

CINETIQUE DE LA BIODEGRADATION DU *m*-CRESOL PAR LE MICROBIOTE DES EAUX USEES DE LA VILLE DE CONSTANTINE.

Reçu le 06/02/2008 – Accepté le 15/06/2008

Résumé

La capacité de biodégradation du *m*-crésol, à une concentration initiale de 200mg/L, par le microbiote des eaux usées de la station d'épuration d'IBN ZIAD de la ville de Constantine, est étudiée en cinétique de temps. Un essai d'isolement des bactéries dominantes est également réalisé en milieu liquide. Les cultures sont menées dans des fermenteurs miniaturisés, où le *m*-crésol est la seule source de carbone et d'énergie d'un milieu minimum. La cinétique de la biodégradation est suivie pendant 30 jours d'incubation à 30°C, en cultures discontinues, statiques. Le suivi de la concentration du *m*-crésol dans le milieu est déterminé par spectrométrie. Les résultats obtenus montrent la capacité des microorganismes à croître en dégradant le *m*-crésol dont plus de 90% de la concentration initiale sont décomposés au bout de 14 jours d'incubation. Une dégradation en conditions abiotiques est également constatée, avec un pourcentage de 47% de la concentration initiale de la molécule durant la même période d'incubation. Cependant, la différence entre les deux voies de dégradation est très significative ($p < 0.05$). Après 30 jours d'incubation, le pH et la DO du milieu augmentent, indiquant une probable évolution des produits métaboliques terminaux du *m*-crésol, révélée par plusieurs pics d'éluion HPLC dont l'identification est en cours. La purification des souches bactériennes dominantes a permis de sélectionner 6 souches bactériennes d'aspects macroscopiques différents. L'observation microscopique à l'état frais et la coloration de Gram révèlent qu'elles sont toutes à Gram négatif, que 5 sont des coques et 1 seule est un bacille. L'examen du type respiratoire et la mise en évidence de la cytochrome oxydase et de la catalase montrent que les 6 souches sont aérobies microaérophiles, oxydase positive et catalase positive. Leur identification est en cours de finalisation.

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

Abstract

Biodegradation of *m*-cresol by the total microflora of wastewater taken from one sewage treatment plant of CONSTANTINE is studied. A test of isolation of the dominant bacteria is also carried out in liquid medium. The cultures are performed in miniaturized fermentors, using a minimum medium, where the *m*-cresol is the sole source of carbon and energy, with an initial concentration of 200mg/L. The kinetic of the biodegradation is followed for 30 days of incubation at 30°C, in discontinuous cultures and static mode. The concentration of *m*-cresol in the medium is measured by spectrometry. The obtained results shows the capacity of microorganisms to develop by degrading the *m*-cresol, which more than 90% of its initial concentration is decomposed at the end of 14 days of incubation. An abiotic degradation is also noted, with a percentage of 47% of the initial concentration of the molecule, during the same incubation period. However, the difference between the two ways of degradation is very significant ($p < 0.05$). After 30 days of incubation, both pH and OD of the medium increase. This situation could result from the appearance of metabolites derived from *m*-cresol and revealed by several peaks of elution HPLC whose identification is in hand. Six bacterial strains of different macroscopic aspects are isolated. The microscopic observation and Gram coloration reveal that all the strains are Gram negatif, among which five are cocci and only one is rod. The examination of the respiratory type, the presence of the cytochrome oxydase and the catalase show that the six strains are aerobic microaerophiles, positive oxydase and positive catalase, respectively. The identification of purified strains is in the course.

Keywords: Biodegradation of pesticides, *m*-Cresol, Total microflora of wastewater.

A. DAFFRI*
S.R. NOUMEUR
S. GUENOUNE
H. BOUSSEBOUA

Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri/Constantine (Algérie).
*E-mail : asdame111@yahoo.fr

ملخص

بغرض دراسة الهدم الحيوي لـ *m*- كريسول و عزل البكتيريا المسؤولة عن ذلك، أخذت ميكروفلورا المياه المستعملة من محطة تصفية المياه "ابن زياد" بمدينة قسنطينة و استعملت لزراع وسط أولي سائل حيث يشكل *m*- كريسول المصدر الوحيد للكربون و الطاقة بتركيز أولي 200 ملغ/ل. تمت عملية الزرع في مخمرات مصغرة، دون رج و بطريقة غير مستمرة. اتبعت حركية الهدم الحيوي لـ *m*- كريسول لمدة 30 يوم، حيث احتضنت المخمرات في درجة حرارة 30 °م و تم قياس تركيز *m*- كريسول بواسطة قياس الكثافة الضوئية.

أظهرت النتائج أن أكثر من 90% من التركيز الأولي لـ *m*- كريسول قد تم هدمه من طرف ميكروبات المياه المستعملة بعد 14 يوم من الحضان. لوحظت خلال نفس المدة عملية هدم غير حيوي بنسبة 47% من تركيز الجزيء. أكدت الدراسة الإحصائية أن هناك فرق شاسع بين عمليتي الهدم.

بعد 30 يوم من الحضان، ارتفعت درجة حموضة الوسط و الكثافة الضوئية، رجح السبب إلى احتمال امتصاص الضوء من طرف نواتج هدم الـ *m*- كريسول. عملية التعرف على هذه النواتج متواصلة بواسطة HPLC.

سنة سلالات بكتيرية متنوعة المظهر تم عزلها، حيث أظهرت الملاحظة المجهرية و صبغ الغرام أن كل السلالات سالبة الغرام، خمسة ذات شكل مستدير و واحدة فقط على شكل عصيات. أظهرت نتائج دراسة نوع التنفس و فحص الأوكسيداز و الكتالاز، أن كل السلالات هوائية، موجبة الأوكسيداز و موجبة الكتالاز. عملية تحديد صنف و نوع البكتيريا المسؤولة على الهدم الحيوي لـ *m*- كريسول متواصلة إلى حد الآن.

الكلمات المفتاحية: الهدم الحيوي لمبيد، *m*- كريسول، ميكروفلورا المياه المستعملة

I. INTRODUCTION

Les phénols sont des composés majeurs de la pollution toxique de l'environnement. Leur présence dans les eaux usées résulte de nombreuses activités domestiques et industrielles : production d'huile, conversion du charbon, production du papier et autres [16,19]. Les crésols sont des phénols utilisés comme agents antiseptiques et désinfectants, ils entrent aussi dans la composition de nombreux produits organiques d'usage multiples : produits phytosanitaires, agents antioxydants, résines phénoliques... L'élimination des crésols des milieux naturels est réalisée par différents processus physiques et chimiques, leur dégradation par la voie biologique, grâce à l'aptitude de multiples microorganismes à les décomposer, est une stratégie très répandue dans la détoxification des environnements pollués. La biodégradation des crésols est largement étudiée en aérobiose. Divers auteurs exposent des études basées sur l'utilisation de ces substances comme principale source de carbone et d'énergie par une microflore complexe [9,15], ou des souches pures [1, 5, 7]. A ce titre, la cinétique de la biodégradation du *m*-crésol par le microbiote des eaux usées de la ville de CONSTANTINE, prélevées de la station d'épuration d'IBN ZIAD est étudiée pendant 30 jours d'incubation en cultures discontinues statiques et sous aérobiose, dans des fermenteurs miniaturisés. Un isolement des bactéries dominantes est également réalisé, à une fin d'identification.

II- MATERIEL ET METHODES

II-1- Milieu de culture

Le milieu de culture est un milieu minimum où le *m*-crésol est la seule source de carbone et d'énergie. Sa composition est la suivante : NaHCO_3 (0,125g/L), KH_2PO_4 (0,1g/L), NH_4Cl (0,07g/L), Na_2SiO_3 (0,02g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01g/L), MnCl_2 (0,007g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0015g/L), vitamine casamino-acids (0,01g/L), *m*-crésol (0,2g/L) [13]. Le pH du milieu est 7,02.

II-2-Prélèvement de l'inoculum

L'inoculum est constitué du microbiote total des eaux usées de la ville de CONSTANTINE. Le prélèvement est effectué à partir du canal d'entrée de la station d'épuration d'IBN ZIAD. L'échantillon est prélevé le matin à 8h 30min, ses propriétés physico-chimiques sont les suivantes : T° : 28°C, pH : 8,12, Débit : 265L/s, Conductivité : 1822us/cm, MES : 171mg/L, DCO : 326mg/L, DBO_5 : 100mg/L.

Une fois l'échantillon prélevé, il est transporté dans une glacière maintenue à 4°C jusqu'au laboratoire [14] où il est traité dès son arrivée.

II-3- Cinétique de la biodégradation et dosage

Des séries de dilutions décimales de l'échantillon des eaux usées (de 10^{-1} à 10^{-9}) sont effectuées dans de l'eau distillée stérile. Le milieu minimum est ensemencé à raison de 3% par dilution (10^0 à 10^{-9}), il est incubé en fermenteur (trois fermenteurs miniaturisés pour chaque dilution et pour chaque intervalle de temps d'incubation). Les fermenteurs sont standardisés aux mêmes volumes d'air et de milieu minimum. La manipulation est réalisée en conditions stériles, avec deux séries de témoins : Témoin 1 : le microbiote des eaux usées est incubé dans les mêmes conditions expérimentales mais en l'absence du *m*-crésol.

Témoin 2 : la molécule est introduite dans les mêmes conditions mais sans le microbiote des eaux usées (vérification de la présence d'une éventuelle dégradation abiotique), c'est le témoin stérile.

Les fermenteurs sont incubés à 30°C sans agitation pendant 30 jours d'incubation. Le suivi cinétique de la biodégradation et le dosage du *m*-crésol débutent dès les premières heures d'incubation. Selon les intervalles cinétiques de mesure suivants : 2h, 6h, 18h, 24h, 72h, 7 jours, 14 jours et 30 jours. A chaque intervalle de temps, la concentration du *m*-crésol est dosée par méthode spectrophotométrique [11] et le pH du milieu mesuré.

II-4- Isolement et purification des microorganismes

L'isolement des bactéries dominantes est effectué au fur et à mesure de la biodégradation de la molécule, par la méthode de la dilution-extinction [6], suivie d'une purification sur gélose nutritive. L'ensemencement est fait à partir des fermenteurs inoculés par les dilutions les plus importantes (10^{-8} , 10^{-9}), respectivement après 7 jours, 14 jours et 30 jours d'incubation.

Les souches isolées et purifiées sont observées au microscope optique, à l'état frais et après coloration de Gram. La détermination du type respiratoire et la mise en évidence de l'existence de la cytochrome oxydase et de la catalase sont également réalisées.

II-5- Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats est réalisée par l'ANOVA selon la méthode de Fischer-Snedecor, pour tester l'effet « temps d'incubation » et l'effet « dilution » sur la biodégradation du *m*-crésol. Le test de Student est appliqué pour la comparaison de la dégradation du *m*-crésol par les deux processus : biologique et non biologique. Ces analyses sont réalisées par le logiciel Minitab/version 13.31 (2000).

III- RESULTATS ET DISCUSSION

III-1- Evaluation de la biodégradabilité de l'échantillon

La charge polluante biodégradable ou non de l'inoculum est quantifiée par la détermination de sa DCO et de sa DBO5. Le rapport DCO/DBO5 = 3,26 donne une première estimation de la biodégradabilité de la matière organique de notre effluent. Sa valeur supérieure à 3 indique qu'il est chargé en matières polluantes, considérées non biodégradables [3]. La vérification de la présence éventuelle de phénols dans notre échantillon d'inoculation se révèle positive, avec une concentration initiale de 40,91 mg/L. Ces résultats montrent donc que les eaux usées contiennent déjà des phénols, dont probablement des crésols d'origine domestique, le dosage de ces molécules ne pouvant être dissocié par notre technique de mesure, puisqu'elles absorbent toutes à la même longueur d'onde.

III-2- Cinétique de la biodégradation du *m*-crésol

La figure 1 montre qu'après 7 jours d'incubation, au delà de 75% de la concentration initiale du *m*-crésol sont dégradés par le microbiote des eaux usées, aussi bien au niveau de l'échantillon non dilué que de ses dilutions, mais seulement jusqu'à la dilution 10-4. Dans tous ces cas, la différence des concentrations du *m*-crésol résiduel est non significative ($p > 0,05$). Par contre, pour le reste des dilutions étudiées, (dilution 10-5 à 10-9), on constate une dégradation nettement plus réduite, 17 à 25%, de la concentration initiale du *m*-crésol. De plus, la variation du niveau de dégradation du *m*-crésol dans ces dernières dilutions est là aussi non significative ($p > 0,05$). Ces résultats indiquent que la modification de l'équilibre écologique introduite, forcément, par la dilution de l'inoculum joue probablement un rôle significatif dans la dégradation du *m*-crésol. Cette situation persiste jusqu'au 30ème jour d'incubation, ce qui indique que l'équilibre écologique initial du microbiote n'est pas rétabli.

Après 14 jours d'incubation, le niveau de biodégradation du *m*-crésol s'accroît dans tous les cas, mais toujours dans une plus grande proportion au niveau des plus faibles dilutions de l'échantillon (de 10^0 à 10^{-4}) : 90% en moyenne, contre 60% pour les dilutions supérieures à 10^{-4} . En effet, la cinétique de dégradation du témoin stérile, à temps d'incubation égal, montre une décomposition abiotique parallèle de la molécule à hauteur de 45% de sa concentration initiale. En milieux aquatiques naturels, la principale voie d'élimination des crésols est biologique. Mais des voies abiotiques diversifiées : photolyse, hydrolyse, oxydation peuvent également se produire [8,17]. Ces processus pourraient bien expliquer la diminution de la concentration du *m*-crésol dans le témoin stérile. La dégradation abiotique du substrat suit un profil de dégradation bien plus faible et il reste constant jusqu'au 14^{ème} jour.

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

Les concentrations élevées de substances toxiques sont considérées comme inhibitrices de la croissance des microorganismes, empêchant ainsi leur propre dégradation. La diminution de la concentration du *m*-crésol, dès les premières heures d'incubation, indique que la croissance microbienne n'est pas inhibée, malgré la concentration initiale de *m*-crésol bien plus élevée dans notre étude que dans celles d'autres auteurs [2,18]. Situation vérifiée par la croissance microbienne positive obtenue après un ensemencement sur milieu solide.

De nombreuses études montrent que la biodégradation des crésols et des phénols par des souches microbiennes pures est réalisée en quelques heures seulement. Ainsi, *Pseudomonas putida* dégrade les phénols des milieux aquatiques à une concentration initiale de 23,4mg/L en 14 heures [12]. Alors que les phénols sont complètement dégradés par le consortium microbien isolé à partir des eaux usées d'usines productrices de phénols au bout de 22 heures. Cependant, une phase de latence de 6 à 16 heures est alors observée pour la biodégradation complète des phénols à une concentration initiale de 200mg/L [10]. De même que la biodégradation de phénols, à une concentration dans le milieu de 150mg/L, est achevée au bout de 3 heures par des boues activées [11].

Notre étude montre une nouvelle fois la capacité des microorganismes à dégrader les composés phénoliques. Les 200mg/L du *m*-crésol, aux quels s'ajoutent les 40.91mg/l de phénols polluants, sont dégradés au bout de 14 jours par le microbiote total des eaux usées, à hauteur de 90%. Une situation de même nature mais de moindre ampleur est observée pour les dilutions les plus importantes de l'inoculum (10^{-8} , 10^{-9}), où en moyenne 60% de la concentration initiale de phénols sont dégradés durant la même période d'incubation. Ce qui montre clairement le rôle prépondérant que joue les microorganismes dans la détoxification du milieu pollué, quelle que soit la concentration de l'inoculum. Ce dernier aspect pourrait indiquer des aptitudes métaboliques spécifiques qu'il s'agira de déterminer.

Après 30 jours d'incubation, la DO remonte pour toutes les dilutions, par rapport au 14^{ème} jour d'incubation, ainsi que pour le témoin stérile. Le pH suit le même profil de hausse, indiqué par le changement de couleur des milieux de culture. Ce cas de figure n'a pas été signalé, probablement parce que les études cinétiques rapportées n'ont pas été menées sur des temps d'incubation aussi longs que les nôtres [11]. La situation observée dans nos cultures au bout de 30 jours d'incubation pourrait s'expliquer par la production de métabolites dérivés du *m*-crésol qui absorbent à la même longueur d'onde. D'autant que le milieu abiotique ne change pas significativement de pH et garde donc sa couleur d'origine, ce qui indiquerait la préservation de l'essentiel de la concentration du *m*-crésol initial. L'analyse en cours de

l'ensemble des cultures résiduelles apportera la réponse à cette situation.

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

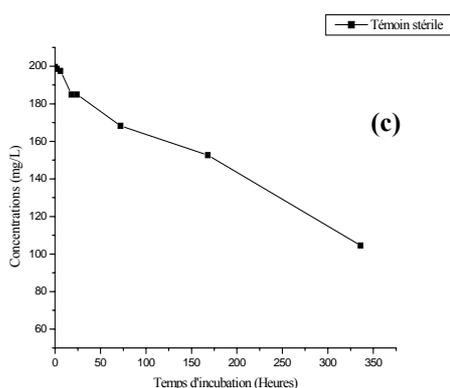
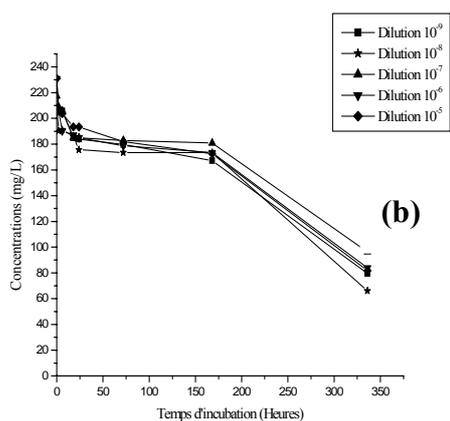
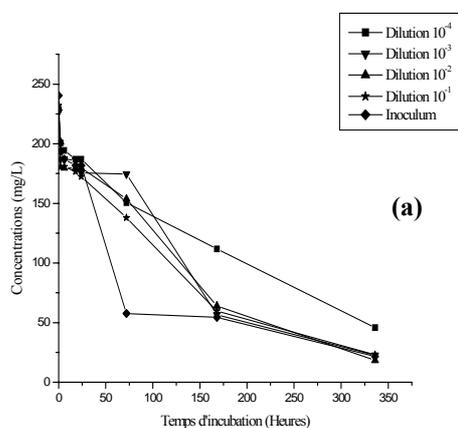


Figure 1 : Cinétiques de biodegradation du *m*-crésol après 14 jours d'incubation.

(a) : Inoculum et ses dilutions jusqu'à 10⁻⁴, (b) : Dilutions de 10⁻⁵ jusqu'à 10⁻⁹, (c) : Témoin stérile.

III-4- Isolement et purification des microorganismes

L'isolement des bactéries dominantes a donné des colonies bactériennes de 6 types macroscopiques différents.

L'observation microscopique à l'état frais et la coloration de Gram révèlent que toutes les souches sont à Gram négatif, 5 d'entre elles étant des coques et une seule se présentant sous forme bacillaire. La culture de cette dernière souche montre qu'elle est pigmentée en vert et que son pigment est diffusible, puisqu'il a fini par colorer toute la gélose. Le type respiratoire des 6 souches est aérobie microaérophile. Toutes les souches sont oxydase positive et catalase positive. Par ce profil, nos résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs qui ont utilisé des souches des genres : *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Bacillus* [4, 5, 7].

L'identification en cours de nos souches déterminera les espèces bactériennes responsables de la biodégradation du *m*-crésol dans la station d'épuration de la ville de CONSTANTINE.

CONCLUSION

Le *m*-crésol est dégradé par le microbiote total des eaux usées prélevées d'une station d'épuration de la ville de CONSTANTINE. La presque totalité de sa concentration initiale est décomposée au bout de 14 jours d'incubation. Cependant une dégradation par voies abiotiques est constatée durant la même période d'incubation. Mais selon un profil nettement différent, à la fois plus faible et plus long que celui de la biodégradation. L'étude statistique montre que la différence entre les deux processus de dégradation est très significative. Notre étude, menée sur une période bien plus longue que les études comparables rapportées dans la littérature [11, 13, 14], montre que La DO et le pH remontent après 30 jours d'incubation. Cette situation pourrait résulter de l'apparition de métabolites dérivés du *m*-crésol, dont l'analyse par HPLC est en cours. L'isolement des microorganismes dominants a permis de sélectionner 6 souches bactériennes à Gram négatif, aérobies microaérophiles, oxydase positive et catalase positive. L'identification en cours de nos souches déterminera les espèces bactériennes impliquées dans la biodégradation du *m*-crésol.

REFERENCES

- [1]- Aleksieva Z., Ivanova D., Godjevargova T., Atanasov B. "Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57". *Process Biochem.*, **37**, (2002), pp. 1215-1219.
- [2]- Allsop P.J., Chisti Y., Moo-Yong M., Sullivan G.R. "Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*". *Biotechnol Bioeng.*, **41**, (1993), pp. 572-580.
- [3]- Anonyme. « La biodégradabilité des effluents urbains ». *Memotec.*, N°19, (2006).
- [4]- Bai J., Wen J.P., Li H.M., Jiang Y. "Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and *m*-cresol using *Alcaligenes faecalis*". *Process Biochem.*, **42**, (2007), pp. 510-517.
- [5]- Bayly R.C., Dagley S., Gibson D.T. "The metabolism of cresols by species of *Pseudomonas*". *Biochem J.*, **101**, (1966), pp. 293-301.
- [6]- Bousseboua H. « Eléments de microbiologie ». Campus-Club, Algérie, (2^{ème} Ed.), (2005), pp.179-199.
- [7]- Buswell J.A. "Metabolism of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*." *J Bacteriol.*, **124**, (1975), pp. 1077-1083.
- [8]- Faust BC., Holgné J. "Sensitized photooxidation of phenols by fluvic acid in natural waters". *Environ Sci Technol.*, **21**, (1987), pp. 957-964.
- [9]- Gallego A., Fortunato M.S., Foglia J., Rossi S., Gemini V., Gomez L., Gomez C.E., Higa L.E., Korol S.E. "Biodegradation and detoxification of phenolic compounds by pure and mixed indigenous cultures in aerobic reactors". *Int Biodeterio Biodegrad.*, **52**, (2003), pp. 261-267.
- [10]- Goudar C.T., Ganji S.H., Pujar B.G., Strevett K.A. "Substrate inhibition kinetics of phenol biodegradation". *Water Environ Res.*, **72**, (2000), pp. 50-55.
- [11]- Maeda M., Itoh A., Kawase Y. "Kinetics for aerobic biological treatment of *o*-cresol containing wastewaters in slurry bioreactor: biodegradation by utilizing waste activated sludge". *Biochem Eng J.*, **22**, (2005), pp. 97-103.
- [12]- Monteiro A.A.M.G., Boaventura R.A.R., Rodrigues A.E. "Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor". *Biochem Eng J.*, **6**, (2000), pp. 45-49.
- [13]- Ralston J.R., Vela G.R. "Medium of detecting phenol degrading bacteria". *J Appl Bacteriol.*, **37**, (1974), pp. 347-351.
- [14]- Rodier J. « L'analyse de l'eau naturelle ». Dunod, Paris (8^{ème} Ed), (2005), pp. 535-540.
- [15]- Shimp R.J., Pfaender F.K. "Effect of adaptation to phenol on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic microbial communities". *Appl Environ Microbiol.*, **53**, (1987), pp. 1496-1499.
- [16]- Sikkema J., Bont J.A.M., Poolman B. "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons". *Microbiol Rev.*, **59**, (1995), pp. 201-22.
- [17]- Smolenski WJ., Suflita JM. "Biodegradation of cresol isomers in anoxic aquifers". *Appl Environ Microbiol.*, **58**, (1987), pp. 710-716.
- [18]- Wang S.J., Loh K.C. "Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation". *Enzyme Microb Tech.*, **25**, (1999), pp. 177-184.
- [19]- Watanabe K., Teramoto M., Futamata H., Harayama S. "Molecular detection, isolation and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge". *Appl Environ Microbiol.*, **64**, (1998), pp. 4396-4402.