

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحي جيجل

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



كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و  
علوم التغذية

## Mémoire de Master

Filière: Sciences Biologiques

Option: Microbiologie Appliquée

### Thème

**Suivie de la croissance de quelques souches bactériennes isolées du compost ménager en présence d'antibiotiques de la famille des bêta-lactamines**

#### Membres de Jury

Présidente : Pr. Ouled Haddar Houria  
Examinatrice: Mme Benhamada Wahiba  
Encadreur : Dr. Moussaoui Sagia

#### Présenté par :

Bouchra BELIBEL  
Khadidja HAINE  
Yamina BEZAZEL

Année Universitaire 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliothèque) :.....

**Liste des abréviations****Liste des figures****Liste des tableaux****Remerciement****Introduction** ..... [1]**Partie I : Synthèse bibliographique****I.1. Bioremédiation** ..... [3]**I.1.1. Définition** ..... [3]**I.1.2. Types de la bioremédiation** ..... [3]**I.1.3. Facteurs physico-chimiques influençant la bioremédiation** ..... [3]**I.2. Microorganismes dans l'environnement** ..... [4]**I.2.1. Activité microbienne** ..... [4]**I.3. Biodégradabilité des antibiotiques** ..... [5]**I.3.1. Source et l'entrée des antibiotiques dans l'environnement** ..... [5]**I.3.2. Estimation des quantités d'antibiotique potentiellement rejetées dans l'environnement** ..[6]**I.3.3. Persistance et les risques potentiels liés à la présence des antibiotiques dans l'environnement** ..... [8]**I.3.4. Biodégradabilité des antibiotiques par les communautés microbiennes** ..... [9]**Partie II : Matériel et Méthode****II.1. Matériel** ..... [13]**II.1.1. Milieux de culture** ..... [13]**II.1.2. Produits chimiques** ..... [13]**II.1.3. Solvants pour HPLC** ..... [14]**II.1.4. Disques d'antibiotiques** ..... [14]**II.2. Méthodes** ..... [14]**II.2.1. Matériel biologique** ..... [14]**II.2.2. Isolement des souches résistantes aux antibiotiques (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®)** ..... [15]**II.2.3. Purification des souches** ..... [14]**II.2.4. Identification des souches bactériennes** ..... [15]**II.2.5. Sélection des souches bactériennes capables de dégrader les  $\beta$ -lactamines (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®)** ..... [15]**II.2.6. Test de diffusion sur gélose (l'antibiogramme)** ..... [16]**II.2.7. Effet de différentes concentrations des  $\beta$ -lactamines sur la croissance bactérienne des souches sélectionnées** ..... [16]

|  |      |
|--|------|
| <b>II.2.8.</b> Test de biodégradation.....   | [16] |
| <b>II.2.9.</b> Evaluation de la présence des $\beta$ -lactamines.....  | [17] |
| <b>Partie III : Résultats et discussion</b>  |      |
| <b>III.1.</b> Isolement des souches résistantes aux antibiotiques (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®).....                             | [18] |
| <b>III.2.</b> Identification des souches bactériennes.....   | [18] |
| <b>III.3.</b> Sélection des souches bactériennes capables de dégrader les $\beta$ -lactamines (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®)..... | [19] |
| <b>III.4.</b> Test de diffusion sur gélose (l'antibiogramme).....  | [21] |
| <b>III.5.</b> Effet de différentes concentrations des $\beta$ -lactamines sur la croissance bactérienne des souches sélectionnées.....     | [22] |
| <b>III.6.</b> Test de biodégradation.....  | [26] |
| <b>Conclusion</b> .....  | [34] |
| <b>Référence bibliographique</b> .....   | [36] |
| <b>Annexe</b>  |      |
| <b>Résumé</b>  |      |

**BCCM/LMG** : Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms

**CLX** : Cefalexin

**CIP**: Ciprofloxacin

**DDD**: Defined Daily Dose = Doses Journalières Définies

**DMSO**: Diméthyle sulfoxyde

**EFL**: Enrofloxacin fluoroquinolone

**K<sub>d</sub>** : coefficient de partage carbone-organique-eau

**K<sub>oc</sub>** : coefficient de partage carbone organique-eau

**K<sub>ow</sub>** : coefficient de partage octanol/eau

**LOEC**: Lowest Observed Effect Concentration= Concentration Minimale Avec Effet Observé.

**MH**: Gélose Muller Hinton

**MMM**: Milieu Minéral Minimum

**NOEC**: No observed Effect Concentration = Concentration Sans Effet Observé

**SDZ**: Sulfadiazine

**SM2**: Sulfadimidine

**SMT**: Sulfaméthazine

**SMX**: Sulfaméthoxazole

**SMZ**: Sulfaméthazine

**SPY**: Sulfapyridines

**STZ**: sulfathiazoles

**TC** : Taux de croissance

**UFC**: Unité Formant Colonie

|   |      |
|---|------|
| <b>Figure 1.</b> Source d'entrée d'antibiotiques dans l'environnement.....  | [6]  |
| <b>Figure 2.</b> Utilisation mondiale d'antibiotiques par classe, 2000-2010.....  | [7]  |
| <b>Figure 3.</b> Les différentes voies de transformation du SMX .....   | [12] |
| <b>Figure 4.</b> Cinétique de croissance des souches isolées (S1 à S10) incubées sur MMM en présence de 3 mg/l d'antibiotique testés sous agitation à 37°C.....         | [19] |
| <b>Figure 5.</b> Résultat d'antibiogramme de S6 testée par un disque d'Amoxicilline.....  | [20] |
| <b>Figure 6.</b> Effet de différentes concentrations d'Augmentin® sur la croissance de la souche S2.....  | [22] |
| <b>Figure 7.</b> Effet de différentes concentrations de Clamoxyl® sur la croissance de la souche S4.....  | [22] |
| <b>Figure 8.</b> Effet de différentes concentrations de Clamoxyl® sur la croissance de la souche... [23]  | [23] |
| <b>Figure 9.</b> Effet de différentes concentrations de Penicilline® sur la croissance de la souche S10.....  | [24] |
| <b>Figure 10.</b> Cinétique de croissance de la souche S2 dans les deux conditions (métabolique, co-métabolique) sur MMM contenant 10 mg/l d'Augmentin® à 37°C.....     | [26] |
| <b>Figure 11.</b> Cinétique de croissance de la souche S4 dans les deux conditions (métabolique, co-métabolique) sur MMM contenant 10 mg/l de Clamoxyl® à 37°C.....     | [26] |
| <b>Figure 12.</b> Cinétique de croissance de la souche S5 dans les deux conditions (métabolique, co-métabolique) sur MMM contenant 10 mg/l de Clamoxyl® à 37°C.....     | [27] |
| <b>Figure 13.</b> Cinétique de croissance de la souche S10 dans les deux conditions (métabolique, co-métabolique) sur MMM contenant 10 mg/l de Pénicilline® à 37°C..... | [27] |
| <b>Figure 14.</b> Biodégradation d'Augmentin® par S2 pendant 48 h d'incubation.....   | [29] |
| <b>Figure 15.</b> Biodégradation de Clamoxyl® par S4 pendant 48 h d'incubation .....  | [29] |
| <b>Figure 16.</b> Biodégradation de Clamoxyl® par S5 pendant 48 h d'incubation.....   | [30] |
| <b>Figure 17.</b> Biodégradation de Pénicilline® par S10 pendant 48 h d'incubation .....  | [30] |
| <b>Figure 18.</b> Adsorption d'Augmentin® sur la S2 autoclavée.....   | [32] |
| <b>Figure 19.</b> Adsorption de Clamoxyl® sur la S4 autoclavée.....   | [32] |
| <b>Figure 20.</b> Adsorption de Clamoxyl® sur la S5 autoclavée.....   | [32] |
| <b>Figure 21.</b> Adsorption de pénicilline® sur la S10 autoclavée.....   | [32] |

**Tableau 1.** Caractéristiques physico-chimiques et valeurs de Kd et Koc des principales classe d'antibiotiques.....[9]

**Tableau 2.** La biodégradabilité de quelque famille d'antibiotique et les microorganismes utilisés..... [11]

**Tableau 3.** Formule, structure chimique et dosage des antibiotiques commerciaux testés..... [14]

**Tableau 4.** Résultats de l'antibiogramme..... [21]

## **Remerciement**

*Tout d'abord, nous remercions Allah, Le Généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas et aussi de nous avoir donné la force afin d'accomplir ce modeste travail.*

*Au terme de ce travail, il nous est agréable d'exprimer nos remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dr. Moussaoui Sagia pour son encadrement, ses précieux conseils, et les encouragements qui nous ont permis de réaliser ce travail.*

*Nous voudrions remercier aussi Pr. Ouled Haddar Houria d'avoir accepté de nous faire l'honneur de présider ce jury.*

*Nos très vifs remerciements vont aussi à Mme Benhamada Wahiba pour avoir contribué par sa participation à l'examen de ce travail.*

*Nous souhaiterons exprimer nos remerciements à tous les enseignants de la faculté des Sciences de l'Université de Mohamed Seddik BenYahia de Jijel surtout Mr. Khennouf T et Dr. Ait Meddour A.*

*Nous remercions aussi tous les collègues de la promotion 2018/2019 et surtout Amel, Rania, Zeyneb, Amina, Ibtissem, Dounia, Meryem et Sara.*

*Nous ne saurons terminer sans remercier toutes ces personnes qui sont dans l'ombre et dont la contribution à notre travail est non négligeable notamment tout le personnel du laboratoire, de la bibliothèque et de l'administration*



# *Dédicaces*



*En avant, à Allah qui tout Puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce modeste travail.*

*A mes chers parents Allaoua et Nacira*

*Vous m'avez appris que la vie était remplie de petites batailles,  
Vainqueurs, vaincus, la guerre continue jusqu'à ce qu'on devienne très vieux,*

*Les études sont mes exercices d'entraînement,*

*Les diplômes seront mes armes de combat,*

*La persévérance et l'assiduité seront le secret de mon couronnement,*

*L'amour et l'amitié seront le répit du soldat.*

*Grâce à vous, vos enfants ont accompli beaucoup de succès*

*Je vous aime.*

*A mes chers frères et sœur*

*Adnan, Mohamed, Hassan et Dalila*

*Je vous remercie de tout ce que vous m'avez appris et donné,*

*Pour votre optimisme, votre dynamisme, vos aides et soutiens précieux,*

*Je vous souhaite tout le bonheur et la réussite du monde,*

*Aucun mot, aucun dédicace ne serait exprimer l'amour, le respect et la reconnaissance que  
j'éprouve pour vous.*

*Sans oublier les enfants de la maison qui entre la joie à notre vie : Tasnim, Soudjoud et  
Djaouad.*

*Spécial dédicace à mon trinômes « Khadîdja » et « Bouchra ». Je vous remercier à tous les  
moments qui me partage, à vous patience, à votre efforts je vous dis merci infiniment.*

*Une grande dédicace à la promotion 2018/2019*

*A tous ce qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.*

*Yamina*





## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes beaux parents.*

*Vous qui m'avez tant soutenue et tant apportée depuis toujours.*

*Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour que vous me procurez et qui ne cesse de me combler.*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde à toi mon **père**. A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; **maman** que j'adore.*

*Que dieu vous procure bonne santé et longue vie.*

*A mon frère yussuf, mes jolies sœurs 'Meriem', 'Souad', 'Laila', 'Koka' et 'Sabah'. que je vous souhaite tout le bonheur et le succès.*

*Sans oublier les petits poussins 'aridj', 'mimo', 'loujain' et 'foufa' que j'aime énormément.*

*A toutes mes amies, mes collègues de la microbiologie appliquée promotion 2019 .*

*A mes chères « Yamina » et « Bouchra » que j'adore et avec qui j'ai partagé des moments inoubliables je vous dis **merci**.*

*Aux gens qui m'aime, et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible je vous dis merci.*

***Khadija***

## *Dédicace*

*J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail à :  
Ceux que j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très  
fière de les avoir et tout les mots du monde ne peuvent exprimer  
l'amour et le respect que je leur porte :*

*A mes très chers parents Zohir et Meghriche Nadjet.*

*A mon frère Badis, A ma sœur Siham et son marie, A ma chérie  
Abba, que je vous souhaite tout le bonheur et le succès.*

*Sans oublié les petits poussins qui entrent la joie à notre vie :*

*Mouh et Farah*

*Spécial dédicace à mon amie et ma sœur Amani farah, à  
khadidja et yamina, Pour tous les bons moments passés  
ensemble. Pour avoir été toujours présentes à mes cotés quand  
j'en avais besoin.*

*Et à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.*

# *Introduction*

Avec l'accélération du développement économique, le problème de la pollution environnementale s'aggrave de jour en jour en raison de sources anthropiques et naturelles, de l'accroissement démographique, de l'industrialisation et de l'urbanisation [1,2].

La production industrielle de produits chimiques ainsi que leur utilisation inappropriée, leur élimination incorrecte et leurs fuites accidentelles, conduit à une augmentation considérable du nombre de substances totalement étrangères au monde vivant, dites xénobiotiques qui sont la cause de la contamination de nombreuses zones [1,3].

En raison du degré élevé de la toxicité des polluants, l'exposition à ces derniers crée divers problèmes de santé graves tels que la perturbation hormonale, le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'obésité, les troubles reproductifs et neurologiques, les troubles d'apprentissage et le diabète [4,5]. Leur accumulation peut causer de graves problèmes environnementaux qui peuvent influencer sur la qualité et la productivité des sols et de l'eau [4,6].

La nécessité de réhabiliter les sites contaminés a conduit au développement de nouvelles technologies qui mettent l'accent sur la destruction des polluants plutôt que l'approche classique de l'élimination. Pour cela, les chercheurs ont mis au point une technique appelée bioremédiation [7,8].

La bioremédiation est une alternative attrayante aux techniques classiques, telles que l'incinération, la destruction catalytique, l'utilisation d'adsorbants et l'élimination physique. Cette technique utilise des microorganismes pour dégrader ces polluants [4,9]. Un tel système de traitement biologique a diverses applications, notamment le nettoyage de sites contaminés tels que l'eau, les sols, les boues et les flux de déchets. Le traitement des rives de l'Alaska dans le détroit de Prince Williams après la marée noire de l'Exxon Valdez en 1989 est un exemple courant dans lequel les méthodes de bioremédiation ont retenu l'attention du public [7].

La bioremédiation qui se base sur l'utilisation de microorganismes indigènes est très avantageuse, ces derniers jouent un rôle clé dans les processus écologiques fondamentaux. Ils constituent aussi un vaste réservoir inexploré de diversité génétique et de capacité métabolique fournissant plusieurs services écosystémiques, notamment le maintien de la qualité des sols et de l'eau [6,10, 11].

En fait, les communautés microbiennes naturelles recèlent une étonnante polyvalence physiologique et un potentiel catabolique pour la décomposition d'un nombre considérable de molécules organiques, y compris des composés synthétiques, grâce à leur grande adaptabilité à différentes conditions. Ils sont capables de coloniser des sites contaminés et de métaboliser certains xénobiotiques récalcitrants, tels que les pesticides, les hydrocarbures, les métaux lourds, les produits pharmaceutiques... etc [10].

Parmi les différents xénobiotiques présents dans les écosystèmes du sol et de l'eau sous forme de micro-polluants, une attention particulière a été portée aux antibiotiques, car leur apparition croissante dans l'environnement pose de graves risques pour la santé humaine et vétérinaire.

Les antibiotiques peuvent affecter les communautés microbiennes naturelles et provoquent soit la disparition ou l'inhibition de certains groupes microbiens impliqués dans les fonctions clés de l'écosystème par des effets bactéricides et bactériostatiques [12].

Dans ce contexte, notre recherche a pour objectif d'isoler des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques à partir des composts ménagers et la possibilité de la dégradation de ces derniers par ces souches bactériennes.

Ce document comporte deux grandes parties:

Une synthèse bibliographique contenant une introduction générale et trois principaux chapitres. Le premier chapitre de ce travail est une synthèse des notions actuelles sur la bioremédiation. Dans le second chapitre on a mentionné des connaissances générales sur les microorganismes, leur rôle et leurs activités microbiennes dans l'environnement. Le troisième chapitre est consacré à l'étude de la biodégradabilité des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, leur source, les quantités potentiellement rejetées, la persistance et les risques potentiels liés à la présence de ces antibiotiques dans l'environnement.

Dans la partie pratique, on a testé la capacité de quelques souches bactériennes, isolées et identifiées des composts domestiques, à dégrader des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (Augmentin®, Clamoxy1® et Penicilline®). Enfin, une conclusion générale puis des perspectives finalisent ce manuscrit.

*Synthèse  
bibliographique*

## **I.1. Bioremédiation**

### **I.1.1. Définition**

La bioremédiation est une technique efficace pour le nettoyage des environnements pollués. Elle a été utilisée avec succès à divers degrés dans le monde, y compris en Europe [9]. Cette technique repose sur l'utilisation des agents biologiques, principalement des microorganismes, tels que les levures, les champignons ou les bactéries pour nettoyer le sol, les sédiments, les substances, les matériaux et les eaux [13]. Le processus de la bioremédiation microbienne dépend principalement de la biodégradation des polluants par l'activité enzymatique des microorganismes, conduisant à la bioconversion des polluants toxiques en substances non ou moins toxiques [10].

Les microorganismes qui effectuent la biodégradation dans l'environnement sont identifiés comme membres actifs de consortiums microbiens. Parmi ces microorganismes: *Acinetobacter*, *Acaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Methylosinus*, *Mycrobacterium*, *Mycococcus*, *Nitrosomonas*, *Nocardia*, *Penicillium* [13].

### **I.1.2. Types de bioremédiation**

Les approches de bioremédiation généralement classées comme in situ ou ex situ, sont conçues pour éliminer le polluant une fois qu'il est généré ou rejeté dans l'environnement. Ces technologies comprennent généralement la bioaugmentation (ajout d'un organisme ou d'une enzyme au contaminant), la biostimulation (utilisation d'éléments nutritifs pour stimuler des organismes naturels), biofiltres (élimination des gaz organiques en faisant passer l'air à travers le compost ou le sol contenant un microorganisme), des bioréacteurs (traitement des contaminants dans un grand réservoir contenant un organisme ou une enzyme), bioventilation (implique la ventilation de l'oxygène à travers le sol pour stimuler la croissance de microorganismes naturels capables de dégrader les contaminants), compostage (mélange de contaminants avec du compost contenant des organismes de bioremédiation) et mise en décharge (utilisation de techniques de culture, de labourage et d'amendement du sol pour favoriser la croissance d'un organisme de bioremédiation sur un site contaminé) [14].

### **I.1.3. Facteurs physico-chimiques influençant la bioremédiation**

Le contrôle et l'optimisation des processus de bioremédiation est un système complexe comportant de nombreux facteurs [15], qui limitent la biodisponibilité et ont pour effet de ralentir le transport de composés spécifiques en phase aqueuse où l'absorption biologique se produit facilement [7]. **Megharaj et al.** [16] ont été rapporté que parmi ces facteurs :

La teneur en eau affecte le transport des polluants et des produits dégradés ainsi que la dégradation des polluants, la température a une influence sur la composition des communautés bactériennes et sur la vitesse de dégradation des polluants qui persistent plus longtemps à basse température. Les microorganismes et les enzymes présentent des d'activité élevées dépendants du pH. La matière organique et les nutriments permettent la croissance et la reproduction de microorganismes ainsi qu'ils influencent la dégradation et la sorption ou accumulation des polluants. Un autre facteur qui est le Co-substrat auxiliaire permet la transformation co-métabolique des contaminants. Le principal facteur de la bioremédiation est la composition des communautés microbiennes qui sont des membres tolérants aux polluants.

## I.2. Microorganismes dans l'environnement

**Gold** [17] a suggéré la règle générale suivante: "la vie microbienne existe dans tous les endroits où les microbes peuvent survivre". Ces derniers sont présents dans de nombreux milieux tels que l'eau, l'air, le sol, d'autres êtres vivants, la nourriture ou diverses surfaces (objets), le sol contient en effet une grande quantité de micro-organismes [18].

Les micro-organismes comprennent non seulement des bactéries mais également des champignons (levures, moisissures), des protozoaires, des microalgues et des virus [19, 20].

### I.2.1. Activité microbienne

Les microorganismes pourraient maintenir l'équilibre écologique, la purification des eaux, la fertilisation des sols, inhiber la prolifération d'organismes nuisibles et désintégrer des substances chimiques nocives dans un environnement écologique tel que *Bacillus thuringiensis* dans la nature. Ce qui les rend indispensables à la survie des populations humaines. Les microbes sont vitaux pour l'environnement car ils participent aux cycles des éléments de la Terre, ils assurent les cycles biogéochimiques de l'oxygène ( $O_2$ ), du carbone (C), de l'azote (N) et d'autres éléments essentiels. Ils participent aussi à la production d' $O_2$ , au contrôle de la biomasse et au nettoyage de la Terre des restes d'organismes morts [19, 20].

Le rôle principal des bactéries et des champignons est de décomposer la matière organique dans les sédiments afin de maintenir l'eau propre. Les microalgues principalement photosynthétiques absorbent le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) et fournissent de l' $O_2$  aux animaux aquatiques. Cependant, en raison du manque d' $O_2$ , il pourrait y avoir une décomposition anaérobie ou une fermentation dans les sédiments, produisant des gaz nocifs tels que le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) et le méthane ( $CH_4$ ) [19].



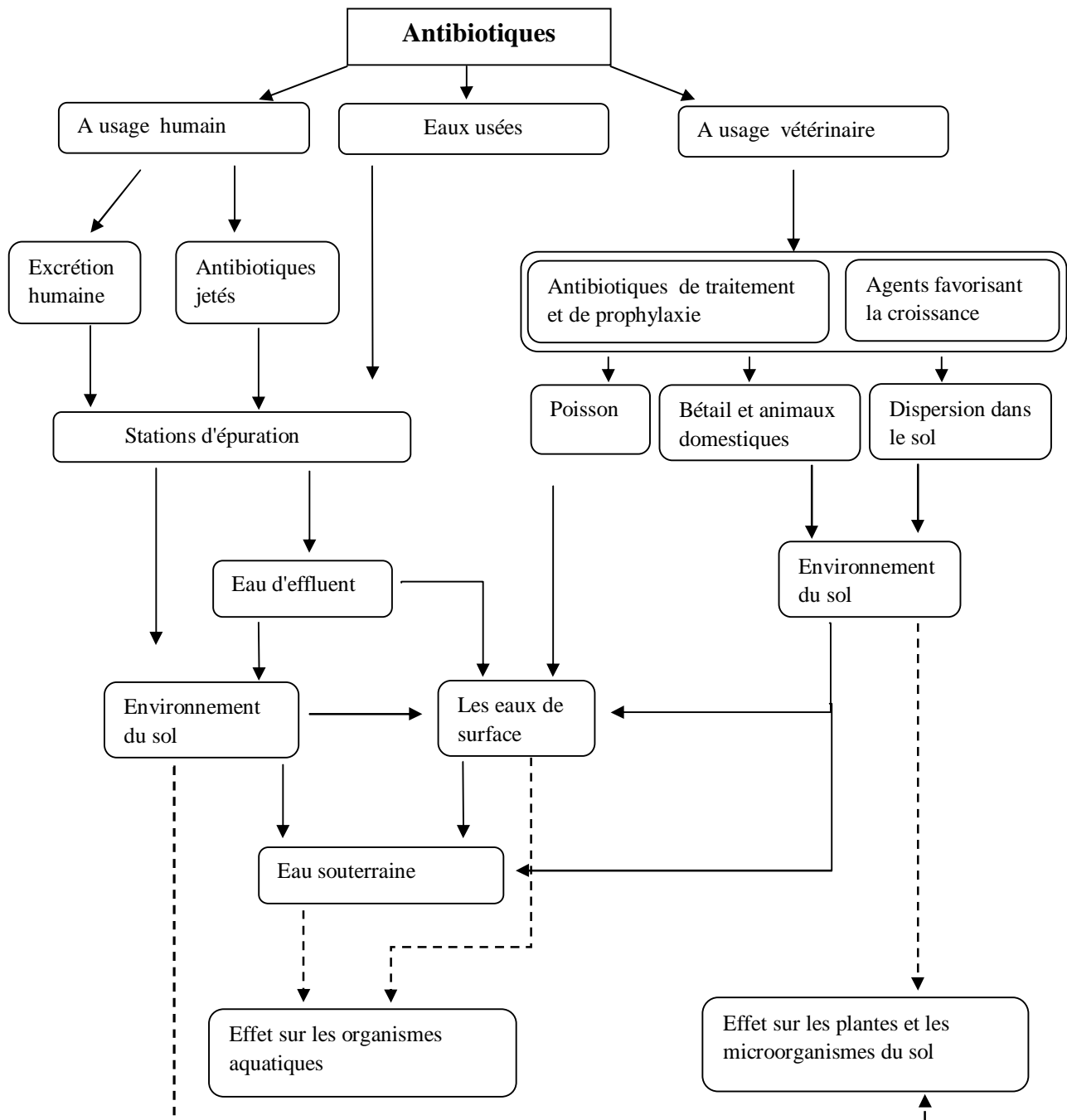
### **I.3. Biodégradabilité des antibiotiques**

#### **I.3.1. Source et entrée des antibiotiques dans l'environnement**

Les concentrations d'antibiotiques dans des environnements naturels tels que le sol ou l'eau varient de quelques nanogrammes (ng) à des centaines de ng/l ou /kg du sol [12,22]. De manière générale, la pollution terrestre joue un rôle mineur dans l'évaluation des effets secondaires des produits pharmaceutiques par rapport à la contamination aquatique. Cela est probablement dû aux voies d'exposition typiques des médicaments: les produits pharmaceutiques destinés à l'homme atteignent les stations de traitement des eaux usées et n'atteignent généralement pas le compartiment terrestre, sauf via l'application de boues d'épuration sur les sols agricoles. Cependant, la situation est assez différente pour les produits pharmaceutiques vétérinaires, qui sont principalement déposés dans l'environnement terrestre [12, 23].

La présence des antibiotiques dans les sols, les sédiments, les boues, les eaux souterraines, les eaux usées, l'eau du robinet, les eaux de surface (lacs, ruisseaux, rivières, mer), les plantes et les animaux aquatiques a été signalée par plusieurs auteurs [21, 22, 24]. Cette présence est due principalement aux effluents des hôpitaux qui sont éliminées de manière inappropriée dans l'environnement [25], aussi aux rejets directs des usines de production pharmaceutique dans le sol [21,26], et également, après l'administration des antibiotiques, 50 à 90% de ces produits pharmaceutiques et/ou de leurs métabolites sont éliminés de l'organisme principalement par le système rénal, le système biliaire ou une combinaison des deux, en fonction de la nature du composé et de l'organisme en question [27,24,28,29]. Ces antibiotiques appliqués et les médicaments inutilisés ou périmés par les humains sont jetés directement dans les toilettes ou les poubelles et qui sont transférés dans les égouts vers les stations de traitement des eaux usées et les décharges et qui sont également considérées comme un point de contamination potentiellement important [21, 27]. Donc, ces antibiotiques peuvent être adsorbés sur les boues d'épuration ou laisser la station d'épuration inchangée avec l'eau de décharge. Par la suite, l'utilisation du fumier et les boues d'épuration comme engrais ainsi que l'irrigation avec de l'eau recyclée peuvent contribuer à la dissémination d'antibiotiques dans le sol et éventuellement les eaux souterraines [12,27].

Le schéma (figure 1) suivant résume les différentes voies d'entrées des antibiotiques dans l'environnement :



**Figure 1.** Source d'entrée d'antibiotiques dans l'environnement [30].

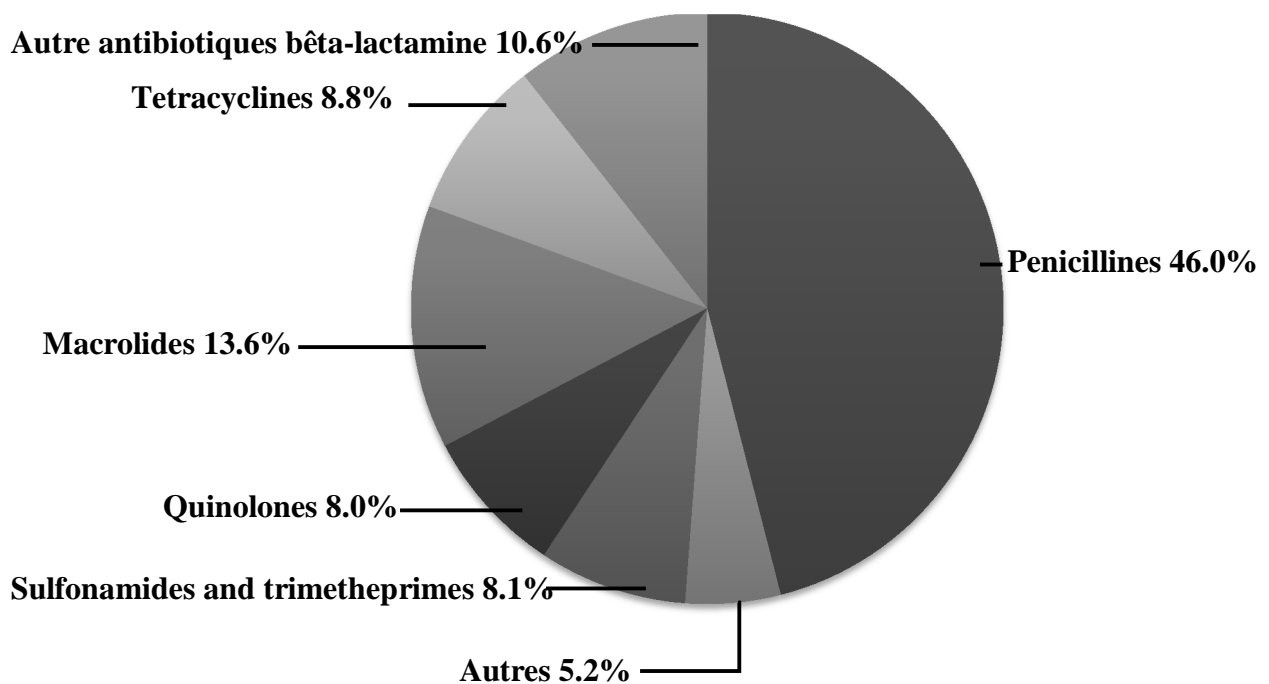
### I.3.2. Estimation des quantités d'antibiotiques potentiellement rejetées dans l'environnement

Le volume annuel de production de médicaments a été estimé à plusieurs centaines de tonnes tandis que la consommation totale d'antibiotiques à l'échelle mondiale est estimée entre  $10^4$  et  $2.10^5$  tonnes et environ 70% du total des ventes est destinés à un usage vétérinaire [24,25,26,31]. Entre 2000 et 2015, la consommation d'antibiotiques, exprimée en doses journalières

définies (DDD), a augmenté de 65% (21,1 à 34,8 milliards de DDD) et le taux de consommation d'antibiotiques a augmenté de 39% (11,3 à 15,7 DDD pour 1 000 habitants par jour) [32].

Plus de 63 000 tonnes d'antibiotiques ont été utilisées dans le monde en 2010 et la moitié d'entre eux ont été consommés en Chine (23%), États-Unis (13%), Brésil (9%), Inde (3%) et Allemagne (3%) [33]. Ces pays sont ceux qui rejettent plus de quantités d'antibiotiques dans l'environnement [23]. Par exemple, on estimait qu'en 2003, environ 9 200 tonnes d'antibiotiques étaient produites pour l'agriculture aux États-Unis. En comparaison, la capacité de production annuelle en Chine est d'environ 210 000 tonnes d'antibiotiques, dans l'agriculture (48%) et les médicaments (42%), les 10% restants étant exportés [26, 31].

Les classes d'antibiotiques ayant enregistrées la plus forte consommation en médecine humaine sont présentées dans la figure 2. Les  $\beta$ -lactames, les pénicillines et les fluoroquinolones représentent 95% des ventes totales en 2015, tandis que les plus utilisées en médecine vétérinaire en 2014 sont les tétracyclines (33%), les pénicillines (25%) et les sulfonamides (11%) [23, 29].



**Figure 2.** Utilisation mondiale d'antibiotiques par classe, 2000-2010 [30].

Länjan *et al.* [31] ont mentionnés que l'amoxicilline et la pipéracilline font partie des composés les plus importants du groupe des pénicillines, qui constitue également le groupe le plus important des  $\beta$ -lactames. Ils ont trouvés jusqu'à 128  $\mu\text{g/l}$  d'amoxicilline dans les effluents d'un service de chirurgie d'un hôpital. Ils ont mis en évidence la présence de pénicillines à des concentrations allant jusqu'à 15  $\mu\text{g/l}$  dans les effluents hospitaliers et à des concentrations allant jusqu'à 1  $\mu\text{g/l}$  dans les influents de station d'épuration rejetés par l'hôpital. Ils ont rapportés aussi

que la concentration de l'amoxicilline dans les effluents des stations d'épuration en Allemagne est de 25 µg/l et de 2,2 µg/l pour la pipéracilline. En général, les β-lactamines ont été signalés moins souvent que les autres antibiotiques par la littérature bien qu'ils aient été utilisés en très grande quantité.

**Kwon-Rae et al.** [34] ont estimés les concentrations d'antibiotiques à usage vétérinaire dans les lisiers de bétail. La concentration de macrolides dans les fumiers de bovins, de porcs et de volailles était respectivement de 0.07–0.14, 1.05–2.1 et 0.62–1.24 mg/kg, tandis que les sulfonamides et les tétracyclines étaient observés à 0.49, 8.44, 1.39 mg/kg et 1.65, 16.56 et 15.62 mg/kg, respectivement.

Les projections de la consommation mondiale d'antibiotiques en 2030, en supposant qu'il n'y ait pas de changement de politique, seront de 200% plus élevées que les 42 milliards de DDD estimés en 2015 [32].

### **I.3.3. Persistance et les risques potentiels liés à la présence des antibiotiques dans l'environnement**

Comme dans le cas de tous les autres xénobiotiques, le devenir des antibiotiques peut suivre trois voies possibles [27,29]:

- (1) Élimination complète par leur minéralisation.
- (2) Transformation partielle.
- (3) Persistance de ces composés dans l'environnement

Les antibiotiques sont considérés comme persistants ou pseudo-persistants car le taux d'introduction dans l'environnement est supérieur au taux d'élimination [21]. Les quinolones, les sulfonamides et le triméthoprime sont les antibiotiques les plus analysés et détectés, en raison de leur importance pour la médecine humaine et vétérinaire et de leur persistance dans le milieu aqueux [12].

La persistance dans l'environnement dépend de nombreux facteurs, tels que les propriétés physico-chimiques (tableau 1) inhérentes aux produits pharmaceutiques (photostabilité, capacités de liaison/adsorption), de facteurs environnementaux (lumière, température, pH...etc.) et surtout, de la présence et de l'activité de micro-organismes capables de le dégrader par le biais de réactions métaboliques et/ou co-métaboliques [11, 21].

**Tableau 1.** Caractéristiques physico-chimiques et valeurs de Kd et Koc des principales classe d'antibiotiques [35].

| Familles d'antibiotiques | Masses moléculaires (g/mol) | pKa                 | Constante de Henry Hc (Pa.l/mol)              | Solubilité dans l'eau (mg/l) | Log Kow     | Kd (l/kg)   | Koc (l/kg)    |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------|---|------------------------------|-------------|-------------|---------------|
| $\beta$ -lactames        | 334.4 à 615.6               | 2.7                 | $2.5 \times 10^{-19}$ à $1.2 \times 10^{-12}$ | 22 à 10100                   | 0.9 à 2.9   |             | -             |
| Fluoroquinolones         | 229.5 à 417.6               | 6.0 et 8.6          | $5.2 \times 10^{-17}$ à $3.2 \times 10^{-8}$  | 3.2 à 17790                  | -1.0 à 1.6  | 260 à 3037  | 1100 à 768740 |
| Macrolide                | 687.9 à 916.1               | 7.7 à 8.9           | $7.8 \times 10^{-23}$ à $4.8 \times 10^{-22}$ | 0.45 à 15                    | 1.6 à 3.1   | 8.3 à 128   | 110 à 7990    |
| Sulfamides               | 172.2 à 300.3               | 2 à 3 et 4.5 à 10.5 | $1.3 \times 10^{-12}$ à $1.8 \times 10^{-18}$ | 7.5 à 1500                   | -0.1 à 0.7  | 0.6 à 0.4   | 18 à 323      |
| Tétracyclines            | 444.5 à 527.6               | 3.3/7.7/ 9.3        | $1.7 \times 10^{-3}$ à $2.0 \times 10^{-26}$  | 230 à 52000                  | -1.3 à 0.05 | 77.6 à 3020 | 195 à 93320   |

La résistance aux antibiotiques est l'un des défis majeurs de la médecine humaine et vétérinaire tels que la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à la pénicilline G [36]. Cependant, plus un antibiotique donné persiste longtemps dans le sol sous une forme active, plus le potentiel de modification de la population bactérienne du sol, en particulier de sa résistance, est grand [22]. Les microorganismes ont plusieurs mécanismes pour éviter les actions létales des antibiotiques : production d'enzymes les inactivant (par exemple l'hydrolyse par la  $\beta$ -lactamase); des modifications de la perméabilité de la paroi cellulaire bactérienne (mutations dans les porines), empêchant l'entrée d'antibiotiques; modifications des sites cibles des antibiotiques dans les cellules bactériennes; les systèmes de transport actif tels que les pompes à efflux dans les parois cellulaires, qui empêchent l'accumulation d'antibiotiques dans les cellules; voies métaboliques alternatives [12].

#### I.3.4. Biodégradabilité des antibiotiques par les communautés microbiennes

Un des moyens d'élimination des antibiotiques dans l'environnement est leur dégradation par la microflore, un phénomène qui a été démontré pour un certain nombre d'antibiotiques [37].

La transformation et la biodégradation sont considérées comme les processus les plus importants pour éliminer la plupart des xénobiotiques, y compris les produits pharmaceutiques. La transformation est la voie principale de dégradation des antibiotiques par les enzymes [11, 12, 21]. Un aperçu des valeurs en  $k_{\text{biol}}$  montre que la dégradation biologique des produits pharmaceutiques (les antibiotique) est limitée, dont [38]:

$-k_{\text{biol}} < 0,1$  ( $\text{lg}_{\text{SS}}^{-1}\text{d}^{-1}$ ): pas d'élimination substantielle par biodégradation ( $< 20\%$ ; pour les composés fortement absorbants avec  $K_d > 1\text{lg}_{\text{SS}}^{-1}$ , l'élimination peut être plus importante en raison du transfert dans les boues).

$-0,1 < k_{\text{biol}} < 10$ : élimination partielle (c'est-à-dire entre 20% et 90%).

$-k_{\text{biol}} > 10$ : élimination supérieure à 90% par dégradation biologique.

Les communautés microbiennes naturelles présentes dans le sol et dans l'eau sont impliquées dans les processus d'autoépuration des écosystèmes car elles peuvent dégrader les contaminants par des voies métaboliques et/ou co-métaboliques [11].

La biodégradation d'un antibiotique dépend de la présence de populations microbiennes telle que des bactéries, des algues ou des champignons, qui résistent à ses effets néfastes, sa dégradation se fait dans des conditions aérobies ou anaérobies [12, 21].

La biodégradation par les voies métaboliques est la capacité des groupes bactériens spécifiques ou des souches de se développer en présence des antibiotiques en tant que source d'énergie, de carbone ou d'azote [11, 12, 21]. Ce processus permet d'éliminer complètement un composé toxique de l'environnement s'il est minéralisé [12]. Aussi, le co-métabolisme, a été clairement défini au début des années 1980 par **Dalton et Stirling** [39], comme «la transformation d'un substrat non lié à la croissance en présence obligatoire d'un substrat de croissance ou d'un autre composé transformable».

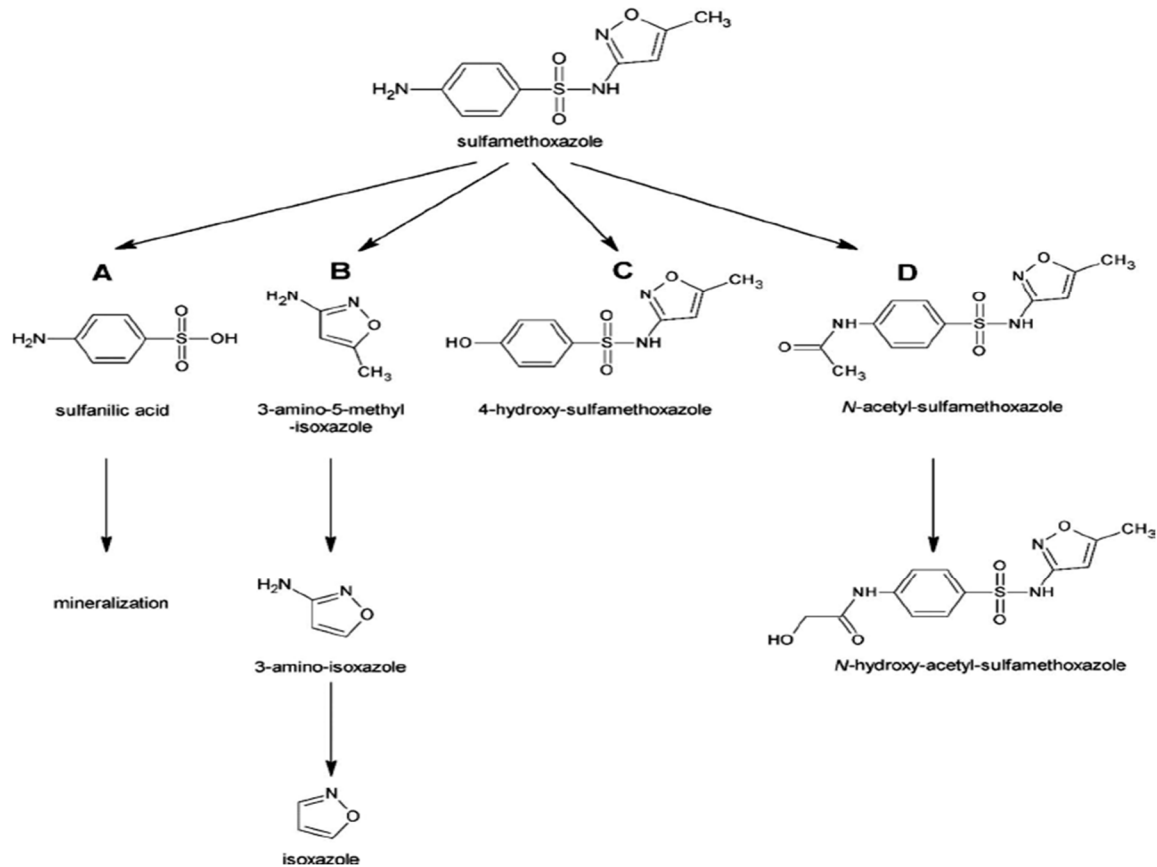
Des facteurs abiotiques tels que la température, la teneur en eau, la texture du sol, l' $\text{O}_2$ , l'humidité, la présence/l'absence de sources alternatives de carbone et d'azote et la présence d'un consortium de bactéries acclimatées sont nécessaires à la biodégradation des antibiotiques. Dans l'eau, les taux de biodégradation peuvent augmenter ou diminuer en fonction de la lumière du soleil, de la salinité et de la contamination anthropique [12]. D'après la littérature, les chercheurs ont réussi à utiliser les microorganismes pour dégrader quelques substances pharmaceutiques. Le tableau 2 mentionne les principales substances médicamenteuses et les microorganismes utilisés pour leur dégradation.

**Tableau 2.** Biodégradabilité de quelques familles d'antibiotiques et les microorganismes utilisés.

| Type d'antibiotiques   | Microorganismes utilisées              | Origine                      | Processus de biodégradation   | Références |
|------------------------|--|------------------------------|---|------------|
| Sulfonamides           |  |                              |   |            |
| Sulfaméthoxazole (SMX) | <i>Achromobacter denitrificans</i> PR1 | Boues activés                | Utilisé comme seule source de carbone / co-métabolisme en présence de l'acétate ou de succinate | [40]       |
| Sulfaméthazine (SMZ)   | <i>Pseudomonas</i> sp DX7              | L'eau de mer                 | Utilisé comme seule source de carbone   | [40]       |
| Fluoroquinolones (FQ)  |  |                              |   |            |
| Ciprofloxacine (CPF)   | <i>Labrys portulcalensis</i> F 11      | BCCM/LG                      | Co-métabolisme en présence d'acétate  | [41]       |
| Macrolides             |  |                              |   |            |
| Tylosine               | <i>Citrobacter amalonaticus</i>        | Sol riche en déchets solides | Fermentation  | [42]       |

Les bactéries et les champignons sont les deux groupes d'organismes les plus aptes à dégrader les composés organiques. Les champignons sont particulièrement importants dans les sols, mais ils ne jouent généralement pas un rôle important dans l'environnement aquatique. Par conséquent, dans les stations d'épuration et dans les eaux de surface, souterraines et marines, les bactéries sont supposées être responsables de la plupart des processus de biodégradation [43].

Parmi les antibiotiques qui sont déjà dégradés et transformés en utilisant des microorganismes, on trouve le SMX. La figure 3 montre les différentes voies de transformation de SMX ainsi que les différents métabolites produits.



**Figure 3.** Les différentes voies de transformation du SMX [44].

Les champignons comme *Trametes versicolor* et *Bjerkandera adusta* pourraient également dégrader les sulfonamides en culture pure [21, 46]. Une dégradation de l'enrofloxaciné fluoroquinolone (EFL) vétérinaire par les basidiomycètes est aussi possible notamment le champignon, *Gloeophyllum striatum*, qui cause la pourriture brune [45].



# *Matériel et Méthodes*

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Jijel, durant la période Avril-Juin de l'année 2019. Durant cette période, on a étudié le comportement de quelques isolats bactériens du sol en présence d'antibiotiques par le suivi de la croissance de souches bactériennes isolées du compost ménager en présence de différentes concentrations de bêta-lactamines.

L'objectif de notre étude est la biodégradation des  $\beta$ -lactamines sous deux différentes conditions :

- (i) Biodégradation de  $\beta$ -lactamines comme seule source de carbone (Métabolisme) ;
- (ii) Biodégradation de  $\beta$ -lactamines en présence du glucose (Co-métabolisme);
- (iii) L'effet de différentes concentrations des  $\beta$ -lactamines sur la croissance des souches bactériennes.

## **II.1. Matériel**

### **II.1.1. Milieux de culture**

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont :

-Milieu minéral minimum gélosé (Mineral Minimal Salt Medium agar) préparé au laboratoire (dont la composition est illustrée dans l'annexe 1)

-Gélose nutritive (FAPROLAB)

-Gélose Muller Hinton(FAPROLAB)

-Bouillon nutritif (BN) (Institut Pasteur)

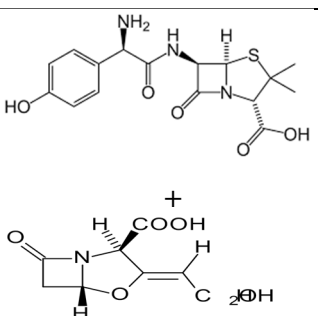
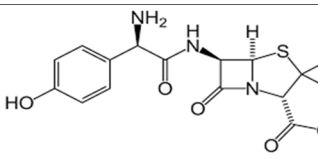
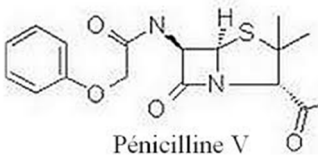
-Le milieu minéral minimum (Minimum Mineral Salt Media) préparé au laboratoire (dont la composition est illustrée dans l'annexe 1).

### **II.1.2. Produits chimiques**

Pour réaliser cette étude, un principe actif et deux antibiotiques ont été utilisés pour tester la biodégradation et qui sont respectivement : Pénicilline (fournis par SAIDAL, Algérie), Augmentin® et Clamoxyl® (antibiotiques commercialisés) réduit en poudre.

Pour chaque antibiotique, des solutions mères ont été préparées (2 mg d'antibiotique/50 $\mu$ l de DMSO). La stérilisation des antibiotiques a été réalisée par filtration à travers des microfiltres (ISOLAB PTFE 0.22  $\mu$ m) [48].

**Tableau 3.** Formule, structure chimique et dosage des antibiotiques commerciaux testés.

| Antibiotique | Formule chimique                                 | Structure chimique  | Dosage                                |
|--------------|--|---|---------------------------------------|
| Augmentin®   | $C_{16} H_{19} N_3 O_5 S$<br>+<br>$C_8 H_9 NO_5$ |  The image shows the chemical structures of Amoxicillin (top) and Clavulanic acid (bottom). Amoxicillin is a penicillin derivative with a piperazine ring and a p-hydroxyphenyl group. Clavulanic acid is a clavamsanic acid derivative with a five-membered beta-lactam ring fused to a five-membered dihydrothiazolidine ring, and a carboxylic acid group. | Un sachet<br>contient<br>1g/125mg     |
| Clamoxyl®    | $C_{16} H_{19} N_3 O_5 S$                        |  The image shows the chemical structure of Amoxicillin, which is a penicillin derivative with a piperazine ring and a p-hydroxyphenyl group.  | Un comprimé<br>contient 1g            |
| Pénicilline  | $C_{16} H_{18} N_2 O_5 S$                        |  The image shows the chemical structure of Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin), which is a penicillin derivative with a phenoxymethyl group attached to the 6-aminopenicillanic acid core.<br>Pénicilline V  | Un comprimé<br>contient<br>1000000 UI |

### II.1.3. Solvants pour HPLC

-Le méthanol.

### II.1.4. Disques d'antibiotiques

Pour étudier le comportement des souches bactériennes isolées vis-à-vis des antibiotiques, deux disques d'antibiotiques ont été utilisés pour réaliser le test d'antibiogramme sur milieu solide (MH). Les disques d'antibiotiques utilisés dans notre travail :

-Amoxicilline (2 µg, CYPRESS DIAGNOSTICS).

-Pénicilline V (10 µg, CYPRESS DIAGNOSTICS).

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Matériel biologique

Afin d'obtenir des souches bactériennes capables de dégrader des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, trois composts domestiques différents de la région d'El-Milia (Jijel-Algérie) ont été collectés, chacun de ces derniers a été supplémenté une seule fois par un type des trois antibiotiques choisis de la famille des  $\beta$ -lactamines dont : 2g d'Augmentin® (Amoxicilline+acide clavulanique), 2g de Clamoxyl® (amoxicilline), 2g de Pénicilline V® (Penicilline V). Les échantillons ont été laissés pendant un mois à température ambiante, mélangés et humidifiés régulièrement chaque jour [47 avec modification].

### **II.2.2. Isolement des souches résistantes aux antibiotiques (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®)**

Après une phase d'acclimatation des trois composts par Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®, 1 g de chaque compost a été dilué dans 10 ml d'eau distillée. A partir de cette suspension mise sous agitation pendant quelques minutes, une série de dilution a été effectuée allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ . Un volume de 100  $\mu$ l de la dilution  $10^{-3}$  a été étalé en surface sur des boîtes de Pétri contenant le milieu minéral minimum (MMM) supplémentés par 2 mg d'antibiotique/200 ml de MMM. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h [49].

### **II.2.3. Purification des souches**

La purification des souches bactériennes a été effectuée à la surface de la gélose nutritive par la méthode des stries serrées. Les boîtesensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 h. L'opération a été renouvelée en prenant chaque fois au hasard une colonie isolée, jusqu'à obtention de colonies de la même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté des souches. Une coloration de Gram a été réalisée pour les souches bactériennes pures obtenues, suivie d'une observation microscopique.

### **II.2.4. Identification des souches bactériennes**

Après purification des isolats bactériens capables de croître en présence des antibiotiques testés, l'identification préliminaire de ces derniers a été basée sur les résultats de la coloration de Gram (annexe 7) et de catalase (annexe 8).

### **II.2.5. Sélection des souches bactériennes capables de croître en présence de $\beta$ -lactamines (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®)**

Chaque souche bactérienne a été cultivée dans le bouillon nutritif jusqu'à la phase de croissance mi-logarithmique. Les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation (EBA 20) à  $4300 \times g$  pendant 5 mn, lavées deux fois avec l'eau physiologique et remises en suspension dans l'eau distillée. La densité optique (DO) a été ajustée à 0.9 à 600 nm.

50 ml du milieu MMM supplémenté par Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline® à une concentration initiale de 3 mg/l (pour chaque antibiotique) ont été placés dans des flacons de 250 ml. Ces derniers ont été inoculés par 5% de la suspension bactérienne de chaque souche. L'incubation a été faite sous agitation à 150 tr/mn à 37°C pendant 5 jours. Les échantillons ont été recueillis toutes les 24 h et la croissance cellulaire de chaque souche bactérienne et mesurée par spectrophotométrie UV-Visible à 600 nm [46,50].

### II.2.6. Test de diffusion sur gélose (Antibiogramme)

La résistance des souches les plus performantes vis-à-vis des antibiotiques a été testée selon les recommandations du Comité Française de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie [51]. Un antibiogramme a été réalisé pour chaque souche afin d'évaluer sa sensibilité aux antibiotiques testés (les disques d'antibiotique utilisés sont convenables aux antibiotiques utilisés dans l'étape d'acclimatation). A partir d'une culture pure de 24 h sur gélose nutritive, les suspensions ( $10^8$  UFC/ml qui correspondent à 0.5 Mc Farland) des souches testées préalablement préparées dans l'eau physiologique stérile ont étéensemencées par inondation sur gélose MH. Les disques d'antibiotiques (Amoxicilline et Pénicilline V) ont été placés au centre de la boîte de Pétri. Après 24 h d'incubation à 37°C, le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré.

### II.2.7. Effet de différentes concentrations des $\beta$ -lactamines sur la croissance bactérienne des souches sélectionnées

Afin de déterminer la concentration maximale des  $\beta$ -lactamines supportée par les bactéries sélectionnées et n'ayant pas d'effet négatif sur leur croissance optimale, différentes concentrations des antibiotiques utilisés (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®) ont été évaluées respectivement. Des flacons contenant 9 ml de milieu MMM et différentes concentrations de chaque antibiotiques (3 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 300 mg/l, 600 mg/l et 1000 mg/l) ont été inoculés avec 1 ml d'une culture de 18 h de la souche sélectionnée respectivement. Le milieu MMM inoculé sans antibiotique a été utilisé comme témoin (0 mg/l). Les échantillons ont été incubés sous agitation à 37°C (150 tr/mn) pendant 48 h et la croissance bactérienne a été évaluée par spectrophotomètre UV-Visible à 600 nm [47].

Le taux de croissance est calculé par la formule suivante :

$$TC = \frac{1}{DO_0} \times \frac{DO_t - DO_0}{T_t - T_0}$$

### II.2.8. Test de biodégradation

A fin d'évaluer la capacité des souches bactériennes sélectionnées à dégrader les antibiotiques qui peuvent être utilisés comme seule source de carbone et d'énergie, nous avons suivie le protocole adopté par **Aissaoui et al.** [47].

La biodégradabilité des  $\beta$ -lactamines (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®) a été étudiée à l'aide du test en bouteille fermée (OCDE 301C). Ce test a été réalisé dans des

erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de MMM inoculés avec 5% d'une culture de 18 h des souches sélectionnées. Cette culture a été centrifugée à 4300×g pendant 5 mn; le culot obtenu a été lavé deux fois à l'eau physiologique et ajouté aux flacons. Les antibiotiques ont été ajoutés au MMM en tant que source unique de carbone et d'énergie, avec une concentration finale de 10 mg/l pour chaque antibiotique séparément.

Pour évaluer l'hydrolyse abiotique et l'adsorption des  $\beta$ -lactamines sur la biomasse, des expériences témoins ont été réalisées en suivant la même procédure précédente en utilisant le MMM, sans micro-organismes et avec 5% de cellules bactériennes autoclavées, respectivement. Les flacons ont été recouverts d'une feuille d'aluminium pour empêcher la photodégradation et incubés sous agitation à 37°C à 150 tr/mn pendant 48 h. Au cours des expériences, la croissance cellulaire a été évaluée par mesure de la DO à 600 nm chaque 24 h.

### II.2.9. Dosage des $\beta$ -lactamines

Pour estimer la concentration de l'antibiotique dégradé, 2 ml du milieu de culture ont été prélevés et centrifugés à (6000 tr/mn) pendant 10 mn pour séparer la biomasse, puis le surnageant a été filtré sur un microfiltre (0,22  $\mu$ m) et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse. En parallèle, un test de biodégradation dans des conditions co-métaboliques en présence de 0.415 g/l du glucose et 10 mg/l de chaque antibiotique dans 50 ml de MMM a été effectué.

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, un détecteur UV-visible (SPD-20AV), un dégazeur (DGU-20A<sub>3</sub>), une pompe (LC-20AT) avec un injecteur à boucle et un enregistreur (C-R8A). La phase mobile contient 100% de méthanol. La longueur d'onde utilisée pour détecter Augmentin® et Clamoxyl® est de 220 nm, et de 254 nm pour la Pénicilline®. Les filtrats sont injectés à l'aide d'une seringue spécifique de 20  $\mu$ l. La durée d'analyse est de 10 mn [52, 53].

Pour préparer des solutions étalons de chaque antibiotique, des solutions mères des antibiotiques ont été préparé en dissolvant 100 mg de chaque antibiotique dans des flacons séparés de 100 ml contenant 2 ml de méthanol et en complétant au volume de l'eau distillée. Une série de dilution a été réalisée à partir les solutions mères jusqu'à 10<sup>-3</sup> [54 avec modification].

# *Résultats et Discussion*

### III.1. Isolement des souches résistantes aux antibiotiques (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®)

Après une étape d'acclimatation durant un mois, un total de 10 souches bactériennes différentes ont été isolées sur la base de la taille et de la morphologie à partir de trois composts :

- trois souches bactériennes isolées du compost supplémenté par Augmentin® (S1, S2 et S3),
- deux souches bactériennes isolées du compost supplémenté par Clamoxyl® (S4 et S5),
- cinq souches bactériennes isolées du compost supplémenté par Pénicilline® (S6, S7, S8, S9 et S10).

### III.2. Identification des souches bactériennes

Après purification des isolats (S1 à S10), les résultats de leur identification sont présentés ci-dessous:

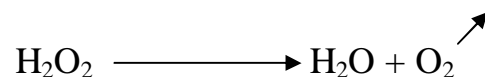
➤ **Coloration de Gram:**

La coloration différentielle pour les 10 souches sélectionnées a mis en évidence :

- Quatre souches cocci à Gram négatif (S2, S6, S7 et S10).
- Quatre souches cocci à Gram positif (S1, S3, S4 et S5).
- Deux souches bacille à Gram négatif (S8 et S9)

➤ **Test catalase :**

Toutes les bactéries sélectionnées (S1 à S10) testées pour la production d'une catalase, ont décomposés l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par une effervescence.

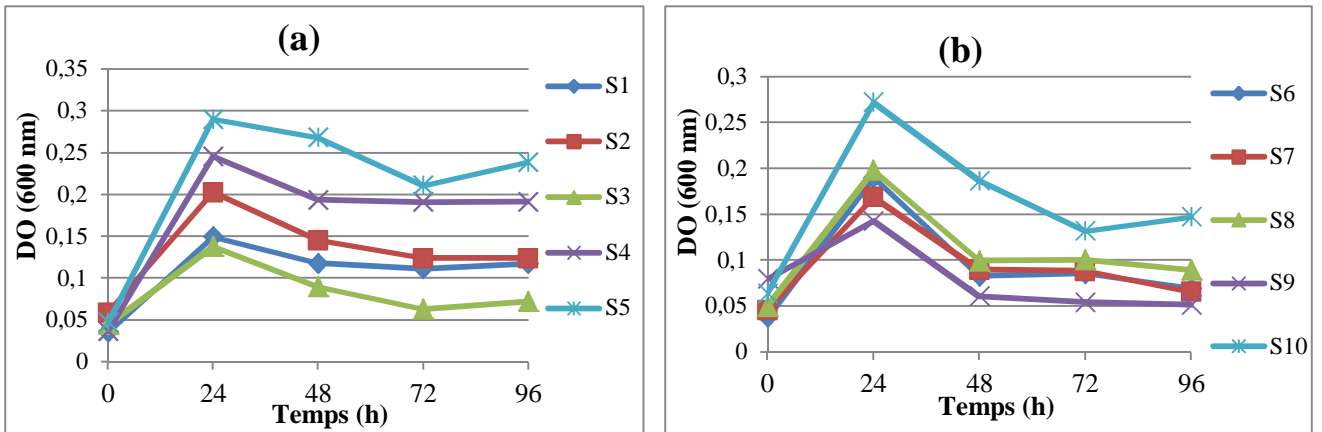


### III.3. Sélection des souches bactériennes capables de dégrader les β-lactamines (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®)

Chaque souche a été criblée séparément (S1 à S10), afin d'évaluer leur capacité à dégrader les antibiotiques testés en tant que source unique de carbone et d'énergie. Après 4 jours de culture, une souche sélectionnée à partir du compost supplémenté par Augmentin® (S2), deux souches a été sélectionnées à partir du compost supplémenté par Clamoxyl (S4 et S5) et une souche sélectionnée à partir du compost supplémentée par Pénicilline (S10), en fonction de leur capacité à croître dans un milieu contenant l'antibiotique testé.

La croissance des bactéries inoculées pendant 96 h dans le MMM additionné par 3 mg/l de chaque antibiotique (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®) comme seul source de carbone est représentée dans la figure 4 (a et b) ( les DO de test de sélection sont mentionnés dans l'annexe 3).





**Figure 4.** Cinétique de croissance des souches isolées (S1 à S10) incubées sur MMM en présence de 3 mg/l d'antibiotique testés sous agitation à 37°C.

(a) les souches bactériennes de 1 à 5      (b) les souches bactériennes de 6 à 10

On constate que, pour la plupart des souches, la croissance cellulaire commence dans les premières heures d'incubation et augmente progressivement avec le temps. D'après les courbes obtenues a et b (figure 5). Ces résultats sont complètement identiques à ceux obtenus par **Mao et al.** [45] qui ont trouvé qu'il n'y'a pas de phase de latence au début de la croissance chez *Shewanella oneidensis* MR-1 et *Shewanella* sp. MR-4 pendant le test de biodégradation du SMX et SPY. La phase exponentielle dure 24 h pour les deux souches. Une autre étude a été faite par **Li et Zhang** [54] montre que la cefalixin (CLX) de la famille des  $\beta$ -lactamines a été biodégradée sans phase de latence dans le système d'égout salin en 10 h.

Dans notre étude, on constate que la croissance bactérienne a atteint son maximum après 24 h d'incubation pour toutes les souches (S1 à S10). La souche S2 présente une DO de 0.2027 ( $TC=0.10 \text{ h}^{-1}$ ), S4 une DO de 0.2455 ( $TC= 0.34 \text{ h}^{-1}$ ), S5 une DO de 0.2899 ( $TC=0.22 \text{ h}^{-1}$ ) alors que pour S10 la DO est de 0.2718 ( $TC=0.13 \text{ h}^{-1}$ ). Cette croissance est probablement due à l'utilisation des antibiotiques, présents dans le milieu, comme source de carbone et d'énergie.

Après 48 h, une diminution de la croissance cellulaire a été observée. On remarque que la souche S9 présente une DO de 0.0607, alors qu'elle a été de 0.1428 après 24 h. On peut expliquer cette réduction par une déficience des nutriments dans le MMM ou bien les conditions physico-chimiques du milieu devenu défavorable (pH, température,  $O_2$ ...). Par contre, après 72 h d'incubation, une légère augmentation de la DO pour la souche bactérienne S5 a été notée (DO=0.2389).

Ce résultat est probablement dû à l'utilisation des cellules mortes par les cellules vivantes ou par l'utilisation des métabolites issues de la biodégradation des antibiotiques testés comme source de carbone et d'énergie.

Sur la base des résultats obtenus, les souches S2, S4, S5 et S10 ont la capacité la plus importante de se développer sur le MMM contenant les antibiotiques testés comme source unique de carbone et d'énergie. Le fait que ces souches bactériennes puissent croître sur MMM contenant des  $\beta$ -lactamines (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®) comme seule source de carbone et d'énergie montre qu'elles peuvent probablement avoir la capacité d'utiliser ces antibiotiques comme substrat. Pour cela, elles ont été sélectionnées pour la suite de notre travail.

#### III.4. Test de diffusion sur gélose (l'antibiogramme)

La sensibilité des 4 souches (S2, S4, S5 et S10) précédemment sélectionnées vis-à-vis de deux antibiotiques de la famille de  $\beta$ -lactamines (Amoxicilline et pénicilline V) a été testée. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 3.** Résultats de l'antibiogramme.

| Les souches   |                     | S2 | S4 | S5 | S10 |
|---------------|---------------------|----|----|----|-----|
| Antibiotiques | [ ] d'antibiotiques |    |    |    |     |
| Amoxicilline  | 2 $\mu$ g           | R  | R  | R  | /   |
| Pénicilline V | 10 $\mu$ g          | /  | /  | /  | R   |

**R** : résistante ; / : non pas testé ; [ ] : concentration

On remarque une croissance des souches bactériennes jusqu'à au niveau du disque (Figure 5).



**Figure 5.** Résultat d'antibiogramme de S6 testée par un disque d'Amoxicilline.

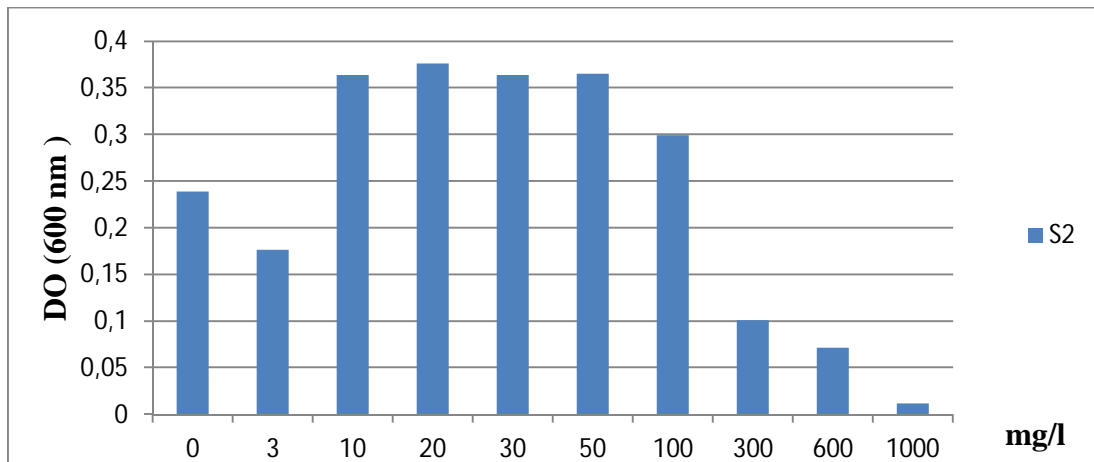
La résistance bactérienne est peut être due à une adaptation naturelle (réponse homéostatique) de microorganismes à des produits essayant d'empêcher leur croissance [12]. Il est bien connu que les antibiotiques de  $\beta$ -lactamines contiennent un cycle lactame, instable et facilement ouvert par les  $\beta$ -lactamases (une enzyme largement répandue chez les bactéries), cette propriété transféré entre les bactéries généralement par conjugaison ou par les plasmides [55].

Un exemple dans ce contexte est rapporté par **Mao et al.** [45] que *Shewanella oneidensis* MR4 possède des déterminants de résistance naturels de type  $\beta$ -lactamase et de type Qnr. Une autre étude faite par **Akindele et al.** [56] a rapportée que *Staphylococcus aureus* a une résistance importante (100%) contre la pénicilline par production des pénicillinase. L'acquisition de la résistance aux antibiotiques peut induire des modifications spécifiques du métabolisme bactérien pouvant être utiles pour la croissance bactérienne dans certains habitats ou dans des conditions environnementales particulières. En fait, certains gènes de résistance conduisent à une gamme de phénotypes métaboliques, y compris des variations dans la capacité à utiliser différentes sources de carbone, d'azote ou de phosphate pour la croissance [12]. **Kümmerer** [35] montré que les microorganismes peuvent utiliser les antibiotiques comme cofacteur pour leur croissance.

### III.5. Effet de différentes concentrations en $\beta$ -lactamines sur la croissance bactérienne des souches sélectionnées

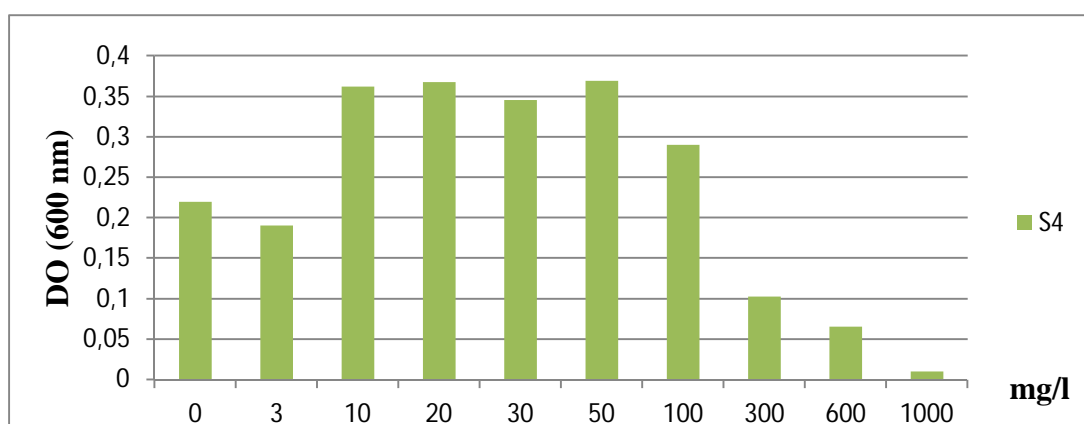
L'effet de différentes concentrations d'antibiotiques (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®) sur la croissance des souches bactériennes (S2, S4, S5 et S10) a été testé. En comparant la croissance cellulaire dans les tubes témoins et expérimentaux (les valeurs de la DO mesurés après 48 h sont mentionnées dans l'annexe 4). Les résultats sont montrés dans les figures (6, 7, 8 et 9).

On observe que la croissance de S2 augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration en antibiotique (Figure 6). La croissance de la souche S2 atteint son niveau maximal en présence d'une concentration de 20 mg/l d'Augmentin® (DO=0.3761). En comparant la cinétique de croissance de S2 en différentes concentration [3 mg/l à 1000 mg/l] avec la cinétique de croissance de cette souche dans le tube témoin, on note que la croissance dans le tube témoin est supérieure à celle de souche incubée avec 3 mg/l. Par contre, la croissance augmente de façon progressive avec l'augmentation de la concentration d'antibiotiques dans le milieu [10 mg/l à 100 mg/l]. Une diminution remarquable de cette même souche a été observée au-delà de 100 mg/l, sa DO a été diminuée de 0.2993 en présence de 100 mg/l jusqu'à 0.0115 pour 1000 mg/l.



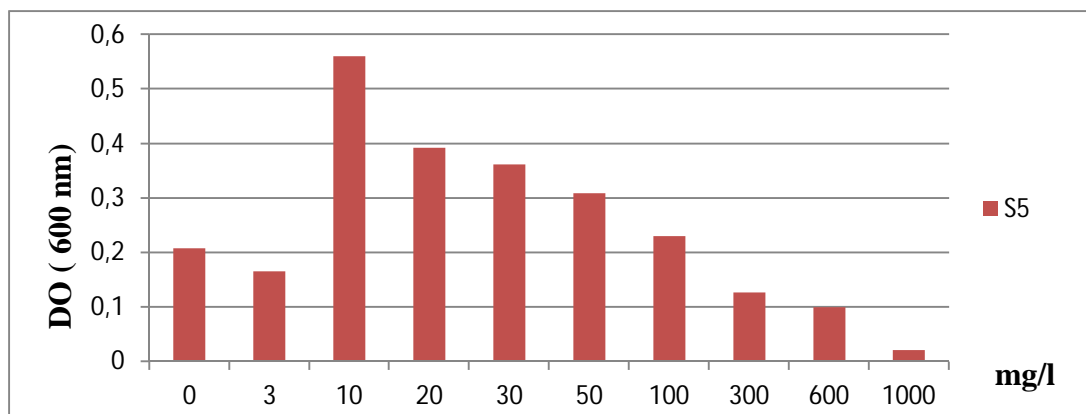
**Figure 6.** Effet de différentes concentrations d'Augmentin® sur la croissance de la souche S2.

On observe que la croissance de S4 augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration en antibiotique (figure 7). La croissance de la souche S4 atteint son niveau maximal en présence de 50 mg/l de Clamoxyl® (DO=0.3698). En comparant la cinétique de croissance de S4 à différentes concentrations [3 mg/l à 1000 mg/l] avec la cinétique de croissance de la souche dans le tube témoin, on constate que la croissance dans le tube témoin est supérieure à celle de la souche incubée avec 3 mg/l. Par contre, la croissance bactérienne augmente de façon progressive avec l'augmentation de la concentration d'antibiotiques dans le milieu [10 mg/l à 100 mg/l] à l'exception de la concentration 30 mg/l où une légère diminution de la croissance a été remarquée. Une diminution remarquable de la croissance de S4 a été signalée au-delà de 100 mg/l, sa DO a été diminuée de 0.2906 en 100 mg/l jusqu'à 0.0106 en présence de 1000 mg/l d'antibiotique.



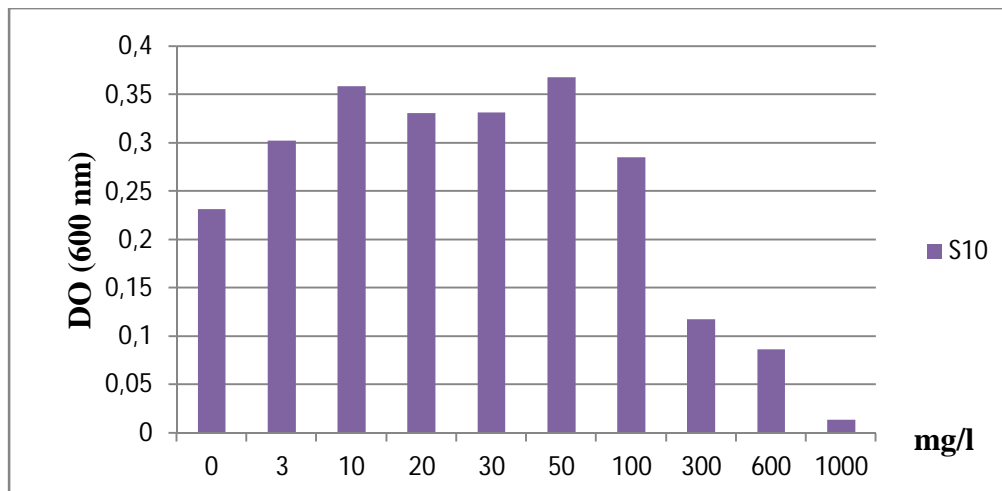
**Figure 7.** Effet de différentes concentrations de Clamoxyl® sur la croissance de la souche S4.

On observe que la croissance de S5 diminue avec l'augmentation de la concentration en antibiotique [10 mg/l à 100 mg/l] (figure 8). La croissance de la souche S5 atteint son niveau maximal en présence d'une concentration de 10 mg/l de Clamoxyl® (DO=0.5605). En comparant la cinétique de croissance de S2 à différentes concentrations [3 mg/l à 1000 mg/l] avec la cinétique de croissance de cette souche dans le tube témoin où on remarque que la croissance est légèrement supérieure à celle de la souche incubée avec 3 mg/l. Par contre une diminution remarquable de la croissance de S5 a été noté au-delà de 100 mg/l, puis sa DO a été diminuée de 0.2297 en 100 mg/l jusqu'à 0.0214 en présence de 1000 mg/l d'antibiotique.



**Figure 8.** Effet de différentes concentrations de Clamoxyl® sur la croissance de la souche S5.

On observe aussi que la croissance de S10 augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration en antibiotique (Figure 9). La croissance de la souche S10 atteint son niveau maximal en présence d'une concentration de 50 mg/l de Pénicilline® (DO=0.3679). En comparant la cinétique de croissance de S10 à différentes concentrations d'antibiotique [3 mg/l à 1000 mg/l] avec la cinétique de croissance de la même souche dans le tube témoin, on trouve que la croissance bactérienne augmente de façon progressive avec l'augmentation de la concentration d'antibiotique dans le milieu [3 mg/l à 100 mg/l] à l'exception des concentrations de 20 mg/l et 30 mg/l où une légère diminution de la croissance a été notée. Une diminution remarquable de la croissance de S10 a été signalée au-delà de 100 mg/l, sa DO a été diminuée de 0.2853 en 100 mg/l jusqu'à 0.0135 en présence de 1000 mg/l d'antibiotique.



**Figure 9.** Effet de différentes concentrations de Pénicilline® sur la croissance de la souche S10.

En comparant la croissance des souches dans les tubes témoins (0 mg/l) et les cultures en présence des différentes concentrations utilisées (de 10 à 100 mg/l), on constate une croissance bactérienne croissante en présence d'antibiotiques à ces différentes concentrations, ceci peut être expliqué par leur utilisation comme source de carbone par les 04 souches. Ceci est en corrélation avec les résultats obtenue par **Zhang et al.** [57] qui rapporte que *Alcaligenes faecalis* peut utiliser le SMX comme seule source de carbone et d'énergie. Par contre, lorsque la concentration est faible (3 mg/l), le taux de croissance est faible qui est probablement du à l'insuffisance de source de carbone (l'antibiotique). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Jianlong Wang et Shizong Wang** [58] qui ont montré que la concentration des antibiotiques peut influencer leur biodégradation. Lorsque leur concentration est faible (ng/l ou µg/l), il est possible que les microorganismes ne dégradent pas ces antibiotiques.

Une diminution remarquable de la croissance bactérienne a été observée à des concentrations des antibiotiques allant jusqu'à 300 mg/l pour la plupart des souches bactériennes. Cette réduction de la croissance peut s'expliquer par l'effet toxique de fortes concentrations des antibiotiques testés. **Mao et al.** [45] ont rapporté que la croissance de *S. oneidensis* MR-1 et de *Shewanella* sp. MR-4 a été inhibée par l'ajout de SPY ou de SMX au milieu. Ils ont aussi rapporté que la croissance de *S. oneidensis* MR-1 et de *Shewanella* sp. MR-4 a été significativement réduite à mesure que la concentration en sulfonamide augmente et qu'il n'y a été presque pas de croissance à une concentration de 60 mg/l. En comparant, nos résultats avec ceux obtenus par **Mao et al.** on trouve que nos souches bactériennes sont plus tolérantes à des concentrations élevées que les souches *S. oneidensis* MR-1 et de *Shewanella* sp. MR-4 testées par ces derniers.

Aussi l'étude d'Andreozzi *et al.* [59], a montré une toxicité élevée de l'amoxicilline chez l'algue bleue *S. leopoliensis* avec une concentration sans effet observé de 0.78 $\mu$ g/l, concentration minimale avec effet observé de 1.56 $\mu$ g/l et EC50 = 2.22 $\mu$ g/l à 96 h à des concentrations comprises entre 50 ng/l and 50 mg/l. En outre, Kümmerer *et al.* [61] ont effectué des tests d'inhibition de la croissance avec *Pseudomonas putida* et ont constaté que, pour la CPF et l'OFL, l'inhibition totale de la croissance a été obtenue à une concentration de 320  $\mu$ g/l (environ 0.97  $\mu$ M) et de 40  $\mu$ g/l (environ 0.11  $\mu$ M), respectivement.

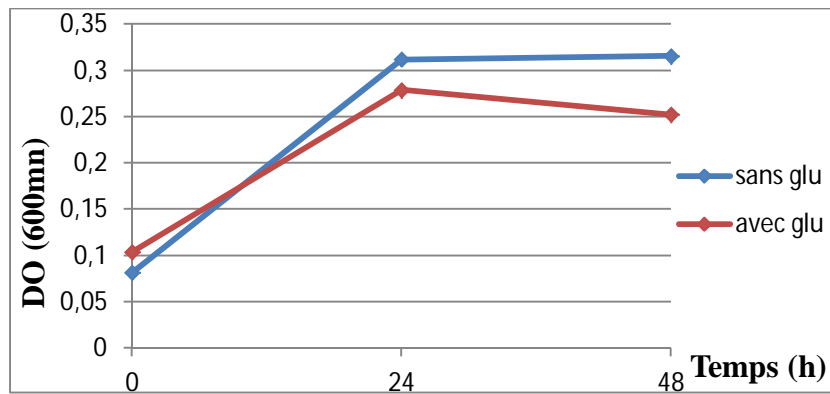
D'après les résultats obtenus, on peut conclure que la croissance est optimale pour les bactéries testées (S2, S4, S5 et S10) aux différentes concentrations d'antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (Augmentin®, Clamoxyl® et Penicilline®) de 10mg/l à 100 mg/l introduit dans le MMM.

### III.6. Test de biodégradation

Ce test nous a permis d'évaluer la capacité des 04 souches bactériennes (S2, S4, S5 et S10) à dégrader les antibiotiques testés (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®) avec une concentration de 10 mg/l sous deux conditions: métabolique et co-métabolique (en présence de 0.415 g/l glucose). Cette concentration d'antibiotique à été choisi en se basant sur les résultats de la CMI.

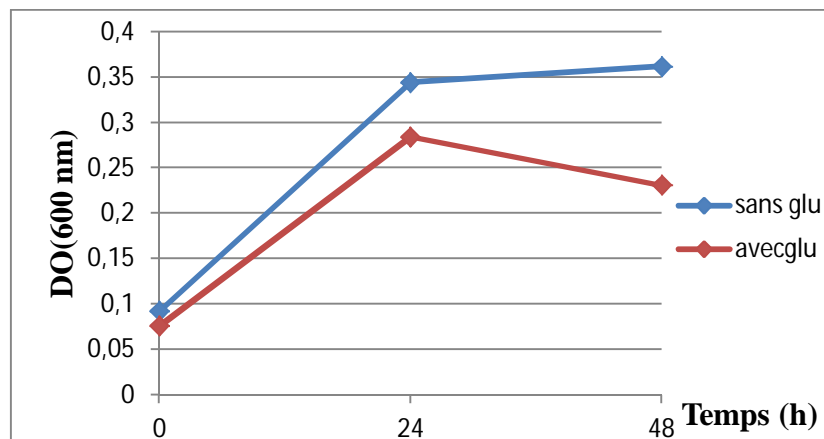
Les résultats de la croissance bactérienne des souches (S2, S4, S5 et S10) dans les deux conditions (métabolique et co-métabolique) sur MMM contenant 10 mg/l d'antibiotique testé sont présentés dans les figures (10, 11,12 et 13) et les résultats de la DO à 600 nm pendant 48 h sont présentés dans l'annexe 5.

Une croissance maximale a été enregistrée après 24 h d'incubation pour S2 dans les conditions métaboliques dont la valeur de la DO est de 0.3117 avec une légère augmentation de la croissance à partir de 24 h (DO=0.3155). Ces valeurs sont différentes dans les conditions co-métaboliques, où on remarque que S2 atteint la croissance maximale après 24 h (DO=0.2789). Alors qu'après 48 h la DO de cette souche dans les conditions co-métaboliques diminue jusqu'à 0.2521. De ce fait, la croissance pour la souche S2 est meilleure dans les conditions métaboliques.



**Figure 10.** Cinétique de croissance de la souche S2 dans les deux conditions (métabolique, co-métabolique) sur MMM contenant 10 mg/l d'Augmentin® à 37°C.

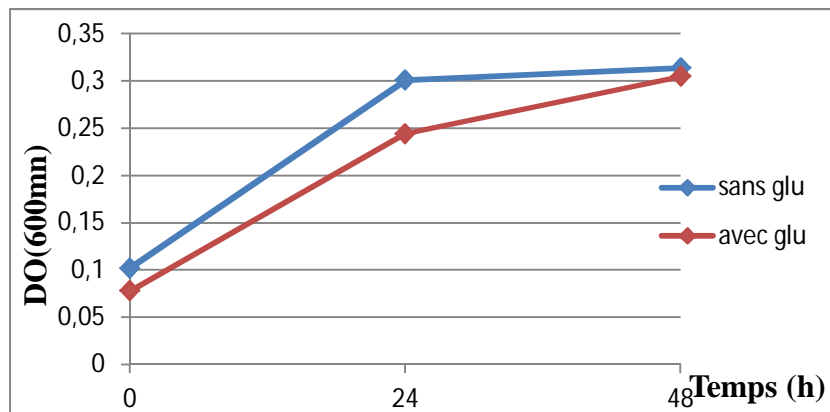
Une croissance maximale a été enregistrée après 48 h d'incubation pour S4 dans les conditions métaboliques dont la valeur de la DO est de 0.3618. Cette valeur est différente dans les conditions co-métaboliques, on remarque que S4 atteint la croissance maximale après 24 h (DO=0.2840). Alors qu'après 48 h sa DO dans les conditions co-métaboliques diminue jusqu'à 0.2308. De ce fait, on note que la croissance pour cette même souche est meilleure dans les conditions métaboliques.



**Figure 11.** Cinétique de croissance de la souche S4 dans les deux conditions (métabolique, co-métabolique) sur MMM contenant 10 mg/l de Clamoxyl® à 37°C.

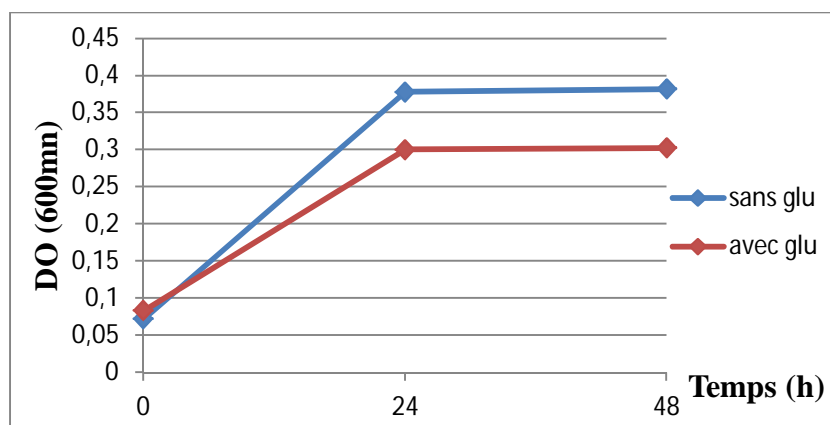
Une croissance maximale a été enregistrée après 48 h d'incubation pour S5 présente dans les conditions métaboliques dont la valeur de la DO est de 0.3010. Cette valeur est presque la même dans les conditions co-métaboliques, on remarque que S5 atteint la croissance maximale après 48 h (DO=0.3052). Donc la croissance pour la souche S5 est proche dans les conditions métaboliques ainsi que dans les conditions co-métaboliques.





**Figure 12.** Cinétique de croissance de la souche S5 dans les deux conditions (métabolique, co-métabolique) sur MMM contenant 10 mg/l de Clamoxyl® à 37°C.

Une croissance maximale a été enregistrée après 24 h d'incubation pour S10 présente dans les conditions métaboliques dont la valeur de la DO est de 0.3778 avec une augmentation légèrement faible de la croissance à partir de 24 h (DO=0.3816). Ces valeurs diffèrent dans les conditions co-métaboliques, on remarque que cette dernière atteint la croissance maximale après 24 h (DO=0.3002) puis elle stabilise. Donc la croissance pour la souche S10 est mieux dans les conditions métaboliques.



**Figure 13.** Cinétique de croissance de la souche S10 dans les deux conditions (métabolique, co-métabolique) sur MMM contenant 10 mg/l de Pénicilline® à 37°C.

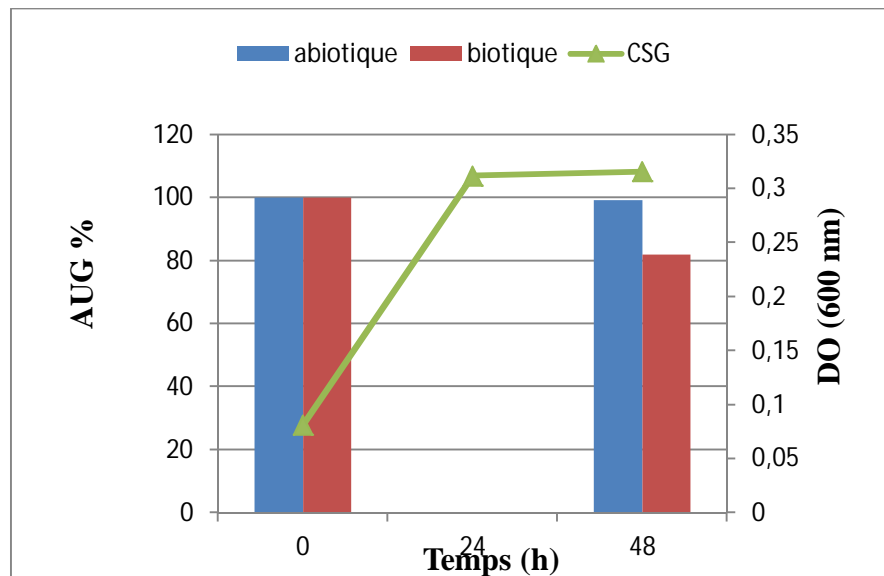
A partir de l'observation des courbes de croissance des 04 souches, on déduit que la capacité des souches S2, S4, S5 et S10 à croître dans le MMM contenant 10 mg/l de l'antibiotique à tester seulement est plus élevée que celle dans le MMM additionné de 0.415 g/l

du glucose (le substrat favorable à dégrader par les microorganismes). L'explication qu'on peut proposer ; c'est que les souches ayant déjà requis une adaptation à utiliser les antibiotiques (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®) comme source de carbone et d'énergie lors du test de sélection. On peut confirmer notre hypothèse par les résultats obtenus par **Herzog et al.** [62] qui ont découvert que deux souches de *Microbacterium* du sol (SDZm4 et sp.C448) pourraient complètement biodégrader les Sulfadiazine (SDZ) et les Sulfaméthazine (SMT), cela signifie que ces deux souches bactériennes utilisent le SDZ et le SMT comme seule de carbone.

**Larcher et Yargeau** [63] ont trouvé des résultats totalement différents que nous. Ils ont testés sept espèces (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*) en tant que cultures pures connues pour exister dans des communautés de boues activées pour la dégradation de SMX en présence et en absence de glucose. Alors que la densité cellulaire de toutes les espèces augmente en raison de l'utilisation monosaccharide comme source de carbone pour la croissance cellulaire, une élimination croissante du SMX ne pouvait être observée que pour trois espèces. En outre, la formation de métabolites a été observée pour *Rhodococcus equi*, mais uniquement en présence de glucose. Une autre étude, montre que les co-substrats (glucose) permettent aux cellules d'atténuer la toxicité de la CIP en leur fournissant suffisamment de nutriments, générant par conséquent d'avantage de biocatalyseurs capables de réagir avec la CIP et de provoquer une dégradation plus rapide de CIP (co-métabolismes) induit par l'énergie. D'autre part, les co-substrats structurellement liées aux CIP pourraient induire les enzymes nécessaires pour initier la transformation de CIP (co-métabolismes dirigé par la structure). En effet, des études récentes ont démontré l'importance pratique des sources de carbone préalables en tant que co-substrat pour une meilleure biodégradation bactérienne des fluoroquinolones [64].

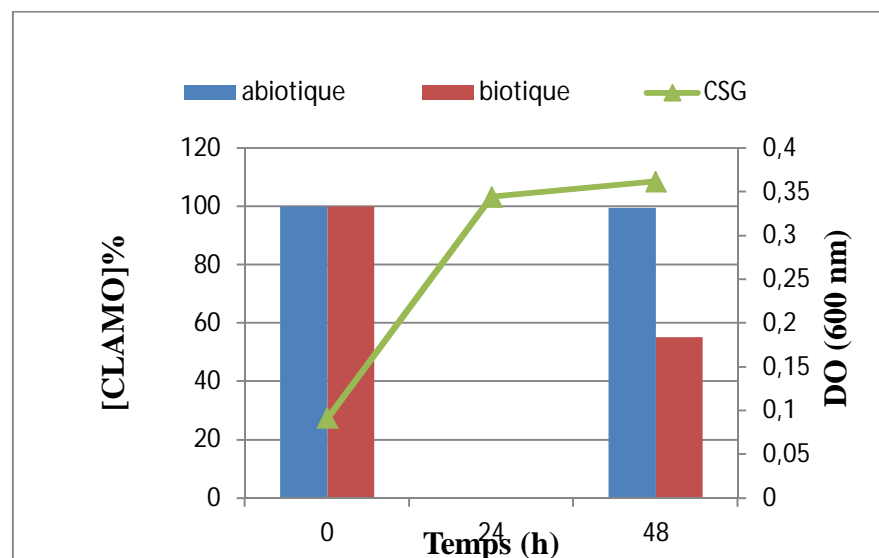
Pour confirmer qu'il y a une biodégradation ou non des antibiotiques testés dans notre étude, 2 ml du milieu de culture ont été prélevés et filtrés de chaque échantillon à  $t_0=0$  h et  $t_1=48$  h pour estimer la concentration de l'antibiotique en utilisant l'HPLC (les chromatogrammes sont mentionnés dans l'annexe 6) (l'HPLC pour le test de biodégradation par voie co-métabolique n'a pas été réalisé à cause du manque du moyen). Les résultats des chromatogrammes sont résumés dans les figures (14, 15, 16 et 17).

D'après le résultat illustré dans la figure 14, on constate après 48 h, qu'il y a une augmentation de la croissance bactérienne de la souche S2 accompagnée d'une diminution de la quantité d'antibiotique testé dans l'échantillon biotique. On observe que S2 présente une élimination d'Augmentin® de l'ordre de 18.02%.



**Figure 14.** Biodégradation d'Augmentin® par S2 pendant 48 h d'incubation (CSG : croissance sans glucose).

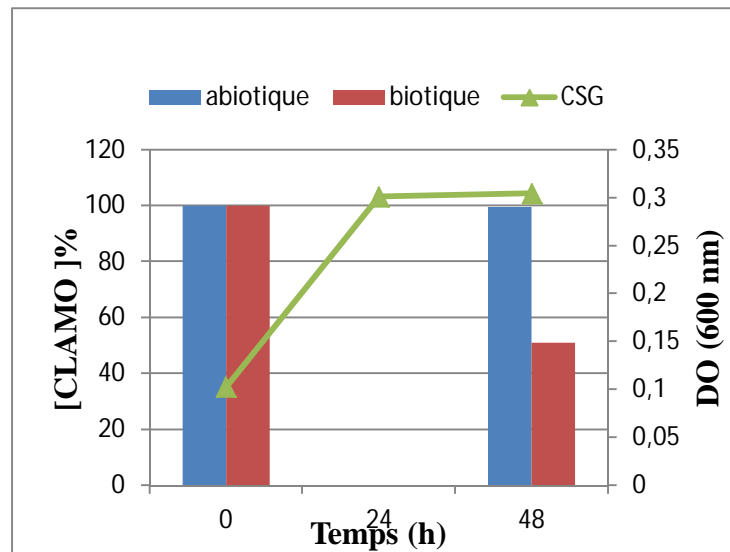
D'après le résultat illustré dans la figure 15, on constate après 48 h, qu'il y a une augmentation de la croissance bactérienne de la souche S4 accompagnée d'une diminution de la quantité d'antibiotique testé dans l'échantillon biotique. On note que S4 présente une élimination de Clamoxyl® de l'ordre de 44.77%.



**Figure 15.** Biodégradation de Clamoxyl® par S4 pendant 48 h d'incubation (CSG : croissance sans glucose).

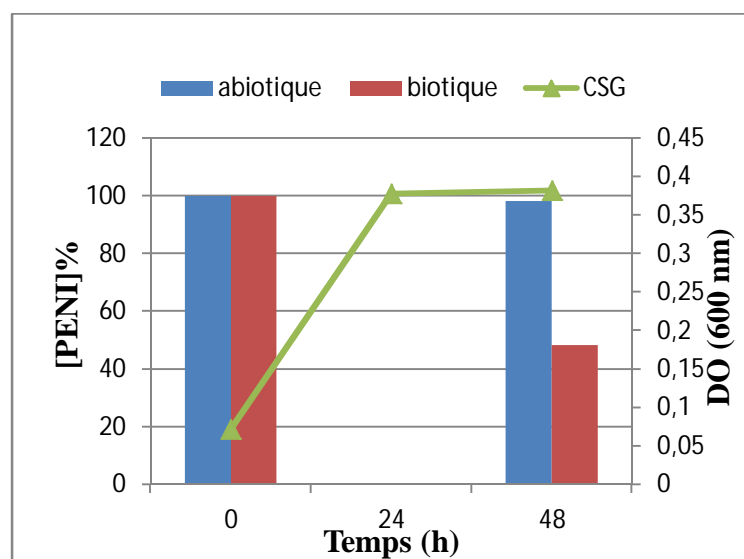
D'après le résultat montré dans la figure 16, on constate après 48 h, qu'il y a une augmentation de la croissance bactérienne de la souche S5 accompagnée d'une diminution

remarquable de la quantité d'antibiotique testé dans l'échantillon biotique. La souche S5 présente une élimination de Clamoxyl® de l'ordre de 48.69%.



**Figure 16.** Biodégradation de Clamoxyl® par S5 pendant 48 h d'incubation (CSG : croissance sans glucose).

D'après le résultat illustré dans la figure 17, on constate après 48 h, qu'il y a une augmentation de la croissance bactérienne de la souche S10 accordée d'une diminution significative de la quantité d'antibiotique testé dans l'échantillon biotique. On observe que S10 présente un taux d'élimination de Pénicilline® de l'ordre de 51.58%.



**Figure 17.** Biodégradation de Pénicilline V® par S10 pendant 48 h d'incubation (CSG : croissance sans glucose).

Nos résultats sont proches des résultats rapportés par la littérature. **Zhang et al.** ont isolé deux souches bactériennes provenant de l'eau de mer, dont une des deux a été identifiée comme *Acinetobacter* sp. HS51. Cette souche présente des activités évidentes de dégradation des sulfonamides jusqu'à 72% de sulfapyridines (SPY) (10 mg/l) et 67% de sulfathiazoles (STZ) (10 mg/l). *Rhodococcus rhodochrous* a éliminé 20% de SMX et 14% de Sulfadimidine (SM2), et *R. equi* a éliminé efficacement le SMX de 15% à 29% avec un ajout de glucose. Une autre bactérie adaptée au froid récemment isolée, *Pseudomonas psychrophila* HA-4, a démontré un potentiel de dégradation élevé du SMX, avec un taux d'élimination maximale de 100 mg/l de SMX (35.6%) à basse température de 5.0 à 30°C [40, 56]. Une autre étude a été réalisée par **Ma et al.** [42] qui ont trouvé que *Citrobacter amalonaticus* présente une forte capacité à dégrader la tylosine jusqu'à 100% en milieu des déchets solides pharmaceutiques avec une concentration initiale de 50 mg/l a été dégradé après 72 h d'incubation dans des conditions de pH initial de 6.0 et 30°C. Par contre les résultats obtenus par **Islas-Espinoza et al.** [65] ont révélé la faible capacité de la souche de *Pseudomonas* à dégrader le SMT et ont indiqué que seulement 0.2 à 1.5% du SMZ a été éliminée par la culture pure de *Pseudomonas putida* GB-1 ctg44.

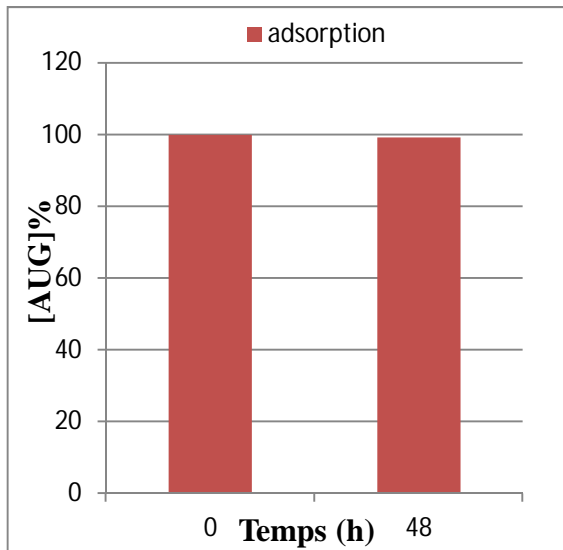
**Kümmerer** [68] a trouvé que la pénicilline G a une biodégradabilité de 27% après 28 jours et de 36% après 40 jours. **Li et Zhang** [55] ont rapporté que la cefalixin (CLX) de la famille des  $\beta$ -lactamines est éliminée de manière significative (jusqu'à 93.7%) par biodégradation.

On remarque que, la biodégradation abiotique dans tous les échantillons est relativement faible et on suspecte qu'elle est due à une hydrolyse en raison du clivage possible du noyau  $\beta$ -lactame et pas à la photodégradation. Une interprétation largement acceptée est que le cycle  $\beta$ -lactame est instable [55].

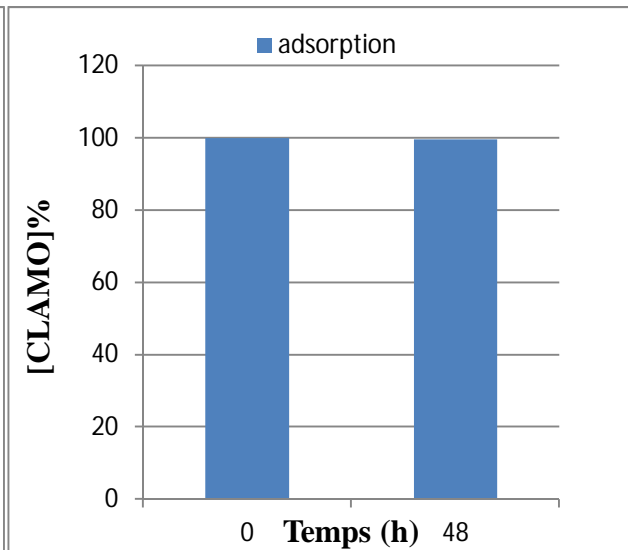
Pour tester si la diminution de la quantité en antibiotiques est due à l'adsorption de ce dernier ou non, on a préparé des tubes témoins contenant les 4 souches autoclavées avec les antibiotiques. Nos résultats sont montrés dans les figures (18, 19, 20 et 21).

D'après les résultats montrés dans les figures (18, 19, 20 et 21), on trouve que l'adsorption, des antibiotiques testés (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®), à la surface des cellules mortes est absente. En comparant ces résultats avec les résultats obtenus dans le test de biodégradation on trouve que la diminution de la quantité des antibiotiques dans le MMM est due principalement à l'activité bactérienne des souches c'est-à-dire à l'utilisation des antibiotiques comme seule source de carbone et d'énergie. Les résultats de **Li et Zhang** [55], confirment nos résultats. Ils ont trouvé que l'amoxicilline a été éliminée à 90% par biodégradation

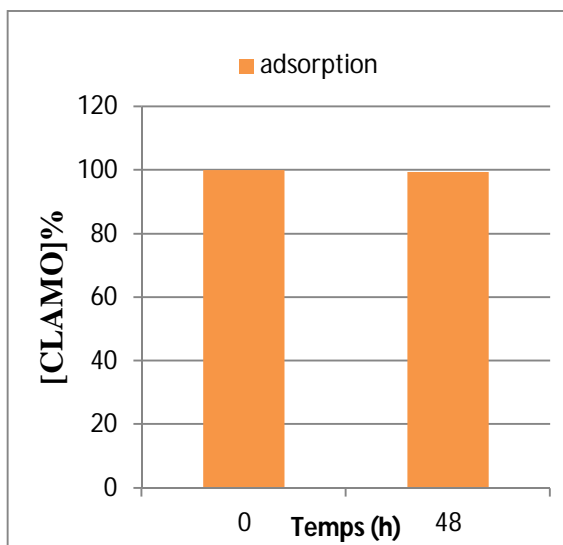
et adsorption après 5 h dans les eaux usées, et que l'élimination a été dominée par biodégradation.



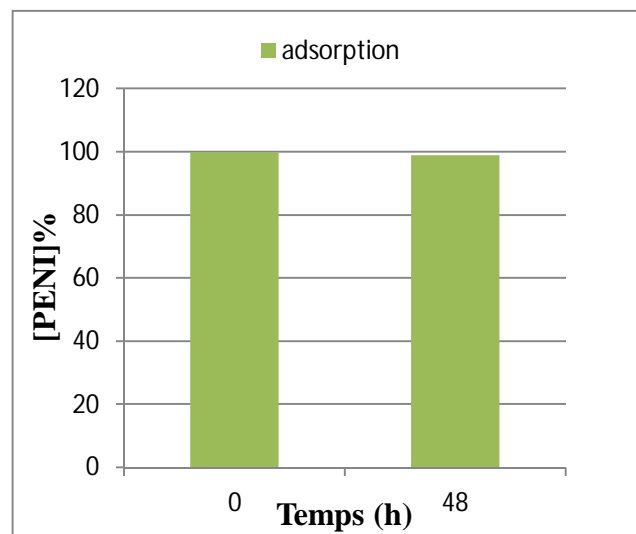
**Figure 18.** Adsorption d'Augmentin® sur la S2 autoclavée.



**Figure 19.** Adsorption de Clamoxyl® sur la S4 autoclavée.



**Figure 20.** Adsorption de Clamoxyl® sur la S4 autoclavée.



**Figure 21.** Adsorption de pénicilline® sur la S10 autoclavée.

# *Conclusion*

Notre travail a pour objectif d'étudier le comportement des bactéries du sol en présence de différentes concentrations d'antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®). Les 4 souches utilisées dans notre étude (S2, S4, S5 et S10) ont été isolées à partir de 3 composts domestiques différents de la région d'El-Milia (Jijel-Algérie).

Une phase d'acclimatation a été effectuée et 10 isolats différents sont isolés. On a identifié 10 souches bactériennes dont quatre souches sont cocci à Gram négatif (S2, S6, S7 et S10), quatre souches cocci à Gram positif (S1, S3, S4 et S5) et trois souches bacille à Gram négatif (S8 et S9).

Un test de sélection a été fait en ajoutant 3mg/l de chaque antibiotique dans 50 ml de MMM. A partir de ce test on a sélectionné 4 souches les plus performantes et qui ont montré une croissance maximale après 24 h. Un antibiogramme est également effectué pour les souches sélectionnées afin de tester leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques testés, on trouve que les souches se multiplient jusqu'au niveau des disques d'antibiotiques.

A l'issue de ce qu'on a réalisé, les 4 souches sont capables de croître dans le milieu minéral minimum contenant les antibiotiques testés (10 mg/l) (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®). De ce fait, ces souches sont capables d'utiliser les antibiotiques comme source de carbone et d'énergie par voie métabolique.

Afin de quantifier le taux de biodégradation des antibiotiques par les souches bactériennes (S2, S4, S5 et S10), la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été requise. Le taux d'élimination d'Augmentin® par S2 est de 18.02%, S4 et S5 éliminent Clamoxyl® par un taux de réduction de 44.77% et 48.69%, respectivement. Alors que le taux d'élimination de Pénicilline® est de 51.58% par S10. Le taux d'élimination d'Augmentin® par dégradation abiotique est de 0.72%, Clamoxyl® par un taux de réduction de 0.38%, alors que le taux d'élimination de la Pénicilline® est de 1.73%.

La dégradation d'Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline® est due principalement à une biodégradation d'origine microbienne.

D'après notre étude et les efforts effectués dans le domaine de la bioremédiation les microorganismes peuvent être efficacement utilisés comme méthode alternative pour l'élimination des polluants rejetés dans l'environnement. En effet, les microorganismes ont la capacité d'utiliser ces polluants comme source de carbone, d'énergie, d'azote, de phosphate....

Ces souches bactériennes ont une richesse spécifique et métabolique ce qui les rend le système de choix pour l'élimination des produits pharmaceutiques et l'épuration de l'environnement. Elles peuvent être une solution efficace pour la dépollution lorsqu'elles sont utilisées comme biofiltres, par exemple leurs utilisations pour filtrer l'eau issue des usines des produits pharmaceutiques avant leur rejet dans l'environnement. Mais la biodégradation de ces



produits contribue à l'apparition des nouveaux métabolites plus ou moins toxiques, ce qui nécessite dans l'avenir de trouver une solution pour éliminer ces métabolites.

*Référence  
bibliographique*

- [1] ABDELLEY, C. (2007). Bioremédiation/Phytoremédiation.
- [2] Singh, J. S., Abhilash, P. C., Singh, H. B., Singh, R. P., & Singh, D. P. (2011). Genetically engineered bacteria: an emerging tool for environmental remediation and future research perspectives. *Gene*, 480(1-2), 1-9.
- [3] Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165(5), 363-375.
- [4] Chen, W., Brühlmann, F., Richins, R. D., & Mulchandani, A. (1999). Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2), 137-141.
- [5] Alharbi, O. M., Khattab, R. A., & Ali, I. (2018). Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *Journal of Molecular Liquids*, 263, 442-453.
- [6] Grenni, P., Falconi, F., & Caracciolo, A. B. (2012). Microcosm experiments for evaluating natural bioremediation of contaminated ecosystems. *Chemical Engineering*, 28, 7-12.
- [7] Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology*, 74(1), 63-67.
- [8] Goltapeh, E. M., Danesh, Y. R., & Varma, A. (Eds.). (2013). *Fungi as bioremediators* (Vol. 32). Springer Science & Business Media.
- [9] Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D., & Dhewa, T. (2011). Review on bioremediation of polluted environment:: A management tool. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(6), 1079.
- [10] Pushpanathan, M., Jayashree, S., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2014). Microbial bioremediation: A metagenomic approach. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 407-419). Elsevier.
- [11] Caracciolo, A. B., Topp, E., & Grenni, P. (2015). Pharmaceuticals in the environment: biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106, 25-36.
- [12] Grenni, P., Ancona, V., & Caracciolo, A. B. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25-39.
- [13] Singh, R. (2014). Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: a review. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 4(1), 1.
- [14] Singh, D. K. (2008). Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 35-40.
- [15] Sharma, S. (2012). Bioremediation: features, strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science ISSN,2231, 4423*.

- [16] Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362-1375.
- [17] Colwell, R. R. (1997). Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18(5), 302-307.
- [18] Labie, D., & Denamur, E. (2012). Évolution adaptative des bactéries-Le hasard et la nécessité. *Médecine/Sciences*, 28(6-7), 588-590.
- [19] Zhou, Q., Li, K., Jun, X., & Bo, L. (2009). Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresource Technology*, 100(16), 3780-3786.
- [20] Dauga, C., Doré, J., & Sghir, A. (2005). La diversité insoupçonnée du monde microbien. *Médecine/Sciences*, 21(3), 290-296.
- [21] Gothwal, R., & Shashidhar, T. (2015). Antibiotic pollution in the environment: a review. *Clean–Soil, Air, Water*, 43(4), 479-489.
- [22] Zhao, F., Yang, L., Chen, L., Xiang, Q., Li, S., Sun, L., ... & Fang, L. (2019). Soil contamination with antibiotics in a typical peri-urban area in eastern China: Seasonal variation, risk assessment, and microbial responses. *Journal of Environmental Sciences*, 79, 200-212.
- [23] Schmitt, H., & Römbke, J. (2008). The ecotoxicological effects of pharmaceuticals (antibiotics and antiparasitics) in the terrestrial environment—a review. In *Pharmaceuticals in The Environment* (pp. 285-303). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [24] Berendsen, B. J. A., Lahr, J., Nibbeling, C., Jansen, L. J. M., Bongers, I. E. A., Wipfler, E. L., & van de Schans, M. G. M. (2018). The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage. *Chemosphere*, 204, 267-276.
- [25] Manzetti, S., & Ghisi, R. (2014). The environmental release and fate of antibiotics. *Marine Pollution Bulletin*, 79(1-2), 7-15.
- [26] Daghrir, R., & Drogui, P. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), 209-227.
- [27] Schlüsener, M. P., & Bester, K. (2006). Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution*, 143(3), 565-571.
- [28] Jjemba, P. K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(1), 113-130.
- [29] Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lützhøft, H. H., & Jørgensen, S. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere*, 36(2), 357-393.
- [30] Pan, M., & Chu, L. M. (2017). Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Science of the Total Environment*, 599, 500-512.

- [31] Längin, A., Alexy, R., König, A., & Kümmerer, K. (2009). Deactivation and transformation products in biodegradability testing of  $\beta$ -lactams amoxicillin and piperacillin. *Chemosphere*, 75(3), 347-354.
- [32] Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., ... & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), E3463-E3470.
- [33] Sarkar, D. J., Mukherjee, I., Shakil, N. A., Rana, V. S., Kaushik, P., & Debnath, S. (2018). Antibiotics in agriculture: use and impact.
- [34] Kim, K. R., Owens, G., Kwon, S. I., So, K. H., Lee, D. B., & Ok, Y. S. (2011). Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water, Air, & Soil Pollution*, 214(1-4), 163-174.
- [35] Bidaud, C. (1998). *Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué* (Doctoral dissertation).
- [36] Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment—a review—part II. *Chemosphere*, 75(4), 435-441.
- [37] Gottlieb, D. (1976). The production and role of antibiotics in soil. *The Journal of antibiotics*, 29(10), 987-1000.
- [38] Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C. S., ... & Siegrist, H. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water Research*, 40(8), 1686-1696.
- [39] Dalton, H., & Stirling, D. I. (1982). Co-metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 297(1088), 481-496.
- [40] Chen, J., & Xie, S. (2018). Overview of sulfonamide biodegradation and the relevant pathways and microorganisms. *Science of the Total Environment*, 640, 1465-1477.
- [41] Amorim, C. L., Moreira, I. S., Maia, A. S., Tiritan, M. E., & Castro, P. M. (2014). Biodegradation of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin as single and mixed substrates by *Labrys portucalensis* F11. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(7), 3181-3190.
- [42] Ma, Y., Wang, L., Liu, L., & Zhang, X. (2015). Biodegradation of tylosin residue in pharmaceutical solid waste by a novel *Citrobacter amalonaticus* strain. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34(1), 99-104.
- [43] Kümmerer, K. (Ed.). (2008). *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer Science & Business Media.

- [44] Fischer, K., & Majewsky, M. (2014). Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6583-6597.
- [45] Wetzstein, H. G., Stadler, M., Tichy, H. V., Dalhoff, A., & Karl, W. (1999). Degradation of ciprofloxacin by basidiomycetes and identification of metabolites generated by the brown rot fungus *gloeophyllum striatum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(4), 1556-1563.
- [46] Mao, F., Liu, X., Wu, K., Zhou, C., & Si, Y. (2018). Biodegradation of sulfonamides by *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Shewanella* sp. strain MR-4. *Biodegradation*, 29(2), 129-140.
- [47] Aissaoui, S., Sifour, M., Ouled-Haddar, H., Sghaier, H., & Jamoussi, B. (2017). Microbial Removal of Sulfamethoxazole by Pure Bacterial Cultures Isolated from the Environment.
- [48] Drillia, P., Dokianakis, S. N., Fountoulakis, M. S., Kornaros, M., Stamatelatou, K., & Lyberatos, G. (2005). On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: the example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 259-265.
- [49] Bessa, V. S., Moreira, I. S., Tiritan, M. E., & Castro, P. M. L. (2017). Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 135-142.
- [50] Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Beggah, C., & Benhamada, F. (2017). Biological removal of the mixed pharmaceuticals: diclofenac, ibuprofen, and sulfamethoxazole using a bacterial consortium. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(2), 135.
- [51] Iso. FENG, Nai-Xian, YU, Jiao, XIANG, Lei, *et al.* Co-metabolic degradation of the antibiotic ciprofloxacin by the enriched bacterial consortium XG and its bacterial community composition. *Science of the Total Environment*, 2019, vol. 665, p. 41-51.
- [52] Ben, S. Study of the separation of fluoroquinolones using HPLC: Application to the study of their degradation by gamma radiation.
- [53] Hadeif, L., & El Hadeif, E. O. S. (2009). Optimisation des paramètres de détection et de quantification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) résidus d'antibiotiques dans la viande.
- [54] Saleh, G. A. (1996). Two selective spectrophotometric methods for the determination of amoxicillin and cefadroxil. *Analyst*, 121(5), 641-645.
- [55] Li, B., & Zhang, T. (2010). Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3468-3473.

- [56] Elizalde-Velázquez, A., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., Dublán-García, O., & SanJuan-Reyes, N. (2016). Amoxicillin in the Aquatic Environment, Its Fate and Environmental Risk. *Environmental Health*, 247.
- [57] Akindele, A. A., Adewuyi, I. K., Adefioye, O. A., Adedokun, S. A., & Olaolu, A. O. (2010). Antibiogram and beta-lactamase production of *Staphylococcus aureus* isolates from different human clinical specimens in a tertiary health institution in Ile-ife, Nigeria. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 5(4), 230-233.
- [58] Zhang, Y. B., Zhou, J., Xu, Q. M., Cheng, J. S., Luo, Y. L., & Yuan, Y. J. (2016). Exogenous cofactors for the improvement of bioremoval and biotransformation of sulfamethoxazole by *Alcaligenes faecalis*. *Science of the Total Environment*, 565, 547-556.
- [59] Wang, J., & Wang, S. (2018). Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3573-3582.
- [60] Andreozzi, R., Caprio, V., Ciniglia, C., De Champdoré, M., Lo Giudice, R., Marotta, R., & Zuccato, E. (2004). Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental Science & Technology*, 38(24), 6832-6838.
- [61] Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., & Mersch-Sundermann, V. (2000). Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, 40(7), 701-710.
- [62] Herzog, B., Lemmer, H., Horn, H., & Müller, E. (2013). Characterization of pure cultures isolated from sulfamethoxazole-acclimated activated sludge with respect to taxonomic identification and sulfamethoxazole biodegradation potential. *BMC Microbiology*, 13(1), 276.
- [63] Larcher, S., & Yargeau, V. (2011). Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(1), 211-218.
- [64] Apa. Feng, N. X., Yu, J., Xiang, L., Yu, L. Y., Zhao, H. M., Mo, C. H., ... & Li, Q. X. (2019). Co-metabolic degradation of the antibiotic ciprofloxacin by the enriched bacterial consortium XG and its bacterial community composition. *Science of the Total Environment*, 665, 41-51.
- [65] Islas-Espinoza, M., Reid, B. J., Wexler, M., & Bond, P. L. (2012). Soil bacterial consortia and previous exposure enhance the biodegradation of sulfonamides from pig manure. *Microbial Ecology*, 64(1), 140-151.
- [66] Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. *Chemosphere*, 75(4), 417-434.

**Annexe 1.** Les composants du milieu minimum (Mineral Minimal Salt Medium agar).

| Constituants g/l                        | Milieu de culture |           |
|---|-------------------|-----------|
|   | Milieu minimum    |           |
|   | Liquide           | Gélose    |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O    | 0.013 g/l         | 0.013 g/l |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O    | 0.013 g/l         | 0.013 g/l |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O    | 0.25 g/l          | 0.25 g/l  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | 7.5 g/l           | 7.5 g/l   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>         | 5 g/l             | 5 g/l     |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>         | 5 g/l             | 5 g/l     |
| l'extrait de levure                     | 0.25 g/l          | 0.25 g/l  |
| Agar-agar                               | -                 | 15 g/l    |
| le pH 7.0 ±0.2, autoclavé 15 mn à 120°C |                   |           |

**Annexe 2.** Croissance des isolats dans le milieu MMM.

| Souches    | Origine   | 0 h           | 24 h          | 48 h          | 72 h          | 96 h          |
|------------|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| S1         | Compost 1 | 0.0352        | 0.1494        | 0.1178        | 0.1113        | 0.1174        |
| <b>S2</b>  |           | <b>0.0588</b> | <b>0.2027</b> | <b>0.1453</b> | <b>0.1238</b> | <b>0.1237</b> |
| S3         |           | 0.0446        | 0.1379        | 0.0896        | 0.0628        | 0.0720        |
| <b>S4</b>  | Compost 2 | <b>0.0266</b> | <b>0.2455</b> | <b>0.1937</b> | <b>0.1909</b> | <b>0.1913</b> |
| <b>S5</b>  |           | <b>0.0469</b> | <b>0.2899</b> | <b>0.2681</b> | <b>0.2107</b> | <b>0.2389</b> |
| S6         | Compost 3 | 0.0379        | 0.1899        | 0.0826        | 0.0855        | 0.0696        |
| S7         |           | 0.0456        | 0.1688        | 0.0897        | 0.0884        | 0.0655        |
| S8         |           | 0.0498        | 0.1982        | 0.0995        | 0.1006        | 0.0892        |
| S9         |           | 0.0795        | 0.1428        | 0.0607        | 0.0540        | 0.0513        |
| <b>S10</b> |           | <b>0.0637</b> | <b>0.2718</b> | <b>0.1865</b> | <b>0.1317</b> | <b>0.1473</b> |

**Annexe 3.** Cinétique de la croissance des isolats (S2, S4, S5 et S10) sur le milieu MMM en présence de différentes concentrations d'antibiotiques testés après 48 h.

|    | 0 mg/l | 3 mg/l | 10 mg/l | 20 mg/l | 30 mg/l | 50 mg/l | 100 mg/l | 300mg/l | 600mg/l | 1000mg/l |
|----|--------|--------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|----------|
| S2 | 0.2393 | 0.1766 | 0.3643  | 0.3761  | 0.3638  | 0.3656  | 0.2993   | 0.1013  | 0.0715  | 0.0115   |
| S4 | 0.2202 | 0.1904 | 0.3624  | 0.3678  | 0.3457  | 0.3698  | 0.2906   | 0.1026  | 0.0653  | 0.0106   |



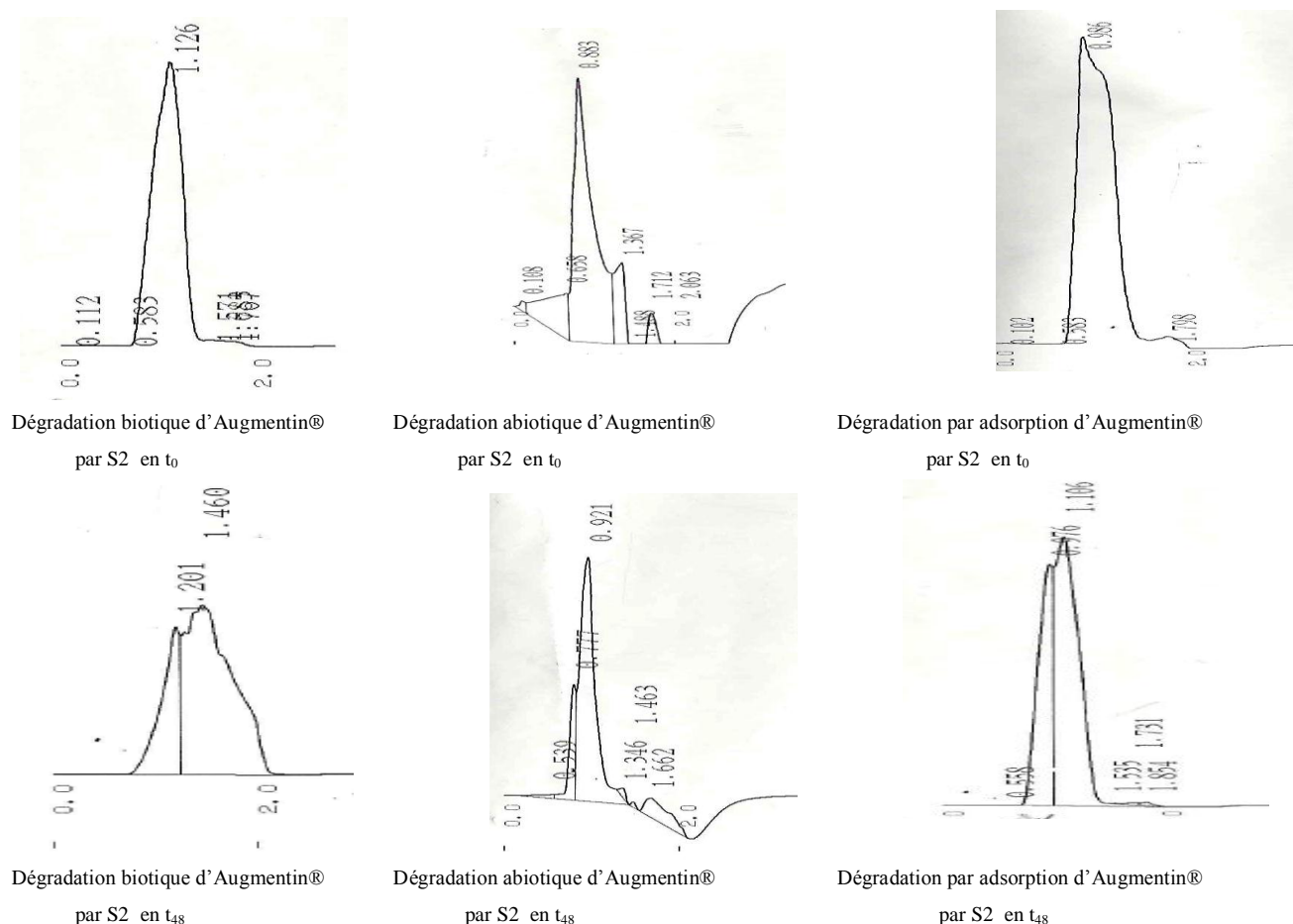
|     |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| S5  | 0.2078 | 0.1654 | 0.5605 | 0.3921 | 0.3620 | 0.3095 | 0.2297 | 0.1272 | 0.0993 | 0.0214 |
| S10 | 0.2316 | 0.3024 | 0.3590 | 0.3308 | 0.3320 | 0.3679 | 0.2853 | 0.1178 | 0.0865 | 0.0135 |

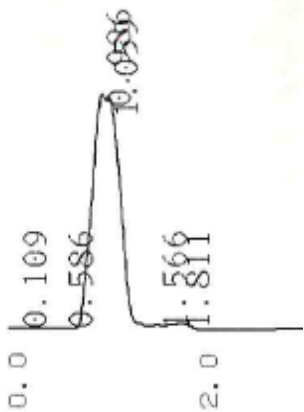
**Annexe 4.** La cinétique de la croissance bactérienne des souches (S2, S4, S5 et S10) dans les deux conditions métabolique et co-métabolique (avec l'ajout de 0.415 g/l du glucose) sur MMM contenant 10 mg/l d'antibiotique testé.

|     | 0 h    |          | 24 h   |          | 48 h   |          |
|-----|--------|----------|--------|----------|--------|----------|
|     | Méta   | Co- méta | Méta   | Co- méta | Méta   | Co- méta |
| S2  | 0.0813 | 0.1037   | 0.3117 | 0.2789   | 0.3155 | 0.2521   |
| S4  | 0.0915 | 0.0754   | 0.3440 | 0.2840   | 0.3618 | 0.2308   |
| S5  | 0.1022 | 0.0781   | 0.3010 | 0.2445   | 0.3140 | 0.3052   |
| S10 | 0.0721 | 0.0830   | 0.3778 | 0.3002   | 0.3816 | 0.3022   |

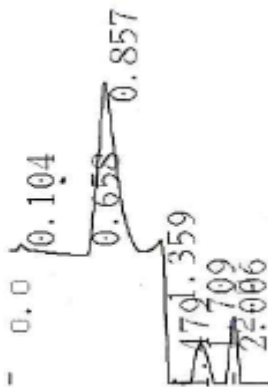
Méta : métabolisme ; Co-méta : cométabolisme

**Annexe 5.** Chromatogramme d'HPLC obtenus avec le test de biodégradation : biotique, abiotique et adsorption d'Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline® par S2, S4, S5 et S10.

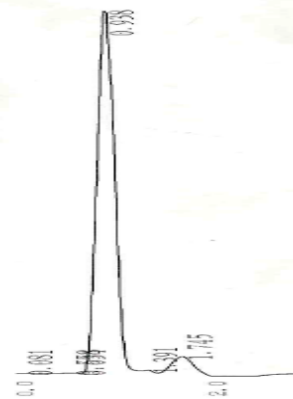




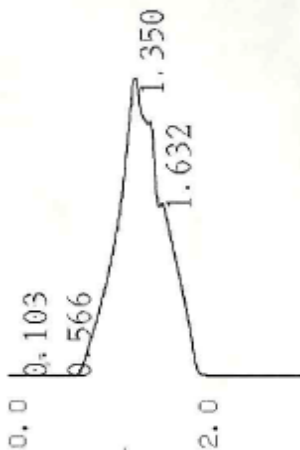
Dégradation biotique de clamoxyl®  
par S4 en t<sub>0</sub>



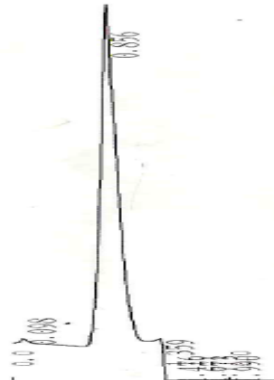
Dégradation abiotique de clamoxyl®  
par S4 en t<sub>0</sub>



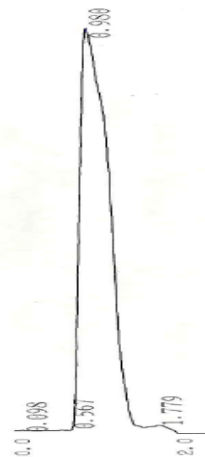
Dégradation par adsorption de clamoxyl®  
par S4 en t<sub>0</sub>



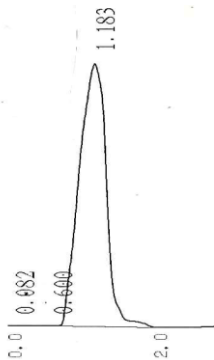
Dégradation biotique de clamoxyl®  
par S4 en t<sub>48</sub>



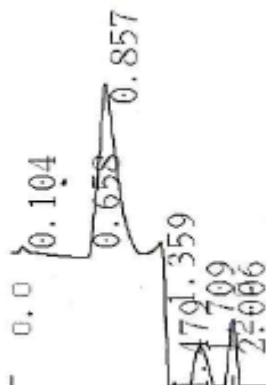
Dégradation abiotique de clamoxyl®  
par S4 en t<sub>48</sub>



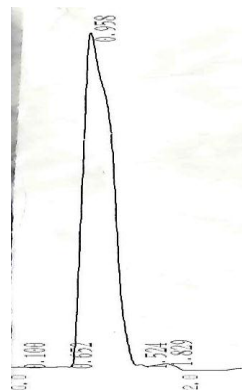
Dégradation par adsorption de clamoxyl®  
par S4 en t<sub>48</sub>



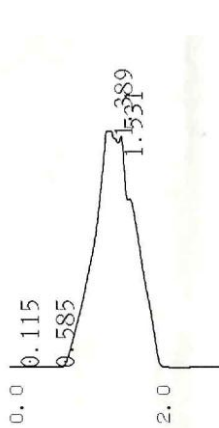
Dégradation biotique de clamoxyl®  
par S5 en t<sub>0</sub>



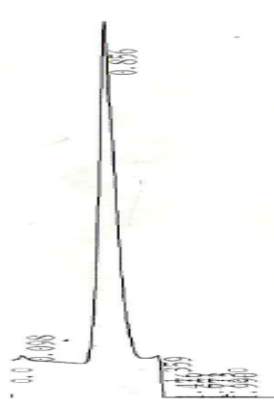
Dégradation abiotique de clamoxyl®  
par S5 en t<sub>0</sub>



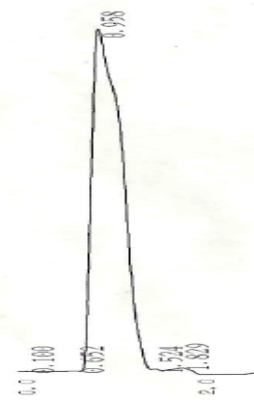
Dégradation par adsorption de clamoxyl®  
par S5 en t<sub>0</sub>



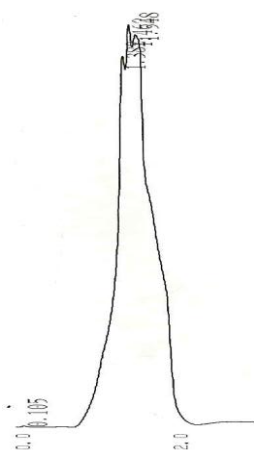
Dégradation biotique de clamoxyl®  
par S5 en t<sub>48</sub>



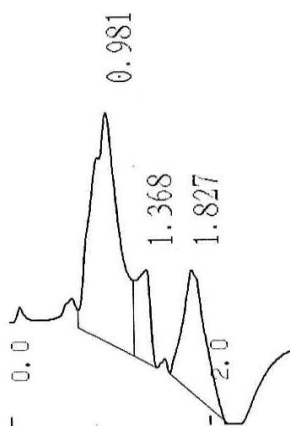
Dégradation abiotique de clamoxyl®  
par S5 en t<sub>48</sub>



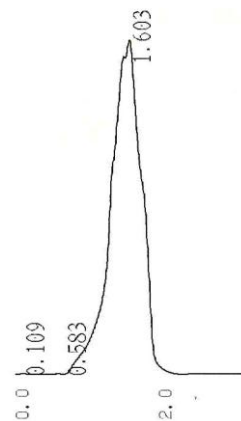
Dégradation par adsorption de clamoxyl®  
par S5 en t<sub>48</sub>



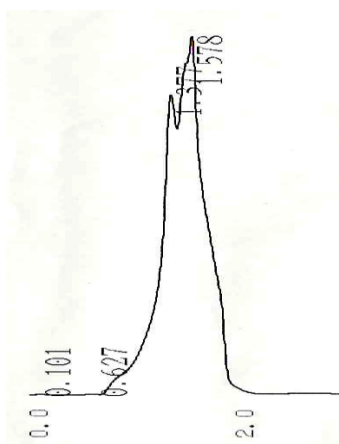
Dégradation biotique de pénicilline®  
par S10 en t<sub>0</sub>



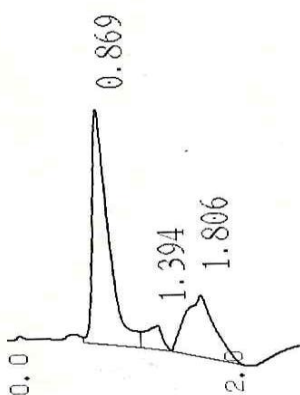
Dégradation abiotique de pénicilline®  
par S10 en t<sub>0</sub>



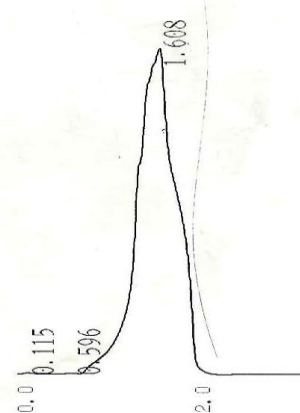
Dégradation par adsorption de pénicilline®  
par S10 en t<sub>0</sub>



Dégradation biotique de pénicilline®  
par S10 en t<sub>48</sub>

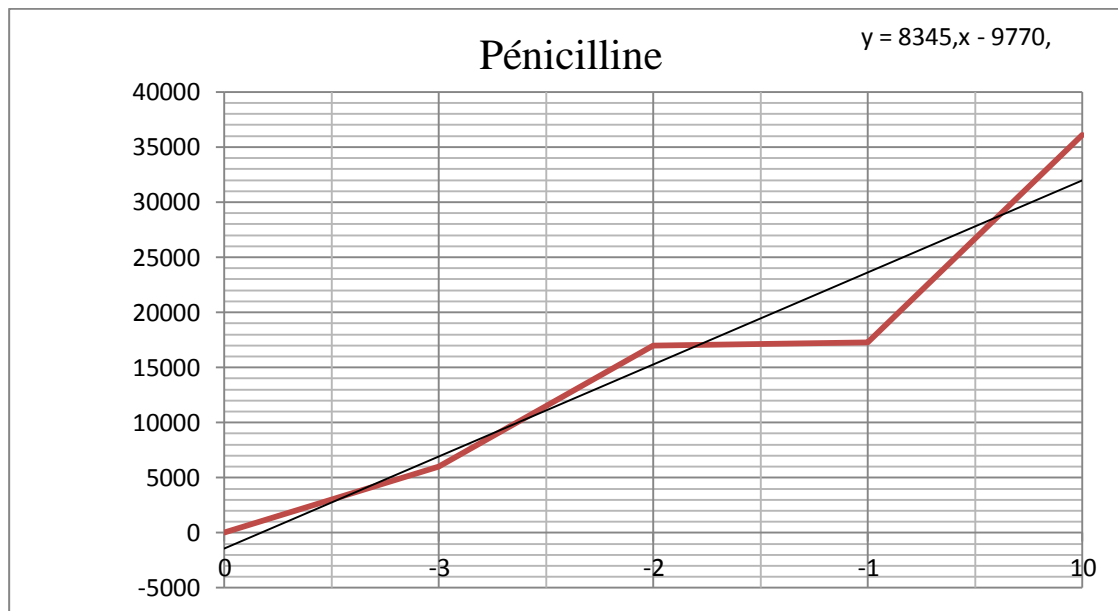


Dégradation abiotique de pénicilline®  
par S10 en t<sub>48</sub>



Dégradation par adsorption de pénicilline®  
par S10 en t<sub>48</sub>

**Annexe 6.** Courbes d'étalonnage des antibiotiques (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®) obtenus par HPLC durant le test de biodégradation.



**Annexe 7.** Coloration de Gram.

Étapes pour réaliser le test

- Réaliser un frottis des bactéries à l'aide d'un incinérateur.
- Appliquer les colorants en respectant l'ordre et le temps ci-dessous. Rincer le colorant entre chacune des étapes.
  - a. Violet de cristal (1 minute)
  - b. Iode (1 minute)
  - c. Décolorant (éthanol) (10 secondes)
  - d. Fuchsine (45 secondes)
- Sécher la lame.
- Observer la morphologie des bactéries aux microscopes (objectif 100 x).

Résultats possibles

- Rose : Gram -
- Mauve : Gram +

Il est possible également d'observer la morphologie des bactéries après avoir complété les étapes de la coloration de Gram.

**Annexe 8.** Recherche de la catalase.

Principe :

On dépose au centre d'une lame propre quelques colonies prélevées à partir d'une culture pure et en ajoutant quelques gouttes d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Lecture :

Catalase + : dégagement des bulles gazeuses d'oxygène (effervescence).

**Réalisé par :**

- Bouchra BELIBEL
- Khadidja HAINE
- Yamina BEZAZEL

**Présidente:** Pr. Ouled Haddar Houria**Encadreur:** Dr. Moussaoui Sagia**Examinatrice:** Mme Benhamada Wahiba**Thème :****Suivie de la croissance de quelques souches bactériennes isolées du compost ménager en présence d'antibiotiques de la famille des bêta-lactamines.****Résumé :**

Le problème de la pollution environnementale s'aggrave de jour en jour, ce qui nécessite de réhabiliter les sites contaminés. Les chercheurs ont mis au point une technique effective appelée bioremédiation. Le travail réalisé a pour objectif d'isoler des souches bactériennes capables de dégrader les antibiotiques (Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline®) à partir de 3 composts. Une phase d'acclimatation a été effectuée et 10 isolats différents sont isolés et identifiés. Un test de sélection a été fait en utilisant 3mg/l de chaque antibiotique dans 50 ml de MMM. A partir de ce test on a choisi les 4 souches les plus performantes qui ont une croissance maximale après 24 h. La souche S2 avec une DO de 0.2027, S4 avec une DO de 0.2455, S5 avec une DO de 0.2899 et S10 avec une DO de 0.2718. Les résultats obtenus montrent que les isolats (S2, S4, S5 et S10) sont capables de croître en présence de concentrations élevées des antibiotiques testés [3 mg/l à 1000 mg/l]. Un test de biodégradation a été effectué en présence de 10 mg/l de chaque antibiotique. Selon les résultats obtenus à partir des chromatogrammes de l'HPLC le taux d'élimination pour l'Augmentin® par S2 est de 18.06%, de Clamoxyl® par S4 et S5 est de 44.77% et 48.69% respectivement, enfin le taux de réduction de la Pénicilline® est de 51.58% par S10. Le taux d'élimination d'Augmentin® par dégradation abiotique est de 0.72%, Clamoxyl® par un taux de réduction de 0.38%, alors que le taux d'élimination de la Pénicilline® est de 1.73%. La dégradation d'Augmentin®, Clamoxyl® et Pénicilline® est due principalement à une biodégradation d'origine bactérienne (phénomène d'adsorption négligeable).

**Mots clés :** Pollution, microorganismes, bioremédiation, β-lactamines, biodégradation.

**Abstract:**

The problem of environmental pollution is getting worse day by day, which requires rehabilitating contaminated sites. Researchers have developed an effective technique called bioremediation. The aim of this work is to isolate bacterial strains capable of degrading antibiotics (Augmentin®, Clamoxyl® and Penicilline®) from 3 composts. An acclimation phase was performed and 10 different isolates were isolated and identified. A selection test was done using 3mg / l of each antibiotic in 50ml of MMM. From this test, we chose the 4 most successful strains that have maximum growth after 24 hours. Strain S2 with an OD of 0.2027, S4 with an OD of 0.2455, S5 with an OD of 0.2899 and S10 with an OD of 0.2718. The results obtained show that the isolates (S2, S4, S5 and S10) are able to grow in the presence of high concentrations of antibiotics tested [3 mg / l to 1000 mg / l]. A biodegradation test was carried out in the presence of 10 mg / l of each antibiotic. According to the results obtained from the chromatograms of the HPLC, the elimination rate for Augmentin® by S2 is 18.06%, Clamoxyl® by S4 and S5 is respectively 44.77% and 48.69%. Finally the reduction rate of Penicillin® is 51.58% by S10. The elimination rate of Augmentin® by abiotic degradation is 0.72%, Clamoxyl® by a rate reduction is 0.38%, while the elimination rate of Penicilline® is 1.73%. The degradation of Augmentin®, Clamoxyl® and Penicilline® is mainly due to biodegradation of bacterial origin (negligible adsorption phenomenon).

Key words: Pollution, microorganisms, bioremediation, β-lactams, biodegradation.

**ملخص**

تتفاقم مشكلة التلوث البيئي يوما بعد يوم. الأمر الذي يتطلب إعادة تأهيل المواقع الملوثة. ولهذا طور الباحثون تقنية فعالة تسمى المعالجة البيولوجية. الهدف من هذا العمل هو عزل السلالات البكتيرية القادرة على تحليل المضادات الحيوية التالية Augmentin®, Clamoxyl®, Penicilline® من 3 أسمدة عضوية. أجريت مرحلة للتأقلم وتم عزل 10 مستوطنات بكتيرية مختلفة وتشخيصها. استخدمنا 3مغ / ل من كل مضاد حيوي في 50 مل من الوسط المعدني وذلك سمح باختيار أربع سلالات الأكثر (السلالة DO=), السلالة DO=0.2899, السلالة DO=0.2455), (DO=0.2027 سجلت القيمة ( قدرة , والتي سجلت أقصى نمو لها بعد 24 ساعة. حيث السلالة DO=0.2718 (DO=0.271) أظهرت النتائج المحصل عليها أن المستوطنات 02,04,05 و10 قادرة على النمو في وجود تراكيز عالية من المضادات الحيوية التي تم اختبارها [3مغ/ل إلى 1000 (DO=0.271) بمعدل % 18.06, السلالتين Augmentin® قادرة على تحليل أن السلالة HPLC02تم إجراء اختبار التحلل الحيوي في وجود 10 مغ/ل من كل مضاد حيوي. أظهرت تحليل. [مغ / ل بمعدل % 51.58. فيما يخص التحلل الغير Penicilline® على التوالي بمعدل % 44.77 و48.69. في حين السلالة 10قادرة على تحليل Clamoxyl® 04 و 05 قادران على تحليل. تحلل هذه المضادات الحيوية المدروسة ناجم % 1.73 المنحلة تمثل Pénicilline® و% 0.38 المنحلة تمثل Clamoxyl®, نسبة 0.72 المنحلة تمثل Augmentin® حيوي نسبة أساسا عن نشاط ميكروبي (غياب ظاهرة الالتصاق).

**الكلمات المفتاحية :** التلوث , الكائنات الحية الدقيقة, المعالجة البيولوجية, β-lactamines, التحلل الحيوي