

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

Université de BLIDA -1-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie et d'Agroécologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention de Diplôme de Master 2 en Biotechnologie

Option : Biotechnologie Microbienne

**Communautés bactériennes dans la rhizosphère des roseaux d'oued
Nador (Tipaza)**

Réalisé par :

SLIMANE Riadh

Devant le jury composé de :

Président :	Mr BENCHABENE M.	Professeur	Université BLIDA -1-
Examinatrice :	Mme BENOUSAID N.	MCB	Université BLIDA -1-
Promotrice :	Mme AMMAD F.	MCA	Université BLIDA -1-

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciement

En premier lieu, je voudrais remercier **ALLAH**, le tout puissant qui m'a donné la santé et la patience pour terminer ce mémoire.

Je tiens à remercier ma promotrice Mme **AMMAD F.** pour tous ses précieux conseils, pour son écoute active, sa disponibilité et ses encouragements pour finir la totalité du mémoire en si peu de temps, ce n'a pas été facile, et je n'aurais pas tant réussi si je n'avais pas reçu ses orientations.

Mes remerciements sont aussi adressés aux membres de jury,

Mr **BENCHABEN M.** pour l'honneur qu'elle m'a fait pour présider de jury.

Mme **BENOUSAID N.** pour avoir acceptée d'examiner ce modeste travail.

Je remercie également Mme **BELARBI Ihcène**, ingénieure de laboratoire pédagogique PFE au département de Biotechnologie et Agroécologie. Pour son aide, et son accueil chaleureux.

J'adresse mes plus sincères remerciements pour l'ensemble des enseignants de l'option Biotechnologie Microbienne pour leurs efforts tout au long des années d'études.

Dédicaces

Avec joie, fierté et respect, je dédie ce mémoire à mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi et m'ont toujours encouragé à m'améliorer.

A mes chers frères Yassine et Adel

Et à tous mes amis que j'ai rencontrés durant mon parcours scolaire, en particulier Chaima, pour m'avoir aidé et encouragé à atteindre ce niveau académique.

Je ne terminerai pas sans mentionner mes collègues de l'Agence Nationale des Déchets, en particulier mes membres d'équipe " Ilyés, Chakib, Ayoub et Ibtissem ".

RIADH

Résumé

Communautés bactériennes dans la rhizosphère des roseaux d'oued Nador (Tipaza)

La rhizosphère des plantes notamment les roseaux jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre du sol et leur milieu de vie, grâce à ses relations avec plusieurs bactéries. Il y a celles qui ont montré leur capacité à favoriser la croissance des plantes par la décomposition des nutriments complexe et dans le même temps les plantes à son tour offrent de l'oxygène et un milieu favorable aux bactéries pour leur croissance. Nous nous sommes intéressés dans notre travail d'identifier des genres suivants : *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium* qu'ont montrés leur potentiel d'être des outils de la biorémédiation, nous avons isolé ces derniers à partir de la rhizosphère des roseaux *Arundo donax* d'oued Nador (Tipaza) au niveau de trois zones différentes. Une caractérisation morphologique et biochimique a eu lieu. Les résultats de l'identification obtenus ont montré la présence des genres suivants : *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium*, le premier genre est un Gram négatif, et les deux derniers sont des Grams positifs, les trois genres sont mobiles, *Pseudomonas* et *Bacillus* ont les catalases + et mannitol +, sauf pour un isolat de genre *Bacillus* qui a montré un mannitol -. Par contre *Clostridium* a montré une catalase - et mannitol +.

Mots-clés : Eaux usées, Biorémédiation, Phytoépuration, *Arundo donax*, Bactéries dépolluantes.

Abstract

Bacterial communities in the rhizosphere of reeds of oued Nador (Tipaza)

The rhizosphere of plants especially reeds, plays an important role in maintaining the balance of the soil and their living environment, due to its relationship with several bacteria. There are those that have shown their ability to promote plant growth through the decomposition of complex nutrients and at the same time the plants in turn offers oxygen and a favorable environment for bacteria to grow. We were interested in our work to identify the following genera: *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Clostridium* that showed their potential to be tools of bioremediation, we have isolated these genera from the rhizosphere of reeds *Arundo donax* of wadi Nador (Tipaza) in three different areas: a morphological and biochemical characterization have taken place. The results obtained showed the presence of the following genera: *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Clostridium*, the first genus is a Gram negative, and the last two are Gram positive, the three genera are mobile, *Pseudomonas* and *Bacillus* have catalase + and mannitol +, except for an isolate of genus *Bacillus* shows a mannitol -. On the other hand, *Clostridium*, catalase - and mannitol +.

Keywords: Wastewater, Bioremediation, Phyto-purification, *Arundo donax*, Depolluting bacteria.

ملخص

التجمعات البكتيرية في منطقة جذور القصب في واد الناظور (تبيازة)

يلعب غلاف جذور النباتات وخاصة القصب، دورًا مهمًا في الحفاظ على توازن التربة والبيئة المعيشية المحيطة بها، نظرًا لعلاقتها بالعديد من البكتيريا. هناك بكتيريا من أظهرت قدرتهم على تعزيز نمو النبات من خلال تحليل العناصر الغذائية المعقدة، وفي الوقت نفسه، النباتات بدورها توفر الأكسجين وبيئة الملائمة لنمو البكتيريا. في عملنا كنا مهتمين بالتعرف على الأجناس التالية: *Clostridium* و *Bacillus*، *Pseudomonas* التي أظهرت قدرتها على أن تكون أدوات للمعالجة الحيوية، قمنا بعزلها من منطقة جذور القصب صنف *Arundo donax* في وادي الناظور (تبيازة) على مستوى ثلاث مناطق مختلفة، تم القيام بعدد من التحاليل البكتريولوجية بهدف تحديد المواصفات مورفولوجي وكيميائي حيوي الخاصة بهذه الأجناس البكتيرية المهتمين بها. حيث أظهرت نتائج التحاليل التي تم الحصول عليها وجود الأجناس التالية؛ *Clostridium* و *Bacillus*، *Pseudomonas*، الجنس الأول يتمثل في Gram سالب، أما بنسبة للجنسين الآخرين Gram موجب، أيضا الأجناس الثلاثة أظهرت قدرتها على التحرك، وكذا الجنس *Pseudomonas* و *Bacillus* أعطوا نتائج متمثلة في الكاتالز + والمانيتول +، باستثناء عزلة من جنس *Bacillus* يظهر مانيتول -. من ناحية أخرى *Clostridium* أعطى الكاتالز - والمانيتول +.

الكلمات الدالة: المياه المستعملة، المعالجة البيولوجية، التنقية النباتية، *Arundo donax*، البكتيريا المطهرة.

Liste des Abréviations

ASR	Anaérobies sulfito-réductrices
DBO	Demande biochimique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
GA	Gélose à amidon
GS	Gélose au sang
GC	Gélose au cétrimide
SSF	Marais à écoulement sous-surface
SF	Marais artificiels à écoulement de surface
MES	Matières en suspension
pH	Potentiel hydrogène
STEP	Station d'épuration
VFSF	Viande foie sulfite de fer

Liste des figures

Figure 01	Filtre à flux horizontal de surface.	28
Figure 02	Filtre à flux horizontal de sous-surface.	28
Figure 03	Image satellitaire représente la zone de l'échantillonnage, le point du rejet d'oued Nador dans la mer et le point de rejet de la station de traitement des eaux usées de Chenoua – Tipaza (STEP).	35
Figure 04	Aspect des colonies de <i>Pseudomonas</i> sur Gélose au cétrimide (Image (A) les colonies sous une lumière normale et image (B) les colonies sous la lumière ultraviolette).	41
Figure 05	Aspect des colonies de <i>Bacillus</i> des trois échantillons sur Gélose à amidon.	42
Figure 06	Les résultats des spores de <i>Clostridium</i> des trois échantillons sur milieu VFSF.	43
Figure 07	Aspect des colonies du <i>Clostridium</i> des échantillons 01 et 02 sur Gélose au sang.	43
Figure 08	Forme et mode de regroupement de l'isolat de genre <i>Pseudomonas</i> après coloration de Gram (G : x100).	44
Figure 09	Forme de l'isolat de genre <i>Bacillus</i> après coloration de Gram (G : x100).	44
Figure 10	Forme de l'isolat de genre <i>Clostridium</i> après coloration de Gram (G : x100).	45
Figure 11	Test de catalase pour les isolats de <i>Pseudomonas</i> pour les trois échantillons.	46
Figure 12	Test de catalase pour les isolats de <i>Bacillus</i> pour les trois échantillons.	46
Figure 13	Test de catalase pour les isolats de <i>Clostridium</i> pour l'échantillon 01 et 02.	47
Figure 14	Résultats du test mannitol-mobilité-nitrate des isolats de <i>Pseudomonas</i> pour les trois échantillons.	47
Figure 15	Résultats du test mannitol-mobilité-nitrate des isolats de <i>Bacillus</i> pour les trois échantillons.	48
Figure 16	Résultats du test mannitol-mobilité-nitrate des isolats du <i>Clostridium</i> pour échantillons 01 et 02.	49

Liste des tableaux

Tableau 01	Germes pathogènes rencontrés fréquemment dans les eaux usées et effet sur la santé humaine	21
Tableau 02	Normes de rejet des eaux usées dans un milieu récepteur (valeurs limites).	22

Table des matières

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	14
PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
Généralités	
1. Les eaux usées	17
1.1. Définition	17
1.2. Origine et nature des eaux usées	17
1.2.1. Les eaux usées domestiques	17
1.2.2. Les eaux usées industrielle	17
1.2.3. Les eaux usées agricoles	17
1.3. Les paramètres des eaux usées	18
1.3.1. Paramètres Organoleptiques	18
1.3.1.1. Couleur	18
1.3.1.2. Odeur	18
1.3.2. Paramètres physiques	18
1.3.2.1. Température	18
1.3.2.2. Matières en suspension (MES)	18
1.3.3. Paramètres chimiques	18
1.3.3.1. Potentiel hydrogène (pH)	18
1.3.3.2. Conductivité électrique (CE)	19
1.3.3.3. L'oxygène dissous	19
1.3.3.4. Demande biochimique en oxygène (DBO)	19
1.3.3.5. Demande chimique en oxygène (DCO)	20
1.3.3.6. Azote	20
1.3.3.7. Phosphore	20
1.3.3.8. Nitrates	20
1.3.3.9. Métaux lourds	21
1.3.4. Les microorganismes	21
1.3.4.1. Les bactéries	21

1.3.4.2. Les virus	21
1.4. Normes nationales de rejets des eaux usées	22
1.5. L'épuration des eaux usées	22
1.5.1. Les procédés classiques de traitement des eaux usées	23
1.5.1.1. Le traitement physique	23
1.5.1.2. Traitement physico-chimique	23
1.5.1.3. Traitement biologiques	24
2. La phytoépuration	25
2.1. Généralité sur la phytoépuration	25
2.2. Définition de La phytoépuration	25
2.3. Les composantes d'un marais artificiel	26
2.3.1. La végétation	26
2.3.2. Les micro-organismes	26
2.3.3. Les animaux	27
2.4. Les types de marais artificiels	27
2.4.1. Bassin à écoulement en surface	27
2.4.2. Bassin à écoulement sous-surface	28
2.4.3. Systèmes hybrides	29
2.5. Principe de fonctionnement les filtres plantés de roseaux	29
2.6. Rôle des macrophytes	29
2.7. Rôle des micro-organismes	30
2.7.1. Chez le genre <i>Pseudomonas</i>	30
2.7.2. Chez le genre <i>Bacillus</i>	31
2.7.3. Chez le genre <i>Clostridium</i>	32
2.8. La phytoépuration en Algérie	32

PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE

1. Objectif	34
2. Région d'étude	34
3. Milieux de culture	34
4. Matériel biologique	35
5. Méthodes	35
5.1. Échantillonnage	35
5.2. Préparation des suspensions mères	36
5.3. Les dilutions décimales	36
5.4. Isolement et purification des souches bactérienne	36

5.4.1. <i>Pseudomonas</i>	36
5.4.2. <i>Bacillus</i>	36
5.4.3. <i>Clostridium</i>	36
5.5. Identification des souches	37
5.5.1. Observation macroscopique	37
5.5.2. Observation microscopique	38
5.5.3. Tests biochimiques	38
5.5.3.1. Test catalase	38
5.5.3.2. Test mannitol-mobilité	39

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1. Identification des souches	41
1.1. Observation macroscopique	41
1.1.1. <i>Pseudomonas</i>	41
1.1.2. <i>Bacillus</i>	41
1.1.3. <i>Clostridium</i>	42
1.2. Observation microscopique (coloration de Gram)	43
1.2.1. <i>Pseudomonas</i>	43
1.2.2. <i>Bacillus</i>	44
1.2.3. <i>Clostridium</i>	45
1.3. Tests chimiques	45
1.3.1. Test de catalase	45
1.3.1.1. <i>Pseudomonas</i>	45
1.3.1.2. <i>Bacillus</i>	46
1.3.1.3. <i>Clostridium</i>	46
1.3.2. Test mannitol – mobilité nitrate	47
1.3.2.1. <i>Pseudomonas</i>	47
1.3.2.2. <i>Bacillus</i>	48
1.3.2.3. <i>Clostridium</i>	48
DISCUSSION	51
CONCLUSION	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	57
ANNEXES	

Introduction

Introduction

Il y a plusieurs millions d'années, l'eau est apparue avec la première forme de vie. Chaque année, l'eau des ressources naturelles se raréfie. Elle est considérée comme un facteur de développement de l'humanité. La protection de l'eau passe par la valorisation et le développement de ses ressources utilisables pour préserver les équilibres naturels qui constitue l'intérêt général pour la plupart des pays du monde.

Les eaux usées sont des effluents constituent une menace pour la santé de la population et jouent également un rôle dans la contamination des eaux de surface et souterraines (WHO 2011). Ainsi le rejet direct des effluents secondaires des stations d'épuration des eaux usées dans l'environnement pose de sérieux problèmes en raison de la richesse de ces effluents en éléments toxiques et dangereux (Lavoie et De la Noüe, 1985). Les eaux usées sont fréquemment collectées en Algérie et elles subissent un traitement au niveau des stations d'épuration, ce qui constitue un avantage qu'il convient de les valoriser.

Le traitement des effluents avant leur rejet dans le milieu récepteur, notamment dans la mer et l'oued, n'a pas été sérieusement pris en considération, la gestion de l'environnement et la situation des effluents liquides urbains constituent une sérieuse problématique aujourd'hui. Par conséquent, une croissance socio-économique durable accorde une grande importance à la protection de l'environnement. Un axe majeur est la collecte, l'élimination et le traitement des eaux usées.

Parmi les méthodes utilisées récemment pour le traitement des eaux usées c'est la phytoépuration qui se développe dans des nombreux pays développés ou en voie de développement. La phytoépuration est un système de traitement des eaux polluées par utilisation de pouvoir épurateur des plantes (microphytes et/ou des macrophytes). Les macrophytes plus spécifiquement les roseaux (*Phragmites australis*) sont capables de former des tissus racinaires pour fournir l'oxygène et agir comme un support pour les bactéries aérobies. Ces bactéries jouent un rôle dans la décomposition et la minéralisation les composants des eaux usées et deviennent assimilables par les plantes (Medjdoub, 2014). En raison de cette capacité, des systèmes de traitement des eaux usées sont construit sous le nom des marais artificiels. Selon des recherches précédentes (Dong et al., 2010 ; Bai et al., 2014 ; Xiao et al., 2020) ces derniers sont généralement créés pour améliorer la qualité des eaux usées en utilisant des processus biogéochimiques naturels médités par des micro-organismes spécialisés du sol.

L'objectif de notre étude vise

- L'isolement de trois genres bactériens à partir de la rhizosphère *d'Arundo donax* au niveau d'oued Nador Tipaza.
- Identifier ces genres à travers une caractérisation microbiologique (macroscopique, microscopique et biochimiques).

Partie I : Synthèse bibliographique

Généralités

1. Les eaux usées

1.1. Définition

Les eaux usées sont le résultat du rejet de différents polluants dans le système d'eau. Ces eaux usées sont très dangereuses pour les êtres vivants et l'écosystème, elles ont des caractéristiques différentes à cela de l'eau fraîche (non polluée) : Le couleur, la turbidité, les mauvaises odeurs, de matières solides en suspension, taux très élevé des métaux lourds, de substances inorganiques et des micro-organismes (WHO 2011).

Toutes ces différences et changement dans les paramètres conduisent à la pollution de l'eau.

1.2. Origine et nature des eaux usées

1.2.1. Les eaux usées domestiques

Elles proviennent des différents usages domestiques de l'eau. Elles sont constituées essentiellement d'excréments humains, des eaux ménagères chargées de matières organiques azotées, phosphatées et de germes fécaux appelées eaux noires (Metahri, 2012).

1.2.2. Les eaux usées industrielle

Selon Metahri. (2012), Elles sont très différentes des eaux usées domestiques. Leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre. En plus des matières organiques, azotées ou phosphorées, elles sont chargées en différentes substances chimiques organiques et métalliques.

1.2.3. Les eaux usées agricoles

Les eaux agricoles L'agriculture est une source de pollution des eaux non négligeable car elle apporte les engrais et les pesticides. Elle est la cause essentielle des pollutions diffuses. Les eaux agricoles issues de terres cultivées chargés d'engrais nitrates et phosphatés, sous une forme ionique ou en quantité telle, qu'ils ne seraient pas finalement retenus par le sol et assimilés par les plantes, conduisent par ruissellement à un enrichissement en matières azotées ou phosphatées des nappes les plus superficielles et des eaux des cours d'eau ou des retenues (Metahri, 2012).

1.3. Les paramètres des eaux usées

1.3.1. Paramètres Organoleptiques

1.3.1.1. Couleur

L'un des paramètres les plus importants de la qualité de l'eau est la couleur. Les eaux usées fraîches sont généralement grises, mais après une longue période, elles deviennent invariablement noires en raison de la dégradation bactérienne dans des conditions anaérobies (Cai et *al.*, 2020).

1.3.1.2. Odeur

La population est de plus en plus préoccupée, la détermination des odeurs devient de plus en plus cruciale. Au cours de la décomposition des matières organiques, les odeurs sont généralement produites par des gaz (Xu et *al.*, 2019).

1.3.2. Paramètres physiques

1.3.2.1. Température

La température des eaux usées est toujours supérieure à celle de l'eau douce en raison de l'action des bactéries aérobies, qui réduisent la présence d'oxygène et augmentent ainsi la température de l'eau (Smith et *al.*, 2018), Bien que d'autres éléments soient à l'origine des variations de température, comme les saisons et la situation géographique (Bolzonella et *al.*, 2019).

La température est un facteur écologique important des milieux aqueux. Son élévation peut perturber fortement la vie aquatique (pollution thermique). Elle joue un rôle important dans la nitrification et la dénitrification biologique. La nitrification est optimale pour des températures variant de 28 à 32°C par contre, elle est fortement diminuée pour des températures de 12 à 15°C et elle s'arrête pour des températures inférieures à 5°C (Metahri, 2012).

1.3.2.2. Matières en suspension (MES)

Selon Medjdoub. (2014), les matières en suspension sont des matières insolubles, fines, minérales ou organiques, biodégradables ou non. Leur principal effet est de troubler l'eau.

1.3.3. Paramètres chimiques

1.3.3.1. Potentiel hydrogène (pH)

Le potentiel hydrogène (pH) d'une solution correspond à son activité en ions hydrogène ou c'est la mesure de la basicité ou de l'acidité d'une masse d'eau ou d'une solution à une température donnée (Okon et *al.*, 2020).

Les organismes sont très sensibles aux variations du pH, et un développement correct de la faune et de la flore aquatique n'est possible que si sa valeur est comprise entre 6 et 9. L'influence du pH se fait également ressentir par le rôle qu'il exerce sur les autres éléments comme les ions des métaux dont il peut diminuer ou augmenter leur mobilité en solution biodisponible et donc leur toxicité. Le pH joue un rôle important dans l'épuration d'un effluent et le développement bactérien. La nitrification optimale ne se fait qu'à des valeurs de pH comprises entre 7,5 et 9 (Metahri, 2012).

1.3.3.2. Conductivité électrique (CE)

La capacité de l'eau à transporter le courant électrique dans une solution aqueuse est mesurée par sa conductivité. L'unité de mesure est les microsiemens par centimètre (s/cm), la conductivité de l'eau distillée se situerait entre 0,5 et 3 s/cm (Halim et *al.*, 2018).

1.3.3.3. L'oxygène dissous

Il s'agit de la mesure de la quantité d'oxygène présente dans un échantillon d'eau ou d'eaux usées au moment du prélèvement. L'oxygène est nécessaire à la respiration des espèces aquatiques (Ma et *al.*, 2020). L'oxygène dissous pénètre dans le système aquatique en tant que sous-produit de diffusion atmosphérique et au cours des processus de la photosynthèse des plantes ou des algues. Lorsque la croissance des algues est excessive, l'eau devient sursaturée en oxygène dissous, ce qui entraîne un taux de diffusion de l'oxygène dans l'atmosphère inférieur à celui de la photosynthèse. Si les niveaux d'oxygène dissous tombent trop bas, les espèces aquatiques meurent car ils sont incapables de remplacer l'oxygène qu'ils consomment par décomposition et respiration (Halim et *al.*, 2018).

1.3.3.4. Demande biochimique en oxygène (DBO)

La demande biochimique en oxygène est la quantité d'oxygène nécessaire aux micro-organismes pendant la décomposition d'une substance organique qui sont trouvées dans l'eau ou les eaux usées (Ma et *al.*, 2020). Bien qu'elle contribue à la détermination des matières organiques instables, elle prend beaucoup plus de temps que la demande chimique en oxygène (Ajayi et *al.*, 2016). Une valeur de DBO plus élevée est due à une surabondance de matières organiques dans l'eau (Ustaoğlu et *al.*, 2020).

La demande biochimique en oxygène après 5 jours (DBO5) correspond à la quantité de dioxygène nécessaire aux micro-organismes aérobies de l'eau pour oxyder les matières organiques, dissoutes ou en suspension dans l'eau (Medjdoub, 2014).

1.3.3.5. Demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène (DCO) est une autre mesure de la concentration de matières organiques (et partiellement inorganiques) contenues dans une eau. Mesurée après oxydation chimique intense, elle représente la concentration d'oxygène nécessaire à l'oxydation de la totalité des matières organiques (Medjdoub, 2014). Selon Metahri. (2012), généralement la valeur de la DCO est :

DCO = 1.5 à 2 fois DBO Pour les eaux usées urbaines ;

DCO = 1 à 10 fois DBO Pour tout l'ensemble des eaux résiduaires ;

DCO > 2.5 fois DBO Pour les eaux usées industrielles.

1.3.3.6. Azote

L'azote est un élément nutritif essentiel pour la croissance des plantes. Les déchets d'animaux et les engrais azotés sont les sources les plus courantes d'azote, bien que d'autres sources comprennent les dépôts atmosphériques et les systèmes septiques. L'augmentation de la concentration d'azote dans l'eau peut entraîner une prolifération d'algues, ce qui réduit la teneur en oxygène de l'eau, suit à cela les animaux aquatiques tels que les poissons peuvent être tuant ou blessant et conduite à la pollution de l'eau (Nadarajan et Stalin, 2021).

1.3.3.7. Phosphore

Le phosphore est autre un élément essentiel à la vie des plantes et se trouve sous formes de poly-phosphates, de phosphore organique et d'ortho-phosphates. Les deux premières formes sont hydrolysées en ortho phosphates par l'action des micro-organismes (Medjdoub, 2014). Le phosphore peut provenir des engrais, des déchets animaux et des détergents phosphatés. Lorsque les niveaux de phosphore sont élevés, l'orthophosphate affecte la qualité de l'eau en augmentant la croissance des algues et en diminuant le volume d'oxygène nécessaire aux animaux aquatiques, ce qui peut entraîner leur mort et la pollution de l'eau (Wurtsbaugh et *al.*, 2019).

1.3.3.8. Nitrates

Le composant de base des engrais azotés, le nitrate, On le trouve sous forme de nitrite (NO₂), d'azote (N₂), d'oxyde d'azote (N₂O) et d'azote organique. Tous ces nutriments

Synthèse Bibliographique

synthétiques enrichissent la teneur en azote dissous des masses d'eau, ce qui entraîne des effets néfastes (Nadarajan et Stalin, 2021).

1.3.3.9. Métaux lourds

Les éléments nocifs les plus importants sont les métaux lourds. Leur principale origine est industrielle. Le cuivre, le zinc, le cadmium, le chrome, le plomb, le mercure, le nickel sont les polluants les plus fréquemment rencontrés. (Bachi, 2010).

1.3.4. Les microorganismes

Selon Belaid. (2010), Les eaux usées contiennent tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales. Cette flore entérique normale est accompagnée d'organismes pathogènes. L'ensemble de ces organismes peut être classé en quatre grands groupes :

1.3.4.1. Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus communément rencontrés dans les eaux usées. La concentration en bactéries pathogènes est de l'ordre de 10⁴ germes par litre.

1.3.4.2. Les virus

Les virus sont des parasites intracellulaires obligés qui ne peuvent se multiplier que dans une cellule hôte. On estime leur concentration dans les eaux usées urbaines comprise entre 10³ et 10⁴ particules par litre.

Les germes les plus fréquemment rencontrés sont les salmonelles, les coliformes fécaux, les staphylocoques, les streptocoques... et les helminthes, ils sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 01. Germes pathogènes rencontrés fréquemment dans les eaux usées et effet sur la santé humaine (Bachi, 2010).

Germes	Organisme	Maladie
Bactéries pathogènes	Salmonelles	Typhoïde
	Shigelles	Dysenterie
Entérobactéries	Colibacilles	Tuberculose
	Leptospires	
	Mycobactéries	
Vibrions	Vibrio coma	Choléra
Virus	Entérovirus	Poliomyélite

Synthèse Bibliographique

	Réovirus	Méningite
	Adénovirus	Affections respiratoires
	Rotavirus	Diarhées
Parasites	Taenia	Cysticercoses
Champignons	-	Eczémas, maladies de la peau

1.4. Normes nationales de rejets des eaux usées

Les exigences algériennes en matière de rejet des effluents d'eaux usées collectés dans les réseaux urbains ou des eaux usées directement rejetées par l'industrie ne permettent de les rejeter dans un milieu récepteur naturel (rivière et rivage marin) que si elles répondent aux normes réglementaires. Les normes de rejets sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Normes de rejet des eaux usées dans un milieu récepteur (valeurs limites) (source : Journal Officiel de la République Algérienne, Décret exécutif n° 06-141 du 19 avril 2006 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels.).

Paramètres	Valeur limites
Température	30°C
pH	6,5 – 8,5
MES	35 mg /l
Azote	30 mg /l
Phosphore total	10 mg /l
DCO	120 mg /l
DBO	35 g/l

1.5. L'épuration des eaux usées

Selon Bakiri. (2007), le traitement des eaux usées a pour fonction de les transformer en eau potable. Alors que l'assainissement des eaux usées a pour objectif de collecter puis d'épurer les eaux polluées avant leur rejet. Toutefois, le terme « traitement » est généralement employé pour désigner l'opération d'assainissement. D'autre côté, le terme épurer signifie « rendre pur » tandis que la définition de purifier est « débarrasser des impuretés ». Quand on

parle d'épuration des eaux résiduaires, il n'est pourtant pas question de les rendre pures, mais plutôt d'en retirer le plus de déchets possibles avant de les évacuer.

1.5.1. Les procédés classiques de traitement des eaux usées

Les stations d'épuration des eaux usées sont des installations compactes qui passent par les processus suivants pour traiter les eaux usées :

1.5.1.1. Le traitement physique

Le prétraitement physique est un ensemble d'activités visant à éliminer la fraction la plus grossière des éléments entraînés dans l'effluent et à éliminer les particules susceptibles d'interférer avec les traitements ultérieurs. Les étapes de cette procédure sont les suivantes :

- **Le dégrillage :**

Cette opération préliminaire et indispensable au niveau de toutes les stations, permet de retenir les matières solides contenues dans l'eau usée. Les refus de grilles sont généralement éliminés avec les ordures ménagères (Saggai, 2004).

- **La dilacération :**

Cette opération a pour but de broyer les matières solides et de les transformer en particules plus fines qui sont envoyées vers les décanteurs (Bachi, 2010).

- **Le tamisage :**

Selon Bachi. (2010), Cette opération constitue un dégrillage fin. Elle est mise en œuvre dans le cas d'eaux résiduaires chargées de matières en suspension de petite taille.

- **Le dessablage – dégraissage :**

Le dégraissage permet d'éliminer les particules légères (graisses, huiles etc.) par flottation (Saggai, 2004).

1.5.1.2. Traitement physico-chimique

Selon Bachi. (2010), Il s'agit le plus souvent d'une décantation qui permet d'éliminer les matières en suspension décantables en deux heures. L'utilisation des réactifs chimiques pour éliminer des particules plus fines, constitue un traitement physico-chimique. Ce traitement permet donc essentiellement l'élimination de la pollution particulaire et d'une partie de la pollution organique sous forme particulaire. Cependant, cette élimination est insuffisante pour répondre aux nouvelles normes internationales de rejet (arrêté du 22 Déc. 1994) et il faudra compléter ce traitement par un traitement secondaire.

1.5.1.3. Traitement biologique

Le traitement biologique des eaux usées est une technique qui nécessite l'utilisation d'organismes vivants. De nombreux organismes biologiques sont impliqués dans le processus. Ces organismes aident à la décomposition des substances organiques ainsi qu'à l'assimilation de certains éléments toxiques. Nous mentionnons les différentes méthodes de traitement biologique suivantes :

- **Les stations par boues activées**

Selon Saggai. (2004), Les stations par boues activées (très riche en micro-organismes ayant besoin d'oxygène pour vivre) reposent sur les principes suivants :

- L'eau à épurer est mise en contact dans le bassin d'activation avec une culture bactérienne importante ;
- De l'oxygène est fourni à travers un dispositif d'aération ;
- Un brassage de la culture bactérienne est effectué ;
- La séparation de la culture bactérienne (boue) et de l'eau épurée se fait dans un bassin de décantation dit clarificateur ;
- La boue est soit recirculée, soit extraite : ce sont les « les boues en excès ».

- **Filtres plantés (jardin filtrant)**

Selon Metahri. (2012), Le sol et les rivières, ont été depuis toujours le réceptacle naturel de la pollution engendrée par l'activité humaine. Les techniques sophistiquées actuellement mises en œuvre dans les stations d'épuration des eaux résiduaires urbaines, ne constituent qu'une optimisation de l'autoépuration naturelle qui s'exerce dans ces deux milieux.

Plusieurs chercheurs proposent une épuration par les procédés de type extensif qui sont des systèmes d'épuration d'eaux usées par voie naturelle (ou zones humides artificielles), dont le plus connu est le lagunage à microphytes et à macrophytes. Ce système est expérimenté depuis la première moitié du siècle sous climat tempéré et présente de nombreuses possibilités d'adaptation au climat des pays en développement. Ces stations d'épuration par voie naturelle sont nombreuses, mais elles ne sont pas souvent connues du grand public. Leur principe de fonctionnement s'inspire de celui des écosystèmes rencontrés dans les zones humides naturelles. L'épuration peut s'opérer sur de grande surface de terrains sableux de granulométrie fine (0.2 à 0.5mm de diamètre) et sur des surfaces (Metahri, 2012). Dans ce système le végétale intervient par son système racinaire, qui joue un double rôle : l'enrichissement de la rhizosphère en oxygène (stimule l'activité de la microflore aérobiques)

et assimile en même temps certains éléments minéraux classé toxique et ou indésirable dans le milieu naturelle (Saggai, 2004).

- **Les lits bactériens**

Le principe de la méthode consiste à créer un sol artificiel beaucoup mieux adapté à ce rôle d'épuration, dans lequel les échanges entre l'effluent, l'air et les bactéries sont facilités. Pour cela, on constitue un support neutre, poreux et perméable, sur une hauteur variant de 1,5 mètre à 5 mètres, au moyen de matériaux filtrants, peu onéreux, tels que mâchefers, scories, cokes, pouzzolanes, etc., (selon les possibilités locales) dans des dimensions de quelques centimètres. L'arrosage de ce sol artificiel par l'eau à traiter, fait apparaître en quelques semaines de nombreuses colonies microbiennes aérobies. La bonne aération du lit bactérien ainsi constitué, contribue à l'activité intense de ces colonies et donc à une oxydation suffisamment rapide de l'effluent (Bachi, 2010).

2. La phytoépuration

2.1. Généralité sur la phytoépuration

Dans le traitement des eaux usées, plusieurs approches coûteuses peuvent être utilisées ; il est nécessaire d'avoir recours à des techniques simples et rentables qui préservent les caractéristiques des écosystèmes, comme l'utilisation de la phytoépuration dans le traitement des eaux usées.

La phytoépuration consiste d'avoir des marais filtrants artificiels. Ces derniers parmi la technologie de phytoremediation viable en raison de leur diversité végétale (phytoplancton, hydrophytes et héliophytes) et des zones de mélange anaérobie/aérobie dans les sédiments. Les marais filtrants artificiels est simple à mettre en œuvre dans le paysage et peut aboutir à une élimination efficace de la contamination organique (Lorah et Voytek, 2004).

Les plantes peuvent influencer les capacités de biodégradation de la communauté rhizosphérique de diverses manières, notamment en augmentant la biodisponibilité des polluants, en induisant des activités enzymatiques impliquées dans le processus de dégradation, et/ou en augmentant sélectivement le nombre et l'activité des dégradateurs de polluants (Macek et *al.*, 2000 ; Miya et Firestone, 2001).

2.2. Définition de La phytoépuration

La phytoépuration est le terme donné à une technique d'assainissement écologique qui traite les eaux usées en utilisant le pouvoir épurateur des plantes. Ce système d'assainissement écologique combine un certain nombre de stratégies, chacune d'entre elles tirant parti de

processus naturels, dont une combinaison de plantes et de micro-organismes, dans un système de traitement des eaux usées construit artificiellement. Ainsi, le lagunage est un processus d'épuration basé sur la transformation et l'assimilation naturelles des contaminants domestiques par les chaînes de vie aquatiques (Vincent et Dufour, 2007).

Les macrophytes et plus spécifiquement les roseaux (*Phragmites australis*) ont la particularité de former un tissu racinaire et un réseau de galeries qui drainent apportent de l'oxygène et servent de support aux bactéries aérobies. Ces bactéries, ainsi que le macrofaune du sol, jouent un rôle de dégradation et de minéralisation de la matière organique, qui devient assimilable par les plantes. Ainsi le système ne produit pas des boues, lesquelles sont compostées et forment un humus sur place (Medjdoub, 2014).

2.3. Les composantes d'un marais artificiel

Un marais artificiel construit est constitué d'un bassin bien conçu pour retenir l'eau, d'un substrat (la terre, le sable, le gravier, la roche). Mais éléments clés de ce dernier sont :

2.3.1. La végétation

Les plantes vasculaires (les hautes plantes) et non vasculaires (algues) sont importantes dans les marais artificiels. La photosynthèse par les algues augmente la teneur en oxygène dissous de l'eau, ce qui a une incidence sur les nutriments et les métaux. D'autre côté, Les marais artificiels sont fréquemment plantés de végétation submergée, qui se développe avec son système racinaire dans le substrat et ses tiges et feuilles à la surface de l'eau. Les joncs, les massettes, les roseaux et un nombre d'espèces de feuilles larges sont des plantes émergentes courantes que l'on trouve dans les lits filtrants (Dupoldt et *al.*, 1995).

2.3.2. Les micro-organismes

Selon Dupoldt et *al.* (1995), bactéries, levures, champignons et algues d'écorce sont des micro-organismes qui se trouvent au niveau des marais artificiels. Parmi les caractéristiques fondamentales des marais artificiels qui interfèrent dans le traitement des eaux usées, c'est les fonctions et les métabolismes des micro-organismes :

- La transformation d'un grand nombre de substances organiques et inorganiques en substances inoffensives ou insolubles.
- Modifie les conditions de réduction/oxydation (redox) du substrat, ce qui affecte la capacité de traitement des marais artificiels.
- Intervient dans le recyclage des nutriments.

Certaines réactions microbiennes sont aérobies (c'est-à-dire qu'elles ont besoin d'oxygène libre), tandis que d'autres sont anaérobies (c'est-à-dire qu'elles se produisent sans oxygène). Plusieurs espèces bactériennes sont des anaérobies facultatifs, ce qui signifie qu'elles peuvent fonctionner à la fois dans des conditions aérobies et anaérobies en réponse à conditions environnementales. D'autre part, des produits chimiques toxiques nocifs, tels que les pesticides et les métaux lourds, peuvent affecter la communauté microbienne d'une zone humide artificielle (Dupoldt et *al.*, 1995).

2.3.3. Les animaux

Les zones humides artificielles attirent également des amphibiens, des tortues, des oiseaux et des mammifères, ainsi une gamme variée d'invertébrés tels que les insectes et les vers, qui font partie des processus de traitement en fragmentant les débris et en digérant la matière organique. De nombreuses larves d'insectes sont aquatiques et consomment de grandes quantités de matières pendant leurs stades larvaires, qui peuvent durer plusieurs années. Les invertébrés jouent également divers rôles écologiques ; par exemple, les nymphes de libellules sont des prédateurs essentiels des larves de moustiques. Bien que les invertébrés soient les créatures les plus importantes en termes d'amélioration de la qualité de l'eau (Dupoldt et *al.*, 1995).

2.4. Les types de marais artificiels

Il existe trois types de marais artificiels :

- Les bassins d'écoulement de surface
- Les bassins d'écoulement sous-surface
- Les systèmes hybrides qui combinent les deux :

2.4.1. Bassin à écoulement en surface

Les marais artificiels à écoulement de surface sont généralement appelés SF (surface flow) car les couches de surface sont souvent anaérobies (conditions de saturation permanente et écoulement dans une direction horizontale) Figure 01, avec un type de végétation prédominant de macrophytes flottants qui peuvent être enracinés au fond de l'étang (Fonder et Headley, 2013).

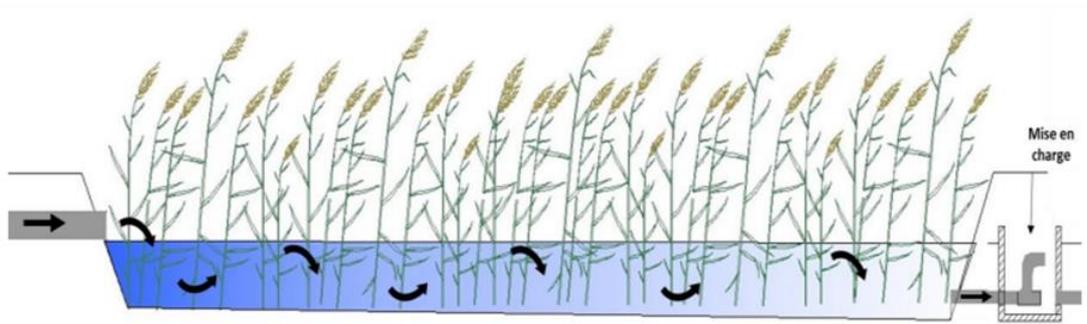


Figure 01 : Filtre à flux horizontal de surface (Hernan, 2017)

Les marais artificiels SF sont également connus sous le nom de marais artificiels de surface à eau libre si elles sont utilisées pour le drainage minier. Les avantages des zones humides SF comprennent leurs faibles dépenses d'investissement et d'exploitation, ainsi que leur facilité d'installation, de gestion et d'entretien. Le principal inconvénient des systèmes SF est qu'ils nécessitent généralement une plus grande superficie que les autres systèmes (Dupoldt et *al.*, 1995).

2.4.2. Bassin à écoulement sous-surface

L'eau pénètre dans la matrice filtrante en un flux horizontal sur toute la longueur du filtre jusqu'à la sortie dans les marais à écoulement **sous-surface** (SSF) (Figure 02). Ces systèmes ont traditionnellement été utilisés pour le traitement des eaux usées communautaires à petite échelle, mais ils sont maintenant employés pour une gamme plus large d'applications, y compris les eaux usées agricoles et industrielles (Vymazal, 2009).

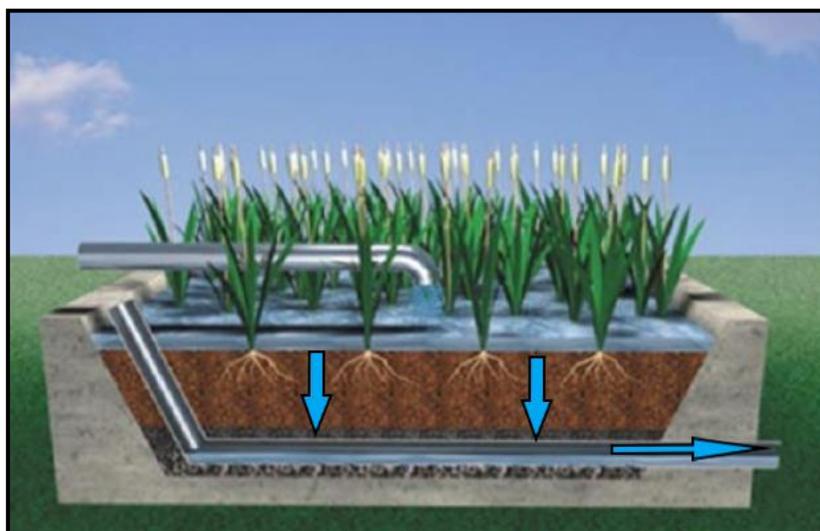


Figure 02 : Filtre à flux horizontal de sous-surface
(Medjdoub, 2014).

2.4.3. Systèmes hybrides

Selon Dupoldt et *al.* (1995), les systèmes à une seule étape exigent que tous les processus d'élimination se déroulent dans le même espace. Dans les systèmes hybrides ou multi-étapes, différentes cellules sont conçues pour différents types de réactions.

2.5. Principe de fonctionnement les filtres plantés de roseaux

L'épuration est réalisée selon le principe de l'épuration biologique majoritairement aérobie dans des milieux granulaires fins à grossiers. Le fonctionnement de ces filtres plantés fait intervenir des réactions épuratoires pouvant être complexes. Mais le principe de base reste l'infiltration d'un effluent brut à travers des lits composés d'un mélange sable-gravier ou de sol en place, plantés de macrophytes (le plus souvent, des roseaux communs). Le matériau du lit et la partie racinaire des plantes servent de support à une biomasse épuratrice (Poulet et *al.*, 2004).

2.6. Rôle des macrophytes

Selon Poulet et *al.* (2004), les macrophytes contribuent indirectement à la décomposition des matières en suspension (MES) dans l'effluent brut :

- La croissance des racines et des rhizomes permet une régulation de la conductivité hydraulique initiale. La faible granulométrie du substrat (sable ou gravier) ainsi que l'apport important de matière organique sont propices au colmatage du filtre. La croissance des parties racinaires limite ces risques en formant des pores tubulaires le long des racines.
- Le développement racinaire accroît la surface de fixation pour le développement des microorganismes et pour des réactions de précipitation. Les tissus racinaires et leurs exsudats constituent vraisemblablement des niches plus accueillantes pour les microorganismes que des substrats minéraux inertes.
- Le rôle du métabolisme des plantes (assimilation des nutriments) affecte plus ou moins le traitement en fonction des surfaces mise en jeu.

Les macrophytes utilisables en phytoépuration se ramènent à deux types principaux : ceux qui sont enracinés au fond de l'eau (phragmite ou typha ...), et ceux qui flottent, leurs racines plongeant librement dans l'eau (Jacinthes ou spirodela ...). Parmi les roseaux les plus utilisés dans la Phytoépuration ont à :

***Arundo donax* (roseau géant) :**

Le roseau géant est considéré comme une culture énergétique prometteuse qui se retrouve du bassin méditerranéen aux zones humides subtropicales, il appartient de la Sous-famille des *Arundinoideae* de la famille des *Gramineae* (*Poaceae*) (Pompeiano et al., 2019).

L'espèce est également connue pour son fort potentiel de phytoremediation (Alshaal et al. 2014). En raison de son capacité de croissance considérable dans différents sols présentant une large gamme de pH, de salinité et de teneur en métaux lourds, le roseau géant a été utilisé ces dernières années pour absorber les métaux lourds et améliorer les sols alcalins salins. (Zhang et al., 2021).

Habitat

Le roseau géant se trouve habituellement le long des berges des rivières, des ruisseaux et généralement sur des sols humides, mais il pousse également avec succès sur des sols relativement secs et infertiles tels que les bords de route (Alshaal et al., 2014).

Caractéristiques d'*Arundo donax*

Le roseau géant (*Arundo donax*) est une espèce de graminée pérenne, robuste et érigée, atteignant jusqu'à 14 m de hauteur dans des conditions de croissance optimales, et poussant en plusieurs touffes. Les tiges individuelles, dures et creuses, d'une épaisseur de 3 à 5 cm, ils ont un aspect de cannelure semblable à celui du bambou, avec des feuilles alternes de 30 à 60 cm de long et de 2 à 6 cm de large, des extrémités effilées et une touffe de poils à la base. Les tiges produites pendant la première saison de croissance ne sont pas ramifiées et photosynthétiques (Alshaal et al., 2014).

Le roseau géant a la capacité de survivre dans un large éventail de sols, y compris des terres apparemment inhospitalières et marginales (Alshaal et al. 2014). L'espèce est également connue pour son forte capacité de croissance en milieu salin (Di Mola et al. 2018).

La propagation du roseau géant peut être divisée en rhizomes ou boutures de tiges et en méthodes de biotechnologie in vitro. Le temps de plantation des boutures de tige a une influence significative sur le taux de survie du roseau géant. Précédemment dans des expériences anciennes les tiges du roseau géant été utilisées comme propagules vers février ou mars, et le taux de survie a atteint 97% (Zhang et al., 2021).

2.7. Rôle des micro-organismes

Le principal rôle des micro-organismes est, comme dans tout procédé de traitement biologique, la dégradation de la matière organique. Ce sont eux qui assurent les différents

processus d'oxydation et de réduction. Ils génèrent grâce à la dégradation de la matière organique l'énergie nécessaire à la biosynthèse. Ils minéralisent les composés azotés et phosphorés, et les rendent ainsi assimilables par les plantes. Ils assurent également les réactions de nitrification/dénitrification. Ils ont besoin d'un support de fixation pour se développer et ne pas être entraînés par les eaux usées ; celui-ci est assuré par les plantes (surtout leurs organes souterrains) et le matériau formant ainsi ce qu'on appelle la rhizosphère. La rhizosphère est une petite région autour des racines des roseaux où croissent de grandes populations de bactéries consommatrices ou non d'oxygène (aérobie / anaérobie) (Medjdoub, 2014).

Parmi les genres les plus dominants au niveau de la rhizosphère d'*Arundo donax* et des roseaux des jardins filtrant sont *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium* (Dong et al., 2010 ; Bai et al., 2014 ; Xiao et al., 2020). Ces genres jouent un rôle essentiel dans le traitement des eaux usées, par exemple :

2.7.1. Chez le genre *Pseudomonas*

- Selon Al-Dhabi et al. (2019), la souche Al-Dhabi-126 de *Pseudomonas* possède une capacité de à se développer en présence de Cd serait très utile pour le traitement des eaux usées ou la biorémédiation des composants xénobiotiques toxiques.
- La souche bactérienne *Pseudomonas putida* (MTCC 1194) a été capable de s'acclimater à des concentrations de phénol et de catéchol allant jusqu'à 1000 et 500 mg/l, respectivement. La souche bactérienne mentionnée ci-dessus n'a commencé à se dégrader que 20 jours après avoir été exposée à des concentrations de phénol de 1200 mg/l (Kumar et al., 2005).

2.7.2. Chez le genre *Bacillus*

- *Bacillus sp.* est utilisé dans le processus de traitement biologique des eaux usées. Ce procédé a permis d'éliminer efficacement plus de 98 % de la demande biochimique en oxygène (DBO) et de la demande chimique en oxygène (DCO). D'autre part, ce procédé donne de bons résultats en termes d'élimination de l'azote total et de réduction du phosphore. Par conséquent, il serait avantageux de charger ce procédé là où des eaux usées à haute teneur seraient traitées (Choi et al., 2002).
- De plus, plusieurs souches du *Bacillus* été étudié et montre la capacité d'absorber le métal Plomb Pb (Syed et Chinthala, 2015).

2.7.3. Chez le genre *Clostridium*

Selon Li et *al.* (2016), *Clostridium sp.* souche PXL2, est un excellent microbe candidat pour la biorémediation de la pollution par les nitrates et les métaux. Elle peut éliminer efficacement et simultanément l'arsenic et le nitrate de la solution grâce à l'oxydation et la dénitrification du Fer. La souche PXL2 a également été capable d'oxyder L'arsenic vers une forme moins mobile et moins toxique, ce qui peut améliorer de manière significative la performance de la biorémediation de l'arsenic. Les espèces d'AFODN comme la souche PXL2 ont un potentiel d'application prometteur pour la remédiassions in situ des nitrates et des métaux.

2.8. La phytoépuration en Algérie

Selon ONA Alger. (2011), l'épuration par les plantes ou STEP écologique, le ministère des Ressources en eau a mis en place en 2007 un système pilote de traitement des eaux usées basé sur un processus essentiellement naturel, appelé « jardin d'épuration". Ce système pilote d'épuration des eaux usées a été implanté dans le village de Temacine dans la wilaya d'Ouargla. La station d'épuration de N'Goussa a été créée dans le cadre d'un vaste projet visant à lutter contre la montée des eaux d'Ouargla.

Elle utilise des filtres à roseaux pour traiter des eaux usées municipales de la daïra de N'Goussa. C'est l'un des nombreux systèmes de traitement biologique des eaux usées de macrophytes. Les plantes utilisées sont des *Phragmites australis* (roseaux commun).

Partie II : Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

L'objectif de ce chapitre est de décrire les différents protocoles et méthodes utilisés au cours de ce projet. Certains protocoles sont décrits en l'annexe.

1. Objectif

Notre travail a été réalisé au niveau de laboratoire pédagogique « PFE » au niveau du département de biotechnologie et agroécologie de l'université de Blida 01, durant la période allant des trois semaines de 12 au 30 de mois de Juin de l'année 2022.

Ce travail a pour objectif d'isoler trois genres bactériens ciblés à partir de la rhizosphère *d'Arundo donax* au niveau d'oued Nador Tipaza et d'identifier ces genres à travers une caractérisation microbiologique (macroscopique, microscopique et biochimiques).

2. Région d'étude

La partie inférieure de l'oued Nador est une plaine qui fait partie de la plus grande plaine côtière connue sous le nom de Sahel d'Alger. Elle est située à environ 75 kilomètres à l'ouest d'Alger (figure 03). Notre zone d'étude localisée à proximités de rejet d'oued Nador dans la mer. Elle est administrativement située dans la wilaya de Tipaza.

Cette zone est restreinte :

- Au nord Par la mer Méditerranée.
- Au sud et à l'est, les pentes du Sahel.
- A l'ouest par le massif du Chenoua.

3. Milieux de culture

- Gélose au cétrimide (GC): (les compositions voire l'annexe 01) milieu sélectif pour le genre *Pseudomonas*.
- Gélose à amidon (GA) : (compositions voire l'annexe 01) milieu sélectif pour le genre *Bacillus*.
- Viande foie sulfite de fer (VFSS) : (compositions voire l'annexe 01) milieu sélectif pour le genre *Clostridium*.
- Gélose au sang (GS) : milieu destiné à obtenir le genre *Clostridium*.



Figure 03 : Image satellitaire représente la zone de l'échantillonnage, le point du rejet d'oued Nador dans la mer et le point de rejet de la station de traitement des eaux usées de Chenoua – Tipaza (STEP). (Google earth)

4. Matériel biologique

Dans l'ordre de réaliser nos expériences, nous avons collectés des échantillons de sols à partir de trois sites à proximités de rejet de la station d'épuration des eaux usées de Chenoua (STEP) dans l'oued Nador, à 2 km à l'ouest de la ville de Tipaza (Figure 03).

Pour le but de déterminer des genres suivants ; *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium* qu'ont montrés leur potentiel d'être des outils pour le traitement des eaux usées. De plus, pour avoir la possibilité des ces roseaux pour le traitement in situ les eaux du rejet de la STEP.

5. Méthodes

5.1.Échantillonnage

Les échantillons de sol que nous avons utilisés sont prélevés à partir de trois sites à proximités de rejet d'oued Nador dans la mer. Un échantillon de chaque site est prélevé à partir de la rhizosphère des roseaux d'*Arundo donax*, à une profondeur de 10 cm sous la surface. Le sol est mis dans des boites stériles puis transférées vers laboratoire dans un sac isothermique.

5.2. Préparation des suspensions mères

Après avoir transféré les échantillons au laboratoire, une quantité de 10g est diluée dans 90 ml d'eau distillée stérile pour chaque échantillon. Un agitateur magnétique est utilisé pour homogénéiser cette suspension pendant 10 minutes dans un erlenmeyer dans des conditions stériles.

5.3. Les dilutions décimales

Les dilutions décimales jusqu'à 10^{-4} sont effectuées pour chaque tube dans 9 ml d'eau distillée stérile. La technique de dilution consiste de transférer à l'aide d'une micropipette un volume d'1 ml de suspension mère, avec laquelle des séries de dilution ont été préparées jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-4} .

Cette manipulation a été réalisé dans des conditions aseptiques devant la zone de bec bunsen, avec le changement des embouts pour chaque manipulation et le flambage de la tête de tube et le bouchon avant et après chaque ouverture et fermeture de tube.

5.4. Isolement et purification des souches bactérienne

Nos recherches ont cible l'isolement et la purification de trois genres bactériens : *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium*.

5.4.1. *Pseudomonas*

Selon Razkallah et Zerari. (2013), le genre *Pseudomonas* est isolé sur le milieu sélectif Gélose cétrimide.

L'isolat est ensemencé dans une boîte Pétrie contenant la gélose cétrimide (GC) solide par la technique de quatre cadrans (voire l'annexe 04), les trois boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

5.4.2. *Bacillus*

L'isolat est ensemencé dans une boîte Pétri contenant gélose à amidon(GA) solide par la technique de quatre cadrans (voire l'annexe 04), les trois boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

5.4.3. *Clostridium*

Partie II : Partie Expérimentale

Selon Razkallah et Zerari. (2013), une recherche des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ASR) est fait pour l'isolement des souches *Clostridium*.

Les isolats ont subi un choc thermique est à une température de $80 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 10 minutes de manière à éliminer toute forme végétative des bactéries ASR présente, après refroidissement ces derniers sont ensemencés dans des tubes contenant un milieu viande foie sulfite de fer (VFSR). Le milieu et l'inoculum sont mélangés lentement avec précaution, en veillant à ne pas créer de bulles d'air et à ne pas introduire d'oxygène.

Les trois tubes sont incubés à 37°C pendant 48h après la solidification du milieu.

Après le temps d'incubation, les tubes présentant de grosses colonies noires entourées de halos noirs qui correspondent à *Clostridium* sulfito-réducteur seront considérés comme positifs.

La lecture initiale doit être effectuée sans aucun doute après 16 heures d'incubation car les colonies de ASR sont fréquemment invasives, auquel cas le tube serait complètement noir et l'interprétation serait difficile voire impossible. Suivi par une lecture deuxième après 24h et une lecture troisième après 48h.

Après la formation des spores la purification a été effectuée par la technique de quatre cadrans (voire l'annexe 04) en milieu gélose au sang (GS) solide, les souches sont purifiées jusqu'à l'obtention de colonies de forme et de couleur identiques dans une boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h dans des conditions anaérobiques

5.5. Identification des souches

Les souches isolées ont été identifiées par une caractérisation morphologique, culturale et biochimique (observation macroscopique, microscopique et tests biochimiques), dans le but de confirmer leurs identités aux genres bactériens ciblés.

5.5.1. Observation macroscopique

Les observations des colonies bactériennes à l'œil nu ont pris en compte les facteurs d'identification morphologiques (macroscopiques) suivants :

- Présence des pigments sur le milieu de culture.
- La couleur de la colonie : blanche, Jaune, Jaunâtre, etc.
- La taille des colonies : petite, moyenne, ou grosse.
- La forme des colonies : rondes, irrégulières, filamenteuse, etc.

- L'élévation : concave, plate, ou convexe.
- L'opacité : transparente, translucide, ou opaque.
- La surface : dentelée, sèche, rugueuse, ou lisse.

5.5.2. Observation microscopique

✓ Coloration de Gram

La coloration de Gram est basée sur l'affinité tinctoriale différente des bactéries à certains colorants due à la constitution de leur paroi. Cette coloration permet aussi d'observer la morphologie des bactéries (formes allongées pour les bacilles et arrondies pour les cocci) (Astier-Théfenne et *al*, 2014).

La technique est comme suit :

✓ Réalisation de la coloration de Gram

- On dépose une goutte d'eau physiologique sur la lame et par une anse de platine stérile une petite quantité d'une colonie bien isolée de 18 à 24 heures est ajoutée et les mélangés. Suivi par un séchage en passant la lame à la flamme du bec Bunsen (2 à 3 fois).
- Verser quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis et laisser le pendant 1 minute, puis rincer la lame par l'eau pour éliminer l'excès de violet de gentiane.
- Déposer une quantité de lugol sur la lame pendant 30s, suivi par un rinçage par l'eau.
- Rincer avec l'éthanol pendant 10s puis rincer bien par l'eau.
- Déposer la lame pendant 1 minute dans la fuchsine, et la rincer abondamment à l'eau.

✓ Observation microscopique

Déposer la lame préparée dans un microscope optique à un grossissement x100 après l'ajout d'une goutte d'huile à immersion.

✓ Lecture des résultats

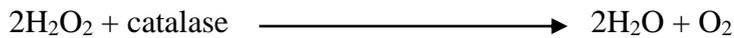
Les bactéries Gram négatif sont colorées en rose et les bactéries Gram positif en violet (Astier-Théfenne et *al*, 2014).

5.5.3. Tests biochimiques

5.5.3.1. Test catalase

Partie II : Partie Expérimentale

Selon Reiner. (2010), L'enzyme catalase sert à neutraliser les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène. La catalase accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène :



Les réactions positives se manifestent par une formation de bulles.

La technique est comme suit :

Dans des conditions stériles, un inoculum bactérien âgé de 18 à 24 heures est prélevée à l'aide d'une pipette de pasteur, est déposé sur une lame et traite par une goutte de H_2O_2 à 3 %, si des bulles sont observées immédiate de bulles ($O_2 + \text{eau} = \text{bulles}$) ou non (Reiner. 2010).

5.5.3.2. Test mannitol-mobilité

Pour faire ce test une petite quantité d'une colonie bien isolée est inoculée par piqûre centrale au fond du milieu (la composition dans l'annexe 01) à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

Les interprétations des résultats sont effectuées selon Shanthakunnari et Isaac. (1971) :

➤ Mobilité

- Turbidité confinée à la ligne de piqûre centrale signifie que les bactéries ne sont pas mobiles.
- Turbidité à des degrés divers dans le tube signifie que les bactéries sont mobiles.

➤ Fermentation du mannitol

- Léger approfondissement de la couleur rouge d'origine, avec turbidité signifie la Non-fermentation du mannitol (Mannitol -).
- Jaune partout sauf à la surface qui reste généralement rouge foncé, avec turbidité signifie la fermentation du mannitol (Mannitol +).
- Léger approfondissement de la couleur rouge d'origine, avec formation de bulles de gaz le long de la ligne de piqûre centrale, parfois avec rupture du milieu, indique la non-fermentation du mannitol avec réduction du nitrate en nitrite et réduction ultérieure en N_2 .

Résultats et Interprétations

Résultats et Interprétations

Cette partie résume l'ensemble des résultats et des interprétations relatives à l'isolement et à l'identification des souches bactériennes des genres ciblés.

1. Identification des souches

1.1. Observation macroscopique

1.1.1. *Pseudomonas*

L'isolement des souches à partir des dilutions 10^{-2} des trois échantillons sur le milieu GC nous permis d'avoir des colonies identiques, elles sont de couleur blanchâtre et une forme ronde et convexe de petite taille à surface lisse. Ces colonies sont fluorescentes sous la lumière ultraviolette (figure 04), des résultats similaires ont été obtenus par (Benyoub, 2011 ; Moungang *et al.*, 2022).

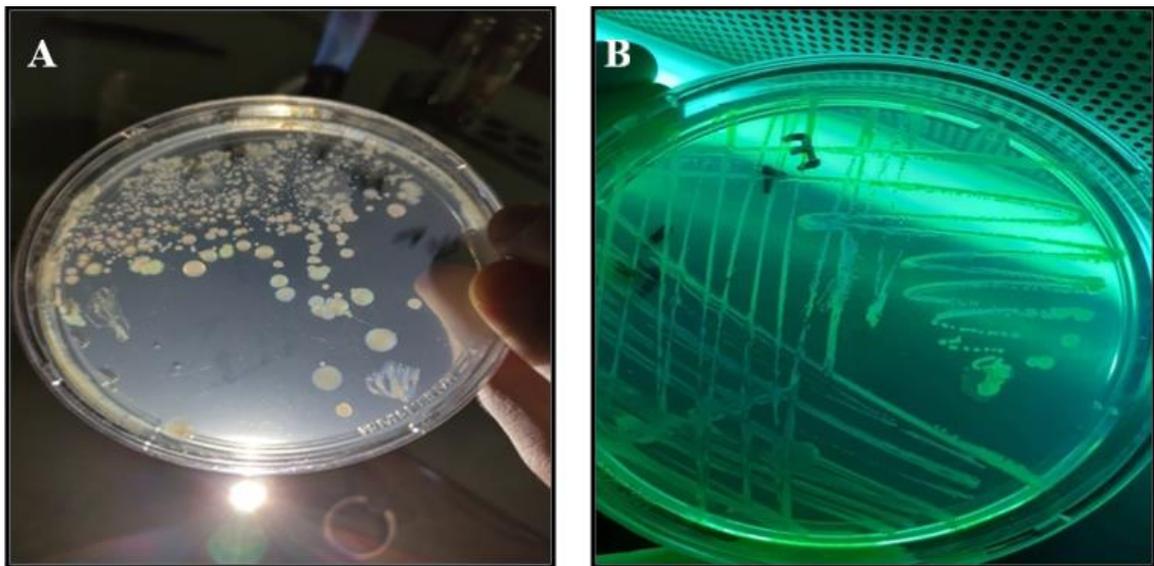


Figure 04 : Aspect des colonies de *Pseudomonas* sur Gélose au cétrimide (image (A) les colonies sous une lumière normale et image (B) les colonies sous la lumière ultraviolette).

1.1.2. *Bacillus*

L'isolement des souches à partir des dilutions 10^{-2} des trois échantillons sur le milieu GA à nous permis à nous permis d'avoir des colonies extrêmement variables. En général, elles sont rondes et plates, de couleur crème ou blanc, d'une surface lisse (figure 05), des résultats similaires ont été obtenus par (Mechmeche et Sadou, 2017 ; Meddas *et al.*, 2020).

Résultats et Interprétations

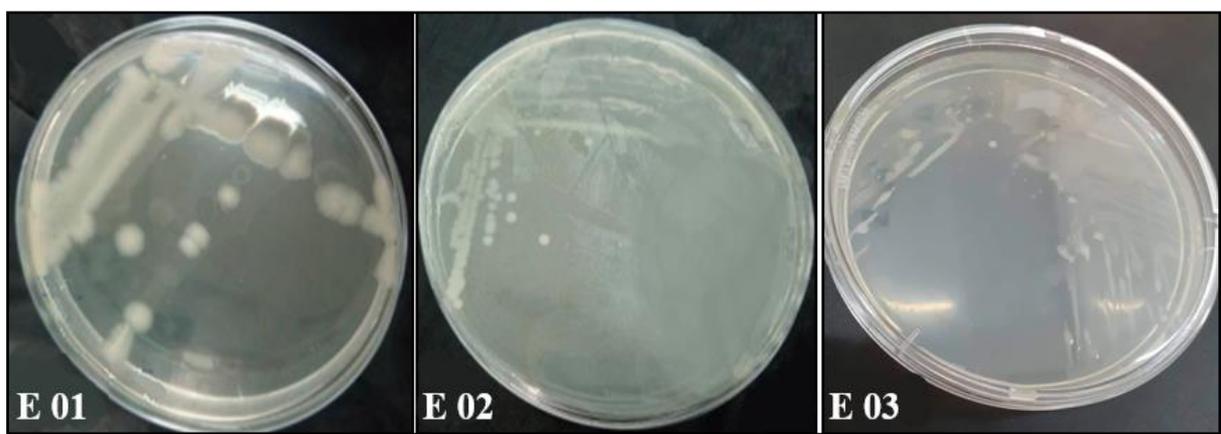


Figure 05 : Aspect des colonies de *Bacillus* des trois échantillons sur Gélose à amidon.

1.1.3. *Clostridium*

Après incubation, une apparence d'une spore noire dans le bas du tube qui signifie la présence des bactéries sulfite-réducteur anaérobique pour le tube d'échantillon 01, d'autre part une spore noire apparaît presque au haut de tube qui signifie la présence des bactéries sulfite-réducteur aéro-anaérobiques. Et pour l'échantillon 03, il a été noté qu'il n'y avait pas de spores dans le tube, ce qui indique qu'il n'y avait pas de bactéries sulfite-réductrices présentes (figure 06).

La formation des spores est expliquée par la capacité des bactéries anaérobies sulfite-réductrices (ASR) présentent sous forme de gram positif, se développant en 24 à 48 heures sur une gélose VFSF en en donnant des colonies typiques réduisant du sulfite de sodium (Na_2SO_3), qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe^{+2} qui donne FeS (sulfure de fer) de couleur noir (Allioui et Benmaatallah, 2021).

Résultats et Interprétations



Figure 06 : Les résultats des spores de *Clostridium* des trois échantillons sur milieu VF SF.

Après l'incubation des spores sur le milieu GS pendant 48h, nous avons obtenus des colonies brunâtres qui dégagent une odeur déplaisante (figure 07), des résultats similaires ont été obtenus par (Metlef, 2008).

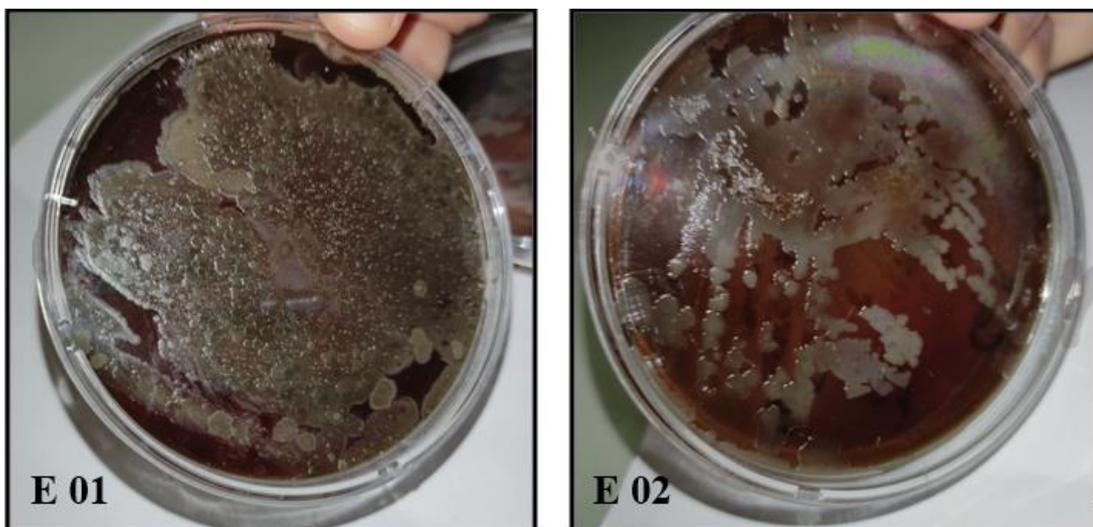


Figure 07 : Aspect des colonies du *Clostridium* des échantillons 01 et 02 sur Gélose au sang.

1.2. Observation microscopique (coloration de Gram)

1.2.1. *Pseudomonas*

Après la coloration de Gram les cellules ont une forme bacillaire et de couleur rose (figure 08), c'est-à-dire des bactéries à Gram négatif, des résultats similaires ont été obtenus par (Medjadji et Zaoui, 2019).

Résultats et Interprétations

Selon Tournus. (2016), Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif.

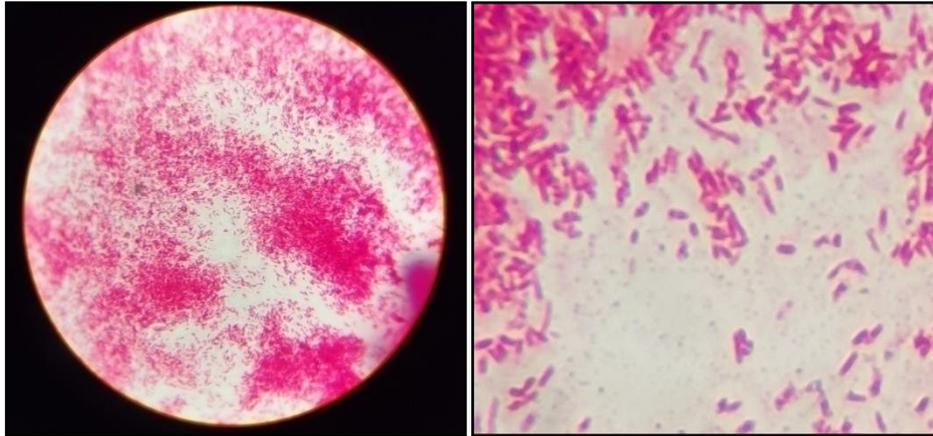


Figure 08 : Forme et mode de regroupement de l'isolat de genre *Pseudomonas* après coloration de Gram (G : x100).

1.2.2. *Bacillus*

La coloration de Gram et l'examen microscopique ont révélé que les souches récupérées dans les trois échantillons présentent les mêmes propriétés cellulaires, notamment une teinte violette au niveau des parois cellulaires, ce qui signifie qu'il s'agit de bactéries Gram positives, et une forme cohérente de bâtonnet (figure 09). Des résultats similaires ont été obtenus par (Mechmeche et Sadou, 2017 ; Meftah, 2019).

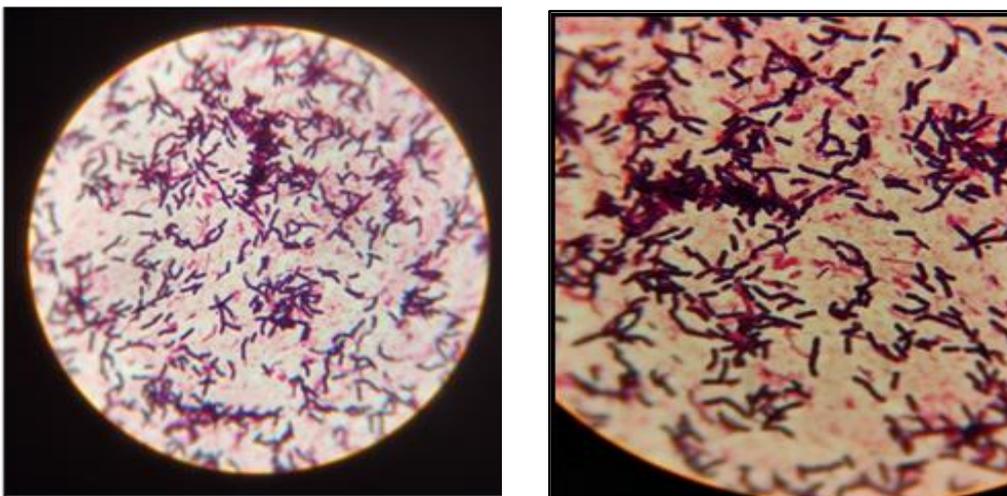


Figure 09 : Forme de l'isolat de genre *Bacillus* après coloration de Gram (G : x100).

1.2.3. *Clostridium*

Après la coloration de Gram les cellules ont une forme bacillaire mince et de couleur violet (figure 10), c'est-à-dire des bactéries à Gram positifs, des résultats similaires ont été obtenus dans le but d'identification du *Clostridium ssp.* par (Metlef, 2008).



Figure 10 : Forme de l'isolat de genre *Clostridium* après coloration de Gram (G : x100).

1.3. Tests chimiques

1.3.1. Test de catalase

1.3.1.1. *Pseudomonas*

Tous les isolats de *Pseudomonas* pour les trois échantillons sont catalase positive. Ces derniers ont dégradé le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz (figure 11).

Nos résultats sont cohérents avec d'autres études qui ont trouvé que les *Pseudomonas* sont des producteurs de catalase (Uğur et al., 2012).

Résultats et Interprétations



Figure 11 : Test de catalase pour les isolats de *Pseudomonas* pour les trois échantillons.

1.3.1.2. *Bacillus*

Tous les isolats de *Bacillus* pour sont des catalases positives. Ces derniers ont dégradé le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz (figure 12). Les mêmes résultats ont été obtenus par (Mechmeche et Sadou, 2017 ; Meftah, S. 2019) qui indiquent *Bacillus* sont des producteurs de catalase.

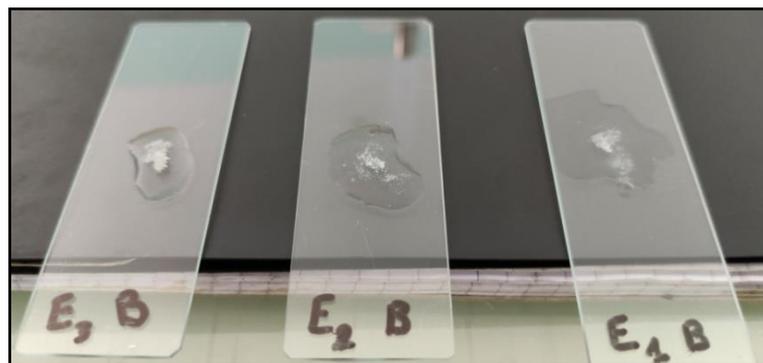


Figure 12 : Test de catalase pour les isolats de *Bacillus* pour les

1.3.1.3. *Clostridium*

Les deux isolats de *Clostridium* d'échantillon 01 et 02 sont catalase négative. Ces derniers sont incapables de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène qui se traduit par l'absence des bulles de gaz (figure 13). Les mêmes résultats ont été obtenus par (Metlef, 2008).

Résultats et Interprétations

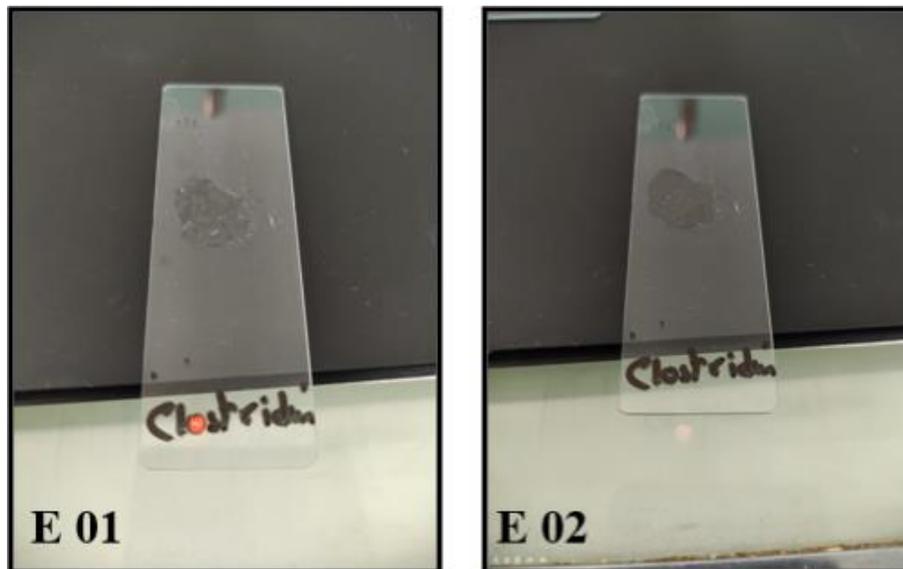


Figure 13 : Test de catalase pour les isolats de *Clostridium* pour l'échantillon 01 et 02.

1.3.2. Test mannitol – mobilité nitrate

1.3.2.1. *Pseudomonas*

Le résultat obtenu a montré un changement de la couleur du milieu du rouge vers le jaune ce qui indique que la fermentation de mannitol a eu lieu, donc le test mannitol +, ainsi la présence des troubles dans les trois tubes indique que les bactéries sont mobiles. D'autre côté, l'absence des bulles indique la non-réduction des nitrates en azote (figure 14). Des résultats ont été obtenus par (Djoudi et Khellil, 2019).



Figure 14 : Résultats du test mannitol-mobilité-nitrate des isolats de *Pseudomonas* pour les trois échantillons.

1.3.3. *Bacillus*

Le milieu est changé vers le jaune pour échantillons 01 et 03 que signifie la fermentation de mannitol donc mannitol + et pour l'échantillon 02 absence de changement du milieu signifie la non-dégradation de mannitol donc mannitol -. La présence des troubles dans les trois tubes indique que les bactéries sont mobiles. L'absence des bulles indique la non-réduction des nitrates en azote (figure 15). Des résultats similaires ont été obtenus par (Randriamisaina, 2015 ; Meftah, S. 2019) qui indiquent *Bacillus* sont des bactéries mobile (López-Prieto et al., 2019).

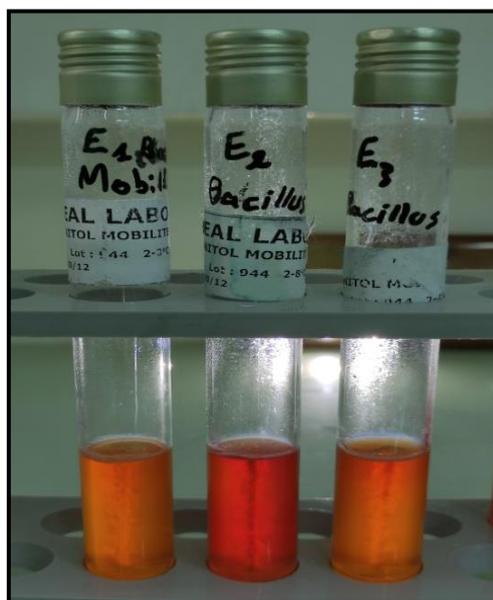


Figure 15 : Résultats du test mannitol-mobilité-nitrate des isolats de *Bacillus* pour les trois échantillons.

1.3.4. *Clostridium*

Le milieu pour l'échantillon 01 et 02 vire au jaune, qui indique fermentation de mannitol donc mannitol +. Pour la mobilité, les deux isolats diffusent à partir de la ligne de la pique centrale, qui manifeste par un trouble du milieu. L'absence des bulles indique la non-réduction des nitrates en azote (figure 16).

Résultats et Interprétations



Figure 16 : Résultats du test mannitol-mobilité-nitrate des isolats du *Clostridium* pour échantillons 01 et 02.

Discussion

Discussion

La communauté microbienne qui se développe dans la rhizosphère des marais artificiels joue un rôle majeur dans les processus biogéochimiques et l'élimination des contaminants des eaux usées (Bai et *al.*, 2014). De plus, leurs activités sont cruciales pour la fonction des marais artificiels (Peralta et *al.*, 2013).

Notre travail et pour objectif d'isoler et identifier des bactéries ciblées à partir de la rhizosphère des roseaux *Arundo donax* d'oued Nador (Tipaza) au niveau de trois zones différentes. Ces bactéries appartiennent aux genres suivants ; *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium* qu'ont démontrés leur capacité à servir comme d'outils de traitement des eaux usées.

La première partie de notre travail consisté à isoler ces bactéries sur des milieux sélectifs. Les résultats de l'observation macroscopique ont montré des similarités morphologiques avec les genres bactériens de référence.

Après la sélection des isolats les plus dominants pour chaque isolement, une coloration de Gram été réalisée et suivi par une observation microscopique sous fort grossissement ($\times 100$), a montré que les isolats de genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif. Et pour, les isolats des genres *Bacillus* et *Clostridium* sont des Gram positif où les isolats du *Bacillus* sont de forme bâtonnet et les isolats du *Clostridium* sont des bacilles minces. Les résultats de l'observation microscopique sont confirmés selon (Public HealthEngland, 2015 ; Public HealthEngland, 2016 ; Public HealthEngland, 2018).

Pour la caractérisation biochimique, nous avons entamés deux tests biochimiques. Premièrement le test catalase de la recherche de l'enzyme respiratoire, les résultats obtenus indiquent que tous les isolats des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont capable de produisent la catalase, cependant, les isolas du *Clostridium* sont incapable de produisent la catalase pour dégradé peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). On sait en général que les processus catalytiques jouent un rôle crucial dans la différenciation des organismes à Gram positif en convertissant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène (Taylor et Achanzar, 1972). Ainsi, l'activité puissante de la catalase est l'une des caractéristiques biochimiques déterminantes de plusieurs espèces bactériennes (Taylor et Achanzar, 1972). Deuxièmement le test mannitol mobilité pour la recherche d'un autre caractère important qui est la mobilité des bactéries, les résultats obtenus montrent que tous les isolats de notre étude sont mobiles. La mobilité bactérienne peut être assurée par une variété de mécanismes, dont les plus courants sont les flagelles (Jarrell et *al.*, 2008). Les flagelles se trouvent principalement chez les bacilles, mais il

Discussion

existe quelques Cocci flagellés, la motilité est donc un moyen important d'identification (Jordan et *al.*, 1934). D'autre côté, nous avons obtenus des résultats positifs pour la fermentation de mannitol sauf pour l'isolat de deuxième échantillon de genre *Bacillus* qui a montré un mannitol -. Le mannitol peut servir comme source de carbone pour un grand nombre de bactéries (Bouraoui, 2013).

Des nombreuses études ont montré la possibilité de l'utilisation des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium* comme un outil important dans le domaine de la biorémédiation, grâce à leurs efficacités de la dépollution des composants toxiques. Nous avons l'exemple chez les *Pseudomonas* la capacité de développement en présence de cadmium le phénol, ces pouvoirs (Kumar et *al.*, 2005 ; Al-Dhabi et *al.*, 2019). Chez les *Bacillus*, on trouve qui ont une capacité de l'élimination de 98% de la demande biochimique en oxygène (DBO), de la demande chimique en oxygène (DCO) et de l'azote total, ainsi, la réduction du phosphore et l'absorption de Plomb (Choi et *al.*, 2002 ; Syed et Chinthala, 2015). De plus chez les *Clostridium*, Nous constatons que ces derniers ont le potentielle de l'élimination efficacement de l'arsenic et le nitrate, plus la dénitrification du Fer (Li et *al.*, 2016).

Typiquement, la biorémédiation est basée sur l'action Co-métabolique d'un organisme ou d'un consortium de micro-organismes (Nicolaou et *al.*, 2010). Dans ce processus, la transformation des contaminants présente peu d'efficacité ou aucun avantage pour la cellule, et donc ce processus est décrit comme une biotransformation non bénéfique (Kumar et *al.*, 2011 ; Wasilkowski et *al.*, 2012).

Plusieurs études ont montré que de nombreux organismes (procaryotes et eucaryotes) ont une capacité naturelle à biosorber les ions de métaux lourds toxiques (Singh et *al.*, 2014). Les exemples de micro-organismes étudiés et stratégiquement utilisés dans les traitements de biorémédiation pour les métaux lourds par exemple comprennent les suivantes bactéries : *Arthrobacter spp.* (Roane et *al.*, 2001), *Pseudomonas veroni* (Vullo et *al.*, 2008), *Burkholderia spp.* (Jiang et *al.*, 2008), *Bacillus cereus* (Kanmani et *al.*, 2012).

D'après les résultats obtenus, on peut dire qu'au niveau de la rhizosphère d'*Arundo donax* d'oued Nador Tipaza se trouve des bactéries fait partie des genres ciblés *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium*, Cela suggère que ces bactéries peuvent gérer le traitement des eaux usées *in situ*.

Conclusion

Conclusion

La pollution des mers et des eaux souterraines due à une gestion inadéquate des eaux usées est courante et présente des risques pour l'environnement et la santé humaine. La biodégradation des composants polluants des eaux usées par phytoépuration est une méthode de dépollution in situ qui peut être envisagée à cet effet.

L'objectif de ce travail était la découverte des genres les plus courants utilisés comme outils de bioremédiation. Nous avons isolé des souches à partir de la rhizosphère d'*Arundo donax* d'oued Nador-Tipaza.

Les observations macroscopiques et microscopiques, ainsi les tests biochimiques nous aider dans notre réussite à identifier les souches appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Clostridium*. Où le premier genre est gram négatif, tandis que les deux autres sont grams positifs. Les trois genres sont mobiles. *Pseudomonas* et *Bacillus* ont tous deux de la catalase et du mannitol +, à l'exception d'un isolat du genre *Bacillus* qui a du mannitol -. Par contre, *Clostridium*, catalase-, et mannitol+.

D'après plusieurs recherches qui ont montré le potentiel de ces genres bactériens ciblés pour l'élimination des composants toxiques, nous pouvons dire que nos isolats peuvent être très utiles pour le traitement des eaux usées et la bioremédiation des composants xénobiotiques toxiques afin de diminuer l'impact de ces polluants dans l'environnement.

L'application de ce type de procédé de bioremédiation à grande échelle reste cependant un défi, et une approche préventive des problèmes de pollution par les métaux est donc encouragée. Des investigations complémentaires visant à identifier les mécanismes impliqués dans la caractérisation des biosorbants, et des avancées en génie génétique sont nécessaires.

De nombreux micro-organismes peuvent décomposer naturellement les molécules xénobiotiques, Une meilleure compréhension de la manière dont les eucaryotes et les procaryotes métabolisent les métaux lourds et les voies de détoxification aidera les futurs chercheurs à traiter ce type de problème environnemental avec une efficacité maximale. Le choix du type de biomasse le plus prometteur doit être fait en tenant compte de son coût et de sa disponibilité, et cela est nécessaire à l'échelle industrielle. Les micro-organismes doivent être faciles à obtenir et à cultiver. Par exemple, une application à l'échelle industrielle n'aurait pas d'intérêt si le microorganisme est difficile à cultiver, une espèce rare ou en voie d'extinction.

Conclusion

Bien que certains progrès aient été réalisés dans la reconnaissance de l'importance des micro-organismes pour la décontamination des eaux polluées, certains points importants doivent encore être abordés. Cependant, un nouveau défi est apparu pour la science. Ainsi, d'autres études doivent se concentrer sur le développement de nouvelles technologies propres et acceptables pour l'environnement avec une faisabilité commerciale.

Références bibliographiques

A

Ajayi A, Peter-Albert C, Ajojesu T, Bishop S, Olasehinde G, Siyanbola T (2016). Biochemical oxygen demand and carbonaceous oxygen demand of the covenant university sewage oxidation pond. *Covenant J Phys Life Sci* 4(1):11–19

Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Mohammed Ghilan, A. K., &ValanArasu, M. (2019). Optimizing the management of cadmium bioremediation capacity of metal-resistant *Pseudomonas* sp. strain Al-Dhabi-126 isolated from the industrial city of Saudi Arabian environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(23), 4788.

Allioui, M., Benmaatallah, R. (2021). Caractérisation physicochimique et microbiologique du fromage traditionnel «Bouhezza». Mémoire master l'université 8 mai 1945 Guelma. Option : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire.

Alshaal, T. – Elhawat, N. – Domokos-Szabolcsy, É. – Kátai, J. – Márton, L. – Czako, M. – El-Ramady, H. – Fári, M.G. (2014). Giant reed (*Arundo donax*L.): A green technology for clean environment. In Ansari, A.A. – Gill, S.S. – Gill, R. – Lanza, G.R. – Newman, L. (Eds.) *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, Springer International Publishing, Switzerland, pp. 3–20.

Andreesen, J. R., Bahl, H., & Gottschalk, G. (1989). *Introduction to the Physiology and Biochemistry of the Genus Clostridium*. *Clostridia*, 27–62.

B

Bachi, O. E., (2010) : Diagnostic sur la valorisation de quelques plantes du jardin d'épuration de la station du vieux Ksar de TEMACINE. Mémoire de magister l'université de KasdiMerbah Ouargla. Option : Protection de l'environnement en Zones arides et semi-arides.

Bai, Y., Liang, J., Liu, R., Hu, C., &Qu, J. (2014). Metagenomic analysis reveals microbial diversity and function in the rhizosphere soil of a constructed wetland. *Environmental technology*, 35(20), 2521-2527.

Références Bibliographiques

Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J, van der Lelie D (2004) Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat Biotechnol*22:583–588

Belaid, N. 2010. Evaluation des impacts de l'irrigation par les eaux usées traitées sur les plantes et les sols du périmètre irrigué d'El Hajeb-Sfax: salinisation, accumulation et phytoabsorption des éléments métalliques. Thèse de doctorat, Université de Sfax, École Nationale d'Ingénieurs de Sfax (Tunisie) : 236 p.

Benyoub, K. (2011). Isolement de souches de *Pseudomonas* à partir des sols et des nécroses d'oliviers de l'Ouest Algérien : Identification et caractérisation biochimique, sérotypique et phytopathologique. Recherche de l'antibiorésistance, d'antagonisme (bactériocine) et d'ADN plasmidique. Mémoire de magister l'université Mohamed Boudiaf des sciences et de la technologie d'Oran. Option: Production végétales et Microbiennes.

Bolzonella, D., Papa, M., Da Ros, C., AngaMuthukumar, L., & Rosso, D. (2019). Winery wastewater treatment: a critical overview of advanced biological processes. *Critical reviews in biotechnology*, 39(4), 489-507.

Bouraoui, H. (2013). Régulation de MtlR, activateur transcriptionnel de l'opéron mtl de *Bacillus subtilis*, par le domaine EIIB du transporteur du mannitol. Thèse de Doctorat l'université Paris-Sud XI. Option : Microbiologie et Génétique Moléculaire.

C

Cai, H., Liang, J., Ning, X. A., Lai, X., & Li, Y. (2020). Algal toxicity induced by effluents from textile-dyeing wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Sciences*, 91, 199-208.

Choi, Y.S.; Hong, S.W.; Kim, S.J.; Chung, I.H. (2002). *Development of a biological process for livestock wastewater treatment using a technique for predominant outgrowth of Bacillus species*. *Water Science and Technology*, 45(12), 71–78.

D

Di Mola, I., Guida, G., Mistretta, C., Giorio, P., Albrizio, R., Visconti, D., ... & Mori, M. (2018). Agronomic and physiological response of giant reed (*Arundo donax* L.) to soil salinity. *Italian Journal of Agronomy*, 13(1), 31-39.

DUPOLDT and al. (1995): hand book of constructed wetlands.

Djoudi, M., Khellil, H. (2019). Recherche et identification phénotypique des germes responsable des infections nosocomiales dans un milieu hospitalier «Hôpital Hakim Sâadane–Biskra». Mémoire de master l'université de Mohamed Khider de Biskra. Option : Microbiologie appliquée.

Dong, X., & Reddy, G. B. (2010). Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. *Bioresource technology*, 101(4), 1175-1182.

F

Fonder, N., & Headley, T. (2013). The taxonomy of treatment wetlands: a proposed classification and nomenclature system. *Ecological Engineering*, 51, 203-211.

H

Halim, A., Sharmin, S., Rahman, H., Haque, M., Rahman, S., & Islam, S. (2018). Assessment of water quality parameters in baor environment, Bangladesh: A review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 269-263.

J

Jarrell, K. F., McBride, M. J. (2008). *The surprisingly diverse ways that prokaryotes move.* *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 466–476.

Jiang CY, Sheng XF, Qian M, Wang QY. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in

Références Bibliographiques

promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*. 2008 May;72(2):157-64.

Jiang L, Ruan Q, Li R, Li T (2013) Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp. BS8Y J Basic Microbiol 53(3):224–30

Jordan, E. O., Caldwell, M. E., & Reiter, D. (1934). Bacterial motility. *Journal of bacteriology*, 27(2), 165-174.

Journal Officiel de la République Algérienne, Décret exécutif n° 06-141 du 19 avril 2006 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels.

K

Kanmani P., Aravind J., Preston D. Remediation of chromium contaminants using bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2012; 9:183–193.

Kumar A., Bisht B. S., Joshi V. D., Dhewa T. Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. *International Journal of Environmental Sciences* 2011; 1 (6) 1079–1093.

Kumar, A., Kumar, S., & Kumar, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal*, 22(2), 151-159.

L

Lavoie, A., De la Noüe, J. (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Water research*, 19(11), 1437-1442.

Li, B., Deng, C., Zhang, D., Pan, X., Al-misned, F. A., & Mortuza, M. G. (2016). Bioremediation of nitrate-and arsenic-contaminated groundwater using nitrate-dependent Fe (II) oxidizing *Clostridium* sp. strain px12. *Geomicrobiology Journal*, 33(3-4), 185-193.

Références Bibliographiques

López-Prieto, A., Martínez-Padrón, H., Rodríguez-López, L., Moldes, A. B., & Cruz, J. M. (2019). Isolation and characterization of a microorganism that produces biosurfactants in corn steep water. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 509-516.

Lorah, M. M., & Voytek, M. A. (2004). Degradation of 1, 1, 2, 2-tetrachloroethane and accumulation of vinyl chloride in wetland sediment microcosms and in situ porewater: biogeochemical controls and associations with microbial communities. *Journal of Contaminant Hydrology*, 70(1-2), 117-145.

M

Ma J, Wu S, Shekhar N, Biswas S, Sahu AK (2020) Determination of physicochemical parameters and levels of heavy metals in food wastewater with environmental effects. *Bioinorganic Chem Appl*

Macek T, Mackova M, Kas J (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnol Adv* 18:23–34

Mechmeche, N., Boucherba, N. E., & Sadou, H. (2017). Isolement et sélection d'une souche bactérienne productrice de kératinases. Mémoire de Master l'université de Bejaia. Option : Biotechnologie microbienne.

Medjdoube, T. (2014) : Etude, conception et dimensionnement d'une STEP par filtre plantés de réseaux des eaux usées des zones éparses de la commune de Terny . Mémoire de master l'université de Abou BekrBelkaid-Tlemcen. Option : Technologie de traitement des eaux.

Medjadji, H. et Zaoui, S. (2019). Évaluation de la production et de l'activité antimicrobienne de la pyoverdine chez des isolats de *Pseudomonas fluorescens* rhizosphériques. Mémoire de Master l'université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. Option : Microbiologie appliquée.

Meftah, S. (2019). Isolement et sélection d'une souche bactérienne dégradant le son de blé à partir l'eau de Hamem El Hajeb (Biskra). Mémoire de master l'université Mohamed Khider de Biskra. Option : Microbiologie Fondamentale et Appliquée.

Références Bibliographiques

Menadi, O., Boumaza, A. (2016). Analyse du microsymbiote isolé à partir des racines de la légumineuse *Trigonellagradiata* Stev. Mémoire de master l'université des Frères Mentouri Constantine. Option : Ecologie Microbienne.

Metahri, M. S. (2012). Elimination simultanée de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitées par des procédés mixtes : cas de la STEP est de la ville de Tizi Ouzou. Thèse de Doctoral l'université Mouloud Mammeri. Option : Génie des procédés.

Metlef, S. (2008). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophile locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. Mémoire de magister l'université Hassiba Ben Bou Ali Chlef. Option. : Sciences alimentaire

Miya, RK, Firestone MK (2001) Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *J Environ Qual* 30:1911–1918

Moungang, L. M., Kweyang, B. P. T., Betyi, L. M., Ache, R. N., Yogne, Y. P., Rabiou, M. S. A. I., Togouet, S. H. Z. (2022). Bacteriological and Physico-Chemical Characterisation of Liquid Wastes: The Case of the University Hospital Centre (UHC) of Yaoundé-Cameroon. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 10(6), 170-190.

Muratova AY, Dmitrieva TV, Panchenko LV, Turkovskaya OV (2008) Phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil. *Int J Phytoremediat* 10:486–502

N

Nadarajan, S., Sukumaran, S. (2021). Chemistry and toxicology behind chemical fertilizers. In *Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture* (pp. 195-229). Academic Press.

Nicolaou SA, Gaida SM, Papoutsakis ET. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metab Eng.* 2010 Jul;12(4):307-31.

O

Références Bibliographiques

Okon B, Okon V, Udom E (2020) Water infrastructure maintainability—issues and challenges in the coastal regions of Akwa Ibom State. *Nigerian J Technol* 39(3):953–961

ONA Alger, 2011, Rapport Intervenant : Amar Chouikh Directeur central de l'exploitation et de la maintenance à l'ONA, STEP de N'Goussa une station 100% verte.

P

Peralta, R. M., Ahn, C., & Gillevet, P. M. (2013). Characterization of soil bacterial community structure and physicochemical properties in created and natural wetlands. *Science of the Total Environment*, 443, 725-732.

Pilu, R. – Bucci, A. – CerinoBadone, F. – Landoni, M. 2012. Giant Reed (*Arundo donax*L.): A weed plant or a promising energy crop? In *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 38, pp. 9163–9174. DOI: 10.5897/AJB11.4182

Pompeiano A, Huarancca Reyes T, Moles TM, Guglielminetti L and Scartazza A (2019) Photosynthetic and Growth Responses of *Arundo donax* L. Plantlets Under Different Oxygen Deficiency Stresses and Reoxygenation. *Front. Plant Sci.* 10:408.

Poulet, J. B., Terfous, A., Dap, S. Et Ghenaim, A. (2004) : station d'épuration a lit filtrants plantes de macrophytes. *Courier du savoir* n° 05 juin 2004. Université Mohamed Khider Biskra.

Public Health England. (2015). Identification of *Pseudomonas* species and other NonGlucose Fermenters. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 17 Issue 3.

Public Health England. (2016). Identification of *Clostridium* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 8 Issue 4.1.

Public Health England. (2018). Identification of *Bacillus* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 9 Issue 3.1

R

Références Bibliographiques

Randriamisaina, K. A. N. (2015). Selection et identification des souches telluriques impliquées dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Mémoire de master 1^{er} université d'Antananarivo. Option : Génie de l'Eau et Génie de l'Environnement.

Razkallah, Z., Zerari, A. (2013). Etude de la qualité bactériologique des eaux de quelques zones humides du complexe de Guerbes-Sanhadja (Wilaya de Skikda). Mémoire master l'université 8 mai 1945 Guelma. Option : Microbiologie de l'environnement : Santé, Eau et Environnement.

Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. American Society for Microbiology, ASM Microbe Library.

Roane T. M., Josephson K. L., Pepper I. L. Dual-bioaugmentation strategy to enhance remediation of cocontaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67 (7) 3208–3215.

Ruiz, H. (2017). *Optimisation de la filière Filtre Planté de Roseaux appliquée au traitement des effluents domestiques pour différents niveaux de performances* (Doctoral dissertation, Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique Bretagne Pays de la Loire).

S

Saggaï M.M,2004: Contribution à l'étude d'un système d'épuration à plantes Macrophytes pour les eaux usées de La Ville de Ouargla. Mémoire de magister l'université de Ouargla. Option : Protection de l'environnement.

Shanthakunnari, P. B. S., Isaac, H. (1971). Mannitol-motility Medium In Routine Diagnostic Enteric Bacteriology. *Indian J Med Res*, 59, 377-381.

Singh R., Singh P., Sharma R. Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: a review. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2014; 4(1) 1–6.

Références Bibliographiques

Singh, D., Gupta, R., est Tiwari, A., 2011. Phytoremediation of Lead From Wastewater Using Aquatic Plants. *International Journal of Biomedical Research*.

Smith, K., Liu, S., Liu, Y., & Guo, S. (2018). Can China reduce energy for water? A review of energy for urban water supply and wastewater treatment and suggestions for change. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 41-58.

Syed, S. et Chinthala, P. (2015). Heavy metal detoxification by different *Bacillus* species isolated from solar salterns. *Scientifica*, 2015(3): 1-8.

T

Taylor W. I, Achanzar D. Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae. *ApplMicrobiol.* 1972 Jul ; 24(1):58-61. doi: 10.1128/am.24.1.58-61.1972. PMID: 4560474; PMCID: PMC380547.

Tournus C., (2016), Validation de l'identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF via la caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques, Université de Rouen, Paris.

U

Uğur A, Ceylan Ö and Aslım B, (2012). Characterization of *Pseudomonas* spp. from seawater of the southwest coast of Turkey. *J. BIOL. ENVIRON. SCI.*, Vol: 6 (16):15-23

Ustaoglu, F., Tepe, Y., & Taş, B. (2020). Assessment of stream quality and health risk in a subtropical Turkey river system: A combined approach using statistical analysis and water quality index. *Ecological indicators*, 113, 105815

V

Vincent C., Dufour S. (2007). Phytoépuration et récupération deseaux de pluies. ColiattiVicent Sébastien Dufour.CNT-AIT 63, 2 place Poly, 63100 Clermont Ferrand. cntait63@gmail.com

Références Bibliographiques

Vymazal J., Kröpfelová L. (2009): Removal of organics in constructed wetlands with horizontal sub - surface flow: A review of the field experience. *Science of The Total Environment*, 2009, vol. 407, n° 13, pp.3911-3922.

W

Wasilkowski D., Swedziol Ż., Mrozik A. The applicability of genetically modified microorganisms in bioremediation of contaminated environments. *Chemik* 2012; 66 (8) 822–826.

WHO (2011) Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization, Geneva.

Wurtsbaugh WA, Paerl HW, Dodds WK (2019) Nutrients, eutrophication and harmful algal blooms along the freshwater to marine continuum. *Wiley Interdisciplinary Rev Water* 6(5):e1373

V

Vullo DL, Ceretti HM, Daniel MA, Ramírez SA, Zalts A. Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresour Technol.* 2008 Sep;99(13):5574-81.

X

Xiao, E., Zhou, Y., Xu, D., Lu, R., Chen, Y., Zhou, Q., & Wu, Z. (2020). The physiological response of *Arundo donax* and characteristics of anodic bacterial community in BE-CW systems: Effects of the applied voltage. *Chemical Engineering Journal*, 380, 122604.

Xu, Zhi; Zhao, Bing; Wang, Yuyun; Xiao, Jinliang; Wang, Xuan (2019). *Composting process and odor emission varied in windrow and trough composting system under different air humidity conditions. Bioresource Technology*, (), 122482

Z

Références Bibliographiques

Zhang D, Jiang Q, Liang D, Huang S and Liao J (2021) The Potential Application of Giant Reed (*Arundodonax*) in Ecological Remediation.

Zhao, G., Huang, X., Tang, Z., Huang, Q., Niu, F., and Wang, X. (2018). Polymer-based Nanocomposites for Heavy Metal Ions Removal from Aqueous Solution: a Review. *Polym. Chem.* 9, 3562–3582.

Zhilina, T.; Appel, R.; Probian, C.; Brossa, E.; Harder, J.; Widdel, F.; Zavarzin, G. (2004). "Alkaliflexusimshenetskii gen. Nov. Sp. Nov., a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermenting bacterium with propionate formation from a soda lake". *Archives of Microbiology.* 182 (2–3).

Annexes

Annexes

Annexe 01 : les milieux de culture

Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande	01 g
Extrait de levure	02 g
Peptone	05 g
Chlorure de sodium (NaCl)	05 g
Agar	14 g
pH	7, 3±0,2
Eau distillée	01 L

Gélose cétrimide (GC)

Peptone de gélatine	16 g
Peptone de caséine	10 g
Bromure de tétradonium (cétrimide)	0.2 g
Acide nalidixique	15 mg
Sulfate de potassium	10 g
Chlorure de magnésium	1.4 g
Agar	10 g
Eau distillé	01 L
pH	7,1

Gélose à amidon

Gélose nutritive	100 ml
Amidon	01 g

Annexes

Viande foie sulfite de fer (VFSR)

Peptone viande-foie	30 g
Glucose	2 g
Amidon soluble	2 g
Extrait de levure	2 g
Sulfite de sodium	2,5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Agar	11 g
Eau distillé	01 L

Mannitol-mobilité

Hydrolysate trypsique de caséine	10,0 g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,04 g
Nitrate de potassium	1,0 g
Agar	3,5 g
Eau distillé	01 L
pH	7,6

Annexe 02 : Solutions et réactifs

- Eau distillée stérile
- Eau oxygénée (H₂O₂)
- Violet de gentiane
- Solution de Lugol
- Ethanol
- Fuschine

Annexes

Annexe 03 : Appareillages

- Bec bunsen



- Microscope optique (MOTIC)



- Etuve (MEMMERT)



Annexes

- Balance de précision



- Autoclave



- Bain Marie



Annexes

- Plaque chauffante et agitateur magnétiques



- Réfrigérateur (SAMSUNG)

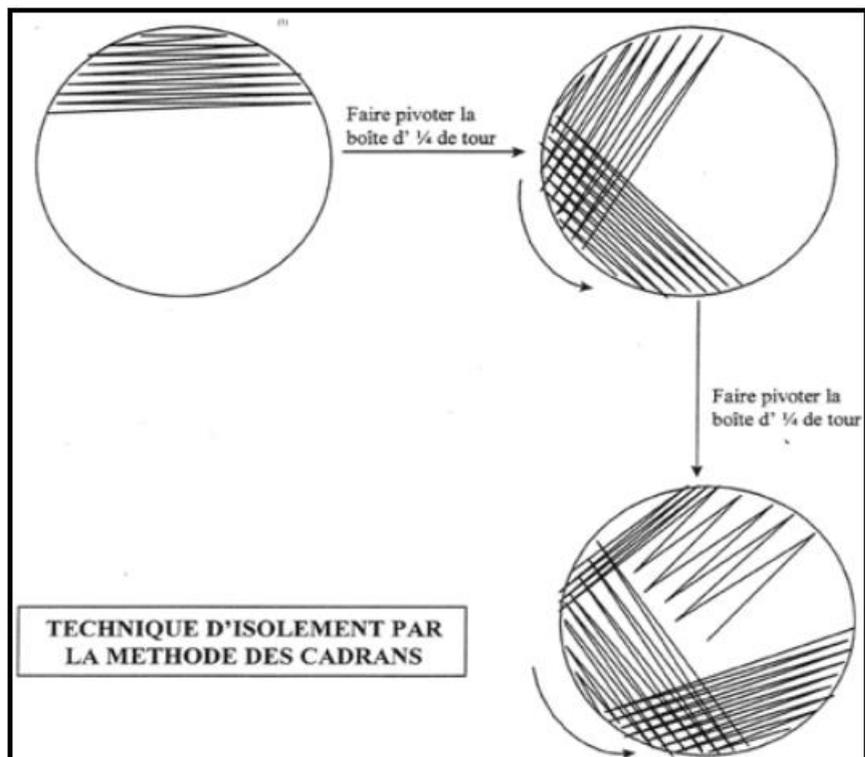


Annexes

- Thermomètre



Annexe 04 : La technique de quatre cadrans



Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Menadi et Boumaza, 2016).