

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

Université de Jijel

جامعة جيجل

Faculté des Sciences Exactes et Sciences

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة و الحياة

de la Nature et de La vie

Département de Biologie Cellulaire et

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Moléculaire



Mémoire de Fin d'Etudes pour l'Obtention du Diplôme de

Master II en Biologie

جامعة محمد الصاديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبية
رقم الجرد : A.853

Option : *Microbiologie Appliquée*

Intitulé:

*La biodégradation du Sulfaméthoxazole par des bactéries isolées
des eaux usées*

Membres de Jury :

Présidente : D^r Laggoune Souheila

Examinatrice : M^{me} Bousdira Fathia

Encadreure : D^r Ouled Haddar Houria



Présenté par :

Boumezbar Imane

Kemel Wahiba

Lazreg Nawel

Année Universitaire: 2011-2012

Remerciements

Nous remercions tout d'abord « Allah » le tout puissant de nous avoir donné la foi, qui nous a guidé et a éclairé notre chemin pour la réalisation et l'élaboration d notre projet.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude et notre profond respect et nos remerciements les plus sincères à :

Notre encadreur D^r Ouled Haddar Houria, pour son encadrement apprécié, sa disponibilité, ses orientations, ses précieux conseils et ses encouragements qui nous ont permis de mener à bien ce travail sans oublier ses qualités humaines.

Nos remerciements s'adressent également M^{lle} Laggoune pour avoir accepté de présider ce jury ; et M^{me} Bousdira pour avoir accepté d'examiner ce travail

L'ensemble des enseignants ayant contribué de près ou de loin à notre formation qu'ils trouvent à travers lignes l'exemption de notre plus grande considération.

Nos remerciements vont également à M^{lle} Aissaoui Salima pour son aide et encouragement, tous les ingénieurs de laboratoire et tous les personnets qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des tableaux :

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques du sulfaméthoxazole.....	8
Tableau 2: Efficacité d'élimination (%) de SMX et ces métabolites (Acetyl-SMX) par des processus de traitement secondaire (bous activée et bioréacteur à membrane).....	12
Tableau 3: Caractéristiques des neuf souches isolées.....	20
Tableau 4: Croissance des souches bactériennes isolées sur milieu minimum en présence de Sulfaméthoxazole.....	21
Tableau 5: Résultats de l'identification biochimique des deux souches bactériennes S2 et S4...	25
Tableau 6: La cinétique de croissance des deux souches <i>Micrococcus sp</i> et <i>Pseudomonas sp</i> pendant le test de la biodégradation avec les concentrations du SMX détecté par HPLC.....	27

Liste des figures :

Figure 1: La structure du sulfaméthoxazole.....	7
Figure 2: La souche S4 sur Gélose nutritive.....	19
Figure 3: La souche S2 sur Gélose nutritive.....	19
Figure 4: La cinétique de croissance des neuf souches isolées en fonction du temps sur milieu minimum en présence du SMX à 6 mg/l à 26°C.....	22
Figure 5: <i>Micrococcus sp</i> sur Chapman.....	26
Figure 6: Biodégradation du sulfaméthoxazole (SMX) par <i>Micrococcus sp</i> pendant 48h d'incubation.....	28
Figure 7: Biodégradation du sulfaméthoxazole (SMX) par <i>Pseudomonas sp</i> pendant 48h d'incubation.....	28
Figure 8 : Chromatogrammes d'HPLC obtenus avec le test de biodégradation du Sulfaméthoxazole par <i>Pseudomonas sp</i>	30

Liste des abréviations :

ADH : Arginine-Dihydrolase

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens.

BA : Boue Activée.

BRM : Bioréacteurs à Membrane

DN: Dénitrification

DO : Densité Optique

GN : Gélose Nutritive

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

Kow : Coefficients de partage octanol-eau

LDC : Lysine-Décarboxylase

MEVAG : Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides

MNU : Médicaments Non Utilisés

MP: Point d'ébullition

MMML : Milieu Minimum Minéral Liquide.

MMMS : Milieu Minimum Minéral Solide.

N₄-AcSNs : N₄-Acétyle Sulfonamides.

N: Nitrification

O₃ : l'Ozone

ODC : Ornithine-Décarboxylase

OH : Radicaux Hydroxyles

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

pKa : Constante de dissociation acide-base.

POA : Procédée d'Oxydation Avancée.

RM : Rouge de Méthyle.

rpm : Rotation par Minutes

SMX : Sulfamethoxazole.

SNs : Sulfonamides.

STEP : Stations de **T**raitement et d'**E**puration des eaux usées.

TDA : Tryptophane **D**ésaminase.

TRH : Temps de **R**étention **H**ydraulique

TRS : Temps de **R**étention **S**olide.

TSI : Triple Sugar **I**ron agar.

UV : Rayon ultra **V**iolet.

VP : Vogue-**P**roskauer.

SOMMAIRE

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
1. Les déchets pharmaceutiques	2
2. L'origine des substances pharmaceutiques.....	2
2.1. Les médicaments à usage humain.....	2
2.2. Les médicaments à usage vétérinaire.....	3
2.3. Les déchets issus de l'industrie pharmaceutique et chimique	3
2.4. Les médicaments non utilisés	3
3. Contamination de l'environnement par les déchets pharmaceutiques	4
3.1. La contamination de l'atmosphère.....	4
3.2. La contamination des sols.....	4
3.3. Contamination des milieux aquatiques et des ressources en eau.....	4
4. L'évaluation des risques liés à la présence de résidus de médicaments dans l'environnement	5
4.1. Les risques pour l'environnement	6
4.2. Les risques pour l'Homme	7
5. Etude de quelques substances pharmaceutiques : cas de Sulfaméthoxazole	7
6. Les mécanismes d'élimination des produits pharmaceutiques	9
6.1. La dégradation abiotique	9
6.1.1. Processus d'oxydation avancée	9
6.1.2. L'ozonation	9
6.1.3. La dégradation photochimique	10
6.2. La biodégradation	10
Matériels et méthodes	
I. Matériel	14
I.1. Les échantillons.....	14
I.2. La substance pharmaceutique utilisée	14
I.3. Milieux de culture et réactifs	14

I.4. Solvants d'HPLC.....	15
I.5. Appareillage	15
II. Méthodes.....	16
II.1. Prélèvement et enrichissement des échantillons	16
II.2. Isolement des microorganismes	16
II.3. Purification des souches.....	16
II.4. Screening de souches bactériennes capables de dégrader le sulfaméthoxazole.....	16
II.5. Identification des souches bactériennes	17
II.6. Test de biodégradation du Sulfaméthoxazole	18
II.7. Méthode d'analyse	18
Résultats et discussions	
I- Isolement des microorganismes	19
II- Screening des souches bactériennes capables de dégrader le sulfaméthoxazole.....	20
III- Identification des souches bactériennes.....	23
IV-Test de biodégradation du sulfaméthoxazole.	26
Conclusion	32
Références bibliographiques	33
Annexes	

Introduction



Introduction:

Les substances pharmaceutiques incluent une grande gamme de produits chimiques avec des structures, des fonctions, des comportements et des activités très différents (Zwiener, 2007). Elles sont employées partout dans le monde pour la médecine humaine ou vétérinaire. Cependant, ce n'est que très récemment que ces composés ont pu être dosés dans l'environnement et, avec cette mise en évidence, ont attiré l'attention des responsables de l'environnement par leurs effets sur la faune et la flore particulièrement aquatiques (Montiel, 2006). En effet, la présence des résidus pharmaceutiques dans l'environnement a été rapportée pour la première fois dans la fin des années 1970 (Jones *et al.*, 2002).

Suite à leur utilisation, les médicaments sont souvent partiellement métabolisés; ainsi ces substances pharmaceutiques et/ou leurs métabolites sont rejetés continuellement dans les eaux usées (Fenet *et al.*, 2006). Leur présence et accumulation dans les eaux naturelles constituent une pollution émergente conduisant à la perturbation des écosystèmes et l'accroissement des dysfonctionnements de la reproduction des espèces aquatiques (Escher *et al.*, 2011). Parmi les polluants pharmaceutiques, les antibiotiques méritent une attention particulière parce qu'ils sont utilisés en grande quantité d'une part et constituent des molécules biologiquement actives pouvant interagir avec des cibles biologiques spécifiques conduisant à l'apparition du phénomène de résistance des micro-organismes potentiellement pathogènes tels que les bactéries (Santos *et al.*, 2010).

Beaucoup d'études ont montré l'inefficacité des traitements des eaux usées pour l'élimination des médicaments (Homem et Santos, 2011). Le processus de l'élimination est simplement inadéquat pour beaucoup de médicaments parce que les unités de traitement des eaux usées n'ont pas été conçues pour éliminer de tels composés (Le-Minh *et al.*, 2010). Les concentrations rapportées habituelles des médicaments dans les milieux aquatiques sont de l'ordre du ng/ L ou inférieures du µg/ L et dépassent rarement les directives de l'eau potable; Pour prévenir cette contamination, plusieurs processus de dégradation ou d'élimination ont été étudiés (Homem et Santos, 2011).

La plupart des études sur la biodégradation des médicaments ont observé une élimination de ces composés par les boues activées avec une efficacité différente (Le-Minh *et al.*, 2010). La boue activée est un consortium de micro-organismes à croissance rapide en présence des sources de carbone à concentration élevée qui n'est pas représentatif pour la population bactérienne et les conditions observées dans les systèmes de l'environnement naturel. Cependant, les cultures pures offrent la possibilité pour les micro-organismes avec un métabolisme oligotrophique d'achever la biodégradation des xénobiotiques et offrir une façon d'étudier le devenir des médicaments dans les eaux usées (Gauthier *et al.*, 2010).

L'objectif de ce travail est d'étudier la biodégradabilité du sulfaméthoxazole par des microorganismes isolés de la station d'épuration des eaux usées d'ERABTA (Jijel) et d'un composte ménager de la région de KAOUS (Jijel), ainsi que l'isolement et l'identification des souches microbiennes dominantes impliquées dans sa dégradation.

Synthèse bibliographique

1. Les déchets pharmaceutiques:

Depuis les années 80 et grâce, aux progrès de l'analyse physico-chimique, de nombreuses molécules pharmaceutiques issues des activités médicales, humaine ou vétérinaire, et d'autres résultant des hôpitaux publics, des établissements de la recherche scientifique ou des laboratoires d'analyses, ont été détectées dans l'environnement. La présence de ces substances est liée à des rejets émis tout au long de leur cycle de vie depuis la fabrication des principes actifs ou des spécialités pharmaceutiques jusqu'à la gestion, la collecte et la destruction des médicaments non utilisés (MNU) (Haguenoer, 2010).

Selon les substances médicamenteuses et les différentes catégories d'eau, les concentrations retrouvées varient dans une gamme allant du nanogramme par litre dans les eaux superficielles douces ou marines, les eaux souterraines et les eaux destinées à la consommation humaine, jusqu'au microgramme, voire à plusieurs centaines de microgrammes par litre dans les effluents et les eaux résiduaires (Nikolaou *et al.*, 2007). Les médicaments peuvent également parvenir jusqu'aux les eaux potables et les nappes phréatiques. La situation est très inégale selon les pays en fonction de leur développement socio-économique, de l'accès de leurs populations aux soins et de leurs réglementations, et aussi, selon les caractéristiques propres à chaque substance: quantité fabriquée, métabolisation chez l'Homme et l'animal, propriétés physico-chimiques et biodégradabilité de la substance et de ses métabolites dans l'eau, les sols et les chaînes alimentaires (Haguenoer, 2010).

2. L'origine des substances pharmaceutiques:

Les substances pharmaceutiques ont plusieurs origines et peuvent atteindre et contaminer l'environnement de plusieurs manières:

- par les rejets de substances médicamenteuses et de leurs dérivés dans les urines et les fèces de la population humaine et des animaux de compagnie et d'élevage ou aux déchets des usagers,
- par les rejets de l'industrie chimique fine, de l'industrie pharmaceutique, des élevages industriels animaux et piscicoles ou aux épandages des boues de stations d'épuration (Haguenoer, 2010).

2.1. Les médicaments à usage humain

On peut distinguer deux sources principales de contamination des milieux soit par la consommation de médicaments; ou par la contamination directe des eaux par les rejets d'usines de fabrication ou de conditionnement.

Les produits pharmaceutiques sont consommés par la population en très grande quantité et sont continuellement excrétés (métabolisés ou non) dans le réseau d'assainissement (Levi, 2006; Kouadio *et al.*, 2009) ceci représente alors la principale source de contamination des milieux. Après administration, une fraction variable du médicament est absorbée, métabolisée et excrétée (Tamtam *et al.*, 2009), puis rejetée dans les eaux usées. Certaines études ont montré qu'une proportion considérable, jusqu'à 50%, du composé peuvent être excrétés inchangés (Ternes, 1998). Le reste est excrété habituellement dans une forme métabolisée (Jones *et al.*, 2007; Gauthier, 2008). Le résidu gagne ensuite les stations de traitement et d'épuration des eaux usées (STEP) où il peut être dégradé en partie. Les traitements dans les STEP ne permettant pas l'élimination de la totalité de la molécule, elle est finalement rejetée dans les effluents des STEP qui sont dilués dans les eaux de surface (rivières) ou adsorbée sur les boues résiduelles et contamine les sols après épandage (Besse, 2010).

L'activité d'un établissement de santé est génératrice de nombreux déchets. Ces rejets représentent une situation particulière et un des principaux problèmes environnementaux en raison du nombre de malades traités, de la quantité et de la diversité des médicaments utilisés. Les effluents hospitaliers n'étant pas traités sur place, les substances pharmaceutiques se retrouvent également dans les eaux usées et gagnent les STEP et finalement les eaux de surface (Kouadio *et al.*, 2009).

2.2. Les médicaments à usage vétérinaire:

La voie d'entrée des médicaments vétérinaires est différente de celle des médicaments à usage humain, puisque ceux-ci peuvent être dispersés directement dans les écosystèmes (utilisation en aquaculture, traitement des animaux en champs...), soit les contaminer indirectement, lors du lessivage par les eaux de pluie des sols contaminés par des élevages intensifs.

Dans le cas des animaux d'élevage, les médicaments vétérinaires utilisés sont essentiellement des antibiotiques et des antiparasitaires, qui sont administrés avec la nourriture (Boxall *et al.*, 2003). Après absorption, les médicaments peuvent être excrétés inchangés ou partiellement métabolisés, soit directement sur pâturage ou rassemblés dans les engrais et étendus sur sol (Batt *et al.*, 2006). Les poissons traités aux antibiotiques éliminent directement les médicaments non métabolisés dans le milieu aquatique tandis que les animaux d'élevage (porcs, bœufs, chevaux, etc.) éliminent ces composés soit directement sur les sols, soit dans les lisiers dans lesquels se poursuivent des réactions de transformation (Dirany, 2010) mais les données sur la transformation de ces molécules dans l'environnement sont très rares.

2.3. Les déchets issus de l'industrie pharmaceutique et chimique:

Une dernière source de pollution est à considérer : les rejets des usines de fabrication ou de conditionnement des médicaments qui pourraient entraîner des pics de contamination localisés (Larsson *et al.*, 2007) et affecter des organismes exposés (Carlsson *et al.*, 2009 ; Gunnarsson *et al.*, 2009).

Jusqu'à présent, assez peu de molécules ont été recherchées dans l'environnement, ceci étant en partie lié à la difficulté de développer de nouvelles méthodes analytiques pour doser les médicaments dans les milieux récepteurs. Les données quantitatives par produit sont indispensables pour faire une évaluation globale des risques et il est anormal que seules, quelques rares statistiques soient disponibles en Europe ; par ailleurs, en Algérie les données statistiques demeurent très insuffisantes.

2.4. Les médicaments non utilisés:

Les médicaments non utilisés (MNU) sont des produits médicaux non utilisés par les patients pour raison de non-observance du traitement par les malades, la taille de conditionnement non adaptée au traitement prescrit ou l'arrêt d'un traitement en raison d'effets indésirables (Fiquet, 2002; Haguenoer, 2010). Une mauvaise estimation des besoins pose beaucoup de problèmes. La sous-estimation de ceux-ci engendre une pénurie et une sélection subjective des patients. La surestimation encombrera inutilement les pharmacies des structures de santé, créant des soucis d'évacuation des produits arrivés à échéance, car les procédures administratives sont généralement très compliquées, et posent des problèmes techniques de destruction (D e Groote, 2005).

3. Contamination de l'environnement par les déchets pharmaceutiques:

La présence de traces des substances médicamenteuses et de leurs métabolites a été établie à l'échelle mondiale en particulier dans les eaux superficielles et souterraines, dans les eaux résiduaires, dans les boues des stations d'épuration utilisées en épandage agricole et dans les sols. Cette présence peut provoquer des risques pour les écosystèmes et pour l'Homme qui représentent un problème mondial que l'on doit réduire dans le cadre d'une politique de prévention.

3.1. La contamination de l'atmosphère

Les rejets de médicaments dans l'atmosphère concernent un nombre limité de molécules. Dans le cas des antibiotiques, les tensions de vapeur sont faibles, ce qui indique qu'ils sont très peu volatiles et peu propices à se diffuser vers l'air à partir des milieux terrestres et aquatiques (Thiele-Bruhn, 2003). Il faut aussi tenir compte des produits formés lors de l'incinération des médicaments non utilisés et les déchets médicamenteux hospitaliers.

3.2. La contamination des sols

Les sols peuvent être contaminés par les aliments, par les déjections des animaux traités par des médicaments vétérinaires directement dans les prairies mais aussi par l'épandage sur les champs des boues des stations d'épuration ou des fumiers et purins produits dans les étables. Selon la nature hydrophile ou hydrophobe des substances excrétées par les animaux, les pluies ensuite peuvent entraîner et disperser une partie vers les eaux souterraines ou les eaux de surface (Al-Ahmad *et al.*, 1999).

3.3. Contamination des milieux aquatiques et des ressources en eau

Le rejet continu de médicaments et de leurs métabolites dans le milieu aquatique conduit à leur accumulation due à leur persistance (Fenet *et al.*, 2006), à leurs propriétés physico-chimiques et en particulier à leur hydrosolubilité, leur stabilité et leur demi-vie. Ces demi-vies ont été calculées au laboratoire ou en conditions naturelles, mais les données sont très parcellaires: ils varient de plusieurs mois pour l'acide clofibrigue et la carbamazépine à quelques heures ou quelques jours pour le diclofénac, le sulfaméthoxazole, l'ofloxacine ou l'ibuprofène (Andreozzi *et al.*, 2003).

Les stations d'épuration n'ont pas été conçues pour traiter spécifiquement des composés organiques en traces comme les médicaments (Garric et Ferrari, 2004). Parmi les médicaments les plus fréquemment retrouvés dans les stations d'épuration on trouve les antibiotiques et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Fenet *et al.*, 2006).

Les antibiotiques ont été détectés dans les effluents d'élevage industriel, ce qui n'est pas surprenant car on peut trouver jusqu'à plusieurs mg de tétracyclines par gramme de lisier (Carlsson *et al.*, 2009). Certains de ces antibiotiques sont faiblement dégradés par les STEP, en particulier les quinolones (ciprofloxacine, norfloxacine...), les nitro-imidazoles et les sulfonamides. Pour le sulfaméthoxazole, leur taux d'élimination dépend du procédé de traitement, il était de - 5% à - 21 % dans une station à boues activées conventionnelle et montait à ± 80 % dans un bioréacteur à membrane (Göbel *et al.*, 2007). Andreozzi *et al.* (2003) ont trouvé en sortie de stations d'épuration des concentrations d'ibuprofène, pourtant il est sensible à la biodégradation, de carbamazépine et de gemfibrozil de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ et de l'acébutolol à des teneurs de $0,1 \mu\text{g/L}$. Des constatations un peu différentes ont été faites par Fenet *et al.* (2006) à la sortie de deux types de stations d'épuration, l'une par lagunage semblerait plus efficace pour la carbamazépine, l'autre par boues activées éliminerait bien les AINS.

Les résidus de médicaments non retenus ou non éliminés directement dans les stations d'épuration sont rejetés dans les eaux de surface par leurs effluents (Fenet *et al.*, 2006). Leurs concentrations sont abaissées soit par dilution soit par photodégradation (Andreozzi *et al.*, 2003). Les eaux de mer peuvent être contaminées par les résidus d'antibiotiques utilisés pour l'élevage intensif des crevettes et des saumons qui se font dans les mangroves (Cabello, 2006).

Des médicaments, notamment ceux à structures polaires, présents dans les eaux de surface, peuvent atteindre les eaux souterraines. Sacher *et al.* (2001) ont recherché la présence de médicaments sur 105 échantillons d'eaux souterraines en Allemagne: 39 de ces échantillons présentaient des traces de médicaments. Certains médicaments ont été détectés à des concentrations voisines de 10 ng/L: des β -bloquants, des analgésiques, un antiépileptique (carbamazépine), le diclofénac, des antibiotiques et des produits de contraste iodés comme l'iopamidole.

Généralement l'eau du robinet est exempte de tout polluant en raison des traitements de potabilisation. Dans la majorité des cas, les eaux analysées ne contenaient pas de résidus pharmaceutiques mais plusieurs auteurs ont retrouvé des molécules médicamenteuses dans les eaux de boisson (Togola et Budzinski, 2008).

Pour les sédiments, les études sont assez peu nombreuses (Hernando *et al.*, 2006), mais elles sont très intéressantes en raison des concentrations qui sont observées. De nombreux antibiotiques ont été mesurés dans les sédiments à des concentrations parfois élevées : la tylosine jusqu'à 578 ng/kg et même 2640 ng/kg (Zuccato *et al.*, 2000).

4. L'évaluation des risques liés à la présence de résidus de médicaments dans l'environnement:

Elle s'adresse aussi bien aux composantes de l'environnement qu'à l'Homme. Elle est très complexe du fait de la grande variété de médicaments et dérivés retrouvés ensemble, de la biodiversité environnementale avec des écosystèmes interactifs, difficiles à reproduire en laboratoire, et des limites de l'évaluation des effets des mélanges de substances chimiques à faibles doses (Fent *et al.*, 2006, Santos *et al.*, 2010, Escher *et al.*, 2011).

Comme pour les autres substances chimiques, plusieurs paramètres, dont certains leurs sont spécifiques, sont à prendre en considération dans l'évaluation du risque environnemental des substances pharmaceutiques.

Concernant l'évaluation de l'exposition (i.e. des quantités de médicaments pouvant atteindre et contaminer les milieux récepteurs), les points suivants sont à prendre en compte:

- les différentes sources de contamination (Montiel, 2006);
- les quantités consommées de médicaments, pouvant être spécifiques à une zone géographique donnée et une période donnée (Alighardashi *et al.*, 2008);
- le métabolisme humain: une fois le médicament absorbé dans l'organisme, il subit toute une série de processus métaboliques visant à son inactivation et à son excrétion de l'organisme (Kümmerer, 2009, Besse *et al.*, 2008, Hartemann, 2006);
- la dégradation des médicaments dans les STEP (urbaines ou industrielles), qui contribue à limiter les rejets dans le milieu récepteur. Cette dégradation varie, quantitativement et qualitativement, en fonction du type de traitement, de la taille de la STEP ou encore de la saison (Göbel *et al.*, 2007);



• enfin, il faut prendre en compte le comportement de la molécule dans l'environnement (sorption aux sédiments), sa sensibilité aux différents phénomènes de dégradation biotiques et abiotiques, ou au contraire sa rémanence dans l'environnement (**Hartemann, 2006**).

Concernant l'évaluation des effets, plusieurs paramètres sont également à considérer :

- le risque de toxicité aiguë, se traduisant généralement par une mortalité rapide des organismes exposés au contaminant (**Santos et al., 2010, Escher et al., 2011**);
- le risque de toxicité chronique, généralement associé à des concentrations faibles en polluant, et qui provoquent des effets nocifs, létaux ou sub-létaux, sur le long terme (**Santos et al., 2010, Escher et al., 2011**);
- la question de la sensibilité des organismes exposés : la toxicité d'un contaminant pouvant varier non seulement en fonction des concentrations d'exposition mais également en fonction de l'organisme considéré (espèce, âge, sexe...) (**Hartemann, 2006**);
- les différences physiologiques entre l'Homme et les organismes aquatiques, posant la question de la possibilité de prévoir les effets sur les écosystèmes à partir des effets observés sur l'être humain (**Fent et al., 2006**);
- le problème des mélanges de polluants: les écosystèmes étant exposés à plusieurs centaines de contaminants, que ce soit les médicaments ou les autres substances chimiques, il est important de considérer les effets cumulés de ces contaminants (**Fent et al., 2006**).

4.1. Les risques pour l'environnement:

La majorité des médicaments n'est pas censée exercer des effets toxiques aigus, du moins chez les mammifères. Mais ces substances sont néanmoins conçus pour agir sur des processus métaboliques, dont certains peuvent avoir des conséquences à long terme sur l'homéostasie et les fonctions physiologiques des organismes (**Garric et Ferrari, 2004**).

D'après **Levi (2006)**, les antibiotiques peuvent induire des effets liés à leurs cibles spécifiques, c'est à-dire influencer les biomasses bactériennes de l'environnement. Dans ce cas, des perturbations peuvent se produire au sein des cycles épurateurs naturels ou artificiels et des dysfonctionnements apparaître au sein des systèmes d'assainissement (**Levi, 2006**). **Selvaratnam et Kunberger (2004)** ont observé une augmentation de la fréquence de bactéries résistantes aux médicaments dans des eaux adjacentes à des fermes dont les sols ont fait l'objet d'épandages de boues de stations d'épuration (**Kemper, 2008**).

Les tests de toxicité aigue de quelques antibiotiques ont montré une plus grande sensibilité sur des micro-algues que sur des crustacés (**Ferreira et al., 2007**). Ils permettent aussi de montrer de grandes différences selon l'antibiotique sur certaines cibles: l'ofloxacine par exemple est particulièrement toxique pour les bactéries, les sulfamides l'est pour les invertébrés et la chlorotétracycline l'est plus pour les algues (**Hernando et al., 2006**). En plus, les sulfonamides ont une toxicité faible pour les organismes supérieurs (les vertébrés), et une toxicité forte pour les microorganismes, les algues et certaines plantes (**Baran et al., 2011**). Sachant qu'aucun risque considérable sur les organismes aquatiques ne pourraient être associés à la présence de médicaments dans les eaux de surface (**Gros et al., 2010**).

4.2. Les risque pour l'Homme:

L'éventualité de risques sanitaires pour l'Homme, dus à l'exposition des populations aux résidus de substances médicamenteuses précisément chez les personnes qui travaillent dans les élevages qui courent les plus gros risques d'antibiorésistance. Un autre risque pour l'Homme est l'ingestion de résidus d'antibiotiques par les poissons et les coquillages commercialisés avec le risque d'altérer la flore intestinale normale, ce qui augmenterait la sensibilité aux infections bactériennes et le risque de sélection de bactéries antibiorésistantes (Cabello, 2004). L'ingestion d'antibiotiques par l'eau du robinet est également possible puisqu'une étude a montré que des antibiotiques présentent des taux de 0.6 à 1.7 ng L⁻¹ (Zuccato *et al.*, 2000).

5. Etude de quelques substances pharmaceutiques : cas de Sulfaméthoxazole

Le sulfaméthoxazole ou 4 N-5 amine -benzenesulfonamide (SMX, C₁₀H₁₁N₃O₃S) (Figure 1) est un antibiotique synthétique (Abellan *et al.*, 2009), appartenant à la famille des sulfonamides, généralement il existe sous trois formes polymorphiques, I, II et III (Takasuka *et al.*, 2001). Le sulfaméthoxazole utilisé largement à cause de son faible coût de production, la toxicité qu'est relativement basse et de son efficacité (Connor, 1998), il est souvent utilisé en synergétique combinaison avec le triméthoprim pour limiter la résistance à ce médicament. En plus, l'association des deux composés peut améliorer l'activité de sulfaméthoxazole (Karpman *et Kurzrock*, 2004). Les deux médicaments ont séparément une action bactériostatique, mais lorsqu'ils sont combinée deviennent bactéricides (Connor, 1998).

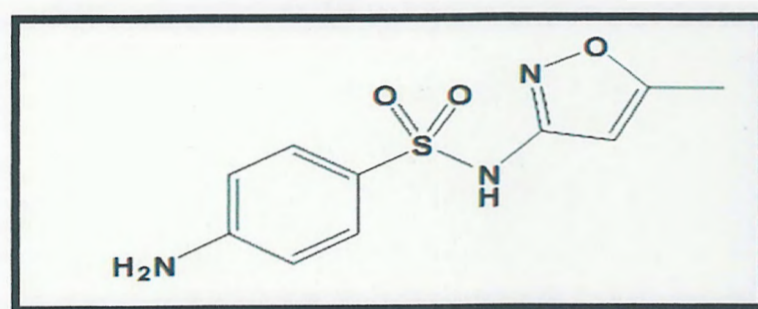


Figure 1: La structure du sulfaméthoxazole (Refat *et al.*, 2010)

Le sulfaméthoxazole à un mode d'action de type bactériostatique. Il intervient sur la croissance bactérienne en agissant comme anti-métabolites. C'est un analogue de structure de l'acide para-aminobenzoïque, ce dernier participe à la synthèse de l'acide folique, qui joue un rôle essentiel dans la synthèse des purines et des pyrimidines, qui sont utilisées dans la construction des acides nucléiques (Prescott *et al.*, 2003, Le-Minh *et al.*, 2010). Les principales caractéristiques physico-chimiques de sulfaméthoxazole sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques de sulfaméthoxazole.

Classe thérapeutique	Famille	Formule brute	M .molaire (g mol ⁻¹)	Solubilité dans l'eau (g L ⁻¹)	pKa	MP (°C)	logKow
antibiotique	sulfamide	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253.3	0.5 ^(a)	1.8; 5.57 ^(b)	167 ^(c)	0.89 ^(a)

pKa: constante de dissociation acide-base, MP: le point d'ébullition, Kow: coefficients de partage octanol-eau.

((a): Klavarioti *et al.*, 2009, (b): Lin *et al.*, 1997, (c): Loftsson et Hreinsdóttir, 2006)

Selon la mobilité et la persistance antimicrobienne, le SMX peut être détecté à des niveaux de ng L⁻¹ dans des différentes étapes pendant le traitement des eaux usées (l'affluent du traitement des eaux usées (6.9-390 ng L⁻¹); l'effluent (24-352 ng L⁻¹)), l'effluent d'hôpital (1300-2100 ng L⁻¹) et eaux de surface (0.38-300 ng L⁻¹) dans des pays différents (Göbel *et al.*, 2005, Chang *et al.*, 2008). En plus il est détecté à des traces dans les eaux souterraines (Lindsey *et al.*, 2001).

Le sulfaméthoxazole est parmi les antibiotiques le plus communément utilisés chez les êtres humains et les animaux pour la prévention et le traitement des infections bactériennes (Abellan *et al.*, 2009). Il agit sur les bactéries tel que *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* (Refat *et al.*, 2010). Il est utilisé pour traiter des maladies respiratoires comme la pneumonie, des infections parasitaires comme le toxoplasmosé et d'autres maladies comme les coccidioses, la diarrhée et la gastroentérite (Jones *et al.*, 2002). Il est largement utilisé pour le traitement des infections urinaires, comme alternatif à l'amoxicilline pour traiter la sinusite (Refat *et al.*, 2011). En plus, il est utilisé comme un facteur de croissance chez les bétails (Abellan *et al.*, 2009).

Après la consommation du médicament, l'absorption se produit par diffusion simple puis il sera distribué et métabolisé, et finalement excrété par le corps. Comme tous les sulfonamides, le sulfaméthoxazole est absorbé rapidement dans l'intestin, diffuse dans les espaces intracellulaires et le placenta, métabolisé par le foie (acétylation rapide ou glycuconjugaison) et éliminé par le rein, généralement après administration orale, 50-70% de la dose est excrétée dans les urine sous forme de N₄-Acétylsulfonamide, et 15-20% sous forme de N₁- glucuronides (Sukul *et al.*, 2006). Les effets adverses associés avec la sur-dose de sulfonamides sur les êtres humains incluent des nausées et des réactions de l'hypersensibilité cutanée (Baran *et al.*, 2011). De plus, il peut causer des interactions avec les autres médicaments. Baran *et al.* (2011) montrent que l'effet toxique direct causé par les sulfonamides (SNs) ne provoque pas une menace sur la santé publique et que l'effet toxique direct sur l'être humain peut être sporadique.

6. Les mécanismes d'élimination des produits pharmaceutiques:

Le développement de techniques analytiques plus sensibles (avancées), a permis la détection et l'identification de nombreux composés pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques (Jones *et al.*, 2002; Fatta *et al.*, 2007). En effet, les processus d'élimination biotiques et abiotiques peuvent déterminer le devenir de ces composés organiques dans l'environnement (Androzii *et al.*, 2003). La persistance contre la dégradation (Abellan *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2008) et l'activité biologique sont des propriétés clés de ces polluants, et à cause de leur élimination continue, ils peuvent conserver leur structure chimique assez long temps et rester dans l'environnement à faibles ou à hautes concentrations (Jones *et al.*, 2002). De ce fait, la combinaison des procédés biologiques avec les procédés d'oxydation chimique est inévitable pour une bonne élimination (Vazquez, 2010). Dans le cas des sulfonamides, en particulier, le sulfaméthoxazole, plusieurs méthodes d'élimination, ont été rapportés, y compris l'oxydation, la photodégradation et la biodégradation (Ryan *et al.*, 2011).

6.1. La dégradation abiotique :

C'est une des voies importantes d'élimination ou de transformation des produits chimiques dans l'environnement (Gervaise, 2000). Elle correspond à une dégradation physique ou chimique du produit sans intervention de processus biologiques.

6.1.1. Processus d'oxydation avancée

Le processus d'oxydation avancée (POA) est l'un des traitements les plus appropriés pour le traitement des eaux usées afin d'éliminer les contaminants pharmaceutiques. Il est caractérisé par une réaction directe avec l'oxydant utilisé, ou par la production de composés secondaires très réactifs, le plus fréquemment, les radicaux hydroxyles (-OH). Plusieurs méthodes sont appliquées, notamment la photocatalysation avec le dioxyde de titane (TiO_2) et la réaction directe avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou d'autres systèmes, tels que l'Ozone/ H_2O_2 et l'UV/Ozone (Egerton *et al.*, 2006).

Dans des études menées au laboratoire et *in situ* sur l'utilisation du traitement d'ozone/ H_2O_2 (en présence de 7 mg/L d'ozone, et de 3.5 mg/L d' H_2O_2 et un temps de contact de 2 min), il a été montré que la concentration du sulfaméthoxazole après le traitement tertiaire des eaux usées est significativement réduite jusqu'à 90%, et que la dégradation par les POAs dépend du temps de contact et de la concentration des contaminants dans l'eau (Le-Minh *et al.*, 2010).

6.1.2. L'ozonation :

L'ozonation est une voie chimique qui est appliquée sur les eaux polluées par les composés pharmaceutiques en particulier les antibiotiques (Vazquez, 2010). En effet, l'oxydation des composés organiques par l'ozonation peut se faire selon les deux voies suivantes : une oxydation directe par l'ozone moléculaire dissout en solution aqueuse, et une oxydation indirecte par les radicaux hydroxyles, générés lors de la décomposition de l'ozone moléculaire (Rodayan, *et al.*, 2010). Par ailleurs, il a été démontré que 5 mg/L d'ozone peut éliminer complètement 0.62 mg/L de sulfaméthoxazole présent dans l'eau usée traitée (Dantas *et al.* 2008).

En effet, l'ozonation est considérée comme une bonne méthode d'élimination de sulfaméthoxazole dans un temps relativement court, mais son utilisation reste limitée car elle est plus coûteuse par rapport aux méthodes biologiques (Yu *et al.*, 2009a), ainsi, l'ozone a la particularité de ne pouvoir être stocké et d'être décomposé très rapidement en oxygène, il doit donc être fabriqué sur le site d'utilisation, directement en amont du dispositif de traitement (Lecomte, 1998). De plus, Li *et al.* (2008) ont signalé que les métabolites formés suite au procédé d'ozonation sont plus toxiques que leur molécule initiale.

6.1.3. La dégradation photochimique :

La dégradation abiotique des micropolluants organiques est possible par divers procédés photochimiques qui nécessitent une source artificielle de rayonnement ou une irradiation par des rayons solaires (Trovó *et al.*, 2009). L'efficacité de la photodégradation dépend de plusieurs facteurs qui influencent fortement sur le taux de photodégradation des composés pharmaceutiques présents dans les eaux de surface, parmi lesquelles: les propriétés physico-chimiques des substances, la variation de l'intensité de rayonnement solaire, la saison, les composants présent dans l'eau, la concentration d' H_2O_2 et d' O_3 . Cette technologie est seulement applicable sur les eaux polluées contenant des composés photosensibles (Andreozzi *et al.*, 2003, Fent *et al.*, 2006).

Généralement, la transformation photochimique du sulfaméthoxazole (SMX) a été appliquée sur différents type d'eau (Trovó *et al.*, 2009; Andreozzi *et al.*, 2003) et ceci a engendré cinq métabolites (Zhou et Moor, 1994). Des études récentes sur la dégradation du sulfaméthoxazole (SMX) par les méthodes photocatalytiques en présence de TiO_2 , ont montré que la dégradation du SMX, a été améliorée quand la concentration du TiO_2 était augmentée jusqu'à 0.5 g / L (Abellan *et al.*, 2009).

6.2. La biodégradation :

La biodégradation est un phénomène naturel. C'est le processus le plus important qui engendre une transformation (changements structurels) des micropolluants organiques, il peut varier d'une transformation partielle à une minéralisation complète par des microorganismes. Leur croissance s'effectue par l'intermédiaire de l'oxydation du carbone qui est utilisé comme source d'énergie. La décontamination par voie biologique consiste à stimuler ce phénomène naturel pour en augmenter le rendement, afin de détruire en un minimum de temps le polluant organique (Lecomte, 1998). Pendant la biotransformation, des métabolites sont produits, avec une toxicité et un comportement environnemental pouvant être différents du composé mère. De même, ils peuvent être conjugués. Il est fortement attendu que la déconjugaison (conversion vers les composés originaux) se produit dans les eaux usées, dans les STEPs (principalement pendant le traitement primaire) ou dans l'environnement (Haguenoer, 2010).

Les inconsistances dans les objectifs de la recherche peuvent expliquer partiellement les différences dans l'efficacité d'élimination rapportées par des études précédentes (Le-Minh *et al.*, 2010). Les antibiotiques et les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAID) sont les deux classes communes de médicaments retrouvées dans l'eau recyclée (Yu *et al.*, 2009 a, Yu *et al.*, 2009 b). En effet, beaucoup d'études ont souvent calculé l'efficacité de leur élimination par la différence entre la concentration du médicament dans l'effluent traité et celle dans l'affluent, mais ne prennent pas en considération la possibilité d'inter-transformation entre les antibiotiques et leurs métabolites dans les eaux usées, en particulier dans le cas des sulfonamides (Le-Minh *et al.*, 2010).

Malgré que l'élimination des antibiotiques soit variable pendant les processus conventionnels dans les STEPs, beaucoup de ces produits chimiques sont observés régulièrement dans les effluents après le traitement secondaire et tertiaire de l'ordre de 10 à 500 ng/ L (**Haguenoer, 2010**). Cependant, quelques-uns des processus des boues activé sont efficaces pour l'élimination de plusieurs de ces composés. Pendant le traitement, les antibiotiques peuvent être transformés ou éliminés de la phase aqueuse par l'hydrolyse, la biotransformation, ou la sorption aux boues primaires et secondaires (**Le-Minh et al., 2010**). Ces médicaments adsorbés aux boues activées seront éliminés par la sédimentation et la disposition subséquente des boues en excès (**Diaz-Cruz et al., 2003**).

Les conditions opérationnelles d'un processus de traitement d'eaux usées telles que la température, le temps de rétention solide (TRS), et le temps de rétention hydraulique (TRH), peuvent affecter considérablement l'efficacité d'élimination de nombreux contaminants pharmaceutiques. Pendant que la température ambiante n'est pas pratiquement contrôlée, le TRS et le TRH peuvent être ajustés à quelques degrés pour optimiser l'efficacité de l'élimination (**Le-Minh et al., 2010**).

Les composés chimiques hydrophobes sont supposés se trouver à haute concentration dans la boue primaire contrairement aux composés hydrophiles (**Beausse, 2004**), comme les antibiotiques hydrophiles qui résistent au traitement biologique conventionnel, ils sont retrouvés principalement dans la phase aqueuse de l'effluent traité (**Le-Minh et al., 2010**). Des TRS élevés ont été rapportés pour augmenter l'élimination de plusieurs composés médicamenteux pendant les processus biologiques aérobies (**Clara et al., 2005a**). De tels TRS ont été suggérés pour tenir compte de l'enrichissement de la culture bactérienne, et par conséquent, quelques unes seront capables de décomposer les produits pharmaceutiques en sous produits pour fournir une grande diversité d'enzymes (**Jones et al., 2007**). De même, des TRH plus longs sont supposés fournir un temps de réaction suffisant pour la biotransformation et la sorption des boues pour atteindre l'efficacité maximale à l'équilibre (**Le-Minh et al., 2010**). **Le-Minh et al. (2010)** ont déterminé que dans un climat sec, un TRH court aboutira à une haute concentration en biomasse qui pourrait augmenter l'élimination, par conséquent, il serait difficile de généraliser le rapport entre le TRH et l'élimination des médicaments sans expliquer l'effet de la concentration en biomasse.

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet du SRT et l'HRT sur l'élimination des antibiotiques dans des bioréacteurs à membrane (BRM) et par les systèmes aux boues activées. Le **tableau 2**, en résume les résultats les plus importants.



Tableau 2: Efficacité d'élimination (%) de SMX et ses métabolites (Acetyl SMX) par des processus de traitement secondaire (bous activée et bioréacteur à membrane)

Procédé traitement	SRT	HRT	SMX	SMX+Acety-SMX	Référence
BA	5.6-8.2	15-22	<0	–	(Xu <i>et al.</i> , 2007)
Lab BRM	72	12	53	–	(Reif <i>et al.</i> , 2008)
BA	2	2	<0	–	(Clara <i>et al.</i> , 2005b)
BRM	10	2	61		
BA (N/DN)	10-12	5	<0 to 9	<0 to 50	(Gobel <i>et al.</i> , 2007)
BRM	16	13	37	87	
BRM	33	13	38	74	
BRM	60-80	13	37	68	
BA (N/DN)	21-25	31	<0 to 60	61 to 76	

BA : Boue activée ; **BRM** : Bioréacteur à membrane ; **N**: Nitrification;
DN: Dénitrification ; **SMX** : sulfaméthoxazole ; **AcetySMX** : N₄-sulfaméthoxazole
TRH : le temps de rétention hydraulique ; **TRS** : le temps de rétention solide;
N /ND : Nitrification / Dénitrification.

Il a été également suggéré que d'autres facteurs, tels que la concentration de la biomasse et la diversité aussi bien que le rapport substrat/biomasse, peut être important pour expliquer les variations (Le-Minh *et al.*, 2010).

Les sulfonamides ne sont pas complètement métabolisés dans le corps humain et sont excrétés par les urines dans les eaux usées sous deux formes, les composés initiaux inchangés ou sous forme de métabolites (Göbel *et al.*, 2005). Les métabolites majeurs des sulfonamides dans les eaux usées sont des produits de N4-acétyle, qui sont biologiquement inactifs qui peuvent être transformés ou convertis en composés initiaux actifs pendant le traitement des eaux usées (Göbel *et al.*, 2005). Ce phénomène peut conduire à une élimination négative apparente avec quelques sulfonamides, en particulier le sulfaméthoxazole (Göbel *et al.*, 2007). Cependant, les concentrations de ce médicament dans les affluents des STEP et les effluents varient considérablement, selon leur consommation et les processus du traitement des eaux usées employés (Le-Minh *et al.*, 2010). Par exemple, le sulfaméthoxazole a été rapporté à des concentrations supérieures à 7.91 mg/ L dans les affluents d'eaux usées en Chine, où le composé figure parmi les 15 médicaments les plus vendus (Peng *et al.*, 2006).

Cette élimination partielle peut être attribuée à une adsorption à la boue ou à une biodégradabilité. Les sulfonamides sont supposés être assez solubles et avoir une séparation hydrophobe faible basée sur un Log D entre -1.8 et 1.3 à pH variant entre 6 et 8. Néanmoins, il a été démontré récemment que l'élimination du Sulfaméthoxazole pendant le traitement par le MBR dépend du pH qui varie entre 5 et 9 (Tadkaew *et al.*, 2010). Étant donné que les sulfonamides sont neutres ou chargés négativement dans les conditions opérationnelles typiques des STEPs (pH 7-8) (Quiang et Adams, 2004), leur adsorption à la biomasse par échange de cations / anions peut être minimale. En plus, Peng *et al.* (2006) ont observé une dégradation faible des particules pendant le processus du traitement primaire des eaux usées. Cependant, la digestion anaérobie de la boue a été montrée capable de fournir une biotransformation efficace des sulfonamides qui sont partiellement adsorbés à la boue (Carballa *et al.*, 2006). Ingerslev et Halling-Sørensen (2000) ont montré que les sulfonamides sont biodégradables dans les systèmes aux boues activées, ils ont une phase d'adaptation de 6-12 jours à 20 ° C et de 34 à 47 jours à 6 ° C.

Récemment, Yu *et al.* (2011) ont étudié les mécanismes d'élimination de quatre antibiotiques (sulfaméthoxazole, sulfadiméthoxine, sulfaméthazine, et triméthoprim) par des cellules immobilisées dans des réacteurs en Batch, et principalement les rôles individuels ou collectifs de la biodégradation et la bio-adsorption comme des mécanismes dominants de dégradation des ces médicaments, tandis que la volatilisation et l'hydrolyse étaient négligeables pour tous les médicaments cibles, avec une biodégradabilité forte (>40% d'élimination) et bioadsorption faible (<40% d'élimination) pour le sulfaméthoxazole. Alors que dans l'expérience de l'adsorption / désorption, il a été caractérisé par une adsorption forte et désorption faible.

Des études précédentes ont montré que la plupart des antibiotiques ne sont pas facilement biodégradables (Alexy *et al.*, 2004), mais une diversité des bactéries du sol a été montrée capable de détruire un nombre multiple d'agents antimicrobiens (Dantas *et al.*, 2008). Par exemple, *Rhodococcus rhodochrous* est capable de dégrader le sulfaméthoxazole à 20 % par co-métabolisme pendant 36 jours (Gauthier *et al.*, 2008, Gauthier *et al.*, 2010). En plus, Larcher et Yargeau (2011) ont montré que *Rhodococcus equi* seule, avait la plus grande capacité de biodégradation du SMX à 29 % d'élimination en présence de glucose par apport aux autres souches bactériennes (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous* et *Rhodococcus zopfii*).

Matériel et méthodes



Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie du Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Jijel dans une période de 6 mois à partir de Décembre 2011.

I. Matériel

I.1. L'échantillonnage:

Les microorganismes utilisés dans cette étude étaient isolés à partir d'une boue activée de la station d'épuration des eaux usées d'ERABTA (Jijel) et à partir d'un composte ménager de la région de KAOUS (Jijel).

Ces deux échantillons ont été enrichis par la substance pharmaceutique (Sulfaméthoxazole).

Les prélèvements étaient effectués au mois de Décembre 2011.

I.2. La substance pharmaceutique utilisée:

La molécule retenue pour cette étude est le Sulfaméthoxazole (POLYPHARMA) sous forme de poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone et assez soluble dans l'éthanol à 96%; se dissout dans les solutions diluées d'hydroxyde de sodium et dans les acides dilués.

Les caractères analytiques du SMX (POLYPHARMA):

Point de fusion :	171,1°C
Acidité :	0,18 ml
Impuretés totales :	< 0,3%
Métaux lourds :	< 20 ppm
Perte à la dessiccation :	0,23%
Cendre sulfuriques :	0,03%
Dosage :	100,11%
Inferieure limite d'exclusion :	0,025%

C'est un antibiotique qui est classé parmi les substances pharmaceutiques les plus consommées et les plus rencontrées dans l'environnement (Homem et Santos, 2011). La solution mère du sulfaméthoxazole est préparée dans l'eau distillée stérile à une concentration de 6 mg/ L.

I.3. Milieux de culture et réactifs:

Le milieu de culture utilisé est le milieu minéral minimum où le SMX est la source de carbone et d'énergie dominante, préparé au laboratoire. Il est composé des éléments minéraux suivants :

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.013 g/ L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.013 g/ L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.25 g/ L), Na_2HPO_4 (7.5 g/ L), KH_2PO_4 (5 g/ L), NH_4NO_3 (5 g/ L), et d'extrait de levure (0.6 g /L) (Larcher et Yargeau, 2011). Le pH est ajusté à 7 avec une solution de NaOH à 5N, avant autoclavage. Le SMX est introduit à une concentration de 6 mg/ L, il est ajouté aseptiquement après l'autoclavage du milieu de culture à 120°C pendant 20 minutes. Le milieu gélosé est préparé avec une concentration de 0,5 g/ L de glucose et 10 g d'Agar-agar, alors que le bouillon est exempt de glucose.



Pour la purification et l'identification on a utilisé les milieux et les réactifs suivants:

Gélose nutritive (Institut Pasteur)
Milieu Chapman (Institut Pasteur)
Milieu Mac Conkey (Institut Pasteur)
King A et King B (Institut Pasteur)
Milieu MEVEG (Institut Pasteur)
Milieu mannitol (Institut Pasteur)
Milieu T.S.I (Institut Pasteur)
Milieu Clark et Lubs (Institut Pasteur)
Bouillon nitrate (Institut Pasteur)
Milieu Urée-indole (Institut Pasteur)
Milieu Moëller (Institut Pasteur)
Milieu Citrate de Simmons (Institut Pasteur)
Nitrate réductase NR1 et NR2 (Institut Pasteur)
L'alpha naphthol (Institut Pasteur)
Rouge de méthyle (RM) (Institut Pasteur)
Voges-Proskauer (VP) (Institut Pasteur)
Erlich Kovacs (Institut Pasteur)
Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Institut Pasteur)
HCl 5N
NaOH 5N
Eau physiologique

I.4. Les solvants pour l'HPLC:

L'acétonitrile (SIGMA-ALDRICH)
Le méthanol (SIGMA-ALDRICH)
L'acide formique (Fluka).

I. 5. Appareillage:

pH mètre (Hanna)
Bain marie (Gerhardt Bonn)
Bain marie-agitateur (Falc)
Etuve (Mettler)
Four pasteur (Controls)
Centrifugeuse (Hettich)
Vortex (Minishaker IKA).
Plaque chauffante agitatrice (Bunsen)
Balance (Scout Pro)
Compteur de colonies (Bioblock)
Spectrophotomètre (Amerchcham)
HPLC (SHIMADZU) doté d'un détecteur UV visible.
Microscope optique de précision (Paralux)
Autoclave (Sili AVX electronic)
Microfiltres (Sartorius RC 0.20µm)

II. Méthodes

II.1. Prélèvement et enrichissement des échantillons:

Deux prélèvements sont effectués, l'un à partir de la boue activée de la station d'épuration des eaux usées d'ERABTA (Jijel), et l'autre à partir d'un compost ménager de la commune de KAOUS (Jijel). Les échantillons sont prélevés au mois de Décembre (2011), sont mis dans des flacons et sont enrichis par 5 ml de Primazol[®] (200 mg de Sulfaméthoxazole et 40 mg de Triméthoprime). Les échantillons sont incubés à température ambiante, en remuant chaque semaine avec une spatule, après 15 jours, cette opération est refaite une deuxième fois. En plus, l'échantillon de compost est humidifié tous les 7 jours.

Cette opération a pour but d'adapter les microorganismes au substrat ajouté. Ils sont soigneusement étiquetés et conservés à température ambiante du laboratoire pendant 4 mois.

II.2. Isolement des microorganismes:

Dans le but d'isoler des souches microbiennes dominantes aptes à dégrader le sulfaméthoxazole à une concentration de 6 mg/ L et ce pour les deux échantillons, une série de dilutions (de 10^{-1} jusqu'à 10^{-7}) est préparée pour les deux échantillons. Un volume de 1 ml de la solution mère de la boue activée est dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile, les autres dilutions ont été préparées de la même façon. Pour le compost une solution mère est préparée par la dissolution de 1g d'échantillon dans 9 ml d'eau physiologique stérile, les autres dilutions ont été préparées de la même façon.

Le milieu minéral minimum solide (MMSM) contenant le substrat étudié (SMX) à 6 mg/ L préalablement coulé et séché estensemencé par étalement de quelques gouttes à partir des dilutions les plus importantes (10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7}) de chaque échantillon. Deux séries de boîtes de Pétri sont utilisées, l'une est incubé à 37°C et l'autre à 25°C pendant 24 à 48 h.

II.3. Purification des souches:

En se basant sur l'aspect macroscopique, diverses colonies ont été prélevées et repiquées sur la gélose nutritive préalablement coulée et séchée. L'ensemencement des boîtes se fait par stries, les boîtes sont incubées à deux températures (37°C, 25°C) pendant 24 h. Le repiquage est refait jusqu'à l'obtention de souches pures. On peut dire que la souche est pure si on obtient des colonies homogènes de même forme, même taille et même couleur.

Pour confirmer la pureté des souches, une coloration de Gram est réalisée.

II.4. Screening de souches bactériennes capables de dégrader le Sulfaméthoxazole:

C'est un test préliminaire qui nous a permis de choisir les souches bactériennes les plus performantes (capables de croître dans le milieu minimum minéral (MMM) où le SMX est la seule source de carbone) pour le test de la biodégradation.

Les souches purifiées sontensemencée dans 10 ml de milieu minimum minéral sans glucose et en présence de sulfaméthoxazole (6 mg/L), l'incubation est faite dans le Bain Marie agitateur à 26° C et 150 rpm. La cinétique de croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm chaque 24 h pendant 5 jours.

II.5. Identification des souches bactériennes:

Chaque colonie purifiée est prélevée et diluée dans 1 ml d'eau physiologique. A partir de cette suspension bactérienne dense, on procède à une observation microscopique après coloration de Gram et à une série de tests biochimiques classiques en vue d'une identification éventuelle (Guiraud, 1998).

- ❖ **L'étude de la voie d'attaque des glucides:** ce test est effectué sur le milieu MEVAG afin de déterminer le type de métabolisme glucidique (fermentaire ou oxydative). On utilise deux tubes de milieu MEVAG, sur l'un on ajoute de l'huile de vaseline pour créer l'anaérobiose. La lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.
- ❖ **La mise en évidence de l'utilisation du mannitol:** le milieu utilisé est le mannitol-mobilité. C'est une gélose semi molle permettant de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. L'ensemencement se fait par piqueur central. L'obtention des résultats bien clairs nécessite un temps d'incubation de 24 h à 37°C.
- ❖ **La mise en évidence de l'utilisation du glucose, du lactose et de la production d'H₂S:** cette mise en évidence est réalisée sur le milieu TSI. On ensemence la surface de la pente de la gélose abondamment par stries serrées et le culot par piqure centrale. La lecture se fait après 24 h d'incubation à 37°C.
- ❖ **La mise en évidence de la production d'acétyl-méthyl-carbinol (acétoïne):** cette mise en évidence est effectuée sur le milieu Clark et Lubs. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 h. La révélation se fait après l'ajout de 0,5 ml d'une solution alcoolique d' α -naphthol (VP1) et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à 16% (VP2).
- ❖ **La mise en évidence de la production d'acides mixtes :** ce test est effectué sur le milieu Clark et Lubs. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. La lecture se fait après l'addition de quelques gouttes de rouge de méthyle.
- ❖ **La mise en évidence de la réduction des nitrates:** l'ensemencement est effectué sur bouillon nitraté. Incuber à 37°C pendant 24h. La lecture se fait en ajoutant une goutte de réactif Nitrate 1 (solution α -Naphthol à 6% dans l'alcool à 60%) et une goutte du réactif Nitrate 2 (solution α -Naphthol à 16% en eau distillée).
- ❖ **La mise en évidence de la 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 24 h, l'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs.
- ❖ **La recherche d'une Tryptophane désaminase (TDA):** ce test est effectué sur le milieu urée-indole, les résultats sont obtenus après 24 h d'incubation à 37°C. La lecture se fait après l'ajout de quelques gouttes de perchlorure de fer en milieu acide (réactif TDA). L'apparition d'une couleur rouge brun indique la présence de l'enzyme dans le milieu.

- ❖ **La mise en évidence de l'uréase:** cette mise en évidence est effectuée sur le milieu urée-indole, et la révélation se fait après incubation à 37°C pendant 24 h. Le virage de couleur au rouge violacé indique la présence de l'uréase.
- ❖ **Utilisation du citrate comme seule source de carbone:** ce test est réalisé sur le milieu de Simmons. La lecture se fait après incubation à 37°C pendant 24 h à 5 jours. Une culture bactérienne abondante avec bleuissement du milieu démontre l'utilisation de citrate.

- ❖ **La recherche des décarboxylases (arginine-dihydrolase: ADH; ornithine-décarboxylase: ODC; lysine-décarboxylase: LDC):** le milieu utilisé est le milieu Moëller additionné ou non (tube témoin) d'un acide aminé correspondant (arginine ou ornithine ou lysine). La lecture a lieu après 24 h d'incubation à 37°C. Le virage alcalin (violet) du milieu indique la présence de ces enzymes.

- ❖ **La recherche de la catalase :** le test classique consiste à mettre du matériel bactérien, prélevé par une anse métallique dans une goutte de peroxyde d'hydrogène déposée sur une lame de verre. La présence de catalase s'exprime aussitôt par un dégagement gazeux (O₂) aisément discernable.

II.6. Test de biodégradation du Sulfaméthoxazole :

Dans des Erlenmaeyers de 250 ml, un volume de 72 ml de bouillon minimum minéral contenant 3 mg/ L de SMX et sans glucose est ensemencé par 5% de culture bactérienne pure, l'inoculation se fait dans des conditions d'asepsie totale. Le contrôle utilisé est dépourvue de culture bactérienne. Les Erlenmaeyers sont fermés par le coton et la gaze pour assurer l'aération et couverts par le papier aluminium pour éviter tout sorte de dégradation abiotique (Larcher *et Yargeau*, 2011). L'incubation se fait dans le Bain Marie agitateur à 26°C et 150 rpm pendant 48 h.

Des mesures de la DO à 600 nm sont faites chaque 2 h par prélèvement de 1 ml à partir de chaque Erlenmeyer, dont le but est de suivre la croissance bactérienne au fur et à mesure avec la biodégradation du SMX.

Des échantillons de 2 ml sont prélevés de chaque Erlenmeyer pour l'HPLC dans des conditions aseptiques. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 10,000 rpm afin d'obtenir un surnageant exempt de cellules microbiennes. Les surnageants sont récupérés et filtrés par des micro-filtres (0,20 µm) (Gauthier *et al.*, 2010). Cette opération est faite pendant trois temps différents (le temps 0, 24 et 48 h). Les filtrats sont conservés dans des microtubes au congélateur.

II.7. Méthode d'analyse :

Pour l'analyse des échantillons, la méthode de Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est requise. Cette dernière comporte une colonne C-18 apolaire inversée, une pompe (LC-20 AT), un dégazeur (DGU -20A₃), un détecteur UV-visible (SPD- 20AV) et un enregistreur (CR 8A). La phase mobile utilisée est constituée d'un mélange d'acetonitrile (25%), l'eau distillé (65%) et 25 Mm d'acide formique (10%) avec un débit de 0,5 ml/ min. 270 nm est la longueur d'onde utilisée pour détecter le SMX. Les filtrats sont injectés à l'aide d'une seringue spécifique de 20 µl (Trovó *et al.*, 2009).

Résultats et discussion

Résultats et discussion:

I. Isolement des microorganismes :

La recherche des groupes microbiens dominants, isolés de différentes sources (boues activées et compost ménager) impliqués dans le phénomène de la biodégradation du sulfaméthoxazole, donne des colonies bactériennes d'aspects macroscopiques différents. Tous ces isolats sont capables de se développer sur le milieu minimum solide contenant le SMX comme source dominante de carbone. Ces souches ont donc la capacité de résister au SMX, et probablement capables de le dégrader.

Après le repiquage et la purification sur GN, on a obtenu neuf (9) souches qui sont: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 et S9. Les souches S1, S3, S4 et S7 produisent une pigmentation verte, diffusant dans toute la boîte de Pétri (**Figure 2**). De plus, une odeur caractéristique s'exhale de ses cultures. Contrairement aux souches précédentes, la pigmentation jaune produite par les souches S2, S5 et S8 est non diffusible (**Figure 3**). En ce qui concerne les colonies des souches S6 et S9 elles ont une coloration beige.

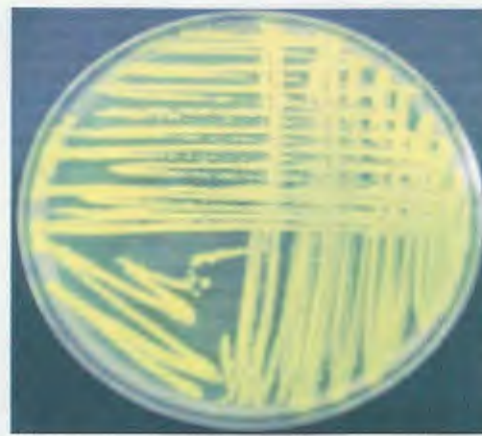


Figure 2: La souche S4 sur Gélose nutritive

figure 3: La souche S2 sur Gélose nutritive

En plus de ces caractéristiques macroscopiques, ces souches isolées sont d'origine et de température d'incubation différente. Le tableau suivant résume les caractéristiques générales de ces neuf souches avec la description macroscopique des colonies sur la gélose nutritive.

Tableau (3): Caractéristiques des neuf souches isolées.

La souche	L'origine	température d'incubation	Description macroscopique des colonies sur GN
S 1	Compost	37° C	Petite colonie visqueuse, arrondie, avec une pigmentation verte diffuse dans toute la boîte de Pétri et une odeur caractéristique.
S 2	Compost	25° C	Grande colonie jaune, arrondie et visqueuse
S 3	Compost	25° C	Colonie visqueuse, arrondie, avec une pigmentation verte diffuse dans toute la boîte de Pétri et une odeur caractéristique.
S 4	Boue activée	37° C	Petite colonie visqueuse, arrondie, avec une pigmentation verte diffuse dans toute la boîte de Pétri et une odeur caractéristique.
S 5	Boue activée	37° C	Grande colonie jaune, arrondie et visqueuse
S 6	Compost	25° C	Grand colonie beige, arrondie et visqueuse
S 7	Boue activée	25° C	Petite colonie visqueuse, arrondie, avec une pigmentation verte diffuse dans toute la boîte de Pétri et une odeur caractéristique.
S 8	Compost	37° C	Grande colonie jaune, arrondie et visqueuse
S 9	Compost	37° C	Grand colonie beige, arrondie et visqueuse

L'observation au microscope après la coloration de Gram révèle que les 04 souches bactériennes (S1, S3, S4 et S7) apparaissent sous forme de bacille à Gram négatif, les 02 souches S6 et S9 ont aussi une forme bacillaire mais elles sont à Gram positif. Les souches restantes sont toutes des cocci dont les souches S2, S5 et S8 sont à Gram positif.

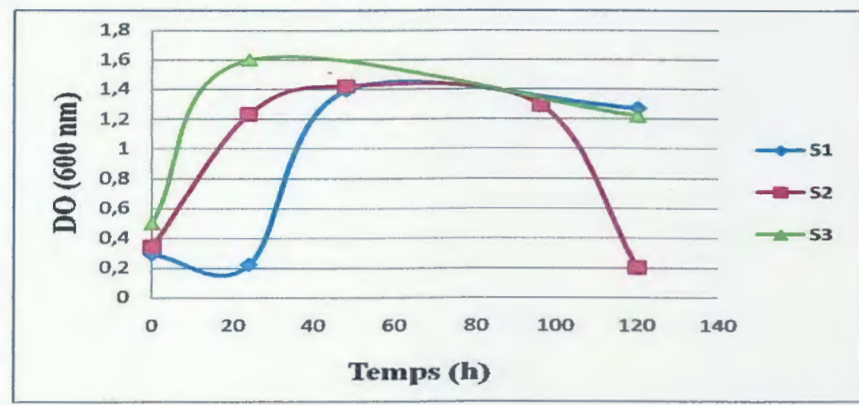
II. Screening des souches bactériennes capables de dégrader le sulfaméthoxazole :

Ce test est réalisé dans le but de choisir quelques souches capables de résister et de croître en présence du SMX pour les réserver au test de la biodégradation de cet antibiotique. Les DO sont mesurées pour les neuf souches pures isolées, les résultats sont résumés dans le tableau (4).

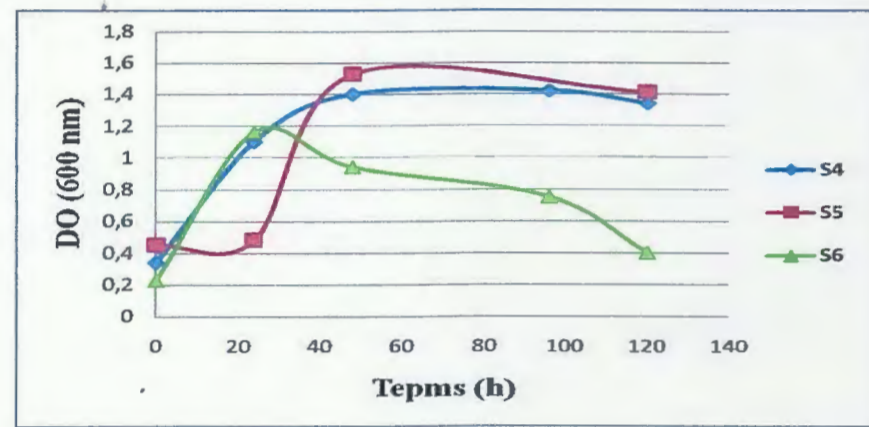
Tableau (4) : Croissance des souches bactériennes isolées sur milieu minimum en présence de Sulfaméthoxazole à 6 mg/ L.

Les souches	DO à 600 nm				
	T = 0	T= 24	T = 48	T = 96	T= 120
S1	0,29	0,2	1,39	0,1	1,3
S2	0,34	1,23	1,4	1,3	0,2
S3	0,5	1,6	0,4	0,25	1,22
S4	0,34	1,1	1,4	1,4	1,34
S5	0,45	0,5	1,5	0,44	1,4
S6	0,23	1,2	0,9	0,75	0,4
S7	0,5	0,12	1,4	1,35	0,12
S8	0,5	1,2	1,4	1,5	0,2
S9	0,3	0,22	0,01	1,35	0,13

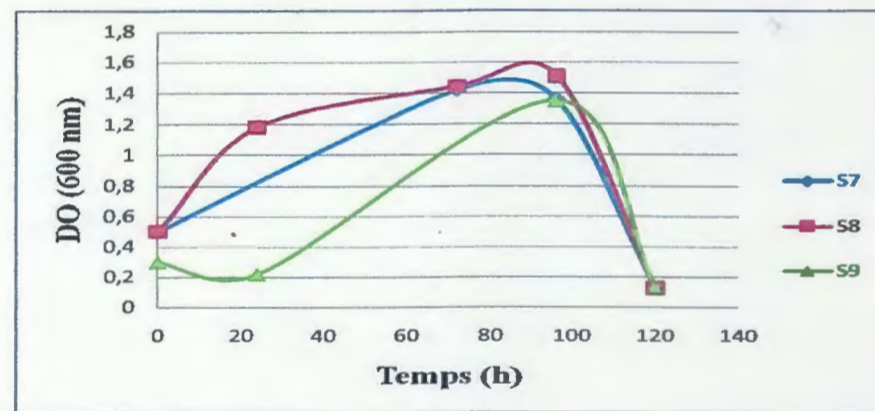
La totalité des neuf souches sont capables de croître dans le milieu minimum minéral liquide en présence de sulfaméthoxazole à 6 mg/ L. Ce test est réalisé pendant 5 jours. Selon la **figure (2)**, la densité optique des 9 souches au temps 0 est presque stable elle est comprise entre 0,2 et 0,5. Une croissance des 9 souches est observée dès les premières heures d'incubation sauf pour les souches (S1, S7 et S9), où la multiplication ne débute qu'après 24 h d'incubation. Pour la plupart des souches la multiplication maximale est marquée après 48 h d'incubation. Dans les heures suivantes, jusqu'à 120 h, on a observé une diminution considérable de la croissance sauf pour les souches (S4).



(a)



(b)



(c)

Figure 2 : La cinétique de croissance des neuf souches isolées en fonction du temps sur milieu minimum en présence du SMX à 6 mg/ L à 26°C

(a): les souches S1, S2 et S3, (b): les souches S4, S5 et S6, (c): les souches S7, S8 et S9

La capacité de nos bactéries de se développer dans le milieu minimum en présence de SMX est revenue à la capacité de ses dernières à utiliser le SMX comme un nutriment, et ça indique qu'elles sont aptes de le dégrader, ou bien à leur capacité de l'adsorber, sans pour autant l'utiliser comme source de carbone.

Selon la littérature scientifique, la biodégradation des xénobiotiques engendre souvent une phase de latence plus au moins importante qui correspond au temps nécessaire pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat, sa durée est variable en fonction de l'espèce bactérienne et des conditions plus au moins favorables du milieu (Harzallah, 2011).

Pour cette raison, les souches (S1, S7 et S9) ne débutent la multiplication qu'après 24 h d'incubation. Donc les souches (S2, S3, S4, S5, S6, S8 et S9) pourraient avoir les enzymes nécessaires pour la dégradation, préalablement induites par activation sur le même milieu, ce qui leur a permis de commencer aussi rapidement l'assimilation et la métabolisation du SMX. Le même résultat est obtenu par Gauthier (2008) qui a étudié l'effet du SMX sur la croissance de *Sphingomonas herbicidovorans*. Le ralentissement ou la diminution de la croissance bactérienne après 48 h, peut être expliqué probablement par l'effet toxique des dérivés de dégradation produits au fur et à mesure de la métabolisation du substrat. En effet, des travaux ont montré que les produits de dégradation des molécules xénobiotiques peuvent être plus toxiques que la molécule initiale (Harzallah, 2011).

D'après ces résultats, on a choisi seulement les deux souches S2 et S4 pour continuer l'identification et le test de biodégradation. Elles ont présenté une bonne croissance et une stabilité dans le milieu minimum en présence de SMX.

III. Identification :

Les faibles moyens d'investigation mis à notre disposition nous ont permis d'identifier uniquement le Genre des souches bactériennes isolées.

III. 1. Coloration de Gram :

L'observation microscopique après la coloration de Gram a révélé que l'une des deux souches bactériennes apparaît sous forme de cocci à Gram positif (souche S2), alors que la 2^{ème} souches (souches S4) est un bacille à Gram négatif.

III. 2. Mobilité :

L'ensemencement des souches bactériennes sur le milieu mannitol-mobilité a montré que la souche S2 est immobile contrairement à la souche S4 qui est mobile.

III. 3. Type respiratoire :

Les souches purifiées ne poussent qu'en surface des tubes MEVAG (Milieu d'Etude pour la Voie d'Attaque des Glucides) elles sont de ce fait toutes aérobies.

III. 4. Culture sur King A et King B :

La souche S4 présente une réaction positive avec le King A et le King B. Elle produit donc la pyoverdine et la pyocyanine. La sécrétion de la pyocyanine et la pyoverdine est caractéristique du groupe fluorescent des *Pseudomonas*. Ainsi que Les souches typiques de *Pseudomonas aeruginosa* peut secrètent le pyocyanine. L'observation de la pyocyanine identifie même l'espèce car c'est la seule à produire ce pigment.

III. 5. Caractères biochimiques et physiologiques des souches bactériennes isolées :

La souche S2 :

Le test au NO_3 montre que la souche (S2) réduit le nitrate en nitrite. Elle produit l'indole, fermente le glucose et assimile le mannitol mais pas le citrate. Elle possède une catalase, une tryptophane désaminase, une arginine dihydrolase, une ornithine décarboxylase et une lysine décarboxylase mais pas une uréase. Elle a une réaction négative avec les dérivés de l'acide pyruvique (RM, VP).

La souche S4 :

Après l'addition des réactifs nitrate 1 et nitrate 2, on note l'absence d'une coloration rouge. Ceci est signe de l'absence des nitrates dans le milieu. Néanmoins, ce résultat ne signifie pas que les souches ne possèdent pas une nitrate réductase, et doit être vérifiée par l'addition de Zn. Elle oxyde le glucose, le citrate et pas le mannitol. Une réponse positive est obtenue pour le test de la catalase, de l'arginine dihydrolase (ADH), de lysine décarboxylase (LDH), d'ornithine décarboxylase (ODC) et avec la tryptophane désaminase. Par contre, une réaction négative est obtenue pour les tests de l'uréase, de l'indole et des dérivés de l'acide pyruvique (RM, VP).

Les résultats de l'identification biochimique sont résumés dans le tableau (5).

Tableau (5) : Résultats de l'identification biochimique des deux souches bactériennes S2 et S4:

Les Tests biochimiques	Les résultats	
	S2	S4
Gram	Cocci à Gram +	bacille à Gram -
pigmentation	Jaune	Vert
Type respiratoire	Aérobie strict	Aérobie strict
catalase	+	+
Mannitol	Légèrement +	-
mobilité	Immobile	Mobile
MEVAG	Ouvert : + Fermé : légèrement +	Ouvert : + Fermé : -
TSI : Glucose	légèrement +	-
Lactose	légèrement +	-
H ₂ S	-	-
Gaz	-	-
RM	-	-
VP	-	-
Uréase	-	-
indole	+	+
ADH	+	+
ODC	+	+
LDC	+	+
TDA	+	+
Citrate de simmons	-	+
Nitrate réductase	+	à confirmer
King A	/	+
King B	/	+
Chapman	+	/
Mac Conkey	/	+

+ : positive,

- : négative.

En se basant sur les schémas dichotomiques et en comparant les caractères étudiés avec ceux des Genres bactériens publiés dans la 2^{ème} édition du «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» (voir annexe), on peut assimiler les bacilles à Gram négatif (souche S4) au Genre *Pseudomonas* et les coques à Gram positif (souche S2) au Genre *Micrococcus*. Les souches S2 et S4 pigmentées poussent bien sur les milieux Chapman (Figure 4) et Mac Conkey, respectivement, ce qui renforce notre hypothèse.

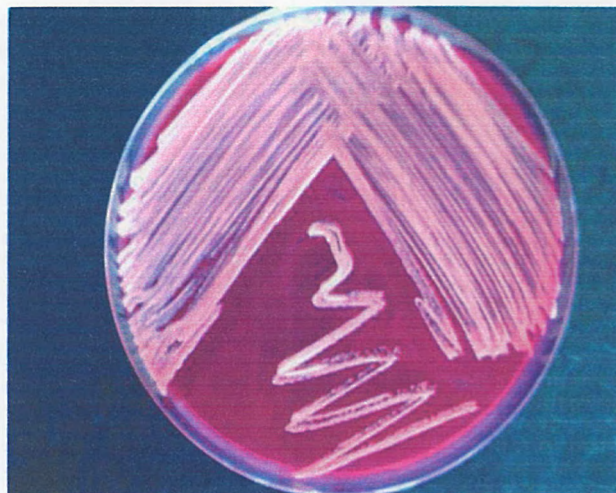


Figure 4: *Micrococcus sp* sur Chapman

IV. Test de biodégradation du Sulfaméthoxazole:

Le but de ce travail est l'étude de la biodégradation du sulfaméthoxazole en utilisant les deux souches bactériennes isolées S2: *Micrococcus sp* et S4: *Pseudomonas sp* isolées à partir de la boue activée et du compost ménager.

Les valeurs croissantes des densités optiques renforcent notre choix de ces deux souches qui peuvent alors résister à la présence de l'antibiotique à une concentration de 3 mg/ L. Le test est réalisé pendant 48 h dans l'obscurité pour éviter la dégradation du substrat par voie photochimique. Les résultats de la croissance des deux bactéries en présence du sulfaméthoxazole et les concentrations de ce dernier dans les trois échantillons (contrôle, S2 et S4) sont résumés dans le tableau (6).

Tableau (6): La cinétique de la croissance des deux souches *Micrococcus* sp. et *Pseudomonas* sp. pendant le test de la biodégradation avec les concentrations du SMX détecté par HPLC.

Le temps	Contrôle	S2		S4	
	[SMX] %	DO à 600 nm	[SMX] %	DO à 600 nm	[SMX] %
T= 0	99,55	0,130	92,45	0,392	97,7
T= 2		0,205		0,098	
T= 4		0,381		0,108	
T= 22		0,504		0,376	
T= 24	92,19	0,153	68,6	1,05	97,04
T= 26		0,161		1,072	
T= 28		0,353		1,033	
T= 46		0,306		1,202	
T= 48	90,37	1,511	46,18	1,238	0

Selon la **figure (5)**, une croissance modérée est observée entre le temps 0 h ($DO_{600nm} = 0,13$) et le temps 24 h ($DO_{600nm} = 0,15$) pour la souche S2, sachant que la croissance augmente considérablement, elle atteint 1,51 après 48 h. De même, la souche S4 a pu pousser dans le milieu minimum minéral en présence de sulfaméthoxazole mais avec une croissance plus élevée que celle observée avec la souche S2, remonte de 0,4 au temps 0h à 1,05 au temps 24h et arrive jusqu'à 1,24 après 48 h d'incubation (**figure 6**).

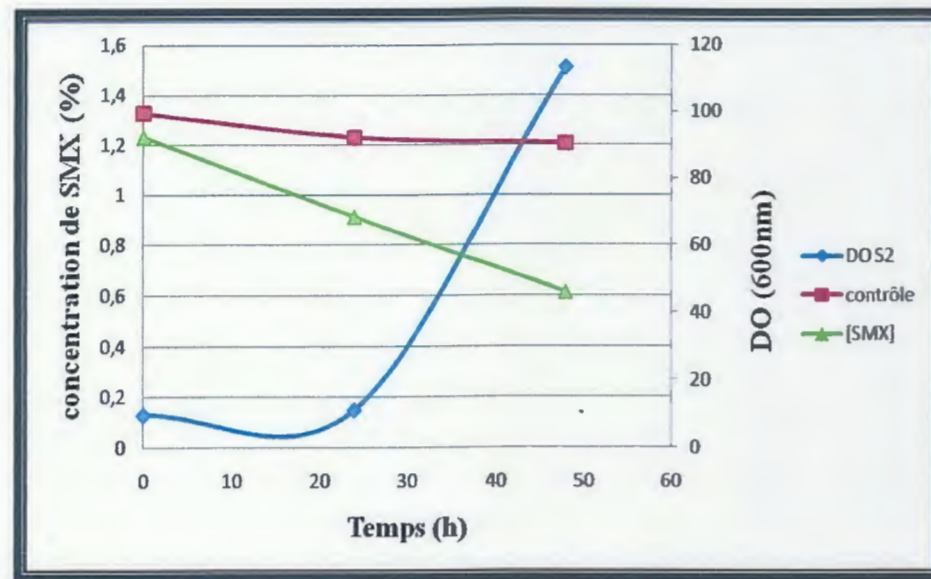


Figure (5): Biodégradation du sulfaméthoxazole (SMX) par *Micrococcus sp.* (S2) pendant 48 h d'incubation.

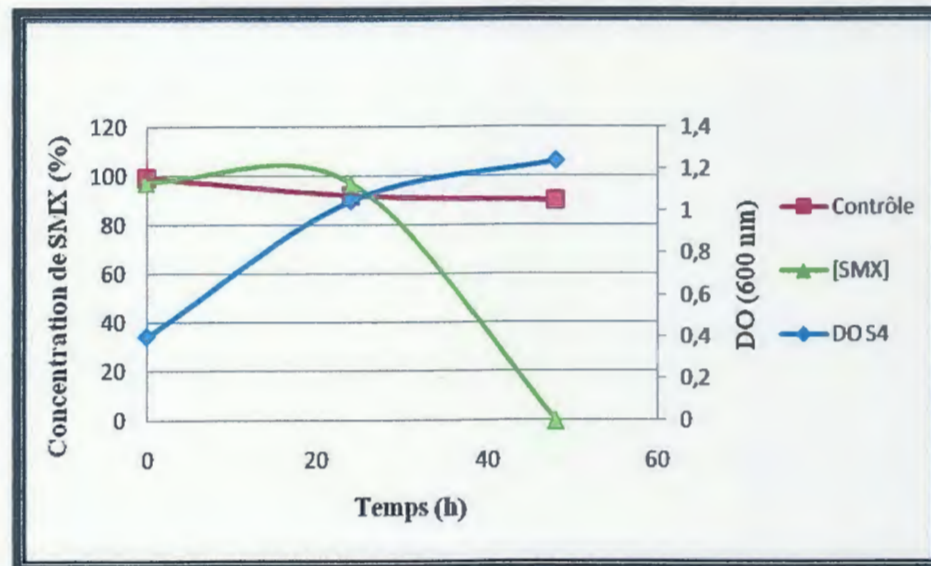


Figure (6) : Biodégradation du sulfaméthoxazole (SMX) par *Pseudomonas sp.* (S4) pendant 48 h d'incubation.

Selon les chromatogrammes d'HPLC obtenus, on a observé au temps 0 h l'apparition d'un pic dans les 3 échantillons qui correspond au Sulfaméthoxazole avec un temps de rétention égal à environ 3,6 minutes. Après 24 h d'incubation une diminution remarquable est observée, elle est de l'ordre de 0,66% en présence de *Pseudomonas* sp. et 23,85% en présence de *Micrococcus* sp. et de l'ordre de 7,36% pour le contrôle. De même, on a remarqué l'apparition de nouveaux pics correspondant probablement à de nouveaux métabolites dans les chromatogrammes avec différents temps de rétention. Dans le contrôle, un seul métabolite est apparu avec un temps de rétention de 5,4 minutes et une concentration de 8,75 %. Pour la souche S2 l'apparition de deux métabolites (1 et 2) est observée. Le métabolite 1 à un temps de rétention de 2,34 minutes avec une concentration de 2,29 % alors que le métabolite 2 a un temps de rétention de 5,13 minutes avec une concentration de 15,77 %. Sachant qu'un seul métabolite est apparu ayant un temps de rétention de 7,53 minutes avec une concentration de 0,34 % pour la souche S4. Après 48h d'incubation une disparition totale du SMX est enregistrée en présence de *Pseudomonas* sp. Une réduction considérable dans la concentration du SMX est observée de l'ordre de 46,37% en présence de *Micrococcus* sp. et de 9,13% pour le contrôle, avec l'apparition d'autres pics dans les chromatogrammes. Pour le contrôle, un métabolite ayant une concentration de 30,22 % correspondant à un temps de rétention de 3,4 minutes est observé. Les temps de rétentions 5.25, 5.39, 5.37, 9.95, 11.37 et 12.50 minutes sont correspondants à six métabolites de SMX apparus de la souche S2 avec des concentrations 41.77 %, 6.52 %, 0.90 %, 31.61 %, 9.14 %, 3.91 % et 0.69 %, respectivement. Dans le cas de la souche S4, 5 métabolites sont apparus à des temps de rétention variables: 2.50, 2.7, 4.16, 4.5 et 7.3 minutes avec des concentrations de 0.42%, 0.50%, 28.70%, 59.10% et 4.85%, respectivement. Généralement ces métabolites restent à être identifiés, mais une proposition est donnée par **Gauthier (2008)** qui est observé que la biodégradation de Sulfaméthoxazole par *Rhodococcus rhodochrous* produit deux métabolites, un de ceux-ci a été identifié comme étant l'hydroxy-N-(5 méthyle 1, 2-oxazol-3-yl) benzène-1-sulfonamide qui est proche au Sulfaméthoxazole. Cependant, pour le deuxième métabolite seulement la formule chimique a été proposée ($C_8H_{19}O_4N_2S$).

La **figure (7)** montre les chromatogrammes obtenus dans le début et la fin de l'expérience de la biodégradation en présence de *Pseudomonas* sp. (S4).

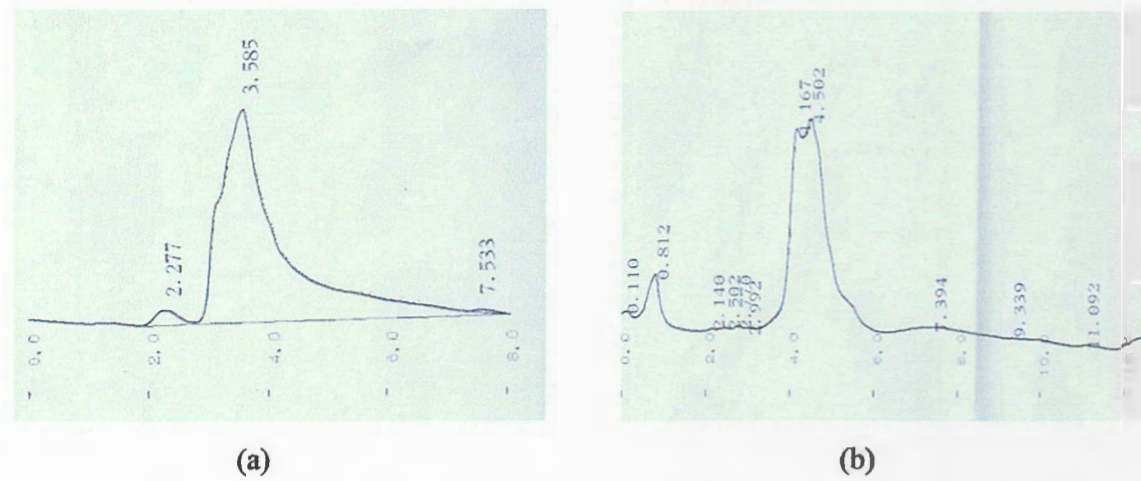


Figure (7): Chromatogrammes d'HPLC obtenus avec le test de biodégradation de Sulfaméthoxazole par la souche *Pseudomonas* sp. (S4).

(a) au temps 24 h, (b) au temps 48 h

La phase mobile: acetonitrile (25%), eau distillée (65%), 25 Mm d'acide formique (10%).

Débit de 0,5 ml/ min; Longueur d'onde = 270 nm.

Nos résultats sont similaires à ceux observés par *Gauthier et al. (2010)* qui ont étudié la biodégradation de SMX par *Rhodococcus rhodochromus* et ont observé une biodégradation de l'ordre de 29%. Ainsi, *Xu et al. 2011* ont observé que les souches *Bacillus firmus* et *Bacillus cereus* étaient des bactéries qui dégradent le SMX avec une haute efficacité dans les rivières. D'autres microorganismes comme les champignons ont la capacité de dégrader le Sulfaméthoxazole, *Phanerochaete chrysosporium* peut dégrader totalement le SMX après une période d'incubation de 4 jours (*Rodarte-Morales et al., 2011*).

Le témoin sans inoculation montre une perte abiotique relativement importante. La perte abiotique est notée dès le premier jour, elle suit un profil continu jusqu'à la fin de l'expérience. Dans les eaux de surface, le SMX peut disparaître par évaporation ou photo-décomposition. Ces processus pourraient bien expliquer la diminution du SMX dans le témoin stérile. Mais dans nos conditions expérimentales, l'incubation des échantillons est effectuée dans l'obscurité, l'effet de la lumière est par conséquent éliminé. L'évaporation est certainement impliquée mais pas de manière prépondérante car le milieu est fermé et son volume d'air est limité. Le taux de dégradation abiotique du SMX ne peut donc résulter de sa photo-décomposition ou de son évaporation, il serait plutôt dû à d'autres processus physico-chimiques qui restent à déterminer. Ces résultats sont agrées avec ceux obtenus par *Harzallah (2011)* dans une étude sur la biodégradation de 2-5-diméthylphénole par le microbiote des effluent d'entrée et de sortie de la station d'épuration d'IBN ZIAD.

Aussi bien en conditions biotiques qu'abiotiques, le SMX n'est pas minéralisé car aucune production de gaz n'est enregistrée dans nos Erlenmeyers, durant toute la durée d'incubation. Sa dégradation signifie donc probablement sa biotransformation en sous produits dérivés.

Il reste à déterminer la nature de ces dérivés. Seule une analyse complète des produits terminaux à l'issue de la période d'incubation pourrait donner des réponses probantes sur les produits et les mécanismes de dégradation biotiques et abiotiques concernés.

En comparant la dégradation de SMX dans le témoin stérile et en présence des souches bactériennes (*Pseudomonas* sp. et *Micrococcus* sp.), on observe qu'il y a une différence significative, il est donc clairement établi que la disparition totale ou la diminution de la concentration de SMX est causée par l'activité biologique des deux souches *Pseudomonas* sp. et *Micrococcus* sp. ces résultats sont en contraste avec la classification de Joss *et al* (2006), qui a considéré le SMX comme une substance non biodégradable et /ou difficile à biodégrader. Tandis que Le-Minh *et al.*, (2010), ont montré que le sulfaméthoxazole est biodégradable avec un taux plus au moins élevé par le microbiote de la boue activée. Yu *et al.* (2011), ont étudié les mécanismes d'élimination de sulfaméthoxazole par des cellules immobilisées réalisés dans des réacteurs en Batch. Ils ont observé une biodégradabilité forte (>40% d'élimination).

Les deux genres bactériens *Pseudomonas* et *Micrococcus* sont très connus pour leur capacité de biodégradation d'une variété de polluants organiques, et elles ont des rôles majeurs dans les processus de biorémediation et les traitements des sites pollués. Il est connu que le Genre *Pseudomonas* est capable d'éliminer les composés difficiles à dégrader. Différentes enzymes sont produites par ces bactéries, il a été découvert que l'arylamine N-acétyltransferase est produite par *Pseudomonas aeruginosa* et cette enzyme a une spécificité pour les amines aromatiques, donc cette bactérie peut utiliser le sulfaméthoxazole comme substrat; toutefois, un taux de dégradation de SMX faible (5.6%) par *P. aeruginosa* est probablement dû à une autre enzyme produite par la bactérie qui est la dihydropteroate synthétase (DHPS) (Larcher et Yargeau, 2011).

Bayoumi (2009), a observé que la souche *Pseudomonas alcaligenes*-DAFS311 est capable de dégrader complètement le naphthalène, l'acénaphthylène et le benzol. Une autre étude, réalisée par Prasanna *et al* (2008), a montré que la bactérie *Pseudomonas* sp. est capable de biodégrader le toluène et le phénol de l'ordre de 87,1 et 84,04, respectivement.

Concernant *Micrococcus*, il est connu pour sa capacité à biodégrader une variété de composés aromatiques. La biodégradation de la mélamine formaldéhyde est observée par une souche de *Micrococcus* sp. isolée des effluents des eaux usées industrielle (industrie aminoplastique) (El-Sayed *et al.*, 2006). D'autre part Bayoumi (2009), a trouvé que la souche *Micrococcus lylae* SBS661 est capable de dégrader complètement l'acénaphthylène, l'acénaphthène et l'anthracène.

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

Conclusion

Conclusion:

Notre étude expérimentale, a été menée sur la biodégradation du Sulfaméthoxazole par des microorganismes isolés de la boue activée de la station d'épuration des eaux usée d'ERABTA (Jijel) et d'un composte ménager de la région de KAOUS, ces derniers représentent une biodiversité très importantes en microorganismes et en composés organiques qui sont utilisés comme source de carbone et d'énergie. Les résultats obtenus ont permis de noter les conclusions suivantes:

- Neuf souches bactériennes capables de résister au Sulfaméthoxazole ont été isolées, mais seulement deux souches ont été identifiées.
- L'identification montre que l'une des souches (S2) appartient au Genre *Micrococcus* et l'autre souche (S4) au Genre *Pseudomonas*.
- *Micrococcus* sp. dégrade partiellement le Sulfaméthoxazole avec un taux de (46.37%).
- *Pseudomonas* sp. est capable de le dégradé complètement (100%).
- Selon les chromatogrammes d'HPLC, de nouveaux pics apparaissent correspondant probablement aux métabolites issus de cette biodégradation.

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

- ❖ Il est indispensable d'identifier les métabolites intermédiaires et terminaux issus de la biodégradation et/ou biotransformation du sulfaméthoxazole, et leurs effets sur la croissance des deux souches bactériennes;
- ❖ Il serait intéressant d'effectuer l'étude dans un système de culture permettant un approvisionnement continu du milieu en oxygène, pour lever la contrainte du système batch;
- ❖ De même, il serait intéressant d'établir une optimisation des conditions intervenant dans le processus de biodégradation (effet du pH et de la température), l'effet de la concentration de sulfaméthoxazole, l'effet de la combinaison des deux souches isolés, et aussi avec d'autres souches;
- ❖ Il serait également intéressant d'effectuer une identification génomique des souches isolées jusqu'au rang de l'espèce et d'étudier l'évolution de l'équilibre de leurs populations respectives.

Références bibliographiques

Référence bibliographique:

- Abellan M.N.; Bayarri B.; Giménez J. et Costa J. (2007).** Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous suspension of TiO₂. *Applied Catalysis B: Environment*. 74: 233-241.
- Abellan M.N.; Gimenez J. et Esplugas S. (2009).** Photocatalytic degradation of antibiotics: The case of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Catalysis Today*. 144:131-136.
- Al-Ahmad A.; Dashner F.D. et Kummerer K. (1999).** Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 37: 158-163.
- Alexy R.; Kümpel T. et Kümmerer K. (2004).** Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. *Chemosphere*. 57: 505-512.
- Alighardashi A.; Pons M.N. et Potier O. (2008).** Présence et devenir des médicaments dans les eaux usées urbaines. *Revue des Sciences de l'Eau*. 21(4): 413-426.
- Andreozzi R.; Marotta R. et Praéxus N.A. (2003).** Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*. 50: 1319-1330.
- Baran W.; Adamek E.; Ziemianska J. et Sobczaka A. (2011).** Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. Review. *Journal of Hazardous Materials* 196: 1-15.
- Batt A.L.; Srtow D.D. et Aga D.S. (2006).** Occurrence of sulfamide antimicrobials in private water wells in washington country, idaho, USA. *Chemosphere*. 64: 1963.
- Bayoumi R.A. (2009).** Bacterial Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Heavy Oil Contaminated Soil. *Journal of Applied Sciences Research*. 5(2): 197-211.
- Beausse J. (2004).** Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry*. 23: 753-761.
- Besse J.P.; Kausch-Barreto C. et Garric J. (2008).** Exposure assessment of pharmaceuticals and their metabolites in the aquatic environment: Application to the French situation and preliminary prioritization. *Human and Ecological Risk Assessment*. 14 (4): 665-695.
- Besse J.P. (2010).** Impact environnemental des médicaments à usage humain sur le milieu récepteur: évaluation de l'exposition et des effets biologiques pour les écosystèmes d'eau douce. Thèse de doctorat. Université de METZ – UFR SCI.F.A. France.
- Boxall A.B.A.; Fogg L.A.; Kay P.; Blackwel P.A.; Pemberton E.J. et Croxford A. (2003).** Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicology Letters*. 142: 207-218.
- Cabello F.C. (2004).** Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health. *Revista Medica de Chile*. 132: 1001-1006.
- Cabello F.C. (2006).** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environment Microbiology*. 8: 1137-1144.
- Carballa M.; Omil F.; Alder A.C. et Lema J.M. (2006).** Comparison between the conventional anaerobic digestion of sewage sludge and its combination with a chemical or thermal pre-treatment concerning the removal of pharmaceuticals and personal care products. *Water Science and Technology*. 53 (8): 109-117.

Carlsson G.; Örn S. et Larsson D.G.J. (2009). Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28(12): 2656-2662.

Chang H.; Hu J.; Asami M. et Kunikane S. (2008). Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1190 (1-2): 390-393.

Clara M.; Kreuzinger N.; Strenn B.; Gans O. et Kroiss H. (2005a). The solids retention time as a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research*. 39 (1): 97-106.

Clara M.; Strenn B.; Gans O.; Martinez E.; Kreuzinger N. et Kroiss H. (2005b). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*. 39 (19): 4797-4807.

Connor E.E. (1998). Sulfonamide antibiotics. *Primary Care Update for OB/GYNs*. 5 (1): 32-35.

Dantas R.F.; Contreras S.; Sans C. et Esplugas S. (2008). Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation. *Journal of Hazardous Materials*. 150: 790-794.

De Groot A. (2005). Les médicaments non utilisés et les pays en développement: la réalité du terrain. *Cahiers de Santé*. 15 (2): 125-127.

Diaz-Cruz M.S.; Lopez de Alda M.J. et Barcelo D. (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*. 22 (6): 340-351.

Dirany A. (2010). Études cinétique et mécanistique d'oxydation/minéralisation des antibiotiques sulfaméthoxazole (SMX), amoxicilline (AMX) et sulfachloropyridazine (SPC) en milieux aqueux par procédés électrochimiques d'oxydation avancée. Mesure et suivi d'évolution de la toxicité lors du traitement. Thèse de doctorat. Université Paris-EST. France.

Egerton T.A.; Christensen P.A.; Kosa S.A.M.; Onoka B.; Harper J.C et Tinlin J.R. (2006). Photoelectrocatalysis by titanium dioxide for water treatment. *International Journal of Environmental Pollution*. 27: 1-19.

El-Sayed W.S.; El-Baz A.F. et Othman A.M. (2006). Biodegradation of melamine formaldehyde by *Micrococcus sp.* strain MF-1 isolated from aminoplastic wastewater effluent. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 57: 75-81.

Escher B.I.; Baumgartner R.; Koller M.; Treyer K.; Lienert J. et McArdell C.S. (2011). Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Research*. 45: 75-92.

Fatta D.; Nikolaou A.; Achilleos A. et Meric S. (2007). Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 26: 515-533.

Fenet H.; Gomez E.; Leclerc M.; et Casellas C. (2006). Devenir des médicaments dans l'environnement. *Environnement, Risques et Santé*. 5: 243-247.

Fent K.; Anna A. et Caminada W.D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology Review*. 76: 122-159.

Ferreira C.S.G.; Nunes B.A.; De Melo Henriques-Almeida J.M. et Guilhermino L. (2007). Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 76: 452-458.

Fiquet B. (2002). Médicaments non utilisés : Attention aux dons empoisonnés. *Alternative Santé*. France. 2 p.

Garric J. et Ferrari B. (2004). Les substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques: présence, comportement et impact. *TSM Dossier*. 99: 47-58.

Gauthier H. (2008). Biodegradation of pharmaceuticals by microorganisms. Thèse de Master. Department of chemical engineering. McGill University, Montreal. Canada.

Gauthier H.; Cooper D.G. et Yargeau V. (2008). Biodegradation of pharmaceuticals by common microorganisms. *Water Pollution IX*. 263-271.

Gauthier H.; Yargeau V. et Cooper D.G. (2010). Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. *Science of the Total Environment*. 408: 1701-1706.

Gervaise Y. (2000). Nouveaux outils pour la prise en compte globale du lien environnement/santé au service de l'expertise. *La revue Experts* n° 48. Rouen. France. 11 p.

Göbel A.; Athomsen A.; Mc Ardell C.S.; Joss A. et Giger W. (2005). Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environmental Science Technology*. 39 (11): 3981-3989.

Göbel A.; Mc Ardell C.S.; Joss B.; Siegrist H. et Giger W. (2007). Fate of sulfonamide, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment*. 372: 361-371.

Gomez M.J.; Sirtori C.; Mezcua M.; Fernandez-Alba A.R. et Agüera A. (2008). Photodegradation study of three dypirone metabolites in various water systems: identification and toxicity of their photodegradation products. *Water Research*. 42: 2698-2706.

Gros M.; Petrović M.; Ginebreda A. et Barceló D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*. 36: 15-26.

Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie Alimentaire*. Dunod (Ed.). Paris. France. 652 p.

Gunnarsson L.A.; Kristiansson E.; Rutgersson C.; Sturve J.; Fick J.; Förlin L. et Larsson D.G.J. (2009). Pharmaceutical industry effluent diluted 1:500 affects global gene expression, cytochrome P450 1A activity, and plasma phosphate in fish. *Environmental toxicology and chemistry*. 28(12): 2639-2647.

Haguenoer J.M. (2010). Les résidus de médicament represent-ils un risque pour la santé publique?. *Santé Publique*. 3(22) : 325-342.

Hartemann P. (2006). Approche pour l'évaluation des effets émergents des résidus de médicaments dans les eaux. *Environnement, Risques et Santé*. 5: 307-310.

Harzallah B. (2011). Etude de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'IBN ZIAD. Mémoire de Magister. Université Mentouri, Constantine. Algérie.

Hernando M.D.; Mezcua M.; Fernandez-Alba A.R. et Barcelo D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*. 69: 334-342.

Homem V. et Santos L. (2011). Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices. *Journal of Environmental Management. Review.* 92 : 2304- 2347.

Ingerslev F. et Halling-Sørensen B. (2000). Biodegradation properties of sulfonamides in activated sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 19 (10): 2467-2473.

Jones O.A.H.; Voulvoulis N. et Lester J.N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals .*Water Research.* 36: 5013-5022.

Jones O.A.H.; Voulvoulis N. et Lester J. N. (2007). The occurrence and removal of selected pharmaceutical compounds in a sewage treatment works utilising activated sludge treatment. *Environment Pollution.* 145 (3): 738-744.

Joss A.; Zabczynski S.; Gobel A.; Hoffmann B.; Lö ffler D.; Mc Ardell C.S.; Ternes T.A.; Thomsena A. et Siegrist H. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Research.* 40: 1686-1696.

Karpman E. et Kurzrock E.A. (2004). Adverse reactions of nitrofurantoin ,trimethoprim and sulfamethoxazol in children . *The Journal of Urology.*172 (2): 448-453.

Kemper N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators.* 8: 1-13.

Klavarioti M.; Mantzavinos D. et Kassinos D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International.* 35: 402-417.

Kouadio L.D.; Traore K.; Bekro Y.A.; Véronique M.; Dembele A.; Mamadou K.; Mazellier P.; Legube B. et Houenou P. (2009). Contamination des Eaux de Surface par les Produits Pharmaceutiques en Zones Urbaines de Côte D'ivoire: Cas du District D'abidjan. *European Journal of Scientific Research.* 27(1): 140-151.

Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment. Review, Part I. *Chemosphere.* 75 (4): 417-434.

Larcher S. et Yargeau V. (2011). Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria. *Applied Microbial Biotechnology.* 91: 211-218.

Larsson D.G.J.; De Pedro C. et Paxeus N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials.* 148: 751-755.

Lecomte P. (1998). Les sites pollués: Traitement des sols et des eaux souterraines. 2^e édition revue et augmentée. *Technique et documentation.* Paris. France. 130 p.

Le-Minh N.; Khan S.J.; Drewes J.E. et Stuetz R.M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research.* 44: 4295-4323.

Lévi Y. (2006). Inquiétudes sur la présence d'antibiotiques et de bactéries antibiorésistantes dans les eaux. *Environnement, Risques est Santé.* 5(4): 261.

Li k.; yediler A.; Yang M.; schulte –Hostede S. et Wang M. (2008). Ozonation of oxytetracycline and toxicological assissement of its oxydation by sous products. *Chemosphere.* 72: 437-478.

Lin C.E.; Chang C.C. et Lin W.C. (1997). Migration behaviour and separation of sulfonamids in cappollary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A.* 768: 105-112.

Lindsey M.E.; Meyer M. et Thurman E.M. (2001). Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in ground- water and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry.* 73: 4640-4646.

- Loftsson T. et Hreinsdóttir D. (2006).** Determination of aqueous solubility by heating and equilibration: A technical note. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. 7: 29-32.
- Montiel A. (2006).** Les résidus de médicaments et le traitement des effluents d'hôpitaux. *Environnement, Risques et Santé*. 5: 296-300.
- Nikolaou A.; Meric S. et Fatta D. (2007).** Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analysis and Bioanalytical Chemistry*. 387: 1225-1234.
- Peng X.; Wang Z.; Kuang W.; Tan J. et Li K. (2006).** A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China. *Science of the Total Environment*. 371 (1-3): 314-322.
- Prasanna N.; Saravanan N.; Geetha P.; Shanmugaprakash M. et Rajasekaran P. (2008).** Biodegradation of Phenol and Toluene by *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., and *Staphylococcus* sp., Isolated from Pharmaceutical Industrial Effluent. *Advanced Biotechnology*. 20-24.
- Prescott M.; Harley P. et Klein A. (2003).** *Microbiologie*. 2^{ème} édition. Boeck- Bruxelles. p 812.
- Quiang Z. et Adams C. (2004).** Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK(a)) for human and veterinary antibiotics. *Water Research*. 38 (12): 2874-2890.
- Refat M.S.; El-Korashy S.A.; El-Deen I.M. et El-Sayed S.M. (2011).** Charge-transfer complexes of sulfamethoxazole drug with different classes of acceptors. *Journal of Molecular Structure*. 980: 124-136.
- Reif R.; Suarez S.; Omil F.; et Lema J.M. (2008).** Fate of pharmaceuticals and cosmetic ingredients during the operation of a MBR treating sewage. *Desalination*. 221 (1- 3): 511- 517.
- Rodarte-Morales A.I.; Feijoo G.; Moreira M.T. et Lema J.M. (2011).** Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27:1839-1846
- Rodayan A.; Roy R. et Yargeau V. (2010).** Oxidation products of sulfamethoxazole in ozonated secondary effluent. *Journal of Hazardous Materials*. 177: 237-243.
- Ryan C.C.; Tan D.T. et Arnold W.A. (2011).** Direct and indirect photolysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in wastewater treatment plant effluent. *Water Research*. 45:1280-1286.
- Sacher F.; Lange F.T.; Brauch H.J. et Blankenhorn I. (2001).** Pharmaceuticals in groundwaters : Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*. 938: 199-210.
- Santos L.H.M.L.M.; Araujo A.N.; Fachini A.; Pena A.; Delerue-Matos C. et Montenegro M.C.B.S.M. (2010).** Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Review. *Journal of Hazardous Materials*. 175: 45-95.
- Selvaratnam S. et Kunberger J.D. (2004).** Increased frequency of drug-resistant bacteria and fecal coliforms in an Indiana Creek adjacent to farmland amended with treated sludge. *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 653-656.
- Sukul P. et Spitteller M. (2006).** Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. *Environmental Contamination and Toxicology*. 187: 67-101.

Tamtam F.; Mercier F.; Eurin J.; Chevreuil M. et Le Bot B. (2009). Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry performance evaluation for analysis of antibiotics in natural waters. *Analysis Bioanalytical Chemistry*. 393: 1709-1718.

Tadkaew N.; Sivakumar M.; Khan S.J.; McDonald J.A. et Nghiem L.D. (2010). Effect of mixed liquor pH on the removal of trace organic contaminants in a membrane bioreactor. *Bioresource Technology*. 101 (5): 1494-1500.

Takasuka M.; Nakai H.I.R. et Raman. (2001). Spectral and X-ray structural studies of polymorphic forms of sulfamethoxazole. *Journal of Vibrational Spectroscopy*. 25: 197-204.

Ternes T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. 32 (11): 3245-3260.

Thiele-Bruhn S. (2003). Pharmaceutical antibiotic compounds in soils . review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 166: 145-167.

Togola A. et Budzinski H. (2008). Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 1177: 150-158.

Trovó A.G.; Nogueira R.F.P.; Ana A.; Sirtorib C. et Alba A.R.F. (2009). Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: Persistence, toxicity and photoproducts assessment. *Chemosphere*. 77:1292-1298.

Vazquez A.C.A. (2010). Les substances polymérique extracellulaire dans le procedé de triatement des eaux useé. Thèse de doctorat. Nancy université. France.

Xu B.; Mao D.; Luo Y. et Xu L. (2011). Sulfamethoxazole biodegradation and biotransformation in the water-sediment system of a natural river. *Bioresource Technology*. 102: 7069-7076.

Xu W.H.; Zhang G.; Li X.D.; Zou S.C.; Li P.; Hu Z.H. et Li J. (2007). Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *Water Research* 41 (19): 4526-4534.

Yu L.; Fink G.; Wintgens T.; Melin T. et Ternes T.A. (2009a). Sorption behavior of potential organic wastewater indicators with soils. *Water Research*. 43: 951-960.

Yu T.H.; Lin A.Y.C.; Lateef S.K.; Lin C.F. et Yang P.Y. (2009b). Removal of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs by extended sludge age biological process. *Chemosphere*. 77: 175 -181.

Yu T.H.; Lin A.Y.C.; Panchangam S.C.; Hong P.K.A.; Yang P.Y. et Lin C.F. (2011). Biodegradation and bio-sorption of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs using immobilized cell process. *Chemosphere*. 84:1216-1222.

Zhou W. et Moore D.E. (1994). Photochemical decomposition of sulfamethoxazole. *International Journal of Pharmaceutics*. 110 (1):55-63.

Zuccato E.; Calamari D.; Natangelo M.; et Fanelli R. (2000). Presence of therapeutic drugs in the environment. *Research Letters*: 355: 1789-179.

Zwiener C. (2007). Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment. *Analysis and Bioanalytical Chemistry*. 387(4): 1159-62.

Annexes

Annexe :

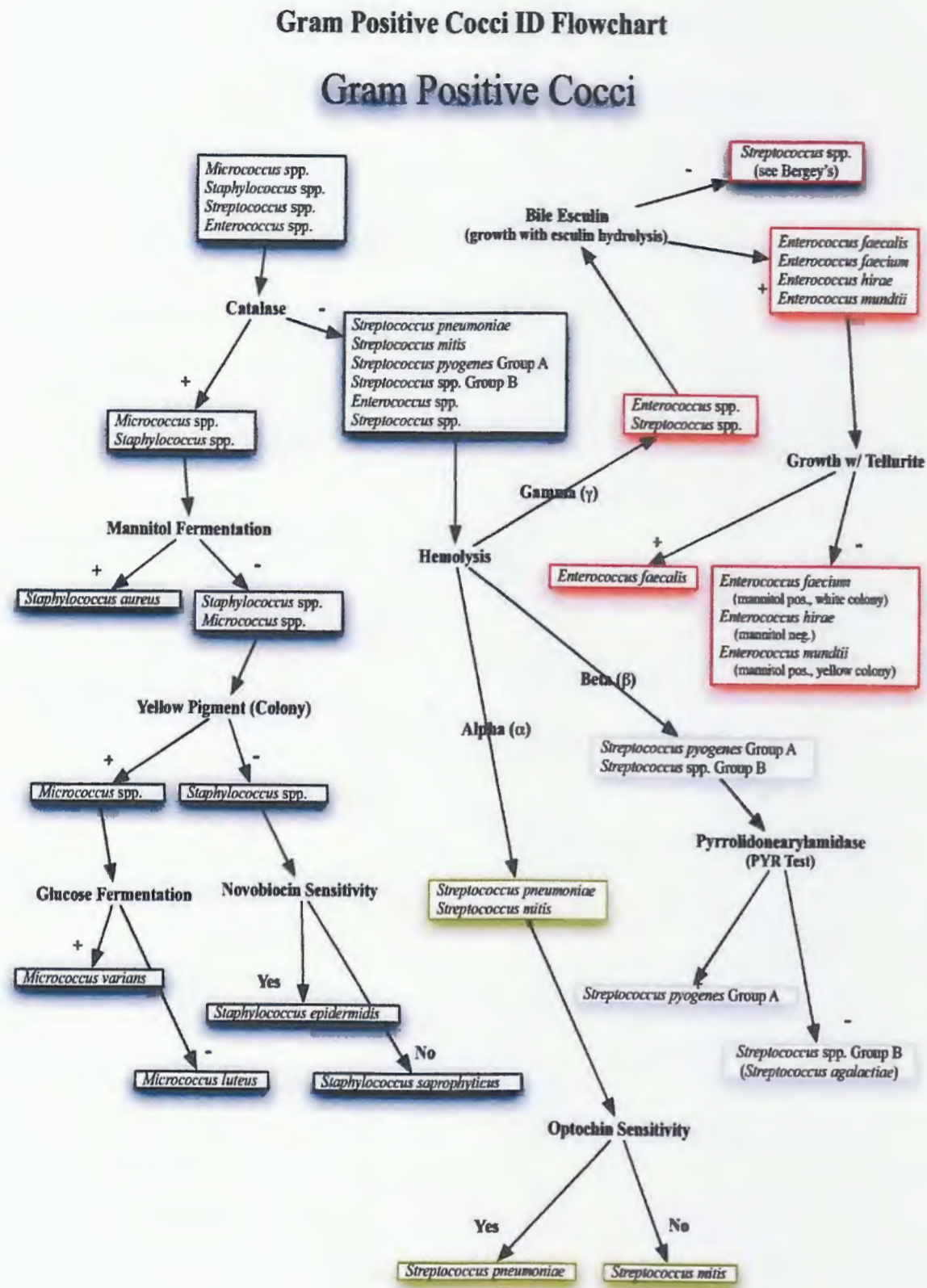


Figure 1: Schéma dicotomique pour l'identification des cocci Gram positive (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2^{ème} édition)

Gram Negative Rods ID Flowchart

Gram Negative Rods

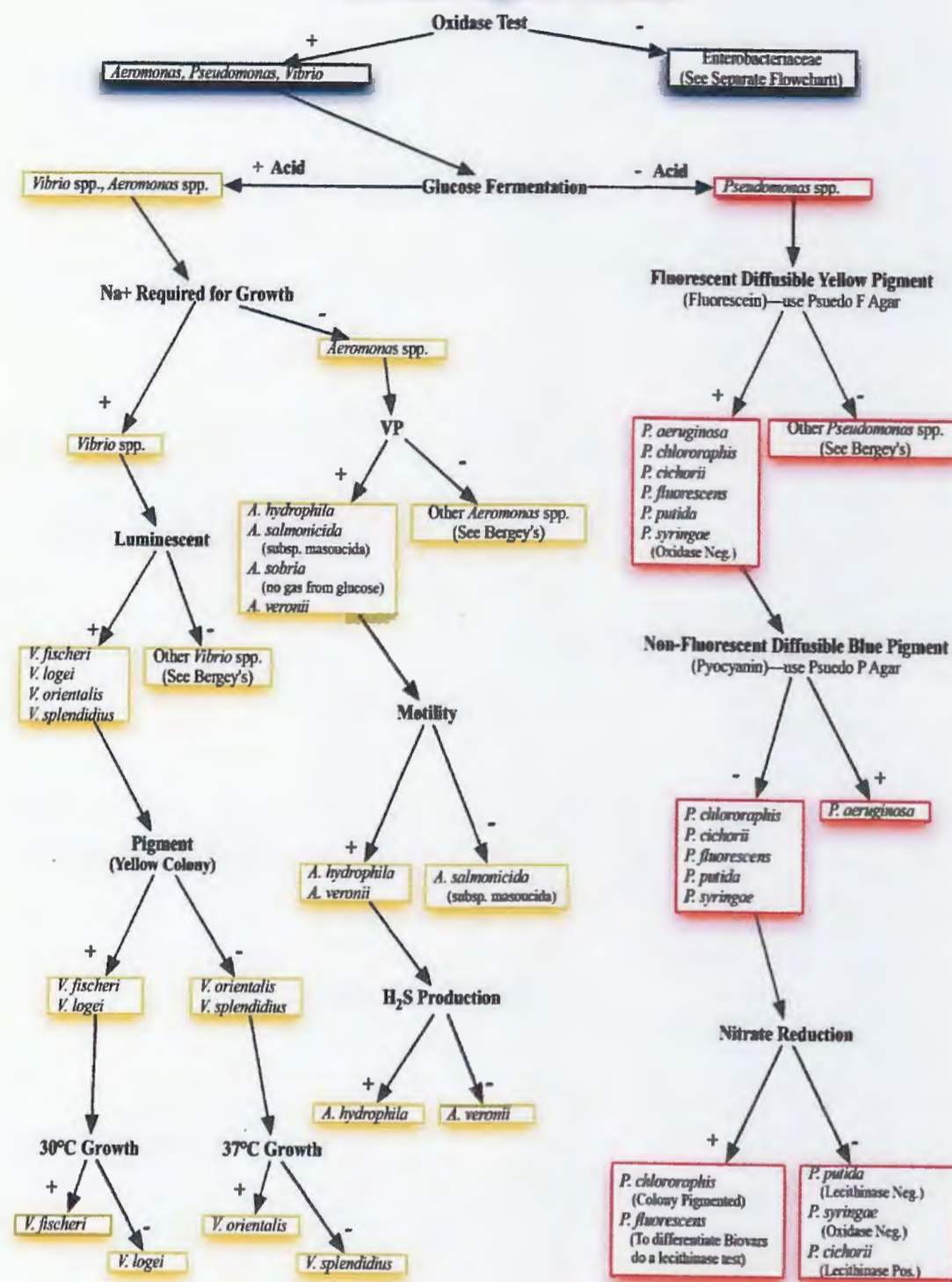


Figure 2: Schéma dicotomique pour l'identification des bacilles Gram négative (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2^{ème} édition)

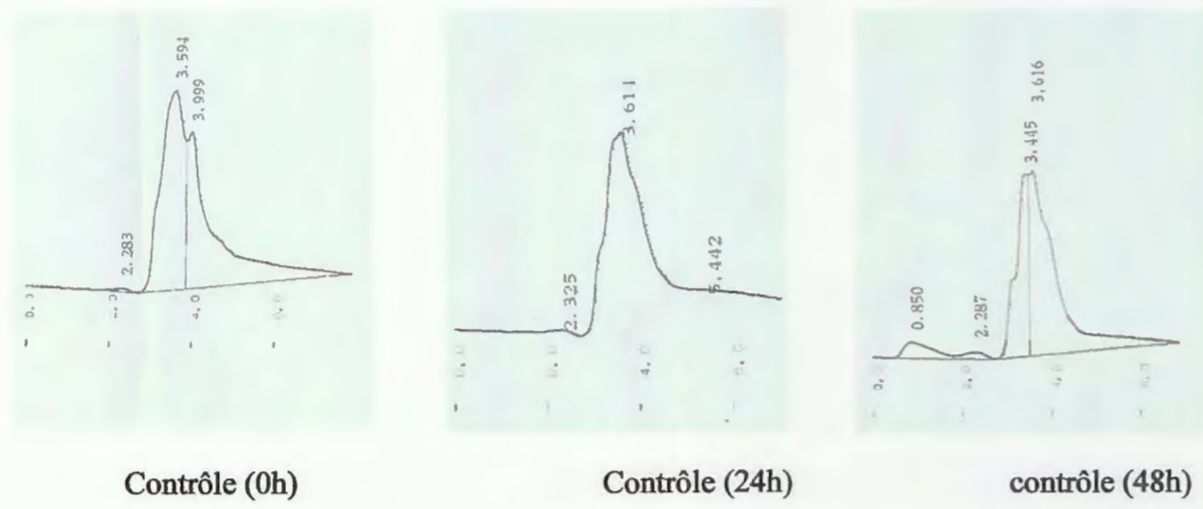


Figure 3: Chromatogrammes d'HPLC obtenus avec le test de biodégradation de Sulfaméthoxazole sans culture (contrôle).

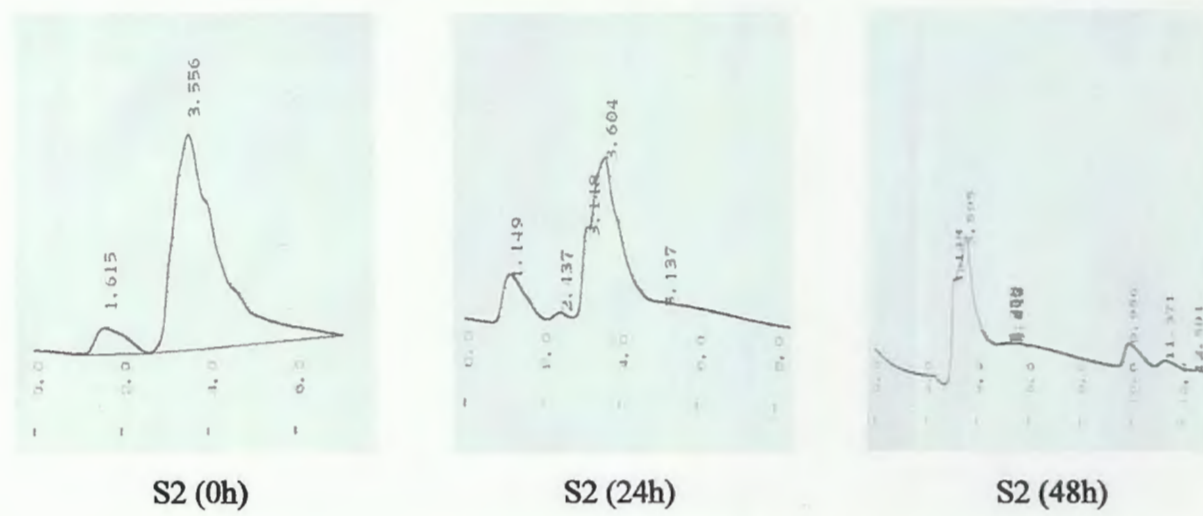


Figure 4: Chromatogrammes d'HPLC obtenus avec le test de biodégradation de Sulfaméthoxazole par *Micrococcus sp* (S2).

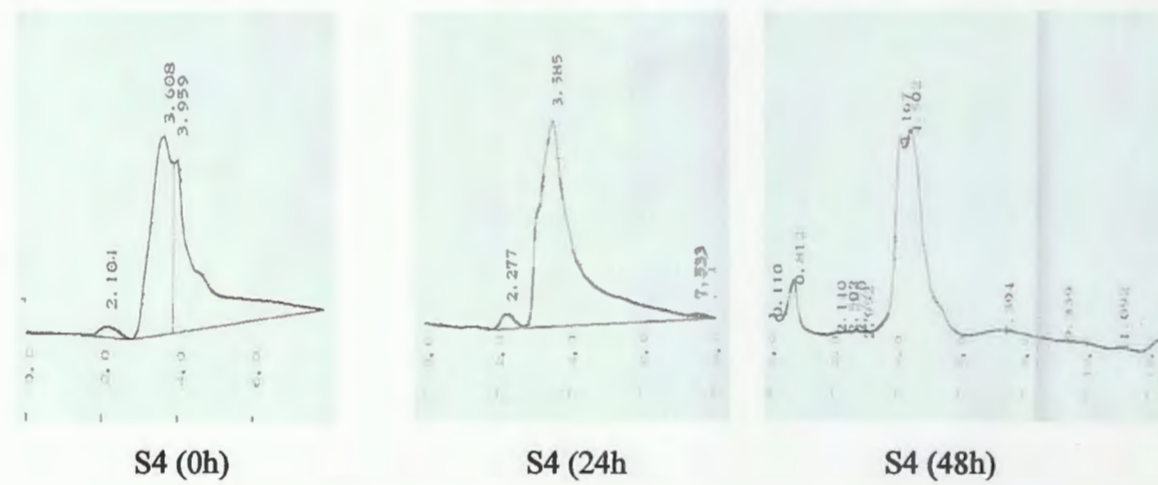


Figure 5: Chromatogrammes d'HPLC obtenus avec le test de biodégradation de Sulfaméthoxazole par *Pseudomonas sp* (S4):

Certificat d'analyse

No.: 50802995

Produit : SULFAMETHOXAZOLE

N° de lot : 26100708

Quantité : 800 kg

Date de fabrication : 07/2008

Date de péremption : 06/2013

Résultats Normés

	Résultats	Normés
CARACTERES	poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone, assez soluble l'éthanol à 96 pour cent ; se dissout dans les solutions diluées d'hydroxyde de sodium et dans les acides dilués.	
IDENTIFICATION		
Point de fusion :	171.1°C	169.0 – 172.0°C
Spectrophotométrie I.R. :	conforme	comparable au spectre de référence
CCM :	conforme	correspond au chromatogramme de référence
Réaction des amines primaires aromatiques :	conforme	positive (sans addition ultérieure d'acide)
ASPECT DE LA SOLUTION	conforme	limpide et $\leq J_5$, JB ₅ ou JV ₅
ACIDITE	0.18 ml	≤ 0.3 ml NaOH 0.1 M
SUBSTANCES APPARENTEES – CLHP		
Impuretés individuelles A, B, C, D, E, F :	< 0.1 % *	≤ 0.1 %
Autres impuretés individuelles :	< 0.1 % *	≤ 0.1 %
Total des impuretés :	< 0.3 %	≤ 0.3 %
METAUX LOURDS	< 20 ppm	≤ 20 ppm
PERTE A LA DESSICCATION	0.23 %	≤ 0.5 %
CENDRES SULFURIQUES	0.03 %	≤ 0.1 %
DOSAGE	100.11 %	99.0 – 101.0 %

* inférieure limite d'exclusion = 0.025 %

Hambourg, 22.12.2008

POLYPHARMA Technologies & Sciences

Les données ci-dessus sont le résultat de notre contrôle de qualité.

réalisé par :

- Boumezbar Imane
- Kemel Wahiba
- Lazreg Nawel

Président : M^{elle} Laggoune Souheila**Examineur :** M^{me} Bousdira Fathia**Encadreur :** D^r Ouled Haddar Houria**Intitulée :****Biodégradation de quelques substances, déchets pharmaceutiques par des bactéries isolées de différentes sources****Résumé :**

Le Sulfaméthoxazole est parmi les composés pharmaceutiques qui ont une importante bioactivité et il considéré comme micropolluant des différents écosystèmes. Dans ce travail, la biodégradation du Sulfaméthoxazole à été étudiée afin d'évaluer son devenir dans l'environnement. L'isolement et l'identification des souches bactériennes intervenant dans cette biodégradation à été effectué. Neuf souches capables de résister au Sulfaméthoxazole ont été isolées, alors que seulement deux souches ont été identifiées. Cette identification montre que l'une des souches appartienne au Genre *Micrococcus* et l'autre souche au Genre *Pseudomonas*. Une biodégradation est observée pour les deux souches, *Micrococcus* sp. est capable de biodégrader partiellement le Sulfaméthoxazole avec un taux de (46.37%). Sachant que *Pseudomonas* sp. est capable de le dégrader complètement (100%). Des métabolites probablement issus de cette biodégradation apparaissent sur les chromatogrammes d'HPLC.

Mots clés : Biodégradation, Sulfaméthoxazole, *Micrococcus*, *Pseudomonas*.**Abstract:**

Sulfamethoxazole is one of the most important bioactive pharmaceuticals, it that is considered to be a micropollutant of different ecosystems. The biodegradation of Sulfamethoxazole has been studied in this work in order to assess the fate of these pharmaceutical in the environment. The isolation and the identification of bacterial strains involved in this biodegradation were carried out. Nine strains capable to resist the Sulfaméthoxazole have been isolated, whereas only two strains have been identified. This identification shows that one of the strains (S2) belongs to the Genus *Micrococcus* and the other (S4) to the Genus *Pseudomonas*. Biodegradation is observed for the two strains, *Micrococcus* sp. is partially capable to degrade the Sulfaméthoxazole with a rate of (46.37%). However, *Pseudomonas* sp. is capable to degrade it completely (100%). HPLC analysis revealed the presence of some metabolites probably generated from Sulfamethoxazol biodegradation.

Key words: Biodegradation, Sulfamethoxazol, *Micrococcus*, *Pseudomonas*.**المخلص:**

يعتبر Sulfamethoxazol من المركبات الصيدلانية ذات التأثير الحيوي المهم، حيث يعتبر من ملوثات البيئة. يهدف هذا العمل إلى دراسة التحلل الحيوي لـ Sulfamethoxazol بهدف تقييم مصيره في البيئة. وكذلك عزل و تحديد السلالات البكتيرية المتدخلة في هذا التحلل الحيوي. تسع سلالات بكتيرية مقاومة لـ Sulfamethoxazol تم عزلها، إلا أنه لم يتم سوى التعريف بسلالتين منها. سمح هذا التعريف بتصنيف إحداهما (S2) ضمن نوع *Micrococcus* والثانية (S4) ضمن نوع *Pseudomonas*. كلا السلالتين قادرتين على التحليل الحيوي لـ Sulfamethoxazol، حيث أن *Micrococcus* sp. تحلله بنسبة 46.37%. إلا أن *Pseudomonas* sp. قادرة على تحليله تماما (100%). بالإضافة إلى ذلك، أظهرت تحاليل HPLC وجود بعض المركبات الناتجة عن تحلل Sulfamethoxazole.

الكلمات المفتاحية : التحلل الحيوي، Sulfamethoxazole، *Micrococcus*، *Pseudomonas*.