REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : : Microbiologie Appliquées

Par :

BRAHIM BOUZID MANEL
AISSAT ZOHRA
GUEROUAMSA RADIA

Thème :

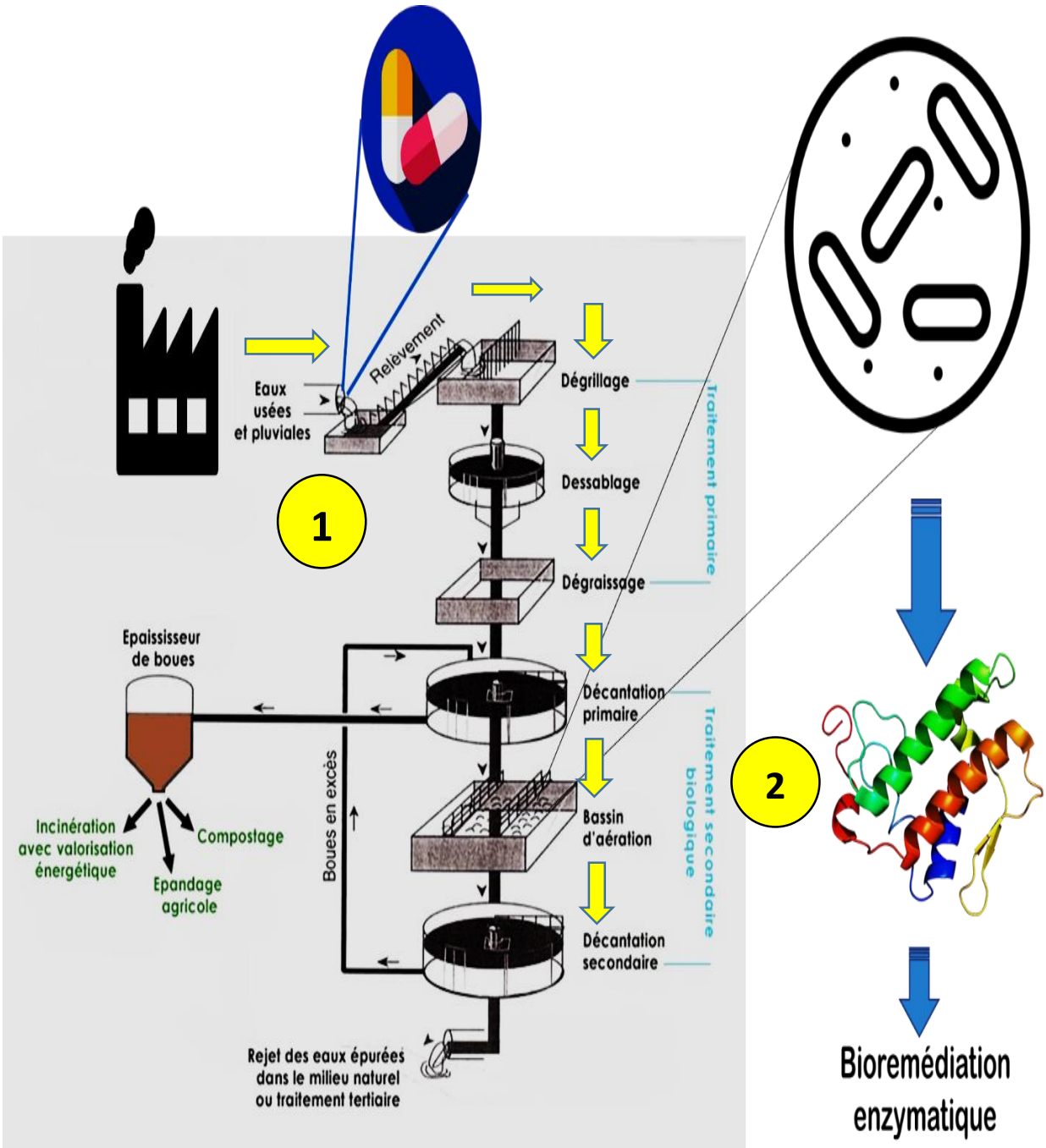
Contribution à la valorisation de biocatalyseurs enzymatiques extraite à partir d'une boue activée pour le traitement d'eaux polluées par des contaminants organiques.

Soutenue publiquement le : 24/06 /2023., Devant le jury composé de :

KIRDI Rachida	MCB– Univ.de Médéa	Présidente
YOUS Radhia	MCA-Univ.de Médéa	Examinatrice
CHERIFI Hakima	Pr – Univ. de Médéa	Examinatrice
AZIZI Ahmed	**MCA– Univ.**de **Laghouat**	**Promoteur**
AINAS Mahfoud	**MCB– Univ.de Médéa**	**Co-Promoteur**
LATRECHE Soufiane	Doctorant – Univ. de Laghouat	Invite

Année universitaire 2022/2023

Résumé graphique



المساهمة في تثمين المحفزات الحيوية الأنزيمية المستخرجة من الحمأة المنشطة لمعالجة المياه الملوثة بالملوثات العضوية.

الملخص

تستخدم المحفزات الحيوية الأنزيمية من الحمأة المنشطة لمعالجة المياه الملوثة بالملوثات العضوية، مما يساعد على زيادة قيمتها، وهو نهج مستدام وواعد كانت الأهداف المحددة هي دراسة سلالات الحمأة المنشطة في المختبر التي تستخرج الإنزيمات لتحلل الملوثات. تتمثل المعالجة الحيوية الأنزيمية في إزالة التلوث من المياه الملوثة بالوسائل التقنية الناتجة عن التحلل الكيميائي بالطرق التالية: تنشيط وتحسين ظروف نمو الحمأة المنشطة وفحص الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في الحمأة المنشطة ومحاولات التحلل الأنزيمي للحمأة بواسطة اللاكاسي والبيروكسيديز للسلالات المحددة. بعد التعرف، الكائنات الحية الدقيقة التي تم الحصول عليها هي: " *Klebesiella oxytoca*, Pseudomonas aeruginosa, *Pentoea spp3*" وعن طريق استخراج الإنزيمات هي: بيروكسيديز ولاكاسيس التي تنقي وتحلل الملوثات العضوية "الأمبيسلين وديكلوفيناك". العائد من البيروكسيديز الذي تم العثور عليه في بنتوا سب 3 هو الأمبيسلين المتدهورة إلى 98.72 ٪، والعائد من البيروكسيديز الذي تم العثور عليه في بنتوا سب 3 هو ديكلوفيناك المتدهورة إلى 92.45 ٪ والعائد من لاكاس التي وجدت في كليبيسيلا أوكسيتا هو ديكلوفيناك المتدهورة إلى 73.33 ٪ أيضا العائد من لاكاس التي وجدت في بنتوا سب 3 هو تدهور الأمبيسلين في 86.66٪ .

الكلمات المفتاحية: الحمأة المنشطة، مياه الصرف الصحي، لاكاز، البيروكسيديز؛ المعالجة الحيوية.

.

Contribution à la valorisation de biocatalyseurs enzymatiques extraite à partir d'une boue activée pour le traitement d'eaux polluées par des contaminants organiques.

Résumé

Les biocatalyseurs enzymatiques issus des boues activées sont utilisés pour traiter l'eau contaminée par des polluants organiques, contribuant à augmenter sa valeur, ce qui est une approche durable et prometteuse. Les objectifs fixés étaient d'étudier *in vitro* les souches d'une boue activée qui extraite les enzymes pour dégradé les polluants. La bioremédiation enzymatique consiste à la décontamination des eaux polluées au moyen technique issue de la dégradation chimique par les méthodes suivantes : Activation et optimisation de conditions culturales de la boue activées et screening des microorganismes présents dans la boue activée et Essaie de dégradation enzymatique des PEs par la laccase et peroxydase des souches identifier. Après l'identification ont obtenu les microorganismes sont : « *Klebesiella oxytoca,* Pseudomonas aeruginosa, *Pentoea spp3* » et en extrayant des enzymes sont : la peroxydase et la laccase qui purifier et dégrader les polluants organiques "Ampicilline et Diclofénac". Le rendement de la peroxydase qui se trouve *Pentoea spp3*est dégradé l'ampicilline à 98,72%, et le rendement de la Peroxydase qui se trouve dans *Pentoea spp3* est dégradé diclofénac à 92.45% et le rendement de la laccase qui se trouve dans *Klebesiella oxytoca* est dégradé diclofénac à 73,33 % aussi le rendement de la laccase qui se trouve dans *Pentoea spp3* est dégradé l'ampicilline à 86,66%.

Les mots clés : Boue activées, Eaux usées, Laccase, Peroxydase ; Bioremédiation.

Contribution to the valorization of enzymatic biocatalysts extracted from activated sludge for the treatment of water polluted by organic contaminants.

Abstract

Enzymatic biocatalysts from activated sludge are used to treat water contaminated with organic pollutants, helping to increase its value, which is a sustainable and promising approach The objectives set were to study in vitro the strains of an activated sludge that extracts enzymes to degrade pollutants. Enzymatic bioremediation consists in the decontamination of polluted waters by technical means resulting from chemical degradation by the following methods: Activation and optimization of activated sludge growing conditions and screening of microorganisms present in the activated sludge and attempts at enzymatic degradation of PEs by laccase and peroxidase of the identified strains. After identification, the microorganisms obtained are: *"Klebesiella oxytoca*, Pseudomonas aeruginosa, *Pentoea spp3"* and by extracting enzymes are: peroxidase and laccase which purify and degrade the organic pollutants "Ampicillin and Diclofenac". The yield of the peroxidase which is found in *Pentoea spp3* is degraded ampicillin to 98.72%, and the yield of the Peroxidase which is found in *Pentoea spp3* is degraded diclofenac to 92.45% and the yield of the laccase which is found in *Klebesiella oxytoca* is degraded diclofenac to 73.33% also the yield of the laccase which is found in *Pentoea spp3* is degraded the ampicillin at 86.66%.

Key words: Activated sludge, Wastewater, Laccase, Peroxidase; Bioremediation.

Remerciements

Dieu "الله" merci pour nous avoir donné la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.

Tout d'abord nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à Mr Ahmed AZIZI notre promoteur et à Mr Mahfoud AINAS et Mr notre Co-promoteur de recherche et Mr Soufiane LATRACHE qui n'a jamais cessé de nous prodiguer conseils, pour avoir dirigé ce travail et pour sons aides pendant toute la durée de réalisation de ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux membres du jury : Mm KIRDI ,Mm CHERIFI et Mm YOUS d'avoir accepté de juger ce travail.

Notre profond remerciement à Mm Tifoura et Mr Soufiane MOULOUD responsable des laboratoires à l'université Yahia Farès de Médéa.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah " "ـــــــــــــهالل j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:,
M'a permis de réaliser cette œuvre et A son prophète MOHAMED, l'exemple, le guide, le sage.
A mes chers parents qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.
A mes frères,et a leurs épouses, mes sœurs et ses enfants et surtout Wahiba, Aissa, Mohamed et Naïma.
Pour ses soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long mes études.
A l'âme de ma chère grande mère j'espère que Dieu vous bénira de sa grande miséricorde.
J'adresse mes sincères remerciements à mes cousins, à leurs épouses et cousines.
A mes collègues : Manel et Radia qui m'ont aidé à achever ce mémoire.
Mes chères amies : Ratiba, Sanaa, Soumia, Imen, Hanane, Sabrina, Wissam, Khadidja, Faiza, Fadila, Kaouther, Yousra Marwa et à toute la promotion de Microbiologie 2023.
A mon adorable amie : Ratiba Zaoui, pour tous les moments et les souvenirs que nous avons passés ensemble. Que Dieu pour puissant, Tu protégé et tu gardes.
Une spéciale dédicace pour une personne qui compte déjà énormément pour moi « G. Samira ».
A mon fiancé Ahcene qu'était toujours me courage m'a offert l'énergie positive, la sagesse et les conseils en or. Merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, par ton amour et ta tendresse, je prie Dieu pour qu'il te protégé.

Zohra

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah" "ـــــــــــه,الل j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:,

A mon soleil, Ma mère, Le plus beau cadeau. Le symbole de la tendresse, du courage, de la responsabilité et de l''amour. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.

Que DIEU le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour

A ma lune, Mon cher père, école de mon enfance et berceau de ma culture. Qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les bonnes. Tes conseils ont toujours ma raison de vivre, mes sources de force, d'inspiration, de courage et d'espoirs. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

Que DIEU le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

À mes frères HICHEM et WALID

Et mon adorable sœur KHALIDA

Et bien sur notre premier neveu GHAITH AMIR

A mon chère grand-père qui je souhaite une bonne santé.

Et à tous mes familles, mes oncles, mes tantes et mes cousins surtout AMIRA ET NARIMAN.

A mes collègues RADIA et ZAHRA qui m'ont aidé à achever ce travail.

Et bien sur mes amis : RADIA, CHAHINEZ, AFFEF, HIBA, ABIR, RANIA, CHAHINEZ S, IKRAM, KHADIDJA, LOUBNA, ZINEB, AMINA, SABRINA, ZAHRA, IMEN, FAIZA, BOUCHRA, LAMIA ET TOUS LES AMIS QUE JE CONNAIS.

Manel

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah" "،اللـــــــــهj'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie:,

A mon père

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. J'espère que ce mémoire sera à la hauteur de tes attentes et qu'il soit l'accomplissement de tous tes efforts.

A ma mère

A ma chère maman, mon amie, ma confidente, ma force, qui m'encourage toujours dans ma vie et son soutient tout au long des années d'étude et sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente. Tu représentes beaucoup pour moi, Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne Longue vie et te protège pour moi.

A ma chère grand-mère

Tout d'abord, j'espère que Dieu vous bénira de sa grande miséricorde et fera votre place au paradis. Je vous remercie de nous avoir élevés depuis l'enfance et pour nous aider dans les études, dans les difficultés de la vie. Merci pour votre sourire qui enlevait les soucis et vos prières qui m'ont amené terminer ce parcours.

A mes frères RAOUF et RAHIM et mon adorable sœur FADOUA je vous souhaite une vie pleine de bonheur et que je sois toujours la sœur dont vous serez fier.

A mon époux TEDJ

Ton confiance, ton soutien, compréhension et ton encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et continuer toujours vers l'avant.

Et ma charmante fille TALINE que je l'aime

A mes chères tantes surtout RACHIDA, oncles, et ma belle-famille mes beaux pères et toute la famille SELMI Je vous remercie pour votre amour et votre soutien pour moi

A mes chères amies MANEL SABRINA CHAHINEZ et ZAHRA

Je vous souhaite beaucoup de succès, de réussite et de bonheur.

Radia

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIÈRES	
ABRÉVIATIONS & NOMENCLAUTRES	
LISTE DES FIIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES	3
1.1 POLLUANT EMERGENT	3
1.1.1 Origine de la micropollution aqueuse	4
1.1.2 Polluants émergents pharmaceutiques	6
1.1.3 Impact sur les êtres vivants et l'environnement	6
1.1.3.1 Effets potentiels sur l'homme	6
1.1.3.2 Effets potentiels sur la faune et la flore	7
1.1.4 Méthode analytique	7
1.1.5 Procèdes de traitements des polluants émergents	8
1.1.6 Les produits pharmaceutiques dans l'environnement	8
1.1.7 Les antibiotiques	9
1.1.8 les antiinflammatoire	9
1.2LES EAUX USEES ET BOUE ACTIVEES	9
1.2.1 Les eaux polluants	9
1.2.2 centre d'épuration	10
1.2.2.1 PROCEDES D'EPURATION DES EAUX USEES	10
1.2.2.2 Traitement des eaux polluées par boues activées	11
1.2.3 Les types des boues	12
1.2.3.1 Boue primaire	13
1.2.3.2 Boues activées	13
1.2.3.3 Boues mixtes	13
1.2.3.4 Boues physico-chimiques	13
1.2.4 Composition de boue activée	13
1.2.4.1 Composition microbiologique des boues	13
1.2.4.2 Matière organiques	14
1.2.4.3 Les microorganismes	15

1.3 LA BIOREMEDIATION	15
1.3.1 La bioremédiation	15
1.3.2 Les techniques de bioremédiation	16
1.3.2.1 Ex situ	16
1.3.2.2 In situ	16
1.3.3 Types de bioremédiation	18
1.3.3.1 la bioremédiation microbienne	18
1.3.3.2 phytoremediation	18
1.3.3.3 Mycoremédiation	19
1.3.3.4 La biostimulation	20
1.3.3.5 La Bioaugmentation	21
1.3.3.6 la bioremédiation intrinsèque	22
1.4 LA BIOREMEDIATION ENZYMATIQUE	23
1.4.1 Les enzymes	23
1.4.1.1 Classification des enzymes	23
1.4.1.2 Les types de enzymes	24
1.4.1.3 La méthode d'extraction	27
14.1.4 La purification enzymatique par coloration	28
1.4.1.5 Identification enzymatique par coloration	28
1.4.2 La bioremédiation enzymatique	28
1.4.2.1 Les étapes de la bioremédiation enzymatique	29
1.4.2.1.1 Evaluation de site	29
1.4.2.1.2 La collecte d'échantillons	29
1.4.2.1.3 Analyse d'échantillons	29
1.4.2.1.4 Indentification des enzymes	29
1.4.2.1.5 Production des enzymes	30
1.4.2.1.6 Méthodes de production	30
1.4.2.2 Application des enzymes dans bioremédiation	31
1.4.2.3 Evaluation de l'efficacité dans la bioremédiation	31
CHAPITRE 2. PRODUITS, MATERIELS & METHODES	32
2.1. MATERIEL	32
2.1.1 PRODUITS CHIMIQUES	33
2.1.2 Appareillage	33
2.2 Méthodes	33

2.2.1 Boues activés et conditions de culture	34
2.2.1.1Revirement de boue activée	34
2.2.1.2 Optimisation de culture des boues activées	35
2.2.2 Screening des microorganismes présents dans la boue activée	36
2.2.2.1Enrichissement sur milieu de culture	36
2.2.2.2 Isolement des bactéries	36
2.2.2.3 Identification des souches	38
2.2.3Essais de dégradation enzymatique des PEs	39
2.2.3.1 Tests de sensibilité et choix des PEs	39
2.2.3.2 Bioremédiation par la laccase	40
2.2.3.2.1 Induction de l'activité laccase	40
2.2.3.2.2 Dosage enzymatique	40
2.2.3.2.3 Purification partielle de la laccase	42
2.2.3.2.4 Dégradation *in vitro* des PEs par la laccase des souches identifiées	42
2.2.3.3 Bioremédiation par la peroxydase	43
2.2.3.3.1Induction de l'activité peroxydase	43
2.2.3.3.2 Dosage enzymatique	43
2.2.3.3.3 Dégradation *in vitro* des PEs par peroxydase des souches identifiées	44
2.2.4 Dosage de protéines totales par la méthode de Bradford	45
CHAPITRE 3. RESULTATS & DISCUSSION	47
3.1 LES CONDITION OPTIMALES D'UNE BOUE ACTIVEE	47
3.2 SCREENING DES MICROORGANISMES PRESENTS DANS LA BOUE ACTIVEE	48
3.2.1 ENRICHISSEMENT SUR MILIEU DE CULTURE	48
3.2.1.1ETUDE MACROSCOPIQUE	49
3.2.1.2 ETUDE MICROSCOPIQUE	50
3.2.1.3 étude biochimique	50
3.2.2 Isolement des bactéries	50
3.2.2.1 Observation macroscopique	50
3.2.2.2 Observation microscopique	51
3.2.2.2.1 Coloration de GRAM	51
3.2.2.3 Étude biochimique	51
3.2.3 Identification biochimique	52
4. Essais de dégradation enzymatique des PEs	53
4.1TESTS DE SENSIBILITE ET CHOIX DES PES	53

4.2 Activité enzymatique	54
4.2.1 laccase (extrait brute)	54
4.2.2 laccase semi-purifier	55
4.2.3 Peroxydase	56
5.DOSAGE DE PROTEINES .	57
5.1 laccase extrait de microorganismes .	57
6. Dégradation des polluants.	60
6.1 Dégradation d'ampicilline par la laccase brute de chaque microorganisme.	60
6.2 Dégradation d'ampicilline par la laccase semi-purifier de chaque microorganisme.	61
6.3 Dégradation de diclofénac par la laccase brute de chaque microorganisme.	62
6.4 Dégradation de diclofénac par la laccase semi-purifier de chaque microorganisme.	63
6.5 DEGRADATION D'AMPICILLINE PAR LA PEROXYDASE.	64
6.6 DEGRADATION DE DICLOFENAC PAR LA PEROXYDASE.	65
7.Comparaison de l'efficacité enzymatique de diverses souches.	66
CONCLUSION GENERALE	68
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	69
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS ET NOMENCLATURES

Abréviations	*Significations*
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique
ADH	Hormone antidiurétique.
ADH	Arginine dihydrolase
ADN	L'acide désoxyribonucléique
API20E	Analytical profile index
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Acide adénosine-triphosphorique
DBO5	La demande biochimique en oxygèneoxygène pendant cinq jours
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
EEB	extrait enzymatique brute
EEPP	extrait enzymatique purifier
ETP	L'éducation thérapeutique du patient
ETP	Education thérapeutique du patient
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
IND	Indole
LC	Chromatographie liquide
LDC	Lysine décarboxylase
LOQ	Limite de quantification
LPS	Lipopolysaccharides
MES	Les matières en suspension
MRS	deMan, Rogosa, Sharpe
MS/MS	Spectromètre de masse en tandem
MTBE	Mythel-ter-butyl ether
Ng	Nano-gramme
NPK	Azote, phosphore et potassium

ODC	Ondes de choc
ODC	Ornithine décarboxylase
P450	Pic de cytochrome
PBR	Perméable barrière réactive
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ph	Potentiel hydrogène
PL	Phospholipide
SIE	Ionisation par éléctrospray
SPE	Extraction en phase solide
TDA	Tryptophane désaminase
TSA	Gélose tryptone soja
Um	Microgramme
Vp	Voges-Proskauer

LISTE DES FIGURES

Numéros	Titres des figures	Pages
1.1.1	Sources de la micropollution aqueuse par les produits pharmaceutiques	5
1.2.1	Stratégies d'amélioration du fonctionnement de la station d'épuration	10
1.2.2	Processus des boues activées	12
1.2.3	boues d'épuration des eaux usées	12
1.3.1	le processus de bioremédiation des déchets	15
1.3.2	Technique de bioremédiation in situ	17
1.3.3	Techniques de biorestauration	17
1.3.4	Stratégies de biologie synthétique applicable à la bioremédiation	18
1.3.5	Mycoremédiation des polluants de l'environnement	20
1.3.6	Le diagramme illustré de la biostimulation	21
1.3.7	Le diagramme illustré de la bioaugmentation.	22
1.4.1	Structure chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique	25
1.4.2	Structure cristalline d'une laccase du champignon Trametes versicolor contenant les 4 cuivres	25
1.4.3	la structure de la peroxydase	26
1.4.4	Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par lipases	27
2.1	Protocole expérimentale	34
2.2	Montage expérimentale de culture et recyclage des boues activées	35
2.3	Optimisation du pH de culture libre	36
2.4	Démarche expérimentale pour l'identification des souches	38
2.5	Galerie API 20 E	39
2.6	Méthode d'extraction de la laccase	41
2.7	dégradation des polluants dans agitateur rotatif	45

3.1	Les valeurs de la densité optiques (la croissance de biomasse) dans les déférents Ph	48
3.2	Boue active : (A) Après l'ensemencement dans le milieu PCA ; (B) Après l'ensemencement dans le milieu TSA.	49
3.3	Aspect des colonies après l'isolement	50
3.4	Observation des bacilles Gram- à l'objectif X 40 après l'ajout l'huile à immersion.	51
3.5	Résultats des tests biochimiques catalase et oxydase.	52
3.6	résultats de la galerie API 20 E.	53
3.7	résultats d'antibiogramme.	54
3.8	Dosage enzymatique pour laccase brute par coloration avec l'ABTS	54
3.9	L'activité enzymatique de laccase brute des trois microorganismes en U. mL^ (−1).	55
3.10	Dosage enzymatique pour laccase purifier par coloration avec l'ABTS.	55
3.11	L'activité enzymatique de laccase semi purifier des trois microorganismes en U. mL^ (−1)	56
3.12	Dosage enzymatique pour peroxydase.	56
3.13	L'activité enzymatique de peroxydase des trois microorganismes en U. mL^ (−1).	57
3.14	Dosage de protéines.	58
3.15	Courbe d'étalonnage de l'enzyme, avec une pente égale=0,001 Lmg-1	58
3.16	Apparence de l'extrait enzymatique, avant et après la purification.	60
3.17	le rendement de la dégradation de l'ampicilline par laccase (extrait brute) extrait par Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, Pentoea spp3.	61
3.18	Le rendement de la dégradation de l'ampicilline par laccase purifier extrait par Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla boycotta, Pentoea,spp3.	62

3.19	Le rendement de la dégradation de diclofénac par laccase extrait par Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, pantoea Spp3	63
3.20	Le rendement de la dégradation de diclofénac par laccase purifier extrait par Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, Pentoea spp3.	64
3.21	Le rendement de la dégradation d'ampicilline par peroxydase extrait par Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxycota, Pentoea spp3.	65
3.22	Le rendement de la dégradation de diclofénac par peroxydase extrait par Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxycota, Pentoea spp3.	66

LISTES DES TABLEAUX

Numéros	Titres des tableaux	pages
1.1.1	Classe de polluants émergents	3
1.2.1	composition des boues résiduaires	14
1.4.1	Classification des enzymes	24
2.1	Spécifications de la boue activée fournie	33
3.1	Les valeurs de la densité optiques (la croissance de biomasse).	47
3.2	Étude macroscopiques	49
3.3	Étude microscopique	50
3.4	Étude biochimique	50
3.5	Profile de résistance et de sensibilité des souches aux antibiotiques	53
3.6	Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la laccase de Pseudomonas aeruginosa	59
3.7	Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la laccase de Kleblseilla oxytoca.	59
3.8	Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la laccase de Pentoea spp3	60
3.9	Comparaison entre la dégradation d'ampicilline par les enzymes de chaque souche étudier	66
3.10	Comparaison entre la dégradation de diclofénac par les enzymes de chaque souche étudier	67

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Ces dernières années, divers polluants ont été rejetés dans le milieu aquatique, atteignant des niveaux alarmants. En tant que méthode de traitement des eaux usées la plus largement utilisée, la méthode traditionnelle des boues activées peut éliminer efficacement la plupart des polluants, tout en éliminant également les médicaments, les pesticides, les plastiques, etc. des polluants tenaces. Autres contaminants tels que produits pharmaceutiques appelés polluants émergents ou polluants préoccupants (Sauvé et Desrosiers, 2014 ; Teodosiu *et al*., 2018). Étant donné que ces composés sont présents dans l'environnement à des concentrations allant du nanogramme au microgramme par litre, ils sont souvent difficiles à suivre ou à contrôler (Mishra *et al.*, 2020) (Virkutyte *et al*., 2010).. Ils sont souvent toxiques, se bioaccumulent facilement et sont difficiles à biodégrader naturellement, ce qui constitue une menace importante pour l'environnement et tous les organismes vivants (Sovet et Desrosiers).

À l'heure actuelle, les méthodes de traitement des eaux usées comprennent principalement des méthodes physiques et chimiques et des méthodes biologiques. Les technologies physicochimiques telles que l'oxydation chimique, la distillation, la technologie de séparation par membrane et l'adsorption ont été utilisées dans le traitement des eaux usées (Alshabib & Onaizi, 2019). Ces stratégies se concentrent sur le traitement, mais sont très coûteuses et provoquent davantage de contamination et de dégâts (Bhatnagar et Anastopoulos, 2017 ; Mohammadi *et al*., 2015 ; Villegas *et al*., 2016). Les méthodes biologiques sont plus respectueuses de l'environnement et peuvent éliminer la plupart des contaminants des eaux usées. Ces méthodes utilisent des plantes, des micro-organismes et des enzymes pour traiter les eaux usées **(**Alshabib & Onaizi, 2019**).** Les micro-organismes utilisés dans ces technologies peuvent dégrader ou adsorber les contaminants au cours du processus.

Cette enzyme est un biocatalyseur très efficace qui biodégrade spécifiquement les substances dans des conditions douces **(**Brandelli *et al*., 2015 ; Yao *et al*., 2020**).** À l'heure actuelle, des enzymes telles que la lipase, la laccase et la peroxydase ont été commercialisées. Les laccases et les peroxydases sont largement utilisées pour éliminer certains micropolluants organiques (Ji *et al*., 2016, Stadlmair *et al*., 2017, Zerva *et al.*, 2017) en raison de leur large spécificité de substrat ou de leur **(**Varga *et al*., 2019**).** La technologie enzymatique répond aux tendances

de la « chimie verte ». Les méthodes enzymatiques ont une cinétique de réaction plus élevée et nécessitent moins d'eau et d'énergie que les procédés chimiques traditionnels. Les enzymes ne sont donc pas consommées par la réaction et peuvent ensuite être recyclées(Kalia *et al*., 2013, Summerscales, 2021**)**. Contrairement aux bactéries et à d'autres méthodes biologiques, les enzymes n'entrent pas en compétition avec d'autres formes de vie microbienne **(**De Cazes *et al*., 2014, Demarche *et al*., 2012**).** Par conséquent, les méthodes enzymatiques devraient éliminer les contaminants résistants aux médicaments et les micropolluants organiques des eaux usées.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui porte sur le traitement des eaux polluant par des contaminants organiques, le traitement se fait par les enzymes extraits à partir d'une boue activée qui dégradent ces polluants émergent.

Le présent manuscrit est présenté de la façon suivante :

Le premier partie est consacré à la synthèse bibliographique relative à la présence des produits pharmaceutiques dans les eaux polluées ainsi que leur impacts et risques potentiels associés à ces composés.

Le deuxième partie représente l'ensemble des méthodes expérimental et comporte : une présentation du matériel, méthodologie expérimentaux utilisés dans la réalisation de cette étude.

Le troisième partie présente l'ensemble des résultats obtenus expérimentalement et leur discussion.

1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUES

1.1 POLLUANT EMERGENT

Les composés dits "polluants émergents" sont des substances présentes dans l'environnement à de faibles concentrations grâce à une meilleure surveillance et au développement de techniques analytiques.

Pour nombre de ces composés, il existe peu de données sur leur devenir, et leur comportement dans l'environnement et leurs éventuels effets sur les organismes sont encore mal définis (Maroga Mboula, 2012).

Le terme "polluants émergents" comprend les composés de nature chimique ou biologique d'origine industrielle, agricole, domestique ou naturelle. Comme le montre le tableau, ils peuvent être classés en polluants émergents, stéroïdes, médicaments humains ou vétérinaires, produits de dégradation des détergents non ioniques, désinfectants, phtalates, etc... tel qu'il est présenté dans le tableau (1.1.1) *(*Maroga Mboula, 2012*).*

Tableau (1.1.1) : Classe de polluants émergents (Maroga Mboula, 2012).

Produits	**Exemples de composé**
Produits pharmaceutiques	
Antibiotiques	Triméthoprime, érythromycine, lincomycine, sulfaméthoxazole
Analgésiques, anti Inflammatoires	Codéine, ibuproféne, acétaminophène, aspirine, diclofénac, fénoproféne
Médicaments psychotiques	Diazépam
Régulateurs de lipide	Bézafibrate, acide clorifibrique, acide fénofibrique
ß-bloquants	Métoprolol, propanol, timolol
Stéroïdes et hormons	Estradiol, oestrone, oestriol, diéthylstibestrol

Produits	Exemples de composé
Produits à usage ménager	
Parfums Produits solaires Insecticides Antiseptiques	Polycyclique, macrocyclique Benzophénone, méthylbenzylidène N,N-diéthyltoluamide Triclosan, chlorophène
Les tensioactifs et leurs Métabolites	Ethoxylates d'alkylphénol, 4-nonylphénol, 4-octylphénol,Carboxylates d'alkylphénol
Produits à retard de flamme	Ethers diphényliquespolybromés, tétrabromobisphénol A
Additifs industriels	Agents chélatant (EDTA), sulfate aromatique
Additifs d'essence	Dialkyl d'éther, méthyl-ter-butyl éther (MTBE)

Les polluants émergents sont présents dans l'environnement à des concentrations allant de nano-grammes/litre à microgrammes/litre. Ils pénètrent dans l'environnement par les effluents des stations d'épuration, les excréments d'animaux (médicaux), la diffusion des boues, les lixiviats des décharges, etc.

En conséquence, les organismes sont exposés à une grande variété de composés qui peuvent avoir des effets délétères. Les effets potentiels de ces composés sur les humains, les animaux et les plantes doivent être déterminés (Maroga Mboula, 2012).

1.1.1 Origine de la micropollution aqueuse

De nombreuses études démontrent que la plupart des eaux de surfaces étudiées sont polluées par les produits pharmaceutiques. De même, la présence de ces produits s'est avérée dans les eaux de surface, les eaux souterraines et résiduaires, les boues des stations d'épuration utilisées en épandage agricole et même dans l'eau potable (N. Boukhalfa,2014).

Les principales sources de pollution des eaux par les produits pharmaceutiques, peuvent être distinguées en deux types : les sources diffuses issues principalement des excrétions humaines et

animales, et représentant la plus grande partie des médicaments rejetés dans l'environnement, et les sources ponctuelles qui sont à l'origine d'émissions beaucoup plus concentrées mais limitées sur le plan géographique (N. Boukhalfa,2014)

On retrouve, parmi les sources diffuses (N. Boukhalfa,2014) :

- Le stockage et l'élimination inappropriés des médicaments périmés ou inutilisés,
- L'excrétion métabolique, par la voie urinaire ou digestive, des médicaments consommés par les hommes et les animaux,
- Le rejet direct des médicaments dans les eaux résiduaires des industries pharmaceutiques et chimiques fines,
- L'élimination directe ou indirecte des agents pharmaceutiques utilisés dans les établissements de soins (laboratoires, hôpitaux, etc.…),
- La dispersion directe des médicaments vétérinaires dans l'environnement en aquaculture ou lors de traitement des animaux d'élevage, ou la dispersion indirecte en cas d'épandage des lisiers et des purins dans les sols destinés à l'agriculture,
- La dispersion directe des molécules thérapeutiques sous formes de compléments alimentaires versées directement dans les bassins de pisciculture. La figure suivante résume ces principales voies de pollution des eaux par les produits pharmaceutiques :

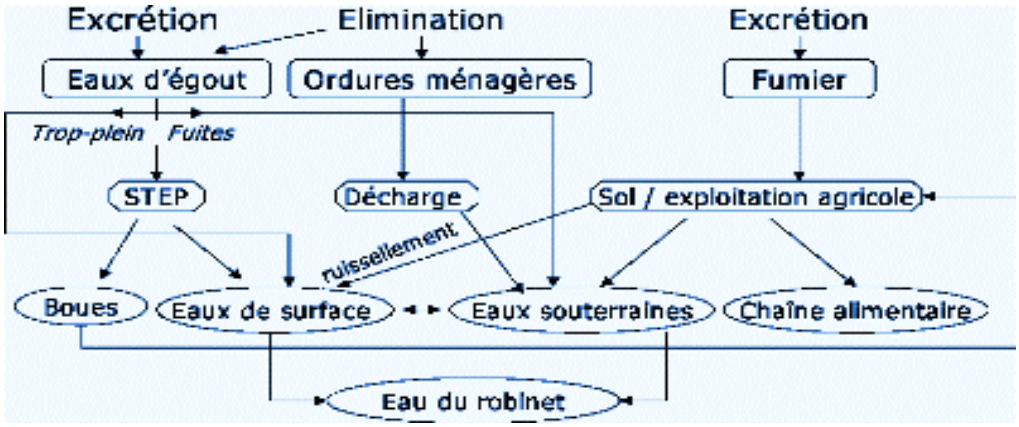


Fig. 1.1.1 Sources de la micropollution aqueuse par les produits pharmaceutiques.

1.1.2 Polluant émergent pharmaceutique

Humains (Klavarioti, Mantzavinos et Kassinos, 2009). Ils sont généralement lipophiles et résistants à la biodégradation, et ont donc un grand potentiel d'accumulation et de persistance dans l'environnement *(*Paxeus, 2004).

De plus, les médicaments peuvent être stables dans l'environnement ou soumis à une transformation biotique et/ou abiotique, et dans la transformation abiotique, la photo dégradation est le processus d'élimination le plus important. Les substances médicamenteuses sont des molécules aux propriétés cicatrisantes, Prophylaxie ou médication pour établir un diagnostic. Elles sont classées selon :

- L'effet pour lequel elles sont conçues (Antibiotiques, Analgésiques…),
- Leur structure chimique (parmi les Antibiotiques : Quinolones, Céphalosporine…),
- Leur mode d'action (anti-métabolites ou agents alkylants) *(*Ra, Oh, Lee, & Kim, 2008).

Leurs propriétés physico-chimiques leur permettent de traverser les biofilms, compte tenu de leur intérêt récent, sont généralement considérés comme des polluants émergents et sont souvent classés dans une catégorie dite de « micropolluants » car on les retrouve dans les milieux aquatiques à des concentrations de 1 nano-gramme par litre ou Microgrammes (Ra *et al.,* 2008**).**Les médicaments conçus pour être biologiquement actifs peuvent également être préoccupants, mais également importants pour nous, pour leurs interactions avec des organismes non ciblés dans l'environnement, ce qui peut parfois conduire à la formation de produits plus toxiques que le composé d'origine (Isidori,Bellotta, Cangiano&Parrella,2009).

1.1.3 Impact sur les êtres vivants et l'environnement

1.1.3.1 Effets potentiels sur l'homme

Les effets des contaminants sur les hommes sont difficiles à étudier car l'expérimentation sur l'homme est limitée. L'impact des polluants sur les hommes est, en général, mis en évidence par des études épidémiologiques ou estimer en fonction des tests sur les animaux et les cellules. Par exemple, l'exposition aux substances à action endocrine qui induit une baisse de la reproduction chez les animaux est également soupçonnée de provoquer une baisse de la reproduction chez les humains. Les perturbateurs endocriniens comme le bisphénol A et la

17ù-œstradiol sont soupçonnés de participer au développement du cancer du sein, du cancer des testicules et de la prostate *(*Maroga Mboula, 2012).

1.1.3.2 Effets potentiels sur la faune et la flore

La présence des contaminants dans l'environnement entraine des interrogations notamment sur les effets qu'ils peuvent avoir sur l'écosystème. Ainsi, de nombreuses études sont effectuées afin d'identifier les effets probables sur la flore et la faune. Dans la littérature, les études de toxicité les plus rencontrées sont les évaluations d'effet de toxicité aigüe. Cette dernière est étudiée in vivo, chez l'animal après exposition à des doses relativement élevées ou in vitro, avec des tests sur des cultures cellulaires. En plus des effets mis en évidence dans les études en laboratoires, il existe des observations d'effet dans le milieu naturel. Un des exemples d'effet observé dans le milieu naturel, qui fut également largement médiatisé, est celui observé sur la reproduction des alligators du lac Apopka en Floride.

Dans les années 90, ce lac fut l'objet d'une contamination accidentelle par des insecticides organochlorés (DDT en particulier). La présence de ces organochlorés a entraîné une démasculinisation des alligators mâles. Les chercheurs ont également observé un faible taux de reproduction et une baisse de la capacité de maturation des œufs des oiseaux se nourrissant des poissons du lac Apopka *(*Maroga Mboula, 2012).

1.1.4 Méthode analytique

Les produits pharmaceutiques sont des composés organiques polaires et non volatils. La chromatographie en phase liquide combinée à une méthode de pré concentration appropriée offre des limites de détection qui vont de faibles ng $L^{-}1$ au µg $L^{-}1$ qui sont suffisantes ou une surveillance adéquate des produits pharmaceutiques dans l'environnement. Des techniques hybrides telles que le piège à ions et la liquide chromatographie et détecteur de spectrométrie de masse LC-MS/MS, toutes deux associées à la source SIE ionisation par électro spray ont été rapportées pour l'analyse des produits pharmaceutiques. Cependant, la LC-MS reste la meilleure option pour l'analyse environnementale des produits pharmaceutiques (de García, García-Encina, &Irusta-Mata, 2017).

La chromatographie liquide couplée à la spectroscopique ultraviolet- visible et au détecteur à barrettes de diodes a récemment été rapportée pour l'analyse des produits pharmaceutiques. Les valeurs de la LOQ limite de quantification différent entre les différentes études utilisant les mêmes techniques analytiques en raison des différents facteurs d'enrichissement obtenus grâce aux différents volumes d'échantillons filtrés par les cartouches SPE l'extraction en phase solide.

Polluants organique polaires et non volatils. Y compris les produits pharmaceutiques. L'accès à des techniques analytiques hybrides sensibles pour une surveillance adéquate des polluants dans l'environnement reste une préoccupation croissante.

La présence et l'élimination des produits pharmaceutiques dans les systèmes d'eau, indiquant l'émergence de connaissance et de ressources dans l'analyse environnementale d'analyse des polluants. Notamment, la plupart des études qui ont été menées en Afrique sur l'analyse des produits pharmaceutiques ont été effectuées à l'aide de techniques LC-MC disponible dans différents laboratoires. De techniques analytiques pour l'analyse des produits pharmaceutiques dans l'environnement (Guerra, Kim, Shah, Alaee, &Smyth, 2014).

1.1.5 Procédés de traitements polluants émergents

Pour atteindre la qualité conforme à la réglementation à partir d'une eau brute, il est nécessaire de mettre en place des traitements efficaces et multiples. Ils forment une chaîne de traitement, plus ou moins sophistiquée qui doit être évolutive étant donné que les caractéristiques de l'eau à traiter ainsi que les exigences normatives sont susceptibles d'être modifiées. Les méthodes utilisées sont classées selon trois catégories principales (McAdam, 2006, Leiknes, 2009) :

- Les procédés physiques,
- Les procédés biologiques
- Les procédés chimiques.

1.1.6 Les produits pharmaceutiques dans l'environnement

Parmi les micropolluants émergents, les médicaments ont depuis plusieurs années. Ce sont des substances actives qui peuvent rester longtemps dans l'eau, On le trouve principalement dans les eaux usées. De plus, des composés médicamenteux similaires Les humains et les animaux peuvent être dégradés in vivo, Les produits de dégradation métabolique, également excrétés dans l'urine, peuvent également être Considérés comme des micropolluants (Djemai, Boukrouk & Rouibah, 2020).

Stations d'épuration, bien qu'elles soient technologie de ces dernières années, n'a pas été conçue pour éliminer toutes les molécules médicament. Par exemple, même si le paracétamol y est dégradé à plus de 90 %, ondes traces se retrouvent dans les eaux usées recyclées puis dans les eaux de surface. Certains composés, comme le diclofénac ou la carbamazépine, sont difficiles à

décomposer. Ces résidus de produits pharmaceutiques, rejetés dans les eaux de surface, peuvent donc présenter un risque environnemental non négligeable (Djemai et *al*., 2020).

1.1.7 Les antibiotiques

Les antibiotiques regroupent différentes familles : Les pénicillines, les bêta-lactamines bactéricides parmi lesquelles l'amoxicilline, les céphalosporines (cefixime, ceftriaxone) inhibant la synthèse de la paroi bactérienne, les aminosides (gentamicine), bactéricides inhibant la synthèse protéique, les macrolides (érythromycine, clarithromycine), les bactériostatiques agissant aniveaudes sous-unités ribosomales 50S,les tétracyclines(doxycycline) à propriété bactériostatique, et les fluor quinolones (ciprofloxacine,norfloxacine), bactéricides inhibiteurs de la synthèse l'ADN. L'association de sulfamides(sulfaméthoxazole) et de benzylpyrimidine (Triméthoprime) présente une action bactéricide par inhibition de la synthèse de l'acide folique (Madikizela *et al*., 2020).

1.1.8 Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments utilisés pour traiter l'inflammation de manière locale ou générale. Ce sont des médicaments symptomatiques qui n'agissent pas sur l'étiologie de l'inflammation et se manifestent lorsque ce processus physiologique devient destructeur, notamment en raison de la douleur qu'il provoque (MOUSSAOUI. A., DAHMAN. M. 2012).

1.2 LES EAUX USEES ET LES BOUES ACTIVEES

1.2.1 Les eaux polluées

« La pollution de l'eau s'entend comme, une modification défavorable nocive des propriétés physico-chimiques et biologiques, produite directement ou indirectement par les activités humaines, les rendant impropres à l'utilisation normale établit ».

Les eaux usées sont toutes les eaux des activités domestiques, agricoles et industrielles chargées en substances toxiques qui parviennent dans les canalisation d'assainissement. Les eaux usées englobent également les eaux de pluies et leur charge polluante, elles engendrent au milieu récepteur toutes sortes de pollution et de nuisance (Du gniolle, 1980 ; Glanic et Benneton, 1989).

1.2.2 Centre d'épuration

Une station d'épuration est un centre de traitement de l'eau qui peut remplir deux missions distinctes :

- recycler les eaux usées en éliminant les polluants avant leur rejet dans leur milieu naturel,
- rendre les eaux naturelles propres et sans danger pour la consommation humaine.

Elle est installée à l'extrémité d'un réseau de collecte des égouts et en amont du milieu naturel. Il existe plusieurs filières de station d'épuration selon le type et la quantité de pollution traiter.(El Hifnawy C, 2012)

1.2.2.1 Procédés d'épuration des eaux usées

Les déférents procèdes épuratoire sont décrits dans l'ordre classiquement adopte une épuration (El Hifnawy C, 2012) **:**

- Prétraitement : dégrillage, dessablage, déshuilage.
- Traitement primaire : procède décantation physique, procède décantation chimiques.
- Traitement secondaire(biologique) : épuration biologique des matières organique.
- Traitement tertiaires : azote, phosphore, désinfection, traitement des boues.

La figure suivante résume ces procédés :

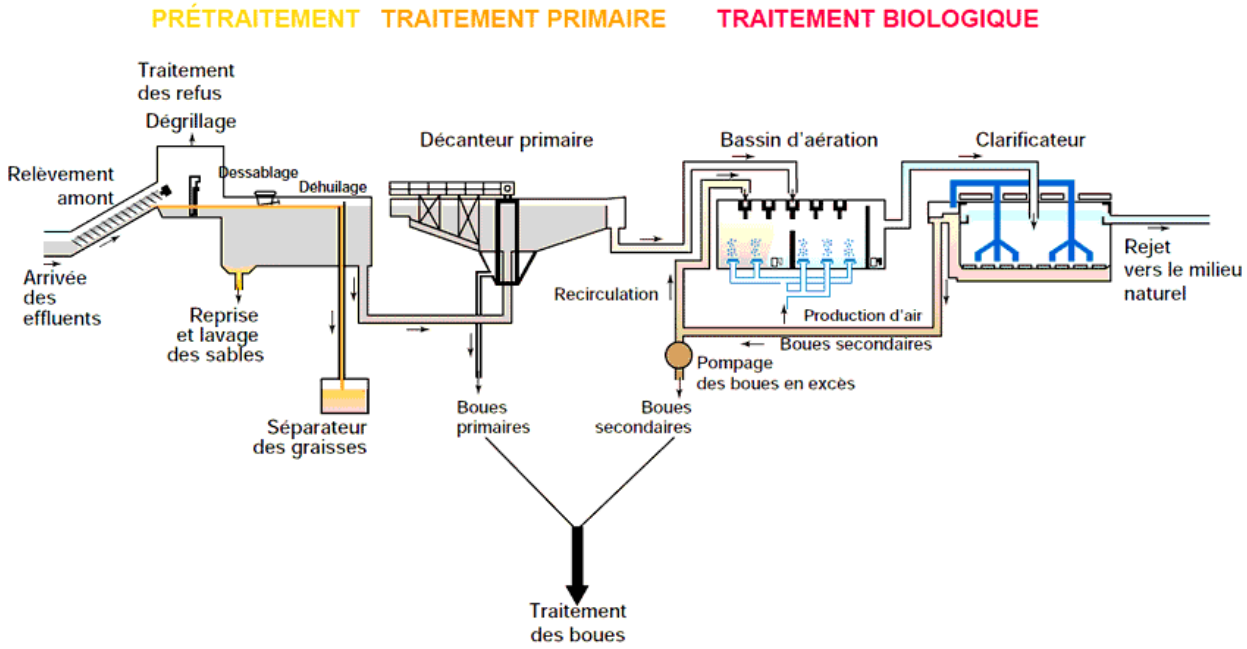


Fig.1.2.1 Stratégies d'amélioration de la station d'épuration (Henri A *et al.*,2004).

1.2.2.2 Traitement des eaux polluées par boues activée

Ces bassins appelés aussi bassins d'oxydation mettent en œuvre une biomasse bactérienne libre associée en flocs. Ces flocons de boues comprennent des microorganismes hétérotrophes et autotrophes nitrifiants lorsque le temps de séjour de la boue est suffisant pour que leur multiplication produise une biomasse active dans le traitement. Un procédé à boues activées visant à éliminer les matières organiques (pollution carbonée, parfois azotée et/ou phosphaté) comprend les éléments suivants :

• Bassin d'aération, une à quatre phases sont réalisées dans ce bassin, selon le type et le niveau de traitement souhaité

• Dans tous les cas, un bassin avec apport d'air (turbine ou diffusion de micro bulles) de manière à obtenir une teneur en oxygène dissous suffisante pour l'activité biologique afin de permettre l'élimination du carbone et, si besoin, la nitrification des composés azotés ;

• Dans le cas du traitement de l'azote, une ou deux étapes anoxiques permettant de dénitrifier les composés azotés ;

• Dans le cas du traitement du phosphore par voie biologique, une étape anaérobique (généralement en amont de tous les autres bassins) ;

• Dans le cas du traitement de l'azote, une recirculation des boues mixtes du bassin aéré vers le 1er bassin anoxique. -bassin de décantation secondaire (dit aussi clarificateur) (Djeddi H, 2007).

Le procédé à boues activées consiste à provoquer le développement d'un floc bactérien dans un bassin alimenté en eaux usées à traiter (bassin d'aération) (Kollar, 2004), l'apport d'air dans le bassin d'aération pour la satisfaction de la DBO5 et pour la respiration de la masse cellulaire. Il est destiné à contribuer au brassage et au maintien en suspension des boues activées (Berné et Cordonnie, 1991).

Il permet d'obtenir des performances poussées pour éliminer le carbone, l'azote et le phosphore. Le bassin d'aération peut être précéder d'un décanteur primaire dans le but d'éliminer les matières en suspension décan tables et sera suivie d'un clarificateur qui assurera la séparation de l'effluent épurée avec les boues, celle-ci seront en partie recyclée dans le bassin d'aération pour assurer le

réensemencement et la concentration permanente, et l'autre partie extraites vers le traitement des boues **(**Koller ,2004). Voir la figure suivante :

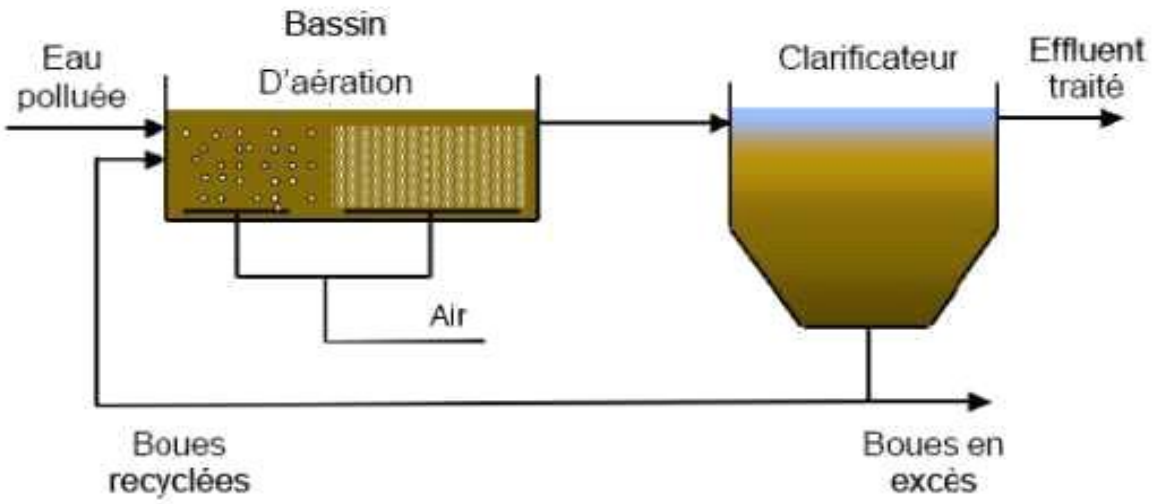


Fig. 1.2.2 Processus des boues activées **(**Bassompierre, 2007).

1.2.3 Les Types de boue

Les boues activées sont l'accumulation de micro-organismes qui dégradent la matière organique lors du traitement des eaux usées biologiques aérobies. Une boue activée se compose principalement de bactéries, de champignons et de protozoaires.

Les boues activées sont des matières solides en suspension qu'ils soient organiques ou inorganiques dans les eaux usées qui se déposent dans les bassins de sédimentation des stations d'épuration **(**SHEPU, 2015**).**

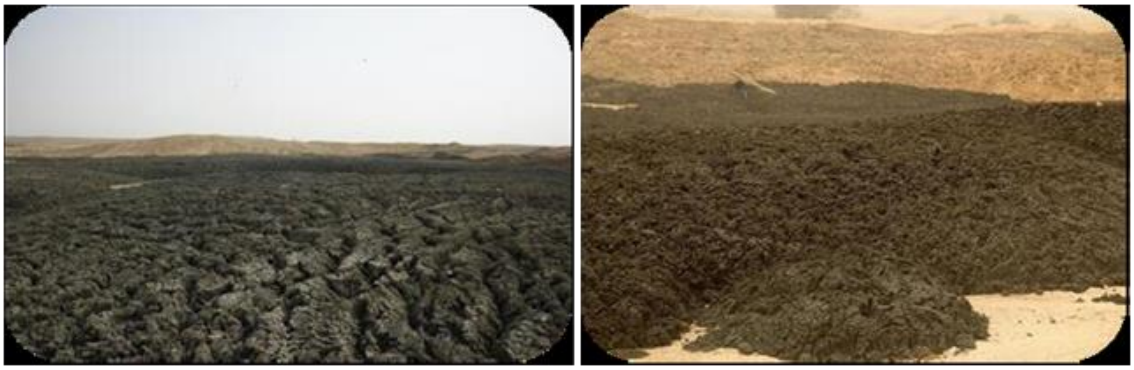


Fig.1.2.3 boues d'épuration des eaux usées **(**RCFRC, 2017).

Il existe quatre types de boues, à savoir :

1.2.3.1 Boues primaires

Celles-ci, appelées boues fraîches, proviennent du décanteur primaire en décantant le MES contenu dans les eaux usées (Addou, 2009).

1.2.3.2 Boues activées

Elles sont obtenues à partir de procédés biologiques avec des cultures libres. Les microorganismes se développent en suspension dans des bassins alimentés en eau à traiter et en oxygène apporté par l'air et sont donc en contact permanent avec les matières polluantes à dégrader **(**Diakhate, 2010**).**

1.2.3.3 Boues mixtes

C'est un mélange de boues biologiques et de boues primaires généralement réalisé avant la stabilisation des boues **(**Addou, 2009).

1.2.3.4 Boues physico-chimiques

Ils ressemblent à des boues primaires. Cependant, lors du traitement, certains réactifs tels que le sel de fer, le sel d'aluminium, ainsi que d'autres agents floculant sont ajoutés pour améliorer la sédimentation des particules fines (Canler *et al.*, 2014).

1.2.4 Composition de boue activée

1.2.4.1Composition microbiologique des boues

- **Microfaune**

La microfaune fait référence à un groupe d'animaux minuscules, mesurant moins de 200 µm, constitué principalement de protozoaires et de métazoaires. Ces organismes microscopiques jouent un rôle essentiel dans l'élimination des bactéries libres par prédation, contribuant ainsi à la cohésion du floc par leurs excrétions. L'observation régulière de ces organismes au microscope fournit des informations précieuses sur l'efficacité du processus de traitement *(*Chergui et *al*., 2016).

- **Microflore**

Dans les boues activées, les bactéries retrouvées sont majoritairement aérobies facultatives, Gram négatif, mobiles, et proviennent principalement du sol ou de l'eau (Canler*et al*., 2014).

1.2.4.2 matière organique

La composition exacte des boues varie selon l'origine des eaux usées, la période de l'année et le type de traitement et de conditionnement effectué dans la station d'épuration. La boue est avant tout une matière première composée de différents éléments (matières organiques, éléments fertilisants, oligo-éléments métalliques, oligo-éléments organiques et pathogènes). Le tableau suivant montre les compositions des boues :

Tableau 1.2.1 Composition des boues résiduaires (aitayne k et dounla s, 2009).

Composition des boues résiduaires		
Matière organique		**Eléments fertilisants**
Lipides protéines, Acides aminés, Produits de métabolisation, Crops microbiens		Azote, phosphore, magnésium, calcium, soufre, potassium, cuivre, zinc, chrome, nickel.
	Eléments indésirables	
Des métaux qui peuvent devenir très toxiques arrivées à certains seuils	Les micro-organismes pathogènes : virus, bactéries, protozoaires, parasites, champignons, présents dans les matières fécales	Les micropolluants organiques : Pesticides, résides de médicaments, phtalates, nitrates, hydrocarbures…

1.2.4.3 les microorganismes

Le monde vivant est classé en trois grandes catégories : les végétaux, les animaux et les protistes, qui se distinguent des deux autres règnes par leur structure relativement simple et la multiplication rapide de leurs individus. Ces micro-organismes sont essentiellement composés de bactéries (êtres unicellulaires), de levures (champignons unicellulaires), de moisissures (très petits champignons) et de protozoaires (prédateurs bactériens). Chacune des souches bactériennes est caractérisée par un nom de genre et un nom d'espèce (Revol, 2013).

1.3 LA BIOREMEDAITION

1.3.1 Bioremédiation

La biorestauration est une transformation médiée par un microorganisme ou dégradation des contaminants en substances non dangereuses ou des substances moins dangereuses. L'employabilité des divers organismes comme les bactéries, les champignons, les algues et les plantes pour une efficacité la biorestauration des polluants a été signalée. Le processus de biorestauration dépend principalement de microorganismes qui attaquent enzymatiquement les polluants et convertissez - les en produits inoffensifs. Comme biorestauration ne peut être efficace que lorsque les conditions environnementales le permettent croissance et activité microbiennes, son application implique souvent la manipulation des paramètres environnementaux pour permettre croissance et dégradation microbiennes à un rythme plus rapide (Karigar& Rao, 2011).

La figure 1.3.1 montre le processus de bioremédiation des déchets :



Fig.1.3.1 Le processus de bioremédiation des déchets (Karigar& Rao, 2011).

1.3.2 Les techniques de bioremédiation

Au cours des deux dernières décennies, il y a eu des progrès récents dans techniques de biorestauration dont le but ultime est de restaurer efficacement les environnements pollués de manière écologique approche, et à un coût très bas. Les chercheurs ont développé et modélisé différentes techniques de biorestauration ; cependant, en raison de la nature et / ou du type de polluant, il n'y a pas de technique de biorestauration unique qui sert de "solution miracle" pour restaurer les environnements pollués *(*Azubuike *et al.*, 2016).

1.3.2.1 Ex situ

Ces techniques impliquent l'excavation de polluants à partir de polluants pollués sites et les transporter ensuite vers un autre site de traitement. Les techniques de biorestauration ex situ sont généralement considéré en fonction de : le coût du traitement, la profondeur de pollution, type de polluant, degré de pollution, géographique localisation et géologie du site pollué. Performance critères, qui déterminent également le choix de l'ex des techniques de biorestauration in situ, ont été décrites (Azubuike *et al.*, 2016**).**

1.3.2.2 In situ

Ces techniques consistent à traiter des substances polluées au site de la pollution. Il ne nécessite aucune excavation ; par conséquent, il est accompagné de peu ou pas de perturbation de structure du sol. Idéalement, ces techniques devraient être moins coûteux par rapport aux techniques de biorestauration ex situ, en raison de l'absence de coûts supplémentaires requis pour les processus d'excavation ; néanmoins, le coût de la conception et de l'installation sur site de certains équipements sophistiqué pour améliorer les activités microbiennes pendant la biorestauration est une préoccupation majeure *(*Azubuike *et al*., 2016).

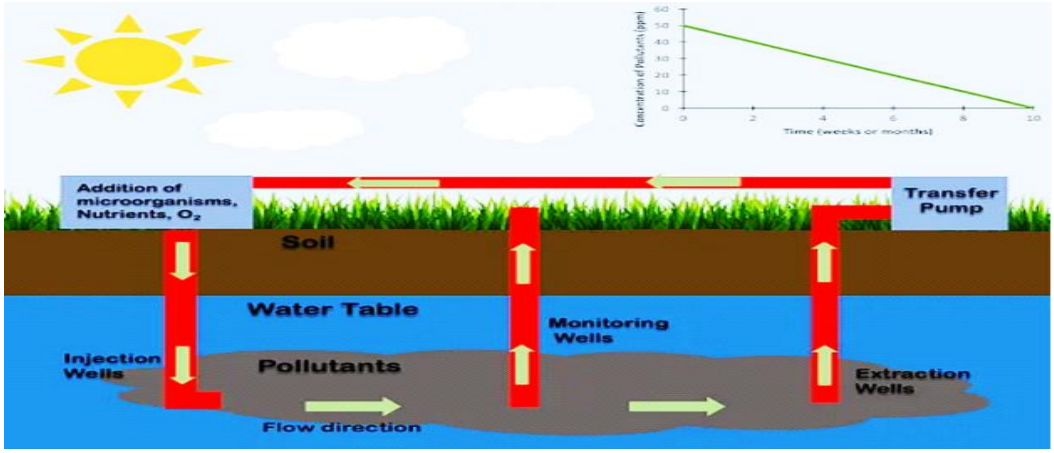


Fig.1.3.2 Technique de bioremédiation in situ (Amruta, 2023**).**

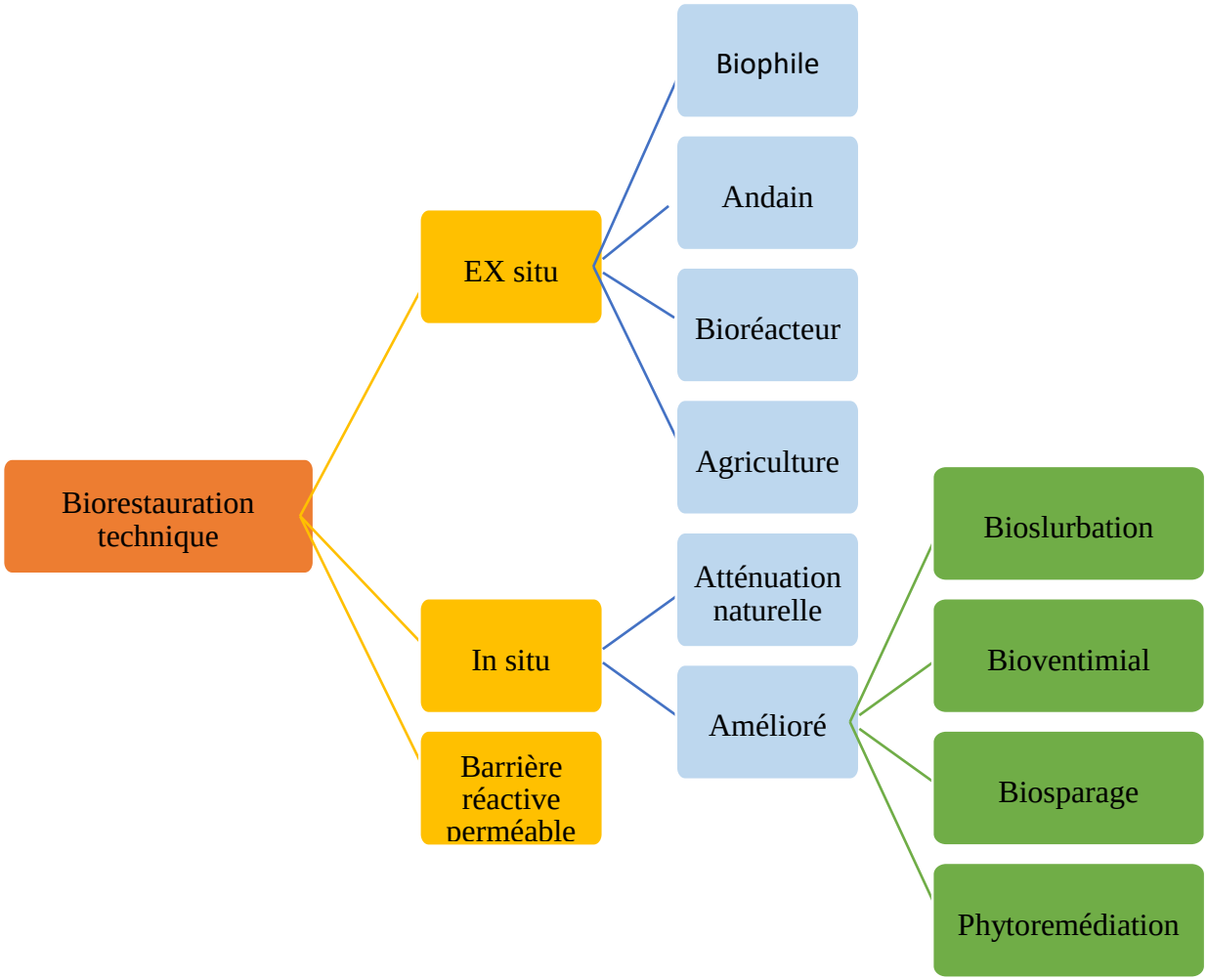


Fig.1.3.3 techniques Biorestauration **(**Azubuike et *al*, 2016).

1.3.3 Types de bioremédiation

1.3.3.1 la bioremédiation microbienne

La bioremédiation microbienne est un processus qui repose sur des mécanismes biologiques pour réduire la concentration de polluants à un état inoffensif. (Azubuike *et al.*, 2016).

Le processus de bioremédiation microbienne pour l'élimination et la désintoxication des contaminants de l'environnement est maintenant apparu comme la meilleure option (Jaiswal & Shukla, 2020).

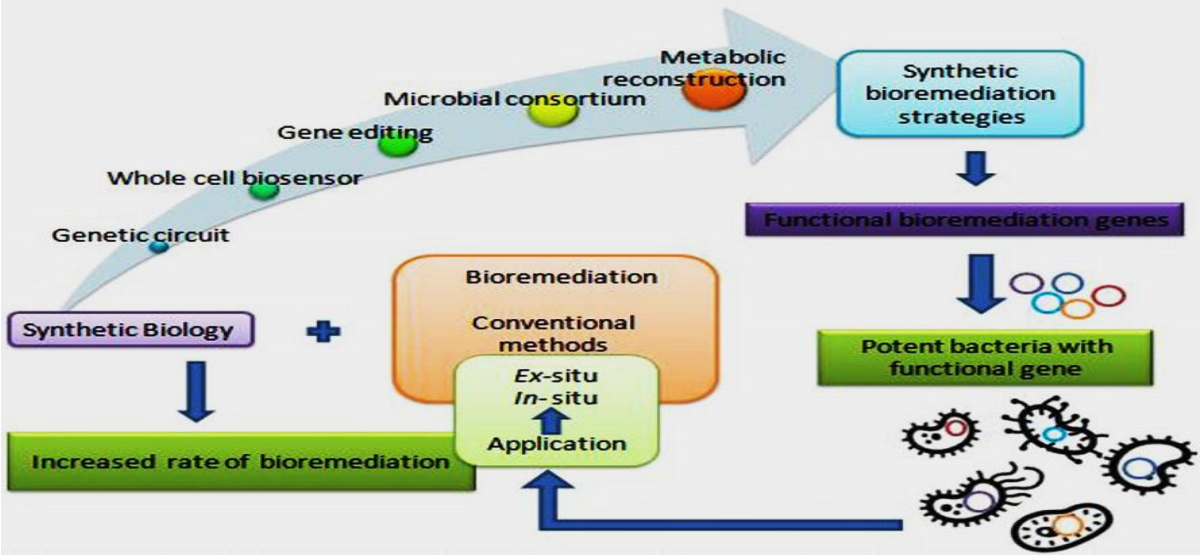


Fig.1.3.4 stratégies de biologie synthétique applicables à la bioremédiation (Jaiswal & Shukla, 2020).

1.3.3.2 phytoremédiation

La phytoremédiation traite du nettoyage des polluants organiques et des contaminants des métaux lourds utilisation de plantes et de microorganismes rhizosphériques. Il est peu coûteux, écologique et efficace moyens de restauration des environnements pollués en particulier ceux des métaux lourds. Néanmoins, le niveau de contamination du sol, la quantité de contaminants métalliques dans le sol, ainsi que la capacité des plantes pour absorber agressivement les métaux du sol, déterminer le succès de la phytoremédiation sur tout site pollué.

Les plantes utilisées en phytoremédiation sont les hyper accumulateurs avec un très potentiel d'accumulation élevé de métaux lourds et faible efficacité de la biomasse, et non hyper

accumulateurs qui possèdent une capacité d'extraction moindre que les hyper accumulateurs, mais dont le rendement total en biomasse est considérablement plus élevé et sont des espèces à croissance rapide. Plusieurs processus sont utilisés pour éliminer les charges lourdes métaux provenant des sols contaminés par certaines plantes, comme illustré à la figure 1.2.5 (Ojuederie & Babalola, 2017).

1.3.3.3 Mycoremédiation

L'augmentation constante de la population, le rythme rapide de l'urbanisation et l'industrialisation exacerbent le problème lié à la pollution. La pollution des sols et de l'eau affecte la santé humaine et l'écosystème. Ainsi, il est crucial pour développer des stratégies pour lutter contre ce problème sans cesse croissant. Mycoremédiation, utilisant des champignons ou ses dérivés pour l'assainissement des polluants environnementaux sont relativement rentables et respectueux de l'environnement, et méthode efficace.

Le rôle de plusieurs champignons dans la dégradation de ces polluants tels que les métaux lourds, agricoles, les déchets pharmaceutiques, y compris les hydrocarbures aromatiques polycycliques, sont énumérés. Stratégies futures pour il est suggéré d'améliorer le taux et l'efficacité de la mycoremédiation. Le manuscrit décrit des stratégies qui peuvent servir de cadre futur pour s'attaquer au problème mondial de la pollution (Akhtar & Mannan, 2020).

La mycoremédiation repose sur les enzymes efficaces, produites par les champignons, pour la dégradation des différents types de substrats et de polluants. Outre la dégradation des déchets, le champignon a produit un produit vendable pour la consommation. Cependant, parfois, ils absorbent le polluant dans leur mycélium (processus de biosorption) et ne peut pas être consommé en raison des substances toxiques absorbées (Kulshreshtha *et al*., 2014).

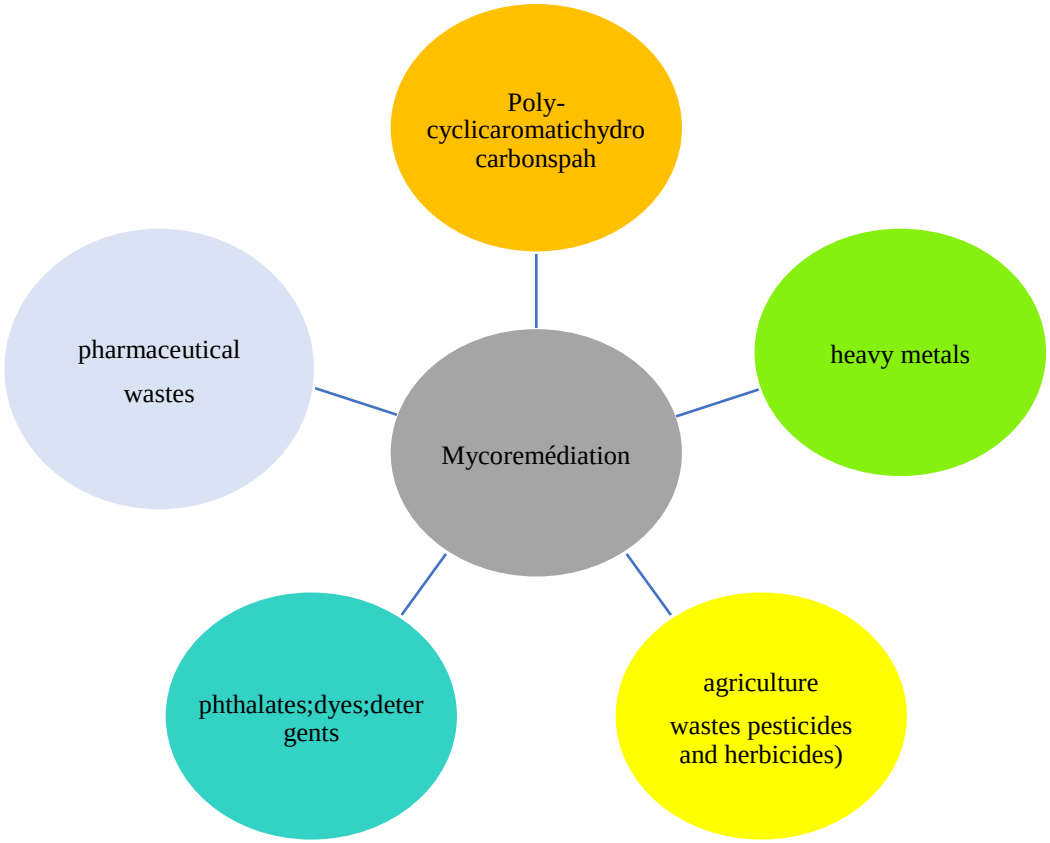


Fig.1.3.5 Mycoremédiation des polluants de l'environnement (Akhtar &Mannan, 2020).

1.3.3.4 Biostimulation

La biostimulation est une technique de remédiation très efficace, rentable et respectueux de l'environnement dans la nature. La biostimulation se réfère au ajout de nutriments limitant la vitesse comme le phosphore, l'azote, l'oxygène, donneurs d'électrons vers des sites gravement pollués pour stimuler l'existante bactérie pour dégrader les contaminants dangereux et toxiques. Chiffre 4,67–69 2 décrit le processus de biostimulation (Tribedi *et al.*, 2018).

Les principaux contaminants qui peuvent être éliminés avec succès par la biostimulation sont les hydrocarbures pétroliers, le sulfate et polyester polyuréthane. La contamination des eaux souterraines par les sulfates est une menace non seulement pour l'écologie environnementale mais aussi pour l'homme santé. Cela peut être remédié biologiquement par le processus biostimulation (Tribedi *et al*., 2018).

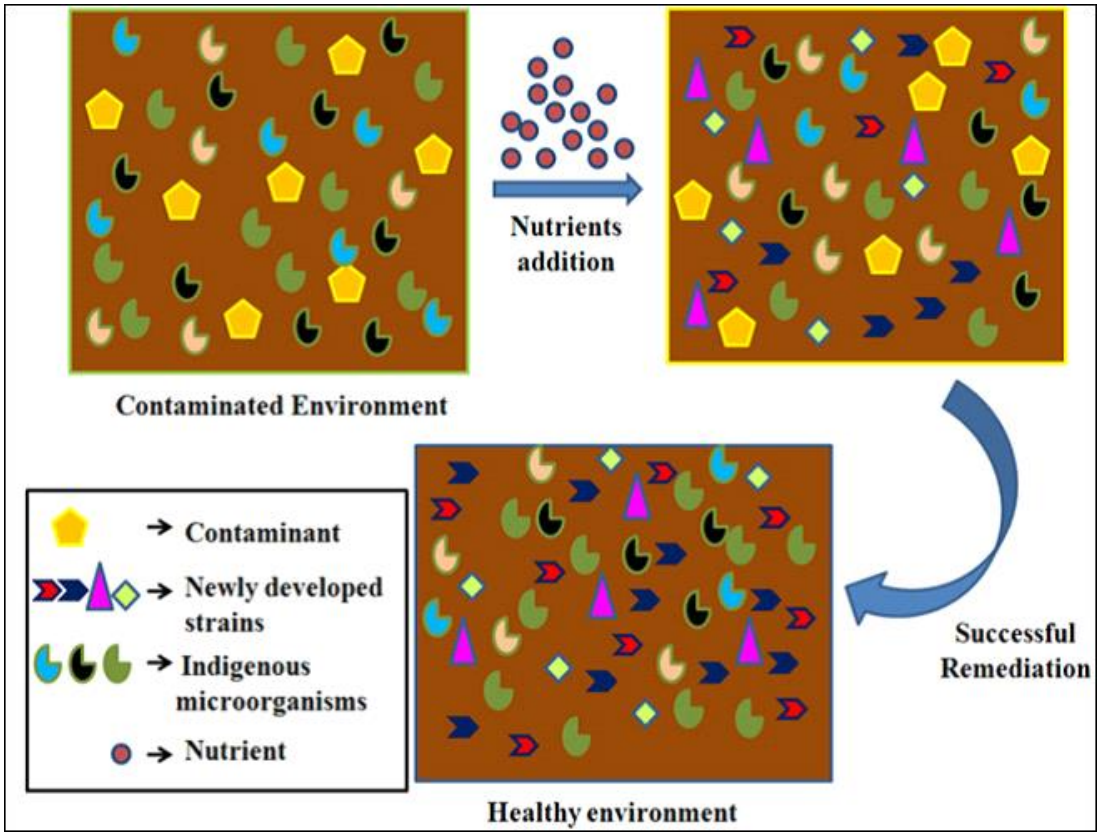


Fig.1.3.6 Le diagramme illustré de la biostimulation (Tribedi *et al*., 2018).

1.3.3.5 La Bioaugmentation

La bioaugmentation est la méthode d'application des autochtones ou de type sauvage allochtone ou de microorganismes génétiquement modifiés aux sites de déchets dangereux pollués afin d'accélérer l'élimination des composés indésirables. La figure 2 décrit le processus de bioaugmentation. La bioaugmentation est principalement entreprise dans l'huile environnements contaminés comme stratégie alternative de biorestauration (Tribedi *et al*., 2018).

Une solution prometteuse à long terme et durable à la rareté croissante de l'eau dans le monde entier est de recycler et de réutiliser les eaux usées. Dans les stations d'épuration, la biodégradation de contaminants ou de polluants en exploitant les microorganismes présents dans les boues activées sont l'un des stratégies les plus importantes pour éliminer les contaminants organiques des eaux usées.

Cependant, cela l'approche a des limites car de nombreux polluants ne sont pas éliminés efficacement. Pour contrebalancer les limitations, la bioaugmentation a été développée et consiste à ajouter des éléments spécifiques et efficaces microorganismes de biodégradation des polluants dans une communauté microbienne dans le but d'améliorer la capacité de cette communauté microbienne à biodégrader les contaminants**. (**Nzila *et al*., 2016).

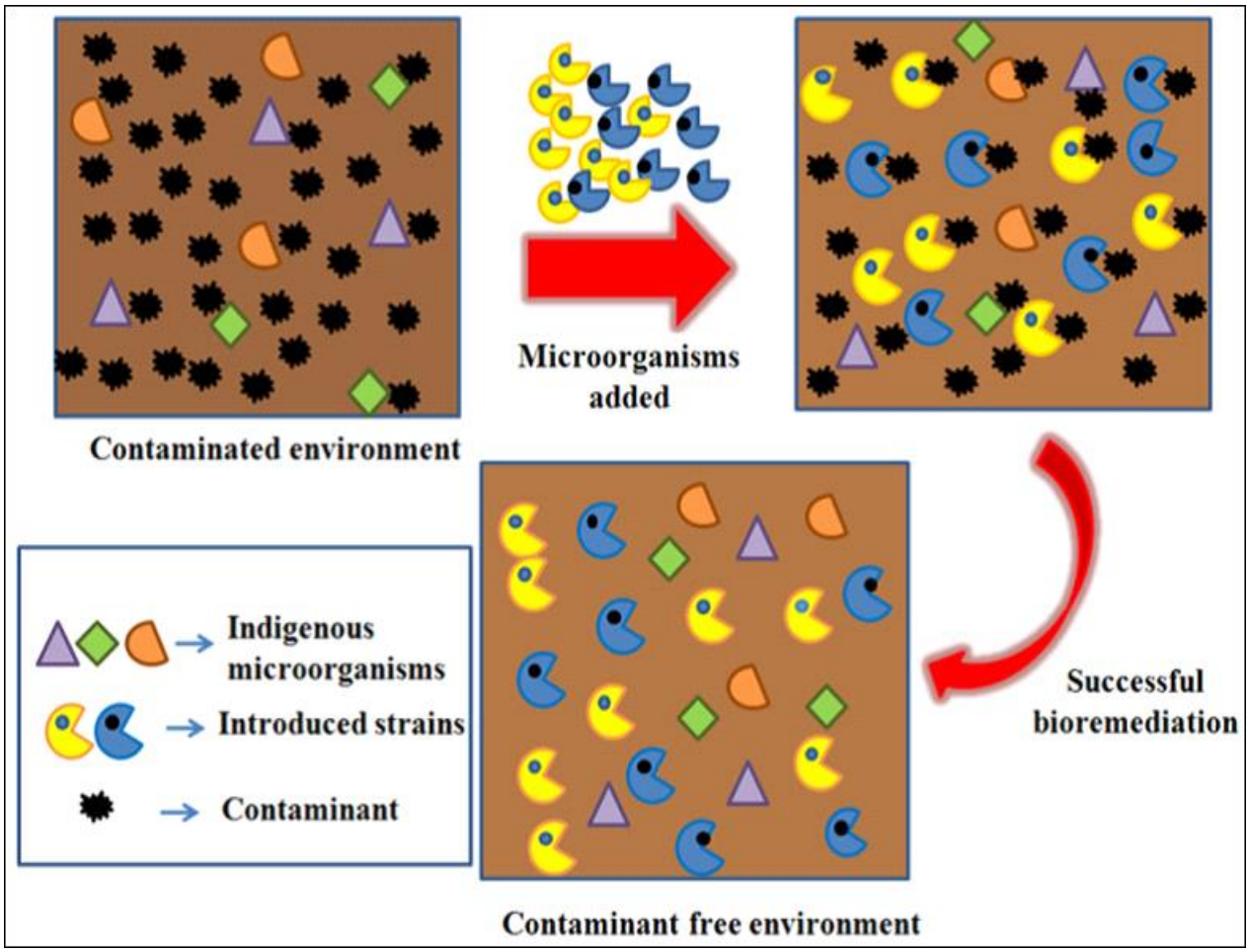


Fig.1.3.7 Le diagramme illustré de la bioaugmentation (Tribedi *et al*., 2018).

1.3.3.6 la bioremédiation intrinsèque

La biorestauration intrinsèque, également appelée atténuation naturelle, repose uniquement sur le microbien potentiel de dégradation. Les microorganismes indigènes se sont adaptés à leur environnement et, s'il a déjà été exposé à la contamination par le pétrole, pourrait être équipé d'une défense mécanismes et intervenir immédiatement en cas de déversement d'hydrocarbures. L'atténuation naturelle est rentable technique puisqu'aucune intervention n'est

requise ; cependant, une surveillance est requise déterminer la durabilité du processus. Avant l'application, évaluations des risques doit être effectuée pour éliminer le risque d'exposition humaine aux contaminants. Intrinsèque la biorestauration n'est pas un choix très attrayant pour la biorestauration des sédiments car c'est un processus très lent, en particulier dans les conditions anaérobies dominantes du couches plus profondes **(**Fragkou *et al.*, 2021).

1.4 LA BOIREMEDIATION ENZYMATIQUE

1.4.1 Les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques aux propriétés protéiques. Les catalyseurs accélèrent les réactions lentes ou imperceptibles sans modifier la structure d'origine. Le développement le plus récent du concept catalytique au XIXe siècle a été accéléré par la découverte de puissants catalyseurs d'origine biologique. Celles-ci ont été appelées enzymes et ont ensuite été identifiées comme des protéines. Les enzymes sont des protéines fabriquées par le corps. Ils sont constitués de milliers d'acides aminés liés dans une chaîne linéaire.

Ces acides aminés ont des propriétés chimiques différentes et sont liés par des liaisons covalentes appelées liaisons peptidiques. Les enzymes activent ou accélèrent les réactions chimiques. Il existe environ 15 000 protéines chez l'homme. Ces enzymes jouent un rôle dans toutes les fonctions telles que la digestion par des enzymes impliquées dans les étapes orales telles que : B. Amylase (Burhan *& al*., 2002).

1.4.1.1 Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet la production de nouveaux matériaux et énergies indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. Ils sont classés selon leur activité catalytique. Selon le Comité des enzymes de l'Union internationale des biochimistes, les enzymes peuvent être divisées en six classes. Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases (Assamoi *et al.*, 2009**).**

Tableau.1.4.1 Classification des enzymes (Cosnier, 2000).

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

1.4.1.2 Les Types des enzymes

Il existe de nombreux types d'enzymes telles que les laccases, les lipases, les protéases et les peroxydases :

- **Les laccases**

La laccase (EC 1.10.3.2, p-diphénol oxydase) est une oxydase de type ligninase bleue, ce qui signifie qu'elle peut décomposer la lignine. Il s'agit d'une série d'enzymes spécifiquement impliquées dans le brunissement enzymatique des fruits et légumes. Ces oxydoréductases appartiennent à une famille de protéines de polycuivre qui utilisent l'oxygène pour oxyder de nombreux composés phénoliques par un mécanisme radicalaire. La laccase ne présente aucune activité catécholase, alors qu'elle peut oxyder à la fois les o- et p-phénols. De plus, il oxyde les monophénols en monoquinones sans les hydroxyler au préalable. Les laccases sont des métalloenzymes qui contiennent un atome de cuivre sur chaque site actif. Ils assurent simultanément l'oxydation des composés phénoliques et la réduction de l'O2 **(**Enguita et *al*., 2003**).**

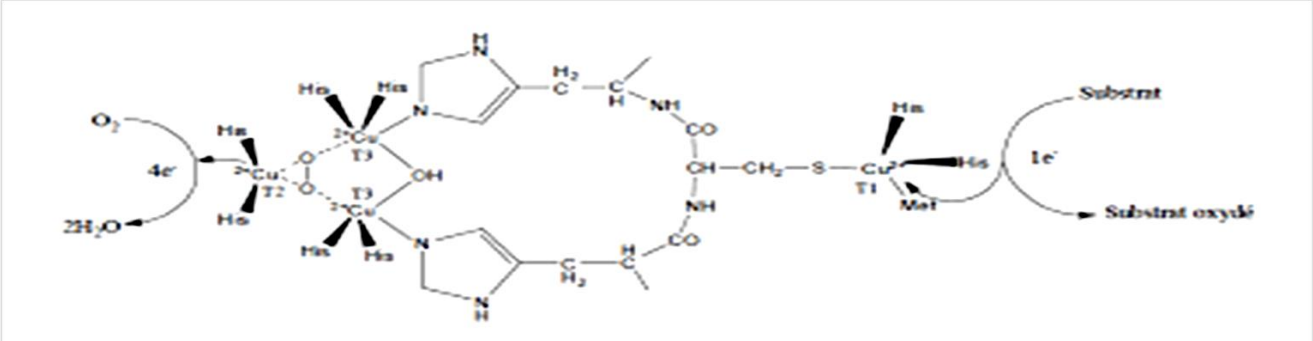


Fig.1.4.1 Structure chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique **(**Rochefort, 2001).

En général, les laccases sont des glycoprotéines dimères ou tétramères contenant quatre atomes de cuivre dans le site actif et diffèrent par la nature de leurs ligands. Il existe trois emplacements nommés T1, T2 et T3. Les sites de type 1 et de type 2 possèdent chacun un atome de cuivre et sont impliqués dans la capture et le transfert d'électrons (Lanteigne, 2010). Le site T1 contient un atome de cuivre (Cu+) qui absorbe à 610 nm. Il coordonne la cystéine et est responsable de la couleur bleue de l'enzyme. Le site T2 contient du cuivre non bleu (Cu2+), qui forme des complexes tétraédriques avec l'histidine azotée et l'oxygène. Le site T3 absorbe à 330 nm et chaque ion cuivre lie trois histidines.

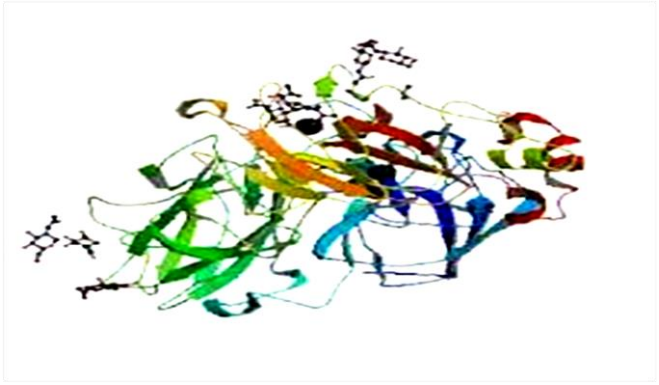


Fig.1.4.2 Structure cristalline d'une laccase du champignon Trametesversicolor contenant les 4 cuivres **(**Piontek *et al*., 2002).

- **Peroxydases**

Les peroxydases sont une grande famille d'enzymes. Selon la nomenclature officielle, elles appartiennent à la famille des oxydoréductases. Ce sont des enzymes omniprésentes présentes dans les plantes, les animaux et les micro-organismes. Les peroxydases végétales sont regroupées en une seule superfamille avec les peroxydases bactériennes et fongiques. Dans cette superfamille,

toutes les peroxydases sont composées de protéines et ont toutes des structures tridimensionnelles similaires **(**Smulevich *et al*., 2006).

Ils réduisent tous le peroxyde d'hydrogène (H2O2) en H2O, mais les substrats qu'ils oxydent sont très différents. La superfamille est divisée en trois classes distinctes (I, II et III), différant principalement par la séquence peptidique primaire, le nombre d'ions calcium et leur origine. Il existe deux grandes familles de peroxydases. L'une est la peroxydase animale, qui se trouve principalement chez les animaux, et l'autre est la peroxydase non animale, qui se trouve dans les plantes, les champignons, les bactéries et les protistes.

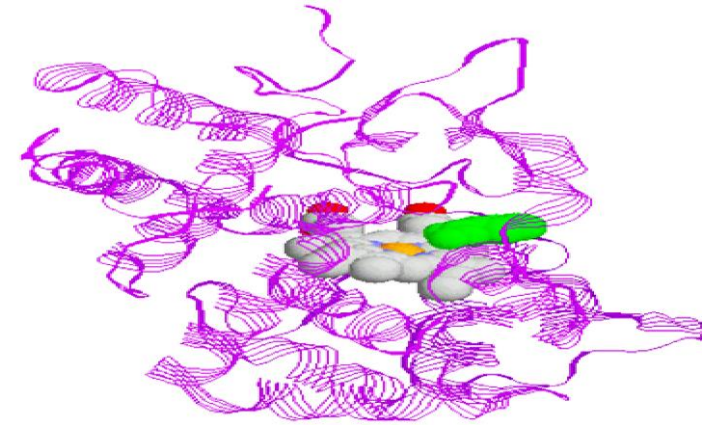


Fig.1.4.3 la structure de la peroxydase

- **Hydrolase**

Les enzymes hydrolytiques sont des enzymes de dégradation. Ceux-ci divisent la molécule et verrouillent les radicaux H et OH de l'eau aux valences libres. Ces enzymes ne nécessitent généralement pas de coenzymes et peuvent être activées par des cations. Ils sont très difficiles à classer. Le plus simple est d'étudier leur influence sur certains groupes moléculaires. En général, les hydrolases produites par les champignons sont intracellulaires (catalase, lactase, invertase) ou extracellulaires (amylases, cellulases, pectinases, protéases) **(**Meziani et Mahcene, 2017). Ces enzymes sont soit libérées dans le milieu extérieur, soit localisées à la surface du champignon, facilitant la récupération fongique. Dans la nature, les micro-organismes utilisent des enzymes pour décomposer les protéines, les polysaccharides, les lipides et d'autres grosses molécules, les réduisant en monomères qui servent de sources de carbone et d'énergie.

- **Lipase**

Les lipases sont omniprésentes dans la nature et jouent des rôles physiologiques importants dans le métabolisme des lipides. Ils sont également présents dans le règne végétal, les invertébrés et les vertébrés, mais aussi dans de nombreux micro-organismes, principalement sous forme de protéines extracellulaires. La triacylglycéroacyl hydrolase EC 3.1.1.3 (lipase) est une enzyme produite par une grande variété d'organismes, d'animaux, de plantes et de micro-organismes. Ces enzymes jouent des rôles importants dans la biochimie des lipides (Mireille Alloue et *al*., 2008).

Ils ont été identifiés par Claude Bernad en 1856 comme des enzymes qui hydrolysent les gouttelettes d'huile insolubles dans le pancréas et les convertissent en produits solubles. Sur le marché mondial des enzymes, les lipases viennent juste après les protéases et les amylases, représentant 5 % de ce marché. Les lipases (EC 3.1.1.3) appartiennent à la sous-classe des hydrolases spécifiques des carboxylates (EC 3.1.1) et sont des triacylglycérol lipases, c'est-à-dire définies comme une enzyme qui peut être spécifiquement ciblée. Squelette carboné du glycérol. D'un point de vue biochimique, les lipases sont nécessairement des estérases, mais l'inverse n'est pas vrai car il existe de nombreuses estérases non lipolytiques **(**Zallot, 2011).

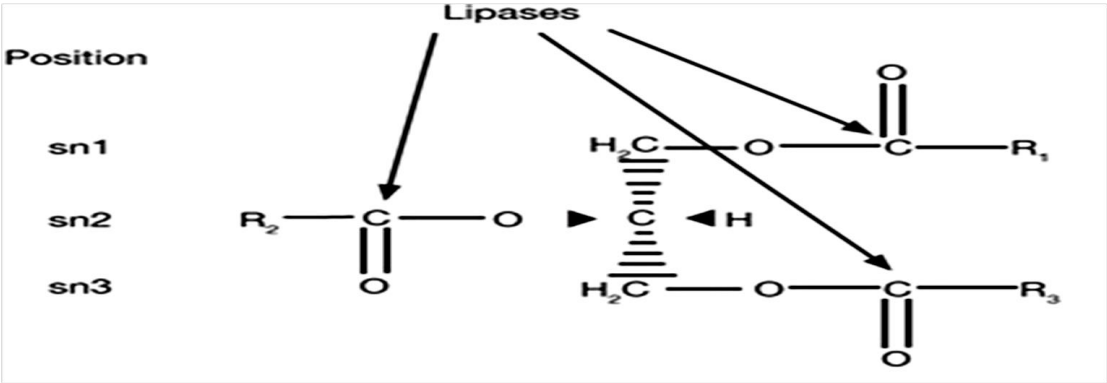


Fig.1.4.4 Identification des liaisons esters potentiellement hydrolysables par lipases (Fickers *et al*., 2008).

1.4.1.3 La méthode d'extraction

On peut dire que le mot "extraction" désigne le processus de séparation d'une substance de ses composés. Les méthodes d'extraction correspondent au transfert sélectif des solutés contenus dans le milieu de départ vers un second milieu par ailleurs soluble en vue de la séparation (Brisset, 2005) :

- Extraction des enzymes par haute pression suivie d'un pressage (presse française),
- Meulage ou meulage (éventuellement en présence de billes),
- Ultrasons : à certaines fréquences, les pores de la membrane provoquent la fuite des protéines.

1.4.1.4 la purification d'un enzyme

La purification est une série d'opérations visant à éliminer toutes les impuretés de l'extrait brut contenant l'enzyme d'intérêt. En principe, toute méthode destinée au fractionnement des protéines peut être utilisée pour la purification enzymatique (ILLANES, 2008) Objectifs de nettoyage (HAINQUE *et al*. 2008 ; CEZARD, 2009*)* :

• Rendement et enzyme maximum

• Pureté la plus élevée possible

• Maximiser l'activité catalytique

1.4.1.5 Identifications enzymatiques par coloration

Les Colorants sont des substances capables d'apporter une coloration à un support en s'y fixant. Cette propriété est fondamentalement liée à la structure et à la composition chimique de la substance. En effet, un colorant est un corps « chromogène » qui absorbe la lumière dans le visible et qui réfléchit les couleurs complémentaires de celles absorbées. Ce phénomène résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes Appelés « chromophores » (Dhina BENSENANE, Fadia KHADOUDJA,2014).

1.4.2 la bioremédiation enzymatique

La bioremédiation enzymatique a montré des promesses dans la dégradation des polluants dans l'eau. C'est une méthode de remédiation de l'eau qui utilise des enzymes pour dégrader les polluants. Les enzymes sont les outils de bioremédiation les plus efficaces et effectuent tous les changements chimiques sur les polluants (Mousavi *et al*., 2021). Différentes enzymes comme lesmono - ou dioxygénases, les halogénases, peroxydases, phosphotriestérases, hydrolases, transférases, et oxydoréductases de diverses espèces des bactéries, des champignons, des algues et des plantes ont été utilisés pour la biorestauration des polluants (Mousavi *et al*., 2021**).**

1.4.2.1 les étapes de la bioremédiation enzymatique

1.4.2.1.1 Evaluation de site

La première étape de la bioremédiation enzymatique consiste en une évaluation du site pour déterminer le type et la concentration des polluants présents (Mousavi *et al*., 2021). Bioremédiation enzymatique est un outil intelligent pour lutter contre la pollution environnementale car elle facilite la décomposition des polluants en substances inoffensive (Sutherland *et al*., 2004).

1.4.2.1.2 La collecte d'échantillons

La collecte d'échantillons pour la bioremédiation enzymatique dépend du type de site évaluer. Par exemple, les biophiles ont été signalées comme étant appropriées pour la bioremédiation différents échantillons de sol, y compris les sols argileux et sableux. **(**Azubuike *et al.*,2016**).** Dans la bioremédiation de précision, un nouveau cadre qui intègre l'analyse méta-génomique basée sur les amplicons et le profilage chimique est utilisé pour collecter des échantillons environnementaux contaminés avec des polluants cibles comme inoculum initial (Shaheen *et al.*,2019).

1.4.2.1.3 Analyse d'échantillons

Une approche de bioremédiation nécessite l'utilisation d'enzymes microbiennes, et les méthodes d'échantillonnage et d'analyse doivent être décrites en détail, y compris le type de polluant et l'emplacement de l'échantillonnage (Bala *et al.*, 2022).

1.4.2.1.4 Indentification des enzymes

Les enzymes jouent le rôle le plus crucial. Les enzymes peuvent remédier à différents types de polluants organiques et inorganiques, notamment HAP, colorants azoïques, polymères, organocyanures, plomb, chrome et mercure. Différentes enzymes isolées de diverses espèces ont été utilisé pour la biorestauration des polluants. Découverte de nouvelles enzymes et de nouveaux sous-types aux caractéristiques physico-chimiques spécifiques serait un moyen prometteur de trouver des outils plus efficaces et rentables pour l'assainissement des polluants. Le processus de biorestauration est principalement basé sur Microorganismes qui attaquent enzymatiquement les contaminants Et transformez- les en produits inoffensifs **(**Karigar & amp ; Rao, 2011**).**

1.4.2.1.5 Production des enzymes

La production d'enzymes est une étape importante dans la bioremédiation enzymatique carrelle permet de produire les enzymes nécessaires pour dégrader des polluants spécifiques (Karigar & amp ; Rao, 2011).

1.4.2.1.6 Méthodes de production

- **La fermentation microbienne**

La production d'enzymes microbiennes par l'application de procédures de fermentation implique une propagation microbienne comme des bactéries, des moisissures et des levures pour obtenir le produit souhaité. Le processus de fermentation est classé en fonction de paramètres spécifiques. Il existe différentes techniques utilisées pour produire des enzymes microbiennes en utilisant des méthodes de traitement en aval qui visent la purification et la récupération des enzymes (Ali Al-Maqtari et al., 2019).

- **Le génie génétique**

Le génie génétique est une méthode utilisée pour modifier le matériel génétique d'un organisme, tel qu'une bactérie, afin de produire des enzymes à des fins industrielles. Le génie génétique est une méthode utilisée pour modifier le matériel génétique d'un organisme, tel qu'une bactérie, afin de produire des enzymes à des fins industrielles (Zhang *et al.*, 2019).

- **ADN recombinant**

Les techniques de l'ADN facilitent l'évolution de la capacité d'un organisme à métaboliser un xénobiotique par la détection de ces gènes dégradants et leur transformation en un hôte approprié via un vecteur approprié sous le contrôle étroit de l'hôte approprié promoteurs. Cela dépend de la susceptibilité à l'altération et à l'échange de gènes informations. La technologie de l'ADN recombinant explore la PCR, l'ARN anti-sens technique, mutagenèse dirigée sur site, électroporationet bombardement de particules techniques de développement de techniques efficaces, sûres et économiques **(**Kumar & amp ; Rao, 2010).

- **L'extraction à partir de sources naturelles telles que les champignons et les plantes**

La biorestauration des matières organiques toxiques par les champignons est la voie la plus durable et la plus verte pour le nettoyage des sites contaminés sites et nous discutons des multiples modes employés par champignons pour la désintoxication de différents toxiques et récalcitrants

composés comprenant des enzymes fongiques proéminentes à savoir., catalases, laccases, peroxydases et cytochrome P450 mono oxygénases. Nous avons également discuté de la récente les progrès de l'ingénierie enzymatique et de la génomique et des recherches sont menées pour retrouver les moins compris voies de biorestauration **(**Deshmukh *et al.,* 2016) installations (ETP) de traitement de déchets divers eaux. La diversité des habitats et la capacité de sécréter une multitude d'enzymes rend les champignons potentiels candidats à la biorestauration sur divers sites **(**Deshmukh *et al.,* 2016).

1.4.2.2 Application des enzymes

- La biorestauration enzymatique est potentiellement une méthode rapide d'éliminer les résidus de pesticides environnementaux. Demandes inclure le traitement des résidus résultant de l'agriculture industries de production et de transformation, telles que le traitement des eaux d'irrigation, fruits et légumes contaminés en surface et des liqueurs de trempette épuisées.
- Une application spécifique pour certaines dégradations organophosphorées enzymes implique la désintoxication de l'agent neurotoxique stocks. Une remédiation efficace et abordable nécessite enzymes hautement spécialisées, donc techniques d'ingénierie des protéines sont utilisés pour améliorer les propriétés de diverses enzymes sources pour améliorer les taux catalytiques, la stabilité et la gamme de substrats.
- Essais avec une dégradation optimisée des organophosphorés enzyme ont montré la faisabilité d'une telle technologie dans diverses applications.
- Les enzymes développées pour l'assainissement de l'environnement pour des classes de pesticides spécifiques ont également des applications comme antidotes pour les intoxications aux pesticides à fortes doses et comme prophylaxie pour personnes à risque de doses élevées de pesticides **(**Sutherland *et al*., 2004).

1.4.2.3 Evaluation de l'efficacité

L'étape d'évaluation de l'efficacité dans la bioremédiation enzymatique implique la mesure de la réduction de la concentration de polluants au fil du temps. L'efficacité de la bioremédiation microbienne dépend de l'activité et de la spécificité des enzymes impliquées dans le processus (Al-maqdi *et al.,* 2021).

2. MATERIELS & METHODES

2. MATERIELS & METHODES

Le présent travail porte sur l'évaluation *in vitro*, de la bioremédiation (élimination) des polluants émergents issus d'une industrie pharmaceutique par des enzymes bactériennes isolées de boues activées ; afin de sélectionner les enzymes les plus performantes pour leur potentielle "épuratrice des PE".

Ainsi, pour répondre aux objectifs de cette étude, nous avons adopté la démarche expérimentale qui comprend les étapes suivantes **:**

- *Activation et optimisation de conditions culturales des boues activées.*
- *Screening des microorganismes présents dans la boue activée*
- *Essais de dégradation enzymatique des PEs par la laccase et peroxydase des souches identifiées.*

L'intégralité de ce travail a été réalisée au sein du laboratoire pédagogique de biologie (LPB), de la faculté des sciences, à l'université Docteur Yahia Farés de Médéa, durant la période « Février-Juin 2023 ».

2.1. Matériel

Cette étude a été conduite sur le mélange bactérien fixe « boue activée » spécialement élaboré pour dégradé un vaste éventail de composés chimiques complexe, aliphatiques et aromatiques dans les stations d'épuration biologique aérobie, aimablement fournie par le complexe *Antibiotical* du groupe SAÏDALde Médéa sous forme lyophilisée d'aspect granulé jaune, avec les spécifications suivantes :

Tableau 2.1. Spécifications de la boue activée fournie

Tests	Spécifications		
	Minimum	**Optimum**	**Maximum**
pH d'exploitation	5.5	7.0	9.5
Oxygène dissous (ppm d'O2)	1.0	8.0-9.0	-
Température (°C)	7.5	22	45
C :N :P	100/5/1	100/7/1	100/10/1

2.1.1 Produits chimiques

Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants **:**

NaOH, HCL, NaCL, cristal violet, Fushine, Lugol, éthanol, TDA, IND, VP, huile de paraffine, H_2O_2, Gaïacol

2.1.2 Appareillage

L'appareillage utilisé durant notre stage de fin d'étude est le suivant **:**

Microscope optique (Optika microscopesà), pH mètre ((ph-2005-ph Meter), Pompe à vide, Réfrigérateur (Liebherr), Agitateur magnétique chauffant IKA (Agimatic-N), Balance, DBO-mètre, Centrifugeuse (*HERMLEZZOO*) avec accessoires (rotor pour grostubes),réfrigérateur,Etuve(Memmert),Incubateur,Spectrophotomètre(2005J.Pselecta.sa) (VWR), Autoclave(OTO12)**,** Bain marie, Bec-bunsen.

2.2 Méthodes

Un protocole expérimental basé sur l'ensemble d'objectifs est présenté dans la figure suivante :

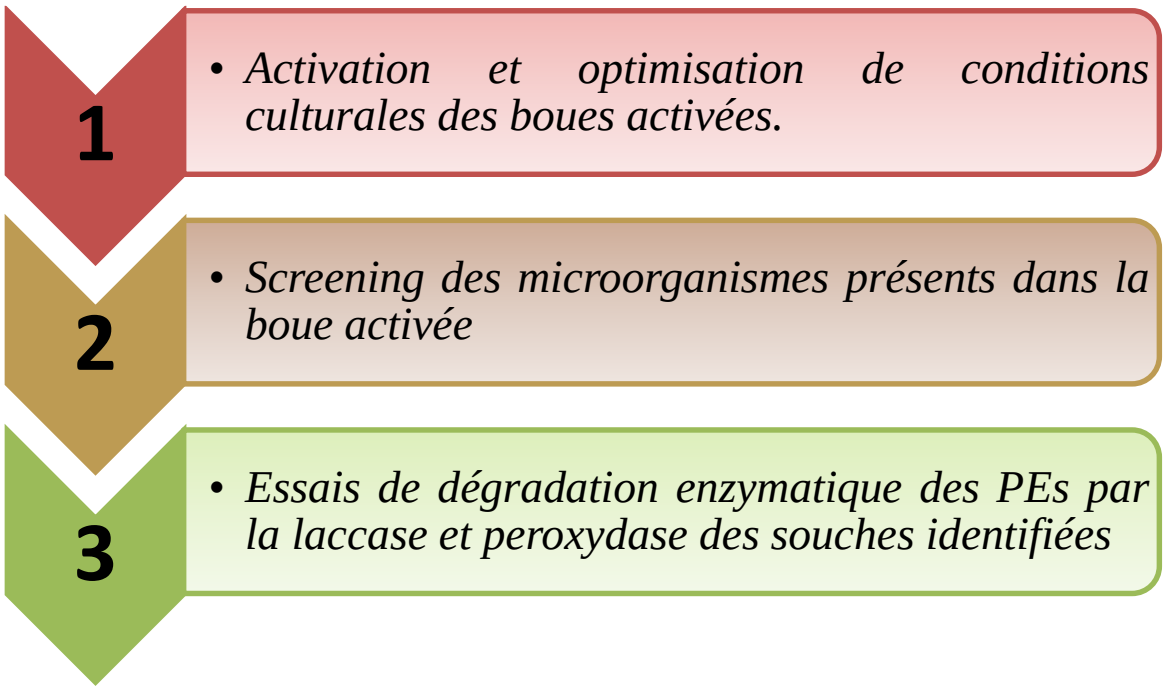


Fig.2.1 Protocole expérimentale.

2.2.1 Boues activés et conditions de culture

2.2.1.1 Revirement de boue activée

La boue activée était fournie sous forme déshydraté. Leur revivification consiste à transférer 50 g poudre dans des flacons qui contiennent 5 00 ml de l'eau de robinet. Un milieu de culture composé de : 1 litre d'eau non traité + 15 g NPK (azote, phosphate, potassium) a été ajouté après 24h d'incubation. Ces flacons ont été incubés à 22 °C pendant 24h sous agitation.

Un montage expérimental (figure x) a été élaboré pour assimiler les conditions de la culture réelle constitue de deux flacons relies entre eux par des tuyaux et une pompe émergée assurant la circulation d'eau et le recyclage des boues activées pendant 24h après une culture de 5 jours.

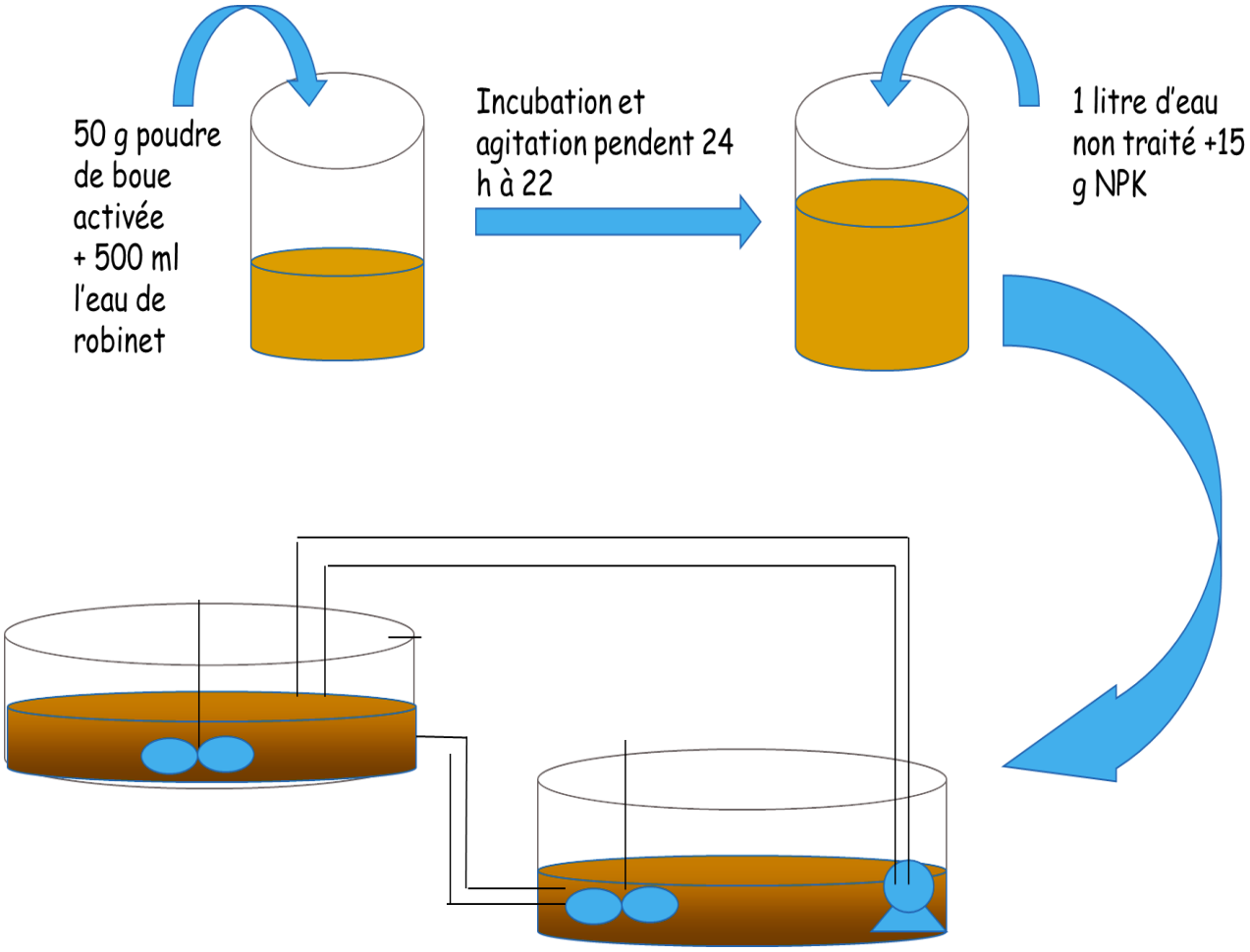


Fig.2.2 Montage expérimentale de culture et recyclage des boues activées

2.2.1.2 Optimisation de culture des BA

Après 24 heures d'incubation, 100 ml de culture ont été versés dans 3 béchers contenant chacun 100 ml de milieu de culture (eau brute + 15 g NPK) et agités pendant 10 jours dans un JARTEST, a une température fixée à 22 °C à l'aide d'un thermostat réglable, dont le pH a été ajusté à différentes valeurs :

- Becher 1 : pH= 6
- Becher 2 : pH =7
- Becher 3 : pH =8

L'évolution de la biomasse des BA a été mesurée par absorption a une longueur d'onde de lecture λ = 620 nm a pour but de se concentrer sur l'adaptabilité et la croissance de la biomasse.

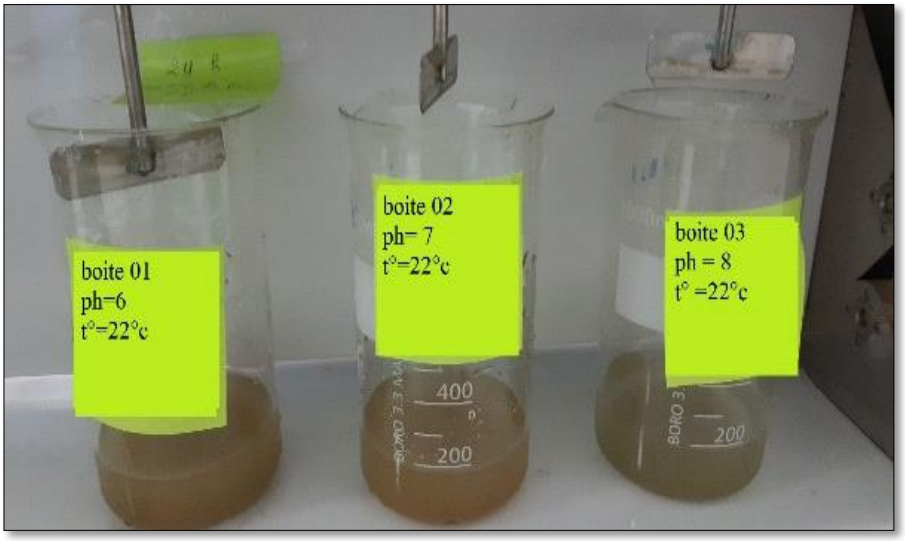


Fig.2.3 Optimisation du pH de culture libre.

2.2.2 Screening des microorganismes présents dans la boue activée

2.2.2.1 Enrichissement sur milieu de culture

Après avoir effectué l'activation et le recyclage des boues activées, une solution mère des BA a été préparée de 9 ml de l'eau physiologie stérile et 1 ml boue activée et une série de dilution allant jusqu'à 10^{-3} a été réalisée par la suite.

L'ensemencement de 0.5 MF de dilution sur deux milieux gélosés TSA et PCA suivi d'une incubation pendant 24h à 37 °C.

2.2.2.2 Isolement des bactéries

Un screening primaire est réalisé sur ces échantillons activés par les méthodes classiques de dénombrement après dilutions décimales allant jusqu'à 10^{-3}.

A l'aide d'une lance de platine on prélève une colonie bien isolée est inoculées à nouveau dans les milieux de culture gélosés sélectifs, Mac conkey, Cromagar, MRS, Muller- Hinton, Hektoen, Chapman et gélose nutritive (GN) préalablement coulés dans des boites de pétri. Les boites sont mises à l'incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les milieux d'isolement utilisés sont :

- **Gélose nutritive**

La gélose nutritive ou gélose ordinaire est un milieu d'isolement non sélectif utilisé généralement pour contrôler la pureté d'une souche bactérienne.

- **Gélose Hektoen**

Est un milieu d'isolement des Salmonelles et des Shigelles, bien que de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur ce milieu. L'identification d'entérobactéries pathogènes repose sur la non utilisation des glucides présents dans le milieu.

- **Gélose Chapman**

Est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre Staphylococcus, mais aussi les Micrococcus, les Enterococcus, les Bacillus, et de rares bactéries à Gram négatif.

- **PCA**

Est un milieu recommandé pour le dénombrement standardisé des bactéries aérobies dans l'eau, les produits laitiers et les aliments, les produits cosmétiques ou pharmaceutiques.

- **TDA**

C'est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens, notamment parmi les Enterobacteriaceae.

- **Mac Conkey**

Est un milieu d'isolement ordinaire, lactosé et sélectif des bacilles à Gram négatif non exigeants.

- **TSA**

Est un milieu d'utilisation générale, permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de micro-organismes.

- **MRS**

Le milieu MRS permet une pousse plus abondante de toutes les souches de lactobacilles, et plus particulièrement des souches à développement lent et difficile comme L. brevis et L. fermenti. Lorsqu'elle est acidifiée à pH 5,4, la MRS Agar peut être utilisée pour dénombrer Lactobacillus bulgaricus dans les yaourts.

2.2.2.3 Identification des souches

Pour identifier les souches, on réalise un certain nombre des tests sui se déroule comme suit :

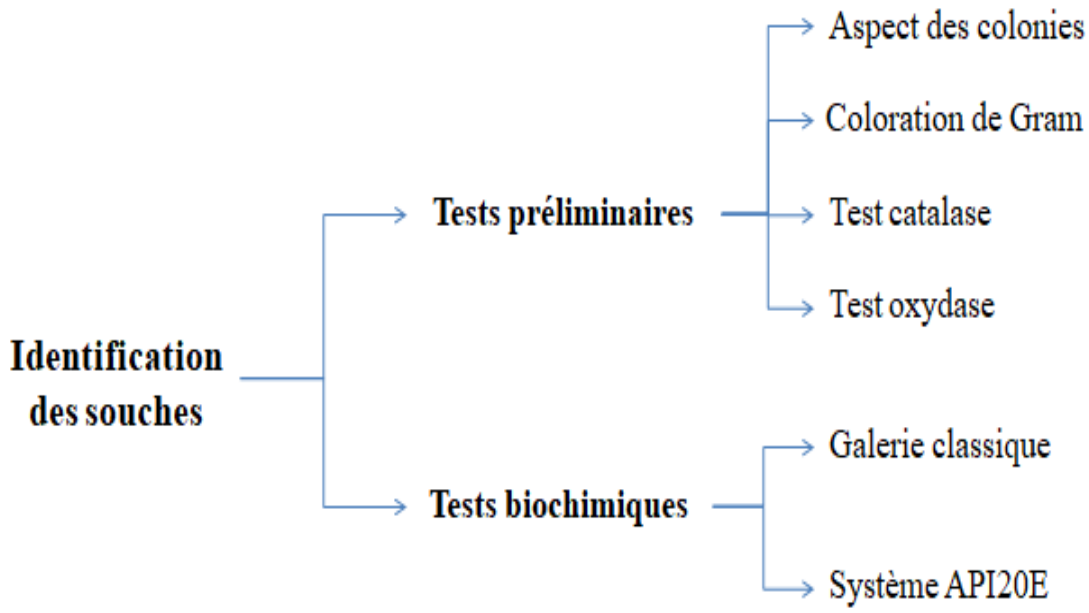


Fig.2.4 Démarche expérimentale pour l'identification des souches

Les caractéristiques macroscopiques sont obtenues après isolement en stries des cultures bactériennes sur milieu gélosé et les colonies bien isolées sont observées au microscope à l'état frais puis à l'état coloré « au Gram » (annexe). Un test à la catalase est réalisé par émulsion d'une colonie dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame. La présence de la catalase est détectée par le dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles d'air (Prescott et *al*., 2003).

La recherche d'oxydase se fait à l'aide d'un test qui permet de détecter un type particulier de chaîne respiratoire, qui comporte en fin de chaîne un cytochrome, et l'oxydase associée ; Un disque

d'oxydase a été placé à l'aide d'une pince flambée par la flamme de bec benzène dans une boite de pétri, ensuite une colonie bien isolée a été prélevé par une pipette pasteur stérile et déposé sur le disque d'oxydase.



Fig2.5 Galerie API 20 E

La galerie API20 E est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles Gram négatif, utilisant 20 tests standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

L'opération s'effectuée selon les étapes suivant : Réunir fond et couvercle d'une boite d'incubation et répartir environ 5 mL d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ; Remplir tubes et cupules des tests (CIT), [VP, GEL), avec la suspension bactérienne ; Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests ; Créer une anaérobiose dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE, H2S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine ; Refermer la boite d'incubation, coder et placer à 37°C pendant 18-24 heures.

Noter sur la fiche le résultat de toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positif : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.
Test VP: ajouter une goutte de réactif VPI et VPII. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.

2.2.3 Essais de dégradation enzymatique des PEs

2.2.3.1 Tests de sensibilité et choix des PEs

Afin d'évaluer la capacité des souches identifiées à dégradé des polluants émergents de type pharmaceutiques, leurs sensibilités in *vitro* à plusieurs médicaments à été teste par la technique de diffusion sur milieux gélosé.

A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement approprié, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été raclé à l'aide d'une pipette pasteur, la pipette ou l'écouvillon a été bien déchargé dans 5 à 10 mL d'eau physiologique stérile à 0.9, puis la suspension bactérienne a été bien homogénéisé. Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mac-Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

Un écouvillon stérile a été trompé dans l'inoculum après cela il a été bien essoré en le pressant comme il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boite de 90 mm. Ensuite chaque disque d'antibiotiques a été pressé à l'aide de pinces bactériologiques stériles la liste des antibiotiques à tester varie selon la bactérie isolée.

2.2.3.2 Bioremédiation par la laccase

2.2.3.2.1 Induction de l'activité laccase

Une expérience de production de laccase par les microorganismes des boues activées *: Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxycota et Pentoea spp3* a été réalisée dans des flacons de 250 mL contiens un milieu de culture sous des conditions biens précises (pH =8 ; T ambiante ; Volume de culture = 100 ml ; agitation rotatif).

L'activité de la laccase dans la culture en croissance active a été induite par l'ajout de 224.5 µL de gaïacol + 50 mg de $CuSO_4$ dans 1 litre de milieu TSB (trypticase-soja) au jour 0 et les microorganismes ont ensuite été laissées à croitre pendant 48 heures supplémentaires. La culture sans gaïacol et $CuSO_4$ a été considérée comme témoin.

2.2.3.2.2 Dosage enzymatique

Utilisé la méthode de broyage pour clati les microorganismes et extrayons l'enzyme (les échantillons ont été prélevés par centrifugation à 1500 g pendant 10 min à 4° C après 48 heures de culture le surnagent a été retiré et le culot a été broyer avec 2 ml de tampon glycine PH=3.5 pendant 3 min pour tous les microorganismes *Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxycota et Pentoea spp3* et après centrifuger pour la 2 ème fois à 1500 g pendent 10 min le culot a été retiré et le surnageant a utilisé pour le dosage enzymatique (déterminer la teneur).

Les échantillons ont été prélevés par centrifugation à 8000 g pendant 20 min à 4 ° C après 3 jours de culture. Le culot a été retiré et le surnageant a été utilisé pour le dosage enzymatique (déterminer la teneur en enzyme laccase).



Fig2.6 Méthode d'extraction de la laccase

L'activité laccase (EC 1.10.3.2) a été mesurée à 30 °C en utilisant 2 mM d'ABTS (L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) dans du tampon glycine HCl 0,1 M (pH 2,5). La couleur verte développée en raison de l'oxydation de l'ABTS a confirmé la présence de laccase. L'augmentation de l'absorbance du mélange d'essai a été contrôlée à 420 nm dans un spectrophotomètre.

Le mélange réactionnel (1000 µL) consistait en 100 µL d'ABTS, 800 µL de tampon glycine HCl 0,1 M (pH 2.5) et 100 µL de solution d'enzyme brute (surnageant). Le blanc contient tout le constituant à l'exception de l'enzyme active. Le mélange réactionnel a été incubé à 30°C pendant 2 min.

Le coefficient d'extinction (ε) de l'ABTS était de 36 000 M^{-1} cm^{-1}. L'activité laccase a été calculée comme suit (Mezaal *et al.*,2020) :

$$\text{Activité enzymatique } (\text{U.mL}^{-1}) = \frac{\text{A} \times \text{V} \times 106}{\varepsilon \times \text{t} \times \text{v}} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

Où :

- A : Absorbance à 420 nm ;

- V : Volume total du mélange réactionnel en (ml) ;
- Ɛ: coefficient d'extinction molaire de ABTS = 36 000 M^{-1} cm^{-1};
- t : temps d'incubation (2 min)
- v : volume d'enzyme utilisé en (ml)

Les activités enzymatiques ont été exprimées en unités internationales (U), définies comme la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol du substrat en 1 min (Atalla et *al.*, 2010).

La concentration en protéines a été dosée par la méthode de Bradford (1976), avec de l'albumine de sérum bovin comme standard.

2.2.3.2.3 Purification partielle de la laccase

Une culture a été cultivée dans des conditions optimisées : température 30°C, pH 8.0 et induite avec CUSO4 + gaïcol ; pour une production maximale d'enzymes (Afreen *et al.*, 2017). Au 4ème jour, le surnageant de culture obtenu par centrifugation à 8000 g pendant 20 min et a été soumis à une précipitation à l'acétone froide (Le filtrat de culture a été mélangé avec de l'acétone froide à un rapport volumique de 1:4 (filtrat : acétone) et incubé à -20°C pendant 1 heure 30 minutes)

La protéine a été précipitée et recueillie par centrifugation à 10 000 g pendant 30 min. Le surnageant a ensuite été jeté et le culot résiduel séché à l'air pour éliminer tout résidu d'acétone, Le culot qui servait maintenant de source d'enzyme pour une étude ultérieure *(Afreen et al., 2017).*

2.2.3.2.4 Dégradation *in vitro* des PEs par la laccase des souches identifiées

La dégradation de 10 µg/L de DCF, AMP par la laccase de *A. platensis* a été étudiée pour les PEs individuellement. Pour évaluer l'efficacité de la dégradation, des solutions mères contenant 10 µg/L de DCF, AMP a été préparées séparément dans du le tampon glycine PH=3.5 (ou eau ultra pure), puis stockées dans des flacons ambrés ou dans des béchers de 250 mL recouverts de papier d'aluminium (Pour éliminer la possible dégradation de l'antibiotique à la lumière) à 18 °C avant utilisation.

Ces solutions de PEs agitées (5.25 µg/L ; 100 ml) tamponnées avec un tampon glycine pH 3.5, ont été incubées avec 20 µL de laccase de chaque microorganisme (5,3 mg de protéine/mL, 600 U/mL) sur agitateur rotatif pendant quatre (04) h à 80 tr/min et 30 °C. Les expériences ont été réalisées en double dans l'obscurité et l'enzyme sans PEs a été considérée comme témoin dans l'expérience. La

dégradation des PEs a été surveillée à intervalles réguliers (30 min) pour assurer une dégradation maximale *(Becker et al., 2016).* Des sous-échantillons ont été prélevés après 240 min d'incubation en prenant 0,5 mL et en ajoutant 0,5 mL de méthanol pour désactiver la laccase afin d'arrêter la dégradation ultérieure.

La dégradation des médicaments a été analysée par spectrophotométrie à (λ_{max}) nm à l'aide d'un spectrophotomètre à différents moments au cours de l'expérience, et le pourcentage de dégradation de l'effluent a été vérifié selon la formule :

$$D = 100\ (A_{ini} - A_{obs})/\ A_{ini} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

Où :

- D : la dégradation (en %),
- A_{ini} : Absorbance initiale et
- A_{obs} : Absorbance observée

2.2.3.3 Bioremédiation par la peroxydase

2.2.3.3.1Induction de l'activité peroxydase

Une expérience de production de peroxudase par les microorganismes des boues activées *: Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxycota et Pentoea spp3* a été réalisée dans des flacons de 250 ml contiens un milieu de culture sous des conditions biens précises (pH =8 ; T ambiante ; Volume de culture = 100 ml ; l'agitation)

L'activité de peroxydase dans le milieu culture TSB (trypticase-soja) au jour 0 et les microorganismes ont ensuite été laissées à croitre pendant 48 heures supplémentaires.

2.2.3.3.2 Dosage enzymatique

Utilisé la méthode de broyage pour clati les microorganismes et extrayons l'enzyme (les échantillons ont été prélevés par centrifugation à 1500 g pendant 10 min à 4° C après 48 heures de culture le surnagent a été retiré et le culot a été broyer avec 2 mL de tampon phosphate buffer PH=7 pendant 3 min pour tous les microorganismes *Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxycota*

et Pentoea spp3 et après centrifuger pour la 2 ème fois à 1500 g pendent 10 min le culot a été retiré et le surnageant a utilisé pour le dosage enzymatique (déterminer la teneur en enzyme peroxydase).

L'activité peroxydase a été mesurée à 30 °C en utilisant 1000 µl de gaïacol+ 900 µl H_2O_2. La couleur rose développée en raison de l'oxydation de gaïacol a confirmé la présence de peroxydase. L'augmentation de l'absorbance du mélange d'essai a été contrôlée à 470 nm dans un spectrophotomètre Shimadzu UV3600.

Le mélange réactionnel (µL) consistait en 1000 µL de gaïacol, 900 µL de H2O2 et 100 µL de solution d'enzyme brute (surnageant). Le blanc contient tout le constituant à l'exception de l'enzyme active. Le mélange réactionnel a été incubé à 30°C pendant 2 min.

$$\text{Activité enzymatique } (\text{U.mL}^{-1}) = \frac{\text{A} \times \text{V} \times 2}{\varepsilon \times \text{v}} \qquad \text{(Eq. 3)}$$

Où :

- A : Absorbance à 470 nm ;
- V : Volume total du mélange réactionnel en (ml) ;
- v : volume d'enzyme utilisé en (ml)
- Ɛ : coefficient d'extinction 25.5 $mM^{-1}cm^{-1}$.
  Temps d'incubation (2 min)

2.2.3.3.3 Dégradation *in vitro* des PEs par peroxydase des souches identifiées

La dégradation de 5.25 µg/L de DCF et AMP par la peroxydase des souches identifiées a été étudiée pour les PEs individuellement. Pour évaluer l'efficacité de la dégradation, des solutions mères contenant 5.25µg/L de DCF, AMP a été préparées séparément dans du le tampon phosphate buffer PH=7 (ou eau ultra pure), puis stockées dans des flacons ambrés ou dans des béchers de 250 mL recouverts de papier d'aluminium (Pour éliminer la possible dégradation de l'antibiotique à la lumière) à 18 °C avant utilisation.

Ces solutions de PEs agitées (5.25 µg/L ; 100 ml) tamponnées avec un tampon phosphate buffer pH 7, ont été incubées avec 20 µL de peroxydase de chaque microorganisme (5,3 mg de protéine/mL, 600 U/mL) sur agitateur rotatif pendant quatre (04) h à 80 tr/min et 30 °C. Les expériences ont été réalisées en double dans l'obscurité et l'enzyme sans PEs a été considérée comme témoin dans l'expérience. La dégradation des PEs a été surveillée à intervalles réguliers (30

min) pour assurer une dégradation maximale *(Becker et al., 2016)*. Des sous-échantillons ont été prélevés après 240 min d'incubation en prenant 0,5 mL et en ajoutant 0,5 mL de méthanol pour désactiver la peroxydase afin d'arrêter la dégradation ultérieure.



Fig.2.7 Dégradation des polluants dans agitateur rotatif.

La dégradation des médicaments a été analysée par spectrophotométrie à (λ_{max}) nm à l'aide d'un spectrophotomètre à différents moments au cours de l'expérience, et le pourcentage de dégradation de l'effluent a été vérifié selon la formule :

$$D = 100\ (A_{ini} - A_{obs})/\ A_{ini} \quad \text{(Eq. 4)}$$

Où :

- D : la dégradation (en %),
- A_{ini} : Absorbance initiale et
- A_{obs} : Absorbance observée

2.2.4 Dosage de protéines totales par la méthode de Bradford

Cette méthode s'articule sur la loi de Beer-Lambert pour déterminer une concentration inconnue d'une solution protéique. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité des protéines en solution.

Dans la première étape. On trace la courbe d'étalonnage A= f ([Protéine]) comme suit :
Prendre 5 tubes à essaies, y introduire : 0,1mL de l'enzyme à différentes concentrations de 0 à 100 mg L^{-1} avec un pas de 25 mg L^{-1}, ajouter 0.25 mL de NaOH (1 M) et 5 mL du réactif de Bradford. Agiter puis laisser les tubes 10 minute pour développer la coloration. Chaque concentration correspond à une absorbance qui se traduit sur la courbe d'étalonnage *absorbance=f ([enzyme])*

Dans la deuxième étape

Introduire dans un tube a essaie : 0,1 mL d'EEPP ; 0,25 mL d'NaOH (1M) et 5 mL du réactif de Bradford. L'absorbance est mesurée à 595 nm après 10 min pour la coloration rose à développer. La concentration en protéine (mg L^{-1}) dans l'EE est déterminée par la projection de la densité optique de l'EE sur la courbe d'étalonnage de l'enzyme.

$$\text{Protéines totales (mg/ml)} = \frac{A}{0.001} \qquad \text{(Eq. 5)}$$

Où :

- A : Absorbance à 590 nm
- La pente : 0,001 Lmg^{-1}

$$\text{Activité totale (UI/ml)} = Pt \times As \qquad \text{(Eq. 6)}$$

Où :

- Pt : Protéines totales (mg/ml)
- As : Activité spécifique (UI/mg)

$$\text{Facteur de purification} = \frac{Activité\ spécifique\ EEPP}{Activité\ spécifique\ EEB} \qquad \text{(Eq. 7)}$$

Où :

- Activité spécifique EEPP : Purification avec l'acétone.
- Activité spécifique EEB : Homogénat initial.

$$\text{Rendement \% de purification} = \frac{Activité\ totale\ EEPP}{Activité\ totale\ EEB} \qquad \text{(Eq. 8)}$$

Où :

- Activité totale EEPP : Purification avec l'acétone.
- Activité totale EEB : Homogénat initia

3.RESULTATS &DISCUSSION

3. RESULTATS & DISCUSSION

3.1 Les condition de culture optimales des boues activées

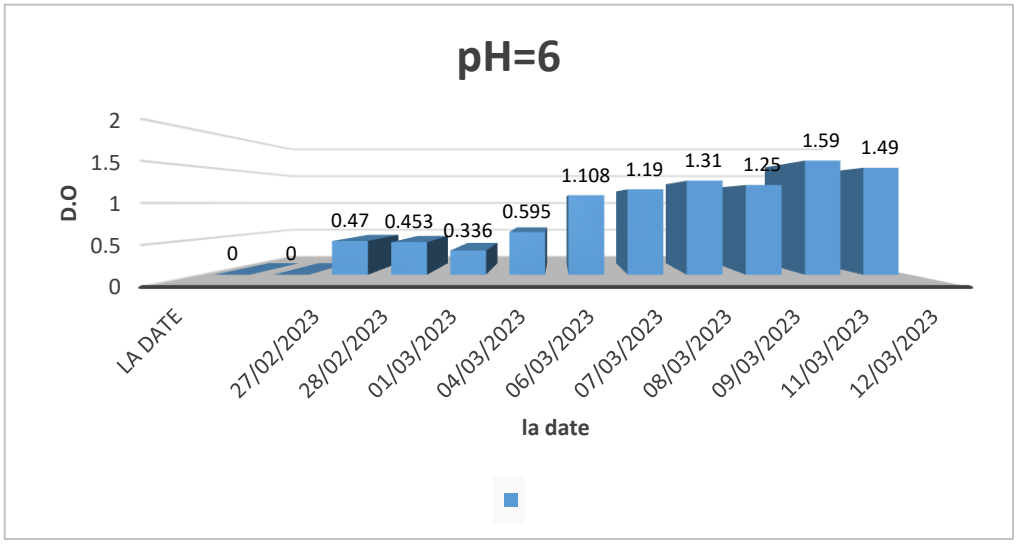
Après l'échantillonnage d'une boue activée ont été attribuées les conditions optimales à cette souche (boue activée).

Et on a le tableau suivant qui donne les valeurs de la densité optique dans les différentes valeurs de pH :

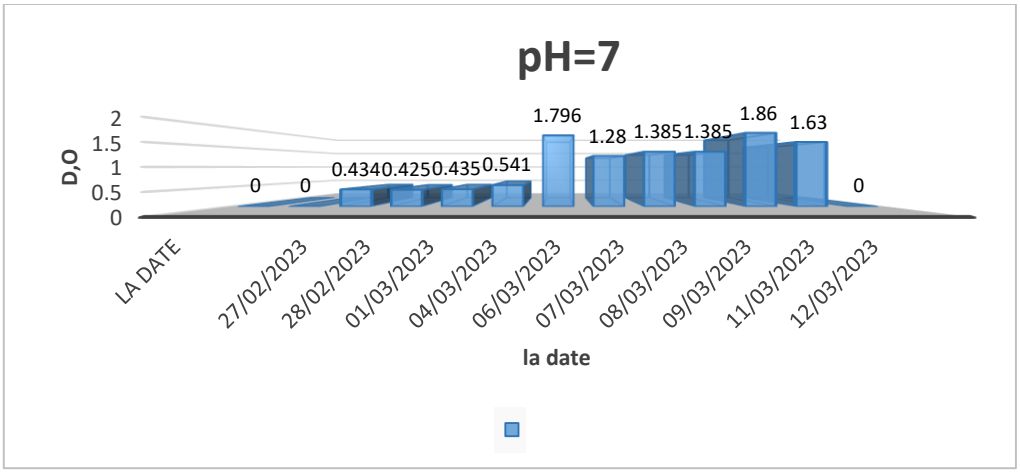
Tableau3.1 Les valeurs de la densité optiques (la croissance de biomasse).

	Densité optique		
La date	**pH =6 température=22 c°**	**pH =7 température=22 c°**	**pH =8 température=22 c°**
27/02/2023	0,47	0,434	0,5
28/02/2023	0,453	0,425	0,725
01/03/2023	0,336	0,435	0,807
04/03/2023	0,595	0,541	1,338
06/03/2023	1,108	1,796	2,022
07/03/2023	1,19	1,28	**2,39**
08/03/2023	1,31	1,385	1,758
09/03/2023	1,25	1,385	1,87
11/03/2023	1,59	1,86	2,28
12/03/2023	1,49	1,63	**2,4**

PH=6



pH=7



pH=8

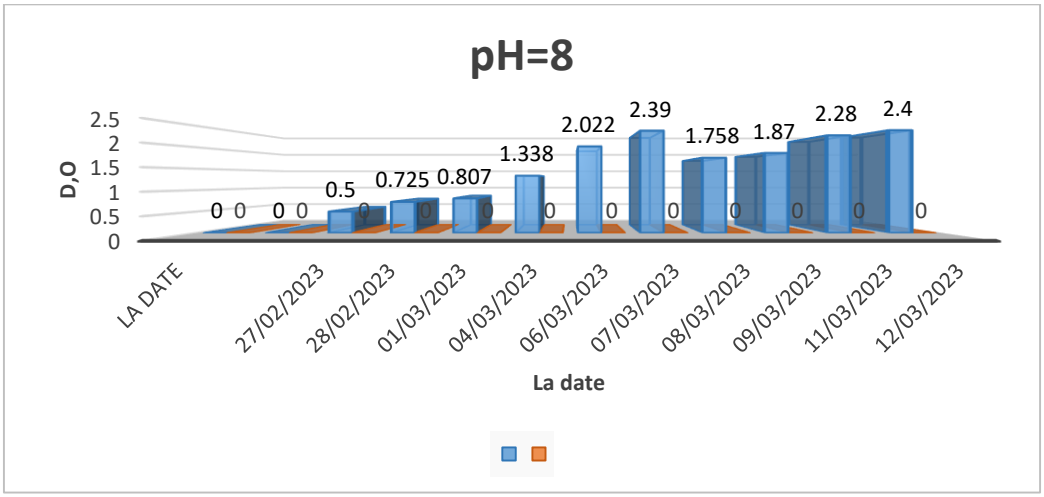


Fig.3.1 Les valeurs de la densité optiques (la croissance de biomasse) dans les déférents pH.

Nous concluons que les conditions de vie des boues actives sont :

- pH =8
- Température=22 °c
- L'agitation
- L'aération
- Le recyclage

3.2 Screening des microorganismes présents dans la boue activée

3.2.1 Enrichissement sur milieu de culture

Apres l'ensemencement dans les deux milieux PCA et TSA et incubation dans 37 °c pendent 24 h on observe les colonies suivantes :

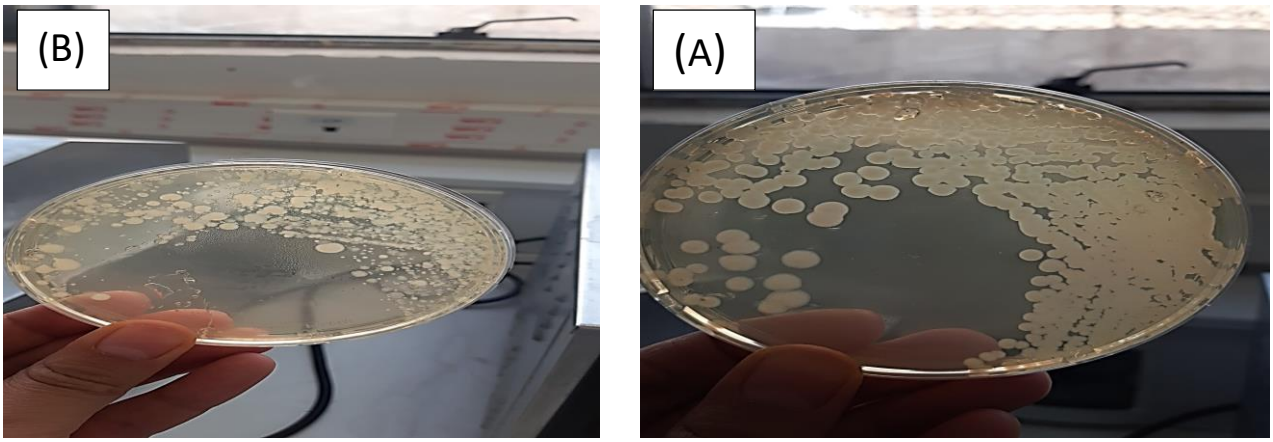


Fig3.2 Boue active : **(A)** Après l'ensemencement dans le milieu PCA ; **(B)** Après l'ensemencement dans le milieu TSA.

3.2.1.1 étude macroscopique

Le tableau suivant représente les résultats d'étude macroscopiques des souches bactérienne qui se trouve dans les boues activées :

Tableau 3.2 Étude macroscopiques.

Macroscopique	Boite (A) PCA	Boite (B) TSA
La forme	Irrégulier Circulaire	circulaire, irrégulière et fusiforme
L'élévation	Plane Convexe	Plane Convexe
Bord	Régulier On dolé	Régulier On dolé
L'opacité	Opaque Translucide	Opaque
La consistance	Grasse Crénasses	Grasse Siècle
La couleur	blanc	Blanc

3.2.1.2 étude microscopique

Etudes microscopiques pour l'identification de nos souches basées sur deux méthodes principales, voir tableau ci-dessous :

Tableau3.3 Étude microscopique.

Microscopique	Boite (a) PCA	Boite (b) TSA
L'état frais	Bacilles	Bacilles
Coloration de gram	Gram -	Irrégulier : gram - Circulaire :gram -

3.2.1.3 étude biochimique

Tableau3.4 Étude biochimique.

Biochimique	Boite (a) PCA	Boite (b) TSA
Test catalase	Catalase +	Irrégulier : catalase + Circulaire :catalase -

3.2.2 Isolement des bactéries

Apres l'isolement dans les milieux : Mac conkey, MRS, chapman, Cromagar, Muller-Hinton, Hektoen, GN, on a obtenu les résultats suivants :

3.2.2.1 Observation macroscopique

La première étape du diagnostic bactérien et du biotypage d'une souche est la description macroscopique des colonies bien isolées, voir la figure 3.2 :



Milieu Chapman **Milieu Mac Conky** **Milieu MRS**

Fig.3.3 Aspect des colonies après l'isolement.

Les résultats d'isolement dans les autres milieux. **Annexe2**

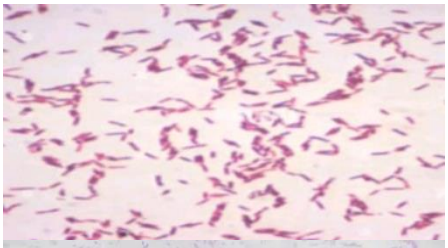
3.2.2.2 Observation microscopique

3.2.2.2.1 Coloration de GRAM

Dans cette étude, des colonies colorées ont été observées au microscope optique après coloration de Gram, et les résultats suivants ont été obtenus :

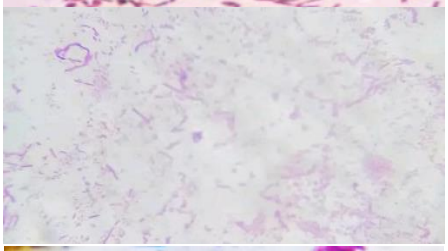
Milieu Chapman

Bacilles gram négative (-)



Milieu Mac Conky

Bacilles gram négative (-)



Milieu MRS

Bacilles gram négative (-)

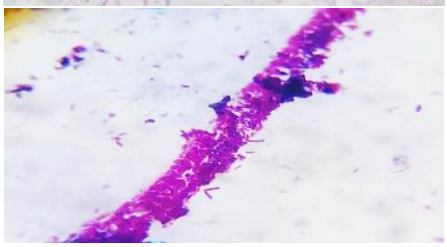


Fig.3.4 Observation des bacilles Gram- à l'objectif X 40 après l'ajout l'huile à immersion.

3.2.2.3 Étude biochimique

Dans une étude biochimique des deux tests (catalase et oxydase) nous avons observé les résultats obtenus :

- Chapman a donné des résultats positifs aux tests de catalase et d'oxydase pour les colonies présentes dans le milieu.
- Les colonies dans le milieu Mac conky donnent une catalase positive et une oxydase négative.
- Pour les colonies en milieu MRS, les tests biochimiques étaient négatifs pour la catalase et l'oxydase.

Voir le graphique ci-dessous, qui explique les résultats de ces tests :

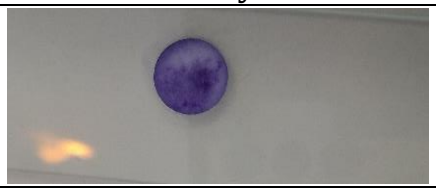
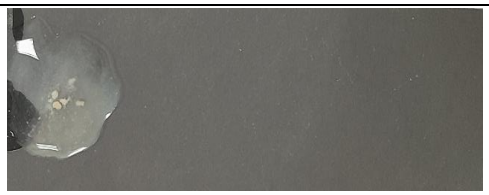
	Test catalase	Test oxydase
Milieu Chapman		
	Catalase positive	Oxydase positive
Milieu Mac Conky		
	Catalase positive	Oxydase négative
Milieu MRS		
	Catalase négative	Oxydase négative

Fig.3.5 Résultats des tests biochimiques catalase et oxydase.

3.2.3 Identification biochimique

Après confirmation des résultats d'identification bactériologique à l'aide de la galerie API 20 E, la couleur obtenue est causée par les micro-organismes suivants :

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Kleblseilla oxytoca*
- *Pentoea spp3*

La figure suivante présente les résultats de la galerie API 20E :

Pseudomonas aeruginosa	
Kleblseilla oxytoca	

Pentoea spp3	

Fig.3.6 Résultats de la galerie API 20 E.

4. Essais de dégradation enzymatique des PEs

4.1 Tests de sensibilité et choix des PEs

Distribution des espèces bactériennes au total 3 espèces bactériennes ont été identifiées (tableau). *Pseudomonas aeruginosa, Klebesiella oxytoca et pantea spp3.*

Tableau 3.5 Profile de résistance et de sensibilité des souches aux antibiotiques.

ATB	*Pseudomonas aeruginosa*	*Klebesiella oxytoca*	*pantea spp3*
AMPICILINE	**R**	**R**	/
DICLOFENAC	**R**	**R**	/
PENICILLINE	**S**	**R**	/
AMOXILICILLINE	**S**	**R**	/
IBUPROGENAC	**S**	**R**	/
SULFAMETHOXAZOLE	**S**	**S**	/

R= résistance, **S**= sensible, **ATB**= antibiotiques

A partir les résultats de l'antibiogramme, nous avons remarqué que :

Pour *Pseudomonas aeruginosa* était résistance à antibiotique AMPICILINE et Diclofénac, par contre elle était sensible pour Pénicilline, Amoxicilline, Ibuprogenac et Sulfaméthoxazole.

Pour *Kleblseilla oxytoca* était résistance pour Ampicilline, Diclofénac Pénicilline, Amoxicilline, Ibuprogenac. Par contre était sensible pour un seul antibiotique qui est le Sulfaméthoxazole.

Après 3 essieu dans déférentes milieux de cultures (muller Hinton, MRS) la bactérie pantea *spp3.* On observe les résultats suivants :

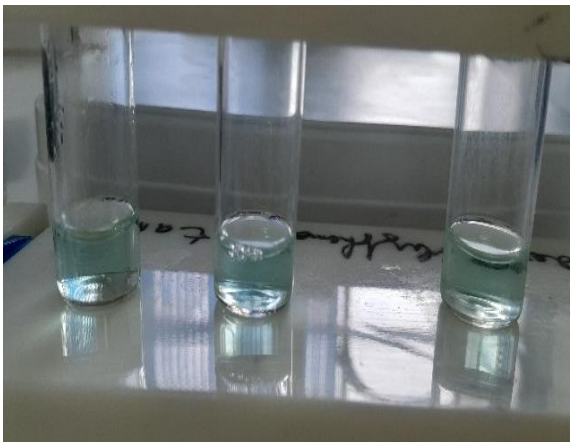
Pseudomonas aeruginosa	
Kleblseilla oxytoca	
Pentoea spp3	**Absence**

Fig.3.7 Résultats d'antibiogramme.

4.2 Activité enzymatique

4.2.1 laccase (extrait brute)

La couleur verte observé dans la figure suivante due à l'activité enzymatique de laccase



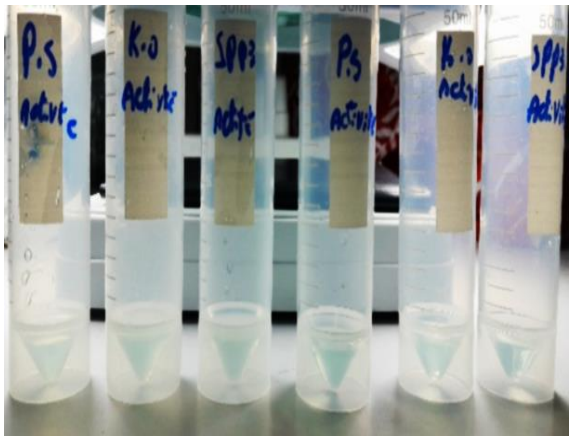


Fig.3.8 Dosage enzymatique pour laccase brute par coloration avec l'ABTS.

Activité enzymatique de :

- *Pseudomonas aeruginosa :* A.E =0.0088 $U.\,mL\hat{}\,(-1)$.
- *Kleblseilla oxytoca :* A.E = 0.0178 $U.\,mL\hat{}\,(-1)$.
- *Pentoea spp3 :* A.E = 0.0121 $U.\,mL\hat{}\,(-1)$.

L'histogramme (3.8) présente les enzymes de trois micro-organismes en fonction de l'activité enzymatique de laccase.

- Le profil présente des résultats variables entre les souches où *Pseudomonas aeruginosa possède* une activité enzymatique de 0.0088, tandis que *Kleblseilla oxytoca :* A.E = 0.0178 et *Pentoea spp3 :* A.E = 0.0121 $U.\ mL^{\wedge}(-1)$.

- On constate un taux élevé de l'activité enzymatique chez *Kleblseilla oxytoca* avec valeur de 0.0178 suivie par l'activité enzymatique de *Pentoea spp3* A. E= 0.0121 $U.\ mL^{\wedge}(-1)$. et à la fin *Pseudomonas aeruginosa* 0.0088 $U.\ mL^{\wedge}(-1)$.. (Voir la figure suivante)

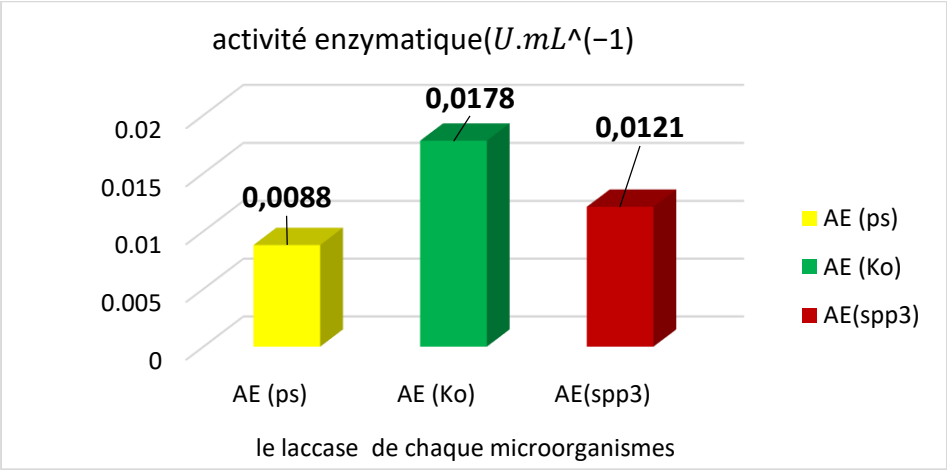


Fig. 3.9 L'activité enzymatique de laccase brute des trois microorganismes en $U.\ mL^{\wedge}(-1)$.

4.2.2 Laccase semi-purifier

La couleur verte observée sur l'image ci-dessous est due à l'activité enzymatique de la laccase



Fig.3.10 Dosage enzymatique pour laccase purifier par coloration avec l'ABTS.

Activité enzymatique de :

- *Pseudomonas aeruginosa :* A.E =0.00222 $U.\ mL^{\wedge}(-1)$.

- *Kleblseilla oxytoca :* A.E = 0.00426 $U.\ mL^{\wedge}(-1)$.

- *Pentoea spp3 :* A.E = 0.0107 $U.mL^{\wedge}(-1)$.

Histogramme présente de la répartition de l'activité enzymatique de laccase semi purifier des trois microorganismes en $U.mL^{\wedge}(-1)$.

On trouve que l'activité enzymatique de laccase semi purifier des *Pentoea spp3* est 0.0107 tandis que 0.00426 $U.mL^{\wedge}(-1)$ chez *Kleblseilla oxytoca* et 0.00222 $U.mL^{\wedge}(-1)$ pour *Pseudomonas aeruginos* (voir figure 3.10)

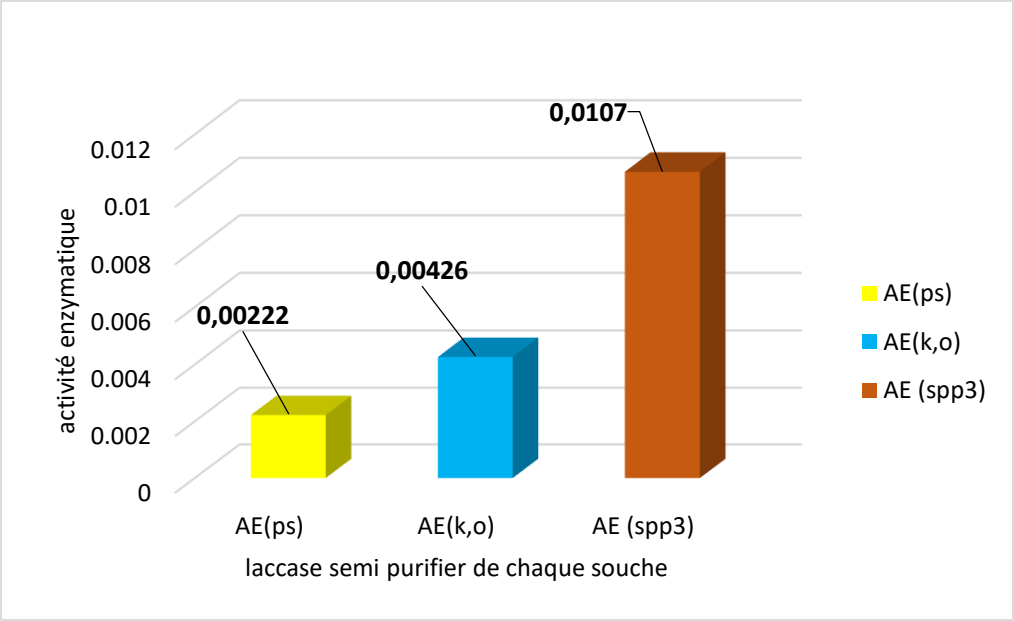


Fig3.11 L'activité enzymatique de laccase semi purifier des trois microorganismes en $U.mL^{\wedge}(-1$

4.2.3 Peroxydase

Le virage de couleur après l'utilisation le gaïacol et H_2O_2.

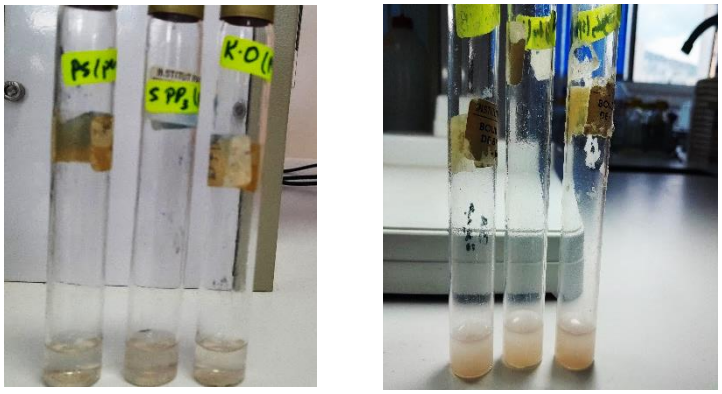


Fig. 3.12 Dosage enzymatique pour peroxydase.

Activité enzymatique de :

- *Pseudomonas aeruginosa :* A.E = 0.646 $U.mL^{\wedge}(-1)$.
- *Kleblseilla oxytoca :* A.E = 0.269 $U.mL^{\wedge}(-1)$.
- *Pentoea spp3 :* A.E = 0.495 $U.mL^{\wedge}(-1)$.

Représentation graphique présente de la répartition de l'activité enzymatique de peroxydase des trois microorganismes en $U.mL^{\wedge}(-1)$.

D'après le profil, on constate une forte activité enzymatique de peroxydase chez *Pseudomonas aeruginosa* avec une valeur de 0.646 suivie par *Pentoea spp3* avec une activité enzymatique de 0.495 et 0,269 l'activité enzymatique de *Kleblseilla oxytoca* (voir figure 3.12).

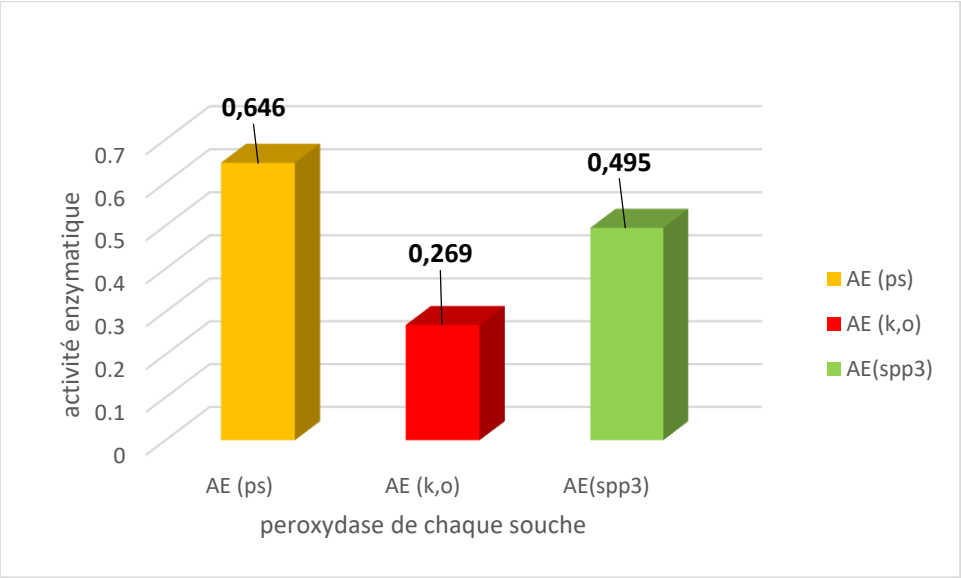


Fig.3.13 L'activité enzymatique de peroxydase des trois microorganismes en $U.mL^{\wedge}(-1)$.

5. Dosage de protéines

5.1 Laccase extrait de microorganismes (*Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, Pentoea spp3*)

Sur cette figure, la couleur bleue obtenue distingue les protéines :



Fig.3.14 Dosage de protéines.

Courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage, également appelée courbe standard, est une méthode générale pour déterminer la concentration d'une substance dans un échantillon inconnu en comparant l'inconnu à un ensemble d'échantillons standard de concentration connue ; On a la courbe suivante d'étalonnage de l'enzyme, avec une pente égale=0,001 Lmg^{-1} :

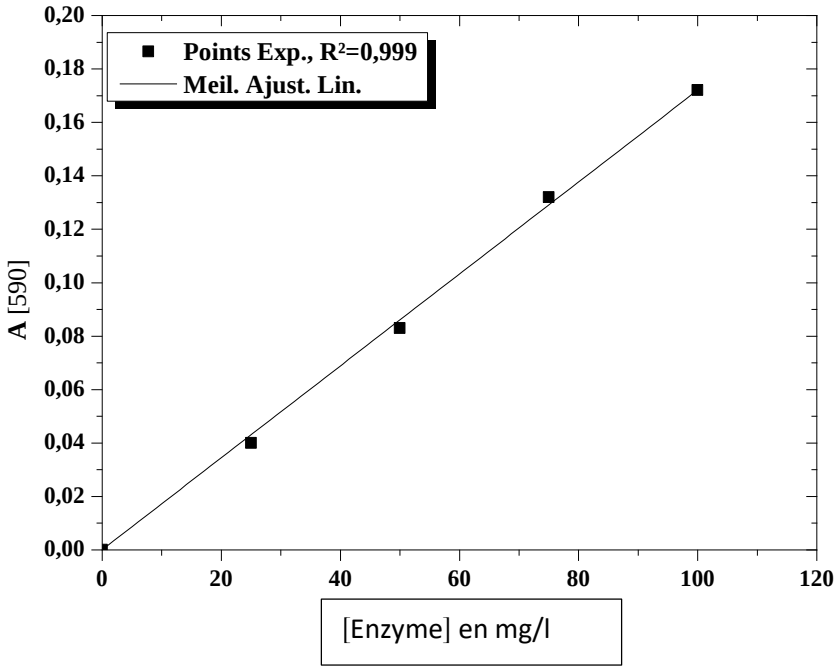


Fig.3.15 Courbe d'étalonnage de l'enzyme, avec une pente égale=0,001 Lmg^{-1}

Le tableau de la purification sert à montrer le rôle et l'efficacité de processus de purification en utilisant l'acétone. Il fait appel à des notions et à des termes précis. On exprime la pureté d'une préparation de protéines en parlant de son activité spécifique. L'activité spécifique est l'activité enzymatique par rapport à la quantité totale de l'ensemble

des protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités enzymatiques par poids de protéines totales. Plus l'activité spécifique est élevée, plus l'enzyme est pure.

Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique.

Le rendement de la purification est la proportion, en pourcentage (%), de l'activité de l'enzyme purifiée par rapport à la concentration en protéine initiale, puisqu'il est inévitable qu'on ait des pertes de matériel, et par conséquent la perte d'activité enzymatique. Le rendement diminue après la purification avec l'acétone dans :

- *Pseudomonas aeruginosa* : diminue de 100 % à 36.38 %.
- *Kleblseilla oxytoca :* diminue de 100% à 95.2%.
- *Pentoea spp3 :* diminue de 100% à 78.38%.

Donc, La purification consiste en un "compromis" entre l'obtention d'une enzyme (protéines) pure et une activité maximale.

Tableau.3.6 Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la laccase de *Pseudomonas aeruginosa* .

Étape	**Protéines totales (mg/ml)**	**Activité totale (UI/ml)**	**Activité spécifique (UI/mg)**	**Facteur de purification**	**Rendement (%)**
Homogénat initial (EEB)	248	2.182	0.0088	/	100
Purification avec l'acétone (EEPP)	358	0.794	0.0022	0.252	36.38

Tableau.3.7 Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la laccase de *Kleblseilla oxytoca.*

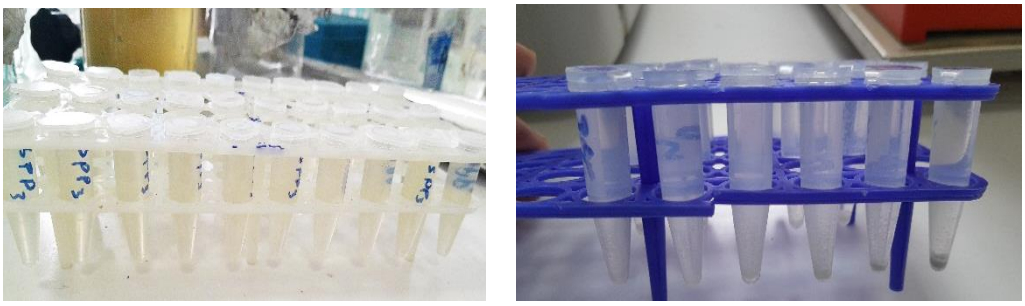
Étape	**Protéines totales (mg/ml)**	**Activité totale (UI/ml)**	**Activité spécifique (UI/mg)**	**Facteur de purification**	**Rendement (%)**
Homogénat initial (EEB)	82	1.459	0.0178	/	100

Purification avec l'acétone (EEPP)	331	1.390	0.0042	0.239	95.2

Tableau.3.8 Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la laccase de *Pentoea spp3* .

Étape	**Protéines totales (mg/ml)**	**Activité totale (UI/ml)**	**Activité spécifique (UI/mg)**	**Facteur de purification**	**Rendement (%)**
Homogénat initial (EEB)	158	1.911	0.0121	/	100
Purification avec l'acétone (EEPP)	140	1.498	0.0107	0.884	78.38

En effet, la purification a justement pour but d'obtenir une protéine de plus en plus pure. La pureté d'une préparation de protéine est évaluée non seulement quantitativement mais elle peut être aussi évaluée selon des critères qualitatifs. La couleur l'EEB et l'EEPP ne sont pas identiques, pour la solution purifiée.



(a) **(b)**

Fig.3.16 Apparence de l'extrait enzymatique, avant et après la purification.

(a) avant la purification (EEB), **(b)** après la purification (EEPP).

6. Dégradation des polluants

6.1 Dégradation d'Ampicilline par la laccase (extrait brute) de chaque microorganisme

A partir de cet histogramme, nous avons observé que le rendement de la dégradation de l'ampicilline exerçait une influence sur l'activité enzymatique de la laccase de trois ces micro-organismes étudiées.

- Laccase qui se trouve dans le *Pseudomonas aeruginosa* est dégradé l'ampicilline à 70%.
- Laccase qui se trouve dans la *Kleblseilla oxytoca* est dégradé l'ampicilline à 73.33%.
- Laccase qui se trouve dans le *Pentoea spp3* est dégradé l'ampicilline à 53.33%.

Donc, une des propriétés importantes d'amélioré l'éliminations de l'ampicilline c'est l'activité optimale de la laccase (voir figure 3.16).

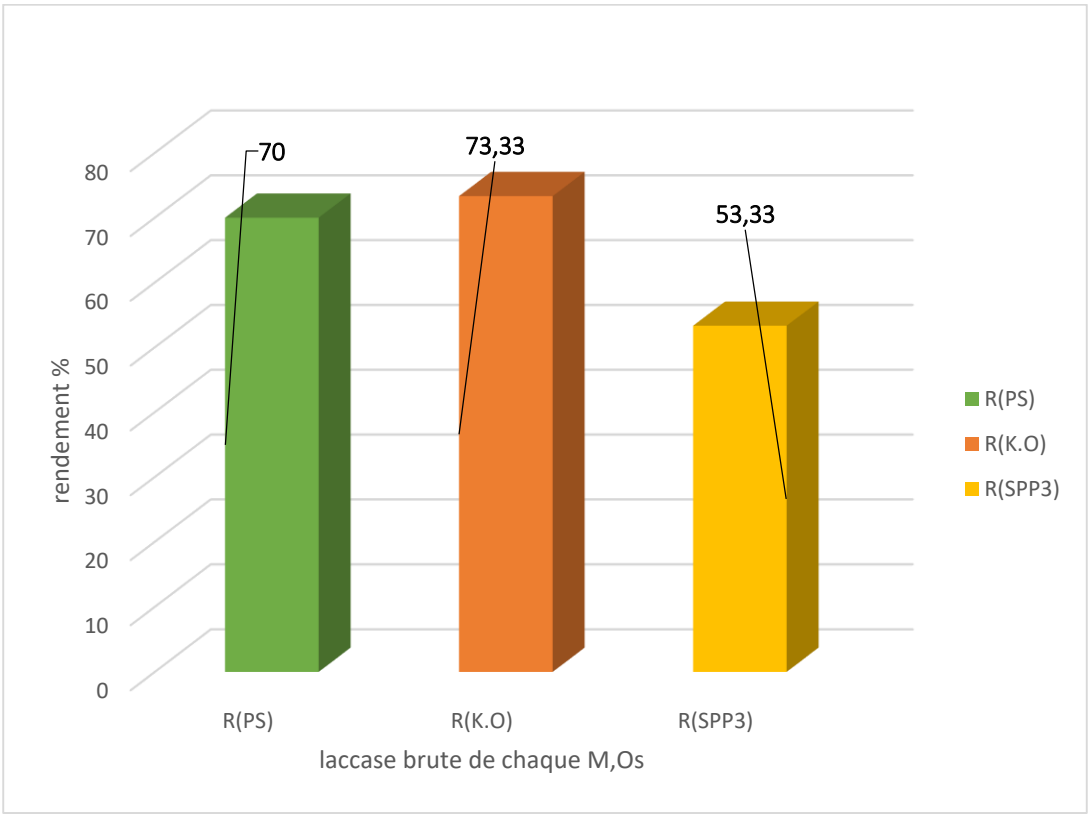


Fig3.17 le rendement de la dégradation de l'ampicilline par laccase (extrait brute) extrait par *Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, Pentoea spp3.*

6.2 Dégradation d'ampicilline par la laccase semi-purifier de chaque microorganisme

D'après les histogrammes, on peut voir que l'efficacité de dégradation de l'ampicilline a un effet sur l'activité laccase purifiée de trois de ces microorganismes étudiés.

• La laccase trouvée dans Pseudomonas aeruginosa dégrade l'ampicilline à 73,33 %. • La laccase présente dans Klebesiella oxytoca est responsable de 80 % de la dégradation de l'ampicilline.

• 86,66% des laccases trouvées dans Pentoea spp3 ont été dégradées par l'ampicilline (voir la figure suivante).

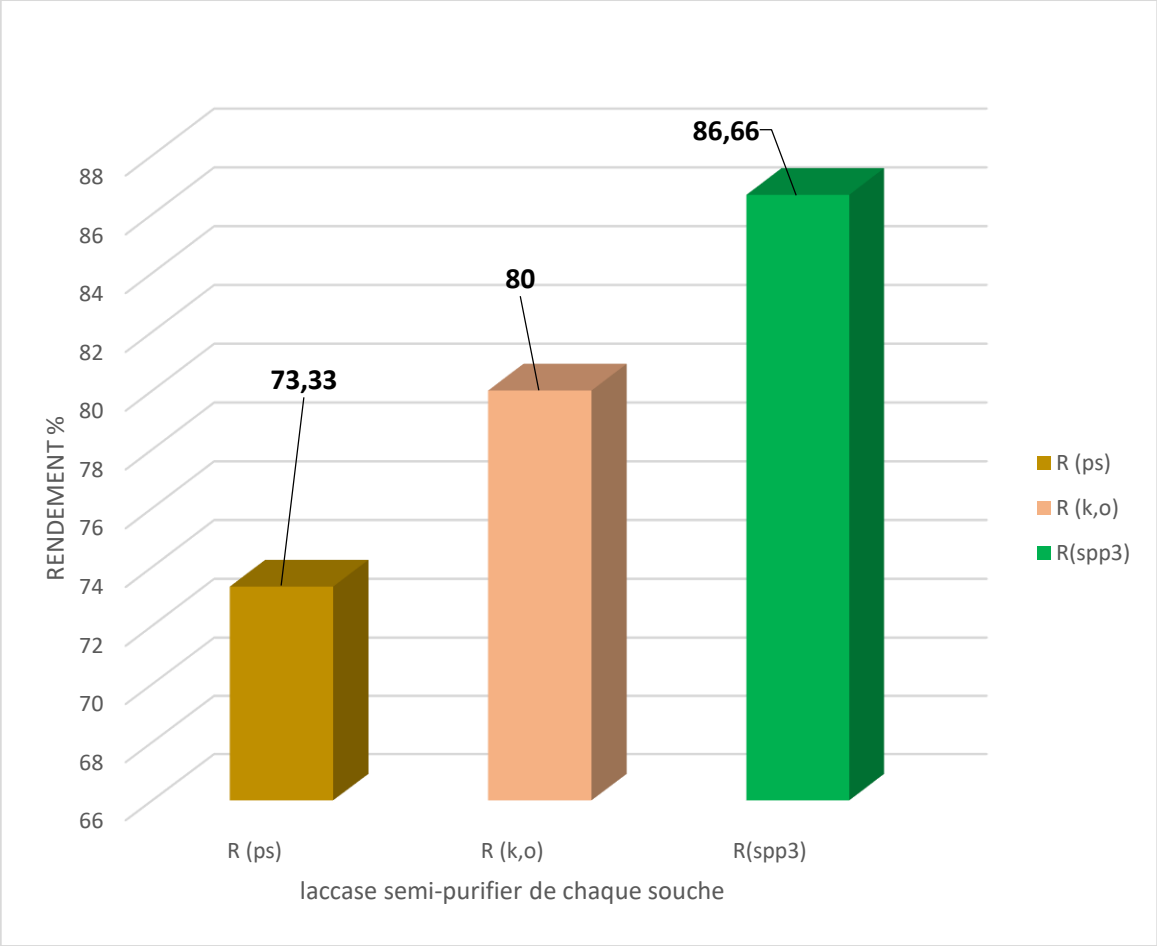


Fig.3.18 Le rendement de la dégradation de l'ampicilline par laccase semi-purifier extrait par *Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, Pentoea spp3.*

6.3 Dégradation de diclofénac par la laccase (extrait brute) de chaque microorganisme

Il a été observé à partir des histogrammes que l'efficacité de dégradation du diclofénac avait un effet sur l'activité enzymatique des laccases extraites de trois de ces microorganismes étudiés.

• La laccase trouvée dans Pseudomonas aeruginosa est dégradée à 96,55 % en diclofénac.

• La laccase de Klebesiella oxytoca dégrade 86,2 % du diclofénac.

• Dégradation de la laccase dans Pentoea spp3 à 70,86 % de diclofénac (voir figure 3.18)

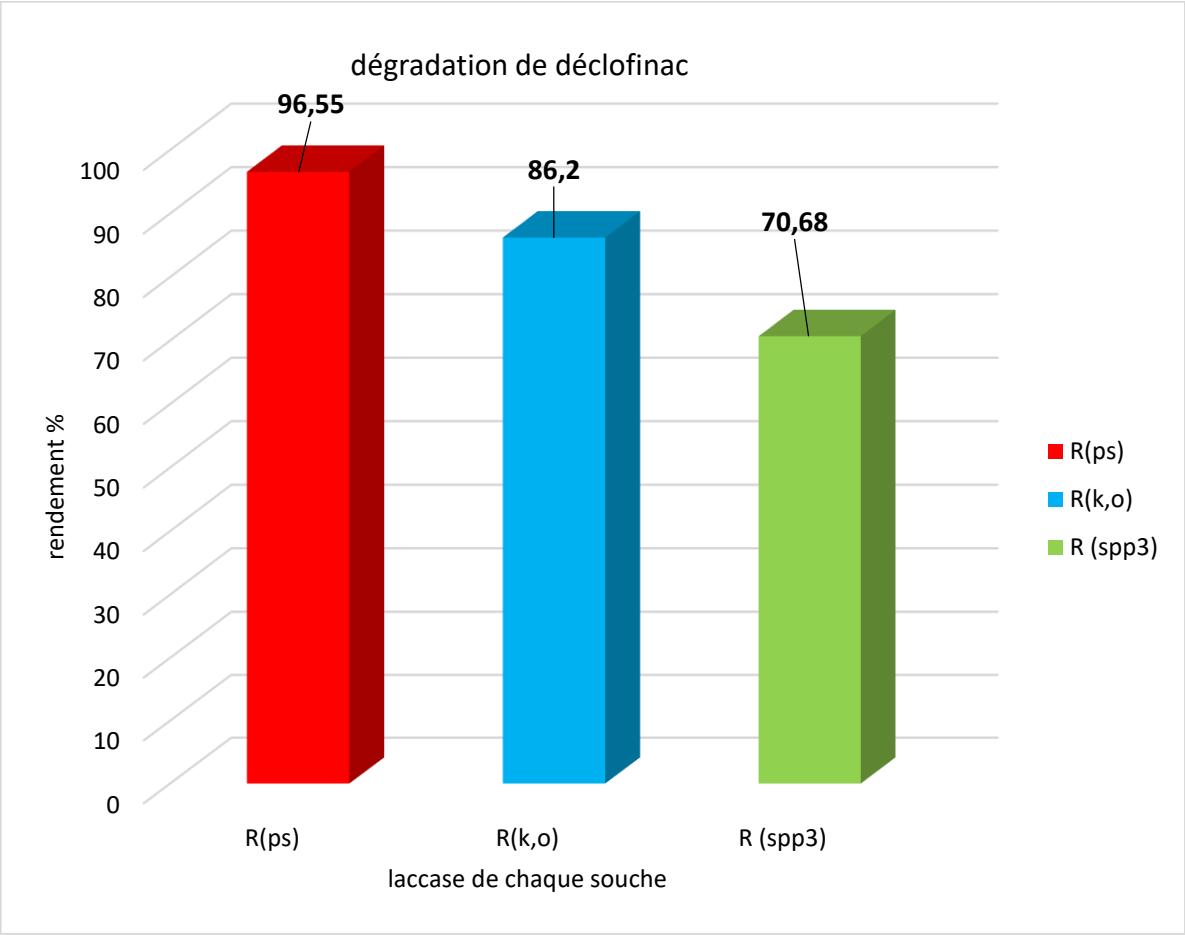


Fig.3.19 Le rendement de la dégradation de diclofénac par laccase (extrait brute) extrait par *Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, Pentoea spp3.*

6.4 Dégradation de diclofénac par la laccase semi-purifier de chaque microorganisme

Il a été observé à partir des histogrammes que l'efficacité de dégradation du diclofénac avait un effet sur l'activité enzymatique des laccases extraites de trois de ces microorganismes étudiés.

• La laccase présente dans *Pseudomonas aeruginosa* est dégradée à 70 % en diclofénac.

• La laccase de *Klebesiella oxytoca* a dégradé 73,33 % du diclofénac.

• Dégradation de la laccase dans *Pentoea spp3* à 53,33 % de diclofénac (voir la figure 3.19).

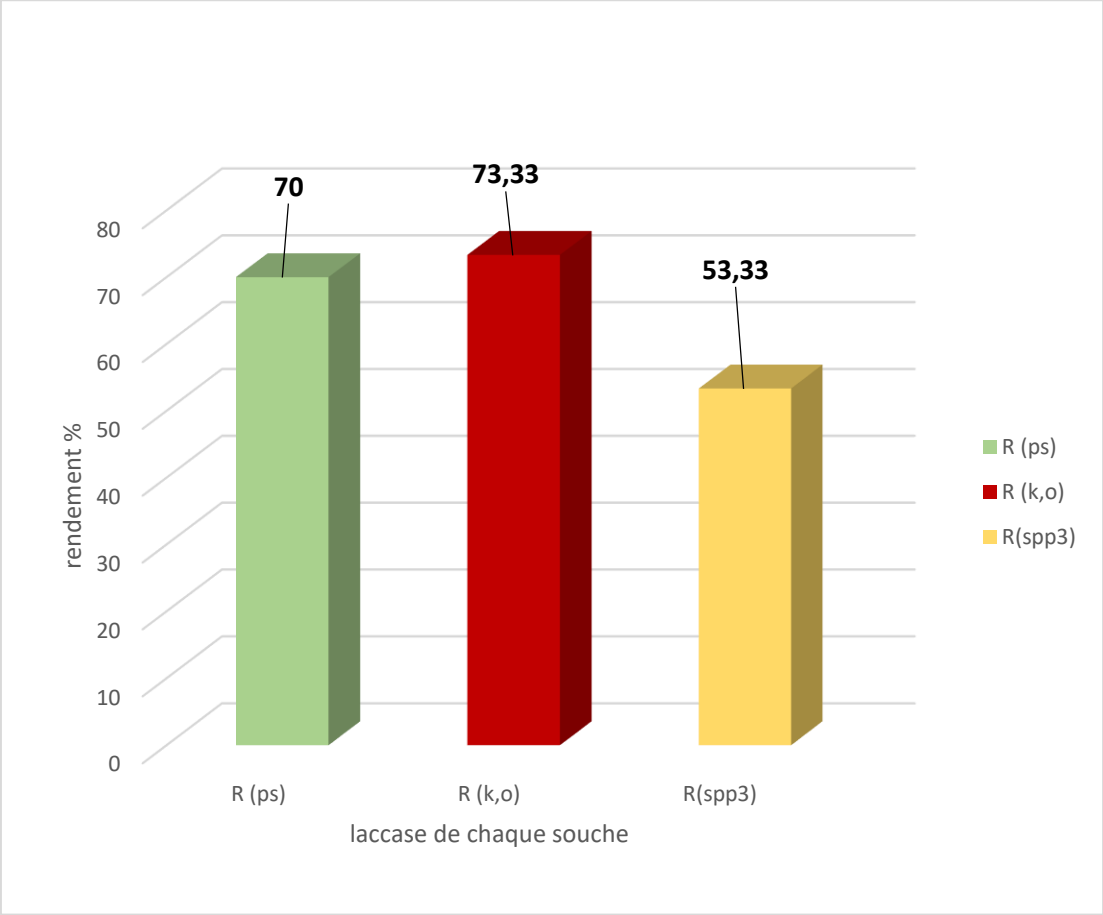


Fig.3.20 Le rendement de la dégradation de diclofénac par laccase semi-purifier extrait par *Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, Pentoea spp3.*

6.5 Dégradation d'ampicilline par peroxydase (extrait brute) de chaque microorganisme

D'après les histogrammes, il a été observé que l'efficacité de dégradation de l'ampicilline avait un effet sur l'activité enzymatique des peroxydases extraites de trois de ces microorganismes étudiés.

• La peroxydase trouvée dans *Pseudomonas aeruginosa* est de l'ampicilline dégradée à 87,87 %.

• Les peroxydases trouvées dans *Klebesiella oxytoca* étaient à 84,68 % des agents de dégradation de l'ampicilline.

• 98,72% des peroxydases trouvées dans *Pentoea spp3* sont dégradées par l'ampicilline (voir la figure suivante Fig.3.20).

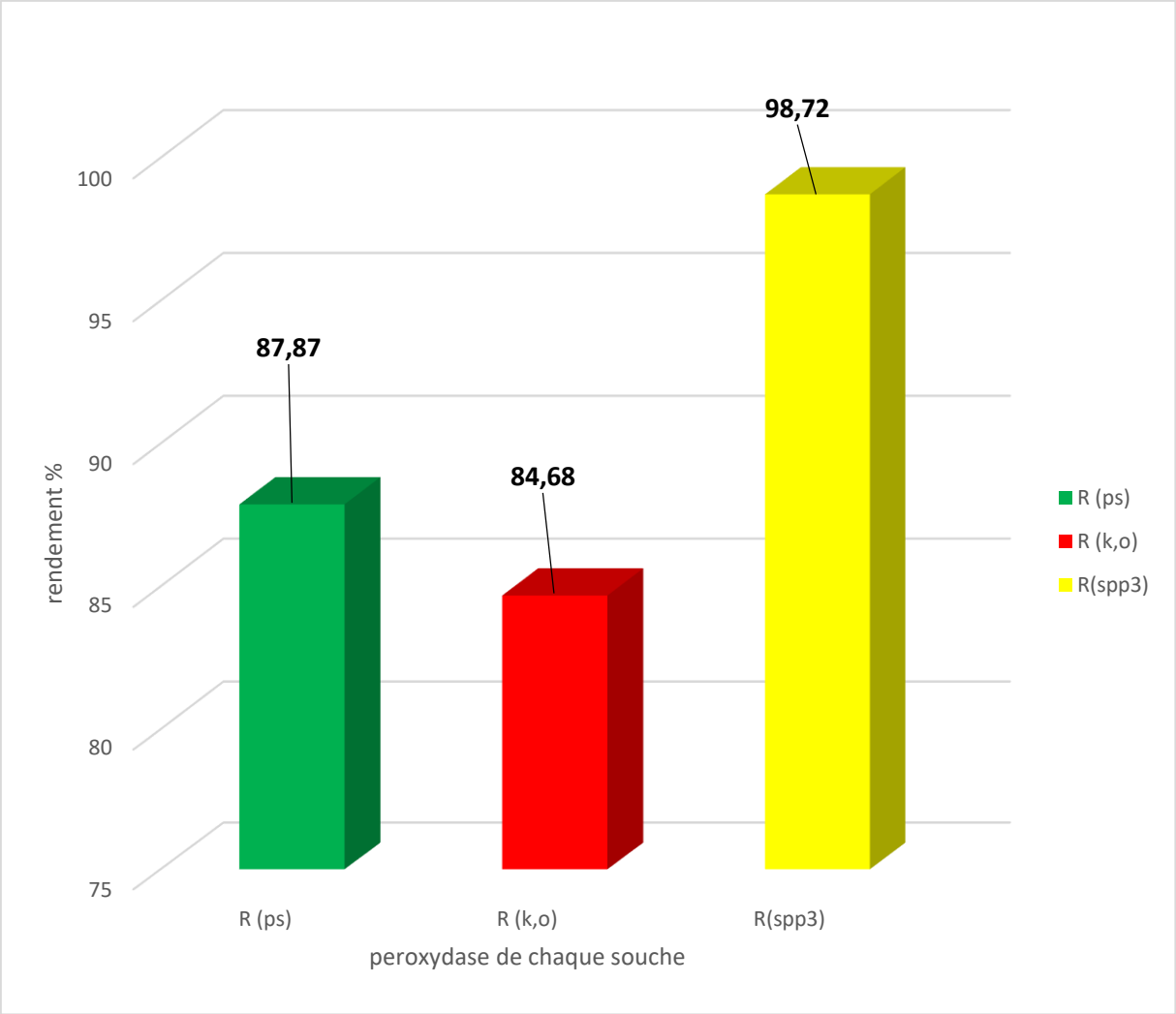


Fig.3.21 Le rendement de la dégradation d'ampicilline par peroxydase extrait par *Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, Pentoea spp3.*

6.6 Dégradation de diclofénac par peroxydase de chaque microorganisme

D'après l'histogramme on observe que le rendement de la dégradation de de diclofénac un effet sur l'activité enzymatique de laccase extrait brute de trois ces micro-organismes étudiées.

- Peroxydase qui se trouve dans le *Pseudomonas aeruginosa* est dégradé diclofénac à 58.49%.
- Peroxydase qui se trouve dans *Kleblseilla oxytoca* est dégradé diclofénac à 11.32%.
- Peroxydase qui se trouve dans *Pentoea spp3* est dégradé diclofénac à 92.45% (voir figure 3.21)

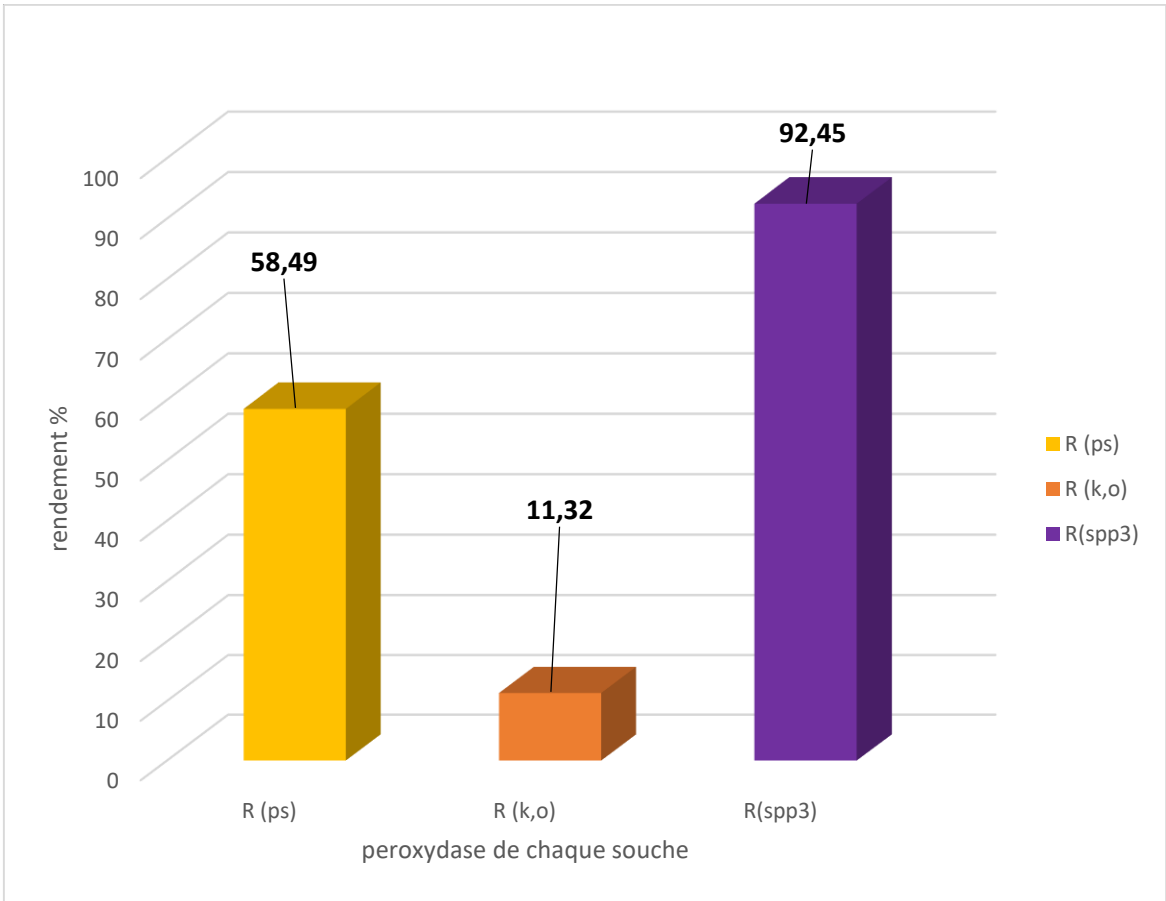


Fig.3.22 Le rendement de la dégradation de diclofénac par peroxydase extrait par *Pseudomonas aeruginosa, Kleblseilla oxytoca, Pentoea spp3.*

7. Comparaison de l'efficacité enzymatique de diverses souches

Dans les deux tableaux ci-dessous nous comparons la dégradation d'antibiotiques (ampicilline) par différentes enzymes extraites de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa, Klebesiella oxytoca, et Pentoea spp3,* et la dégradation d'un anti-inflammatoire (diclofénac).

Et encore nous comparons la dégradation de ces polluants par l'enzyme brute et semi-purifier.

Tableau.3.9 Comparaison entre la dégradation d'ampicilline par les enzymes de chaque souche étudier.

R / M.O	Laccase Brute	Laccase semi-purifier	Peroxydase Brute
Pseudomonas aeruginosa	70%	73.33%	87.87%
Kleblseilla oxytoca	73.33%	80%	84.68%
Pentoea spp3	53.33%	86.66%	98.72%

R= rendement

M.O= microorganisme

Tableau.3.10 Comparaison entre la dégradation de diclofénac par les enzymes de chaque souche étudier.

R / M.O	Laccase Brute	Laccase semi-purifier	Peroxydase Brute
Pseudomonas aeruginosa	96.55%	91.37%	58.49%
Kleblseilla oxytoca	86.20%	87.93%	11.32%
Pentoea spp3	70.68%	93.10%	92.45%

On observe que :

- La laccase semi-purifier de chaque souche dégrade l'ampicilline plus que laccase brute.
- Pour diclofénac la laccase semi-purifier dégrade mieux que la laccase brute.
- Le rendement en laccase brute et en laccase semi-purifiée qui dégrade l'ampicilline est supérieur à celui de l'enzyme qui élimine le diclofénac.
- Le rendement en peroxydase qui dégrade l'ampicilline est supérieur au rendement en peroxydase qui décompose le diclofénac.

CONCLUSION

Conclusion

La contribution à la valorisation de biocatalyseurs enzymatiques extraits à partir d'une boue active pour le traitement des eaux polluées par des contaminants organiques offre des avantages significatifs en termes de durabilité environnementale et d' efficacité du processus de dépollution .les biocatalyseurs enzymatiques ;dérivés de microorganismes présents dans les boues actives ; présentent une activité catalytique élevée et une spécificité pour les contaminants organiques ;ce qui en fait des outils puissants pour la dégradation de ces polluants. Cette étude nous permet de mieux comprendre l'identification et extraction des enzymes (peroxydase et laccase (des microorganismes de boue active pour le traitement des eaux polluées. De nos travaux on peut conclu que les microorganismes sont des *Pentoea spp3* ; *Klebesiella oxytoca* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; les enzymes peroxydase et laccase dégradent l'antibiotique ampicilline et diclofénac. En perspective des études antérieurs utilisent des techniques de biologie moléculaire est nécessaire pour l'extraction des enzymes d'une boue active pour le traitement des eaux polluées par des contaminants organiques qui représente une approche prometteuse et durable pour la dépollution de l'eau.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Addou, 2009** : (2017) EUFEMED 2017. Doi :10.3389/978-2-88945-202-6.

2. **AITAYNE K ET DOUNLA S, 2009 :** Irreversible climate change due to carbon.

3. **Akhtar & Mannan, 2020:** MA; A.N. (no date) Mycoremediation: Expunging environmental pollutants, Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands).
4. **Ali Al-Maqtari** et al., **2019:** Author links open overlay panelQais Ali Al-Maqtari a b c d et al. (2021) Stabilization of water-in-oil emulsion of pulicaria jaubertii extract by ultrasonication: Fabrication, characterization, and storage stability, Food Chemistry.
5. **Al-maqdi** et al**., 2021:** Al-Maqdi KA;Bilal M;Alzamly A;Iqbal HMN;Shah I;Ashraf SS; (no date) Enzyme-loaded flower-shaped nanomaterials: A versatile platform with biosensing, biocatalytic, and environmental promise, Nanomaterials (Basel, Switzerland).
6. **Amruta, 2023:** (No date a) International puja schedule 2023 - sahaja yoga - amruta. Available at: https://pdf.amruta.org/Calendars/2023/Sahaja_Yoga_Pujas_2023.pdf
7. **Assamoi et al., 2009 Michel Musoni et al. (2015):** Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: From traditional methods to Engineered Systems, BASE.
8. **Azubuike** et al., **2016:** (No date a) (PDF) bioremediation: Principles and application in environmental ... Available at: https://www.researchgate.net/publication/340267415_Bioremediation_Principles_and_Application_in_Environmental_Management_Toxicity_Mechanisms_of_Contaminants_Degradation_Detoxification_and_Challenges_Elsevier.
9. **Bala** et al**., 2022:** Bala M;Catena F;Kashuk J;De Simone B;Gomes CA;Weber D;Sartelli M;Coccolini F;Kluger Y;Abu-Zidan FM;Picetti E;Ansaloni L;Augustin G;Biffl WL;Ceresoli M;Chiara O;Chiarugi M;Coimbra R;Cui Y;Damaskos D;Di Saverio S;Galante JM;Khokha V;Kirkpatrick AW;Inaba K;L (no date) Acute mesenteric ischemia: Updated guidelines of the World Society of Emergency surgery, World journal of emergency surgery : WJES. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36261857/.
10. **Barklayetal ; Buckley et al ; et kurbus et al :** Baker, S.J. et al. (2020) Co2-induced climate forcing on the fire record during the initiation of cretaceous oceanic anoxic event 2, GSA Bulletin.

11. **Bassompierre 2007** : Procédé à Boues activées pour le traitement d'effluents papetiers : De ...
12. **Benchaabane & Chadouli, 2019:** Quantum efficiency of charge transfer competing against nonexponential ... (no date).
13. **Berné et Cordonnie, 1991):** (No date) Motivating project-based learning: Sustaining the doing, supporting the ...
14. **Brady et al., 2010** The influence of nursing leadership on Nurse Performance: A systematic). (no date).
15. **Brisset, 2005**): Brisset, S. and Brochet, P. (2005) Analytical model for the optimal design of a brushless DC Wheel Motor, COMPEL - The international journal for computation and mathematics in electrical and electronic engineering.
16. **Burhan & al., 2002:** Fiori, M. and Vesely-Maillefer, A.K. (1970) Emotional intelligence as an ability: Theory, challenges, and New Directions, SpringerLink.
17. **Canler et al., 2014 :** Canler, J.-P. (2014) Aide aux diagnostic des stations d'épuration par l'observation microscopique des Boues activées. Versailles (Paris): Quae.
18. **Chergui et al., 2016 :** Quercus suber forest and pinus plantations show different post-fire ...
19. **Cosnier2000: A** composite clay glucose biosensor based on an electrically connected.
20. **De García, García-Encina, & Irusta-Mata, 2017:** Ortiz de García S;García-Encina PA;Irusta-Mata R; The potential ecotoxicological impact of pharmaceutical and personal care products on humans and freshwater, based on UsetoxTM Characterization Factors. A Spanish case study of toxicity impact scores, The Science of the total environment.
21. **Deshmukh** et al., **2016:** AS; D. (no date) Insulin-stimulated glucose uptake in healthy and insulin-resistant skeletal muscle, Hormone molecular biology and clinical investigation. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26485752/.
22. **Dhina BENSENANE 2014 :** Fadia KHADOUDJA etude de L'éimination de colorants en solution aqueuse par biosorption sur les feuilles du pistachier lentisque suivie d'une photocatalyse hétérogéne, Mémoire de Magister, Universite Houari boumadianne, 2014.
23. **Diakhate, 2010** Diakhaté, D. (2010) Les secrets d'une réussite: Récit. Dakar-Ponty, Sénégal: Éditions Feu de brousse.
24. **Djeddi H, 2007:** Apa PsycNet (no date a) American Psychological Association. Available at: https://psycnet.apa.org/record/2007-09934-002.
25. **Djemai et al., 2020**): Author links open overlay panelRokhsareh Mohammadzadeh 1 et al. (2022) Archaeal key-residents within the human microbiome: Characteristics, interactions and involvement in health and disease, Current Opinion in Microbiology.

26. **Djemai, Boukrouk & Rouibah, 2020 :** Contribution à l'étude de l'élimination de polluants émergents de type ... (no date).
27. **Dugniolle, 1980 Glanic et Benneton, 1989 :** Memoire - Université Abdelhamid ibn Badis Mostaganem.
28. **El Hifnawy C, 2012:** (No date) Effect of soil-structure interaction on damping of structures. Available at: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/eqe.4290110503.
29. **Enguita et al., 2003:** The Journal of Biological Chemistry © 2003 by the American Society for.
30. **Fickers et al 2008:** Mumm, P., Imes, D., Martinoia, E., Al-Rasheid, K. a. S., Geiger, D., Marten, I., &Hedrich, R. (2013). C-Terminus-Mediated Voltage Gating of Arabidopsis Guard Cell Anion Channel QUAC1. Molecular Plant, 6(5), 1550–1563.
31. **Fragkou** et al., **2021:** Galanis P;Vraka I;Fragkou D;Bilali A;Kaitelidou D; (no date) Nurses' burnout and associated risk factors during the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis, Journal of advanced nursing. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33764561/.
32. **Guerra, Kim, Shah, Alaee, & Smyth, 2014**: Guerra P;Kim M;Shah A;Alaee M;Smyth SA; (no date) Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes, The Science of the total environment
33. **HAINQUE et al .2008**: CEZARD, 2009 Author links open overlay panelConor Fearon a et al. (2020) Medical Management of myoclonus-dystonia and implications for underlying pathophysiology, Parkinsonism & Related Disorders. Extraction et purification des enzymes (no date)
34. **Henri A et al.,2004:** Apa PsycNet (no date) American Psychological Association. Available at: https://psycnet.apa.org/record/2004-13697-016
35. **ILLANES, 2008:** Enzyme biocatalysis : Principles and applications in SearchWorks catalog. (no date).
36. **Isidori, Bellotta, Cangiano & Parrella, 2009):** Genotoxicity of aqueous extract from heated cooking oils and its ... (no date)
37. **Jaiswal & Shukla, 2020:** Author links open overlay panelShweta Jaiswal et al. (2019) Integrated approaches in microbial degradation of plastics, Environmental Technology & Innovation. Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352186419306893.

38. **Janda et Abbott, 2006; Abbott ;2007**): SL; J.J.16S rrna gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and Pitfalls, Journal of clinical microbiology.
39. **Jarlier et Nordman, 2000 :** Nauciel, 2000 Nauciel, C. Bactriologie mdicale, Google Books.
40. **Karigar & Rao, 2011:** SS; K.C. (no date) Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A Review, Enzyme research. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21912739/.
41. **Klavarioti, Mantzavinos et Kassinos, 2009:** Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems ... - researchgate. (no date)
42. **Koller ,2004**: Lancaster University (no date) research.lancs.ac.uk. Available at: https://www.research.lancs.ac.uk/portal/en/publications/computer-applications-in-critical-discourse-analysis(5ac963e1-2a73-4c7c-80ae-a585954152e6)/export.html
43. **Kulshreshtha** et al**., 2014:** Kulshreshtha, S., Mathur, N. and Bhatnagar, P. (2014) Mushroom as a product and their role in mycoremediation, AMB Express. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052754/.
44. **Kumar & Baul, 2010:** Kumar, P., & Baul, G. (2010). Bioremediation Technology. Bioremediation Technology, 245–265. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3678-0.
45. **Lanteigne, 2010** Inter-regionalism in the Global South: Comparison with extra-, cross ... (no date)
46. **Madikizela et al., 2020**: Analysis, occurrence and removal of pharmaceuticals in ... - researchgate. (no date)
47. **Maroga Mboula, 2012**: Maroga Mboula V;Héquet V;Gru Y;Colin R;Andrès Y. Assessment of the efficiency of photocatalysis on tetracycline biodegradation, Journal of hazardous materials (no date)
48. **McAdam 2006**: leiknes 2009: Mattia, D. (1970) Water treatment by membrane operations, SpringerLink.
49. **Mderreg, 2015 :** Mderreg, B. (1970) Infections à pseudomonas aeruginosa en reanimation : Evolution de la Résistance aux antibiotiques à travers le temps., Semantic Scholar.
50. **Meziani et Mahcene, 2017:** CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of ... (no date)
51. **Mireille Alloue et al., 2008: Alloue** WA;Destain J;El Medjoub T;Ghalfi H;Kabran P;Thonart P; (no date) Comparison of Yarrowia lipolytica lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques, Applied biochemistry and biotechnology.

52. **Mousavi** et al., **2021:** Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Iman Moezzi, S. M., Ravan, N., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., Omidifar, N., Yousefi, K., & Behbudi, G. (2021). Recent Advances in Enzymes for the Bioremediation of Pollutants. Biochemistry Research International, 2021. https://doi.org/10.1155/2021/5599204

53. **MOUSSAOUI. A., DAHMAN. M. 2012** : Contrôle physico-chimique, microbiologique et pharmaco toxicologique d'un anti-inflammatoire Kétoprofène [Mémoire]. Blida : Université Saad Dahlab.

54. **N. Boukhalfa 2014 :** synthèse et caractérisations des hydroxydes doubles lamellaires a différents rapport molaire et de montmorillonite organophile : Elimination du diclofénac, Mémoire de Magister,Université de Setif(2014).

55. **Nzila** et al**., 2016 :** Nzila, A., Razzak, S. A., & Zhu, J. (2016). Bioaugmentation: An emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. International Journal of Environmental Research and Public Health, 13(9). https://doi.org/10.3390/ijerph13090846

56. **Ojuederie & Babalola, 2017:** Ojuederie, O. B., & Babalola, O. O. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. International Journal of Environmental Research and Public Health, 14(12). https://doi.org/10.3390/ijerph14121504

57. **Paxeus, 2004:** N; P Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaids), gemfibrozil, carbamazepine, beta-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment, Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research (no date)

58. **Piontek et al 2002**: CM; W.K.B. Clinical practice. postpartum depression, The New England journal of medicine.

59. .

60. **Ra et al., 2008:** Boyle CA;Boulet S;Schieve LA;Cohen RA;Blumberg SJ;Yeargin-Allsopp M;Visser S;Kogan MD; Trends in the prevalence of developmental disabilities in US children, 1997-2008, Pediatrics.

61. **Ra, Oh, Lee, & Kim, 2008**: Kim, E. et al. (2009) Solvent-responsive polymernanocapsules with controlled permeability: Encapsulation and release of a fluorescent dye by swelling and deswelling, Chemical Communications.

62. **RCFRC, 2017:** 1 introduction (no date) FIRST Robotics Competition 2017 Game and Season Manual. Available at:

https://firstfrc.blob.core.windows.net/frc2017/Manual/HTML/2017FRCGameSeasonManual.htm.

63. **Revol, 2013 :** Revol, E. (1989) A Propos de contention dans les CAS complexes de Lyse Osseuse (no date).
64. **Rochefort 2001:** Women on the margins?intellectual sociability and citizenship in Belle ...
65. **Shaheen** et al**., 2019:** Shaheen, S. M., El-naggar, A., Wang, J., Hassan, N. E. E., Niazi, N. K., Wang, H., & Daniel, C. W. (2019). Contaminated Soils. Im, 255–274. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120859.A
66. **SHEPU, 2015** : Pierce, G.B. et al. (1981) Ai: Yi Ge Fa Yu Sheng Wu Xue Wen Ti. Beijing: Ke xue chu ban she.
67. **Smulevich et al., 2006:** Cookson, J. (2018) Atypical antipsychotics in bipolar disorder: The treatment of mania: Advances in psychiatric treatment, Cambridge Core.
68. **Sutherland** et al., **2004:** Sutherland, T. D., Horne, I., Weir, K. M., Coppin, C. W., Williams, M. R., Selleck, M., Russell, R. J., & Oakeshott, J. G. (2004). Enzymatic bioremediation: From enzyme discovery to applications. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 31(11), 817–821. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04088.x
69. **Tribedi** et al., **2018:** Tribedi, P., Goswami, M., Chakraborty, P., Mukherjee, K., Mitra, G., Bhattacharyya, P., & Dey, S. (2018). Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. Journal of Microbiology & Experimentation, 6(5), 223–231. https://doi.org/10.15406/jmen.2018.06.00219.
70. **Xavier et al., 2010 :** ((PDF) xavier et al 2010 - researchgate.
71. **Zallot, 2011:** Zallot, R., Oberg, N. and Gerlt, J.A. Discovery of new enzymatic functions and metabolic pathways using genomic enzymology web tools, University of Illinois Urbana-Champaign (no date).
72. **Zhang** et al**., 2019:** Zhang, Y., Geary, T., & Simpson, B. K. (2019). Genetically modified food enzymes: a review. Current Opinion in Food Science, 25, 14–18. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.01.002
73. **Afreen** et al., **2017:** A; A.B.K. (no date) Adrenal insufficiency in Pakistani HIV infected patients, Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29076676/.
74. **Atalla et al.,2010:** Author links open overlay panelBettinaLöffler and AbstractS. aureus is a frequent cause of chronic and therapy-refractory infections. The ability of S. aureus to invade different types of non-professional phagocytes (2013) Staphylococcus aureus persistence in non-professional phagocytes, International Journal of Medical Microbiology.

Available at: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422113001847.

75. **Becker et al., 2016:** Bale, T.L. and Epperson, C.N. (2016) Sex as a biological variable: Who, what, when, why, and how, Nature News. Available at: https://www.nature.com/articles/npp2016215/.
76. **Mezaal et al 2020:** covid-19pandamic impact on physicians decision…-researchgate.available at: https://researhgate.net/publication/344554878_covid.
77. **Prescott et al., 2003:** SGD Prescott M.et al (2003) available at: https://www.yeastgenome.org/reference/S000120979.

Annexes

Les annexes

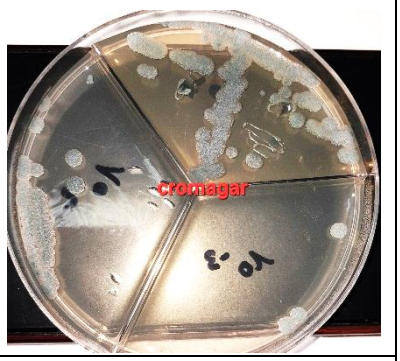
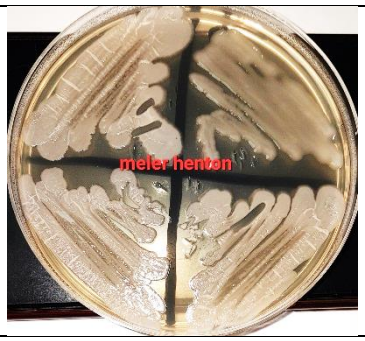
Annexe 1

Les produits chimiques :

Les Produits	La pureté %	La marque
H_2O_2	30	Ficher chemical
NAOH	97	biochime
Hcl	36.5	Honeywell
NACL	99.5	biochime
GLICINE	98.5	biochime
ETHANOLE	96	specilab
ORTHO PHOSPHORIQUES	85	cheminova

Annexe 3

Résultats d'isolement dans les milieux Chromagar, Muller- Hintn, Hektoen, GN :

<table>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>Milieu hectoan</td><td>Milieu chromagar</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>Milieu GN</td><td>Muller- Hinton</td></tr>
</table>

Annexe 2

Préparation des milieux des cultures (1):

Les milieux	Les composants
Trypticase soja Agar	-Hydrolysat pancréatique de caséine 17g -Hydrolysat pancréatique de farine de soja 3g -Chlorure de sodium (50g pour l'hyper salé) 5g -Glucose 2.5g -Phosphate di potassique (bouillon) 2.5g -Agar (manque dans le bouillon) 18g
Gélose nutritif	-peptone 5g -Extrait de viande 2g -Extrait de levure 5g -Chlorure de sodium 12g -Agar 15g -Eau distillée stérile 1000 ml
Gélose Chapman	-rouge de phénol 0.025g -gagar 15g -eau distillée 1000ml-
Gélose Hektoen	-Proteose peptone 12g Thiosulfate de sodium 5g -Citrate ferrique ammoniacal 1.5g -Chlorure de sodium 5g
Mac conkey	-peptone pancréatique de gélatine 17g -peptone pancréatique de caséine 1.5g -peptone peptique de viande 1.5g -lactose 10g -chlorure de sodium 5g -sels biliaires 1.5g
Standard Methods Agar	-trypton 5g -Extrait de levure 2.5g -Glucose 1g -Agar 15g