

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

Master Académique en Sciences de
La Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Etude de l'influence de quelques conditions de culture sur la biotransformation de l'acétaminophène par des bactéries isolées du sol.

Membres de Jury

Président (e) : Dr. Lilia BOUSSOUF.

Examinatrice: Dr. Samiya AMIRA.

Encadreur: Prof. Houria OULED HADDAR.

Présenté par

M^{elle}: Rokia MEKAHLI.

M^{elle}: Besma MEZHOU.

M^{elle}: Selma ZOUIKRI.



Année Universitaire 2021-2022

Numéro d'ordre (bibliothèque) :.....

Remerciements

En premier lieu, nous remercions « **Allah** », Le tout Puissant, de nous avoir aidé à surmonter toutes les difficultés lors de nos études et nous avoir donné la patience, la volonté et le courage afin d'arriver à la finalité de ce travail.

Nous tenons à remercier « **Pr. Houria OULED HADDAR** » qui nous a fait l'honneur d'encadrer et de diriger ce travail. Nous avons beaucoup apprécié sa confiance, ses précieux conseils et ses efforts pour nous aider tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury « **Dr. Lilia BOUSSOUF** » et « **Dr. Samiya AMIRA** » d'avoir accepté de juger ce travail.

Un remerciement spécial est adressé à notre enseignant « **Pr. Mohamed SIFOUR** » pour son aide précieuse et pour le temps qu'il nous a consacré.

Nous tenons à remercier tout particulièrement « **M^{elle} Ibtissem CHEKIRE** » pour son aide précieuse, ses conseils et pour le temps qu'elle nous a consacré durant toute la période du travail, merci infiniment.

Nous remercions tous les ingénieurs et les techniciens du laboratoire de Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires qui ont participé à la réalisation de ce travail

Nos plus profonds remerciements vont à nos parents pour leur aide, leur compréhension, leur soutien, et leurs prières tout au long du cursus scolaire et universitaire, ainsi que pour leurs encouragements sans cesse, qu'Allah les bénisse.

Enfin, nous remercions gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Encore une fois de plus, merci.

Sommaire

Liste des abréviations**Liste des figures****Liste des tableaux****Introduction****Partie 1. Synthèse bibliographique**

1.1.	Généralités et notions fondamentales sur l'acétaminophène.....	03
1.1.1.	Historique.....	03
1.1.2.	Définition.....	04
1.1.3.	Structure chimique.....	04
1.1.4.	Propriété physicochimique.....	04
1.1.5.	Métabolisme humain.....	05
1.1.6.	Consommation de l'acétaminophène à l'échelle mondiale	06
1.2.	Sources et devenir des médicaments dans l'environnement : cas de l'acétaminophène	07
1.2.1.	Mode d'action et toxicité de l'acétaminophène.....	09
1.2.2.	Mécanismes de dégradation et d'élimination de l'acétaminophène.....	11
1.2.3.	Mécanisme abiotique	11
1.2.3.1.	Méthodes biologiques avancées	12
1.2.3.2.	Biodégradation (Biorémediation).....	14

Partie 2. Matériels et méthodes

2.1.	Matériel	17
2.1.1.	Souche bactérienne	17
2.1.2.	Milieux de culture.....	17
2.1.3.	Appareillage.....	17
2.2.	Méthodes.....	18
2.2.1.	Préparation de la solution mère de l'acétaminophène (APAP).....	18
2.2.2.	Conservation de la souche.....	18
2.2.3.	Identification de la souche bactérienne isolée.....	18
2.2.4.	Standardisation.....	22
2.2.5.	Préparation de l'inoculum.....	22
2.2.6.	Effet de quelques paramètres sur la croissance de la souche A1 et la biodégradation de l'APAP	22
2.2.6.1.	Effet de la variation de la concentration de l'APAP sur la croissance de la souche A1.....	23

2.2.6.2.	Effet de la variation du pH sur la croissance de la souche A ₁	23
2.2.6.3.	Effet du la taille d'inoculum sur la croissance de la souche A ₁	23
2.2.6.4.	Effet de la variation de temps sur la croissance de la souche A ₁	23
2.2.6.5.	Dosage de l'APAP par la méthode colorimétrique.....	24

Partie 3. Résultats et discussion

3.1.	Identification de la souche bactérienne isolée	26
3.1.1.	Observation microscopique.....	26
3.1.2.	Observation microscopique.....	26
3.1.3.	Résultats des tests biochimiques	27
3.2.	Effet de quelques paramètre sur la croissance de la souche A1 et la biodégradation de l'APAP	28
3.2.1.	Effet de la variation de la concentration de l'APAP sur la croissance de la souche A ₁	28
3.2.2.	Effet de la variation du pH sur la croissance de la souche A ₁	29
3.2.3.	Effet du la taille d'inoculum sur la croissance de la souche A ₁	31
3.2.4.	Effet de la variation de temps sur la croissance de la souche A ₁	33

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

AA	Acide arachidonique
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
APAP	N-acétyl-4-aminophénol
AM404	Acide gras N-arachidonoylphénolamine amide
BN	Bouillon nutritif
COX-1	Cyclooxygénase 1
COX-2	Cyclooxygénase 2
CYP450	Cytochrome P450
CYP2E1	Cytochromes P450 2E1
CYP3A4	Cytochromes P450 3A4
DDDs	Nombre de doses journalières définies pour 1000 habitants par jour
DO	Densité optique
FAAH	Fatty Amino Acid Hydrolase
GN	Gélose nutritive
K_{ow}	Le coefficient de partage octanol-eau
NAPQI	N-Acétyl-p-benzoquinone imine
MBR	Bioréacteur membranaire
MMM	Milieu Minéral Minimum
POA	Procédés d'oxydation avancés
POE	Polluants organique émergentes
PBS	Tampon phosphate salin
POAs	Procédés d'oxydation avancés
pK_a	Constant de dissociation

Liste des abréviations

PG	Prostaglandines
PGE2	Prostaglandine E2
PGHS	Prostaglandine H2 synthétase
Rpm	Révolution par minute
STEP	Stations d'épuration des eaux usées
TRPV1	Transit Receptor Potential Vanilloid-1
UV	Ultra Violet

Figure 1. Formule développée et brute de l'acétaminophène.....	04
Figure 2. Métabolisme du paracétamol(APAP)	06
Figure 3. Consommation de l'acétaminophène dans les pays européens en 2015.....	07
Figure 4. Sources et voies d'introduction de l'acétaminophène dans l'environnement.....	08
Figure 5. Conversion du paracétamol en AM404, un inhibiteur de la recapture d'endocannabinoïde.....	10
Figure 6. Effet de la variation de la concentration de l'APAP sur la croissance de la souche A1.....	28
Figure 7. Biodégradation de l'APAP sous l'effet de différente concentration.....	29
Figure 8. Effet de la variation de pH sur la croissance de la souche A1.....	30
Figure 9. La biodégradation d'APAP par la souche A1 sous l'effet du pH.....	30
Figure 10. Effet de la variation de taille d'inoculum sur la croissance de souche A1.....	32
Figure 11. La biodégradation d'APAP par la souche A1 sous l'effet de différente taille D'inoculum.....	33
Figure 12. Effet de la variation du temps sur la croissance de la souche A1 et labiodégradation de l'APAP par la souche en fonction du temps.....	34

Tableau 1. Les propriétés physicochimiques de l'acétaminophène (paracétamol).....	05
Tableau 2. Efficacité de certaines méthodes avancées utilisées pour l'élimination de l'acétaminophène.....	13
Tableau 3. Biodégradation de paracétamol par l'utilisation de quelques souches microbiennes.....	15
Tableau 4. Caractéristiques biochimiques d'isolat du sol.....	27

Introduction

Les produits pharmaceutiques sont considérés comme des micropolluants émergents qui se propagent facilement dans l'environnement. Au cours des dernières décennies, ces résidus ont suscité un grand intérêt à travers de nombreuses recherches et articles, où plus de 150 principes actifs pharmaceutiques ont été découverts dans les eaux usées et les eaux de surface à l'état de traces (**Fick et al., 2009 ; Wu et al., 2012**), mais même à de faibles concentrations (du nano-gramme au microgramme par litre), ils ont des effets nocifs à long terme sur l'équilibre des écosystèmes et la santé des êtres vivants (**Zhang et al., 2013**).

Ces produits et leurs métabolites sont excrétés et pénètrent dans les écosystèmes de diverses manières et sous différentes formes, principalement par les sécrétions urinaires et fécales, les émissions provenant des installations de fabrication ainsi que l'élimination inappropriée des médicaments usagés par les consommateurs et dans les hôpitaux (**Fick et al., 2009; Hu et al., 2012 ; Aissaoui et al., 2017a**).

L'acétaminophène, également connu sous le nom de paracétamol [APAP] est le plus connu des anti-inflammatoires non stéroïdiens en vente libre, car facilement disponible et peu coûteux. D'ailleurs, certaines études ont révélé sa présence dans les eaux de pleine mer de la Méditerranée occidentale à des concentrations allant jusqu'à 1,7 nano-grammes par litre (**Graham et al., 2013 ; Palma et al., 2018**).

Les stations d'épuration (STEP) utilisées des différents techniques abiotiques pour l'élimination des traces du paracétamol (**Cruz-Morató et al., 2013**). notamment les procédés d'oxydation avancés (POA) qui se sont avérées capables d'oxyder efficacement le paracétamol jusqu'à minéralisation en carbone inorganique (CO₂) (**Feng et al., 2013**). Bien que ces procédés soient disponibles, l'efficacité de ces traitements reste limitée et insuffisante pour l'élimination complète de ces polluants, et cela est dû aux conditions de réaction sévères, la faible concentration des contaminants qui génèrent de nombreux polluants liquides secondaires, ainsi qu'au coût d'exploitation élevé (**Wu et al., 2012; Zhang et al., 2013; Almomani et al., 2016**).

D'autre part, la biodégradation des composés pharmaceutiques par l'utilisation des souches bactériennes, semble être une alternative prometteuse et meilleure que les méthodes physico-chimiques utilisées jusqu'à présent, car les micro-organismes jouent un rôle majeur en les convertissant en composés inoffensifs et moins toxiques que ceux d'origine tels que le dioxyde de carbone et l'eau, ainsi que leur capacité à s'adapter à des groupes larges et différents de substrats. Les méthodes de traitement biologique varient avec la diversité des bactéries et des champignons utilisés, comme les traitements aérobie et anaérobie, la technologie des

bioréacteurs à membranes, les procédés à boues activées etc. ... (Zhang et al., 2013 ; Akay et al., 2016 ; Edrees et al., 2017).

L'objectif primordial de ce travail repose sur la biodégradation de l'acétaminophène par une souche bactérienne isolée du sol, en plus d'optimiser l'effet du pH, de la concentration du substrat, de la concentration cellulaire de l'inoculum et du temps d'incubation sur la croissance de la souche sélectionnée avec estimation de la biodégradabilité de la molécule par une méthode colorimétrique.

Matériel et Méthode

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. L'objectif est l'optimisation de quelques conditions de culture pour la biodégradation de l'acétaminophène (APAP) par une souche bactérienne isolée du sol.

2.1. Matériel

2.1.1. Souche bactérienne

La souche bactérienne A1 utilisée dans cette étude a été préalablement isolée à partir du sol et fournie par Mme Chekired Ibtissem du laboratoire de Toxicologie Moléculaire de l'Université de Jijel.

2.1.2. Milieux de culture

Durant notre étude, les tests de biodégradation ont été testés sur l'acétaminophène (paracétamol) avec une pureté de 99 %, sous forme d'une poudre blanche fourni par l'institut Pasteur.

Les différents milieux de culture utilisés sont

- ✓ Le milieu minéral minimum (MMM) préparé au laboratoire comme suit : K_2HPO_4 (1.60g) ; KH_2PO_4 (0.40g) ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.20g) ; $CaCl_2$ (0.03g) ; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0.02g) ; NH_4NO_3 (0.5g) ; extrait de levure (0.50g), 1000ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7.0 ± 0.2 et l'autoclavage a été effectué à une température de $120^\circ C$ pendant 20 minutes (**Wang *et al.*, 2020**).
- ✓ Gélose nutritive (GN) déshydratée ou prête à l'emploi (Institut Pasteur, BioKar®)
- ✓ Bouillon nutritif (BN) déshydraté ou prêt à l'emploi (FAPROLAB®, BioKar®)

Appareillage

- ✓ Autoclave (Slli AVX electronic)
- ✓ Bain-marie (Gerhardt Bonn)
- ✓ Balance (KERN)
- ✓ Balance analytique (KERN ALS220-4N)
- ✓ Etuve (Mettler)
- ✓ Four Pasteur (Mettler)
- ✓ pH mètre (Hanna Instruments)
- ✓ Plaque chauffante agitatrice (VELPSCIENTIFIA)
- ✓ Vortex (Heidolph)

2.2. Méthode

2.2.1. Préparation de la solution mère de l'acétaminophène (APAP)

La solution mère de l'APAP a été préparée dans l'eau distillée pour donner une concentration finale de 05 mg/ml qui a été par la suite stérilisée en utilisant un microfiltre (Sartorius RC 0.22 µm), et couverte par du papier aluminium, la solution a été conservée dans l'obscurité à 4°C jusqu'à l'utilisation.

2.2.2. Conservation et révification de la souche

La souche bactérienne A1 fournie dans du glycérol a été ensemencée dans un tube à essai stérile sur GN inclinée et incubée à 37°C pendant 24 h, puis conservée dans le réfrigérateur à 4°C. À partir de ce dernier, la souche A1 a été cultivée dans le bouillon nutritif, puis incubée à 37°C pendant 24h. Son développement se traduit par un trouble. Un ensemencement par strie a été réalisé sur la gélose nutritif préalablement coulée dans des boîtes de Pétri et la pureté de la souche a été vérifiée après incubation à 37°C pendant 24h par observation macroscopique (aspect des colonies) et microscopique (coloration de Gram).

2.2.3. Identification de la souche bactérienne isolée

L'identification de l'isolat capable de croître en présence de l'acétaminophène est basée sur les caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopiques), physiologique et biochimique.

2.2.3.1. Aspect macroscopique

L'identification préliminaire de la souche bactérienne été basée sur l'aspect macroscopique des colonies vues à l'œil nu, selon les critères suivants : la forme des colonies (bombée, semi bombée, plate), la couleur, la transparence (opaque, translucide), la taille, l'aspect de la surface (lisse, rugueuse ou muqueuse), la consistance, le contour et l'allure des contours (réguliers, irréguliers).

2.2.3.2. Etude microscopique

La coloration de Gram est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale, c'est une coloration différentielle qui permet de colorer les bactéries et de les distinguer à l'examen direct (une observation microscopique) par leur aptitude à fixer le violet de gentiane (bactérie **Gram +**) ou la fuschine (bactérie **Gram -**).

Après préparation et fixation du frottis à la chaleur du bec Bunsen ; il a été recouvert par le violet de gentiane (cristal violet) pendant 1 min ; l'eau a été ajoutée pour éliminer l'excès du colorant. Après le Lugol (mordant) a été ajouté et appliqué pendant 30s, l'excès a été rincé à l'eau courante ; ensuite l'alcool a été ajouté au frottis en goutte à goutte pendant quelques secondes (10-15 secondes). 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'observation se fait au plus fort grossissement (grossissement : objectif x 100) en lumière blanche (lumière maximale). L'observation a consisté à noter la forme des cellules (forme bâtonnet ou forme sphérique) et leur coloration. Les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.

2.2.3.3. Tests biochimiques

✓ Recherche de la catalase

La catalase a été utilisé pour vérifier la présence de l'enzyme catalase. Une petite quantité de 3% H₂O₂ a été ajouté à la colonie bactérienne isolée sur une lame de verre (**Haque, 2022**). La décomposition de l'eau oxygénée se traduit par un dégagement de bulles de gaz (catalase positif) selon la réaction suivante : $\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$.

✓ Recherche de l'oxydase

L'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries Gram négative qui produisent cette enzyme. A l'aide de pinces, un disque d'oxydase a été placé sur une lame. Une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche a été prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur, la colonie a été étalée doucement sur le disque.

L'apparition d'une coloration bleu foncé à violet dans un délai de 30 secondes indique une oxydase positive. L'absence de coloration signifie que l'oxydase est négative (**Dimri et al., 2020**).

✓ Recherche de la β -galactosidase (ONPG)

Le test ONPG est utilisé pour détecter l'enzyme β -galactosidase, présente dans les fermenteurs tardifs du lactose. Une suspension bactérienne dense a été ajoutée dans un tube contenant de l'eau distillée stérile et un disque d'ONPG, le tube a été incubé à 37°C pendant 30min. Milieu devient jaune, la bactérie possède une β - galactosidase.

Si le milieu reste inchangé la bactérie ne possède pas la β - galactosidase cyclooxygénases (**Dimri et al., 2020**).

✓ Recherche de la mobilité/ fermentation du mannitol

Le milieu Mannitol Mobilité Nitrate est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. L'ensemencement a été réalisé par piqûre centrale dans la gélose jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. La fermentation du mannitol se traduit par un virage du milieu au jaune. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement (**Dimri et al., 2020**).

✓ Recherche de la nitrate-réductase

En absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Le bouillon nitraté a étéensemencé avec quelques gouttes de suspension bactérienne et incubé à 37°C pendant 24 h. Quelques gouttes de réactif NRI et NRII ont été ajoutées après l'incubation. Si le milieu devient rouge, la bactérie possède donc une nitrate-réductase.

Si le milieu reste inchangé la poudre de zinc est ajoutée pour jouer le même rôle que le nitrate réductase vis-à-vis des nitrates.

- Coloration rouge : il y a transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possède pas cette enzyme.
- Pas de coloration : les nitrates sont transformés par la bactérie au-delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme (**Dimri et al., 2020**).

✓ Etude de la voie d'attaque des glucides (MEVAG)

Ce test est effectué sur le milieu MEVAG afin 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, l'un d'eux était couvert par l'huile de vaseline pour créer l'anaérobiose. L'incubation a été faite à 37°C pendant 24h.

- Si les deux tubes restent inchangés, la bactérie ne peut donc pas fermenter le glucose, le métabolisme est inerte.
- Si dans le tube anaérobie, il n'ya pas de culture et 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 les deux tubes sont jaunes, il y a donc acidification dans les deux tubes, la bactérie a un métabolisme fermentatif et oxydatif du glucose.
- Si le tube avec l'huile seulement est jaune, il y a acidification il s'agit donc d'un métabolisme fermentatif.
- Si le haut du tube est bleu, les bactéries sont inertes au glucose il y a donc utilisation des peptides comme source d'énergie (**Haque, 2022**).
- ✓ **Mise en évidence de l'utilisation du glucose, du lactose et de la production d'H₂S et du gaz**

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.

- Pour la fermentation du glucose un résultat positif se traduit par une coloration jaune du culot.
- Pour la fermentation du lactose ou du saccharose, la pente inclinée prend une coloration jaune (lactose/saccharose fermenté).
- La production du gaz se traduit par un décollement de la gélose.
- La formation d'H₂S se traduit par une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqure (**Haque, 2022**).
- ✓ **Mise en évidence de la production d'acides mixtes et d'acétyl-méthyl-carbinol (acétoïne)**

Les deux tests ont été effectués dans le bouillon Clark et Lubs .Deux tubes de ce dernier ont été inoculés par une goutte d'une suspension bactérienne. Après 18h à 37°C, chaque tube sert à révéler une des 2 voies :

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

Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une coloration rose cerise pour les deux tests (**Dimri et al., 2020**).

✓ Production d'indole

La culture est effectuée dans une eau peptonée exempte d'indole ou dans le milieu Urée-indole. La lecture se fait après incubation à 37°C pendant 24h, l'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs. L'apparition d'un anneau rouge, indique une réaction positive (**Dimri *et al.*, 2020**).

✓ Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Ce test est réalisé sur le milieu de Simmons avec ensemencement par stries serrées sur la surface de la gélose. La lecture se fait après incubation à 37°C pendant 24h. Une culture bactérienne abondante avec bleuissement du milieu démontre l'utilisation de citrate (**Haque, 2022**).

2.3.4. Standardisation

La connaissance de la charge de l'inoculum reste primordiale pour la fiabilité de chaque test. Un ml (1ml) de la culture bactérienne A1 a été inoculé dans 10 ml de bouillon nutritif, puis incubé à 37°C pendant 24 h; au terme d'incubation, la DO a été ajustée jusqu'à 0.12 (600nm).

2.3.5. Préparation de l'inoculum

Des colonies de la souche à tester ont étéensemencées dans un flacon de 200 ml contenant 5 ml de BN (annexe 05). L'incubation a été effectuée dans l'étuve à 37°C pendant 18 h. La culture a été centrifugée dans des eppendorfs à 6000rpm pendant 10 min. Le lavage du culot a été effectué par une solution de PBS. Une deuxième centrifugation a été faite à 6000 rpm pendant 10 min. Le culot a été récupérer par PBS et on a ajustée la DO à 0.12.

2.4. Effet de quelques paramètres sur la croissance de la souche A1 et la biodégradation de l'APAP

2.4.1. Effet de la variation de la concentration de l'APAP sur la croissance de la souche A1

Dans quatre erlenmeyers stériles de 100 ml contenant 19 ml de milieu liquide MMM additionné de différentes concentrations d'APAP ; 10mg/L, 50mg/L, 100mg/L, 500mg/L comme seule source de carbone et d'énergie, un volume de 1 ml de l'inoculum (DO 0.12) a été ajouté, les erlenmeyers ont été recouvert par du papier aluminium pour éviter la photodégradation et fermés par des bouchons en coton couverts de gaze pour permettre le maintien des conditions aérobies. L'incubation était faite dans l'étuve à agitation (INFORS HT Ecotron) à 150 rpm pendant 48 h avec mesure de l'absorbance à 600 nm (comme indicateur de la croissance) chaque 24 h. Après 48h la méthode colorimétrique a été utilisé pour estimer le pourcentage de dégradation de

l'APAP sous l'influence de différentes concentrations, pour cela un échantillon de 2ml a été prélevé et centrifugé à 14000 rpm pendant 20 minutes avant d'être testé (**Palma, 2018 ; Chopra et Kumar, 2020**).

2.4.2. Effet de la variation du pH initial sur la croissance de la souche A₁

Dans quatre erlenmeyers contenant 19ml de milieu MM, le pH initial a été ajusté à 5, 6, 7 et 8 puis additionné d'une concentration de 50 mg/L de l'APAP. Par la suite, les erlenmeyers ont été inoculés par 1 ml d'une culture jeune (18 h d'incubation) de la souche A₁. Les flacons ont été recouverts par du papier d'aluminium pour éviter la photodégradation, fermés par le coton couvert de gaze pour permettre le maintien des conditions aérobies et incubé à 37°C pendant 48h sous agitation (150 rpm). La DO a été mesurée à 600 nm chaque 24 h. Après 48h la méthode colorimétrique a été utilisée pour estimer le pourcentage de dégradation de l'APAP sous l'influence de différents pH, pour cela et à partir de chaque culture, un échantillon de 2ml a été prélevé et centrifugé à 14000 rpm pendant 20 minutes avant d'être testé (**Aissaoui *et al.*, 2017b ; Chopra et Kumar, 2020**).

2.4.3. Effet de la concentration cellulaire de l'inoculum sur la croissance de la souche A₁

Dans trois erlenmeyers contenant 19ml du milieu MM, le pH a été ajusté à 7, puis additionné d'une concentration de 50 mg/L d'APAP. Par la suite, chaque erlenmeyer a été inoculé par 1 ml d'une culture jeune de la souche bactérienne A₁ (18 h d'incubation) contenant 10⁴, 10⁶ et 10⁸UFC/ml, respectivement. Les flacons ont été recouverts par du papier d'aluminium pour éviter la photodégradation, fermés par le coton couvert de gaze pour permettre le maintien des conditions aérobies et incubé à 37°C pendant 48 h sous agitation (150 rpm). La DO a été mesurée à 600 nm chaque 24 h. Après 48h la méthode colorimétrique a été utilisée pour estimer le pourcentage de dégradation de l'APAP sous l'influence de différentes concentration cellulaire de l'inoculum.

2.4.4. Effet de la variation de temps sur la croissance de la souche A₁

Dans un erlenmeyer stérile de 100 ml contenant 19 ml du milieu liquide MMM, le pH a été ajusté à 7 puis additionné de concentration de l'APAP 50 mg/L, un volume de 1ml d'inoculum (10⁸UFC/ml) a été ajouté. L'erlenmeyer était recouvert par du papier aluminium pour éviter la photodégradation et fermé par le coton couvert de la gaze pour permettre le maintien des conditions aérobies. L'incubation a été faite dans l'étuve à agitation à 150 rpm pendant 96 h avec mesure de l'absorbance à 600 nm (comme indicateur de la croissance) chaque 24 h. Parallèlement, et à partir des flacons d'échantillons de chaque temps (T₀, T₂₄, T₄₈, T₇₂, T₉₆) de 2

ml ont été prélevés, centrifugés à une vitesse de 14000 rpm pendant 20 min. Les surnageants ont été conservés au congélateur pour le dosage ultérieur de l'APAP par la méthode colorimétrique.

2.4.5. Dosage de l'APAP par colorimétrie

Dans cette expérience, nous avons utilisé la méthode colorimétrique pour détecter le pourcentage de dégradation de l'APAP par l'isolat A1. 250µl des surnageants collectés des cultures ont été mélangés avec 500µl d'acide trichloroacétique (15%) et centrifugé (Hettich ZENTRIFUGEN) jusqu'à formation d'un surnageant clair (6000 rpm pendant 05min). Après cela, 600µl du surnageant a été transféré à un tube contenant 250µl de 6NHCl et 200µl de nitrite de sodium. Cette réaction produit de l'acide nitreux qui est neutralisé par l'addition de 500µl d'acide sulfamique (15%) et 1,250µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (15%). Le spectrophotomètre UV (SHIMADZU) a été utilisé pour détecter l'absorbance du mélange finale à 240 nm (**Chopra et Kumar., 2020**).

2.4.6. Calcul le taux de dégradation de l'acétaminophène (APAP)

Pour estimer le pourcentage de dégradation de l'APAP après dosage colorimétrique (**Chopra et Kumar, 2020**), nous avons utilisé l'équation suivante :

$$\text{Taux d'élimination (\%)} = \frac{C_0 - C_T}{C_0} \times (100) \text{ (Voir annexe IV).}$$

Où : C_0 : absorbance à la concentration initiale de l'APAP

C_T : absorbance après l'incubation au temps T

Résultats et discussion

3.1. Identification de l'isolat bactérien A1

3.1.1. Identification morphologique

3.1.2. Observation macroscopique

Les caractéristiques morphologiques observées comprennent la forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'élévation, le contour, la surface de la colonie bactérienne et l'aspect des colonies ce qui nous permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification (Yang et al., 2019).

Le type de colonies de la souche A1 est caractérisé par un aspect aplatie, lisse, contours réguliers, une petite taille, forme ronde, avec une consistance crémeuse et une couleur transparente (voir annexe II).

3.1.3. Observation microscopique

Une observation au microscope optique (Motic) a été réalisée en lumière blanche, éclairage direct de la préparation (grossissement : objectif x100). Après une coloration de Gram, les cellules ont la forme de coque colorée en rose (Gram-) (voir annexe II).

3.1.4. Identification biochimique de l'isolat bactérien A1

D'après le **tableau 04**, les résultats des tests biochimiques effectués sur l'isolat A1 ont montré que la bactérie est immobile, aéro-anaérobie facultative, dépourvue d'une activité oxydase et possède une nitrate réductase et une catalase.

Tableau 04. Caractéristiques biochimiques de l'isolat bactérien du sol.

Tests	A1
Oxydase	-
Catalase	+
Mannitol	+
Mobilité	-
Citrate	-
RM	+
VP	-
TSI	
Glucose	-
Lactose	-
H ₂ S	+
MEVAG	
Ouvert	+
Fermé	+
Indole	+
ONPG	-

Positive : + ; Négative : -

Ces caractères d'identification ne sont pas suffisants pour une orientation précise vers le genre ou l'espèce des isolats, du fait qu'il existe d'autres tests clés dans l'identification qui n'ont pas été réalisés.

Dans notre travail, nous avons comparé les caractères étudiés avec ceux des Genres bactériens publiés dans la 2ème édition du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ». Nous avons pu assimiler l'isolat au genre *Acinetobacter* sp.

3.2. Effet de la variation de la concentration de l'APAP sur la croissance bactérienne de la souche A₁

Le but de cette expérience est d'étudier la biodégradation de l'APAP en utilisant une souche bactérienne A₁ isolée à partir du sol, d'estimer l'effet de l'APAP sur sa croissance et de déterminer la concentration maximale tolérée par la souche. Une gamme de différentes concentrations croissantes de l'APAP a été utilisée, en partant de 10 mg/L, 50 mg/L, 100mg/L et 500mg/L. Le test a été réalisé pendant 48h dans l'obscurité afin d'éviter la photodégradation du substrat. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 1 (Voir annexe III) et la **figure 06**.

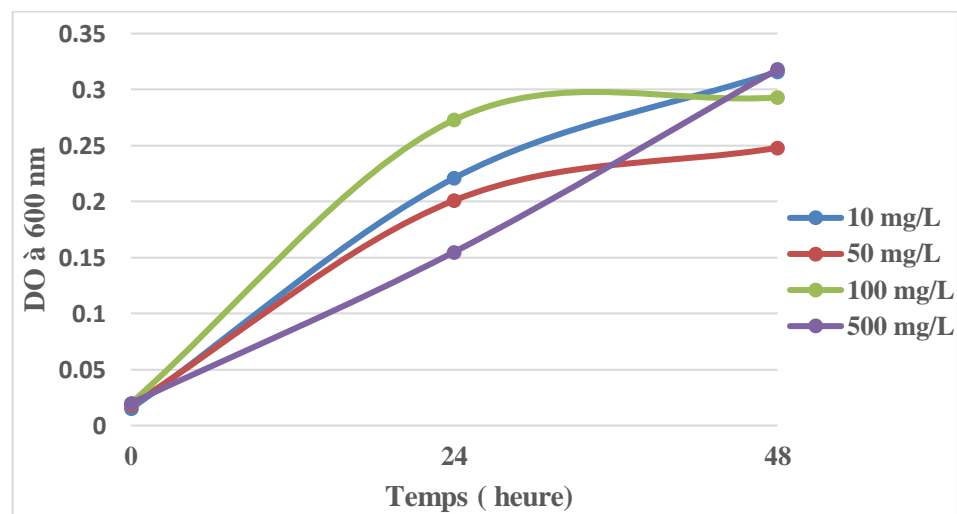


Figure 06. Effet de la variation de la concentration de l'APAP sur la croissance de la souche *Acinetobacter* sp.A1 incubée à 37° C sous agitation.

Selon la **figure 06** et le tableau 1(annexe III), on remarque qu'il y a une bonne croissance en présence de l'APAP aux différentes concentrations testées, certaines sont plus importantes que d'autres, ce qui indique que l'APAP pourrait favoriser la croissance des bactéries, et qu'il pourrait être dégradé par la bactérie. Une augmentation graduelle de la croissance de la souche A₁ durant 24h, a été observée jusqu'à atteindre son maximum à 48h. La concentration de 500 mg/L d'APAP, marque la DO la plus élevée (0,318). Quant à la concentration de 50 mg/L, elle a noté la valeur de DO la plus faible (0,248), cela indique une faible croissance cellulaire par rapport aux autres concentrations, ce qui peut être expliqué par la consommation de la seule source de carbone disponible dans le milieu comme a été rapporté par **Palma et al., (2021)**. Concernant les concentrations 10 et 100 mg/L, la croissance bactérienne est qualifiée moyenne, avec des valeurs de DO de 0,316 et 0,293, respectivement.

En se basant sur les résultats du taux d'élimination illustrés dans la **figure 07**, nous pouvons dire que, la souche A₁ est capable de dégrader différentes concentration de l'APAP avec des taux

d'élimination différents. L'APAP est partiellement biodégradé par la souche A1 avec un taux d'élimination d'environ 68.7% à une concentration initiale de 10mg/L et un taux maximal de 74.8% à la concentration 50mg/L, cela est dû au fait que la bactérie pouvait tolérer les concentrations faibles de paracétamol. En revanche, le taux de biodégradation était très faible aux concentrations 100 et 500mg/L, nous les avons estimé à 12.5% et 6.3%, respectivement, ceci est probablement dû au fait que les bactéries à Gram négatif ne peuvent pas résister de fortes concentrations de paracétamol, contrairement aux bactéries à Gram négatif qui peuvent tolérer des concentrations très élevées de paracétamol (Zhang et al., 2013). D'après ces résultats, la concentration de paracétamol qui a donné le taux de dégradation le plus important est 50mg/L avec un pourcentage d'élimination d'environ 75%. Nos résultats sont proches de ceux rapportés par Zur et al., (2020) qui ont enregistré une dégradation complète en présence d'une souche de *Pseudomonas moorei* KB4.

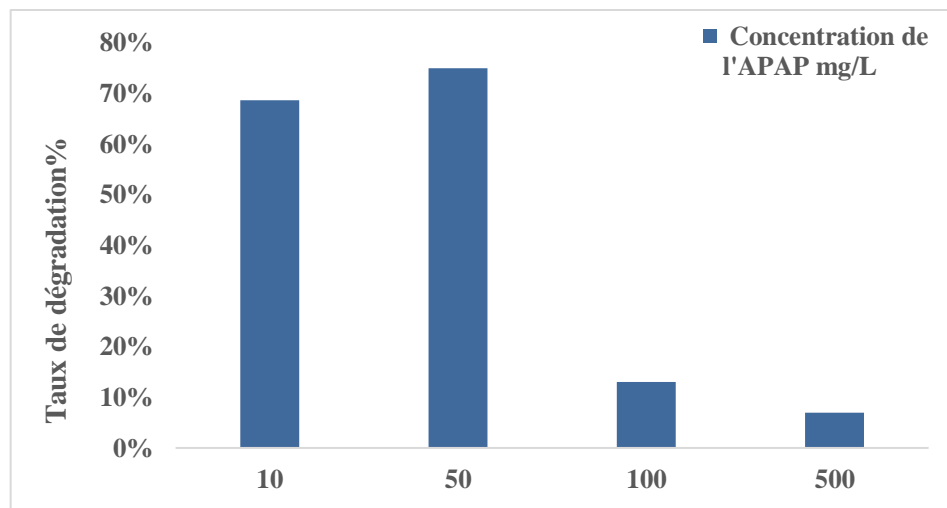


Figure 07. Variation du taux de biodégradation de l'APAP par la souche *Acinetobacter* sp.A1 en fonction de la variation de la concentration du médicament après 48h d'incubation à 37° C sous agitation.

3.3. Effet de la variation du pH sur la dégradation de l'APAP par *Acinetobacter* sp.A1.

Le taux de dégradation du paracétamol a été testé en présence de la souche bactérienne *Acinetobacter* sp. A1 en examinant l'effet des changements de pH dans l'intervalle de 5 à 8 pendant 48 heures.



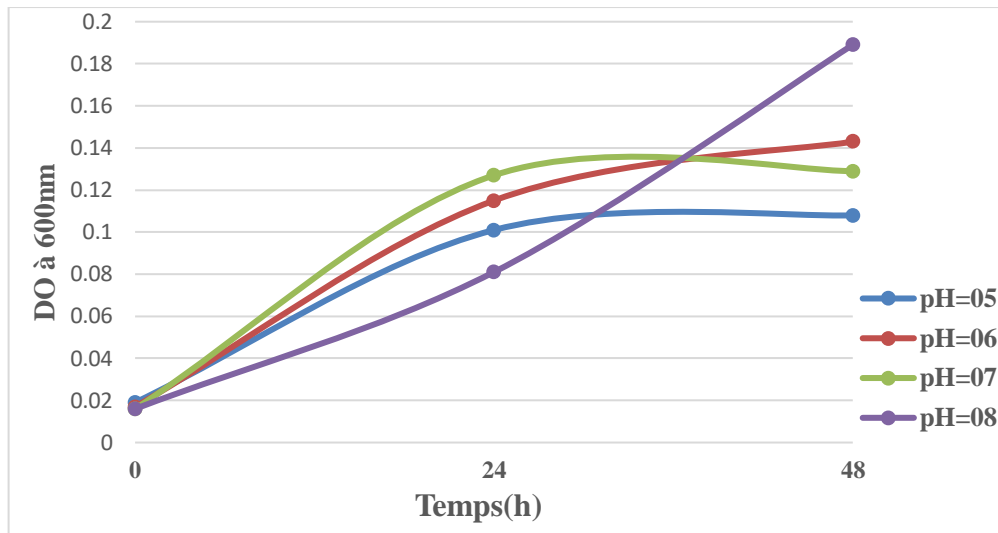


Figure 08. Effet de la variation du pH initial sur la croissance de la souche *Acinetobacter* sp.A1 incubée en présence de 50 mg/L de paracétamol à 37° C sous agitation.

D'après les résultats obtenus dans la **figure 08** et le tableau 2 (annexe III), nous notons que la croissance de la souche commence dans les premières heures d'incubation, où nous avons enregistré des valeurs de DO allant de 0,101 à 0,127 pour atteindre une augmentation maximale de 0,189 après 48 heures.

La **figure 09** montre que le pourcentage le plus élevé de dégradation du paracétamol a été noté à un pH de 7 avec un taux de 70% par rapport aux autres valeurs de 38 %, 68 % et 52 % correspondant respectivement à des pH de 5, 6 et 8, après 48 heures, ces résultats confirment la présence d'un effet du pH sur la dégradation et la décomposition du paracétamol (**Hu et al.,2012 ; Chopra et al., 2020**).

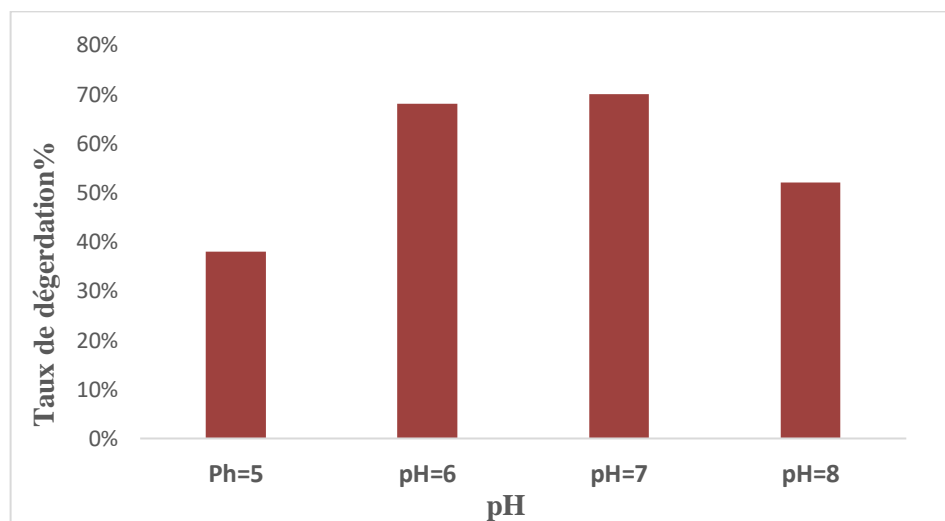


Figure 09. Variation du taux de biodégradation de l'APAP par la souche *Acinetobacter* sp. A1 en fonction de la variation du pH après 48h d'incubation à 37° C sous agitation.

La capacité accrue internaliser les polluants organiques par les cellules bactériennes est liée à la structure et aux propriétés des membranes cellulaires et à leur morphologie. Le pH est un facteur important qui affecte directement cette capacité en modifiant la structure des enzymes et des molécules de substrat et en changeant ainsi les interactions électrostatiques entre le médicament et la surface de la cellule vivante, ce qui à son tour conduit à affecter le processus d'absorption et la toxicité des polluants. La plupart des bactéries se développent mieux à pH neutre ou proche de celui-ci car il est considéré comme le pH optimal pour la production de l'énergie nécessaire à la respiration cellulaire et à l'augmentation de la perméabilité des membranes ainsi qu'à l'activité de certaines enzymes sensibles à ses modifications. D'autre part, le paracétamol possède en milieu alcalin une propriété importante, sa valeur de pKa qui est de 9.5, ce qui le rend présent sous la forme non ionique donc il a été remarqué qu'il se convertissait sous forme de phénols (RO-) lorsque le pH est élevé et la formation de la forme protonique (ROH) avec des niveaux de pH faibles (Zhang et al., 2013 ; Žur et al., 2018).

2.3. Effet de concentration de l'inoculum sur la biodégradation du paracétamol par *Acinetobacter* sp.A1

Le but de ce test est d'évaluer la capacité de la souche bactérienne *Acinetobacter* sp.A1 à éliminer le paracétamol à différentes concentrations d'inoculum 10^4 , 10^6 et 10^8 UFC/ml et à étudier l'effet de ce paramètre sur sa biodégradation.

Selon la **figure 10** et le tableau 3 les résultats montrent que la croissance de la souche A1 est élevée au cours des premières 24 heures d'incubation où sa valeur maximale de la DO est de 0,466 lorsque la concentration cellulaire de l'inoculum est égale à 10^8 UFC/ml. Tandis que pour les concentrations 10^6 et 10^4 la croissance bactérienne est qualifiée moyenne, avec des valeurs de DO de 0,335 et 0,362, respectivement.

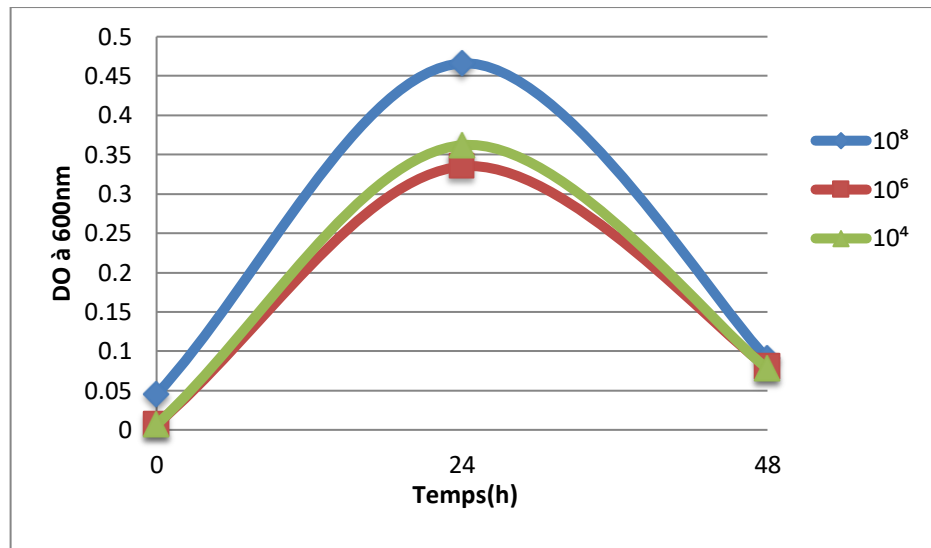


Figure 10. Effet de la variation de la concentration de l'inoculum sur la croissance de la souche *Acinetobacter* sp. A1 incubée en présence de 50 mg/L de paracétamol à pH 7 à 37° C sous agitation.

Après 48h, nous avons remarqué d'après la figure 11 et le tableau 3 (Annexe III) une diminution significative du taux de croissance avec des valeurs de 0.091 pour la concentration de 10^8 UFC/ml, 0.080 pour la concentration de 10^6 UFC/ml et 0.078 pour la concentration de 10^4 UFC/ml.

Nous avons remarqué d'après la **figure 11** une dégradation partielle du paracétamol à un pourcentage égale à 71% en présence d'une concentration cellulaire avoisinant les 10^8 UFC/ml, toutefois, des taux de biodégradation moyens ont été notés lorsque la concentration en cellule de l'inoculum est égale à 10^6 UFC/ml et 10^4 UFC/ml avec des pourcentages de 49 % et 44 %, respectivement. La dégradation biologique des composés organiques polluants l'environnement est lié à plusieurs facteurs, dont la concentration de médicament dans le milieu et la capacité des microorganismes à s'y adapter (**Edrees et al., 2017**).

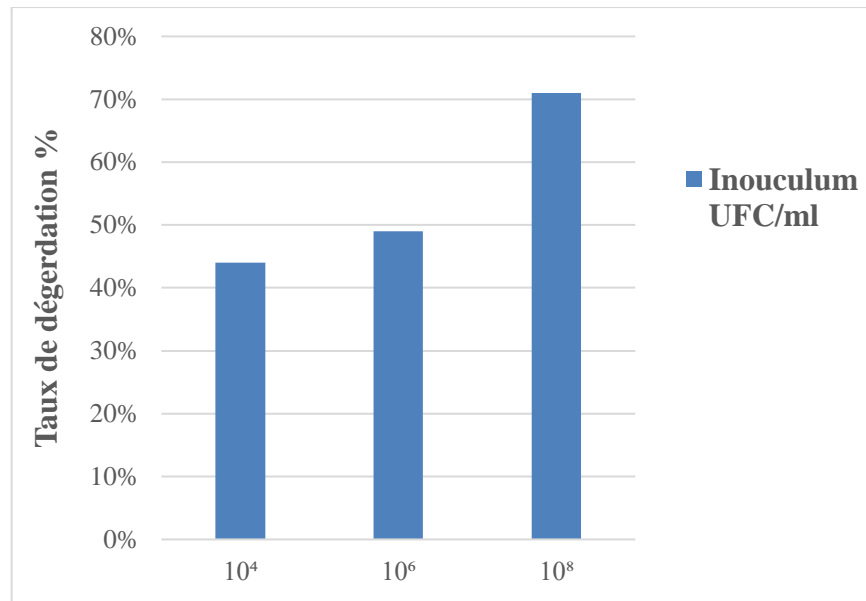


Figure 11. Variation du taux de biodégradation de l'APAP par la souche *Acinetobacter* sp. A1 en fonction de la variation de la concentration cellulaire de l'inoculum après 48 h d'incubation en présence de 50 mg/L de paracétamol à pH 7 à 37° C sous agitation.

La dégradation du paracétamol dépend en grande partie de la production de la biomasse microbienne. La taille de l'inoculum est un facteur important pour atteindre de meilleurs taux de tolérance et de biodégradation du paracétamol qui augmentent linéairement avec l'augmentation de la quantité de biomasse initiale. La production importante de biomasse contribue à augmenter la capacité de ces micro-organismes à décomposer et à se débarrasser des polluants pharmaceutiques en augmentant leur absorption biologique, qui est un mécanisme dominant dans la dégradation biologique à long terme (Wolski et al., 2006; Liu et al., 2018).

Effet de la variation du temps d'incubation sur la croissance de la souche *Acinetobacter* sp. A 1

L'effet du temps d'incubation sur la croissance de la souche *Acinetobacter* sp. A 1 a été évalué pendant 96h dans l'obscurité. Les résultats de la croissance de la souche A1 en présence de l'APAP à une concentration de 50 mg/L ont été suivis par mesure de la DO après chaque 24h (t0, t24, t48, t72 et t96h). La **figure 12** montre les résultats obtenus.

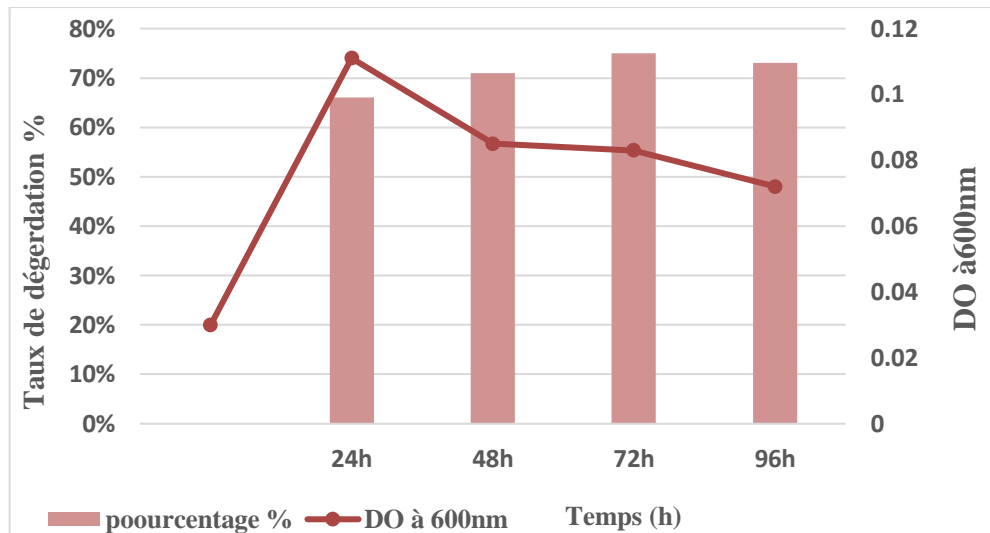


Figure 12. Effet de la variation du temps d'incubation sur la croissance de la souche *Acinetobacter sp.A1* et sur la biodégradation de l'APAP en présence de 50 mg/L de paracétamol à pH 7 à 37° C sous agitation.

La **figure 12** et le tableau 4 (annexe III) tableau 4 montrent qu'il y a une croissance de la souche présente dans le milieu MMM contenant 50 mg/L de paracétamol. Ceci indique que cette souche a la capacité de l'utiliser, le biodégrader et/ou le minéraliser. On remarque aussi que la croissance de la souche sélectionnée varie et augmente en fonction du temps. La mesure de la DO pour la souche A1 correspond à 0.03 en t_0 , 0.111 en t_{24} , 0.085 en t_{48} , 0.083 en t_{72} et 0.082 en t_{96} .

La croissance bactérienne de la souche A1 a atteint son maximum après 24h. Ces résultats indiquent que le temps favorise la croissance de la souche A1 donc la concentration de l'APAP n'a aucun effet négatif sur la souche A1.

Une diminution de la croissance bactérienne a été observée après 24h d'incubation jusqu'à atteindre 0.072 à 96h, ceci est probablement dû à l'accumulation postérieure des résidus métaboliques produits par la bactérie devenant des composés dangereux dans le milieu ou à une déficience des nutriments dans le MMM ou à un changement des conditions physicochimiques qui deviennent défavorables ce qui cause la mort de la bactérie A1.

En se basant sur les résultats du pourcentage de biodégradation illustrés dans la **figure 12**, nous pouvons dire que, la souche est capable de dégrader l'APAP avec des taux de dégradation élevés de 66% et de 71% après 24h et 48h, respectivement. Après 72h, il atteint son maximum avec un pourcentage égal à 75%, de plus, et après 96h il diminue jusqu'à 72%. Donc le temps 72h est favorable à la biodégradation puisqu'il présente le pourcentage de dégradation le plus élevé. Ces

données peuvent être soutenues par **Edrees et al., (2017)** qui ont utilisé la souche *Pseudomonas* sp ST-1 pour une éventuelle biodégradation du paracétamol comme seule source de carbone et d'énergie. Ils ont enregistré un taux de dégradation d'environ 76,8 % en 72 h.

Conclusion

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'optimisation de quelques conditions de culture pour la biodégradation du paracétamol par une culture bactérienne préalablement isolée à partir du sol et fournie par le laboratoire de Toxicologie Moléculaire de l'Université de Jijel.

L'isolat A1 est une cocci à Gram négatif, identifié par des tests biochimiques comme étant une *Acinetobacter* sp Cette souche est capable de croître dans un milieu minéral minimum en présence de paracétamol comme seule source de carbone et d'énergie. Les conditions idéales pour la biodégradation du paracétamol par la souche *Acinetobacter* sp étaient une concentration cellulaire d'inoculation de 10^8 UFC/ml, une concentration de substrat (paracétamol) de 50 mg/ml et un pH initial de 7,0 pendant une période de 72h à 37°C sous agitation.

L'analyse du surnageant bactérien par la méthode colorimétrique a montré que le taux d'élimination du paracétamol (50 mg/ml) par la souche *Acinetobacter* sp.A1 était égal à 75%.

Dans cette étude, les informations obtenues sont utiles pour développer un procédé de culture d'*Acinetobacter* sp.A1 pour une biodégradation efficace de l'acétaminophène à grande échelle et ouvre un champ sur de nombreuses perspectives de recherche ayant pour objectif une sa décomposition biologique optimale et sans résidus secondaires, ceci peut être réalisé par les moyens suivants :

- Déterminer les voies métaboliques impliquées dans la biodégradation du paracétamol.
- Identifier les métabolites intermédiaires pour évaluer leur toxicité éventuelle et la possibilité de les dégrader par *Acinetobacter* sp.
- Compréhension approfondie d'autres genres et espèces microbiens et de leur réponse à l'environnement et aux polluants, et sélection des plus efficaces.
- Augmenter la performance des souches par optimisation des conditions optimales de culture de la concentration, le pH, le volume d'inoculum, la ventilation, et même les modifications génétiques telles que les mutagenèses qui amélioreront les performances des souches et donneront des taux de dégradation plus élevés.
- Intégrer des procédés physico-chimiques et biologiques pour favoriser la décomposition et essayer de les appliquer au niveau des sites de pollution tels que les stations d'épuration afin de réduire le coût de traitement.

Références bibliographiques

-A-

Ahmed S, Javed A, Tanvir S, Hameed A (2001). Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that degrades 4-acetamidophenol and 4-aminophenol. *Biodegradation* 12:303–309.

Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Harrouche, K., & Sghaier, H. (2017). Metabolic and co-metabolic transformation of diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 isolated from activated sludge. *Current microbiology*, 74(3), 381-388.a

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.b

Akay, C., & Tezel, U. (2016). Biotransformation of acetaminophen by four phylogenetically distinct bacteria. *Bogazici University*, 34342.

Almomani, F. A., Shawaqfah, M., Bhosale, R. R., & Kumar, A. (2016). Removal of emerging pharmaceuticals from wastewater by ozone-based advanced oxidation processes. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35(4), 982-995.

Aminoshariae, A., & Khan, A. (2015). Acetaminophen: old drug, new issues. *Journal of endodontics*, 41(5), 588-593.

Anderson, B. J. (2008). Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*, 18(10), 915-921.

Audino, F., Conte, L. O., Schenone, A. V., Pérez-Moya, M., Graells, M., & Alfano, O. M. (2019). A kinetic study for the Fenton and photo-Fenton paracetamol degradation in an annular photoreactor. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(5), 4312-4323.

Ängeby, K. K., Klintz, L., & Hoffner, S. E. (2002). Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 553-555

-B-

Bernal, V., Erto, A., Giraldo, L., & Moreno-Piraján, J. C. (2017). Effect of solution pH on the adsorption of paracetamol on chemically modified activated carbons. *Molecules*, 22(7), 1032.

Bertolini, A., Ferrari, A., Ottani, A., Guerzoni, S., Tacchi, R., & Leone, S. (2006). Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS drug reviews*, 12(3-4), 250-275.

Brieudes, V. (2014). *Caractérisation de la contamination des systèmes aquatiques par les psychotropes: développement d'une méthode de référence incluant une démarche multifactorielle de hiérarchisation* (Doctoral dissertation, Université de Bordeaux).

Bunchorntavakul, C., & Reddy, K. R. (2013). Acetaminophen-related hepatotoxicity. *Clinics in liver disease*, 17(4), 587-607.

-C-

Chopra, S., & Kumar, D. (2020). Characterization, optimization and kinetics study of acetaminophen degradation by *Bacillus drentensis* strain S1 and waste water degradation analysis. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1-18.

Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., & Sarrà, M. (2013). Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water research*, 47(14), 5200-5210.

-D-

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.

Driad, Y. (2009). *Stabilité du paracétamol: application à un sachet produit en industrie pharmaceutique* (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).

Dimri, A. G., Chaudhary, S., Singh, D., Chauhan, A., & Aggarwal, M. L. (2020). Morphological and biochemical characterization of food borne Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Dao, Y. H., Tran, H. N., Tran-Lam, T. T., Pham, T. Q., & Le, G. T. (2018). Degradation of paracetamol by an UV/chlorine advanced oxidation process: influencing factors, factorial design, and intermediates identification. *International journal of environmental research and public health*, 15(12), 2637.

-E-

Edrees, W. H. A., Abdullah, Q. Y. M., AL-Kaf, A. G., & Naji, K. M. (2017). A review on comparative study between the physicochemical and biological processes for paracetamol degradation. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*, 2(2), 32-41.

Esplugas, S., Bila, D. M., Krause, L. G. T., & Dezotti, M. (2007). Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of hazardous materials*, 149(3), 631-642.

-F-

Faber, K., RauberLüthy, C., Kupferschmidt, H., & Ceschi, A. (2010, September). Intoxication aiguë au paracétamol. In *Forum Médical Suisse*, 38(10), 647-651.

Feng, L., Van Hullebusch, E. D., Rodrigo, M. A., Esposito, G., & Oturan, M. A. (2013). Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. *Chemical Engineering Journal*, 228, 944-964.

Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M., & Larsson, D. J. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2522-2527.

-G-

Graham, G. G., Davies, M. J., Day, R. O., Mohamudally, A., & Scott, K. F. (2013). The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*, 21(3), 201-232.

-H-

Haider, M., Ahmad, Z., Shakeel, Q., Shafiq, S., Chand, S. A., Saddiq, W. M., ...& Kharal, M. (2020). Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; A major impediment to Citrus orchards. *International Journal of Biosciences*, 16, 512-517.

Haque, M. A. (2022). Isolation and Biochemical Characterization of Xylanase Enzyme Producing Bacteria from Goat Rumen.

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

Hider-Mlynarz, K., Cavalié, P., & Maison, P. (2018). Trends in analgesic consumption in France over the last 10 years and comparison of patterns across Europe. *British journal of clinical pharmacology*, 84(6), 1324-1334.

Hodgman, M. J., & Garrard, A. R. (2012). A review of acetaminophen poisoning. *Critical care clinics*, 28(4), 499-516.

Hu, J., Zhou, L., Zhou, Q. W., Wei, F., Zhang, L. L., & Chen, J. M. (2012). Biodegradation of paracetamol by aerobic granules in a sequencing batch reactor (SBR). In *Advanced Materials Research* (Vol. 441, pp. 531-535). Trans Tech Publications Ltd.

-J-

Jewell, W. J. (1987). Anaerobic sewage treatment. Part 6. *Environmental science & technology*, 21(1), 14-21.

Józwiak-Bebenista, M., & Nowak, J. Z. (2014). Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta poloniae pharmaceutica*, 71(1), 11-23.

-K-

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance. *Environmental science & technology*, 36(6), 1202-1211.

-L-

Lalert, L., Ruangvejvorachai, P., & Maneesri-le Grand, S. (2021). Chronic paracetamol treatment induces neuroinflammation and microglia activation in rat hippocampus. 65, 225-233.

Le Garrec, S., Burnat, P., & Gentes, P. (1994). Le paracétamol. *Lyon pharmaceutique*, 45(4), 227-242.

Lee, W. M. (2020). Acetaminophen toxicity: A history of serendipity and unintended consequences. *Clinical Liver Disease*, 16(Suppl 1), 34.

Liu, Y., Tie, B., Li, Y., Lei, M., Wei, X., Liu, X., & Du, H. (2018). Inoculation of soil with cadmium-resistant bacterium *Delftia* sp. B9 reduces cadmium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) grains. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 223-229.

Louvet, A., Cannesson, A., Colin, M., Mathurin, P., & Dharancy, S. (2010). Paracétamol: risque hépatique (dose thérapeutique et surdosage). *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, 17(5), 437-443.

-N-

Neamțu, M., Bobu, M., Kettrup, A., & Siminiceanu, I. (2013). Ozone photolysis of paracetamol in aqueous solution. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(10), 1264-1271.

-P-

Palma, T. L., Donaldben, M. N., Costa, M. C., & Carlier, J. D. (2018). Putative role of Flavobacterium, Dokdonella and Methylophilus strains in paracetamol biodegradation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229(6), 1-23.

Palma, T. L., Magno, G., & Costa, M. C. (2021). Biodegradation of paracetamol by some gram-positive bacterial isolates. *Current Microbiology*, 78(7), 2774-2786.

Perussolo, M. C., Guiloski, I. C., Lirola, J. R., Fockink, D. H., Corso, C. R., Bozza, D. C., ... & de Assis, H. C. S. (2019). Integrated biomarker response index to assess toxic effects of environmentally relevant concentrations of paracetamol in a neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 182, 109438.

-R-

Radjenović, J., Petrović, M., & Barceló, D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water research*, 43(3), 831-841.

-S-

Sharma, C. V., & Mehta, V. (2014). Paracetamol: mechanisms and updates. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 14(4), 153-158.

Shabani, M., Pontié, M., Younesi, H., Nacef, M., Rahimpour, A., Rahimnejad, M., & Bouchenak Khelladi, R. M. (2021). Biodegradation of acetaminophen and its main by-product 4-aminophenol by *Trichoderma harzianum* versus mixed biofilm of *Trichoderma harzianum* / *Pseudomonas fluorescens* in a fungal microbial fuel cell. *Journal of Applied Electrochemistry*, 51(4), 581-596.

-V-

Vo, H. N. P., Le, G. K., Nguyen, T. M. H., Bui, X. T., Nguyen, K. H., Rene, E. R., ... & Mohan, R. (2019). Acetaminophen micropollutant: Historical and current occurrences, toxicity, removal strategies and transformation pathways in different environments. *Chemosphere*, 236, 124391.

-W-

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.

Wolski, E. A., Murialdo, S. E., & Gonzalez, J. F. (2006). Effect of pH and inoculum size on pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas* sp. *Water SA*, 32(1), 93-97.

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.

-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.

Żur, J., Piński, A., Marchlewicz, A., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszńska, D., & Guzik, U. (2018). Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21498-21524.

Żur, J., Piński, A., Michalska, J., Hupert-Kocurek, K., Nowak, A., Wojcieszńska, D., & Guzik, U. (2020). A whole-cell immobilization system on bacterial cellulose for the paracetamol-degrading *Pseudomonas moorei* KB4 strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 149, 104919.

Annexes

Annexe I

Composition du milieu minéral minimum

Constituants	g/L
K₂HPO₄	1.60
KH₂PO₄	0.40
MgSO₄.7H₂O	0.20
CaCl₂.2H₂O	0.03
Fe cl₃.6H₂O	0.02
NH₄NO₃	0.50
extrait de levure	0.50

pH 7.0 ±0.2

Composition du Milieu PBS

Constituants	g/L
KCl	0.20
K₂HPO₄	0.24
Na₂HPO₄	1.44
NaCl	08

pH 7.0± 0.2

Composition de la gélose nutritive

Constituants	g/L
Peptone	5,00
Extrait de viande de bœuf	3,00
Chlorure de sodium	5,00
Agar-agar	15,00

pH 7,3 ± 0,2 à 25°C

Composition du bouillon nutritif

Constituants	g/L
Tryptone	10,0
Extrait de viande	5,0
Chlorure de sodium	5,0

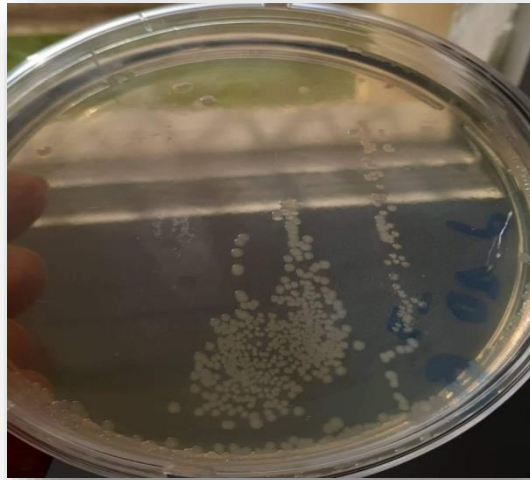
pH 7,2 ± 0,2 à 25°C

Composition du bouillon nitrate

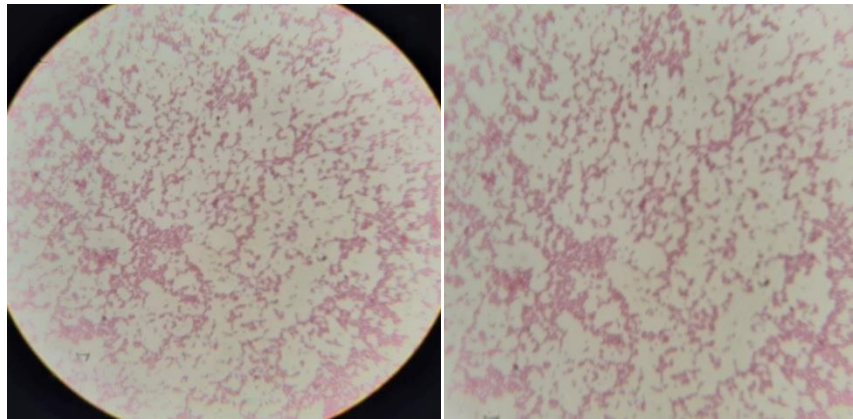
Constituants	g/L
Peptone de viande	10,0
Extrait de viande	5,00
Chlorure de sodium	5,00
Nitrate de potassium	1,00

pH 7,2

Annexe II



Photographie de l'aspect macroscopique de la bactérie A1.



Photographies de l'aspect microscopique (coloration de Gram) de bactérie A1
(Gx100).

Annexe III

1. Cinétique de croissance de la souche A1 sous différentes concentrations.

DO à 600nm

Concentrations	10	50	100	500
T ₀	0.015	0.018	0.020	0.020
T ₂₄	0.221	0.201	0.273	0.155
T ₄₈	0.316	0.248	0.293	0.318

2. Cinétique de croissance de la souche A1 à différents pH.

DO à 600nm

PH	05	06	07	08
T ₀	0.019	0.017	0.016	0.016
T ₂₄	0.101	0.115	0.127	0.081
T ₄₈	0.108	0.143	0.129	0.189

3. Cinétique de croissance de la souche A1 à différentes concentrations cellulaires d'inoculum.

DO à 600nm

Taille de l'inoculum	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁴
T ₀	0.045	0.007	0.0067
T ₂₄	0.466	0.335	0.362
T ₄₈	0.091	0.080	0.078

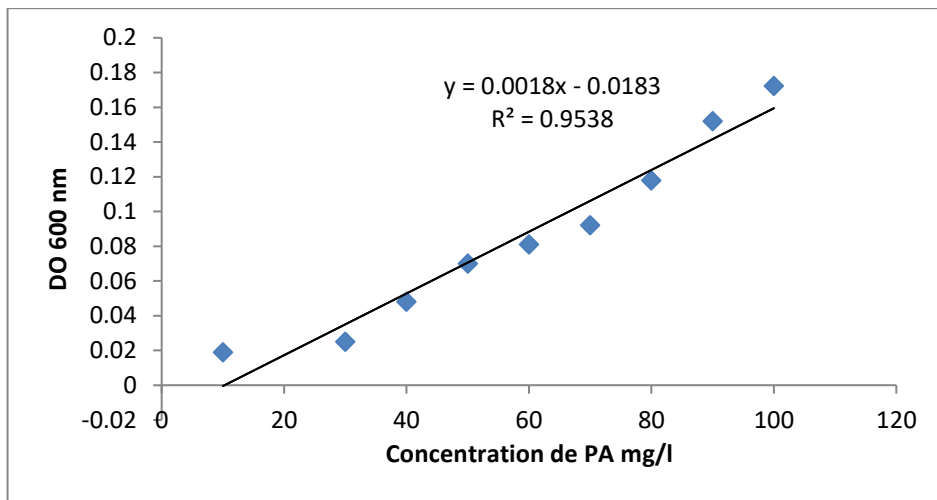
4. Cinétique de croissance de la souche A1 à différentes concentrations cellulaires d'inoculum.

DO à 600nm

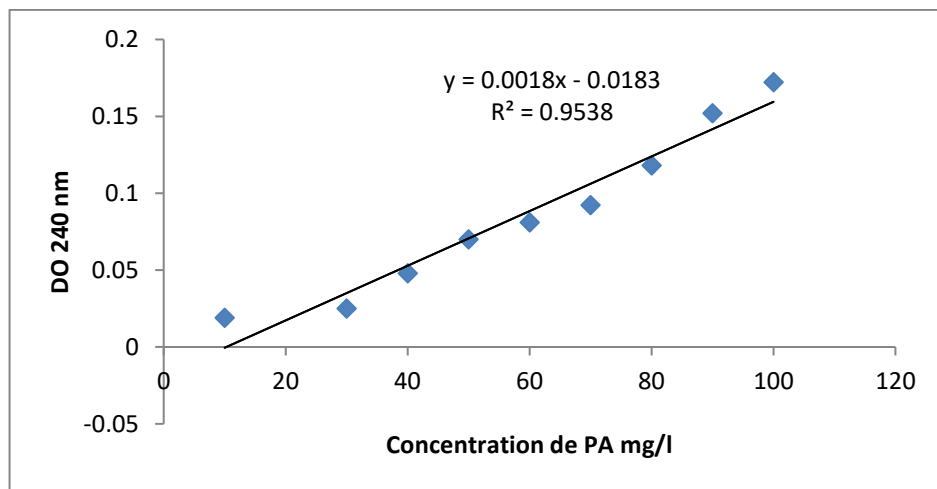
Temps	T ₀	T ₂₄	T ₄₈	T ₇₂	T ₉₆
DO 600 nm	0.03	0.111	0.085	0.083	0.072

Annexe IV

Courbe d'étalonnage de la croissance.



Courbe d'étalonnage de la dégradation par la méthode colorimétrique



Réalisé par : Rokia MEKAHLI Besma MEZHOUD Selma ZOUIKRI	Président (e) : Dr. Lilia BOUSSOUF Examinatrice: Dr. Samiya AMIRA Encadreur: Prof. Houria OULED HADDAR
--	---

Thème

Etude de l'influence de quelques conditions de culture sur la biotransformation de l'acétaminophène par des bactéries isolées du sol.

Résumé

L'acétaminophène (paracétamol, APAP) est l'un des polluants pharmaceutiques les plus courants dans l'environnement et a été classé parmi les polluants organiques émergents (POE). Sa concentration dans notre environnement n'est pas seulement nocive pour l'écosystème, mais aussi pour les êtres humains. Afin d'améliorer la biodégradation de l'acétaminophène par une bactérie isolée du sol, les effets de la concentration du médicament, de la taille d'inoculation, du temps d'incubation et du pH initial ont été étudiés. L'isolat choisis est une cocci Gram négatif. L'identification de la souche à Gram négatif a été réalisée par macro-galerie. La bactérie isolée *Acinetobacter* sp.A1 a une capacité remarquable de croître dans le milieu minéral minimum en présence du paracétamol comme seule source de carbone et d'énergie. Cette dernière a montré un taux de biodégradation maximal lorsque l'inoculum comporte 10^8 UFC/ml, la concentration du substrat est de 50mg/ml, pH initial 7,0 après 72 h d'incubation à 37°C. Selon la méthode colorimétrique, le taux d'élimination du paracétamol après 72 h par la souche *Acinetobacter* sp.A1 est d'environ 75%.

Mots clés : Biodégradation, Acétaminophène, *Acinetobacter* sp, Optimisation

Abstract

Acetaminophen (paracetamol, APAP) is one of the most common pharmaceutical pollutants in the environment and has been classified as an emerging organic pollutant (EOP). Its concentration in our environment is not only harmful for the ecosystem, but also for human beings. In order to improve the biodegradation of acetaminophen by bacteria isolated from soil, the effects of drug concentration, inoculation size, incubation time and initial pH were studied. The selected isolate is Gram-negative Cocci. The identification of the Gram-negative strain was carried out by macro-gallery. The isolated bacterium *Acinetobacter* sp.A1 has the ability to grow in the minimum mineral medium MMM in presence of paracetamol as the sole source of carbon and energy. The latter showed a maximum biodegradation when the inoculation size was 10^8 CFU/ml, concentration of paracetamol was 50mg/ml, with an initial pH of 7.0 after 72h of incubation at 37°C. Based on the colorimetric method, the paracetamol elimination rate after 72 h by *Acinetobacter* sp.A1 was approximately 75%.

Key words: Biodegradation, Acetaminophen, *Acinetobacter* sp, Optimization.

ملخص

يعد الأسييتامينوفين (باراسيتامول، APAP) أحد أكثر الملوثات الصيدلانية شيوعاً في البيئة وقد تم تصنيفه على أنه ملوث عضوي ناشئ (EOP). تركيزه في بيئتنا ليس فقط، ضاراً بالنظام البيئي ولكن أيضاً للبشر. من أجل الحصول على تحليل حيوي أمثل للأسييتامينوفين بواسطة البكتيريا المعزولة من التربة، تمت دراسة تأثير تركيز اللقاح و تركيز الدواء والرقم الهيدروجيني الأولي وكذلك مدة الحضانة. العزلة المختارة عبارة عن مكورة سالبة الجرام. تم تحديد جنس العزلة A1 بواسطة الإختبارات الكيموحيوية. تمتلك البكتيريا المعزولة *Acinetobacter* sp. القدرة على النمو في وسط معدني أدنى MMM في وجود الباراسيتامول كمصدر وحيد للكربون والطاقة. تم تسجيل أقصى نسبة تحليل حيوي عند استعمال تركيز خلايا اللقاح مساو ل 10^8 وحدة تشكيل المستعمرات في مل، وفي وجود تركيز 50 مجم / مل من الدواء، و رقم هيدروجيني أولي 7.0 خلال 72 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 37°C. وفقاً لطريقة القياس اللوني فإن نسبة إزالة الباراسيتامول بعد 72 ساعة بواسطة سلالة *Acinetobacter* sp.A1 بلغ حوالي 75%.

الكلمات المفتاحية: التحلل البيولوجي، الأسييتامينوفان، *Acinetobacter* sp، تحديد ظروف الحضانة المثلى.