). Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. *Food Microbiology*, 21(5), 511-518.

Gomes, A. R., Justino, C., Rocha-Santos, T., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Pereira, R. (2017). Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. *Journal of environmental science and health, part a*, 52(10), 992-1007.

Goswami, L., Kumar, R. V., Borah, S. N., Manikandan, N. A., Pakshirajan, K., & Pugazhenti, G. (2018). Membrane bioreactor and integrated membrane bioreactor systems for micropollutant removal from wastewater: a review. *Journal of water process engineering*, 26, 314-328.

Gröning, J., Held, C., Garten, C., Claußnitzer, U., Kaschabek, S. R., & Schlömann, M. (2007). Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere*, 69(4), 509-516.

H

Hadi, A. E., Khalisha, A., Pambudi, A., & Effendi, Y. (2021). Potential of bacteria consortium as growth controller of pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* F. sp. cubense (Foc). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* , 637, 012029.

Haguenoer, J. M. (2010). Les résidus de médicaments présentent-ils un risque pour la santé publique? *Santé publique*, 22(3), 325-342.

Hiller, E., & Šebesta, M. (2017). Effect of temperature and soil pH on the sorption of ibuprofen in agricultural soil. *Soil and Water Research*, 12(2), 78-85.

Ho, H. P., Lee, R. J., Chen, C. Y., Wang, S. R., Li, Z. G., & Lee, M. R. (2011). Identification of new minor metabolites of penicillin G in human serum by multiple-stage tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(1), 25-32.

I

Ikehata, K., JodeiriNaghashkar, N., & Gamal El-Din, M. (2006). Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: a review. *Ozone: Science and Engineering*, 28(6), 353-414.

Inouss, H.; Ahid, S.; Belaiche, A ., & Cherrah, Y. (2015). Évolution de la consommation des antibiotiques au Maroc (2003–2012). *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*, 63 ,78.

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtiera, L., & Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of the Total Environment*, 348(1-3), 93-101.

K

Kannan, C., Mishra, D., Rekha, G., Maruthi, P., Shaik, H., & Sundaram, R. M. (2021). Diversity analysis of antagonistic microbes against bacterial leaf and fungal sheath blight diseases of rice. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-16.

Kar, S., Roy, K., & Leszczynski, J. (2018). Impact of pharmaceuticals on the environment: risk assessment-using QSAR modeling approach. *Computational toxicology*, 180, 395-443.

Kumar, M., Sodhi, K. K., & Singh, D. K. (2019). Bioremediation of Penicillin G by *Serratia* sp. R1, and enzymatic study through molecular docking. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 12, 100246.

L

Lai-Cheung-Kit, I.; Lemarchand, B.; Bouscaren, N ., & Gaüzère, B.A. (2019). Consommation des anti-inflammatoires non stéroïdiens lors de la préparation au Grand Raid 2016 à La Réunion. *Science & Sports*, 34(4), 244-258.

Larcher, S., & Yargeau, V. (2012). Biodegradation of sulfamethoxazole: current knowledge and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 309-318.

- Larsson, D. J., de Pedro, C., & Paxeus, N. (2007).** Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of hazardous materials*, 148(3), 751-755.
- Li, D., & Shi, W. (2016).** Recent developments in visible-light photocatalytic degradation of antibiotics. *Chinese Journal of Catalysis*, 37(6), 792-799.
- Li, W. C. (2014).** Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental pollution*, 187, 193-201.
- Liu Y.; Lu X.; Wu F., & Deng N. (2011).** Adsorption and photooxidation of pharmaceuticals and Personal Care products on clay minerals. *Reactive Kinetics and Mechanisms Catalysis*, 104, 61 - 73.
- Lucas, D., Castellet-Rovira, F., Villagrasa, M., Badia-Fabregat, M., Barceló, D., Vicent, T., & Rodríguez-Mozaz, S. (2018).** The role of sorption processes in the removal of pharmaceuticals by fungal treatment of wastewater. *Science of the Total Environment*, 610, 1147-1153.

M

- Madikizela, L.M.; Tavengwa, N.T., & Chimuka, L. (2018).** Applications of molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and analgesics from environmental waters and biological samples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 147, 624-633.
- Mansour, H., Boughzala, O., Barillier, D., Chekir-Ghedira, L., & Mosrati, R. (2011).** Les colorants textiles sources de contamination de l'eau: CRIBLAGE de la toxicité et des méthodes de traitement. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 24(3), 209-238.
- Marques, C. R., Abrantes, N., & Gonçalves, F. (2004).** Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: II. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid metabolites. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 19(5), 527-540.
- B. Mathon, Aurélie Vandycke, Marina Coquery, Philippe Bados, A. Daval, & al.. (2017).** Photodégradation de micropolluants organiques sous rayonnement solaire en zone de rejet végétalisée de type bassin. Thèse de Doctorat. Irstea centre Lyon-villeurbanne, pp.63.
- Mezzelani, M.; Gorbi, S., & Regoli, F. (2018).** Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine environmental research*, 140, 41-60.

Miller, T. H., Bury, N. R., Owen, S. F., MacRae, J. I., & Barron, L. P. (2018). A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environmental Pollution*, 239, 129-146.

Monteiro, S. C., & Boxall, A. (2010). Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 53-154.

N

Nadir, I., Achour, Y., El Kassimi, A., El Himri, M., Laamari, M. R., & El Haddad, M. (2021). Removal of antibiotic sulfamethazine from aqueous media. *Physical Chemistry Research*, 9(2), 165-180.

Naidu, R., Espana, V. A. A., Liu, Y., & Jit, J. (2016). Emerging contaminants in the environment: risk-based analysis for better management. *Chemosphere*, 154, 350-357.

Nassar, R., Trivella, A., Mokh, S., Al-Iskandarani, M., Budzinski, H., & Mazellier, P. (2017). Photodegradation of sulfamethazine, sulfamethoxypyridazine, amitriptyline, and clomipramine drugs in aqueous media. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 336, 176-182.

Nguyen, L. N., Hai, F. I., Yang, S., Kang, J., Leusch, F. D., Roddick, F., ... & Nghiem, L. D. (2013). Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 148, 234-241.

O

Omil F.; Suárez S.; Carballa M.; Reif R., & Lema J.M. (2010). Criteria for Designing Sewage Treatment Plants for Enhanced Removal of Organic Micropollutants. *Environmental Pollution*.16, 978-90-481-3509-7.

P

Parezanović, G. Š. Lalic-Popovic, M., Golocorbin-Kon, S., Vasovic, V., Milijašević, B., Al-Salami, H., & Mikov, M. (2019). Environmental transformation of pharmaceutical formulations: a scientific review. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 77(2), 155-161.

Parrott, J. L., & Blunt, B. R. (2005). Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 20(2), 131-141.

Q

Quesada, H.B.; Baptista, A.T.A.; Cusioli, L.F., Seibert, D.; de Oliveira Bezerra, C., & Bergamasco, R. (2019).Surface water pollution by pharmaceuticals and an alternative of removal by low-cost adsorbents: A review. *Chemosphere*, 222, 766-780.

S

Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., & Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic toxicology*, 68(2), 141-150.

Sipma, J., Osuna, B., Collado, N., Monclús, H., Ferrero, G., Comas, J., & Rodriguez-Roda, I. (2010). Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems. *Desalination*, 250(2), 653-659.

Sun, J., Luo, Q., Wang, D., & Wang, Z. (2015). Occurrences of pharmaceuticals in drinking water sources of major river watersheds, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 117, 132-140.

T

Tork, S., Aly, M. M., & Nawar, L. (2010). Biochemical and molecular characterization of a new local keratinase producing *Pseudomonas* sp., MS21. *Asian J Biotechnol*, 2(1), 1-13.

Tran, N. H., Urase, T., & Kusakabe, O. (2009). The characteristics of enriched nitrifier culture in the degradation of selected pharmaceutically active compounds. *Journal of hazardous materials*, 171(1-3), 1051-1057.

V

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ...& Whitman, W. B. (Eds.). (2011).*Bergey's manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.

W

Wang, J., & Wang, S. (2018). Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(8), 3573-3582.

Wang, P., Shen, C., Wang, X., Liu, S., Li, L., & Guo, J. (2020). Biodegradation of penicillin G from industrial bacteria residue by immobilized cells of *Paracoccus* sp. KDSPL-02 through continuous expanded bed adsorption bioreactor. *Journal of Biological Engineering*, 14(1), 1-10.

Wei, G., Fan, L., Zhu, W., Fu, Y., Yu, J., & Tang, M. (2009). Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR533-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *Journal of Hazardous materials*, 162(1), 50-56.

Wu, X., Gu, Y., Wu, X., Zhou, X., Zhou, H., Amanze, C., ...& Zeng, W. (2020). Construction of a tetracycline degrading bacterial consortium and its application evaluation in laboratory-scale soil remediation. *Microorganisms*, 8(2), 292.

Wu, S., Zhang, L., & Chen, J. (2012). Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(4), 875-884.

Y

Yang, X., Li, M., Guo, P., Li, H., Hu, Z., Liu, X., & Zhang, Q. (2019). Isolation, screening, and characterization of antibiotic-degrading bacteria for penicillin V potassium (PVK) from soil on a pig farm. *International Journal of Environmental Research and public Health*, 16(12), 2166.

Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3423.

Yu, L., Wang, Y., Shan, X., Ma, F., & Guo, H. (2022). Harnessing *Paenarthrobacter ureafaciens* YL1 and *Pseudomonas koreensis* YL2 Interactions to Improve Degradation of Sulfamethoxazole. *Microorganisms*, 10(3), 648.

Z

Zhang, L., Hu, J., Zhu, R., Zhou, Q., & Chen, J. (2013). Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(8), 3687-3698.

Zhang, Q., & Dick, W. A. (2014). Growth of soil bacteria, on penicillin and neomycin, not previously exposed to these antibiotics. *Science of the total environment*, 493, 445-453.

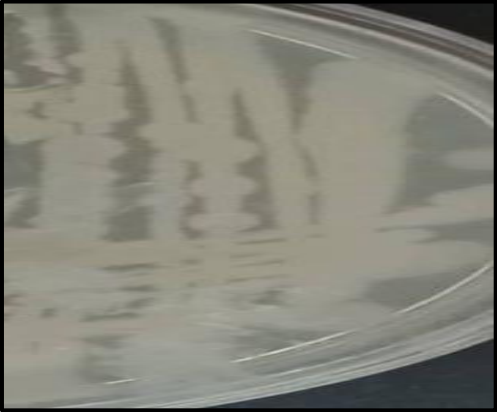


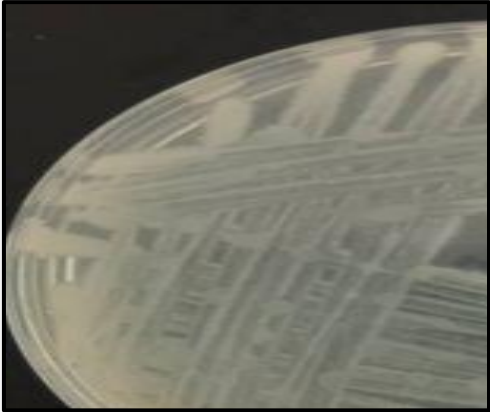
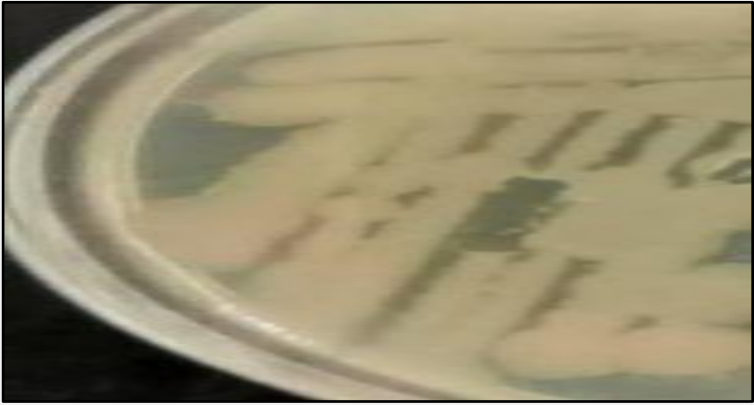
Zoubek, M.E.; Woitok, M. M.; Sydor, S.; Nelson, L.J.; Bechmann, L.P.; Lucena, M.I., & Cubero, F.J. (2019). Protective role of c-Jun N-terminal kinase-2 (JNK2) in ibuprofen-induced acute liver injury. *The Journal of pathology*, 247(1), 110-122.

Żur, J., Wojcieszynska, D., Hupert-Kocurek, K., Marchlewicz, A., & Guzik, U. (2018). Paracetamol–toxicity and microbial utilization. *Pseudomonas moorei*KB4 as a case study for exploring degradation pathway. *Chemosphere*, 206, 192-202.

Zwiener, C., & Frimmel, F. H. (2003). Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibric acid, ibuprofen, and diclofenac. *Science of the Total Environment*, 309(1-3), 201-211.

Annexes

Annexe 1

	
<p>(P2)</p>	<p>(P4)</p>
	
<p>(P7)</p>	<p>(P19)</p>
	
<p>(P22)</p>	
<p>Aspect macroscopique des souches (P2), (P4), (P7), (P19) et (P22).</p>	

Annexe 2

Composition du milieu minéral minimum

Constituants	g /L
K₂HPO₄	1.60
KH₂PO₄	0.40
MgSO₄ .7H₂O	0.20
CaCl₂.2H₂O	0.03
FeCl₃ .6H₂O	0.02
NH₄NO₃	0.50
extrait de levure	0.50

pH 7.0 ±0.2, autoclavé 15 mn à 120°C.

Composition de la gélose nutritive

Constituants	g/L
Peptone	5
Extrait de viande de bœuf	3
Chlorure de sodium	5
Agar-agar	15

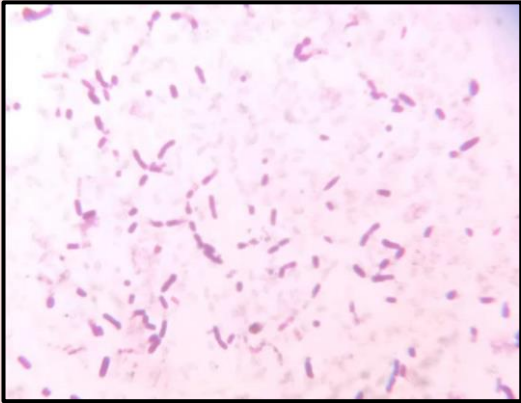
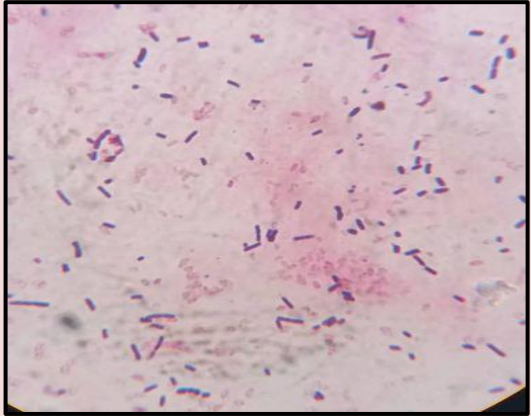
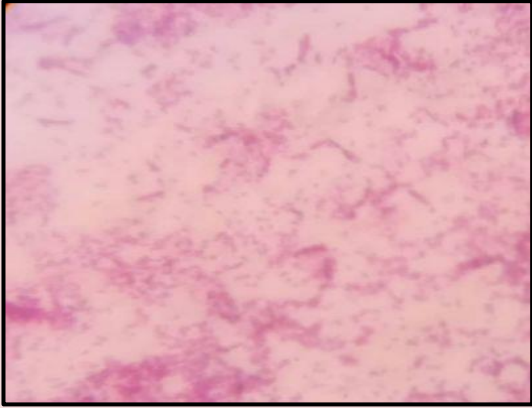
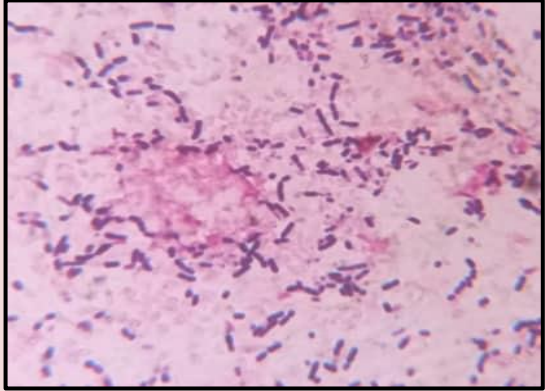
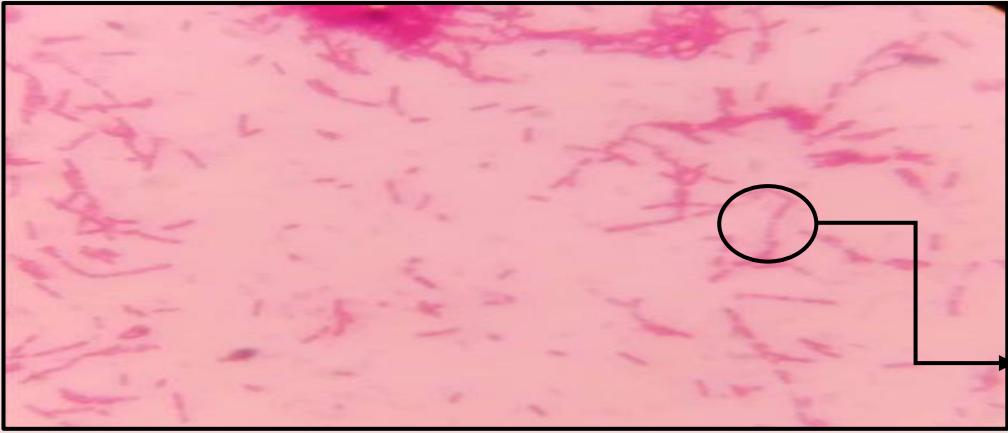
pH 7,3 ±0,2 à 25°C.

Composition du bouillon nutritif

Constituants	g/L
Tryptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5

pH 7,2 ± 0,2 à 25°C

Annexe 3

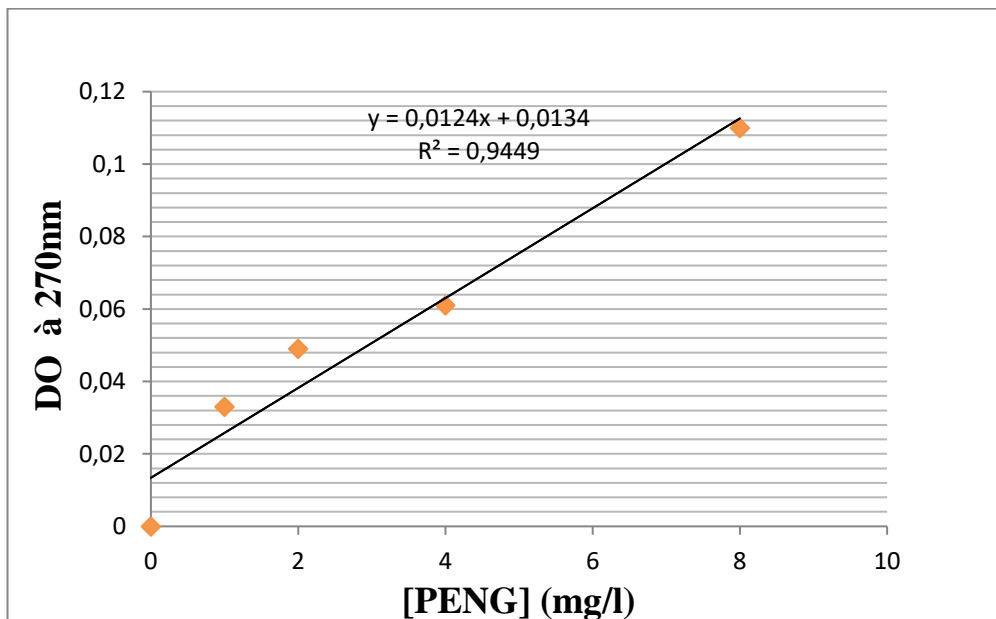
	
<p>(P2)</p>	<p>(P4)</p>
	
<p>(P19)</p>	<p>(P22)</p>
	
<p>(P7)</p>	
<p>Photographies de l'aspect microscopique (coloration de Gram) des bactéries isolées (G x100).</p>	

Annexe 4

Cinétique de croissance des isolats sur milieu minimum en présence de 10mg.Lde PENG.

DO à 600 nm					
Isolats	Temps	T=0	T=24	T=48	T=72
P2		0.065	0.329	0.219	0.235
P4		0.075	0.137	0.109	0.208
P7		0.08	0.199	0.222	0.219
P19		0.041	0.220	0.135	0.236
P22		0.064	0.221	0.232	0.2

Annexe 5



Courbe d'étalonnage pour le dosage spectrophotométrique de la PENG



Annexe 6

Biodégradation et taux d'élimination de la PENG (10mg /L) comme seule source de carbone par les souches pures et le consortium bactérien.

P2			P19		P22		Consortium	
Temp s (h)	DO à 600 nm	Taux d'élimination de la PENG%	DO à 600 nm	Taux d'élimination de la PENG%	DO à 600 nm	Taux d'élimination de la PENG%	DO à 600 nm	Taux d'élimination de la PENG%
T=0	0.015	/	0.012	/	0.010	/	0.01	/
T=24	0.157	34.6%	0.146	37.3%	0.144	36.4%	0.163	49.6%
T=48	0.139	41.6%	0.139	50.9%	0.154	36.7%	0.146	51.3%
T=72	0.122	46.3%	0.128	51.8%	0.160	38.3%	0.144	54.4%

Biodégradation et taux d'élimination de la PENG (10mg/L) en présence de glucose (50mg/L) par les souches pures et le consortium bactérien.

P2			P19		P22		Consortium	
Temp s (h)	DO à 600 nm	Taux d'élimination de la PENG%	DO à 600 nm	Taux d'élimination de la PENG%	DO à 600 nm	Taux d'élimination de la PENG%	DO à 600 nm	Taux d'élimination de la PENG%
T=0	0.01	/	0.005	/	0.014	/	0.011	/
T=24	0.151	52.4%	0.140	36.7%	0.115	38.3%	0.156	57.2%
T=48	0.143	60.2%	0.144	54.8%	0.108	61.3%	0.125	62.1%
T=72	0.140	61.7%	0.148	54.8%	0.102	62.5%	0.153	62.5%

Réalisé par :

- BoutaghaneManal.
- BrihoumRayane.
- Ykhelfoune Loubna.

Membres de Jury :

Présidente: Dr. AMIRA Samiya
Examinateur: Pr. IDOUI Tayeb
Encadreur: Pr. Ouled Haddar Houria.

Thème**Etude du comportement d'un consortium bactérien sélectionné vis-à-vis de quelques produits pharmaceutiques****Résumé**

La pollution de l'environnement par les produits pharmaceutiques est devenue une préoccupation mondiale au cours des dernières décennies en raison de ses effets négatifs. La capacité d'un consortium bactérien sélectionné à dégrader la pénicilline G (10 mg. L⁻¹) dans des conditions métaboliques et co-métaboliques a été évaluée afin de prédire son devenir dans l'environnement. Les résultats ont révélé que les trois souches isolées de différentes sources, identifiées comme *Bacillus* sp., ont pu se développer en présence de la pénicilline G (10 mg. L⁻¹) comme seule source de carbone et d'énergie. Les résultats ont montré que le consortium bactérien a pu dégrader 54,4 % de la pénicilline G (10 mg.L⁻¹) dans des conditions métaboliques ; alors que dans des conditions de co-métabolisme, 62,2 % de la pénicilline G a été éliminée. La biodégradation de la PENG est plus efficace par le consortium bactérien que par les cultures pures.

Mots clés : Biodégradation, Consortium bactérien, PENG, métabolisme, co-métabolisme.

Abstract

Environmental pollution by pharmaceutical products has become a global concern in recent decades due to its negative effects. The ability of a selected bacterial consortium to degrade penicillin G (10 mg.L⁻¹) under metabolic and co-metabolic conditions was evaluated in order to predict its fate in the environment. The results revealed that the three strains isolated from different sources, which were identified as *Bacillus* sp., were able to grow in the presence of penicillin G (10 mg.L⁻¹) as the sole carbon source and energy. The results showed that the bacterial consortium was able to degrade 54.4% of penicillin G (10 mg.L⁻¹) under metabolic conditions; while under conditions of co-metabolism, 62.2% of penicillin G was eliminated. The biodegradation of PENG is more effective by the bacterial consortium than the pure cultures.

Keywords: Biodegradation, Bacterial consortium, PENG, metabolism, co-metabolism.

ملخص

أصبح تلوث البيئة بالمنتجات الصيدلانية يشكل قلقاً عالمياً في العقود الأخيرة وذلك بسبب آثارها السلبية. تمت دراسة قدرة اتحاد بكتيري محدد على تحليل البنسيلين ج (10 مغ. ل⁻¹) في ظل ظروف التمثيل الغذائي والتمثيل الغذائي المشترك من أجل مراقبة مصيره في البيئة. حيث كشفت النتائج أن السلالات الثلاث المعزولة من مصادر مختلفة والتي تم تحديدها على أنها عصيات *Bacillus* sp. كانت قادرة على النمو بوجود البنسيلين ج (10 مغ. ل⁻¹) كمصدر وحيد للكربون والطاقة. تبين النتائج ان الاتحاد لبكتيري كان قادراً على تحليل 54.4 % من البنسيلين ج (10 مغ. ل⁻¹) في ظل ظروف التمثيل الغذائي؛ بينما في ظل ظروف التمثيل الغذائي المشترك، تم التخلص من البنسيلين ج بنسبة 62.2 %. يعتبر التحليل البيولوجي لـ PENG أكثر كفاءة من قبل اتحاد البكتيريا مقارنة بالسلالات النقية.

الكلمات المفتاحية: التحلل البيولوجي، اتحاد البكتيريا، البنسيلين ج، التمثيل الغذائي، التمثيل الغذائي المشترك.