REPUBLIQUE TUNISIENNE

MINISTERE DE L'AGRICULTURE, DES RESSOURCES HYDRAULIQUES ET DE LA PECHE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE DE TUNISIE

Ecole Doctorale : Sciences et Techniques de L'Agronomie et de l'Environnement

***

THESE

EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Spécialité Génie Rural Eaux et Forêts

Amélioration de la performance épuratoire des systèmes de traitement des eaux usées par filtres plantés de macrophytes et contrôle de la qualité microbiologique des eaux traitées

Soutenue publiquement par

Marwa BEN SAAD

Le 11 Avril 2020 à INAT

Devant le jury composé de :

Mme. Latifa BOUSSELMI, Professeur, CERTE	Président
M. Ahmed GHRABI, Professeur, CERTE	Directeur de thèse
Mme Jamila Tarhouni, Professeur, INAT	Rapporteur
M. Abdelwahab Chatti, M. Conférences, CERTE	Rapporteur
Mme. Olfa MAHJOUB, M. Conférences, INGREF	Examinateur
Mme Myriam Ben Said, Maître Assistant, CERTE	Membre invité

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire Eaux Usées et Environnement (LR15CERTE03), CERTE

Marwa Ben Saad– Amélioration de la performance épuratoire des systèmes de traitement des eaux usées par filtres plantés de macrophytes et contrôle de la qualité microbiologique des eaux traitées

Résumé :

Le thème de recherche de la thèse s'insère dans le cadre d'une gestion durable des ressources en eaux non conventionnelles. L'objectif principal est de présenter des solutions innovantes afin d'améliorer le système de traitement des eaux usées par les filtres plantés de macrophytes tout en gardant leur cadre naturel et écologique. Cette étude qui a été menée sur des pilotes de laboratoire, s'est focalisée principalement sur l'élimination des nitrates et des pathogènes des eaux usées en se basant sur la bioinoculation des bactéries d'intérêt et des bactériophages dans des filtres à macrophytes. Le criblage des bactéries d'intérêt a permis de sélectionner une souche bactérienne ayant une grande aptitude à assimiler les nitrates et son inoculation au niveau de la rhizosphère dans les filtres, a montré une amélioration de l'élimination des nitrates. De même, la bioinoculation des bactéries antagonistes ou des bactériophages améliore significativement l'inactivation des bactéries pathogènes. L'utilisation du liège, comme matériau de remplissage pour les filtres plantés, a montré un meilleur abattement des nitrates (80% à 90%), comparée au gravier (4 à 70%). Le liège semble être un bon support pour développer les bactéries dénitrifiantes, résultat confirmé par l'étude moléculaire. L'utilisation du liège et la bioinoculation des bactéries dénitrifiantes a permis l'élimination totale des nitrates (100%).

Mots clés : Eaux usées ; Elimination ; Filtres plantés ; Macrophytes ; Nitrates ; Pathogènes.

Abstract:

This research topic fits into the context of a sustainable management of unconventional water resources. The main objective is to present innovative solutions in order to improve The main objective is to present innovative solutions in order to improve the wastewater treatment system by filters planted with macrophytes. The present study conducted on the laboratory scale, was focused mainly on the removal of nitrates and pathogens from wastewater, based on the bioinoculation of bacteria and bacteriophages in the filters. The screening of the bacteria made selecting a bacterial strain having a great ability to assimilate nitrates and its inoculation in the rhizosphere in the filters, showed an improvement of nitrates elimination. In the same way, the bioinoculation of the antagonistic bacteria or bacteriophages improves significantly the inactivation of pathogenic bacteria. Using of cork as filling material for planted filters has shown better reduction of nitrates (80% to 90%), compared to gravel (4 to 70%). Cork seems to be a good support for developing denitrifying bacteria, this result is confirmed by molecular study. The use of cork and the bioinoculation of denitrifying bacteria leads to the total elimination of nitrates (100%).

Keywords: Elimination; Macrophytes; Nitrates; Pathogen; Planted filters; Wastewater

ملخص:

تندرج هذه الدراسة في إطار حسن التصرف في الموارد المائية الغير التقليدية. الهدف الرئيسي من هذه الأطروحة هو تقديم حلول مبتكرة لمعالجة المياه المستعملة وذلك باستعمال الأحواض المزروعة في معالجة المياه مع الحفاظ على بنيتها الطبيعية والبيئية. ركزت هذه الدراسة التي أجريت بالمخبر وبشكل أساسي على إزالة النيترات والبكتيريا من المياه المستعملة. استنادًا إلى طرق طبيعية مثل إضافة كائنات دقيقة ذات أهمية، واستخدام مادة طبيعية لتعبئة الأحواض المزروعة واستعمال النانوتكنولوجيا لتحفيز البكتيريا ذات الأهمية، وبالتالي تتم معالجة آلمياه المستعملة بأقل تكاليف بالمقارنة مع الطرق المتداولة. تمكنا من خلال هذه الدراسة من انتقاء بكتيريا لها قدرة عالية في التخلص من النيترات من المياه المستعملة إثر حقنها داخل الحوض المزروع. كما أنّ حقن بكتيريا وفيروسات مضادّة للكائنات الدقيقة الموجودة في المياه المستعملة يساعد على إزالة هذه الأخيرة بشكل كبير. كما أظهر استخدام الفلين كمواد لتعبئة الأحواض المزروعة قدرة على تسجيل أفضل النتائج لازالة النيترات (من 80 % إلى 90 %) مقارنة بالحصى (4 إلى 70 ٪). وقد تمّ تأكيد قدرة الفلين على إزالة النيترات بواسطة البيولوجيا الجزئية إذ أظهرت الدّراسة تواجد مكثف للبكتيريا المزيلة للنيترات. أدى الجمع بين حقن بكتيريا ذات أهمية واستخدام الفلين كمادة تعبئة إلى إزالة النيترات بصفة كليّة (100 ٪).

الكلمات المفاتيح: المياه المستعملة؛ الأحواض المزروعة؛ النيترات؛ البكتيريا؛ ازالة.

A la mémoire de mon père

A ma chère mère

Nulle dédicace ne peut exprimer ce que je dois pour vos sacrifices et votre patience durant mes années d'études. Que Dieu préserve votre santé et vous accorde longue vie.

A tous ceux que j'aime et spécialement

A mon mari Yassine et ma petite Ilef

A mes frères et mes sœurs et surtout la plus adorable Rana

Que Dieu vous garde et vous protège.

Marwa

Remerciements

Ce document commence par les indispensables remerciements pour tous ceux qui m'ont apporté leur aide et leur soutien. Au premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Monsieur Ahmed GHRABI, Professeur et directeur général du Centre de Recherches et des Technologies des Eaux (CERTE) à la Technopôle de Borj Cedria pour son encadrement tout au long de ces années, sa confiance, son intérêt pour cette recherche, ses idées pertinentes et ses conseils.

Aussi, je souhaite remercier vivement ma co-encadrante, Madame Myriam BEN SAID, Maître assistante au CERTE pour son aide précieuse tout au long de ces années.

Je remercie infiniment Prof. Latifa BOUSSELMI pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire Eaux Usées et Environnement (LabEaUE) au CERTE. Vos conseils judicieux ont illuminé ma façon de voir les choses.

Je remercie Prof. Jordi MORATO pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de la microbiologie sanitaire et de l'environnement à l'Université Polytechnique de Catalogne en Espagne.

Merci également aux membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je vous suis très reconnaissante du temps que vous y avez consacré. J'ai en outre une pensée particulière pour les membres de mon comité de suivi de thèse, Prof. Latifa BOUSSELMI et Prof. Jamila TARHOUMI. Merci pour votre écoute, vos

remarques enrichissantes et vos conseils, qui furent très bénéfiques au déroulement de ce travail.

Mes vifs remerciements vont aussi à Madame Olfa Mahjoub, Maître de Conférences à l'INGREF qui a accepté de juger et d'examiner ce travail sans oublier Mr. Abdewahab Chatti, Maître de Conférences au CERTE et à la FSB qui a accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Mes chaleureux remerciements s'adressent à mes ami(e)s et à tous les membres de notre laboratoire, sans oublier personne.

Enfin, j'adresse un grand merci à ma famille et à mon entourage pour leur soutien et leur affection. Je remercie infiniment ma mère pour le soutien inconditionnel et la confiance qu'elle m'accorde depuis mon plus jeune âge.

Sommaire

Introduction Générale 1

Chapitre 1 : Revue bibliographique

I. Introduction sur le traitement des eaux usées 4

II. Les filtres plantés de macrophytes 6

II.1. HISTORIQUE DE LA TECHNIQUE DE TRAITEMENT PAR FILTRES PLANTES DE MACROPHYTES 6
II.2. GENERALITES SUR LES MACROPHYTES 6
II.2.1. Définition des macrophytes 6
II.2.2. Classification des macrophytes 7
II.2.3. Critères de sélection des macrophytes pour l'épuration des eaux usées 7
III.2.4. Présentation de l'espèce Phragmites australis 8
II.3. FONCTIONNEMENT DES FILTRES PLANTES DE MACROPHYTES 8
II.4. LES TYPES DES FILTRES PLANTES DE MACROPHYTES 8
II.4.1. Les filtres plantés à écoulement vertical 9
II.4.2. Les filtres plantés à écoulement horizontal 9
II.4.3. Rôles de différentes composantes de filtre planté de macrophytes 10
II.4.4. Le matériau de remplissage 10
II.4.5. Les plantes 11
II.4.6. Les microorganismes 11
II.5. MECANISMES D'ELIMINATION DES POLLUANTS DANS LES FILTRES PLANTES DE MACROPHYTES 12
II.6. PERFORMANCES, AVANTAGES ET LIMITES DES FILTRES PLANTES DE MACROPHYTES 13
II.7. TRAITEMENT DES EAUX USEES PAR FILTRES PLANTES DE MACROPHYTES EN TUNISIE 16

III. Les microorganismes à pouvoir auto-épuratoire 18

III.1. L'INTERACTION MICROORGANISMES-PLANTE 19
III.2. DESCRIPTION ET ROLE DE BIOFILM 20
III.3. ELIMINATION DES MICROORGANISMES PATHOGENES PAR LES FILTRES PLANTES DE MACROPHYTES 22
III.3.1. Mécanismes impliqués dans l'élimination des pathogènes 23
III.3.2. Facteurs influençant l'élimination des pathogènes par les filtres plantés de macrophytes 24

IV. L'élimination des composés azotés dans les filtres plantés de macrophytes 25

IV.1. CYCLE BIOLOGIQUE DE L'AZOTE 25
IV.2. TOXICITE DE L'AZOTE ET PHENOMENE D'EUTROPHISATION 26
IV.3. PROCESSUS DE TRANSFORMATION DE L'AZOTE DANS LES FILTRES PLANTE DE MACROPHYTES 26
IV.4. LA DENITRIFICATION 27
IV.4.1. Les enzymes intervenant dans la dénitrification 27
IV.4.2. Communauté microbienne impliquée dans la dénitrification 29
IV.4.3. Les facteurs contrôlant la dénitrification dans le milieu aquatique 29

V. Les techniques de détection et d'analyse de la composition microbienne au niveau des filtres plantés de macrophytes 30

V.1. EXEMPLES DE TECHNIQUES CLASSIQUES 30
V.2. EXEMPLES DE TECHNIQUES MOLECULAIRES 31
V.2.1. Amplification Du Matériel Génétique Par Polymérisation En Chaîne 32
V.2.2. Principe de la PCR quantitative en temps réel 32
V.2.3. Le séquençage 33

VI. Développement des méthodes pour améliorer la performance épuratoire des filtres plantés de macrophytes 34

VI.1. L'APPLICATION D'UN SUBSTRAT ORGANIQUE 36
VI.2. LA BIOAUGMENTATION OU BIOINOCULATION 37
VI.3. APPLICATION DES BACTERIOPHAGES POUR LE TRAITEMENT DES EAUX USEES 38
VI.4. L'INCORPORATION DES FILTRES PLANTES DE MACROPHYTES AVEC D'AUTRES TECHNOLOGIES DE TRAITEMENT DES EAUX USEES 40
VI.5. L'APPLICATION DE LA NANOTECHNOLOGIE POUR LE TRAITEMENT ET L'AMELIORATION DE LA QUALITE DES EAUX USEES TRAITEES 41

VII. Conclusion 43

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1.INTRODUCTION 44

2.PRESENTATION DES SITES D'ECHANTILLONNAGE 44

2.1. PREMIER SITE D'ECHANTILLONNAGE 44
2.2. DEUXIEME SITE D'ECHANTILLONNAGE ET STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE 45

3.PRESENTATION DES PROTOTYPES EXPERIMENTAUX 46

3.1. PROTOTYPE 1 46
3.2. PROTOTYPE 2 48

4.PROTOCOLES EXPERIMENTAUX 48

4.1. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION PHENOTYPIQUES DES SOUCHES BACTERIENNES D'INTERET 48
4.2. CRIBLAGE DES ISOLATS BACTERIENS 49
4.2.1. Test de dénitrification 49
4.2.2. Etude de l'activité protéasique 49
4.2.3. Etude de l'activité lipasique 50
4.2.4. Test de l'antagonisme des isolats bactériens envers les souches bactériennes pathogènes 50
4.2.5. La Détection de la production des métabolites secondaires par les isolats bactériens : les sidérophores 50
4.2.6. Etude de la mobilité des isolats bactériens 51
4.2.7. Étude de la formation de biofilm 51
4.3. ETUDE DE LA SOUCHE BACTERIENNE D'INTERET 51
4.3.1. Suivi de la croissance 51
4.3.2. Extraction d'ADN, amplification par PCR et séquençage de l'ADN 16S. 52
4.3.3. Détection des gènes impliqués dans la dénitrification. 52
4.4. APPLICATION DE L'INOCULUM BACTERIEN 53
4.4.1. Suivi de l''élimination des nitrates 53
4.4.2. Suivi de l'inactivation d'une bactérie pathogène : S. typhi 53
4.5. L'APPLICATION DES BACTERIOPHAGES POUR L'INACTIVATION DES BACTERIES PATHOGENES. 54
4.5.1. Présentation et sélection du Matériel biologique 54
4.5.2. Isolement, purification des phages à partir des eaux usées 54
4.5.3. Détermination du titre phagique 55
4.5.4. Propagation des phages et screening des phages spécifiques pour S. typhi 55
4.5.5. Suivi de l'inactivation S. typhi 55
4.5.6. Détermination du titre phagique 56
4.6. L'UTILISATION D'UN SUBSTRAT ORGANIQUE COMME MATERIAU DE REMPLISSAGE DANS LES FILTRES PLANTES DE MACROPHYTES 56
4.6.1. Extraction d'ADN 56

4.6.2. Quantification des gènes nirS et nosZ par PCR en temps réel ... 56
4.7. AMELIORATION DE LA DENITRIFICATION PAR NANOBIOSTIMULATION ... 57
4.7.1. Caractérisation des matériaux de remplissage ... 58
4.7.2. Cinétique d'abattement des nitrates ... 58
4.7.3. Mesure de l'effet du TiO_2 sur la dénitrification ... 58
4.7.4. Cinétique d'abattement des nitrates en présence du TiO_2 ... 59

5.LES OUTILS D'INTERPRETATION ... 59

5.1. ANALYSES STATISTIQUES ... 59
5.2. MODELES MATHEMATIQUES UTILISES ... 59

Chaiptre 3: Résultats et discussion

Partie I: Bioinoculation des bactéries d'intérêt au niveau rhizosphérique d'un filtre planté de macrophytes afin d'améliorer l'abattement des nitrates

1.INTRODUCTION ... 61

2.RESULTATS ... 62

2.1. IDENTIFICATION DES SOUCHES ... 62
2.2. ETUDE DE CRIBLAGE DES SOUCHES BACTERIENNES DENITRIFIANTES ... 63
2.2.1. Test de dénitrification ... 63
2.2.2. Étude de la formation de biofilm des isolats bactériens ... 65
2.3. CARACTERISATION DE LA SOUCHE BACTERIENNE SELECTIONNEE ... 65
2.3.1. Suivi de la croissance de la souche bactérienne d'intérêt ... 65
2.3.2. Extraction d'ADN, amplification par PCR et séquençage de l'ADN 16S ... 66
2.3.3. Détection des gènes impliqués dans la dénitrification par PCR ... 67
2.4. APPLICATION DE LA SOUCHE D'INTERET POUR L'AMELIORATION DE LA DENITRIFICATION ... 68
2.4.1. Suivi de l'assimilation des nitrates in vitro ... 68
2.4.2. Suivi de l'assimilation des nitrates in situ ... 70

3.CONCLUSION PARTIELLE ... 76

Partie II: Amélioration de l'abattement des pathogènes par inoculation des bactéries antagonistes et des bactériophages

1.INTRODUCTION ... 77

2.RESULTATS ... 77

2.1. ETUDE DE CRIBLAGE DES BACTERIES ANTAGONISTES ENVERS UNE BACTERIE PATHOGENE ... 77
2.1.1. Activité protéasique des isolats bactériens ... 77
2.1.2. Activité lipasique ... 78
2.1.3. Test de l'antagonisme des isolats bactériens envers les souches bactériennes pathogènes ... 79
2.1.4. La Détection de la production des métabolites secondaires par les isolats bactériens : les sidérophores ... 79
2.1.5. Etude de la mobilité des isolats bactériens ... 81
2.2. APPLICATION DE LA SOUCHE D'INTERET POUR L'INACTIVATION DES BACTERIES PATHOGENES ... 82
2.2.1. Suivi de l'inactivation d'une bactérie pathogène : S. typhi après une seule injection de la souche d'intérêt 82
2.2.2. Inactivation du S. typhi après des injections séquentielles de la souche PFH_1. ... 84
2.3. APPLICATION DES BACTERIOPHAGES POUR L'INACTIVATION DES BACTERIES PATHOGENES. ... 86
2.3.1. Sélection et purification du phage spécifique pour S. typhi ... 86
2.3.2. Suivi de l'abattement du S. typhi après bio-inoculation par le phage d'intérêt ... 86

2.3.3. Cinétique d'inactivation de S. typhi avec augmentation du titre phagique inoculé 88
2.4. UTILISATION DES PHAGES LYTIQUES SPECIFIQUES EN TANT QUE BIOCAPTEUR POUR DETECTER LES BACTERIES ACTIVES DANS L'EAU TRAITEE 90

3.CONCLUSION 95

Partie III: Utilisation d'un substrat organique pour améliorer la dénitrification : Quantification des bactéries dénitrifiantes par PCR quantitative en temps réel dans deux milieux filtrants

1.INTRODUCTION 97

2.RESULTATS 98

2.1. PERFORMANCE D'ELIMINATION DES NITRATES 98
2.2. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL 99
2.2.1. Les courbes d'étalonnages 99
2.2.2. Quantification des gènes nirS et nosZ 99

3.CONCLUSION 100

Partie IV: Amélioration de la dénitrification dans les filtres plantés de macrophytes par nanobiostimulation

1.INTRODUCTION 102

2.RESULTATS 103

2.1. CARACTERISATION DES MATERIAUX DE REMPLISSAGE : GRAVIER ET LIEGE 103
2.2. ETUDE DE LA FORMATION DU BIOFILM SUR LE LIEGE ET LE GRAVIER 104
2.3. CINETIQUE D'ABATTEMENT DES NITRATES : COMPARAISON ENTRE LE LIEGE ET LE GRAVIER 105
2.4. LA BIOINOCULATION DE LA SOUCHE PFH1 106
2.4.1. Estimation de la biomasse rhizosphérique avant et après inoculation de la souche PFH1 106
2.4.2. Cinétique d'abattement des nitrates en présence de l'inoculum bactérien 107
2.5. EFFET D'UNE NANOPARTICULE, LE DIOXYDE DE TITANE (TiO_2) SUR LA DENITRIFICATION 108
2.5.1. Test quantitatif 108
2.5.2. Application d'un inoculum bactérien en présence de TiO_2 pour l'amélioration de l'effet rhizosphérique d'un système de traitement des eaux usées par filtre planté de macrophytes à écoulement horizontal 109

3.CONCLUSION 111

Partie V: Discussion générale des résultats

Discussion……..112

Conclusion Générale et Perspectives..……..……121

Références bibliographiques

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

CFU: Colony-Forming Unit / **UFC**: Unité Formant Colonie

CW: Constructed Wetland

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

FPEH : Filtre Planté à Ecoulement Horizontal

FPEV: Filtre Planté à Ecoulement Vertical

FPM: Filtre Planté de Macrophytes

MBR: Membrane Bio-Reactor

PBS: Phosphate Buffred Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFU: Plaque-Forming Unit

Q-PCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SBR : Sequential Batch Reactor

TDC: Technical Demonstration Center

Liste des figures

Figure 1. Correspondance écosystèmes / techniques épuratrices (Brouillet et al.2008). 6
Figure 2. Les différents types éco-morphologiques de macrophytes 7
Figure 3. Les types des filtres plantés de macrophytes (Gorito et al. 2017). 10
Figure 4. Mécanismes d'élimination des polluants dans un filtre planté de macrophytes 13
Figure 5. Systèmes d'assainissement des écoles primaires, Kasserine (Ghrabi and Bousselmi 2019) 17
Figure 6. Facteurs influençant la structure et l'activité microbienne dans les filtres plantés de macrophytes (Truu et al. 2009b) 19
Figure 7. Localisation des microorganismes dans la rhizosphère (Philippot et al. 2013) 20
Figure 8. Modèle de formation d'un biofilm par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* 21
Figure 9. Le cycle biologique de l'azote (Bothe et al. 2007) 25
Figure 10. Les étapes de la dénitrification avec une localisation des enzymes par rapport à la membrane cytoplasmique (Wallenstein et al. 2006). 28
Figure 11. Les approches moléculaires pouvant être utilisées pour l'analyse de la communauté bactérienne d'un échantillon (modifié d'après (Wallenstein et al. 2006)) 33
Figure 12. Les différentes stratégies utilisées pour améliorer la performance des filtres plantés de macrophytes (Wu et al. 2015a) 36
Figure 13. Structure de bactériophage T4, spécifique de la bactérie *Escherichia coli* 39
Figure 14. Schéma général de différentes technologies installées au TDC 45
Figure 15. Pilote expérimental 46
Figure 16. Schéma représentatif du prototype 1 (filtre planté à écoulement horizontal). 47
Figure 17. Conception de filtres plantés à écoulement horizontal 47
Figure 18. Dispositif d'injection au sein de la rhizosphère du filtre planté. 47
Figure 19. Prototype 2 48
Figure 20. Résultat d'un test de dénitrification réalisé pour les isolats bactériens 64
Figure 21. Étude de la production de biofilm des isolats bactériens 65
Figure 22. Cinétiques de croissance de la souche PFH_1 66
Figure 23. Fluorescence émise par les deux gènes pendant la réaction de la PCR quantitative en temps réel 68
Figure 24. Suivi de l'assimilation des nitrates *in vitro* par l'isolat PFH_1 avec une concentration initiale de nitrate $[NO_3^-]_{initiale}$ égale à 9mg/L 68
Figure 25. Suivi de l'assimilation des nitrates *in vitro* par l'isolat PFH_1 avec une concentration initiale de nitrate $[NO_3^-]_{initiale}$ égale à 90mg/L 69
Figure 26. Suivi de l'assimilation des nitrates *in situ* par l'isolat PFH_1 avec, une concentration initiale de nitrate $[NO_3^-]_{initiale}$ égale à 90mg/L 70
Figure 27. Suivi de l'assimilation des nitrates *in situ* par l'isolat PFH_1 avec une concentration initiale de nitrate $[NO_3^-]_{initiale}$ égale à 12mg/L 71
Figure 28. Suivi de l'assimilation des nitrates au niveau du filtre témoin (T) 72
Figure 29. Suivi de l'assimilation des nitrates au niveau du filtre inoculé (F) 72
Figure 30. Suivi de l'assimilation des nitrates au niveau du filtre témoin (T) 73
Figure 31. Suivi de l'assimilation des nitrates au niveau du filtre inoculé F 73
Figure 32. Evolution du pH au cours de la dénitrification au niveau des deux filtres (témoin, T et F inoculé avec PFH_1. 76
Figure 33. Étude de l'activité protéasique des différents isolats bactériens 78
Figure 34. Mise en évidence des activités protéasique et lipasique chez les isolats bactériens 78

Figure 35. Détection de la production de sidérophores chez les isolats bactériens 80
Figure 36. Mise en évidence de la mobilité bactérienne chez les isolats bactériens 81
Figure 37. Etude de la mobilité bactérienne chez les isolats bactériens..... 81
Figure 38. Suivi de l'inactivation de *S. typhi* au niveau des deux filtres (T) et (F) 82
Figure 39. Suivi de l'inactivation d'une bactérie pathogène au niveau des deux filtres (T) et (F) 85
Figure 40. Evolution de l'inactivation *S. typhi* au niveau des deux filtres (T sans inoculation du phage) et (F avec inoculation du phage). 87
Figure 41. Suivi de l'inactivation d'une bactérie pathogène *S.typhi* au niveau des deux filtres (T) et (F) avec un titre phagique égal à 10^5 PFU/mL ; T: filtre témoin ; F: filtre avec inoculation du phage..... 89
Figure 42. Phases de l'inactivation de *S. typhi* au niveau des deux filtres (T) et (F) avec un titre phagique égal à 10^5 PFU/mL; T: filtre témoin; F: filtre avec inoculation du phage. 89
Figure 43. Détermination du titre phagique (aprés 2h et 18h de contact phage-bactéries)..... 92
Figure 44. Courbes d'étalonnage de l'ADNr *16S*, *nirS*, and *nosZ* assays..... 99
Figure 45. Nombre de copies des gènes *nirS* et *nosZ* dans les différens filtres plantés de macrophytes en Bellvis (cork) et Vilanova de la Barca (gravel) 100
Figure 46. Spectres IR du gravier (a) et du liège (b) 103
Figure 47. Susceptibilité de liège et de gravier à supporter le biofilm bactérien (a)Masse de biofilm formé en Gramme par particule. (b) Absorbance du biofilm formé par 20g de substrat à 600nm. 104
Figure 48. Cinétique d'abattement des nitrates au cours du temps par les deux types de filtres plantés (liège et gravier) avec une concentration initiale de $[NO_3^-]_{initiale}$ = 90mg/L. (a) au cours du temps de suivi ; (b) au cours de la première heure 105
Figure 49. Histogrammes de l'estimation de la biomasse rhizosphérique avant et aprés bioinoculation de la souche (PFH1).....107
Figure 50. Cinétique d'abattement des nitrates par filtres plantés (support gravier et liège inoculés et non inoculés) avec une concentration initiale de $[NO_3^-]_{initiale}$ = 90mg/L.....107
Figure 51. Histogrammes de la cinétique d'abattement des nitrates avec la souche PFH1 à différentes concentrations de TiO_2. 108
Figure 52. Le rendement épuratoire obtenu en % par les deux matériaux de remplissage. 110
Figure 53. Effet de la bioaugmentation dans l'élimination des microcystines et abondance des gènes dans les filtres plantés de macrophytes (Wan et al. 2018). 114

Liste des tableaux

Tableau 1. Mécanismes d'élimination des polluants dans les filtres plantés de macrophytes (Chen et al. 2014; Alufasi et al. 2017) :..... 13

Tableau 2. Performance épuratoire des systèmes à macrophytes 14

Tableau 3. Avantages et limites des filtres plantés de macrophytes (Kadlec and Knight 1996) . 15

Tableau 4. Souches pathogènes utilisées dans les tests d'antagonisme. 50

Tableau 5. Amorces utilisées pour la quantification des gènes..... 57

Tableau 6. Les isolats bactériens et leurs origines..... 62

Tableau 7. Test de l'antagonisme entre les isolats bactériens 64

Tableau 8. Les paramètres cinétiques de la croissance de la souche PFH_1 66

Tableau 9. Détermination des constantes de dénitrification *in vitro* de l'isolat de PFH_1..... 70

Tableau 10. Détermination des constantes de dénitrification de l'isolat bactérien PFH_1 *in situ*. 74

Tableau 11. Test d'antagonisme avec des souches indicatrices pathogènes. 79

Tableau 12. Détermination des constantes cinétiques d'inactivation de *S. typhi* après une seule injection..... 83

Tableau 13. Les constantes cinétiques de l'inactivation de *S. typhi* après plusieurs injections de PFH_1..... 85

Tableau 14. Détermination de constantes cinétiques d'inactivation de *S. typhi* 88

Tableau 15. Constantes cinétiques d'inactivation de *S. typhi* 89

Tableau 16. Constantes cinétiques d'inactivation de *S.typhi* 90

Tableau 17. Pourcentage d'abattement des nitrates 98

Tableau 18 . L'abattement des nitrates au bout d'une heure 109

Tableau 19. Modèle de Chick-Watson appliqué pour l'abattement des nitrates et l'inactivation des bactéries pathogènes.....115

Tableau 20. Tableau récapitulatif des constantes cinétiques déterminées à différents essais ..115

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

Le traitement des eaux usées est indispensable vu leurs risques sur la santé et l'environnement. Les technologies conventionnelles de traitement des eaux sont appliquées systématiquement pour garantir la satisfaction des normes de qualité de l'eau avant son rejet dans son exutoire (NT106.002) ou avant son réutilisation (NT106.003). Néanmoins, le coût d'investissement et la maintenance de ces méthodes de traitement mises en place, restent relativement élevés pour les pays en voie de développement. Ce qui soulève la nécessité des techniques alternatives efficaces, durables et surtout à bas coût.

En raison de leurs caractéristiques particulières, les filtres plantés de macrophytes, appelés aussi marais artificiels et connus en anglais sous le nom de « *Constructed Wetlands, CW* », sont avérés comme étant des systèmes efficaces, simples, écologiques, économiques et facile à mettre en œuvre, pour traiter les eaux usées (Ghrabi et al., 2011). Leur principe de base consiste à infiltrer un effluent d'eaux usées à travers un lit rempli généralement de gravier et plantés de macrophytes.

Au niveau d'un filtre planté de macrophytes, trois composants principaux participent au traitement des eaux usées. Ces composants sont comme suit : le matériau de remplissage, les plantes et les microorganismes. De ce fait, le traitement est effectué par une série complexe de mécanismes physiques, chimiques et biologiques où les différents agents qui constituent le système interagissent (Gorito et al. 2017).

Selon le sens d'écoulement de l'effluent, les filtres plantés de macrophytes se subdivisent principalement en deux catégories: les filtres plantés à écoulement horizontal et les filtres à écoulement vertical (Wu et al. 2015c). Ces systèmes de traitement des eaux usées ont montré une bonne efficacité dans la réduction des matières en suspension, les composés azotés et de la demande biologique en oxygène DBO_5 des eaux usées.

Pour garantir la durabilité et le bon fonctionnement des filtres plantés de macrophytes, l'amélioration de la performance de ces systèmes de traitement des eaux usées devient un sujet d'actualité autour duquel se déroulent plusieurs recherches. Des études ont montré que l'action sur l'un des paramètres affecte directement ou indirectement le fonctionnement d'un marais artificiel. Le type de filtre, ses dimensions, l'espèce végétale utilisée, ainsi que le support granulaire et la nature de l'effluent à traiter sont les principaux paramètres qui interviennent pour évaluer le bon fonctionnement de ce système (Rehman et al. 2017).

L'objectif principal de notre travail est l'amélioration du système de traitement des eaux usées par les filtres plantés de macrophytes afin de produire une eau de bonne qualité qui ne présente pas un risque potentiel pour la santé publique et l'environnement, tout en gardant le cadre écologique et naturel du procédé. Notre étude s'est focalisée principalement sur l'élimination des nitrates et des bactéries pathogènes, vu leur impact sur l'environnement et la santé publique.

Outre l'introduction et la conclusion générale, ce manuscrit est structuré en trois chapitres :

Chapitre 1 : Revue bibliographique

Ce premier chapitre a pour objectif de présenter le contexte général dans lequel s'inscrit ce travail. Elle donne un aperçu général sur les systèmes de traitement des eaux usées en particulier les filtres plantés de macrophytes. La majeure partie s'est focalisée sur la description de l'interaction entre les microorganismes et la plante et les paramètres influençant sur le rendement épuratoire des filtres plantés principalement la dénitrification et l'élimination des bactéries pathogènes.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Cette partie du manuscrit présente la méthodologie mise en œuvre pour les parties expérimentales de ce travail de thèse. Il inclut une description détaillée des sites d'échantillonnage, des protocoles expérimentaux, des prototypes, des techniques de biologie moléculaire, des modèles mathématiques et des analyses statistiques utilisées.

Chapitre 3 : Résultats et discussions.

Ce chapitre est structuré à son tour en quatre parties.

Première partie : Bioinoculation des bactéries d'intérêt au sein de la rhizosphère d'un filtre planté de macrophytes et leur effet sur l'abattement des nitrates :

Dans ce chapitre, l'accent est mis sur l'intérêt de la bioinoculation des bactéries d'intérêt comme étant une méthode pour améliorer les performances épuratoires des filtres plantés de macrophytes. Les étapes d'isolement, de purification, d'identification et de criblage des souches bactériennes sont réalisées pour sélectionner une souche bactérienne ayant une activité dénitrifiante puissante. Les essais de la bioinoculation ont été réalisés à l'échelle laboratoire, sur des prototypes de filtres plantés à écoulement horizontal. Les objectifs sont :

- Evaluer la capacité dénitrifiante des souches bactériennes prélevées des filtres.
- Sélectionner les souches d'intérêt biotechnologique.
- Identifier par séquençage de l'ADNr16S la/les souche(s) d'intérêt.

- Mettre en évidence et suivre les gènes impliqués dans le phénomène de dénitrification par PCR en temps réel.

Deuxième partie : Amélioration de l'abattement des pathogènes par inoculation des bactéries antagonistes et des bactériophages.

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'amélioration des performances épuratoires du système de traitement par la bioinoculation de la souche d'intérêt et des bactériophages. L'amélioration a concerné l'inactivation d'une bactérie pathogène ; *Salmonella typhi* (*S. typhi*).

Troisième partie : Utilisation d'un nouveau substrat organique afin d'améliorer la dénitrification dans les filtres.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un stage en Espagne, en collaboration avec une équipe espagnole (laboratoire de microbiologie sanitaire et de l'environnement à l'Université Polytechnique de Catalogne). L'objectif était d'étudier l'effet d'un nouveau matériau de remplissage (liège) sur l'élimination des nitrates des eaux. La partie à laquelle j'ai énormément participé était de quantifier deux marqueurs de la dénitrification (les gènes *nirS* et *nosZ*) par PCR quantitative en temps réel. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article publié dans la revue Science of the Total Environment (Aguilar et al. 2019).

Quatrième partie : Amélioration de la dénitrification dans les filtres plantés de macrophytes par nano-bio-stimulation. Dans cette partie nous avons stimulé une souche dénitrifiante afin d'améliorer le processus de la dénitrification. La bio-stimulation des souches d'intérêts avant inoculation par l'addition de dioxyde de titane à une concentration déterminée à partir des bio-essais a été testée.

Chapitre 1

Revue bibliographique

I. Introduction sur le traitement des eaux usées

De nos jours, l'assainissement des eaux usées devient un enjeu majeur pour assurer le développement durable. De ce fait, le choix de la méthode adéquate pour traiter les eaux usées est important. Actuellement Il existe une panoplie des techniques d'assainissement des eaux usées d'origine domestique. La plupart sont de nature biologique qui se base sur des phénomènes d'autoépuration naturelle telle que les boues activées. Les boues activées sont largement utilisées pour l'abattement de la matière organique, des matières en suspension, des produis azotés et phosphorés et des microbes pathogènes (Brouillet et al. 2008).

Dans un système conventionnel de traitement des eaux usées d'origine domestique, différentes étapes sont impliquées :

1. **Le traitement préliminaire** où les solides grossiers et d'autres grands fragments de l'eau usée brute sont enlevés (Alcamo et al. 2003).

2. Le traitement primaire dans lequel les solides organiques et inorganiques ainsi que les matériaux flottants sont éliminés (FAO 2003). Les procédés de traitement primaire sont physiques (par exemple, décantation) ou éventuellement physico-chimiques, et produisent des boues primaires.

3. Le traitement secondaire qui est généralement biologique, où les matières organiques solubles et les matières en suspension des eaux usées traitées primaires sont enlevées. Les procédés d'épuration secondaire comprennent des procédés biologiques, naturels ou artificiels, faisant intervenir des microorganismes aérobies pour décomposer les matières organiques dissoutes ou finement dispersées. Dans certains cas, un traitement faisant intervenir des microorganismes anaérobies (digestion anaérobie des boues résiduaires) est annexé au traitement secondaire.

Les techniques de traitement des eaux usées sont variées tels que : les **disques biologiques, Lit bactérien aérobie**, **Boues activées**, **Biomasse immergée aérobie**, **SBR** ‘‘Sequential Batch Reactor’’, **MBR** ‘’Membrane Bio-Reactor’’ (Boutin 2003).

4. Le traitement tertiaire et/ou complémentaire est une étape qui n'est pas toujours obligatoire dans laquelle les constituants spécifiques de l'eau usée tels que les nutriments et les métaux lourds, qui ne sont pas éliminés par le traitement secondaire sont enlevés. Ce sont des traitements dénommés parfois traitements avancés (coagulation physico-chimique, filtration sur sable, chloration, ozonation, traitement par le charbon actif, etc.) (FAO 2003).

En plus à ces filières standards, des techniques écologiques se sont développées et sont également capables de traiter la pollution azotée et phosphorée, et/ou bactériologique. Leur principe se base sur l'autoépuration (Brouillet et al.2008).

L'autoépuration est un phénomène naturel permettant à un écosystème aquatique d'éliminer une pollution essentiellement organique (Khdhiri et al. 2014). Elle fait intervenir des organismes vivant dans le milieu aquatique : bactéries, protozoaires, algues, qui permettent à l'eau de retrouver sa qualité première.

Les microorganismes transforment la matière organique en sels minéraux. Les minéraux seront utilisés ultérieurement par les algues et les plantes aquatiques (Petroliers et al. 2013).

L'autoépuration de l'eau fait intervenir divers mécanismes à savoir la filtration à travers le sol, la biodégradation des contaminants, l'accumulation et la séquestration des substances toxiques dans les organismes aquatiques, la formation de granulés et de particules et leur sédimentation au fond (Ostroumov 2014).

Le bon fonctionnement de l'épuration naturelle des eaux nécessite un bon fonctionnement des agents épurateurs et un bon équilibre entre l'apport d'oxygène et sa consommation dans l'écosystème. En revanche le phénomène d'autoépuration peut être limité si les rejets de matières organiques sont trop concentrés, la capacité naturelle d'autoépuration des organismes vivants est saturée et la pollution persiste (Khdhiri et al. 2014).

Le phénomène d'autoépuration des écosystèmes aquatiques et l'amélioration de la qualité de l'eau a été analysé par plusieurs chercheurs (Ostroumov 2005; Merghem et al. 2016). Une étude, réalisée en Chine par Tian et al. (2011) a été portée sur la capacité d'une rivière à s'auto-épurer. Les résultats obtenus ont montré que la rivière étudiée ait une bonne aptitude à éliminer la charge organique, mais l'élimination des métaux lourds a été faible. De plus, l'analyse des composants des trois plantes aquatiques ont montré la grande capacité de ces plantes à absorber l'azote et le phosphore.

Parmi les techniques écologiques, le lagunage fondé sur l'activité algale qui assure la production d'oxygène nécessaire à la vie des organismes épurateurs, et les techniques utilisant des végétaux supérieurs (Figure1). Ces dernières se basent sur l'association entre les végétaux et un support pour former un écosystème qui permet l'épuration de l'eau. Les végétaux utilisés sont des arbres, des macrophytes, des haies, des herbes ou bien des associations d'espèces. Le support peut être constitué d'un filtre à sable, d'un sol naturel ou d'une masse d'eau. La filière

la plus répandue est celle **des filtres plantés de roseaux** (Brouillet et al. 2008; Risch et al. 2011).

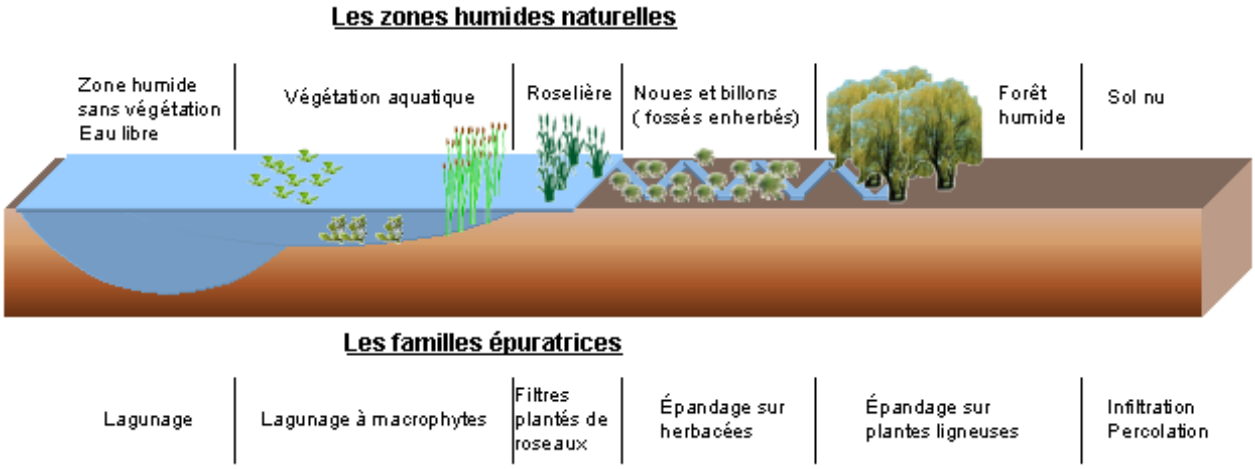


Figure 1. Correspondance écosystèmes / techniques épuratrices (Brouillet et al.2008).

II. Les filtres plantés de macrophytes

II.1. Historique

Depuis l'antiquité, chez les égyptiens et les chinois, les plantes ont été utilisées pour l'épuration des eaux usées (Pedro et al., 2017). Le procédé de filtre planté ou marais artificiel a commencé à prendre de l'ampleur en Allemagne à partir des travaux de Dr. Käte Seidel qui a réalisé ses premiers travaux de recherche à l'Institut Max Planck de Krefeld dans les années 1950-1960 (Liénard et al., 2004). Un système à étages multiples constitué de deux premiers étages à écoulement vertical suivi d'étages à écoulement horizontal a été proposé. Il était connu par les spécialistes sous l'acronyme anglais MPIP « *Max Planck Institute Process* » (Liénard et al. 2004). Dès l'origine, des supports granulaires ont été utilisés pour ces filtres. Les plantes qui ont été généralement utilisées sont *Phragmites* spp. (*Poaceae*), *Typha* spp. (*Typhaceae*), *Scirpus* spp. (*Cyperaceae*), *Iris* spp. (*Iridaceae*), *Juncus* spp. (*Juncaceae*) and *Eleocharis* spp. (*Spikerush*) (Wu et al. 2015). La plante la plus étudiée et la plus répondue dans le monde est *Phragmites australis* (Wu et al. 2015).

II.2. Généralités sur les macrophytes

II.2.1. Définition des macrophytes

Les macrophytes désignent les grands végétaux aquatiques (bryophytes, ptéridophytes et spermatophytes) visibles et identifiables à l'œil nu sur le terrain. Ces plantes aquatiques, grâce à leurs tissus immergés dans l'eau, contribuent à un mécanisme de filtration et favorisent la

sédimentation ce qui fait augmenter la clarté de l'eau (Aguiar et al. 2014). Les macrophytes ont également des capacités épuratoires (eau et sédiment) en diminuant la teneur de certains composés comme l'azote et le phosphore en les intégrant dans leur biomasse (Vymazal 2011; Horn et al. 2014).

II.2.2. Classification des macrophytes

En se basant sur des critères morphologiques et physiologiques, les macrophytes peuvent être classées en : (i) **émergentes** comportant les plantes dont les racines et la base de la tige se trouvent presque constamment immergées mais dont les feuilles et les inflorescences s'élèvent au-dessus de l'eau, (ii) **flottantes** comprenant des espèces librement flottées à la surface de l'eau et (iii) **immergées** comprenant des espèces totalement immergées (Diaz and Nadu 2016). La Figure 2 présente une photo de macrophytes de chaque classe.

Figure 2. Les différents types éco-morphologiques de macrophytes
(a) immergées (b) émergentes (c) Flottantes

Plusieurs facteurs biotiques et abiotiques influencent le développement des macrophytes. En effet, La distribution des espèces végétales et leur productivité dépendent d'interactions complexes entre les conditions hydrodynamiques, les processus hydrochimiques et l'énergie lumineuse disponible, conduisant à diverses stratégies adaptatives pour coloniser les différents habitats (Martin and Coetzee 2014).

II.2.3. Critères de sélection des macrophytes pour l'épuration des eaux usées

Le choix des plantes est un enjeu important dans les filtres plantés de macrophytes. En effet, pour qu'une plante soit utilisable en traitement des eaux usées, elle doit survivre aux effets toxiques potentiels des polluants et de leur variabilité. En outre, elle doit présenter des critères spécifiques tels que la tolérance au stress environnemental, la bonne adaptabilité aux conditions environnementales et opératoires difficiles, le bon rendement photosynthétique et la bonne assimilation des polluants (Wu et al. 2015c).

II.2.4. Présentation de l'espèce *Phragmites australis*

Phragmites australis ou le roseau commun est l'une des espèces des plantes émergentes les plus répandues au monde. C'est une plante envahissante des milieux humides, utilisée depuis les années 1970 dans la phytoremédiation des eaux usées, des sols et des sédiments. Les recherches publiées confirment que *P. australis* est un excellent accumulateur de différents types de nutriments et de métaux lourds par rapport aux autres plantes aquatiques (Rezania et al., 2019). La distribution géographique de *Phragmites* sp. s'étend presque dans tous les continents, en particulier en Asie et en Europe (Vymazal 2013a).

Phragmites australis est une espèce de plante vivace avec une taille qui peut atteindre 6m. La tige est très grande et dressée (Bonanno 2013). Elle persiste en hiver et s'affaisse progressivement au printemps suivant. Les feuilles engainant la tige, sont très grandes et pointues, perpendiculaires à la tige et ont des nervures parallèles. Elle est fixée et enracinée par un rhizome profondément ancré dans la vase (Rezania et al., 2019).

II.3. Fonctionnement des filtres plantés de macrophytes

En se basant sur la capacité des marais naturels à réduire la charge polluante des eaux contaminées, les marais artificiels ont été construits (Gorito et al. 2017). Le fonctionnement des filtres plantés de macrophytes se base sur des mécanismes naturels pour éliminer les polluants. Il s'agit d'infiltrer un effluent brut à travers des lits composés de terre ou d'un mélange de sables et de graviers et plantés de macrophytes (Wu et al. 2014). Pour ce type de systèmes de traitement des eaux usées, il n'y a ni renouvellement régulier du massif filtrant, ni évacuation des boues biologiques (Poulet et Terfous 2004) .

Le système de filtre planté de macrophytes est actuellement utilisé pour le traitement de plusieurs types d'eau usée (Nivala et al. 2013, Younger et Henderson 2014, Sehar et al. 2014). De plus, il peut être utilisé pour le traitement primaire, secondaire ou tertiaire des eaux usées urbaines, domestiques, des eaux pluviales, des eaux usées agricoles et des eaux usées industrielles (Ávila et al. 2014; Wu et al. 2014).

II.4. Les types des filtres plantés de macrophytes

Plusieurs facteurs interviennent dans la classification des filtres plantés de macrophytes tels que : le mode d'alimentation, le sens de l'écoulement, les conditions du traitement (Tu et al. 2014). L'écoulement peut être superficiel « Surface Flow » ou à travers le sol « Subsurface Flow» (Figure 3). Selon le sens de l'écoulement, ces systèmes sont subdivisés en deux

catégories : les filtres à écoulement vertical et les filtres à écoulement horizontal (Tu et al. 2014).

Selon Wu et al (2014), les filtres plantés de macrophytes se subdivisent en trois groupes majeurs : les systèmes traditionnels ayant la classification déjà mentionnée, les systèmes hybrides, représentés par la Figure 4 dans lesquels les deux types horizontal et vertical peuvent se réunir pour un meilleur traitement des effluents et il apparaît récemment les systèmes renforcés ou intensifiés. Ils sont artificiellement aérés, avec ou sans recirculation, … (Wu et al. 2015).

II.4.1. Les filtres plantés à écoulement vertical

La circulation de l'eau est assurée par un apport à la surface du filtre et un drain de collecte en fond de massif ce qui conduit à un écoulement de type vertical (Boutin et Lienard 2003). L'oxygénation est obtenue par une alimentation par bâchées, créant une convection naturelle avec l'atmosphère puis par diffusion gazeuse lorsque la plage d'infiltration est dénoyée. Chaque bâchée doit se répartir uniformément sur l'ensemble de la surface du lit, pour un traitement optimum (Risch et al. 2011).

II.4.2. Les filtres plantés à écoulement horizontal

La circulation de l'eau se réalise grâce à des "gabions" latéraux, à chaque extrémité du filtre, qui conduisent à un écoulement horizontal (Risch et al. 2011). Les filtres horizontaux ne sont pas alimentés par la surface, comme les filtres verticaux. Les eaux usées décantées entrent, via un gabion d'alimentation, directement dans le massif filtrant. Il est donc nécessaire de débarrasser l'effluent, au préalable, des matières en suspension, soit par l'intermédiaire d'un décanteur-digesteur placé en amont, soit par un premier étage de filtration verticale (Ghrabi et al. 2011).

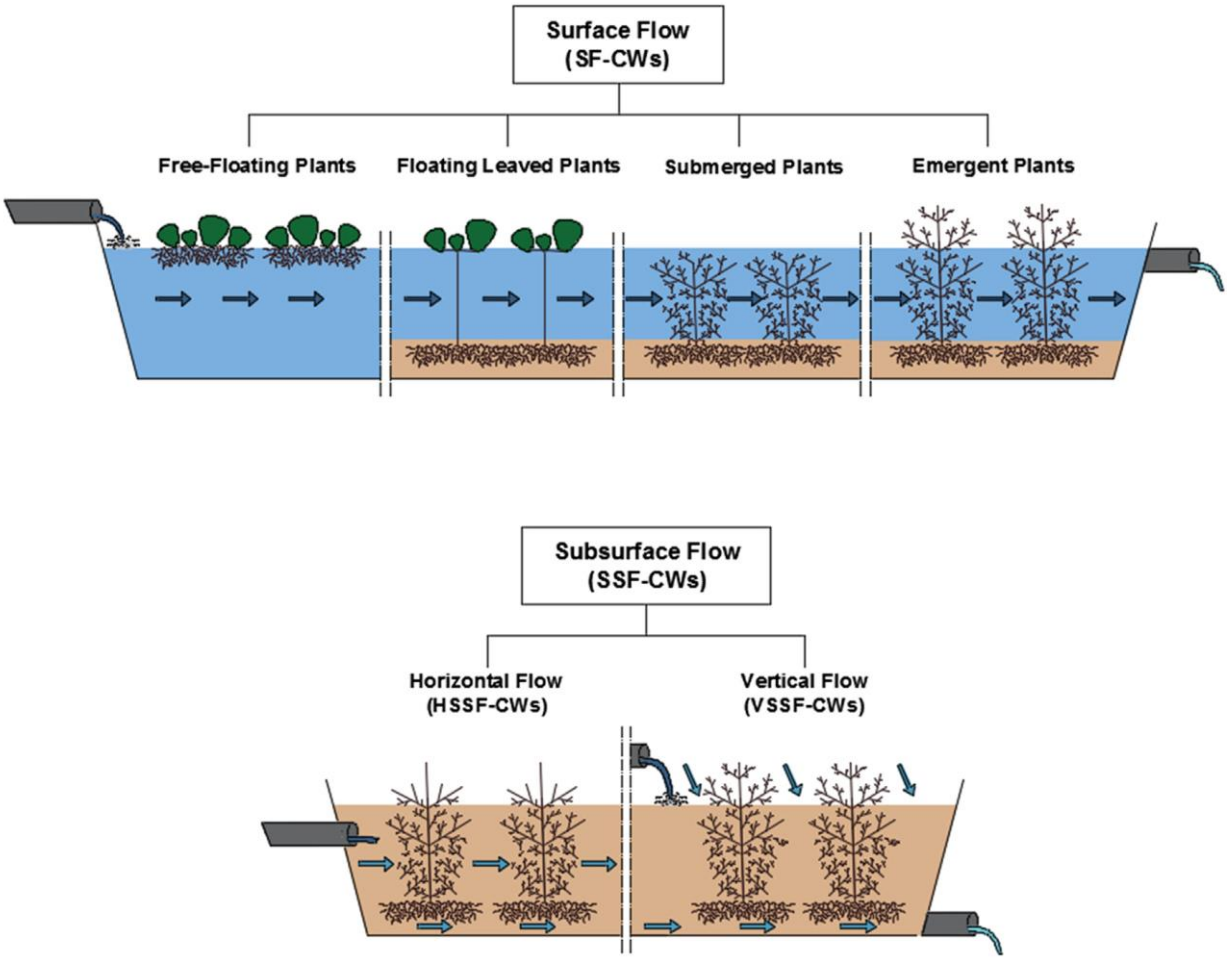


Figure 3. Les types des filtres plantés de macrophytes (Gorito et al. 2017).

II.4.3. Rôles de différentes composantes de filtre planté de macrophytes

Dans un filtre planté de macrophytes, trois composantes essentielles participent ensemble à l'élimination du polluant : le substrat ou matériau de remplissage, les plantes et les microorganismes (Li et al. 2014).

II.4.4. Le matériau de remplissage

Le matériau de remplissage constitue un support pour la croissance des plantes et des microorganismes. Il joue également un rôle important dans l'élimination de la charge polluante de l'effluent à traiter grâce à des processus physicochimiques comme la filtration et la sorption (Gorito et al. 2017). La sorption du polluant à la surface du matériau de remplissage peut se faire par divers mécanismes à savoir l'interaction de Van der Waals, l'interaction électrostatique, l'échange d'ions et la complexation à la surface. Le substrat le plus utilisé est le gravier (Li et al. 2014).

Le choix du matériau de remplissage pour la construction d'un filtre planté est un enjeu important. En effet, le substrat est un paramètre critique du fait qu'il constitue un milieu de croissance pour les plantes et les microorganismes et permet une bonne circulation de l'effluent à traiter. La sélection d'un bon substrat est basée sur sa perméabilité et sa capacité à adsorber les polluants (Wu et al. 2015c).

Actuellement, plusieurs études sont focalisées sur l'utilisation des substrats de nature différente. L'investigation porte essentiellement sur les caractéristiques de substrat qui lui permet d'être destiné à un polluant bien défini. Divers substrats ont été étudiés par exemple : Sable ; Gravier ; Argile ; Calcite ; Marbre ; Bentonite ; Dolomie ; Calcaire ; Schiste argileux…, Même des sous-produits industriels tels que les miettes de briques creuses et les boues d'alun, et des matériaux synthétiques comme le charbon actif et le compost (Liu et al. 2014; Wu et al. 2015c).

II.4.5. Les plantes

Les plantes ont un rôle essentiel dans un marais artificiel. Elles ont la capacité d'assimiler le polluant et elles favorisent la croissance microbienne. Nombreuses études montrent que la présence des plantes améliore la performance d'un marais artificiel (Chen et al. 2016). En effet, les macrophytes ont la capacité de capter l'oxygène de l'air et de le diffuser des feuilles jusqu'aux racines créant ainsi un milieu aérobie favorable pour la croissance des microorganismes aérobies. Ainsi, La plante libère des exsudats racinaires qui sont constitués de substances organiques carbonées et azotées : protéines, polysaccharides et acides organiques. Ces exsudats stimulent la croissance et l'activité microbienne (Zhang et al. 2014; Gorito et al. 2017). La présence des exsudats crée un microenvironnement autour de la surface racinaire connu par rhizosphère (Chen et al. 2016).

II.4.6. Les microorganismes

Le principe de base du traitement des eaux par les macrophytes aquatiques enracinés, repose particulièrement sur le fait que les macrophytes fournissent un support pour la croissance des bactéries (Vymazal 2013b). Il a été prouvé que le principal agent épuratoire dans un filtre est principalement l'activité microbienne (Wu et al. 2012). La minéralisation des composés organiques est assurée par les microorganismes que ce soit en anaérobiose qu'en aérobiose. Ces derniers éliminent l'azote par ammonification, nitrification-dénitrification, oxydation de l'ammonium (Meng et al. 2014). Ainsi, ils jouent un rôle important dans l'élimination des sulfures, de phosphore et des métaux lourds (Faulwetter et al. 2009).

II.5. Mécanismes d'élimination des polluants

La performance épuratoire est liée à divers mécanismes : Sédimentation, filtration, précipitation, adsorption, volatilisation, assimilation par les plantes, etc. (Pajares and Bohannan 2016). L'élimination des polluants dans un filtre planté de macrophytes est effectuée par une série complexe de processus physiques, chimiques et biologiques dans lequel l'eau, les sédiments, les plantes et les micro-organismes qui habitent les différents compartiments interagissent (voir Tableau 1) (Zhai et al. 2017).

La présence des plantes garantit des performances avec succès, car les plantes présentent à la fois des propriétés structurales et biochimiques favorisant l'élimination des polluants. En conséquence, l'organisation des masses végétales dans les zones humides est généralement incluse comme un élément clé dans la conception des zones humides initiale (Desmet et al. 2011).

La charge organique est rapidement éliminée dans les marais artificiels par simple filtration. En effet, le substrat ou matériau de remplissage joue un rôle important dans la filtration des matières en suspension présentes dans les eaux usées. Son efficacité dépend en grande partie de sa texture (Zhang et al. 2015). L'azote peut être éliminé par volatilisation, ammonification, nitrification et dénitrification (Diaz and Nadu 2016). Les principales voies d'élimination du phosphore sont l'adsorption, la complexation, la précipitation et l'assimilation par les plantes (Nations and Settlements).

Pour les métaux, Les formes particulaires sont retenues par filtration. Les formes solubles sont éliminées notamment en se précipitant sous formes d'oxydes et de sulfites métalliques (Guittonny-Philippe et al. 2014). Les pathogènes comme les bactéries, les virus et les protozoaires sont éliminés par sédimentation ou une simple exposition aux radiations UV (Diaz and Nadu 2016).

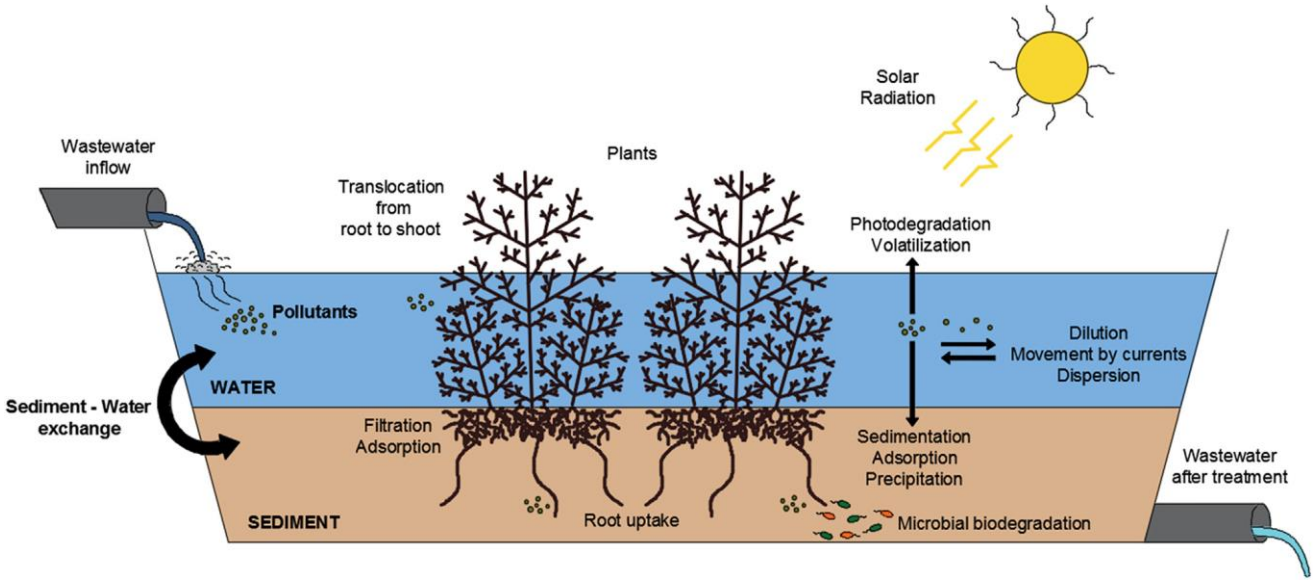


Figure 4. Mécanismes d'élimination des polluants dans un filtre planté de macrophytes (Gorito et al. 2017)

Tableau 1. Mécanismes d'élimination des polluants dans les filtres plantés de macrophytes (Chen et al. 2014; Alufasi et al. 2017) :

Polluant	**Mécanismes d'élimination du polluant**
MES	Sédimentation Filtration
Matière Organique	Dégradation par les bactéries
Phosphore	Sorption Assimilation par les plantes
Azote	Ammonification par les bactéries nitrifiantes Dénitrification Assimilation par les plantes Adsorption Volatilisation de l'ammoniac
Métaux	Adsorption, échange de cations Complexation Précipitation Assimilation par les plantes Oxydo-réduction
Microorganismes pathogènes	Sédimentation Mort naturelle Prédation Irradiation UV solaire Exsudats racinaires

II.6. Performances, avantages et limites des filtres plantés

Les filtres plantés de macrophytes ont montré une bonne efficacité dans la réduction des matières en suspension et de la demande biologique en oxygène DBO des eaux usées. Pendant

que les filtres à écoulement vertical se caractérisent par des processus de dégradation microbienne aérobiques, les filtres à écoulement horizontal présentent un milieu anoxique et anaérobique favorable au développement des bactéries dénitrifiantes.

Le tableau ci-dessous présente des exemples d'études sur les systèmes des filtres plantés de macrophytes et leurs performances épuratoires.

Tableau 2. Performance épuratoire des systèmes à macrophytes

Type des eaux usées	**Rendement du système à macrophytes**						**Type de FPM et Dimensions** **L X l X H**	**Temps de séjour (j)**	**Références**
	MES	DBO_5	DCO	NH_4	NT	PT			
Eaux noires (Tunisie)	81%	82,1%	61,8%	61%	70%	81,2%	Horizontal *P. australis* 5 X 3,12 X 0,7	15	Ben Saad et al. 2015
Eaux grises (Egypte)	82,2%	70,3%	65,6%	-	36%	32,4%	Horizontal *P. australis* 1,1 X 1 X 0,4	10	Abdel-Shafy et al. 2009
Eaux usées municipales (Chine)	71,8%	70,4%	62,2%	40,6%	-	29,6%	*P. australis* *Typha orientalis* 150 X 30 X 0,5	120	Song et al. 2009
Eaux de tanneries (Bangladesh)	55%	98%	98%	86%	-	87%	*P.australis* 1,3 X 1 X 0,8	4	Saeed et al. 2012
Eaux usées municipales (Mexique)	81,66%	77,94%	76,32%	-	52,78%	40,24%	Horizontal *Strelitzia reginae* *Anthurium andreanum* 3,6 X 0,9 X 0,3	4	Zurita et al. 2011
Eaux usées domestiques (Espagne)	81%	86%	77%	-	55,9%	53,9%	Horizontal *P.australis*	10	Alfredo et al. 2016

Le système de traitement des eaux usées par macrophytes offre une intégration paysagère excellente avec un faible coût d'exploitation et d'entretien par rapport aux systèmes conventionnels (Wu et al. 2014a). Actuellement, Il existe plusieurs configurations des filtres plantés de macrophytes. La géométrie diffère selon les critères de construction et de fonctionnement. Ces configurations ont un impact direct sur le déroulement des processus épuratoires et par suite sur le degré de l'efficacité avec laquelle certains processus impliqués dans le traitement de l'eau sont effectués.

Le bon fonctionnement des marais artificiels, particulièrement à écoulement vertical, est limité par le phénomène de colmatage. Ce dernier est dû à l'accumulation des matières en suspension et de la matière organique dans les pores vides du matériau de remplissage, ainsi la croissance rapide des microorganismes et leur abondance excessive peut participer au colmatage du milieu filtrant. De ce fait, l'installation d'un prétraitement en aval du filtre est nécessaire pour éviter ce problème (Hua et al. 2014).

Les filtres plantés à écoulement vertical n'exigent pas une large zone géographique, en plus ils favorisent un bon transfert d'oxygène donc une bonne nitrification. En revanche, ce type de système demande un coût d'installation plus élevé par rapport aux filtres à écoulement horizontal.

Les filtres à écoulement horizontal favorisent le phénomène de dénitrification et sont fiables et efficaces dans l'élimination des nitrates.

Tableau 3. Avantages et limites des filtres plantés de macrophytes (Kadlec and Knight 1996)

	Avantages	**Limites**
FPM à écoulement horizontal	Très bonnes performances épuratoires pour l'abattement de MES, de la charge organique et des nitrates Aucun risque d'odeur Une bonne surface de traitement Pas de prolifération d'insectes	Surface géographique étendue Aération limitée Absence de nitrification
FPM à écoulement vertical	Zone géographique peu étendue Bon transfert d'oxygène favorisant la nitrification	Rendement un peu faible pour l'élimination des MES Coût élevé par rapport aux filtres horizontaux
Les FPM à écoulement superficiel	La présence à la fois des zones aérobies et des zones anaérobiques à l'intérieur de filtre	Prolifération des insectes et parfois d'odeur Zone géographique étendu

II.7. Traitement des eaux usées par filtres plantés en Tunisie.

En Tunisie, environ 40% de la population tunisienne vit dans les milieux ruraux, dans des petits villages ou isolés (Ghrabi et al. 2011). Vu la pauvreté du service d'assainissement, la décharge directe sans traitement des eaux usées domestiques dans la nature présente un risque majeur pour l'environnement et pour la santé humaine (Vymazal 2008). Pour cette raison, quelques expériences ont été faites afin de déterminer la bonne technologie pour les petites agglomérations en Tunisie.

- **La station de Jougar** : Le premier filtre planté de macrophytes construit pour le traitement des eaux résiduaires en Tunisie a été installé en 2004 au gouvernorat de Zaghouan. Le système a servi une population d'environ 1000 habitants et est composé d'un bassin de traitement primaire, de deux lits en régime vertical et d'un lit en régime horizontal. Le filtre est rempli de graviers de diverses tailles et planté avec « *Phragmites australis* » et « *Typha latifolia* ». les principaux résultats montrent les taux d'abattement suivant : DBO 93 ± 2% ; DCO 89 ± 3% ; MES 98 ± 1,5% ; Azote total Kjeldahl 38 ± 19% et le phosphore total 72 ± 16% (Kouki et al. 2009).

- **La station de Chorfech** : installée au gouvernorat de l'Ariana par le Centre de Recherches et Technologies des Eaux (CERTE), cette station est composée de trois étages de filtres en série : le premier est un filtre planté horizontal, le second est vertical et le dernier est horizontal. Cette station traite les eaux usées d'une agglomération rurale de 50 maisons (350 habitants). Les taux d'abattements sont de l'ordre de 97% pour les MES et la DBO_5, 95% pour la DCO, 71% pour l'azote total et 82% pour le phosphore total (Ghrabi et al.2011).

- **L'école primaire de Chorfech** : Ne pourrait pas être branchée avec la station de Chorfech. C'est un système de gestion locale des eaux, y compris l'épuration des eaux usées, qui a été réalisé par le CERTE. La station pilote est principalement composée d'un système pour collecter les eaux pluviales et approvisionner les chasses d'eau et d'un système de traitement des eaux usées en provenance du bloc sanitaire de l'école composé d'une fosse septique suivi par un filtre planté de macrophytes à écoulement horizontal. Les eaux traitées sont utilisées pour l'irrigation du jardin (Ben Saad et al. 2015).
- **Les trois écoles primaires de Kasserine :** Comme la station pilote de l'école primaire de Chorfech, des pilotes d'assainissement des eaux dans trois écoles primaires de Kasserine sont récemment implémentés par le CERTE (Figure 5). L'objectif est principalement

démonstratif d'une gestion locale et durable de l'eau dans les écoles primaires en milieu rural. Les trois écoles primaires concernées par les pilotes sont : école primaire de Feidh El Methnene, école primaire de Garet Enaam et l'école primaire El Mrawna. Le système proposé est robuste, simple et à faible coût. La qualité excellente des eaux traitées pourrait développer une réutilisation locale à l'intérieur des écoles pour irriguer les arbres et les plantes ornementales (Ghrabi and Bousselmi 2019).

Figure 5. Systèmes d'assainissement des écoles primaires, Kasserine (Ghrabi and Bousselmi 2019)

- **Le Centre de Démonstration Technique TDC** : Un projet d'assainissement séparatif a été installé au sein du foyer universitaire El- Manzah situé à l'Institut National Agronomique de Tunisie (Regelsberger et al. 2007). Le système de traitement, installé comme un pilote à titre démonstratif, consiste en trois lignes de traitement liées à l'eau grise, l'eau noire et l'eau pluviale. Les technologies installées sont : MBR, SBR, et le filtre planté de macrophytes. L'eau grise est collectée à partir des douches et des lavabos et traité à l'aide du SBR, l'eau traitée est acheminée vers les chasses d'eau (Lamine L. et al. 2007). Les eaux noires (eaux vannes) sont épurées par une fosse septique suivie par des filtres plantés de *phragmites australis*. L'eau traitée est utilisée pour l'irrigation d'un jardin botanique, en particulier médicinales. L'eau pluviale est collectée par le toit du foyer dans un réservoir de stockage, filtrée par un filtre de sable puis chauffée par l'énergie solaire et acheminée vers les douches du foyer.

- **Khanguet el Hojjej** : L'agglomération rurale Khanguet El Hojjej est située au gouvernorat de Nabeul à 30 km au Sud de Tunis. La station d'épuration traitant les rejets

domestiques de cette agglomération consiste à un système hybride de filtres plantés par macrophytes, constitué d'un décanteur digesteur et un filtre à écoulement vertical (FPEV) planté de roseau suivi d'un filtre à écoulement horizontal (FPEH) planté également de typha. Ce système possède d'importantes potentialités d'élimination d'azote par une nitrification poussée au niveau du FPEV et une dénitrification au niveau du FPEH (Kraiem et al. 2019).

- **La station d'épuration de Hammam Bourguiba** réalisée en 2009 est l'une des stations de l'ONAS ayant recours au traitement par filtres plantés de roseaux. Cette station se caractérise par un débit moyen journalier de 230 m^3/j, une charge polluante de 92 KgDBO_5/j. Elle renferme deux voies identiques comportant chacune : un canal dégriffeur, un décanteur digesteur, un bassin de stockage, un filtre à macrophytes à écoulement vertical, un filtre à macrophytes à écoulement horizontal (http://www.onas.nat.tn/Fr/page.php?code=75).

III. Les microorganismes à pouvoir auto-épuratoire

Dans un filtre planté de macrophytes, la biomasse microbienne qui se développe au niveau du support granulaire et au niveau de la rhizosphère est à la base de la dégradation de la matière organique contenue dans les eaux usées (Mburu et al. 2014). Ces bactéries à pouvoir autoépuratoire sont organisées au niveau d'une structure de résistance appelée biofilm. Panpan et al (2014) classe la communauté microbienne en deux grandes catégories : une impliquée dans la dégradation de la matière organique et l'autre dans l'élimination de l'azote.

Divers microorganismes peuvent intervenir dans la dégradation des matières organiques telles que les bactéries hétérotrophes, les bactéries autotrophes, les champignons et certains protozoaires.

Les bactéries aérobies hétérotrophes permettent l'oxydation de la matière organique en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électron et en rejetant le dioxyde de carbone et d'autres composés chimiques. En revanche, les bactéries anaérobies hétérotrophes assurent la dégradation de la matière organique en deux étapes :

En premier lieu, les bactéries acidifiantes permettent la simplification des biopolymères en monomères pour que les bactéries méthanotrophes interviennent, en second lieu, et minéralisent les produits issus de la fermentation en CO_2 et CH_4. Les recherches ont montré que les bactéries méthanotrophes et les archaea méthanogènes sont les agents dominants.

Les bactéries sulfato-réductrices contribuent, elles aussi, à la dégradation de la matière organique (Faulwetter et al. 2009; Truu et al. 2009a). La structure et l'activité microbienne à

l'intérieur de filtre est affecté par plusieurs paramètres physicochimiques et biologiques particulièrement la nature de l'effluent à traiter, le substrat et la plante utilisée (Figure 6) (Truu et al. 2009b).

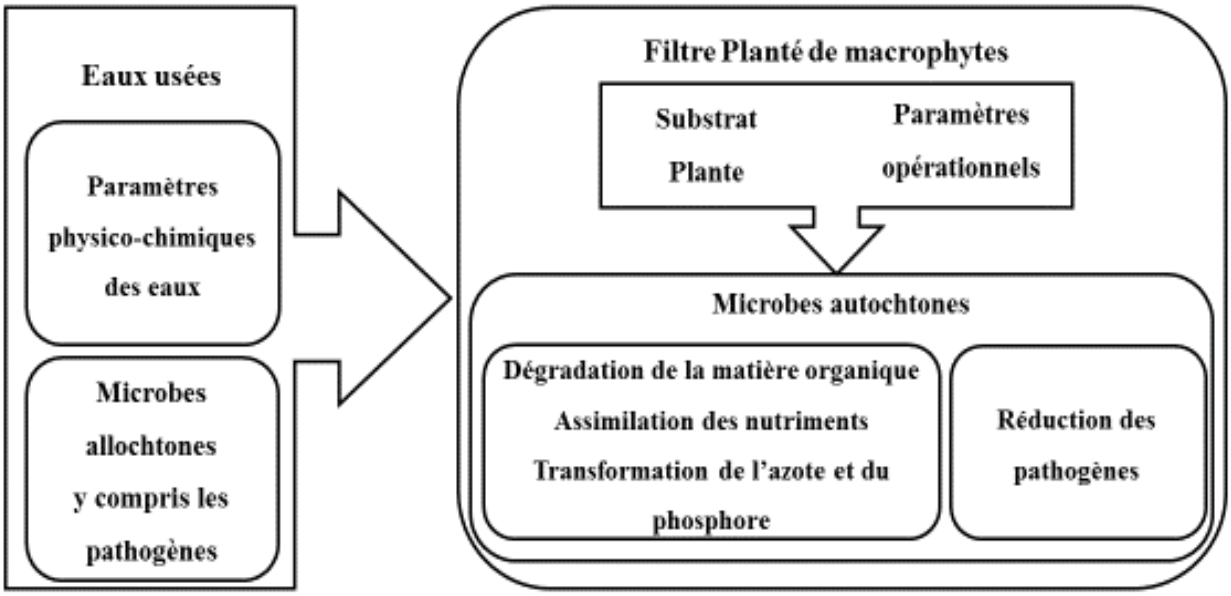


Figure 6. Facteurs influençant la structure et l'activité microbienne dans les filtres plantés de macrophytes (Truu et al. 2009b)

III.1. L'interaction microorganismes-plante

La rhizosphère, au niveau de laquelle se développent la plupart des communautés microbiennes, est la partie la plus dynamique de la plante (Zhang et al. 2014). C'est la zone du sol entourant les racines et étant sous l'influence du métabolisme de la plante. Elle se décompose en trois zones : l'endorhizosphère formée par les tissus racinaires, le rhizoplan formé par la surface des racines et l'ectorhizosphère qui renferme le sol adhérant aux racines. La plante libère au sein de la rhizosphère divers éléments carbonés connus sous le nom des exsudats racinaires (Nguyen 2003).

La densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le substrat distant des racines (Figure 7), c'est la partie où se déroule l'interaction entre la plante et le microorganisme : il s'agit de «l'effet rhizosphère» (Chen et al. 2016). Des études ont montré que les rhizosphères des différents marais artificiels renferment une taxonomie et une densité microbienne qui se diffère d'un marais à un autre selon la quantité et la composition des exsudats racinaires (Chen et al. 2016). Ces exsudats racinaires conditionnent donc la nature des activités bactériennes (Lemanceau 1992). Rares sont les recherches qui se focalisent sur l'effet des exsudats racinaires sur la communauté microbienne au sein de la rhizosphère et leur effets sur l'élimination d'un polluant dans un filtre planté de macrophytes (Chen et al. 2016).

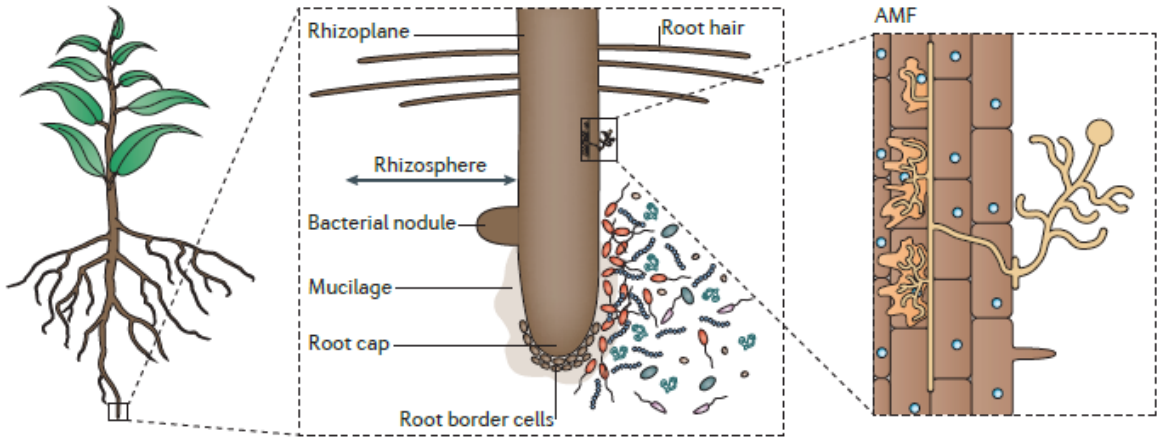


Figure 7. Localisation des microorganismes dans la rhizosphère (Philippot et al. 2013)

A ne pas négliger l'interaction des microorganismes entre eux au sein de la rhizosphère. Ces interactions sont généralement représentées par le phénomène d'antagonisme qui désigne une inhibition d'un organisme par un autre à l'intérieur d'une population microbienne hétérogène. L'antagonisme se manifeste par la sécrétion des substances d'origine microbienne comme les antibiotiques, les enzymes, les sidérophores, et d'autres substances toxiques. Certaines bactéries prolifèrent au contact direct des racines, voire même en pénétrant à l'intérieur de leurs tissus rhizodermiques et corticaux, formant avec elles des associations symbiotiques. Cette microflore attachée peut garder cet état même après un lavage approfondi (Trivedi et al. 2012).

III.2. Description et rôle de biofilm

Le biofilm se définit comme une structure complexe constituée de cellules microbiennes adhérées à une surface et enrobées d'une matrice d'exopolysaccharide. Le biofilm est une étape normale ou potentielle du cycle de vie de la plupart des bactéries, qui affichent alors un comportement coopératif et produisent des phénotypes différenciés conduisant à des fonctions spécifiques, parfois en réaction à un stress (Briandet 2011).

La formation du biofilm se déroule comme suit : En premier lieu, les cellules microbiennes se rapprochent de la surface à coloniser en réponse à un certain nombre de stimulus environnementaux et nutritionnels. Cette approche conduit à une adhésion de la cellule à la surface. En second lieu, une prolifération par l'adhésion d'autres microorganismes à la couche cellulaire formée. Le biofilm s'épaississe jusqu'à devenir macroscopique. A la dernière étape, les microorganismes peuvent activement se séparer du biofilm. Ceci peut être induit par le vieillissement du biofilm ou sous certains stress ou carences. Ces microorganismes retournent

à l'état dit « planctonique » de libre circulation et peuvent aller coloniser de nouvelles surfaces, complétant ainsi le cycle (Figure 8) (Filloux and Vallet 2003).

Dans un filtre planté de macrophytes, les microorganismes sont présents dans deux états: planctonique et sessile (biofilm) (Kurzbaum et al. 2010). l'assemblage microbien sous forme de biofilm se retrouve essentiellement sur le substrat constituant le milieu filtrant et à la surface des racines des plantes dans la zone rhizosphérique (Srivastava et al. 2016). Chaque bactérie de biofilm vit dans une communauté microbienne complexe. Chacune de ces cellules sessiles réagit à son environnement particulier et diffère fondamentalement d'une cellule planctonique de la même espèce (Kurzbaum et al. 2010).

Dans un filtre planté de macrophytes, L'activité de la communauté microbienne particulièrement celle associée en biofilm joue un rôle important dans l'élimination, la minéralisation et la transformation des polluants présents dans l'eau usée. Le biofilm entourant le lit et celui qui se trouve à la fois dans la zone plus large et dans la rhizosphère intervient dans l'élimination des agents pathogènes en facilitant leur fixation et en hébergeant des protozoaires broutant à la surface du biofilm.

Il a été démontré que dans les filtres plantés de macrophytes à écoulement horizontal, la zone rhizosphérique renferme des niveaux élevés d'oxygène exsudé des racines des plantes, permettant ainsi un microenvironnement aérobie. Il a également été démontré que les biofilms de la rhizosphère améliorent le développement de populations bactériennes ayant une activité antibiotique (par exemple, *Pseudomonas* sp.). De ce fait, le biofilm constitue un microenvironnement riche et diversifié dans lequel la structure de la communauté microbienne varie sous l'influence de plusieurs facteurs à savoir la présence où l'absence des plantes, le type de substrat utilisé comme matériau de remplissage et la nature de l'effluent à traiter (Weber et al. 2008).

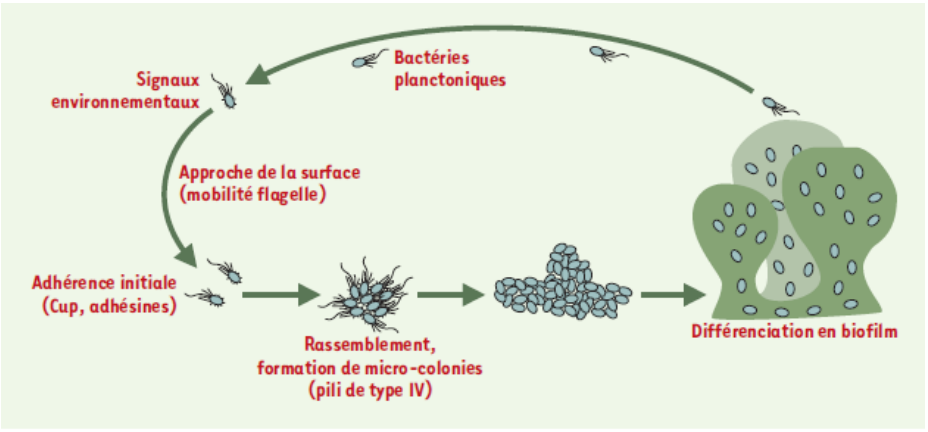


Figure 8. Modèle de formation d'un biofilm par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Filloux and Vallet 2003)

III.3. Elimination des microorganismes pathogènes par les filtres plantés de macrophytes

Il existe environ soixante types de microorganismes pathogènes étudiés qui peuvent être présents dans les eaux usées à savoir les virus tels que les rotavirus, les bactéries pathogènes comme *Vibrio cholerae*, les protozoaires tels que *cryptosporidium parvum* et les parasites eucaryotes pluricellulaires comme le ver de Guinée. Ces pathogènes résultent des excrétions humaines et animales. Une fois présents dans l'eau à traiter, ils peuvent survivre dans les filtres plantés de macrophytes pour une longue durée et participent au développement de la biomasse autochtone.

Vu la cherté de suivre tous les types de pathogènes existants dans les marais artificiels, la plupart des recherches se focalisent sur l'étude des microorganismes indicateurs de la pollution fécale à savoir les coliformes totaux, les coliformes fécaux, *E. coli*, les streptocoques fécaux et parfois, les Staphylocoques et *Clostridium perfringens*. Quelques recherches ont été menées sur la mesure des agents étiologique comme *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeroginosa* et *Listeria* spp. (Wu et al. 2016).

Des mécanismes physiques, chimiques et biologiques, seuls ou en combinaison, ont été rapportés pour éliminer les agents pathogènes des filtres plantés de macrophytes. Les mécanismes physiques impliquent la filtration des microorganismes à travers la rhizosphère, l'attachement au substrat et la sédimentation, tandis que les mécanismes chimiques incluent l'oxydation, le rayonnement UV et l'exposition aux biocides excrétés par certaines plantes.

La prédation par les animaux aquatiques, la mort naturelle, la compétition pour les ressources et l'activité antimicrobienne des exsudats racinaires constituent les facteurs biologiques. Les mécanismes d'élimination des coliformes dans les zones humides comprennent la prédation par des organismes tels que les bactériophages, le manque de nutriments et la toxicité d'autres micro-organismes. Cependant, la contribution de chaque mécanisme dépend de la conception du marais artificiel, du régime hydraulique et du temps de rétention, des macrophytes et de leur densité, des fluctuations saisonnières et de la composition des eaux usées.

De plus, des facteurs environnementaux tels que le pH, la température, le potentiel redox auraient une influence sur les propriétés des marais artificiels et, par conséquent, sur l'efficacité de l'élimination des agents pathogènes (Alufasi et al., 2017).

III.3.1.Mécanismes impliqués dans l'élimination des pathogènes

L'élimination des agents pathogènes par les filtres plantés de macrophytes se basent essentiellement sur deux mécanismes : la sédimentation et la filtration.

La sédimentation concerne particulièrement les organismes ayant des vitesses de sédimentation élevées telles que les helminthes. Les bactéries et les protozoaires ont de faibles vitesses de sédimentation (0,001 mm / s) et sont moins susceptibles de se déposer que les helminthes. Les microorganismes à faible vitesse de sédimentation comme les virus peuvent se fixer à des particules plus grosses dans les eaux usées et se déposer hors de la suspension(Jasper et al. 2013). De plus, la présence des végétaux dans ces systèmes de traitement des eaux participent significativement à l'élimination des pathogènes par leur fixation au niveau des racines. Nombreuses études ont montré la puissante capacité des plantes aquatiques à fixer les microorganismes au sein de leur système racinaire en favorisant une bonne surface d'attachement grâce aux racines très développés et un riche milieu nutritif grâce aux exsudats racinaires (Weber et al. 2008; Vymazal 2014a).

La filtration joue un rôle important pour l'élimination des pathogènes par les marais artificiels. Le type granulaire de matériau de remplissage ainsi que le type de la plante utilisée sont les facteurs clés dans le processus d'élimination microbienne par filtration. Les plantes assurent la filtration physique à travers les systèmes racinaires, la formation de biofilms et la fourniture d'une vaste surface pour la fixation microbienne (Weber et al. 2008).

Les racines des plantes diffusent l'oxygène de l'air jusqu'aux racines ce qui crée un milieu aérobie dans la partie rhizosphérique d'où l'augmentation de la concentration en oxygène dissous dans le système. La présence de ce dernier crée des conditions défavorables pour les bactéries entériques (Wu et al. 2016). Une étude menée par Headley et al. (2013) sur l'abattement d'*E. coli* a rapporté une performance remarquable des filtres plantés de macrophytes aérés par rapport à ceux qui n'étaient pas aérés. Ceci a été attribué au changement de l'écologie microbienne et de la structure trophique impliquée dans l'élimination d'*E. coli*. En outre, l'inactivation des micro-organismes par les rayons UV est un mécanisme efficace pour éliminer les agents pathogènes, principalement dans les filtres plantés à écoulement superficiel avec un taux d'abattement bactérien de 72,6%. En effet, la radiation UV affecte les microorganismes en endommageant leur ADN (Wu et al. 2016).

Les mécanismes biologiques impliqués dans l'élimination des pathogènes comprennent la libération des exsudats racinaires par les plantes. Ces derniers jouent un rôle important dans

la régulation de la composition de la communauté microbienne et de sa fonction (Haichar et al. 2014). Ainsi, des études ont rapporté la capacité des plantes à absorber et à internaliser des microorganismes pathogènes tels que les bactéries (salmonelles, mycobactéries) à travers leur système racinaire (Kaevska et al. 2014). La prédation est un phénomène plus répondu qui participe largement dans l'élimination des pathogènes des eaux usées. La prédation comprend l'activité bactériovore des nématodes, protozoaires, bactéries et phages. c'est un facteur important pour l'élimination des bactéries et des protozoaires des eaux usées (Jasper et al. 2013).

Quelques études ont examiné le devenir des virus et des indicateurs viraux lors du traitement des eaux usées par les filtres plantés de macrophytes. Torrens et al. (2009) ont montré la performance d'un filtre planté à écoulement vertical à éliminer les coliphages.

III.3.2. Facteurs influençant l'élimination des pathogènes par les filtres plantés de macrophytes

Plusieurs facteurs influencent la performance des filtres plantés de macrophytes dans l'élimination des pathogènes à savoir le type de filtre, la nature et la composition des eaux usées à traiter, le temps de séjour, les facteurs influençant la croissance de la plante utilisée, le milieu filtrant, l'oxygène, le pH, l'intensité solaire et les fluctuations saisonnières (Wu et al. 2016). Nombreux études ont montré que la performance de ces systèmes de traitement des eaux usées dans l'élimination des pathogènes varie selon plusieurs facteurs biotiques et abiotiques à savoir les conditions climatiques par exemple en Inde une étude sur l'élimination des *Salmonella* spp., *Shigella* et *Vibrio* à partir des eaux usées domestiques a enregistré des abattements de 96%, 87% et 94% respectivement pendant la saison pluvieuse, en hiver et en été (Makvana and Sharna 2013).

Nombreux études ont souligné le rôle des plantes dans l'élimination des pathogènes et ont suggéré que les lits plantés sont plus efficaces dans l'élimination des bactéries par rapport aux lits non plantés (Hench et al. 2003; Keffala and Ghrabi 2005; Vymazal 2005). Les systèmes racinaires des plantes fournissent un support mécanique et remplissent de nombreux rôles, notamment la synthèse, l'accumulation et la sécrétion des composés participant ainsi dans l'élimination ou l'inactivation des pathogènes. Le substrat est un autre facteur important affectant la dynamique de la communauté bactérienne dans les filtres plantés de macrophytes (Weber and Legge 2008).

IV. L'élimination des composés azotés dans les filtres plantés de macrophytes

IV.1. Cycle biologique de l'azote

L'azote fait partie intégrante des êtres vivants. Il entre dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Le cycle de l'azote peut être divisé en quatre parties distinctes :

- **La fixation** de l'azote gazeux : c'est la conversion de l'azote atmosphérique en azote utilisable par les plantes et les animaux grâce aux microorganismes fixateurs d'azote.
- **L'ammonification** : où il y a décomposition de la matière organique et libération d'ammonium.
- **La nitrification** qui consiste en l'oxydation de l'ammonium en nitrites NO_2^- en passant par la forme intermédiaire de l'hydroxylamine NH_2OH.
- **La dénitrification** qui retourne l'azote à l'atmosphère sous sa forme moléculaire N_2, avec comme produit secondaire du CO2 et de l'oxyde d'azote N_2O. (Figure 9).

D'autres voies s'ajoutent à celles-ci et sont internes au cycle, comme l'oxydation anaérobique d'ammonium ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation) ou La réduction désassimilatrice des nitrates en ammonium DNRA (dissimilatory nitrate reduction to ammonium) (Denk et al. 2017).

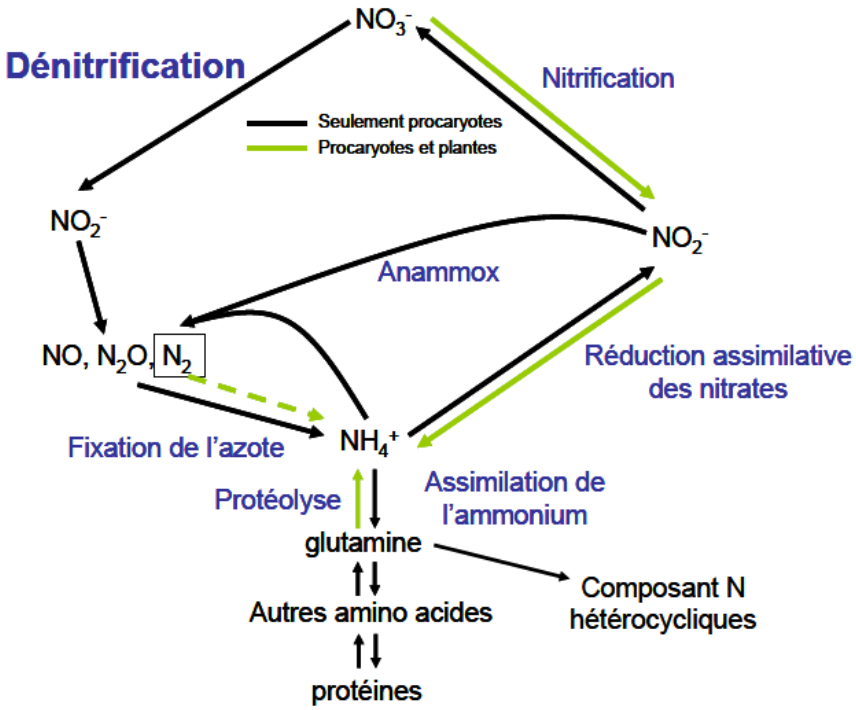


Figure 9. Le cycle biologique de l'azote (Bothe et al. 2007)

IV.2. toxicité de l'azote et phénomène d'Eutrophisation

L'azote sous ses différentes formes réactives (ammonium, nitrates, nitrites, ammoniac,…) peut être une source de pollution (Pajares and Bohannan 2016). En effet, le développement rapide de l'agriculture et l'utilisation intense des fertilisants à base d'azote affectent la qualité des eaux. La décharge excessive de l'azote dans l'eau peut causer des problèmes écologiques graves comme l'eutrophisation et la dégradation par la suite de la vie dans l'écosystème aquatique (Vymazal 2014b).

La pollution en nitrates des écosystèmes aquatiques constitue un problème majeur vu ses effets néfastes sur la santé humaine. Les nitrates peuvent s'infiltrer à travers le sol et atteindre la nappe aquifère. Chez les nouveaux-nés, les nitrates est la cause de la méthémoglobinémie. Cette maladie vient de la transformation des nitrates en nitrites. Les nitrites réagissent avec l'hémoglobine pour former la méthémoglobine, affectant la capacité du sang à transporter suffisamment d'oxygène jusqu'aux cellules de l'organisme (Lee and Beauchemin 2014).

Par son apport excessif en nitrates, l'activité agricole présente la principale source de la pollution des nappes souterraines. Les nitrates sont très solubles, hautement mobiles et peuvent persister et s'accumuler, à long terme, à des concentrations élevées (Zhai et al. 2017). L'organisation mondiale de la santé a fixé une norme de contrôle de 50mg/L pour les nitrates dans les eaux potables (OMS, 2016).

Les oxydes d'azotes libérés dans l'atmosphère à cause de l'activité anthropique présentent un danger pour l'environnement : pollution des basses couches, amincissement de la couche d'ozone stratosphérique et réchauffement climatique (Jia et al. 2011).

IV.3. Processus de transformation de l'azote dans les filtres plantés de macrophytes

Les mécanismes prédominants dans l'élimination de l'azote dans les lits plantés sont la conversion microbienne sous forme gazeuse et le stockage dans le substrat et la biomasse végétale. La volatilisation directe de l'ammonium est généralement négligeable. La séquence nitrification-dénitrification est considérée comme le processus majeur d'élimination de l'azote. En effet, les filtres plantés de macrophytes à écoulement vertical où il y a un bon transfert d'oxygène favorisent la nitrification, alors que dans les filtres à écoulement horizontal, les nitrates peuvent être éliminés de façon efficace par dénitrification microbienne (Avila et al. 2017). De ce fait, un système hybride garantie une bonne élimination d'azote. Ainsi l'oxygène

est un facteur primordial pour la nitrification et doit être abondant pour le bon déroulement de ce processus (Liu et al. 2014).

IV.4. La dénitrification

La dénitrification est un processus microbien dans lequel les oxydes d'azote sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons, pour la production d'énergie en absence d'oxygène (Helen et al. 2016).

La réduction des nitrates (NO_3^-) en azote gazeux (N_2) se déroule en quatre étapes consécutives avec la production des nitrites (NO_2^-), le monoxyde d'azote (NO) et de l'oxyde nitreux (N_2O) comme des intermédiaires obligatoires selon le schéma réactionnel suivant :

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$$

Ces réactions sont catalysées par différentes enzymes soit la nitrate réductase, la nitrite réductase, l'oxyde nitrique réductase et l'oxyde nitreux réductase (Chon et al., 2011). La réduction des nitrates en azote gazeux est couplée à la synthèse d'ATP par l'intermédiaire de la chaîne de transport des électrons. Les quatre réactions sont représentées par les équations suivantes (Payne 1981) :

$$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O \text{ (Nitrate réductase)}$$

$$NO_2^- + 2\,H^+ + e^- \rightarrow NO + H_2O \text{ (Nitrite réductase)}$$

$$2NO + 2\,H^+ + 2\,e^- \rightarrow N_2O + H_2O \text{ (Oxyde nitrique réductase)}$$

$$N_2O + 2\,H^+ + 2\,e^- \rightarrow N_2 + H_2O \text{ (Oxyde nitreux réductase)}$$

L'équation bilan du phénomène de la dénitrification est la suivante :

$$2\,NO_3^- + 10\,e^- + 12\,H^+ \rightarrow N_2 + 6\,H_2O$$

IV.4.1. Les enzymes intervenant dans la dénitrification

La première étape de la dénitrification consiste à la conversion des nitrates en nitrites. Elle est catalysée par la nitrate réductase. Cette enzyme peut se présenter sous deux formes : une nitrate-réductase liée à la membrane (Nar) codé par le gène *narG* ou une nitrate-réductase periplasmique (Nap) codé par le gène *napA*. Les bactéries dénitrifiantes peuvent renfermer les deux formes de cette enzyme (Philippot 2002). Ensuite, La réduction des nitrites en oxyde nitrique est catalysée par la nitrite réductase. Cette enzyme se présente également sous deux formes de structure et métaux prosthétiques différents : l'une avec du cuivre (Cu-Nir) codé par le gène *nirK* et l'autre avec du cytochrome *cd1* (Cd-Nir) codé par le gène *nirS* (Chon et al. 2011). L'étape suivante consiste en la transformation de l'oxyde nitrique en oxyde nitreux. Cette étape est catalysée par deux enzymes : l'une reçoit l'électron du cytochrome c ou de la

pseudoazurin (cNor) codé par le gène *norC* et l'autre d'un pool de quinol (qNor) codé par le gène *norB* (Braker and Tiedje 2003). Enfin, la transformation de l'oxyde nitreux en azote gazeux est effectuée grâce à une enzyme (Nos) localisée dans le périplasme des bactéries Gram- et codé par le gène *nosZ* (Chon et al. 2011) (Figure 10).

Pour l'étude des microorganismes acteurs de la dénitrification, les recherches sont focalisées sur l'étude des gènes codant pour les enzymes impliquées dans les différentes étapes de la réaction. Par ailleurs, il est à noter que ces étapes peuvent avoir lieu indépendamment les unes des autres et qu'un même micro-organisme ne possède pas nécessairement toutes les enzymes de la dénitrification. Un large nombre de bactéries dénitrifiantes possèdent les gènes codant pour la nitrate réductase. Les gènes *nirS* et *nirK* ont été les plus utilisés pour la caractérisation des communautés dénitrifiantes dans les milieux aquatiques. Les gènes *norB* et *qnorB* sont les moins utilisés pour l'étude des communautés dénitrifiantes (Philippot 2002; Jones et al. 2008).

La réduction des nitrates en nitrites a lieu dans le cytoplasme, puis la réduction des nitrites jusqu'en azote gazeux se passe dans le périplasme. De ce fait, les bactéries qui assimilent les nitrates ont la capacité de transporter activement les nitrates à l'intérieur des cellules. Ensuite, les nitrites résultant de la réduction des nitrates doivent être activement relâchés dans le périplasme où ils pourront être réduits. La réduction des nitrites en oxydes nitriques est une étape particulière de la dénitrification puisqu'elle conduit à la formation de la liaison N-N qui se forme lors de la réaction de réduction du NO en N_2O. La réduction du N_2O n'est pas nécessairement couplée à la dénitrification et plusieurs espèces non dénitrifiantes sont connues pour réduire le N_2O (Braker et al. 1998; Philippot 2002; Priemé et al. 2002; Delorme et al. 2003; Henry et al. 2004; Chon et al. 2011; Huang et al. 2011)..

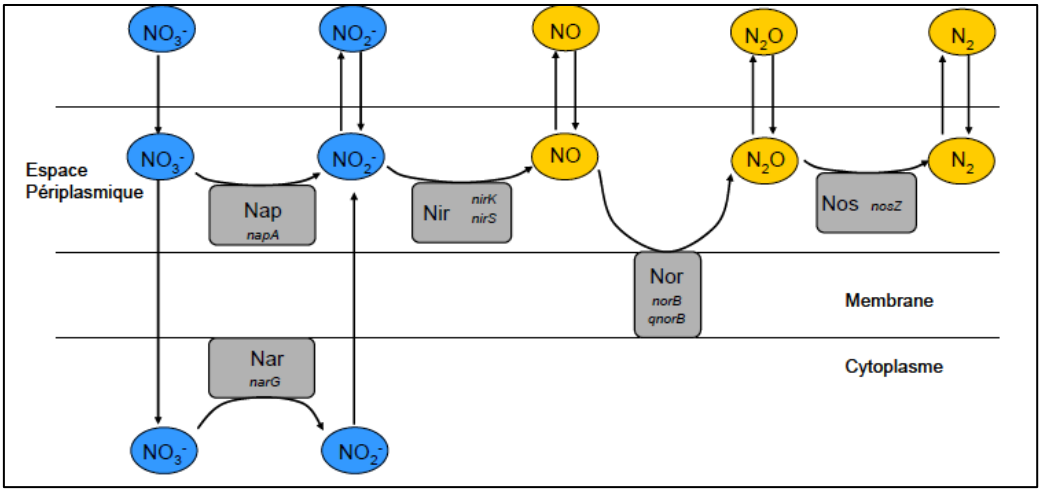


Figure 10. Les étapes de la dénitrification avec une localisation des enzymes par rapport à la membrane cytoplasmique : Nar :nitrate réductase ; Nap : nitrate réductase liée à la membrane ; Nir : nitrite réductase ; Nor : oxyde nitrique réductase ; Nos : oxyde nitreux réductase (Wallenstein et al. 2006).

IV.4.2. Communauté microbienne impliquée dans la dénitrification

Le phénomène de la dénitrification renferme une large gamme des microorganismes de différentes origines principalement les procaryotes. C'est un processus biologique réalisé par des microorganismes chimioorganotrophes facultativement aérobiques. Ces microorganismes sont phylogénétiquement très diversifiés : ils proviennent des trois principales branches de l'arbre du vivant *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*. Ainsi, un même microorganisme ne possède pas nécessairement toutes les enzymes de la dénitrification. De ce fait, les différentes étapes de la dénitrification peuvent avoir lieu indépendamment les unes des autres, spatialement et temporellement (Roose-amsaleg et al. 2010).

La capacité à dénitrifier a été découverte chez divers groupes de bactéries phylogénétiquement non apparentées, y inclus *Aquificae*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroides*, and *Proteobacteria* phyla. Ce phénomène est observé également chez certaines espèces de levures et des archéobactéries. La plupart des recherches ont été focalisées sur les bactéries dénitrifiantes vu que ces microrganismes sont les plus impliqués dans ce phénomène dans plusieurs environnements (Wallenstein et al. 2006). La majorité des bactéries dénitrifiantes sont des anaérobies facultatives chimiotrophes. Le plus grand nombre des gènes impliqués dans la dénitrification a été identifié chez les Gamma-protobactéries comme *P.stutzeri, Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens.* Actuellement, la diversité de la communauté dénitrifiante est déterminée à l'aide des marqueurs moléculaires utilisant des gènes fonctionnels codant pour les enzymes qui participent à la dénitrification (Philippot 2002).

IV.4.3. Les facteurs contrôlant la dénitrification dans le milieu aquatique

Plusieurs facteurs affectent la dégradation microbienne notamment la disponibilité de la matière organique, La condition d'oxydation-réduction, la température, le pH, la présence des plantes et les caractéristiques du milieu. En effet, pour que la dénitrification ait lieu une source de carbone organique doit être présente comme donneurs d'électrons. Ainsi, la dénitrification est d'autant plus rapide que la quantité de carbone disponible est importante et que ce carbone est rapidement biodégradable. De plus, une anaérobiose stricte ou modérée qui régule l'activité enzymatique est nécessaire pour que le processus puisse avoir lieu et également la présence de formes azotées oxydantes comme les nitrates, les nitrites, les oxydes nitriques ou le protoxyde d'azote et enfin la présence des bactéries capables de réaliser ce processus.

L'intensité de la dénitrification est donc susceptible d'être conditionnée par des variations de ces différents facteurs (Fan et al. 2013).

V. Les techniques de détection et d'analyse de la composition microbienne au niveau des filtres plantés de macrophytes

Différentes techniques microbiologiques conventionnelles ou basées sur les méthodes de la biologie moléculaires peuvent être utilisées pour suivre les processus d'épuration et pour évaluer la performance des filtres plantés de macrophytes.

Les méthodes classiques à culture-dépendante restent toujours un outil pratique et économique pour la détection et le dénombrement des bactéries indicatrices de la pollution fécale. En revanche, ces méthodes ne fournissent aucune indication sur la communauté microbienne totale d'où la nécessité des outils moléculaires (Donde and Bangding 2017).

V.1. Exemples de techniques classiques

Les premières investigations de la composition microbienne des eaux usées ont été basées sur l'observation microscopique et l'utilisation des milieux de culture. La microscopie permet l'observation à l'état frais des microorganismes et la description de leur forme et leur mobilité. Avec le développement de la microscopie, il est possible d'observer l'ultrastructure des organites intracellulaires. De plus, la microscopie électronique à balayage ou MEB permet de reconstituer une image tridimensionnelle de l'échantillon.

Le développement de la culture sur un milieu nutritif a permis de cultiver et d'identifier certaines bactéries des eaux usées. Par la suite, la découverte des microorganismes indicateurs de la pollution fécale a permis d'évaluer la qualité de l'eau particulièrement les coliformes totaux, fécaux, *E. coli* et les streptocoques totaux et fécaux (Gilbride et al. 2006). Parmi les méthodes dépendantes de la culture et qui sont largement utilisées pour évaluer la performance des filtres plantés de macrophytes, on trouve la méthode de la filtration membranaire (Coleman et al.2001; Foladori et al. 2015). Et la méthode du nombre le plus probable « NPP » (Chang et al. 2014; Ali et al. 2018).

En outre, la cytométrie en flux a été largement utilisée dans l'étude de la performance des filtres plantés de macrophytes. En effet, cette technique permet le dénombrement, l'identification et le tri des cellules en suspension. A titre d'exemple, Gagnon et al. (2007) ont étudié l'effet des espèces végétales utilisées sur la densité microbienne au sein des marais artificiels en appliquant la cytométrie en flux pour l'évaluation de la biomasse totale dans les

systèmes étudiés. Ainsi les tests enzymatiques sont des tests rapides utilisés pour détecter des bactéries spécifiques présentes dans les eaux usées, par exemple dans (Naga et al. 2016) une détection rapide et spécifique d'*E. coli* a été basée sur l'étude de l'activité enzymatique la beta-D-glucuronidase.

La découverte des bactéries viables non cultivables en 1982 (Xu et al. 2018) a montré la limite majeure des méthodes dépendantes de la culture. En effet, par les milieux de culture, il est difficile de reproduire le milieu naturel et de cultiver toute la biomasse présente dans l'échantillon. De ce fait, les méthodes moléculaires viennent de résoudre le problème et constituent une révolution pour la microbiologie et le monde scientifique.

V.2. Exemples de techniques moléculaires

Les techniques de la biologie moléculaire prennent une place de plus en plus importante dans l'étude de la diversité microbienne naturellement présente dans un milieu environnemental. En effet, les techniques de la biologie classique basée sur la culture traditionnelle des microorganismes ne permettent pas d'estimer réellement la communauté microbienne existante dans un échantillon donné (Amann et al. 1995; Gilbride et al. 2006).

En 1970, Carl Woese (1987) a établi une classification des procaryotes en se basant sur la comparaison des ARN 16S par la première technique de Frederick Sanger : les ARN 16S sont découpés en oligonucléotides. Une empreinte des fragments obtenus est réalisée pour chaque espèce et comparée aux empreintes des autres espèces. Un coefficient de similarité des empreintes est calculé. Ensuite le développement des outils de la biologie moléculaire permet d'étudier la structure, la fonction et le dynamisme des communautés bactériennes (Dahloff 2002). Des études ont montré l'efficacité des approches moléculaires récentes dans la caractérisation de la diversité microbienne dans un échantillon donné (Shahnewaj and Mannan 2013).

Une variété des méthodes moléculaires ont été appliqués pour l'étude des gènes impliqués dans la dénitrification et l'analyse de la diversité de la communauté dénitrifiante dans un environnement naturel. Généralement, ces approches visent à quantifier les gènes impliqués dans la dénitrification et à évaluer donc l'abondance des microorganismes dénitrifiants dans l'échantillon (Wallenstein et al. 2006).

Pour une étude moléculaire des échantillons naturels, une première étape primordiale doit être présente et qui consiste en l'extraction de l'ADN génomique. En effet, les méthodes

d'extraction du matériel génétique sont nombreuses et variables. Une fois l'ADN est extrait, il peut être manipulé selon l'objectif à atteindre de différentes manières. Les approches moléculaires sont nombreuses et se basent toutes sur l'amplification du matériel génétique ainsi extrait. L'analyse peut être quantitative (PCR quantitative, PCR compétitive) ou structurale (RFLP, DGGE, etc.) (Shahnewaj and Mannan 2013). Ainsi, la technique de l'hybridation fluorescente ou FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) est une technique moléculaire largement utilisée dans la détection des microorganismes spécifiques dans les filtres plantés de macrophytes (Sawaittayothin et al. 2007). Elle combine la biologie moléculaire et la microscopie et permet d'identifier de manière fiables les microorganismes présents et visualiser leur morphologie ainsi que leur répartition spatiale (Juzan et al. 2012).

La figure 11 présente les approches moléculaires pouvant être utilisées pour l'analyse de la communauté bactérienne d'un échantillon.

V.2.1. Amplification Du Matériel Génétique Par Polymérisation En Chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) constitue un outil essentiel en biologie moléculaire (Tse and Capeau 2003). Elle est basée sur le mécanisme de la réplication de l'ADN : l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire puis dupliqué et ré-enroulé. La technique est basée sur la répétition de cycles de transition de température et se déroule en trois étapes principales : la dénaturation, l'hybridation et l'extension ou élongation. Cette technique a été mise au point en 1986 par Mullis et ses collaborateurs (1986) (Huybens et al. 2009).

V.2.2. Principe de la PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel (real-time PCR ou Q-PCR) fait le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la fin du processus. Un gène cible est amplifié par Q-PCR. En connaissant le nombre de copies rencontrées dans le génome bactérien, le nombre de bactéries porteuses de ce gène présentes dans l'échantillon de départ peut alors être estimé. (Sharma et al. 2007).

L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (Tse and Capeau 2003). Cet outil est couramment utilisé pour déterminer par exemple la dynamique des populations microbiennes

(présence, augmentation, maintien de l'abondance microbienne) ou du maintien de l'activité des gènes (Monier and Cécillon 2015).

V.2.3. Le séquençage

Le séquençage est un procédé utilisé pour déterminer l'ordre des bases dans les acides nucléiques. Il permet, à partir d'une séquence cible d'ADN, de retrouver l'identité du microorganisme correspondant après comparaison avec une base de données. Il est utilisé pour réaliser l'inventaire des espèces ou des fonctions potentielles d'un écosystème. Depuis les années 1970 et selon la méthode originale de Sanger, cette technique moléculaire fut une révolution dans le domaine de l'identification des microorganismes. Depuis 2005, le séquençage haut-débit ou de nouvelle génération est apparu, la même opération est dorénavant réalisée en quelques heures seulement et le nombre de séquences obtenues s'élève à plusieurs millions (Juzan et al. 2012).

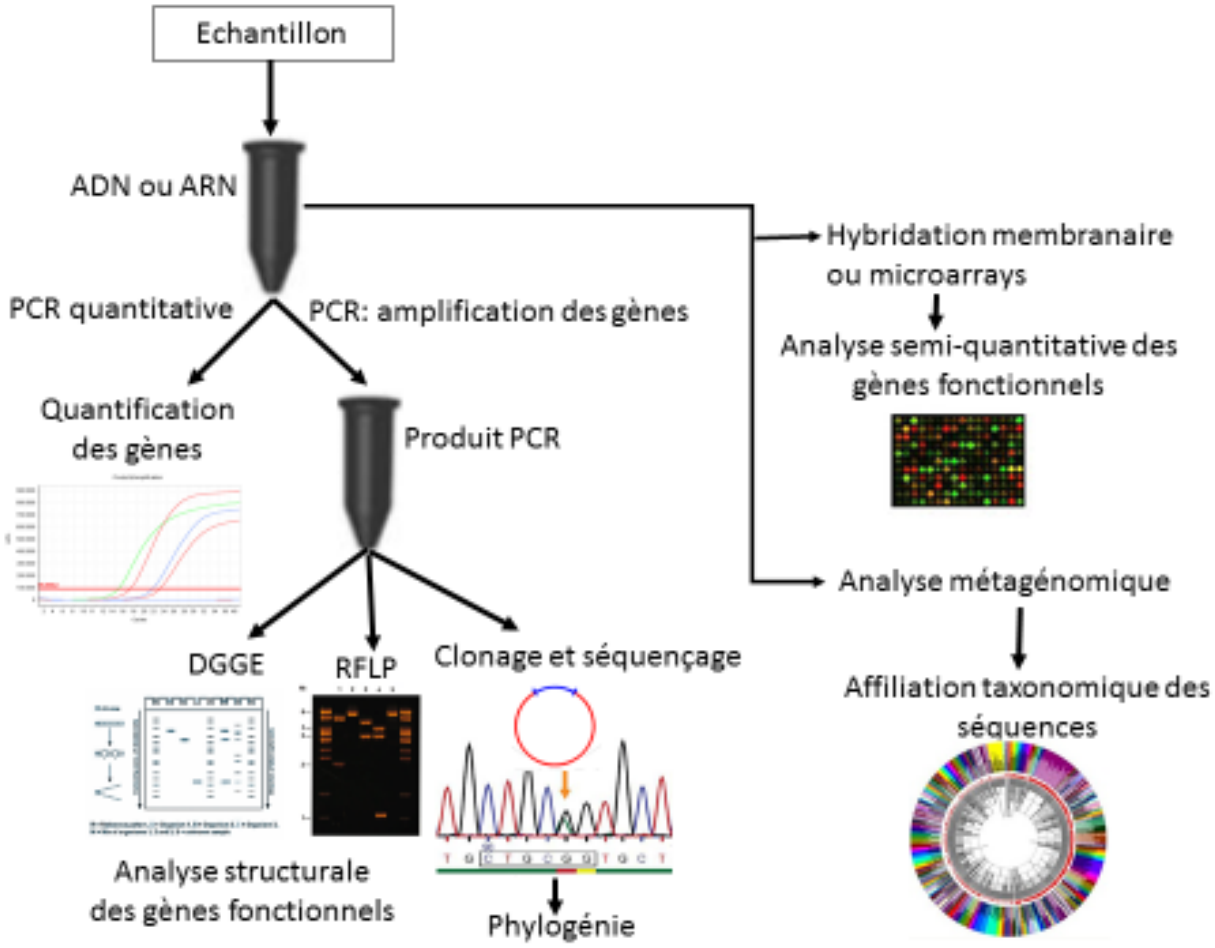


Figure 11. Les approches moléculaires pouvant être utilisées pour l'analyse de la communauté bactérienne d'un échantillon (modifié d'après (Wallenstein et al. 2006))

VI. Développement des méthodes pour améliorer la performance épuratoire des filtres plantés de macrophytes

En tant que l'une des technologies écologiques les plus répandues, les filtres plantés de macrophytes constituent un moyen rentable et durable de traitement des eaux usées (Wu et al. 2014a). Pour préserver la durabilité et pousser au développement, l'amélioration de la performance de ces systèmes de traitement des eaux usées devient un sujet d'actualité autour duquel se déroulent plusieurs recherches.

Des études ont montré que l'action sur l'un des paramètres affecte directement ou indirectement le fonctionnement d'un marais artificiel. Le type de filtre, ses dimensions, l'espèce végétale utilisée, ainsi que le support granulaire et la nature de l'effluent à traiter sont les principaux paramètres qui interviennent pour évaluer le bon fonctionnement de ce système (Rehman et al. 2017).

Les performances des filtres plantés de macrophytes dépendent souvent de l'optimisation de diverses conditions d'exploitation et d'environnement. Par conséquent, des stratégies et des méthodes potentielles ont été utilisées et permettent d'atteindre des performances d'élimination de polluant élevées et stables. Les stratégies d'amélioration actuellement appliquées comprennent: (a) L'isolation thermique, (b) La création de courant de marée ou «Tidal flow» (c) L'alimentation par paliers « step-feeding » (d) La recirculation des effluents, (e) L'ajout de sources de carbone externes (L'ajout de carbone organique et application de substrats organiques), (f) La récolte de biomasse végétale, (g) La bioaugmentation, et (h) L'ajout de vers de terre (Wu et al. 2015a) (Figure12).

L'isolation thermique consiste à recouvrir le système à l'aide d'une couche isolante formée par divers matériaux tels que l'écorce, la paille agricole, des coupeaux de bois, du compost afin de fournir une isolation thermique au système et améliorer ainsi la dégradation du polluant (Wallace et al. 2001). Wu et al.(2011b) ont mis au point un marais artificiel avec une couche isolante de copeaux de bois de 40cm pour traiter les eaux usées domestiques des villages ruraux dans le nord de la Chine. Cette couche de biomasse isolante pourrait maintenir la température du lit au-dessus de 6°C et fournir une isolation thermique importante au système. En conséquence, une performance de traitement élevée a été obtenu en hiver glacial : La DBO est de l'ordre de 95%, l'abattement en MES vaut 96%, l'abattement de l'azote ammoniacal est de 84% et le phosphore total vaut 88%.

Vu l'importance de l'oxygène, la recirculation de l'effluent, la manière d'alimentation de système de traitement par paliers et le développement des courants d'eaux à l'intérieur du filtres, sont des méthodes suivies par nombreux chercheurs. Ces méthodes viennent de garantir un bon transfert d'oxygène dans le système. Ce dernier est un paramètre environnemental crucial qui contrôle la nitrification et la biodégradation de la matière organique présente dans les eaux usées à traiter. La création d'une aération interne engendre une bonne circulation de l'effluent à l'intérieur du filtre planté. Ce qui permet un traitement fiable et une performance améliorée (Li et al. 2015; Wu et al. 2015a; Wang et al. 2016).

Il a été prouvé que la récolte de la biomasse végétale est une stratégie efficace pour améliorer l'élimination des nutriments par filtres plantés de macrophytes (Saeed and Sun 2012). Ainsi l'ajout de vers de terre dans ces systèmes est une méthode potentielle qui améliore la dégradation de la matière organique (Xu et al. 2013).

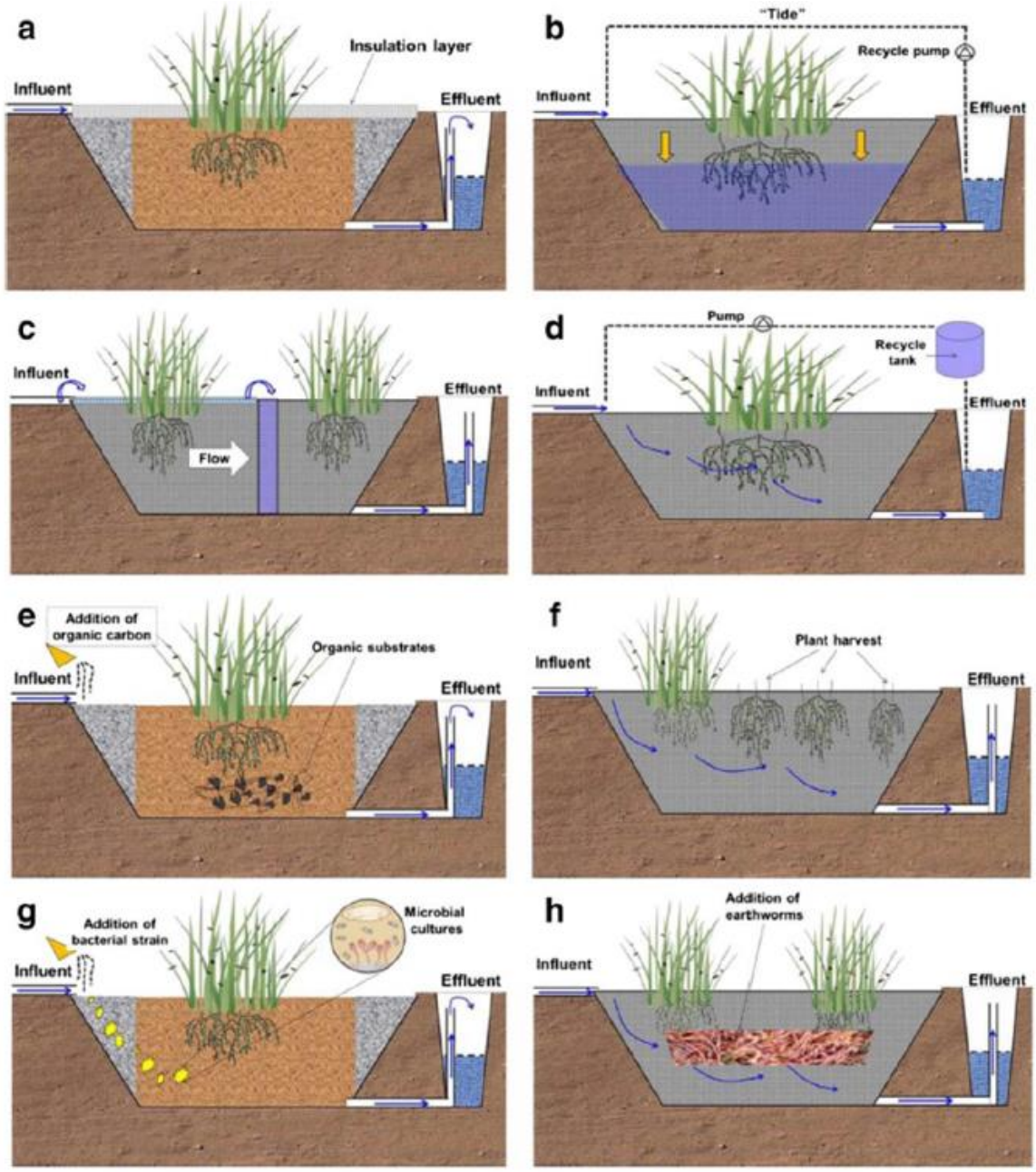


Figure 12. Les différentes stratégies utilisées pour améliorer la performance des filtres plantés de macrophytes : (a) L'isolation thermique, (b) Création de courant de marée ou « Tidal flow » (c)L' alimentation par paliers « step-feeding » (d) La recirculation des effluents, (e) La fourniture de sources de carbone externes (L'ajout de carbone organique et L'application de substrats organiques), (f) La récolte de la biomasse végétale, (g) La bioaugmentation, et (h) L'ajout de vers de terre (Wu et al. 2015a)

VI.1. L'application d'un substrat organique

Afin d'améliorer la dénitrification par les systèmes de traitement des eaux usées par filtres plantés de macrophytes, des chercheurs ont proposé l'utilisation d'un substrat naturel et riche en carbone comme matériau de remplissage.

Récemment, certains bioabsorbants comme la balle de riz, l'écorce de pin, bagasse de canne à sucre et le liège granulé ont été considérés comme des alternatives intéressantes aux

matériaux de substrat commun dans les filtres plantés en raison de leur faible coût (Saeed and Sun 2011, 2013; Shen et al. 2015; Wu et al. 2015c).

Dans une étude, Saeed et Sun (2013) ont utilisé la bagasse de canne à sucre comme milieu filtrant dans un système hybride de filtres plantés de macrophytes pour traiter les eaux usées textiles. Les résultats obtenus, comparés avec ceux trouvés en cas de l'utilisation de sable comme milieu filtrant, ont montré l'efficacité de la bagasse de canne à sucre dans l'amélioration de la performance du système. Dans une autre étude plus récente, Shen et al. (2015) ont utilisé un mélange d'amidon de maïs et de polycaprolactone (PCL) en tant que source de carbone pour améliorer l'élimination des nitrates par filtres plantés de macrophytes. Les résultats ont montré que l'efficacité de l'élimination des nitrates (98%) était élevée et les bactéries dénitrifiantes *Bacillus* sp. et *Thauera* sp. étaient très abondantes dans le biofilm attaché à la surface de PCL. Cependant, un problème potentiel d'utilisation de substrats organiques peut augmenter la concentration de la DCO dans les effluents des filtres plantés de macrophytes par rapport aux systèmes utilisant le gravier comme substrat (Saeed and Sun 2011).

VI.2. La bioaugmentation ou bioinoculation

Afin d'améliorer la performance de traitement des eaux usées par filtres plantés de macrophytes, la bioaugmentation appelée aussi bioinoculation est une stratégie qui est largement utilisée ces dernières années par nombreux chercheurs. Elle consiste en l'ajout de cultures microbiennes hautement concentrées et spécialisées (Meng et al. 2014; Shao et al. 2014). Ces cultures peuvent renfermer une seule souche pure et pré adaptée ou un consortium bactérien ou encore des bactéries génétiquement modifiées.

L'ajout des microorganismes est une méthode efficace et fiable pour accélérer le taux de la biodégradation dans les filtres plantés traitant des eaux usées de différentes provenances et qui peuvent même contenant des polluants toxiques (Zhao et al. 2014; Pei et al. 2016). Pei et al. (2016) ont étudié l'effet de la bioinoculation de la souche *Paenibacillus* sp. XP1 dans un filtre planté de *Phragmites australis,* utilisé pour traiter des eaux usées domestiques, sur l'élimination de la charge organique, de l'azote et de phosphore. Les résultats obtenus ont montré l'effet significatif de la bioinoculation dans l'amélioration de la performance de traitement de filtre inoculé par rapport au filtre non inoculé. De même, l'élimination des nutriments par un filtre planté de macrophytes ultilisé pour le traitement des eaux de rivières polluées et inoculé par un consortium de six bactéries dénitrifiantes a été évalué par Shao et al. (2014). Les taux d'abattement ont été 75% pour la DCO, 96% pour la TN, 96% pour $NH4^{+}$-N et 90% pour TP. De plus, Zhao et al. (2014) ont évalué les effets de la bioaugmentation sur

l'élimination de l'endosulfan dans les filtres plantés de macrophytes et ont montré qu'après 20 jours de traitement, un bon abattement de l'endosulfan a été enregistré (89-97%).

Bien que les recherches ci-dessus sur la bioaugmentation ont démontré leur efficacité sur l'amélioration de la performance des filtres plantés de macrophytes dans l'élimination des polluants des eaux usées, la recherche de souches compétentes avec une capacité puissante d'élimination de polluant et l'optimisation de leurs conditions sont les besoins essentiels à étudier pour que cette application soit une efficace et fiable stratégie à l'avenir (Zhao et al. 2014).

VI.3. Application des bactériophages pour le traitement des eaux usées

L'utilisation des bactériophages, virus qui infectent et lysent les bactéries (Figure 13), est une technique efficace de lutte contre les infections bactériennes. Cette technique est largement utilisée dans le domaine médical, connue sous le nom de phagothérapie (Petty et al. 2006; Ravat et al. 2015; Dublanchet 2017). L'intérêt de l'application des phages afin de contrôler les populations bactériennes a été étendu du domaine médical pour couvrir les domaines de l'agriculture, de l'aquaculture et de l'industrie alimentaire. Récemment, l'application potentielle des techniques de phages dans les systèmes de traitement des eaux usées a permis de contrôler les problèmes liés au traitement des eaux usées et d'améliorer la performance épuratoire des systèmes de traitement. Ils ont été comme étant des agents de contrôle des pathogènes des eaux usées, pour améliorer la déshydratation et la digestion des boues (Withey et al. 2005b).

Les bactériophages sont considérés comme les entités biologiques les plus abondantes et les plus diverses de la planète, avec dix phages pour chaque cellule bactérienne dans la plupart des écosystèmes étudiés. La forte pression de prédation exercée par les phages sur les communautés microbiennes signifie que l'aptitude bactérienne est mesurée par leur adaptation non seulement aux ressources disponibles mais aussi à l'environnement biotique. Les bactériophages régulent donc en permanence l'écologie et l'activité microbiennes (Shapiro and Kushmaro 2011).

Deux cycles biologiques de bactériophage ont été distingués : Le cycle lytique et le cycle lysogénique. Dans le cycle lytique, les phages lytiques détruisent la cellule bactérienne. En détournant la machinerie bactérienne à leur profit, ils se reproduisent et se multiplient. La bactérie éclate et plusieurs dizaines de nouveaux phages identiques à l'original sont libérés dans le milieu et donc disponibles pour s'attaquer à d'autres bactéries de la même espèce. Dans le cycle lysogénique, les phages tempérés ont la propriété d'intégrer leur génome au chromosome

bactérien par transduction. Les phages peuvent ainsi conférer de nouvelles propriétés à la bactérie. Ils peuvent rester quiescents pendant très longtemps (prophages) avant d'entamer leur reproduction et d'entrer dans un cycle lytique (Ravat et al. 2015).

Au cours de la dernière décennie, le nombre d'études portant sur l'écologie des bactériophages dans les systèmes aquatiques augmente rapidement. En effet, les bactériophages sont étudiés comme étant des indicateurs contrôlant l'abondance des bactéries cibles, l'activité et la composition de la communauté bactérienne (Shapiro and Kushmaro 2011).

Ben Said et Otaki (2012) ont utilisé un phage lytique contre *Salmonella typhi* comme bioindicateur pour détecter les bactéries viables non cultivables après irradiation par une lumière UV. Turki et al. (2012) ont utilisé les bactériophages en tant qu'agents de lutte biologique pour éliminer les pathogènes des eaux usées. Trois phages distincts désignés par sww65, sww275 et sww297 ont été isolés des eaux usées et évalués ; pour leur potentiel à lyser les souches de *Salmonella* spp. Les résultats obtenus ont montré qu'un un cocktail de ces trois phages a réduit toutes les cultures de *Salmonella* testées. De même, Zhang et al. (2013) ont appliqué les bactériophages pour éliminer de manière sélective *Pseudomonas aeruginosa* des eaux usées. Les résultats trouvés ont montré que le traitement par des phages spécifiques peut éliminer de manière sélective les bactéries pathogènes avec un impact minimal sur les organismes bénéfiques de système de traitement et par conséquent améliore significativement la qualité des eaux traitées.

La sélection du phage approprié est un facteur critique pour la réussite et la fiabilité de cette technique (Pereira et al. 2016).

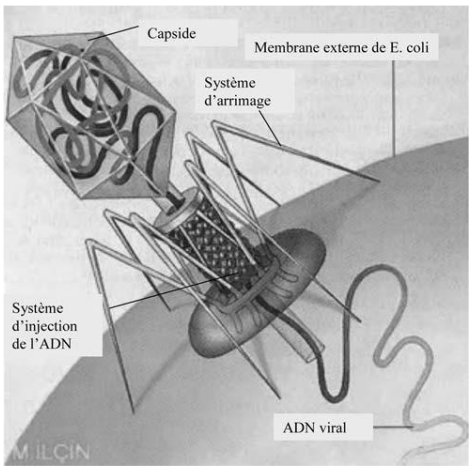


Figure 13. Structure de bactériophage T4, spécifique de la bactérie *Escherichia coli* (Ravat et al. 2015)

VI.4. L'incorporation des filtres plantés de macrophytes avec d'autres technologies de traitement des eaux usées

Le développement des systèmes de traitement des eaux usées par les filtres plantés de macrophytes afin d'atteindre des taux élevés d'abattement des polluants s'avère un défi de nombreuses recherches (Wu et al. 2014c). En effet, pour une meilleure performance épuratoire et pour pallier aux limites de ces systèmes de traitement, une grande variété des filtres plantés intensifiés ou intégrés avec d'autres technologies est développée ces dernières décennies (Vymazal 2013b; Meng et al. 2014; Wu et al. 2014c; Liu et al. 2015; Ilyas and Masih 2017).

Actuellement, les techniques les plus utilisées pour intensifier la performance des filtres plantés de macrophytes sont :

***Le système hybride** dans lequel la combinaison des deux types de filtres à écoulement vertical et horizontal est employée pour assurer un bon traitement des effluents. Contrairement au système hybride connu, un nouvel hybride révolutionnaire conçu pour améliorer l'élimination de l'azote des eaux usées domestiques. Ce système se compose de trois étages dont le premier et le troisième étage, rectangulaire, à écoulement horizontal et un deuxième étage circulaire à trois couches de différents diamètres et à écoulement superficiel. Les résultats ont révélé que des taux d'élimination élevés pour le MES, la DCO, le $NH4^+$ -N, le NT et PT ont été enregistrés (89, 85, 83, 83 et 64%, respectivement) (Ye and Li 2009).

***Les filtres plantés artificiellement aérés** : Dans lesquels, une aération artificielle est employée afin de garantir des conditions d'aérobiose favorables pour l'activité des bactéries nitrifiantes. Il a été prouvé que ces systèmes aérés confèrent un bon transfert d'oxygène et donc une bonne élimination d'azote par rapport à ceux non aérés (Wu et al. 2014c, 2015c).

***Les filtres plantés à flux circulaires** : Dans ce système, plusieurs compartiments connectés entre eux formant un couloir à flux circulaire. Grâce à l'intercirculation spéciale des eaux usées dans le système, es eaux usées pourraient être purifiées avec succès et une efficacité d'élimination supérieure à 93% pour la DCO, NH_4^+-N et PT ont été obtenus (Wu et al. 2014c).

***Le filtre planté de macrophytes dérouté** dont la conception est basée sur celle du filtre planté à écoulement horizontal avec augmentation de la circulation de l'effluent par la création d'un flux ascendant et descendant séquentiellement. Ce système a atteint des abattements élevés de 79% pour la DCO, 99% de NH4+ -N, et élimination totale de l'azote oxydé (NTO) à 100% à un temps de séjour de 5 jours (Tee et al. 2012).

***Le filtre planté de macrophytes couplé à la pile à combustible microbienne** « Microbial Fuel Cell CW » : Le traitement des eaux usées par des piles à combustible microbiennes (MFC) est récemment apparu comme une solution durable (Puig et al. 2012). Cette technologie se base sur le principe des piles à combustible : la cathode est alimentée en oxygène et l'anode est constituée d'une électrode placée au sein d'une chambre contenant un biofilm de bactéries. Elle permet d'assurer une double fonction : produire de l'électricité tout en intensifiant les procédés de traitement des effluents par accélération de la dégradation de la matière organique. Une pile à combustible microbienne couplée au un filtre planté de macrophytes a été utilisé pour l'élimination de l'azoïque (colorant) et la production d'électricité. Les résultats ont indiqué que le système CW-MFC a atteint le plus haut taux de décoloration d'environ 91% et une tension de sortie d'environ 610 mV (Fang et al. 2013).

***Le filtre planté de macrophytes couplé à l'électrolyse «Electrolysis-integrated CW»** : Ju et al. (2014) ont utilisé cette technique pour améliorer l'élimination de l'azote et de phosphore par filtre planté de macrophytes des eaux usées. Ils ont montré l'efficacité de cette technologie dans l'amélioration de la performance épuratoire du filtre planté avec des taux d'abattement significatifs de la DCO, NH_4^+-N et PT qui valent respectivement 95%, 80% et 90%.

***Le Filtre planté de macrophytes couplé à un réacteur biologique** : Une nouvelle conception pour les filtres plantés de macrophytes combinant les procédés classiques de traitement des eaux usées, tels que les boues activées et les réacteurs anaérobies, a été développée en tant que systèmes hybrides pour améliorer l'élimination des polluants (Liu et al. 2015; Garfí et al. 2017).

En plus de leurs avantages particulièrement leur faible coût par rapport aux systèmes conventionnels de traitement des eaux usées, les filtres plantés de macrophytes ont été évolués pour être une technologie fiable avec une bonne performance épuratoire dans l'élimination de divers polluants des eaux usées.

VI.5. L'application de la nanotechnologie pour le traitement et l'amélioration de la qualité des eaux usées traitées

La nanotechnologie est la science de la manipulation des matériaux à l'échelle atomique, moléculaire et macromoléculaire. C'est un domaine assez récent de recherche et développement qui offre une vaste gamme d'applications et promet d'améliorer notre qualité de vie (Mccrank 2009). Actuellement, la nanotechnologie suscite de plus en plus d'intérêt et

elle est en voie de constituer le cœur de la prochaine révolution industrielle (Feigenbaum et al. 2004). Avec son développement rapide, les nanomatériaux sont de plus en plus intégrés dans les produits commerciaux et industriels (Maynard and Michelson 2006).

La particularité d'une nanoparticule réside dans le fait que la majorité des atomes qui la constitue se trouve en surface. Les nanoparticules ont la caractéristique d'avoir des surfaces d'échanges très importantes ce qui leurs confère des propriétés physiques et chimiques particulières (Lanone and Boczkowski 2010).

Dans le domaine de traitement des eaux usées, la nanotechnologie présente un grand potentiel pour améliorer la qualité des eaux traitées et pour intensifier l'efficacité des procédés de traitement des eaux. En effet, les nanoparticules sont utilisées pour diverses applications par exemple comme des nano-adsorbants qui peuvent être facilement intégrés dans les procédés de traitement des eaux usées. Appliqués sous forme de poudre, les nano-adsorbants dans les réacteurs à suspension peuvent être très efficaces car toutes les surfaces des adsorbants sont utilisées et le mélange facilite grandement le transfert de masse. Cependant, une unité de séparation supplémentaire est nécessaire pour récupérer les nanoparticules. Les nano-adsorbants peuvent également être utilisés dans les adsorbeurs fixes ou fluidisés sous forme de pastilles, billes ou de granulés poreux chargés de nano-adsorbants. Dans les procédés membranaires l'incorporation de nanomatériaux fonctionnels dans les membranes offre une excellente occasion d'améliorer la perméabilité de la membrane et sa stabilité mécanique et thermique, ainsi que de créer de nouvelles fonctions pour la dégradation des contaminants présents dans l'effluent à traiter (Qu et al. 2013).

La photocatalyse présente la voie majeure de l'utilisation des nanoparticules dans le traitement des eaux usées. C'est un procédé d'oxydation avancée utilisé pour l'élimination des contaminants à l'état de trace et des agents microbiens pathogènes présents dans l'eau. C'est un prétraitement utile pour les contaminants dangereux et non biodégradables afin d'améliorer leur biodégradabilité (Schneider et al. 2014; Achouri et al. 2016). Le TiO_2 est le photocatalyseur le plus utilisé dans le traitement des eaux en raison de sa faible toxicité, de sa stabilité chimique, de son faible coût et de son abondance en tant que matière première (Ameta et al. 2018). Ainsi les nanoparticules sont largement appliquées dans la désinfection des eaux et le contrôle microbiologique des eaux traitées (Li et al. 2008).

Une étude réalisée par Li et al. (2013) sur l'effet de TiO_2 pris à différentes concentrations sur l'abattement de l'azote des eaux usées, a montré l'effet variable de TiO_2 sur l'élimination de l'azote et qui dépend nettement de la concentration testée. Zheng et al. (2015) ont étudié l'influence de diverses nanoparticules (Al_2O_3, SiO_2, TiO_2, et ZnO) sur l'abattement

de l'azote et de phosphore, en examinant le changement de la structure de la communauté microbienne dans un procédé de traitement des eaux usées par boue activée, et en déterminant leur effet sur l'expression des gènes et sur les activités catalytiques des enzymes impliquées dans l'élimination des nutriments étudiés. Les résultats obtenus ont montré une variabilité de la réponse des gènes en fonction de la dose testée et également de la nanoparticule étudiée.

Récemment, Huang et al. (2017) ont étudié l'effet des nanoparticules d'argent (AgNPs) (0,5 et 200µg/L) sur l'élimination des nutriments et sur la communauté bactérienne fonctionnelle dans des filtres plantés de macrophytes à écoulement vertical. Les résultats obtenus ont montré que l'ajout de ces nanoparticules améliore l'abattement de l'azote et de phosphore par comparaison à un système témoin où il n'y a pas d'AgNPs. De plus, l'analyse des résultats de séquençage a révélé l'abondance des *Proteobacteria*, *Acidobacteria* et *Bacteroidetes*.

Dans notre étude, la nanotechnologie a été appliquée pour la stimulation des gènes impliqués dans la dénitrification par l'adaptation des microorganismes à des concentrations bien déterminées des nanoparticules. C'est la nanobiostimulation.

VII. Conclusion

En conclusion de cette partie de l'analyse bibliographique, qui décrit l'état de l'art sur les systèmes de traitement des eaux usées par filtres à macrophytes, nous avons mis en évidence l'importance de ce système de traitement des eaux usées, basé sur une technologie rustique, naturelle, peu couteuse et facile à mettre en œuvre. Cependant, des limites ont été relevées dans l'élimination des nitrates et des pathogènes. Les objectifs spécifiques de nos travaux qui seront présentés dans les chapitres suivants, sont : (i) l'élimination des nitrates des eaux usées par la bioinoculation des microorganismes d'intérêt et l'utilisation de liège comme substrat organique de remplissage dans les filtres à macrophytes. (ii) l'étude de l'élimination des bactéries pathogènes par inoculation des bactéries antagonistes ou des bactériophages spécifiques.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1. Introduction

Dans cette partie, nous présentons les différents sites d'échantillonnage, les méthodes analytiques, les systèmes expérimentaux et les outils mathématiques et statistiques appliqués pour l'interprétation des résultats. Cette partie comporte quatre sections comme suit :

- La première section présente les sites de prélèvement des échantillons et la stratégie d'échantillonnage suivie.
- La deuxième section décrit les systèmes expérimentaux conçus et construits dans le cadre de ce travail de recherche.
- La troisième section est consacrée aux protocoles expérimentaux utilisés pour améliorer les systèmes de filtres plantés de macrophytes
- La quatrième section présente les outils d'interprétation des résultats : les modèles mathématiques et les tests statistiques utilisés.

2. Présentation des sites d'échantillonnage

2.1. Premier site d'échantillonnage

Les échantillons qui ont servi à nos travaux de recherche pour l'isolement et la sélection des bactéries d'intérêt ont été prélevés du Centre de Démonstration Technique (TDC) du CERTE installé à l'Institut National Agronomique de Tunisie. Ce centre comprend trois lignes de traitement liées à l'eau pluviale, l'eau grise, l'eau noire. Celle consacrée au traitement des eaux vannes (eaux noires), se fait dans une fosse septique suivie des 2 filtres à macrophytes. Les deux filtres, montés en série, sont de type à écoulement vertical et horizontal, respectivement (Figure 14). L'échantillonnage a été effectué dans différents points : au niveau de la fosse septique, à l'entrée du filtre à écoulement vertical, à l'entrée et à la sortie du filtre à écoulement horizontal, au sein de la rhizosphère (entrée, milieu et sortie de chaque filtre). Afin de diversifier la gamme d'échantillonnage, d'autres échantillons de sol et des racines ont été effectués dans divers endroits auprès de l'Oued à la technopole Borj Cedria.

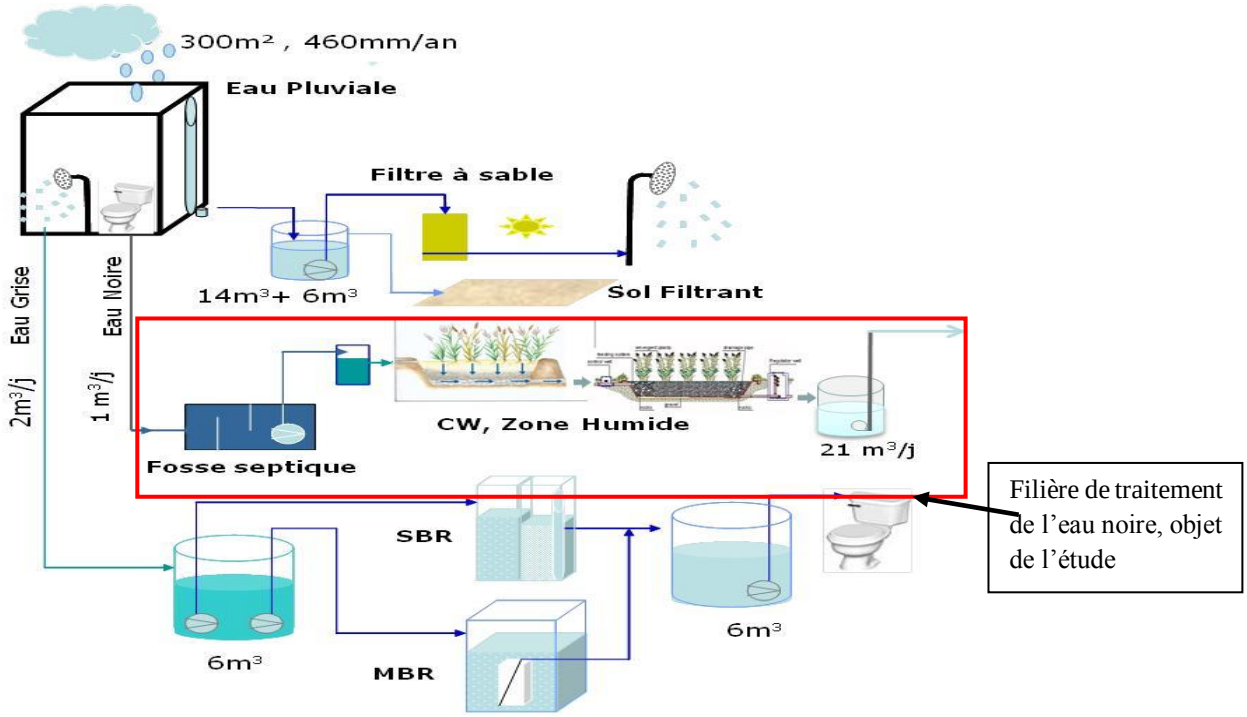


Figure 14. Schéma général de différentes technologies installées au TDC

2.2. Deuxième site d'échantillonnage et stratégie d'échantillonnage

Afin d'évaluer l'effet d'un nouveau matériau de remplissage (le liège) à éliminer les nitrates, nous avons travaillé sur des échantillons prélevés d'une mini-station (prototype) installée à l'université de Catalogne en Espagne (Figure 15). Cette mini-station comprend un traitement basé sur des filtres plantés de macrophytes pour épurer les eaux de drainage issues des activités agricoles et contaminées par les nitrates. Elle est composée d'un système hybride de deux filtres plantés de macrophytes, l'un à écoulement horizontal et l'autre à écoulement vertical. Il est réalisé selon un processus constructif innovant basé sur l'utilisation des conteneurs maritimes. Il s'agit d'un prototype compact, modulaire et mobile. Le même modèle a été installé dans deux régions agricoles voisines Vilanova de la Barca et Bellvis. Dans Villanova, le filtre a été rempli par de gravier comme matériau de remplissage alors que dans Belvis, le substrat utilisé est le liège.

Figure 15. Pilote expérimental

L'échantillonnage des eaux a été fait à l'entrée et à la sortie du système durant 6 mois (Juillet - Décembre 2016), et ceci pendant trois jours consécutifs, conformément aux protocoles d'échantillonnage des eaux souterraines établis par l'agence catalane de l'eau et à la réglementation UNE-EN ISO 5667-1 et 2: 2004.

Le substrat contenant le biofilm a été prélevé à différents niveaux du filtre dans des points bien déterminés. Pour le filtre à écoulement horizontal, le substrat a été prélevé tout le long du filtre et dans la direction de l'écoulement au début, au milieu et avant la sortie du filtre. Pour le filtre à écoulement vertical, le prélèvement a été effectué tout au long de la profondeur du filtre à savoir à la surface du filtre (0 à 0,2 m de profondeur), au milieu (0,25 à 0,8 m de profondeur) et au fond du filtre. Un total de 24 échantillons (200 g de gravier et 40 g de liège) ont été collectés dans des bouteilles en verre stérile de 500 mL contenant 250 mL de PBS 1X (solution saline tamponnée au phosphate, NaCl 130 mM, NaH2PO4 / Na2HPO4 pH 7,2). Les bouteilles ont été stockées au froid pour éviter leur séchage et la lyse cellulaire. Les échantillons ainsi prélevés ont fait l'objet d'une étude moléculaire.

3. Présentation des prototypes expérimentaux

3.1. Prototype 1

Le premier système expérimental comporte deux filtres plantés de roseaux à écoulement horizontal. Le premier a servi comme témoin (**T**: filtre témoin) et le deuxième a servi pour les différents tests réalisés (**F**: filtre test). Chaque mini filtre est représenté par un petit bassin rempli de gravier de petite et de grande taille et planté de *phragmites australis*. Les figures 16, 17 et

18 présentent respectivement les dimensions et la conception détaillée du prototype 1, une vue générale et le point d'injection des bactéries d'intérêt au niveau de la rhizosphère.

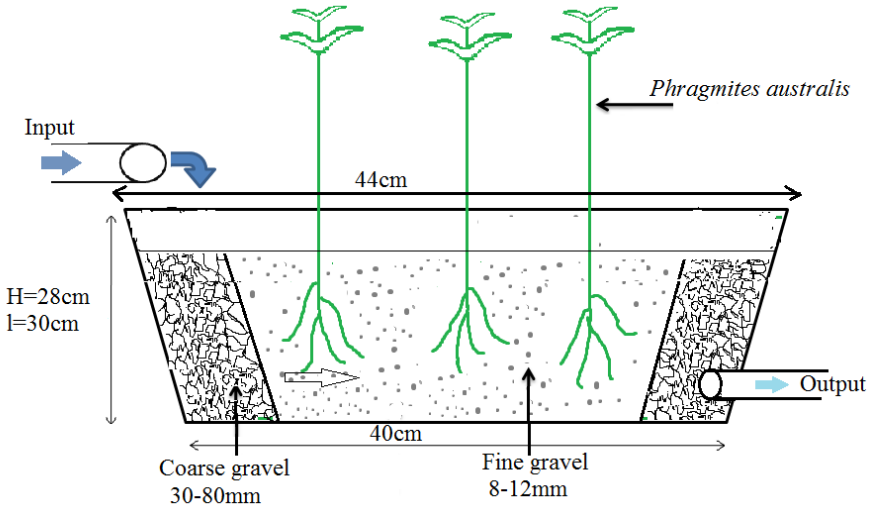


Figure 16. Schéma représentatif du prototype 1 (filtre planté à écoulement horizontal).

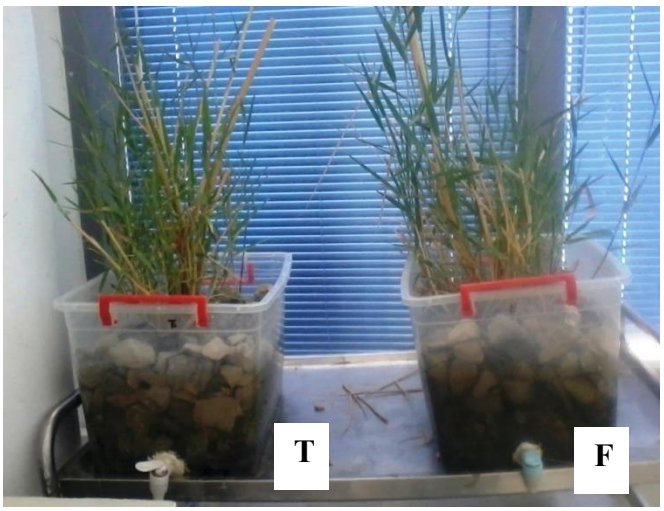


Figure 17. Conception de filtres plantés à écoulement horizontal (T: Témoin ; F: avec inoculation des bactéries d'intérêt).

Figure 18. Dispositif d'injection au sein de la rhizosphère du filtre planté.

3.2. Prototype 2

Le prototype 2 est un système constitué de quatre filtres identiques plantés de roseaux à écoulement horizontal dont deux sont remplis de gravier et les deux autres sont remplis du liège comme matériau de remplissage (Figure 19). La conception et la construction de chaque bassin sont identiques au prototype 1.

Figure 19. Prototype 2 constitué de 4 filtres plantés de roseaux : deux remplis de gravier et deux remplis de liège.

4. Protocoles expérimentaux

4.1.Isolement et identification phénotypiques des souches bactériennes d'intérêt

Pour isoler les souches bactériennes à partir de la rhizosphère, les racines sont d'abord débarrassées de la terre facilement détachable ensuite, de petits morceaux de racines sont immergés dans d'eau physiologique (0,85g/L NaCl) et agités pendant 15 min à l'aide d'un vortex afin de récupérer les bactéries autochtones. Des dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-8}) sont réalisées à partir de cette suspension dans une solution d'eau physiologique stérile. 0,1mL de chaque dilution est étalé à la surface du milieu sélectif (milieu King B, Annexe).

Le même montage expérimental a été suivi pour l'isolement des souches d'intérêt à partir des feuilles des plantes. Concernant les échantillons d'eaux usées, ces échantillons ont subi des dilutions décimales dans l'eau physiologique (0,85% de NaCl) et étalé sur milieu de culture sélectif (King B). L'incubation a eu lieu à 30°C pendant 24 heures. Le développement du pigment fluorescent a été révélé à l'œil nu ou sous UV (254 et 366nm).

Les colonies d'aspects différents sont purifiées sur le milieu solide de King B puis désignées par un code. L'identification de ces souches isolées est déterminée à base de l'aspect phénotypique de colonies, de l'examen microscopique et des caractères biochimiques spéciaux. L'observation morphologique (forme de la colonie, taille, couleur, aspect, odeur et

transparence) et microscopique (coloration de Gram, taille, forme, mode de groupement et mobilité) permet une orientation préliminaire pour la suite de la recherche.

Les tests biochimiques réalisés sont : la fluorescence sur milieux de King A et B, le test de l'oxydase et de la catalase. Les souches bactériennes pures sont conservées en milieu LB à -20°C après avoir ajouté 15% de glycérol.

- **La coloration de Gram**

La coloration Gram a été effectuée selon la méthode classique. Parallèlement, un test plus rapide a été effectué : Deux gouttes d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH 3%), sont mises en contact avec le consortium bactérien sur une lame en effectuant un mouvement circulaire. La solution de KOH devient visqueuse en présence de bactéries à gram négatif. La réaction est considérée positive si la viscosité est obtenue après 30s (Bourgault et Lamothe, 1988).

4.2.Criblage des isolats bactériens

Après une étape d'isolement et de purification des souches bactériennes, nous avons passé à une autre étape : le criblage ou le « *screening*» qui a pour but de sélectionner à partir des isolats bactériens les souches les plus dénitrifiantes, les plus antagonistes envers les souches pathogènes, les plus mobiles, etc. Ces souches bactériennes seront ultérieurement utilisées pour améliorer le rendement épuratoire du système de traitement des eaux usées.

4.2.1. Test de dénitrification

La dénitrification est la transformation des ions nitrates en azote gazeux (N_2). La réduction des nitrates a été testée selon la méthode décrite par Roussel-Delif et al. (2005). Des tubes contenant du bouillon nutritif à 0.2 % de KNO_3 et une cloche pour détecter la formation de gaz, sont inoculés et incubés à la température 25ºC pendant 7 jours. Le suivi de l'assimilation des nitrates est effectué par dosage en utilisant la chromatographie ionique.

4.2.2. Etude de l'activité protéasique

L'estimation qualitative de la sécrétion extracellulaire des protéases a été déterminée par inoculation de 5 µL de la bactérie testée sur un milieu gélosé LB-agar (1,5% agar) additionné à 0,75% de caséine. Après incubation de 24 à 36 h à 30°C, la présence d'un halo d'inhibition reflète une activité protéolytique de la caséine présente dans le milieu de culture.

4.2.3. Etude de l'activité lipasique

Une gélose nutritive en boite de Pétri, additionnée de 2% de Tween 80, est ensemencée par spots à partir d'une culture en milieu solide de la souche à étudier. Après incubation de 24 à 48 heures à 30°C, les colonies des souches qui sont lipase (+) sont entourées d'un halo opaque formé suite à la précipitation d'acides gras issus de la lipolyse.

4.2.4. Test de l'antagonisme des isolats bactériens envers les souches bactériennes pathogènes

En vue de détecter l'activité antagoniste des isolats bactériens envers les souches bactériennes pathogènes (Tableau 5), un volume du milieu gélose nutritif est coulé dans des boites de Pétri stériles. Après solidification du milieu, les boites sont ensemencées en surface par la suspension de la souche indicatrice, puis les disques vierge sont imbibés par 50µl de surnageant filtré de la souche productrice, obtenu après centrifugation à 4 000 tours / min pendant 15 min. Les disques sont ensuite déposés sur le milieu de culture, la diffusion des agents antimicrobiens dans le milieu gélosé est améliorée par une incubation des boites à 37°C pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques.

Lors du criblage, le test d'antagonisme est réalisé entre les isolats bactériens pour prévenir toute interaction négative entre les isolats d'intérêt biotechnologique après inoculation.

Tableau 4. Souches pathogènes utilisées dans les tests d'antagonisme.

Les souches pathogènes	Référence
E. coli	ATCC 25922
S. tyhi	ATCC 560
P. aeruginosa	ATCC 4114
S. aureus	Souche de laboratoire
B. cereus	ATCC 14759

4.2.5. La Détection de la production des métabolites secondaires par les isolats bactériens : les sidérophores

Le mot sidérophore, issu du grec, signifie sidêros : fer et phore : porteur. L'utilisation des sidérophores représente chez les bactéries l'un des systèmes les plus efficaces pour l'acquisition du fer. Les sidérophores sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, compris entre 200 et 2000 daltons, dont le rôle est de solubiliser, de chélater et d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes (Neilands 1995).

Pour évaluer la production de siderophores chez les différents isolats bactériens, nous avons disposé d'une culture bactrienne sur milieu LB liquide (48 à 72h). Après centrifugation à 5000 tours/min pendant 20 min, un volume de 1mL de surnagent est prélevé, auquel un volume de 1,5mL d'une solution de $FeCl_3$ à 2% est ajouté. Une réaction instantanée aura lieu avec une coloration rouge brique indique la présence des siderophores. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre pour une densité optique (DO) égale à 495 nm (Sujatha N. 2013).

4.2.6. Etude de la mobilité des isolats bactériens

Les différents types de mobilité (*swimming*, *swarming* et *twitching*) sont déterminés selon la méthode décrite par Reimmann et al. (2002).

Tableau 6.Les différents types de mobilités bactériennes testées pour les souches de *Pseudomonas*

Type de mobilité testée	% d'agar (Wat/vol)	Milieu de culture	Exploitation d'une fonctionnalité
Swimming	0,3	LB	Flagelle polaire
Swarming	0,5	BN (8g/L)+glucose (5g/L)	Flagelle polaire et pili type IV
Twitching	1	LB agar	Pili type IV

4.2.7. Étude de la formation de biofilm

La production du biofilm a été testée par la méthode décrite par O'Toole (1998). Cette méthode se base sur l'utilisation des microplaques et la coloration par le cristal violet. Un volume de 200µL de la culture bactérienne de 18h est placé dans des puits de microplaque. Après 16 h d'incubation à 30°C, 25 µL du crystal violet (1%) est additionné à chaque puits. Après 15mn de repos, les puits sont lavés avec de l'eau distillée stérile. Le biofilm ainsi formé au fond des puits est alors décroché pour une quantification ultérieure. La démobilisation du biofilm se fait à l'aide d'une solution éthanol à 95% (200 µL). Le mélange éthanol/ bactérie est transféré dans un tube eppendorf de 1,5 mL où nous ajoutons un volume de 800 µL d'éthanol (95%) pour avoir une suspension bactérienne de 1mL. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre pour une densité optique (DO) égale à 600 nm. La formation du biofilm (cinétique de la production du biofilm) est déterminée par l'augmentation de la DO_{600} par rapport au témoin négatif (le milieu LB sans culture bactérienne).

4.3. Etude de la souche bactérienne d'intérêt

4.3.1. Suivi de la croissance

Afin de déterminer la cinétique de croissance de la souche sélectionnée, cette dernière a été cultivée dans différentes conditions : en utilisant le bouillon nutritif, comme un milieu de culture et en variant la température (5°C, 20°C et 30°C), puis en gardant la température stable à 30°C et en testant 3 milieux nutritifs (eau physiologique, eau usée autoclavée et bouillon nutritif). L'étude de la croissance bactérienne a servi pour dégager les paramètres spécifiques de la croissance à savoir la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}), le temps de latence (λ_t) et le temps de génération (t_G).

4.3.2. Extraction d'ADN, amplification par PCR et séquençage de l'ADN 16S.

L'extraction et la purification de l'ADN à partir des cultures de la souche bactérienne d'intérêt a été réalisée à l'aide d'un réactif commercialisé v-DNA reagent (GenIUL). La concentration de l'ADN est mesurée à 260nm et sa purification est estimée par le rapport abs260/abs280.

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S a été réalisée en utilisant les amorces universelles suivantes : 27F (5'-TAC GGY TAC CTT GTT AYG ACT T-3') et 1492Rmod (5'-AGR GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') dans un volume réactionnel de 25µL contenant 2µL de l'échantillon ADN, 0,5 µL de chaque désoxynucléotide triphosphate (dNTP) à une concentration de 10 µM, 0,75 µL de $MgCl_2$ 1.5 mM, 0,5 µL de chaque amorce (10 µM), 0,125 µL de Taq polymérase (Invitrogen), 2,5 µL de tampon PCR buffer (Invitrogen, Paisley, UK) et de l'eau milli-Q ajouté pour ajuster le volume. Les amplifications ont été réalisées avec un thermocycleur Biorad en se basant sur le programme suivant: une dénaturation initiale de 5min à 94ºC, suivi par 30 cycles de 1 min à 94ºC, 1 min à 55 ºC et 2 min à 72 ºC, et une élongation finale de 10 min à 72ºC (Altschul et al. 1997).

Les produits PCR ont été vérifiés et visualisés à l'aide de l'électrophorèse sur gel d'agarose en une utilisant un marquer de masse Invitrogen. La purification et le séquençage (Shot Sanger sequencing) du gène codant pour l'ARNr 16S ont été réalisés selon Genoscreen (Lille, France) à l'aide des amorces 27F and 1492Rmod dans un séquenceur ABI3730XL. Les séquences ont été comparées à la banque de séquences GenBank DNA avec BLAST.

4.3.3. Détection des gènes impliqués dans la dénitrification.

La PCR-en temps réel est une méthode basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent (SYBR Green) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générée pendant la réaction de PCR.

Après une étape d'étalonnage de la PCR quantitative en temps réel qui sera décrite dans la partie qui suit, la présence des gènes impliqués dans la dénitrification *nirS* et *nosZ* a été testée chez la souche bactérienne sélectionnée en utilisant les amorces nirS2F/ nirS3R et nosZF/nosZR respectivement. Les réactions ont été réalisées dans un Light Cycler 1.5 (Roche-Applied) en utilisant Eva Green (5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Mix Plus/Solis BioDyne, Estonia) comme marqueur fluorescent selon les instructions du fabricant. La réaction a été réalisée dans un volume de 20µL de mélange qui contient 4µL Eva Green Mix, 0,3µL de chaque amorce, 5µL d'ADN. Les cycles thermiques ont été comme suit : une activation initiale de 15min à 95°C, 45 cycles : 30s à 95°C, de 1min à la température de fusion (Tm), de 20s à 72°C (Chon et al. 2011)**.**

4.4. Application de l'inoculum bactérien

4.4.1. Suivi de l''élimination des nitrates

Pour mettre en évidence l'efficacité et la rentabilité de l'étape de l'addition (injection) de(s) bactérie(s), la cinétique d'élimination des nitrates par les filtres plantés a été suivie. L'effluent à traiter a consisté en une solution synthétique d'eau physiologique contaminée par une concentration connue des nitrates. L'optimisation de l'expérience a été basée sur la réalisation des bioessais *in vitro*. En effet, la bactérie sélectionnée a été mise dans une solution d'eau physiologique. Après 18 heures d'adaptation, une concentration bien déterminée des nitrates est déversée dans la solution (9 et 90 mg/L de KNO_3). L'activité dénitrifiante de la bactérie sélectionnée au cours du temps est ainsi suivie.

L'expérience *in situ* (sur le filtre) a été réalisée comme suit : au début, l'inoculum contenant la souche bactérienne d'intérêt (10^8 UFC/mL) est injecté, directement et une seule fois, au sein de la rhizosphère du filtre. Après un temps d'adaptation, l'alimentation en eau riche en nitrates est effectuée. Après, le filtre est alimenté par un effluent réel d'eau usée domestique riche en nitrates. La concentration en nitrates est mesurée par chromatographie ionique (Metrohm 944). Le tableau suivant résume les différents essais réalisés sur le système expérimental.

Tableau 7. Les différents essais réalisés sur le prototype expérimental

Essais	**1**	**2**	**3**	**4**	**6**
Eau	synthétique 8,75mg/L de KNO_3	synthétique 12mg/L de KNO_3	synthétique 8,75mg/L de KNO_3	synthétique 90 mg/L de KNO_3	Eau usée domestique

4.4.2. Suivi de l'inactivation d'une bactérie pathogène : *S. typhi*

En se basant sur le pouvoir antagoniste de la souche sélectionnée, l'inoculum bactérien (10^8 UFC/mL) a été préparé et injecté dans la partie rhizosphérique du filtre test « F ». L'inactivation de la bactérie pathogène par le système expérimental au cours du temps a été suivie après une seule injection et après des injections séquentielles de la souche d'intérêt en se référant à sa cinétique de croissance préalablement établie.

Un volume d'eau contaminé artificiellement par la souche bactérienne pathogène *S. typhi* (10^6 UFC/mL) a servi pour l'alimentation des deux filtres témoin et test. Le nombre des bactéries après traitement et durant un intervalle du temps bien déterminé (chaque demi-heure) est estimé par dénombrement sur milieu sélectif solide : Milieu SS. La cinétique d'abattement des bactéries pathogènes est ainsi déterminée.

En se référant à la cinétique de croissance de la souche bactérienne d'intérêt, trois injections séquentielles de l'inoculum bactérien dans la rhizosphère du filtre test ont été réalisées. Le système expérimental a été alimenté par la solution d'eau contaminée par les bactéries pathogènes une seule fois au début de l'expérience. La même démarche expérimentale a été suivie pour établir la cinétique d'abattement des bactéries pathogènes.

4.5. L'application des bactériophages pour l'inactivation des bactéries pathogènes.

Dans cette partie, l'élimination des bactéries pathogènes a été basée sur l'application d'un phage spécifique préalablement sélectionné au sein de la rhizosphère d'un filtre planté de macrophytes. La stratégie consiste à : **(i)** La sélection du phage spécifique pour la bactérie *Salmonella typhi* (*S. typhi*). **(ii)** La détermination de la cinétique d'abattement bactérien au niveau du filtre planté de macrophytes avec et sans bio-inoculation. **(iii)** L'exploitation de la qualité de l'eau traitée en se basant sur l'interaction phage/cellule hôte.

4.5.1. Présentation et sélection du Matériel biologique

La souche pathogène choisie pour cette étude est *S. typhi* ATCC 560. Ce choix a été effectué en se basant sur les caractères de virulence et de pathogénicité de cette souche. Le milieu de culture utilisé pour la purification et le repiquage de la souche indicatrice, est la gélose Salmonella-Shigella (SS agar).

4.5.2. Isolement, purification des phages à partir des eaux usées

Pour l'isolement des phages spécifiques, un échantillon d'eau usée a été centrifugé (5000 rpm/ 5 min). Un volume de 20 mL de la suspension a été filtré à l'aide d'un filtre de 0,22 µm de diamètre et dilué de 10 en 10 dans une solution saline de $CaCl_2$ (1 mM). Un volume de 100µL du filtrat de chaque dilution a été additionné à 100 µL de la suspension bactérienne

(cellule hôte) et étalé dans le milieu de culture (LBA). Après 24 h d'incubation à 37°C, des plages de lyse seront observées. Ces zones de destruction bactérienne sont ensuite transférées dans 20 mL d'une culture bactérienne jeune. Après incubation pendant 24 h à 37°C, le mix a été filtré une deuxième fois. Ensuite, le volume du lysat phagique purifié a été subdivisé en deux aliquotes, dont l'une est stockée à -20°C.

4.5.3. Détermination du titre phagique

La souche sensible (*S.typhi*) a été ensemencée en nappe sur la gélose nutritive. Les dilutions de la suspension phagique ont été déposées sous forme de spots (5 à 10µL) sur la gélose. Après incubation, la cellule hôte va libérer des virions infectieux dans le milieu extérieur. Par suite, ces particules infectieuses vont infecter à leur tour les bactéries voisines. Progressivement, il se produit une destruction locale des bactéries produisant une zone claire sur un fond de croissance bactérienne uniforme. Cette zone de lyse ou destruction bactérienne est appelée plage de lyse. La plage de lyse correspond à la présence initiale d'une particule virale infectieuse. Le dénombrement des plages de lyses permet ainsi, la détermination du titre viral. Le titre phagique est déterminé par la formule suivante :

Titre phagique (PFU/mL)= Nombre des plages de lyse * l'inverse de la dilution

4.5.4. Propagation des phages et screening des phages spécifiques pour *S. typhi*

Pour déterminer le spectre d'infection ou le spectre de propagation de chaque isolat phagique, nous avons testé la sensibilité des phages isolés à partir des eaux usées vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes de référence comme *E. coli* ATCC 25922, *Ps. aeruginosa* ATCC 15442 et *S. typhi* ATCC 560. Ainsi, quatre dilutions successives de 10^{-1} à 10^{-4} ont été réalisées à partir des lysats phagiques purifiés. Un volume de 100 µL de chaque dilution est mis en contact avec la cellule hôte respective. La présence de plages de lyse après un temps d'incubation montre la susceptibilité de la souche bactérienne testée au phage correspondant.

4.5.5. Suivi de l'inactivation *S. typhi*

Un volume d'eau est contaminé artificiellement par la souche bactérienne pathogène *S. typhi* (10^3 UFC/mL). Cette eau a servi pour l'alimentation des deux filtres témoin et test dans lequel le bactériophage d'intérêt est injecté auparavant. Le nombre des bactéries après traitement et durant un intervalle du temps bien déterminé est estimé par dénombrement sur milieu sélectif solide : Milieu SS. La cinétique d'abattement bactérien au niveau des deux filtres en fonction du temps de contact phage/cellule hôte, a été suivie.

4.5.6. Détermination du titre phagique

Un volume de 100µL de lysat phagique a été mis en contact avec une concentration bactérienne croissante. Cette expérience a pour intérêt de déterminer le titre des virions infectieux libérés par une concentration connue de bactéries hôtes. Le but de cette expérience c'est d'estimer la concentration des bactéries pathogènes dans l'eau usée traitée en se basant sur l'interaction phage/cellule hôte.

4.6.L'utilisation d'un substrat organique comme matériau de remplissage dans les filtres plantés de macrophytes

L'utilisation du liège comme matériau de remplissage dans les systèmes de traitement des eaux usées par filtres plantés a pour objectif d'améliorer l'abattement des nitrates. Ce travail sur le liège a été développé en collaboration avec l'Université Catalane en Espagne dans le cadre d'un stage de longue durée.

4.6.1. Extraction d'ADN

Les échantillons de liège et de gravier ont été soumis à une sonification pendant 3min pour détacher le biofilm de substrat à l'aide d'un bain à ultrasons (Selecta Group). Le surnagent a été centrifugé à 4 000 tr / min pendant 8 minutes dans une centrifugeuse Medifriger (Selecta Group). L'extraction de l'ADN à partir d'échantillons de biofilm a été réalisée à l'aide du kit DNeasy Power Soil (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. La concentration et la pureté de l'ADN ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop à 260 nm et 280 nm, respectivement. Les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C.

4.6.2. Quantification des gènes *nirS* et *nosZ* par PCR en temps réel

Trois souches bactériennes présentant les gènes étudiés ont été choisies: *Escherichia coli* NCTC 9001, *Pseudomonas aeruginosa* CECT110 et *Ralstonia eutropha* (*Cupriavidus necator* DSM 545 °) (Chon et al. 2011) pour l'étalonnage de la PCR en temps réel . Les bactéries ont été cultivées dans du milieu TSB à 37°C. L'ADN a été extrait d'une culture de chaque souche à l'aide du réactif ADN-v (GenIUL). Les absorbances de l'ADN à 260 et 280 nm ont été mesurées par un spectrophotomètre afin de déterminer la concentration en ADN de chaque échantillon ainsi que vérifier la pureté de l'ADN. Afin d'amplifier le gène d'intérêt une PCR a été réalisée dans un thermocycleur (BIO-RAD) avec un mélange réactionnel de 20µL renfermant : 10X tampon PCR (2µL), $MgCl_2$ 25mM (2µL), dNTPs 8Mm (2µL), 1µL de chaque

amorce, 0,2µL Taq polymérase Horse-PowerTM Taq (Canvax Biotech, S.L.), 30ng d'ADN et le volume est ajusté par de l'eau milli-Q jusqu'au 20µL. La réaction a été réalisée comme suit : 94°C 5:00, 29 cycles de 30 secondes à 95°C, de 30 secondes à la température de fusion de l'amorce Tm, et d'une minute à 72°C, enfin une dernière étape de 10min à 72°C.

La PCR a été suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose du produit de la PCR. La concentration en agarose était de 2%, l'électrophorèse a été réalisée à 90V pendant 1 heure. Le gel a été coloré au bromure d'éthidium pendant une demi-heure et la bande d'amplicon a été visualisée à l'aide d'un trans-illuminateur à UV (BIO-RAD), coupée et purifiée à l'aide du kit de purification Illustra GFX PCR DNA and Gel Band (GE Healthcare).Enfin, l'absorbance à 260 nm a été mesurée à nouveau, cette fois-ci uniquement de l'amplicon et donc uniquement du gène étudié. Le nombre de copies de l'amplicon obtenu après une PCR conventionnelle a été calculé d'après la formule suivante :

$$Copies\ \left[\frac{molec}{\mu L}\right] = \frac{Concentration\ [ng] \times 6{,}02 \cdot 10^{23}}{(Amplicon\ lenght \times 660 g/mol) \times 10^{9} ng/g}$$

Pour l'étalonnage de la PCR en temps réel, une série de dilutions (10^{10} à 101) a été réalisée pour chaque échantillon. Les réactions PCR en temps réel ont été réalisées afin de quantifier les gènes fonctionnels clés *nirS* et *nosZ* à l'aide d'amorces : *nirS*2F / *nirS*3R et *nosZ*F / *nosZ*R, respectivement (Tableau 8). Les réactions ont été effectuées dans un Light Cycler 1.5 (Roche-Applied) selon les instructions du fabricant en utilisant une détection basée sur Eva Green (5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Mix Plus / Solis BioDyne, Estonie). Le volume final de la réaction était de 20 µL contenant 0,3 µL de chaque amorce, 4 µL du mélange HOT FIREPol® EvaGreen® et 5 µL de matrice d'ADN, le reste étant de l'eau milli-Q. Le programme de la réaction était le suivant : 95°C pendant 12 minutes, puis 45 cycles à 95 ° C pendant 15 secondes, la Tm pendant 20 secondes, 72 ° C pendant 20 secondes et une dernière étape à 85°C pendant 15 secondes. Toutes les réactions ont été terminées avec une courbe de fusion et une étape finale à 40 ° C pendant 20 secondes.

Tableau 5. Amorces utilisées pour la quantification des gènes

Gene	Forward primer	Reverse primer	Tm	Amplicon length	References
ARNr 16S	ATG GCT GTC GTC AGC T	ACG GGC GGT GTG TAC	52°C	352 bp	(Chon et al., 2011)
nirS	TAC CAC CCS GAR CCG CGC GT	GCC GCC GTC RTG VAG GAA	64°C	164 bp	(Chon et al., 2011)
nosZ	AGA ACG ACC AGC TGA TCG ACA	TCC ATG GTG ACG CCG TGG TTG	63°C	474 bp	(Scala & Kerkhof, 1998)

4.7. Amélioration de la dénitrification par nanobiostimulation

L'objectif de cette partie de notre étude est d'améliorer la performance des filtres plantés de macrophytes par l'utilisation d'un substrat naturel et de la bioinoculation. Ainsi nous avons exploité la possibilité de stimuler les gènes impliqués dans la dénitrification par la nanotechnologie. Nous avons effectué une biostimulation des souches d'intérêt avant bioinoculation.

4.7.1. Caractérisation des matériaux de remplissage

La composition des matériaux de remplissage utilisés dans les filtres (gravier et liège) a été vérifiée à l'aide de la Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR). Avant l'analyse FTIR, l'échantillon a été dispersé en poudre et mélangé avec le KBr (Bromure de Potassium), le tout comprimé dans une presse pour former une pastille translucide aisément manipulable et au travers de laquelle un faisceau de spectromètre peut passer.

De plus, la susceptibilité de liège et de gravier à supporter le biofilm microbien a été testée. Pour ce faire, 30g de chaque substrat ont été émergés dans un volume de 500 mL d'eau physiologique et inoculés par la souche PFH1 (1mL). Après une semaine d'incubation à la température ambiante, le biofilm formé sur les deux substrats a été détaché par sonication (sonicateur Elmasonic) pendant 3min et l'absorbance a été mesurée avec spectrophotomètre UV-Vis à 600nm. **(**PerkinElmer UV/VIS spectromètre Lambda 25). En outre, la masse de biofilm formé par particule (liège et gravier) a été estimée.

4.7.2. Cinétique d'abattement des nitrates

La bactérie d'intérêt (PFH1) a été injectée, directement au sein de la rhizosphère des deux filtres inoculés (liège et gravier). Après un temps d'adaptation de (24 h), l'alimentation en eau riche en nitrates a été effectuée (à une concentration de 90 mg/L). Toutes les 30 minutes, un échantillon de 10 mL a été prélevé des quatre prototypes (témoins et inoculés), puis filtré par une pompe sous-vide. Le suivi de la concentration en nitrates a été effectué à l'aide de la chromatographie ionique. La comparaison pourra être faite sur trois niveaux : entre gravier inoculé et non inoculé (témoin), entre liège inoculé et non inoculé (témoin) et entre gravier inoculé et liège inoculé.

4.7.3. Mesure de l'effet du TiO_2 sur la dénitrification

Pour évaluer l'effet de TiO_2 sur l'activité dénitrifiante des isolats bactériens, La souche PFH1 a été mise en contact avec le TiO_2 à des concentrations croissantes allant de 0 mg/L à 50 mg/L en présence des nitrates (2% de KNO_3), en anaérobiose et en obscurité pour empêcher l'interférence de l'effet photocatalytique. Après une incubation de 7 jours à 30°C, la quantité

des nitrates restante a été mesurée par chromatographie anionique. La mesure des nitrates résiduaires va nous renseigner sur la concentration optimale de nanoparticule nécessaire pour induire l'assimilation des nitrates par la bactérie et par suite d'optimiser le pouvoir épuratoire concernant la dénitrification.

4.7.4. Cinétique d'abattement des nitrates en présence du TiO_2

La bactérie d'intérêt (PFH1) préalablement adaptée avec le TiO_2 a été injectée directement au sein de la rhizosphère des deux filtres inoculés (liège et gravier). Après un temps d'adaptation, Le système a été alimenté par 90mg/L des nitrates. Toutes les 30 minutes, un échantillon de 10 mL a été prélevé des deux prototypes (inoculés), puis filtré par une pompe sous-vide. Le suivi de la concentration en nitrates a été effectué à l'aide de la chromatographie ionique.

5. Les outils d'interprétation

5.1. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Minitab® 18. Avant de poursuivre les analyses, les données originales sur l'abondance des trois gènes étaient transformées en logarithme ; il a donc été rapproché d'une distribution normale nécessaire pour appliquer un test paramétrique. Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée pour comparer l'élimination des nitrates et le nombre de copies de gènes entre les deux substrats utilisés (liège ou gravier). Des tests de Student ont été effectués pour comparer les moyennes des variables par rapport au substrat. De l'autre côté, un coefficient de corrélation de Pearson a été appliqué pour comparer et définir s'il existait une corrélation entre la variable % de retrait par rapport au nombre de copies de gènes.

5.2.Modèles mathématiques utilisés

Des modèles mathématiques ont été appliqués pour interpréter les cinétiques d'abattement des nitrates et des bactéries pathogènes.

5.3. Modèle de Chick-Watson

En 1908, Chick a mis l'accent sur l'étroite similarité entre la vitesse d'inactivation des microorganismes par désinfection et les cinétiques chimiques. La désinfection est assimilée à une réaction chimique biomoléculaire où les réactants sont le produit désinfectant et les

microorganismes. Il suppose qu'elle peut être décrite par une cinétique du premier ordre comme beaucoup de réactions chimiques (Shayeb et al., 1998 ; Lambert and Johnston 2000)

$$\frac{dN}{dt} = -kN$$

Avec : N : Le nombre de microorganismes ;

t : Le temps de contact ;

k : Le coefficient de désinfection.

5.4.Modèle de series-events

Le modèle cinétique de series-events ou d'événement en série a été proposé par (Severin et al. (1984). La cinétique d'inactivation des microorganismes est supposée comme étant une série d'évènements, où chaque événement est caractérisée par une cinétique de premier ordre. Chaque niveau de dénitrification *Di* a une cinétique constante *Ki* et n est le niveau seuil d'inactivation.

$$\boldsymbol{M_0 \overset{k_1}{\rightarrow} M_1 \overset{K_2}{\rightarrow} M_2 \overset{K_3}{\rightarrow} M_i \ldots M_{n-1} \overset{K_n}{\rightarrow} M_n}$$

L'expression généralisée du modèle series-events est :

$$\frac{\boldsymbol{N_t}}{\boldsymbol{N_0}} = \mathbf{exp}(-\boldsymbol{K} \times \mathbf{C\ t}) \sum_{\boldsymbol{i=0}}^{\boldsymbol{n-1}} \frac{(\boldsymbol{KCt})^{\boldsymbol{i}}}{\boldsymbol{i}!}$$

Avec : N : Le nombre de microorganismes ;

t : Le temps de contact ;

k : Constante cinétique.

5.5.Modélisation de l'interaction phage-bactérie

L'interaction phage-hôte a été étudiée mathématiquement par de nombreux chercheurs, et des caractéristiques intéressantes sont encore en discussion.

Dans notre étude, la modélisation de la croissance des phages spécifiques en relation avec les cellules hôtes en carence nutritive a été déterminée selon le modèle utilisé par Mudgal et al. (2006) avec modifications. Ce modèle est appliqué à une concentration de bactéries privées de nourriture supérieure à 10^2 UFC / mL.

$$\frac{\boldsymbol{PN}}{\boldsymbol{P0}} = \boldsymbol{M\ exp}(-\boldsymbol{rN})$$

Où ; P_0: le titre initial du phage PA; P_N: Titres du phage PA après 2 heure d'incubation à 37 °C en présence de *N*: concentration de bactérie hôte permissive; *M*: les cellules hôtes actives non encore lysées; *r*: le taux d'infectiosité du phage.

Chapitre 3

Résultats et discussion

Partie I

Bioinoculation des bactéries d'intérêt au niveau rhizosphérique d'un filtre planté de macrophytes afin d'améliorer l'abattement des nitrates

1. Introduction

Après un diagnostic général de la station d'épuration des eaux usées par filtres plantés de macrophytes (TDC) située à El Menzah, une défaillance épuratoire au niveau de processus de dénitrification dans le filtre à écoulement horizontal a été notée. A partir de ces données analytiques, une étape d'optimisation et d'amélioration s'est avérée nécessaire pour optimiser le rendement de la station sur l'élimination des nitrates. La stratégie a consisté en la bio-augmentation des souches bactériennes d'intérêt (dénitrifiantes).

La bio-augmentation ou bioinoculation est utilisée dans l'agriculture depuis de nombreuses années. L'inoculation de légumineuses avec *Rhizobium* spp. remonte aux années 1800. Des tentatives ont également été faites pour utiliser la bio-augmentation avec des bactéries fixatrices d'azote autonomes ou associées à des plantes telles que '*Azotobacter'* ou *Azospirillum* spp. pour augmenter le rendement des plantes. D'autres applications agricoles de la bio-augmentation comprennent l'inoculation de semences de plantes avec des micro-organismes favorisant la croissance des plantes ou avec des micro-organismes protecteurs des plantes antagonistes des agents phytopathogènes. Plus récemment, la bio-augmentation a été appliquée pour pallier aux nombreux problèmes environnementaux (Gentry et al., 2008). Cette méthode est parmi les nouvelles méthodes requises pour améliorer la performance des systèmes de traitement des eaux usées par filtres plantés de macrophytes. La combinaison de la phytoremédiation et de la bioaugmentation a donné naissance à une nouvelle technologie qui est la rhizoremédiation (Kuiper et al., 2004).

Les microorganismes sélectionnés pour l'inoculation doivent être « robustes » pour qu'ils puissent résister aux conditions environnementales parfois difficiles et limitantes, tels que le pH, la compétition avec les microorganismes autochtones et la microfaune, la température, l'humidité, les flux de gaz, la proximité et la disponibilité des nutriments. Pour faciliter la survie et la colonisation des microorganismes inoculés, la bio-augmentation directe de la rhizosphère est l'une des stratégies de la bio-augmentation la plus étudiée (Gentry et al., 2008).

Dans cette étude, la sélection des bactéries d'intérêt a été basée sur une étude de criblage des souches bactériennes isolées et identifiées à l'aide des tests biochimiques. Des bio-essais ont été réalisés au laboratoire pour le monitoring des activités dénitrifiantes et antagonistes des bactéries sélectionnées. L'application a été menée sur les prototypes des filtres plantés de

macrophytes à écoulement horizontal et les différents résultats obtenus sont détaillés dans ce chapitre.

2. Résultats

2.1. Identification des souches

Après une étape d'échantillonnage, d'isolement et de purification, 19 souches bactériennes ont été isolées, et sont présentées dans le Tableau 8.

Tableau 6. Les isolats bactériens et leurs origines

Isolats	Origine	Echantillon	Site d'échantillonnage
PFS	Fosse septique	Eau	Centre de Démonstration Technique (**TDC)**
PEV	Entrée de filtre à écoulement vertical	Eau	
PEH	Entrée de filtre à écoulement horizontal	Eau	
PS	Sortie de filtre à écoulement horizontal	Eau	
PRV	Rhizosphère à la sortie du filtre à écoulement vertical	Racines	
PRH	Rhizosphère à la sortie du filtre à écoulement horizontal	Racines	
PFV_1	Plante du filtre à écoulement vertical 1	Feuilles	
PFH_1	Plante du filtre à écoulement horizontal 1	Feuilles	
PREH	Rhizosphère à l'entrée du filtre à écoulement horizontal	Racines	
PRMH	Rhizosphère au milieu de filtre à écoulement horizontal	Racines	
PRSV	Rhizosphère à la sortie du filtre à écoulement vertical	Racines	
PRSH	Rhizosphère à la sortie du filtre à écoulement horizontal	Racines	
PRMV	Rhizosphère au milieu de filtre à écoulement vertical	Racines	
PFH_2	Plante du filtre à écoulement horizontal 2	Feuilles	
PFV_2	Plante du filtre à écoulement vertical 2	Feuilles	
PREV	Rhizosphère à l'entrée du filtre à écoulement vertical	Racines	
PR_1	Rhizosphère 1	Racines	Oued Seltène, Technopôle de Borj Cedria, Soliman
PR_2	Rhizosphère 2	Racines	
PSol	sol	Sol	

Les différentes souches bactériennes se cultivent rapidement sur milieu King B en donnant des colonies rondes, lisses, crème à blanchâtres, de 1 à 2mm de diamètre, avec des

reliefs bombés et une pigmentation jaune-verte fluorescente sous UV (365nm) qui diffuse dans le milieu de culture (figure 19). La présence d'une odeur aromatique de seringat est assez caractéristique chez toutes les souches. Toutes les souches étudiées sont oxydase$^+$ et catalase$^+$. Seulement 8 isolats étaient positifs à la production de la gélatinase : PRV, PFV_1, PR_2, PREH, PRMH, PREV, PFV_2 et PFH_2.

L'observation microscopique a été effectuée au microscope optique, à l'objectif x100, après ajout de quelques gouttes d'huile à immersion sur les différents frottis. L'observation microscopique révèle la présence des bacilles à Gram négatif droits ou légèrement incurvés à bouts arrondis. Les cellules se présentent isolées ou groupées par deux. L'examen microscopique direct des isolats bactériens (état frais), à l'objectif 40, montre que ces souches bactériennes isolées de différents environnements sont des bactéries de forme bacillaire, mobiles et asporulées.

L'isolement, la purification, l'identification macroscopique, microscopique et biochimique des isolats bactériens, constituent une partie d'étude préliminaire suivie d'une étape de *screening* ou de criblage afin d'isoler les souches bactériennes d'intérêt biotechnologique. Cette étape de *screening* a été effectuée en se basant sur d'autres caractéristiques de sélection. À savoir, criblage bactérien en fonction de l'activité dénitrifiante, la mobilité, la production enzymatique (lipase et protéase), la production de biofilm, la production métabolites secondaires (sidérophore) et l'antagoniste envers des bactéries pathogènes.

2.2. Etude de criblage des souches bactériennes dénitrifiantes

2.2.1. Test de dénitrification

Au cours de la dénitrification, les oxydes d'azote sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons, pour la production d'énergie en absence d'oxygène. La dénitrification est composée de quatre réactions par lesquelles les nitrates sont réduits en diazote (N_2), par des métallo-enzymes comme la nitrate réductase, nitrite réductase, oxyde nitrique réductase, et l'oxyde nitreux réductase (Cabello et al., 2004).

Parmi les souches testées, dix ont été révélées comme des bactéries dénitrifiantes (PEV, PEH, PFS, PRV, PFH_1, PR1, PR_2, PRMH, PFH_2 et P_{Sol}). La souche isolée à partir des feuillages du filtre à écoulement horizontal (PFH_1) produit une quantité plus importante d'azote gazeux (N_2) ce qui reflète sa bonne activité dénitrifiante. Pour cela, elle est considérée comme la plus dénitrifiante parmi les isolats testés (figure 20).

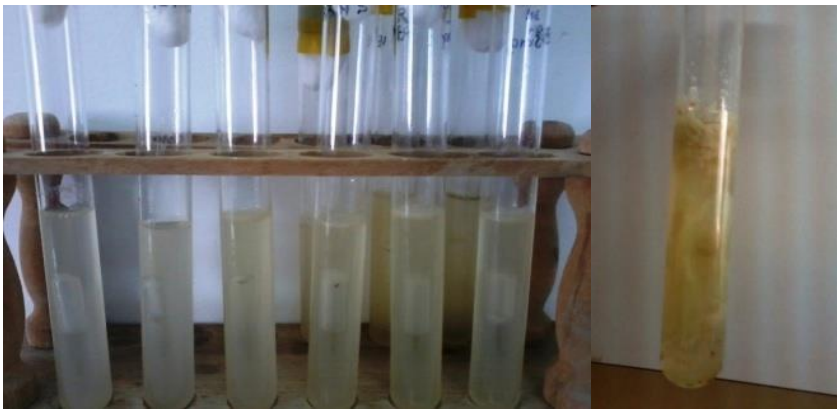


Figure 20. Résultat d'un test de dénitrification réalisé pour les isolats bactériens

À remarquer que lors du criblage, le test d'antagonisme a été réalisé entre les isolats bactériens ayant une activité dénitrifiante pour prévenir toute interaction négative entre les isolats d'intérêt biotechnologique après inoculation au niveau de la rhizosphère. Les résultats du test d'antagonisme intra-isolats sont représentés dans le tableau 7.

Tableau 7. Test de l'antagonisme entre les isolats bactériens

Souches indicatrices	Souches productrices	Résultat du test d'antagonisme
PFH_1	PEH	-
	PEV	+
	PRH	-
	PR1	-
PEH	PFH_1	+
	PEV	+
	PRH	+
	PR_1	+
PRH	PFH_1	-
	PEH	-
	PEV	-
	PR_1	-
PR_1	PFH	-
	PEH	-
	PEV	+
	PRH	-
P_{Sol}	PRMH	-
	PFH_1	+
	PFH_2	+
	PEH	+
	PRH	-
	PR_1	-
PFH_2	PFH1	-
	PEV	+
	P_{Sol}	+
	PRH	+
PFV_2	P_{Sol}	+
	PRMH	+
	PREH	-
	PRSH	+

Légende : (+) : présence d'antagonisme ; (-) : absence d'antagonisme

2.2.2. Étude de la formation de biofilm des isolats bactériens

L'étude de la production de biofilm par les isolats bactériens a été menée afin de cribler les souches bactériennes les plus productives de biofilm. La figure 21 présente les résultats obtenus pour l'étude du biofilm formés par les isolats bactériens. Ces résultats montrent que la majorité des isolats ont l'aptitude à s'agglomérer en film biologique. L'isolat (Psol) isolé à partir du sol, s'est avéré comme la plus productrice de biofilm.

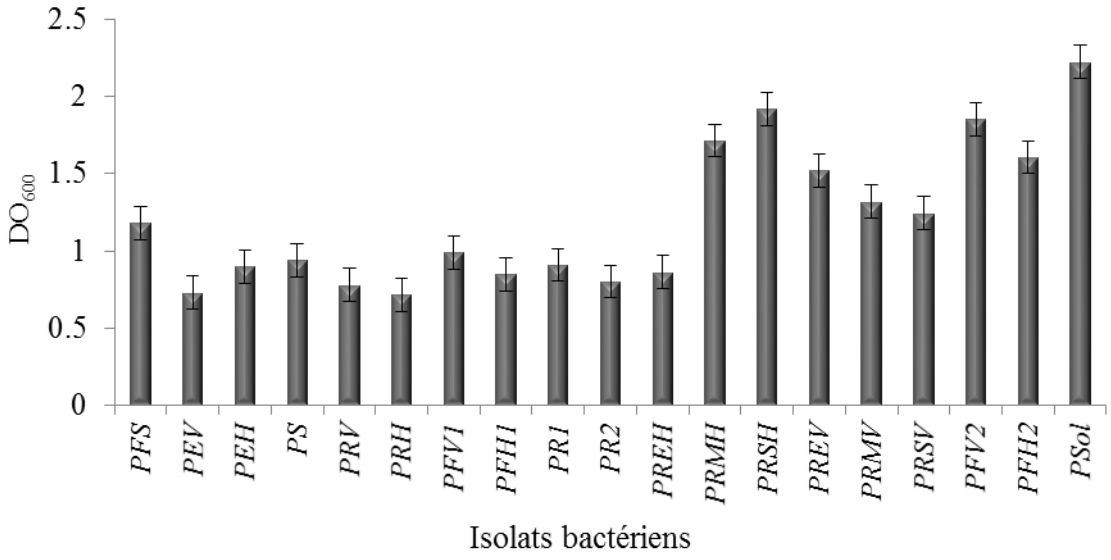


Figure 21. Étude de la production de biofilm des isolats bactériens

L'étude de criblage des 19 souches bactériennes isolées a permis de sélectionner parmi les isolats la souche nommée (PFH_1), isolée à partir des feuillages du filtre planté de macrophytes à écoulement horizontal comme la souche bactérienne la plus dénitrifiante et la plus antagoniste envers les souches pathogènes. Cette souche a été utilisée par la suite pour améliorer le rendement épuratoire d'un filtre planté.

2.3. Caractérisation de la souche bactérienne sélectionnée

2.3.1. Suivi de la croissance de la souche bactérienne d'intérêt

Afin d'optimiser l'expérience et avant de procéder à l'inoculation de la souche bactérienne sélectionnée (PFH_1), sa cinétique de croissance a été étudiée dans différentes conditions (Figure 22). La cinétique de croissance des bactéries est essentiellement formée d'une phase de latence suivie d'une phase exponentielle puis d'une phase stationnaire. Le suivi de la croissance bactérienne a pour but de déterminer les paramètres cinétiques suivants : le temps de latence, la vitesse de multiplication maximale (μmax) et le temps de génération (Tg)

(tableau 8). L'étude de la cinétique de croissance a servi de déterminer les principales caractéristiques de croissance de la souche PFH_1 en particulier le temps de latence (60min). La température optimale de la croissance de PFH_1 est 30°C.

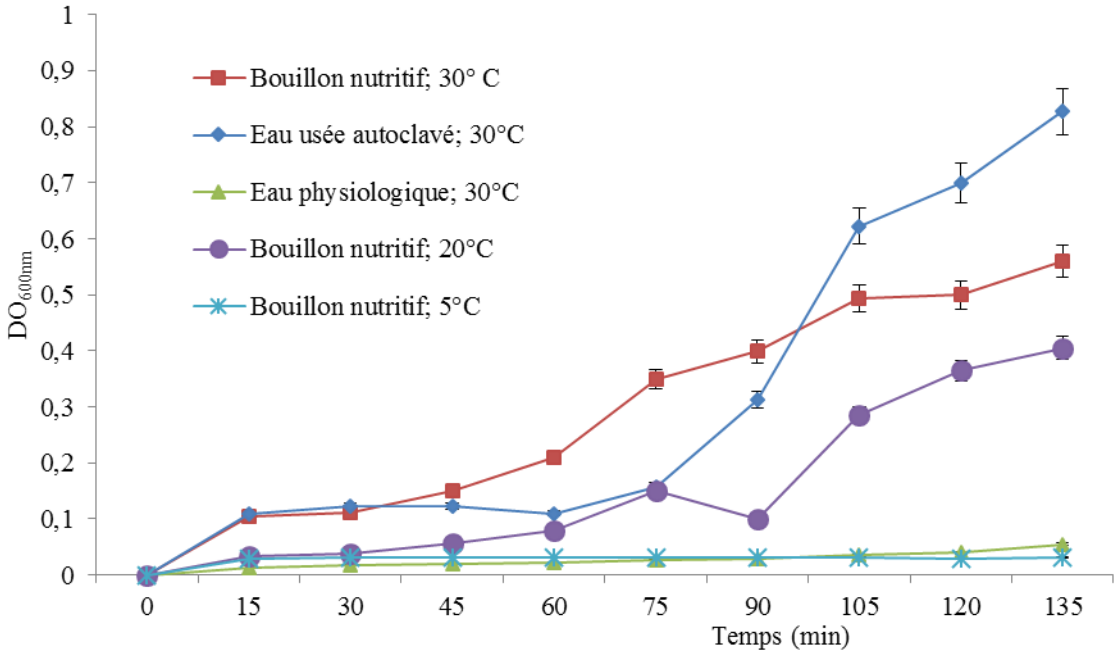


Figure 22. Cinétiques de croissance de la souche PFH_1

Tableau 8. Les paramètres cinétiques de la croissance de la souche PFH_1

	Bouillon nutritif			Eau usée autoclavée à 30°C	Eau physiologique à 30°C
	5°C	20°C	30°C		
Vitesse maximale de croissance (μ_{max}) en min^{-1}	0,01	0,16	0,25	0,31	0,02
Temps de génération T_G (génération/min) $T_G = \ln(2)/\mu_{max}$	69,3	4,33	2,77	2,23	34,65
Temps de latence	-	90	60	60	-

2.3.2. Extraction d'ADN, amplification par PCR et séquençage de l'ADN 16S

L'analyse de la séquence de l'ARNr 16S de la bactérie PFH_1 a révélé une similitude de 99% avec *Enterobacter cloacae*, bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. La souche PFH_1 a été classée dans *Enterobacter* sp. et ses données de séquençage ont été soumises à GenBank NCBI sous le numéro d'accès MG770377. *Enterobacter* est groupé dans un sous-groupe avec *Klebsiella*, avec lequel il est étroitement lié.

Les espèces *d'E. Cloacae* comprennent un groupe extrêmement diversifié de bactéries qui ont été trouvées dans divers environnements, allant des plantes au sol, en passant par l'homme (Liu et al., 2013). Elles ont été signalées comme étant des bactéries importantes du

génie et de la croissance des plantes (Nie et al., 2002). Certaines souches d'*Enterobacter* peuvent jouer un rôle important dans les interactions plante-microbe et donc dans les mécanismes de bio-contrôle (Taghavi et al., 2010). De plus, plusieurs études ont montré la capacité pertinente d'*Enterobacter* Sp. d'éliminer les polluants des eaux usées. A titre d'exemple, Lu et al. (2006) ont montré une bonne capacité d'absorption des métaux et une résistance élevée à divers métaux lourds d'un isolat bactérien local, *Enterobacter* sp. J1.

2.3.3. Détection des gènes impliqués dans la dénitrification par PCR

La détection de deux marqueurs de la dénitrification *nirS* et *nosZ* chez la souche PFH_1 a été effectuée par PCR quantitative en temps réel. En comparaison avec la courbe standard préalablement établie, la présence de la fluorescence a bien montré la présence à la fois des gènes *nirS* et *nosZ* chez la souche étudiée. De plus la mesure de l'intensité de la fluorescence émise par chaque gène a été évaluée en cultivant la bactérie dans des concentrations croissantes des nitrates. La figure 23 présente les spectres d'émission de la fluorescence par les deux gènes à différentes concentrations des nitrates.

La souche étudiée a la capacité de réduire les nitrates en azote gazeux. Cultivée seule dans un milieu nutritif contenant les nitrates, cette souche produit la quantité la plus importante d'azote gazeux par rapport aux autres isolats bactériens (test de dénitrification). La présence de gaz a été bien confirmée par la présence du gène *nosZ* qui code pour l'oxyde nitreux réductase, enzyme intervenante dans la transformation des oxydes nitreux en azote gazeux.

L'intensité de la fluorescence émise varie selon la concentration des nitrates dans le milieu de culture. Ce qui révèle bien la variabilité de la réponse des gènes *NirS* et *nosZ* selon la concentration des nitrates fournie à la bactérie. Pour le gène *NirS*, la fluorescence émise au cours de la réaction est intense pour une concentration de nitrate égale à 14mg/L. Au-delà de cette concentration la réponse de ce gène s'affaiblit. Alors que pour *NosZ*, la fluorescence la plus intense est enregistrée pour une concentration de 16mg/L.

Pour expliquer ce résultat, nous supposons que le gène *NosZ* est plus actif chez la bactérie étudiée que *NirS*. L'augmentation du taux des nitrates dans le milieu constitue un effet stimulateur pour ce gène.

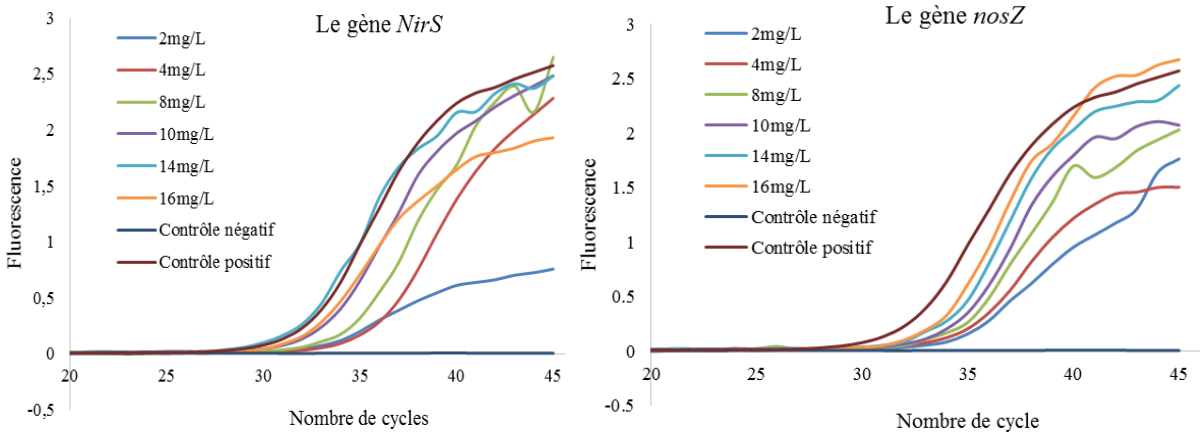


Figure 23. Fluorescence émise par les deux gènes pendant la réaction de la PCR quantitative en temps réel

2.4. Application de la souche d'intérêt pour l'amélioration de la dénitrification

2.4.1. Suivi de l'assimilation des nitrates *in vitro*

Le suivi de la réduction biologique des nitrates *in vitro* par la souche sélectionnée PFH_1 a révélé que les nitrates sont réduits après deux heures pour les deux concentrations en nitrate de 9 et 90 mg/L (figures 24 et 25). En analysant les courbes cinétiques, nous pouvons observer deux cinétiques caractérisant l'élimination des nitrates : (i) une cinétique rapide de la dénitrification maximale (Phase 1). (ii) suivi par une cinétique lente et tend à être constant au cours du temps (Phase 2).

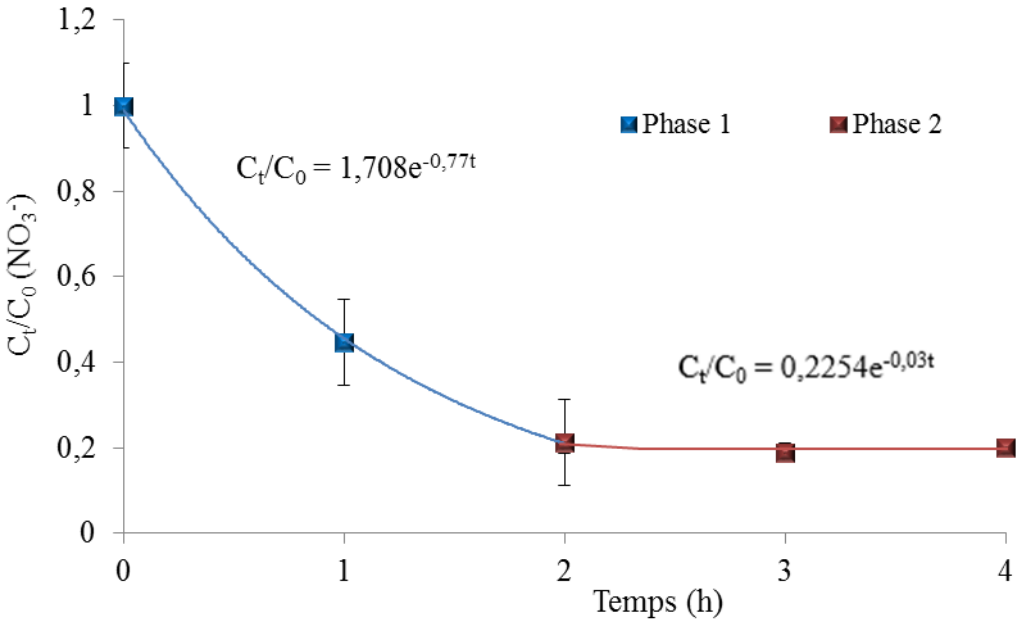


Figure 24. Suivi de l'assimilation des nitrates *in vitro* par l'isolat PFH_1 avec une concentration initiale de nitrate $[NO_3^-]_{initiale}$ égale à 9mg/l

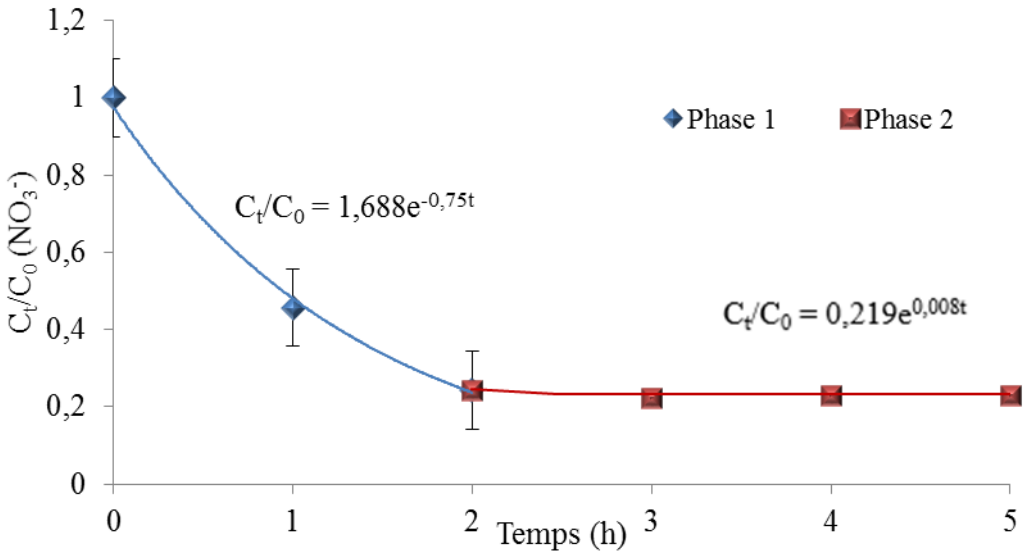


Figure 25. Suivi de l'assimilation des nitrates *in vitro* par l'isolat PFH_1 avec une concentration initiale de nitrate $[NO_3^-]_{initiale}$ égale à 90mg/L

Cette cinétique de dénitrification *in vitro*, s'avère en parfait accord avec le modèle de ChicK-Watson (CW) modifié :

$$\boldsymbol{C/C_o = A \exp(-k^n t)}$$

Avec : ***C*** : la concentration de nitrate à un temps t, exprimé en mg/L ;

$\boldsymbol{C_0}$: la concentration de nitrate à un temps zéro, exprimé en mg/L ;

A : le taux de dénitrification à un intervalle de temps déterminé ;

k : coefficient de dénitrification ;

t : le temps exprimé (h)

n : le facteur de dilution supposé égale à 1 pour le modèle de premier ordre de Chick Watson (CW).

Nous constatons que la première phase de contact de la bactérie dénitrifiante avec une concentration $[\mathbf{x}]_{mg/L}$ de nitrate est la plus importante et la plus efficace. En effet le pouvoir dénitrifiant de l'isolat (PFH_1) est traduit par la constante cinétique (***k***). Le coefficient (***k***) représente la pente de la courbe de régression linéaire.

La première phase de l'assimilation de nitrate est caractérisée par un coefficient de dénitrification plus important que celui déterminé au cours de la deuxième phase. D'après les résultats récapitulés dans le tableau 9, le taux de dénitrification déterminé au cours de la première phase (*A*) est plus important que celui déterminé au cours de la deuxième phase de dénitrification. Les valeurs de la constante (*A*) pour les deux concentrations en nitrates 9 et 90mg/L au cours de la première phase sont respectivement 1,708 et 1,688 alors que pour la

deuxième phase, ses valeurs chutent à des valeurs beaucoup plus faibles : 0,225 et 0,219, respectivement. Par la suite le pourcentage d'assimilation de nitrate *in vitro* est environ égal à 80% pour les deux concentrations initiales de nitrate.

Tableau 9. Détermination des constantes de dénitrification *in vitro* de l'isolat de PFH_1

$[NO_3^-]$ mg/L	*K*		*A*	
	k_1	k_2	A_1	A_2
9	0,77	0,03	1,708	0,225
90	0,75	0,008	1,688	0,219

Légende : *A* : le taux de dénitrification à un intervalle de temps déterminé (A_1 et A_2 : les taux de dénitrification respectifs de la première et la deuxième phase) ;***k*** : coefficient de dénitrification (k_1 et k_2 : les coefficients de dénitrification respectifs de la première et la deuxième phase de dénitrification).

2.4.2. Suivi de l'assimilation des nitrates *in situ*

L'évolution de l'assimilation des nitrates à partir d'une concentration initiale de 90 et 12 mg/L représentée par les figures 26 et 27, respectivement, suivent la même allure. En effet, nous distinguons deux phases d'assimilation : (i) La première phase est la phase la plus rapide et la plus efficace où nous pouvons observer une dénitrification rapide ; (ii) La deuxième phase est la phase lente, qui est caractérisée par une vitesse de dénitrification lente et tend à être constant au cours du temps contrairement à la première phase.

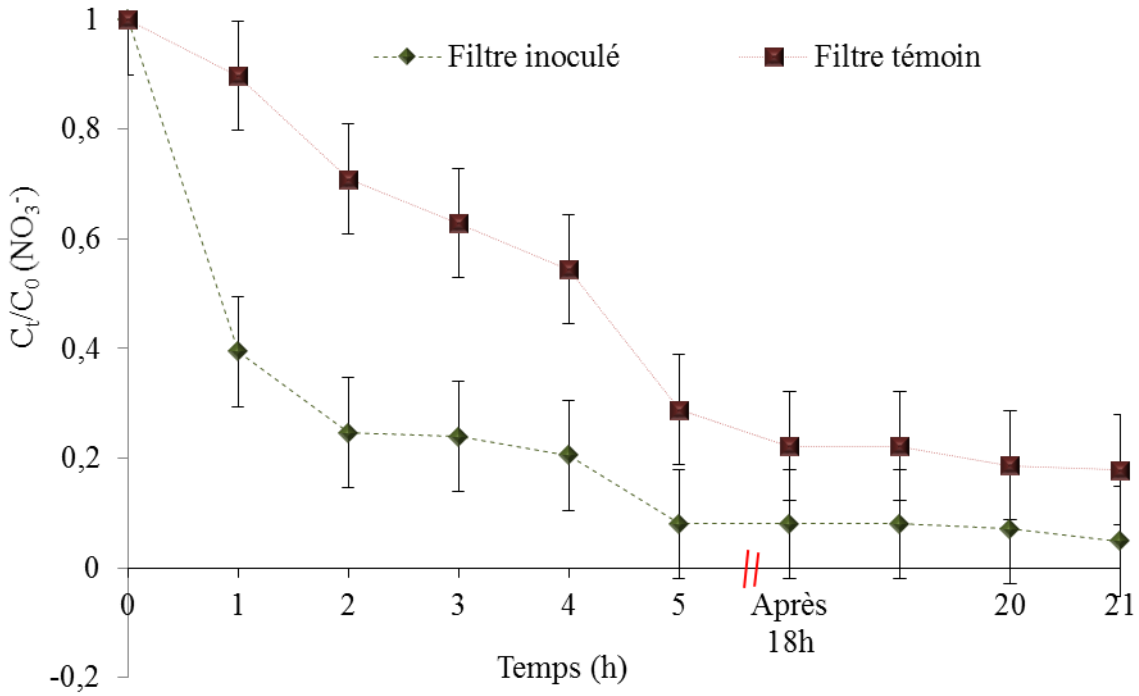


Figure 26. Suivi de l'assimilation des nitrates *in situ* par l'isolat PFH_1 avec, une concentration initiale de nitrate $[NO_3^-]_{initiale}$ égale à 90mg/L

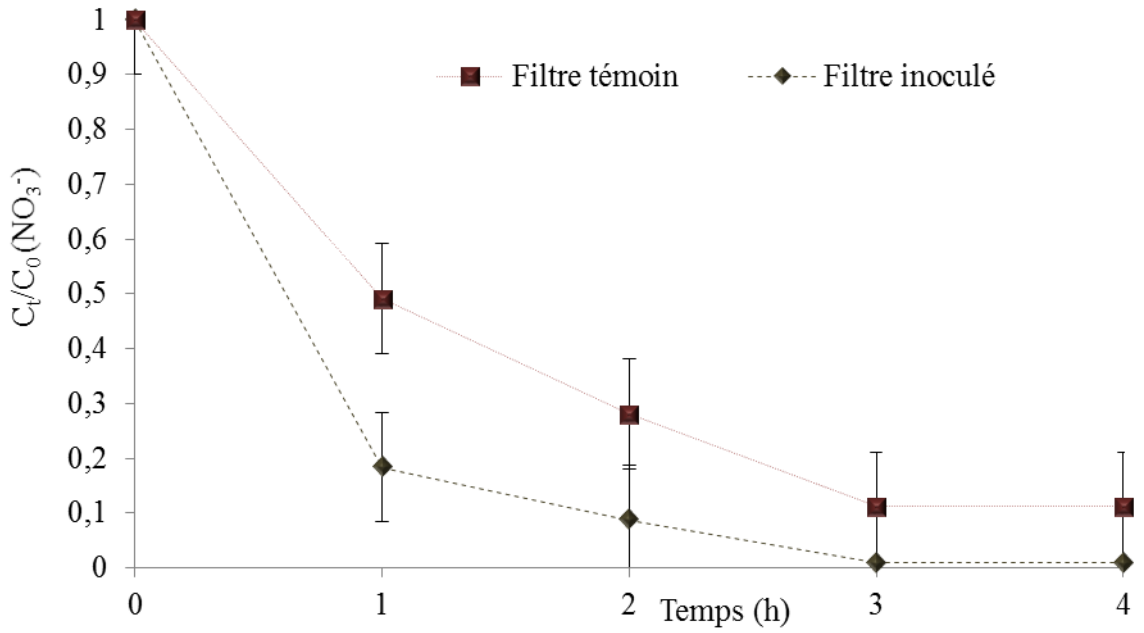


Figure 27. Suivi de l'assimilation des nitrates *in situ* par l'isolat PFH_1 avec une concentration initiale de nitrate $[NO_3^-]_{initiale}$ égale à 12mg/L

De plus, la cinétique de la réduction des nitrates est plus rapide au niveau de filtre inoculé (**F**). Ce qui met en évidence l'effet bénéfique de la bioinoculation dans l'amélioration du potentiel épuratoire des filtres plantés même avec une seule souche bactérienne (PFH_1).

Différentes concentrations en nitrates ont été injectées dans les deux filtres afin de confirmer l'effet de la bioinoculation. Après 18 h et en partant d'une concentration initiale de 8,75 mg/L de NO_3^-, l'assimilation est totale au niveau du filtre inoculé (**F**) alors qu'au niveau du filtre témoin, une concentration résiduelle égale à 1mg/L de NO_3^- a été enregistrée. Pour un intervalle de temps de deux heures, la concentration en nitrates d'une eau usée domestique diminue de 7 à 3 mg/L dans le filtre témoin (**T**) alors qu'elle est totalement assimilée dans le filtre inoculé (**F**).

La cinétique de la réduction des nitrates pour les deux filtres **T** (témoin) et **F** (filtre inoculé par la souche PFH_1 au niveau de la rhizosphère), est représenté par les Figures 28, 29, 30 et 31 sous forme des courbes cinétiques exponentielles.

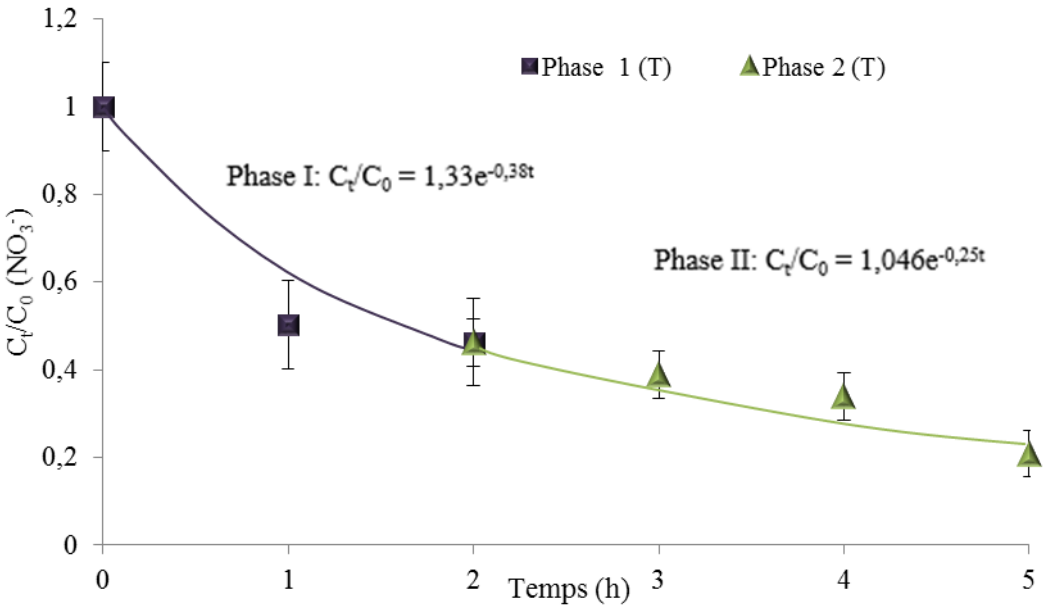


Figure 28. Suivi de l'assimilation des nitrates au niveau du filtre témoin (T)
Avec $[NO_3^-]_{initiale}$ = 90 mg/L

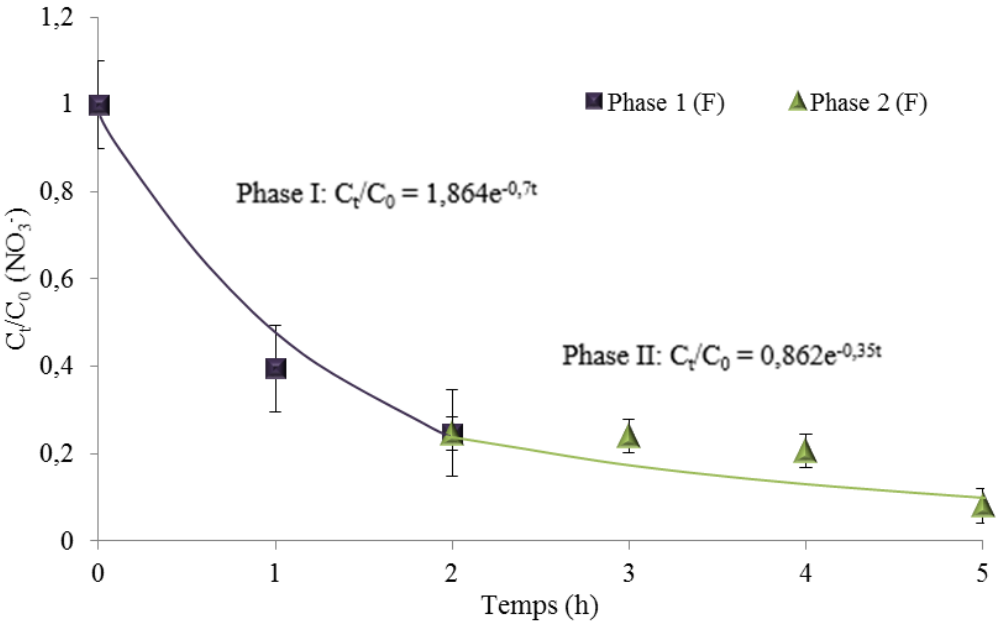


Figure 29. Suivi de l'assimilation des nitrates au niveau du filtre inoculé (F)
Avec $[NO_3^-]_{initiale}$ = 90mg/L

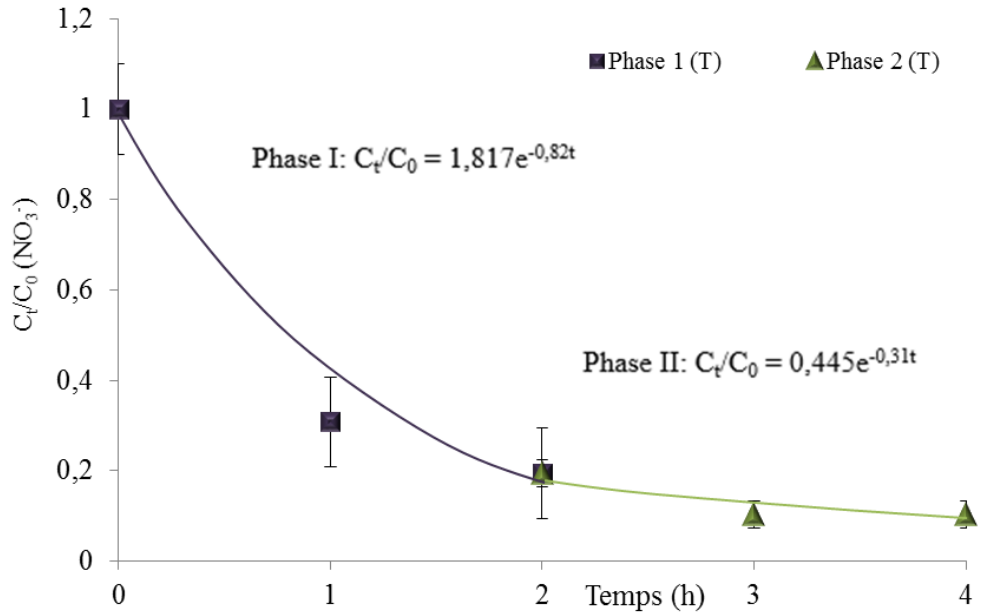


Figure 30. Suivi de l'assimilation des nitrates au niveau du filtre témoin (T)
Avec, $[NO_3^-]_{initiale}$ = 12mg/L

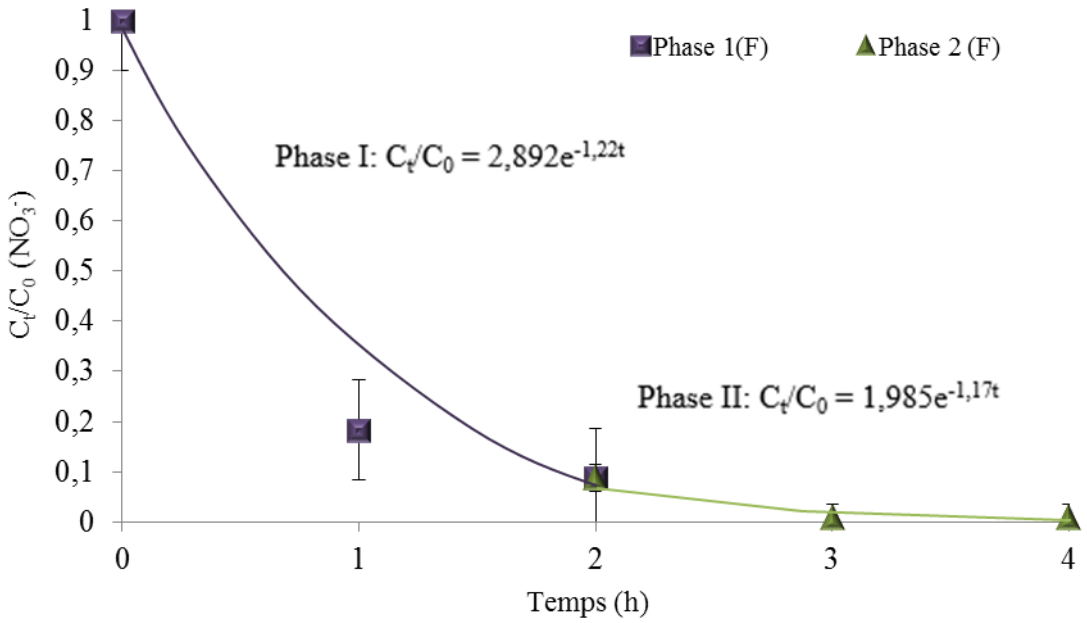


Figure 31. Suivi de l'assimilation des nitrates au niveau du filtre inoculé F
Avec $[NO_3^-]_{initiale}$ = 12mg/L

La cinétique de dénitrification *in situ* s'avère également en parfait accord avec le modèle de ChicK-Watson (CW) modifié présenté ci-dessus (2.4.1).

D'après les résultats récapitulés dans le tableau 10, le taux de dénitrification (A_1) déterminé au cours de la première phase est plus important que celui déterminé au cours de la

deuxième phase de dénitrification pour les deux filtres témoin (**T**) et inoculé (**F**). La première phase de contact avec une concentration $[\mathbf{x}]_{\mathbf{mg/L}}$ de nitrate est la plus importante et la plus efficace. Nous constatons que le taux de dénitrification est plus important au niveau du filtre inoculé par l'isolat PFH_1 (**F**). En se référant à la première phase, les valeurs de (***A***) pour une concentration en nitrates de 90mg/L dans les deux filtres (**T** et **F**) valent respectivement : 1,33 et 1,864. L'assimilation de nitrate a augmenté de 21% dans le filtre inoculé par PFH_1 par rapport au filtre témoin. Ce pourcentage est moins important que celui déterminer au cours de la dénitrification *in vitro* vue que les conditions d'assimilation diffèrent mais, ça reste un pourcentage assez intéressant qui reflète l'impact positif de la souche d'intérêt dans l'amélioration de la dénitrification *in situ*.

L'analyse de coefficient de dénitrification (***k***) montre que le pouvoir dénitrifiant dans chaque filtre s'avère plus important au cours de la première phase et il est plus important au niveau du filtre (**F**).

Tableau 10. Détermination des constantes de dénitrification de l'isolat bactérien PFH_1 *in situ*

[NO3$^-$] en mg/L		***K***		***A***	
		k_1	k_2	A_1	A_2
90	**T**	0,38	0,25	1,33	1,046
	F	0,7	0,35	1,864	0,862
12	**T**	0,82	0,31	1,817	0,445
	F	1,22	1,17	2,892	1,985

Légende : ***A*** : le taux de dénitrification à un intervalle de temps déterminé (A_1 et A_2 : les taux de dénitrification respectifs de la première et la deuxième phase) ; ***k*** : coefficient de dénitrification (k_1 et k_2 : les coefficients de dénitrification respectifs de la première et la deuxième phase) ; **T** : filtre témoin sans inoculation ; **F** : filtre avec inoculation de PFH_1.

Il faut noter également qu'au niveau du filtre (**F**) inoculé, le temps de 3 heures est suffisant pour une assimilation quasi totale de nitrate (99%) pour une concentration initiale égale à 12 mg/L, alors que l'assimilation n'est pas totale pour le même intervalle du temps en partant avec une concentration de départ égale à 90mg/L. L'assimilation de de nitrate dans ce cas qui n'est que 76%, semble nécessiter un temps supérieur à 2h pour qu'elle soit totale. Cela pourrait être expliqué par le développement des bactéries dénitrifiantes au niveau de la rhizosphère dans le filtre inoculé. La présence d'une source de carbone insuffisante est aussi un facteur limitant dans le processus biologique de dénitrification.

Afin de comparer l'assimilation des nitrates avant et après bioinoculation, des modèles mathématiques ont été adoptés tel que le modèle de premier ordre de Chick Watson et le modèle de *series events*.

Concernant le modèle cinétique d'événement en série (Severin et al. 1984). La cinétique de dénitrification est supposée comme étant une série d'évènements, où chaque événement est caractérisée par une cinétique de premier ordre (Chick – Watson). Chaque niveau de dénitrification *Di* a une cinétique constante *Ki* et n est le niveau seuil de la dénitrification.

$$D_0 \overset{k_1}{\rightarrow} D_1 \overset{K_2}{\rightarrow} D_2 \overset{K_3}{\rightarrow} D_i \ldots D_{n-1} \overset{K_n}{\rightarrow} D_n$$

En supposant que la constante cinétique est la même à chaque niveau, l'expression généralisée suivante peut être dérivée du modèle series-events.

$$\frac{N}{N_0} = A \exp(-K \times C^n t^m) + ln \frac{(1 + \sum_{i=0}^{n-1} \times C^n t^m)^i}{i!}$$

Les figures 30 et 31 illustrent l'adaptabilité de ce modèle mathématique à décrire le comportement des bactéries dénitrifiantes au sein de la rhizosphère en termes d'évènement. En effet, aucun changement dans l'allure cinétique n'est observé. Cependant, l'utilisation de ce modèle peut divulguer les séries d'événements subis par des rhizobactéries *in vitro* lors de l'assimilation des nitrates avec ou sans bioinoculation. Par exemple, pour une concentration initiale de nitrate égale à 12 mg / L, la bioassimilation des nitrates par les bactéries dénitrifiantes est passée par une série de trois événements (D3) dans le filtre témoin (T) contre une série d'un seul évènement (D1) dans le filtre bioinoculé (F). Ce qui montre que l'inoculation des bactéries dénitrifiantes dans le filtre (F) a amélioré et facilité l'assimilation des nitrates par la réduction de deux évènements et par suite cette assimilation est plus rapide et plus efficace.

Ce résultat met en évidence la potentialité des bactéries d'intérêt pour améliorer la rhizocompétence dans le processus de dénitrification de 47,54 et 21,36% respectivement pour une concentration initiale de nitrate de 12 et 90 mg / L.

- **Evolution du pH**

L'évolution du pH au niveau des filtres (**T**) et (**F**), est représentée par la Figure 32. Nous avons remarqué une légère augmentation du pH. En effet, le pH varie entre 7,5 et 8 dans le le filtre (**F**) et entre 7,5 et 7,9 dans le filtre (**T**). Ces résultats semblent en concordance avec ceux trouvés par Saeed and Sun (2011). La dénitrification est une réaction biologique consommatrice de protons qui provoque une augmentation du pH.

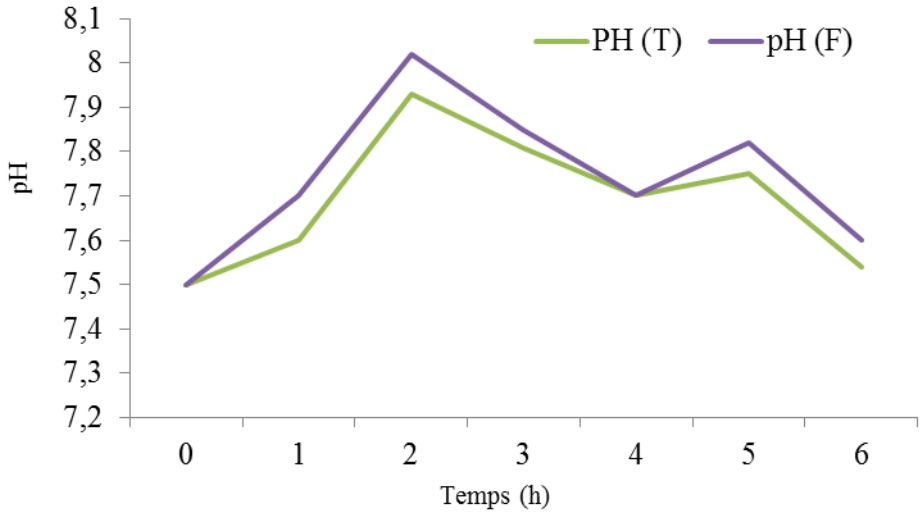


Figure 32. Evolution du pH au cours de la dénitrification au niveau des deux filtres (témoin, T et F inoculé avec PFH_1.

3. Conclusion partielle

Dans cette étude, nous avons pu isoler de l'environnement 19 souches bactériennes en se basant sur des tests biochimiques. L'étude de criblage des isolats bactériens basée sur l'aptitude de la bactérie à assimiler les nitrates, nous a permis de sélectionner la souche PFH_1 isolée à partir des feuilles des plantes comme étant la souche la plus réductrice des nitrates. Ce résultat a été bien confirmé en mesurant la quantité des nitrates restante par chromatographie ionique.

Avant de procéder à l'injection directe de la souche PFH_1 au niveau de la rhizosphère du filtre planté, des essais *in vitro* ont été réalisés. La cinétique de la réduction des nitrates par la souche PFH_1 a été caractérisée par deux phases : (i) une cinétique rapide de la dénitrification maximale. (ii) suivi par une cinétique lente et tend à être constant au cours du temps. Le pourcentage d'assimilation par PFH_1 de nitrate *in vitro* est égal à 80% pour les deux concentrations initiales testées de nitrate.

La bioinoculation de la souche d'intérêt au niveau du filtre F a permis un abattement des nitrates important par rapport au témoin par exemple après 18 h, une concentration initiale de 8,75 mg/L de NO_3^- est totalement assimilée au niveau du filtre (**F**) alors qu'au niveau du le filtre témoin, nous avons enregistré une concentration égale à 1mg/L de NO_3^-.

Les résultats obtenus permettent de conclure que la bioinoculation présente une méthode simple et efficace pour améliorer la performance des filtres plantés de macrophytes.

Partie II

Amélioration de l'abattement des pathogènes par inoculation des bactéries antagonistes et des bactériophages

1. Introduction

En plus de la bioinoculation des bactéries d'intérêt, l'application des bactériophages pour inactiver des souches bactériennes pathogènes est une stratégie innovante depuis ces dernières années. Les bactériophages sont des virus qui infectent les bactéries. Ces parasites obligatoires utilisent la machinerie métabolique de la cellule hôte pour se reproduire (Withey et al., 2005). Les bactériophages représentent la biomasse la plus importante de la planète. Leur abondance est évaluée à 10^{30}-10^{32}. Les bactériophages sont très abondants avec en moyenne 10^7 phages par mL dans les milieux liquides et jusqu'à 10^9 dans les sédiments. Leur importance est donc considérable. Selon leur cycle biologique, il existe deux types de bactériophages : les phages lytiques et les phages tempérés (Ravat et al. 2015). Les bactériophages ont été découverts depuis 1915 suite à une observation « des plages claires » au niveau d'une culture bactérienne sur gélose (Duckworth 1976). Cette observation a poussé les chercheurs à découvrir ces nanoparticules. Dès sa découverte, les phages ont été largement appliqués dans la phagothérapie, puis, au cours de la dernière décennie, l'utilisation des bactériophages dans l'industrie agroalimentaire est devenue une option efficace pour le bio-contrôle des pathogènes potentiellement présents dans les aliments. Les bactériophages sont ubiquitaires et régulièrement ingérés par l'homme via son alimentation. Pour cela, ils sont présumés inoffensifs et aucun effet secondaire à leur ingestion n'a été rapportée (Anany et al. 2015). En outre, l'écologie des bactériophages dans les systèmes aquatiques suscite de plus en plus d'intérêt. Nombreuses études rapportent des applications de bactériophages en tant qu'indicateurs ou traceurs de la présence de bactéries dans les systèmes de traitement des eaux usées (Withey et al., 2005; Shapiro and Kushmaro 2011).). Le traitement par bactériophage est une alternative prometteuse aux stratégies de désinfection actuelles. En particulier, le traitement par phages élimine efficacement *P. aeruginosa* in vitro (Zhang et al., 2013).

L'objectif de notre étude dans ce chapitre, consiste à sélectionner un phage spécifique pour la bactérie pathogène, le purifier et l'injecter au sein de la rhizosphère du filtre planté de *Phragmites australis* pour contribuer à l'élimination des bactéries pathogènes.

2. Résultats

2.1. Etude de criblage des bactéries antagonistes envers une bactérie pathogène

2.1.1. Activité protéasique des isolats bactériens

L'estimation qualitative de la sécrétion extracellulaire des protéases a été déterminée par inoculation de 5µL de la bactérie testée sur un milieu gélosé additionné à 0,75% de la

caséine du lait. Après incubation, la présence d'un halo d'inhibition reflète une activité protéolytique de la caséine présente dans le milieu de culture. La mesure de diamètre d'inhibition permet de distinguer une différence d'activité protéolytique entre les isolats.

La figure 33 récapitule les résultats obtenus sur l'activité protéasique chez différents isolats. L'activité protéasique s'avère plus intense chez les souches PFH_1, PFH_2, PRSH et PRMV. Les souches PR_1, PRV, PFV_1, PR_2, PRSV présentent une activité un peu moins intense.

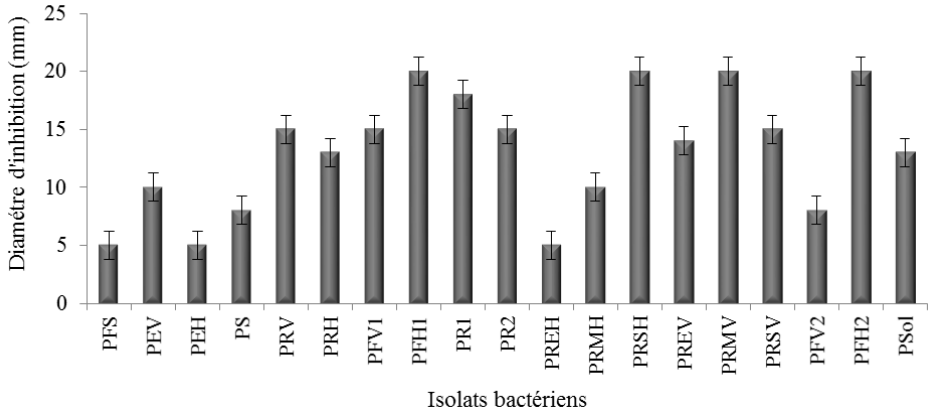


Figure 33. Étude de l'activité protéasique des différents isolats bactériens

2.1.2. Activité lipasique

La Figure 34 met en évidence les activités protéasique et lipasique chez quelques isolats bactériens étudiés. Les résultats ont montrés que les isolats bactériens : FS, PEV, PS, PRH, PFH1, PREH, PRSH, PREV, PRMV, PRSV et PFH_2 ont montré une activité lipasique non révélée pour les autres isolats : PEH, PRV, PFV_1, PR_1, PR_2, PRMH et PFV_2. Les colonies de bactéries productrices de lipases apparaissent entourées d'un halo opaque dû à la formation de cristaux de sel de calcium.

Figure 34. Mise en évidence des activités protéasique et lipasique chez les isolats bactériens

2.1.3. Test de l'antagonisme des isolats bactériens envers les souches bactériennes pathogènes

Les résultats du test d'antagonisme des isolats bactériens contre les différentes souches pathogènes sont récapitulés dans le tableau 11. Les résultats révèlent que l'isolat bactérien (PFH_1) isolé à partir des feuillages du filtre à écoulement horizontal est l'isolat le plus antagoniste envers les souches indicatrices testées. Cet isolat présente un spectre d'action assez large. En effet la souche de (PFH_1) est active contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa* et *S. typhi*).

Tableau 11. Test d'antagonisme avec des souches indicatrices pathogènes.

Souches indicatrices	Isolat bactérien	Résultat	Souches indicatrices	Isolat bactérien	Résultat
S. typhi ATCC 560	**PFH_1**	+	*B. cereus*	PFH_1	-
	PFH_2	-		PFH_2	-
	PEV	-		PEV	-
	PEH	-		PEH	-
	PRH	-		PRH	-
Staphylococcus aureus	**PFH_1**	+	*P. aeruginosa* ATCC2134	PFH_1	-
	PFH_2	+		PFH_2	-
	PEV	-		PEV	-
	PEH	-		PEH	-
	PRH	-		PRH	-
P. aeruginosa ATCC4114	**PFH_1**	+	*E. coli*	PFH1	-
	PFH_2	+		PFH2	-
	PEV	-		PEV	-
	PEH	-	*E. coli*	PFH1	-
	PRH	-			

Légende : (+) : présence d'antagonisme ; **(-)** : absence d'antagonism

2.1.4. La Détection de la production des métabolites secondaires par les isolats bactériens : les sidérophores

Les bactéries produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui ont un large spectre d'activités biologiques qui incluent des activités antimicrobiennes, immunosuppressives et chélatrices de fer (Rondon et al., 2004). Le fer est un élément essentiel pour tous les organismes vivants, à l'exception peut-être de certains lactobacilles. Le fer est abondant dans la croûte terrestre, mais la majeure partie se trouve sous la forme insoluble d'hydroxyde de fer ; ainsi, le fer n'est disponible que pour les organismes à des concentrations égales ou inférieures à 10-18 M dans des solutions de sol à pH neutre.

Cela représente un défi pour les bactéries, qui ont besoin de fer à des concentrations de l'ordre de micromolaire pour se développer. Pour faire face à sa solubilité, de nombreux microorganismes synthétisent des sidérophores. Les sidérophores sont des chélateurs de fer de faible poids moléculaire et de haute affinité qui transportent le fer vers des cellules bactériennes. Les sidérophores des bactéries rhizosphériques peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons pathogènes (Sindhu et al., 2009).

Le test de la détection de la production des sidérophores a été réalisé dans l'intérêt de sélectionner les souches bactériennes les plus puissantes et ce dans le cadre de criblage des isolats bactériens. Récemment, nombreuses recherches sont focalisées sur l'utilisation des sidérophores dans la bioremédition et la chélation d'autres métaux lourds. En plus il a été prouvé que ces métabolites secondaires ont des propriétés antimicrobiennes. La capacité de la bactérie à envahir le milieu s'appuie donc sur toutes les structures qui vont lui permettre de persister dans le milieu et de s'y multiplier (Khan et al. 2017).

La détection de la production de sidérophores chez les isolats bactériens est représentée par la figure 35, ci-dessous. Cette production de sidérophores a été estimée par mesure de l'absorbance à 495nm en présence d'une solution de $FeCl_3$ à 2%. Les résultats obtenus montrent que la plupart des souches sont productrices de ces métabolites à l'exception de deux souches PRMH et PRMV qui ont une production presque nulle.

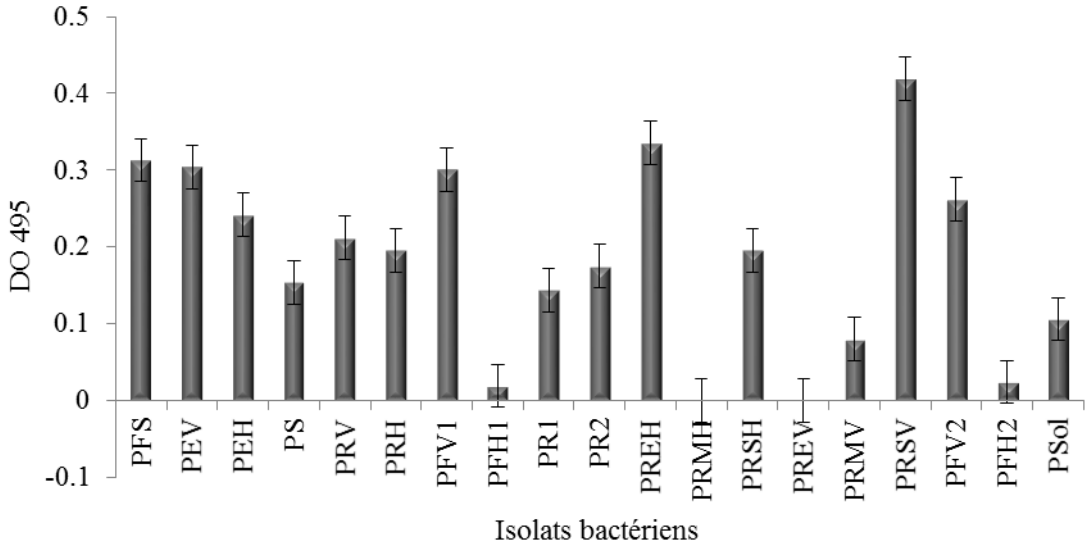
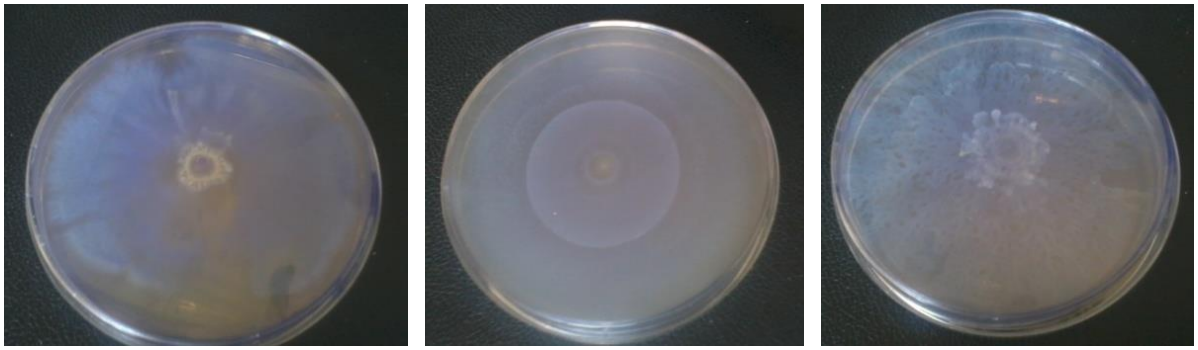


Figure 35. Détection de la production de sidérophores chez les isolats bactériens

2.1.5. Etude de la mobilité des isolats bactériens

La mobilité représente la capacité permettant à certaines bactéries de se déplacer et donc de changer de milieu pour trouver des conditions environnementales plus favorables en allant chercher des substances nutritives ou fuir un environnement hostile (O'Toole and Kolter 1998b). Les figures 36 et 37 mettent en évidence la mobilité des isolats bactériens. Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches isolées présentent les trois types de mobilité.



Twitching **Swimming** **Swarming**

Figure 36. Mise en évidence de la mobilité bactérienne chez les isolats bactériens

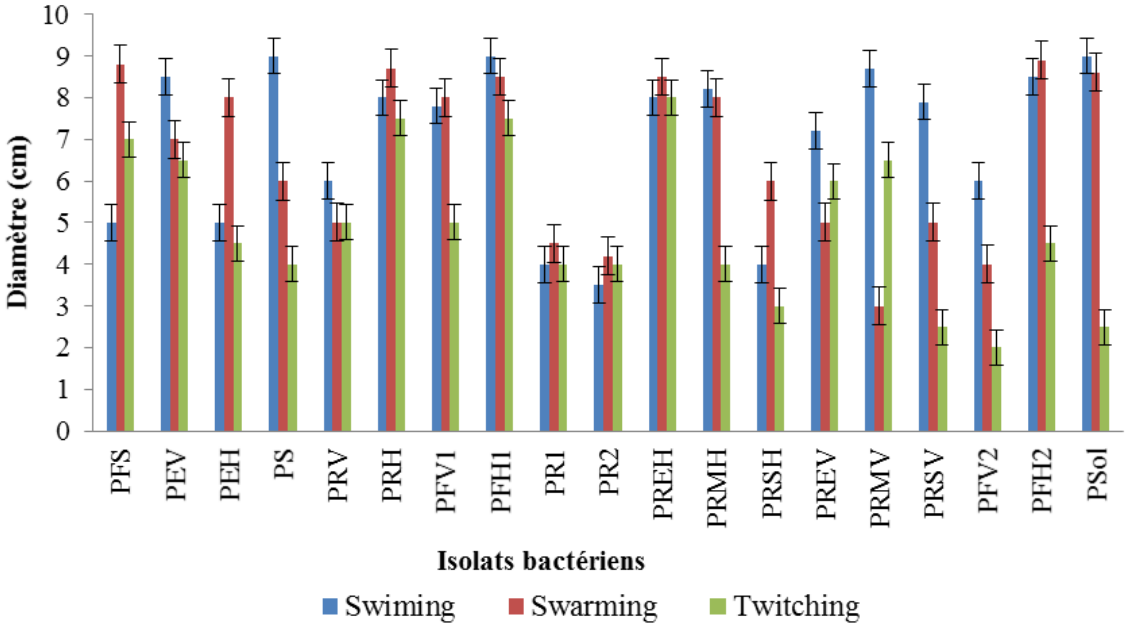


Figure 37. Etude de la mobilité bactérienne chez les isolats bactériens

2.2. Application de la souche d'intérêt pour l'inactivation des bactéries pathogènes

2.2.1. Suivi de l'inactivation d'une bactérie pathogène : *S. typhi* après une seule injection de la souche d'intérêt

L'étude de la cinétique d'inactivation *S. typhi* dans les deux filtres, est représentée par les courbes de la figure 38. Après 3 heures de monitoring, nous avons enregistré un abattement de *S. typhi* égal à 2U-Log_{10} au niveau du filtre inoculé (**F**) contre un abattement égal à 1U-Log_{10} déterminé au niveau du filtre témoin (**T**). L'injection de PFH_1 au sein de la rhizosphère du filtre inoculé (**F**) améliore de 1U-Log_{10} la cinétique de l'inactivation de *S. typhi* en comparaison avec le filtre témoin.

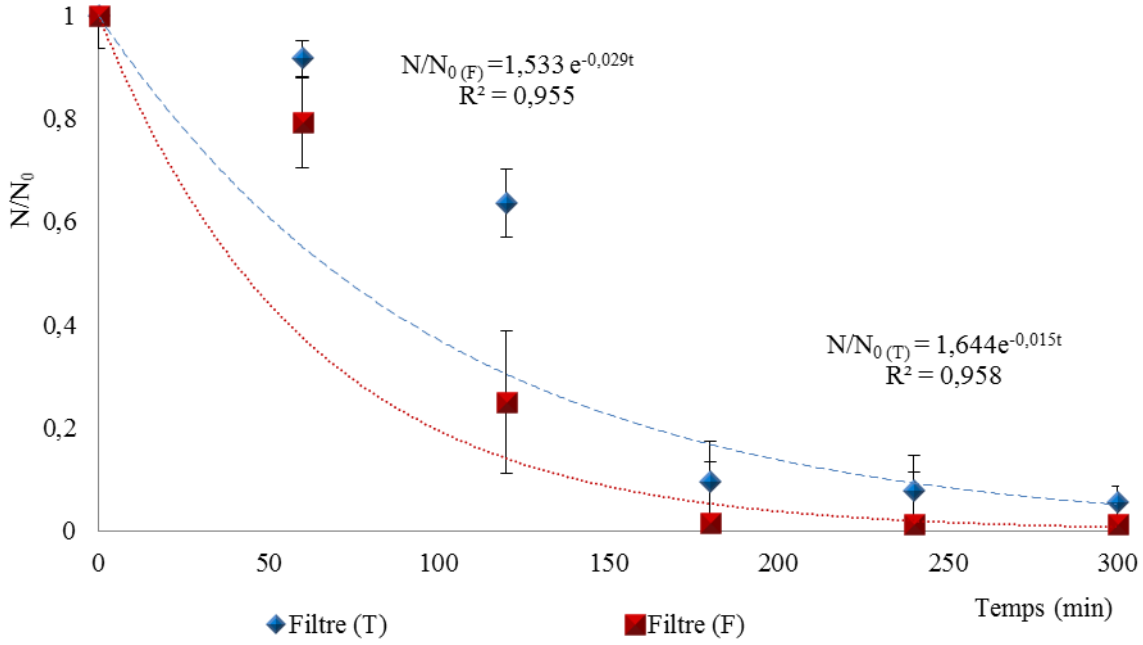


Figure 38. Suivi de l'inactivation de *S. typhi* au niveau des deux filtres (T) et (F)

Plusieurs études témoignent de l'efficacité des systèmes à macrophytes dans l'élimination des souches bactériennes pathogènes (Hill and Sobsey 2001). Hench et al. (2003) ont montré que l'abattement de la bactérie pathogène *S. typhi* est égal à 2,3 U-Log pour un traitement des eaux usées primaires des petites communautés dans un milieu rural et en utilisant le gravier comme massif filtrant pendant un temps de rétention de 23 à 52 heures. Diverses interactions comme l'antibiose, l'antagonisme biologique, l'amensalisme, la compétition pour les éléments nutritifs et le parasitisme peuvent être responsables de la réduction du nombre de bactéries dans un système à macrophytes (Di Francesco et al. 2016). La cinétique d'inactivation s'avère en parfait accord avec le modèle de ChicK-Watson (**CW**) formulé comme suit :

$$N/N_o = A' \exp(-k'^n t)$$

Avec ; ***N***: Nombre des bactéries viables cultivables à un temps ***t; N_0***: Nombre des bactéries viables cultivable à un temps ***t_0; k'*** : Coefficient d'inactivation; ***A'*** : Le taux d'abattement; ***n***: Seuil d'inactivation ou le seuil des séries d'événements subis par la bactérie après désinfection, ***n***=1 pour le modèle de premier degré.

Par l'analyse des courbes d'inactivation bactérienne, nous pouvons noter une amélioration de l'abattement bactérien en fonction du temps. L'exploitation des résultats d'abattement bactériens par le modèle cinétique de Chick-Watson nous a permis de déterminer les paramètres biologiques de la cinétique d'inactivation à savoir, le coefficient d'inactivation (***k'***) et Le taux d'abattement (***A'***).

L'analyse du coefficient d'inactivation ou coefficient de désinfection (***k'***) consignés dans le Tableau 12, montre une différence dans la réponse de la bactérie *S. typhi* en présence et en absence de PFH_1 ; sachant que plus la valeur de ***k'*** est grande plus l'inactivation bactérienne est importante (Ben Said *et al*., 2013). Par conséquent, l'analyse du coefficient (***k'***) montre que l'inactivation de la souche *S. typhi* est plus importante en présence de la bactérie PFH1. En effet, les valeurs de (***k'***) pour les deux filtres T et F sont respectivement 0,015 et 0,029.

Tableau 12. Détermination des constantes cinétiques d'inactivation de *S. typhi* après une seule injection

Bactérie	***k'*** coefficient d'inactivation (min^{-1})		***A'*** Abattement	
	k'_T	k'_F	A'_T	A'_F
S. typhi	0,015	0,029	1,644	1,533

Par une seule inoculation de la bactérie antagoniste PFH_1, l'élimination des bactéries pathogènes est améliorée de 1,6 U-Log10. Au niveau de filtre (T), l'inactivation des bactéries pathogènes est due à la biomasse autochtone. Cependant, dans le filtre (F), l'addition de la souche antagoniste améliore significativement l'inactivation des bactéries pathogènes. L'amélioration du potentiel rhizobactérien est fortement liée aux paramètres de croissance des bactéries antagonistes, à savoir le temps de latence (ʎt), la vitesse de croissance spécifique (µmax) et le temps de génération de bactéries (t_G). L'effet combinant les différents facteurs est ensuite déterminé les facteurs gamma respectifs. Le concept Gamma a été introduit par Zwietering et al. (1992) (Wijtzes et al. 2001) et repose sur deux principes: (i) tous les facteurs mesurables, qui influencent le taux de croissance (µ), sont indépendants et se produire de manière multiplicative:

$$\mu = f(\theta) x f(pH) x f(aw) x \ldots f(others)$$

(ii) L'effet de chaque facteur environnemental sur le taux de croissance peut être représenté par une fraction du taux de croissance maximal :

$$\gamma = \mu / \mu opt \text{ (Compris entre 0 et1)}$$

$$\mu max = \mu opt\, \gamma(\theta)\, \gamma(pH)\, \gamma(aw) \ldots \gamma(others)$$

avec γ: la fonction qui englobe tous les facteurs qui peuvent affecter la vitesse de croissance optimale μ_{opt}; **θ**: température (°C).

Au niveau du filtre (F), en plus de l'activité des bactéries autochtones, l'effet des bactéries inoculées vient de renforcer l'activité antagoniste après un temps de latence (ʎt):

$$\text{Si t} < ʎt + \alpha;\ N/No = AT \exp(-k.t)$$

$$\text{Si t} \geq ʎt + \alpha;\ N/No = A' \exp(-k'.t)$$

$$\text{Avec ; } A' = A + A\alpha$$

$$A' = A \text{ x } (1 + \mu max)$$

$$k' = k + (k\,\alpha)$$

$$k' = k\,(1 + \mu max)n + m$$

Dans le filtre F, la cinétique d'inactivation des bactéries pathogènes peut être modélisée comme suit :

$$N/No = A\text{x}\,(1 + \mu max)\alpha \exp[(-k \text{ x } (1 + \mu max)\, n + m]\, t$$

Où N / N_0 est la réduction de la concentration bactérienne indicatrice. Nt: nombre de bactéries viables et cultivables au temps t; N0: Nombre de bactéries viables et cultivables au temps t0; k: coefficient d'inactivation; A: le taux de réduction bactérienne; k ': coefficient d'inactivation des bactéries lié à la présence de bactéries injectées; A ': taux d'élimination bactérienne lié à la présence de bactéries injectées, m: seuil d'activation ou événements seuils subis par la bactérie après bioinoculation et α: temps d'acclimatation des bactéries inoculées.

2.2.2. Inactivation du *S. typhi* après des injections séquentielles de la souche PFH_1.

Afin de renforcer la rhizocompétence des bactéries dans l'élimination des agents pathogènes, des injections successives des bactéries sélectionnées ont été réalisées aux temps 0, 60, 120 min et 180 min. Le choix du temps d'injection a été basé sur le temps de latence de la bactérie qui équivaut à 60 minutes (Figure 28). Le suivi de l'inactivation de *S. typhi* au niveau des deux filtres (T) et (F); après plusieurs inoculations de PFH_1 (F), est donné par la figure 39.

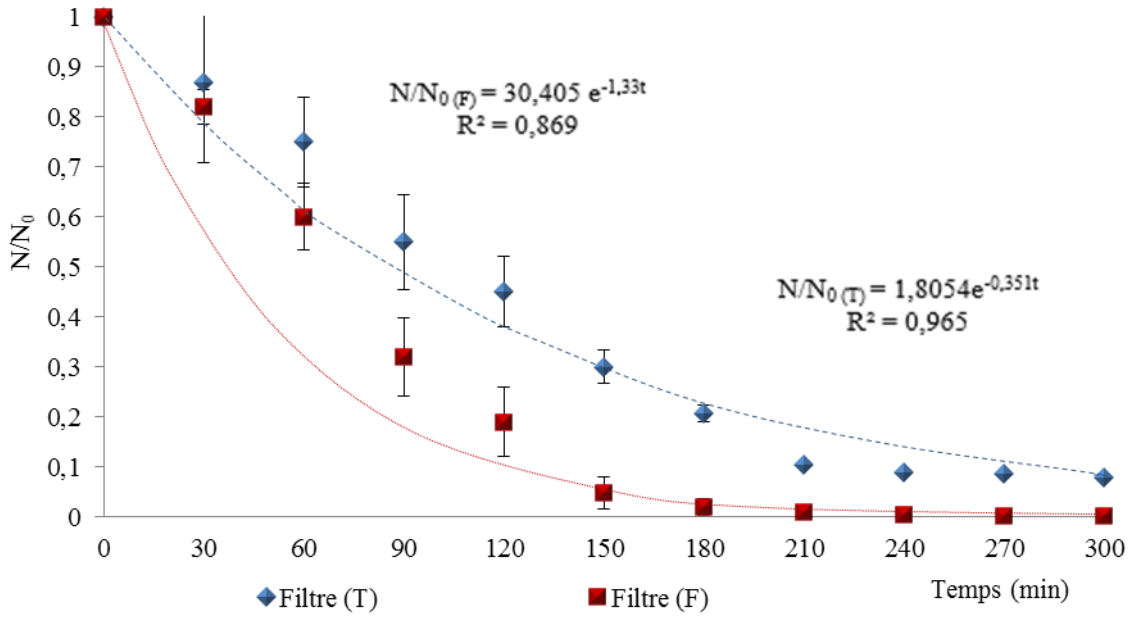


Figure 39. Suivi de l'inactivation d'une bactérie pathogène au niveau des deux filtres (T) et (F); T : filtre témoin sans inoculation de PFH_1 ; F : filtre avec inoculation de PFH_1 après plusieurs inoculations de PFH_1.

Par une série de bioinoculation, la réduction des bactéries pathogènes a été améliorée par rapport au filtre (T) sans inoculation de 2 U-Log10 (N/N_0).

L'effet cumulatif de la bio-injection séquentielle et le maintien de la phase de croissance exponentielle des bactéries d'intérêt (sur la base de la courbe de croissance de la souche PFH_1), ont permis d'augmenter le coefficient d'inactivation des bactéries indicatrices (***k***) à 1,33 min^{-1}, déterminé après trois bio-injections dans le filtre (F) en comparaison avec la valeur de k égale à 0,35 min^{-1} pour le filtre témoin (T).sans bio-injection. Le tableau 13 récapitule les constantes d'inactivation *S. typhi* après plusieurs injections de PFH_1.

Tableau 13. Les constantes cinétiques de l'inactivation de *S. typhi* après plusieurs injections de PFH_1

	k' (min^{-1})	***A***
Filtre non inoculé (T)	0,351	1,805
Filtre inoculé (F)	1,333	30,405

La différence de paramètres cinétiques (*k*' et *A*) déterminée à la fois pour les filtres T et F, est proportionnelle aux facteurs de croissance bactériens (t), au taux de croissance spécifique maximal (µmax) et au temps de génération de la bactérie (t_G). L'augmentation du taux d'inactivation des agents pathogènes est positivement corrélée aux facteurs de croissance du

bio-inoculum (A' et k') et au nombre d'injections. Ce résultat peut être modélisé par l'équation suivante :

$$N/No = [Ax\,(1 + \mu max)\alpha \exp[(-k\,x\,(1 + \mu max)\,n + m]\,t]b$$

Avec : b : le nombre d'inoculation

L'effet cumulatif de trois bio-injections séquentielles au niveau de la rhizosphère de *Phragmites australis*, a accentué la rhizocompétence dans l'élimination des bactéries avec k' (1,33 min^{-1}) et A' (30,4) par rapport à l'activité antagoniste des bactéries d'intérêt avec une réduction du temps de contact.

La bioinoculation des bactéries antagonistes s'est avérée comme une approche efficace pour améliorer la qualité de l'eau traitée. En outre, les résultats de la présente étude confirment la possibilité de développer un bioinoculant commercial à appliquer dans les processus de traitement biologique de l'eau afin d'améliorer la qualité de l'eau traitée.

2.3. Application des bactériophages pour l'inactivation des bactéries pathogènes.

2.3.1. Sélection et purification du phage spécifique pour *S. typhi*

Après les différentes étapes d'isolement, purification et amplification des particules phagiques, le spectre d'infectiosité des 3 phages isolés à partir des eaux usées (ϕI, ϕII, ϕIII), a été testé. Le phage ϕII a montré une spécificité pour la souche de *S. typhi* ATCC 560. Cet isolat phagique a été utilisé pour procéder à la bio-inoculation *in situ* au niveau de la zone rhizosphérique du filtre planté de roseaux.

2.3.2. Suivi de l'abattement du *S. typhi* après bio-inoculation par le phage d'intérêt

La figure 40 présente l'évolution de l'inactivation de la souche de *S. typhi* en fonction du temps de contact avec la biomasse autochtone de la zone rhizosphérique de la plante *Phragmatis australis* avec ou sans bio-inoculation.

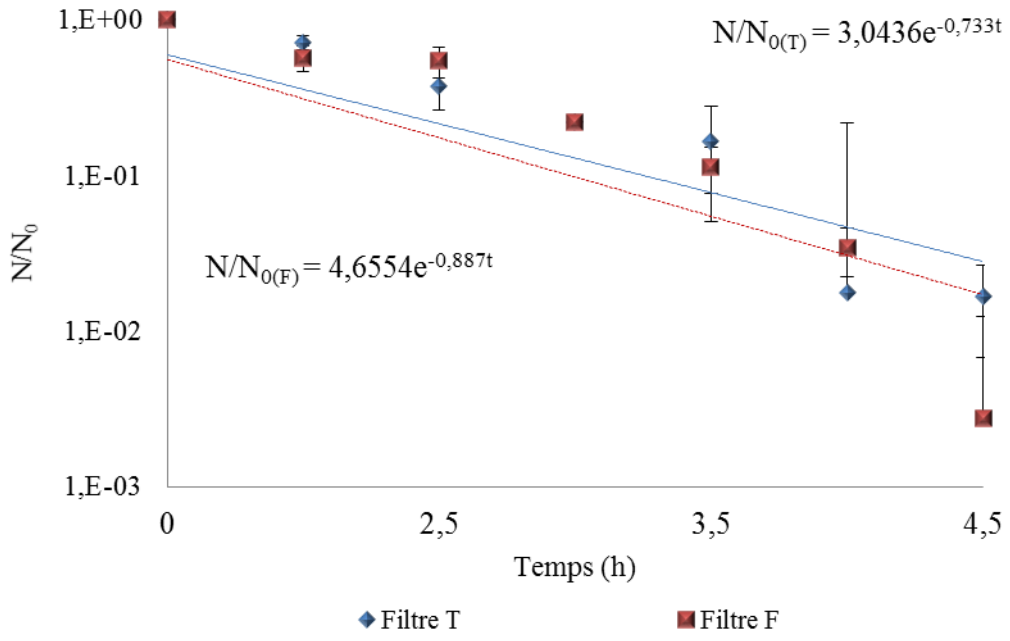


Figure 40. Evolution de l'inactivation *S. typhi* au niveau des deux filtres (T sans inoculation du phage) et (F avec inoculation du phage).

Après 4 heures et demi de monitoring, un abattement de *S. typhi* égal à 3U-Log_{10} a été enregistré au niveau du filtre inoculé (**F**) contre un abattement égal à 2U-Log_{10} déterminé au niveau du filtre témoin (**T**). L'injection du phage au sein de la rhizosphère du filtre planté (**F**) améliore la cinétique de l'inactivation de *S. typhi* en comparaison avec le filtre témoin.

Pour mieux comparer les résultats et mettre en évidence l'effet de la bio-inoculation sur l'abattement de la bactérie pathogène, nous avons utilisé le modèle cinétique de Chick Watson.

$$N/N_0 = A \exp(-K^n t)$$

Avec ; ***N*** : Nombre des bactéries viables cultivables à un temps ***t*** ;

N_0 : Nombre des bactéries viables cultivables à un temps t_0 ;

K : Coefficient d'inactivation ou coefficient de létalité ;

A : Le taux d'abattement des bactéries

n : Seuil d'inactivation ou le seuil des séries d'événements subis par la bactérie

Après traitement, ***n***=1 pour le modèle de premier degré.

L'analyse du coefficient d'inactivation (***K***) montre une différence dans la réponse de la bactérie *S. typhi* en présence ou en absence de bio-inoculation du phage d'intérêt. Sachant que, plus la valeur de ***K*** est grande, plus l'inactivation bactérienne est importante (Ben Said *et al*. 2013). L'inactivation du *S. typhi* est plus importante en présence du phage avec une

amélioration de l'abattement de **1** U-Log_{10} par rapport au témoin. Les valeurs de (***K***) pour les deux filtres (**T**) et (**F**) sont respectivement 0,73 et 0,88 et sont résumées dans le tableau Tableau 14.

Tableau 14. Détermination de constantes cinétiques d'inactivation de *S. typhi*

Bactérie	***K (min^{-1})***		***A***	
S. typhi	K_T	K_F	A_T	A_F
	0 ,73	0,88	3,043	4,655

K: coefficient d'inactivation bactérienne ou coefficient de désinfection ; ***A*** : taux d'abattement bactérien

En analysant la courbe, trois phases peuvent être distinguées selon l'action des phages sur les bactéries. Durant la première phase d'inactivation, l'action du phage sur la bactérie hôte est pratiquement absente. En effet, la multiplication et la prolifération du phage dépend de la présence de la cellule hôte. En se basant sur le cycle phagique, la première partie de la courbe d'abattement (les deux premières heures) constitue la phase d'infection des bactéries hôtes : Les phages en état libre (le titre phagique inoculé est égale à 10^3 PFU/mL) vont sélectionner les bactéries permissives qui vont permettre le déroulement du cycle phagique. Après, il y'aura la succession des différentes étapes de cycle phagique à savoir : la fixation ou l'adsorption des particules phagiques sur leurs hôtes, la libération du matériel génétique du phage dans le cytoplasme de la cellule hôte, l'expression et réplication des différents éléments du phage produits par un détournement du métabolisme bactérien, et la maturation des particules virales.

La première phase d'inactivation bactérienne constitue pour les phages inoculés, une période de latence où ces particules virales s'éclipsent pour assurer leur multiplication et leur prolifération au sein de leur cellule hôte afin d'assurer la deuxième phase d'attaque assurer par la nouvelle progéniture de virion infectieux après la lyse bactérienne.

La phase d'attaque est dévoilée dans la deuxième et la troisième phase d'inactivation bactérienne. Dans la phase d'attaque, l'inactivation bactérienne sera dépendante par le nombre initial des bactéries infectées et l'augmentation du titre phagique (par rapport au titre phagique initial).

2.3.3. Cinétique d'inactivation de *S. typhi* avec augmentation du titre phagique inoculé

En vue d'optimiser la phase d'attaque, le titre phagique initial a été augmenté de 10^3 à10^5 PFU/mL. Ceci a pour but d'augmenter le taux d'infectiosité et de diminuer le temps de latence (phase 1). La figure 41 montre une amélioration de l'abattement de la bactérie

pathogène au niveau du filtre planté inoculé par le phage par rapport au filtre témoin avec un coefficient d'inactivation K_F égale à 2,21 contre un coefficient K_T égale à 1,51 (Tableau 15).

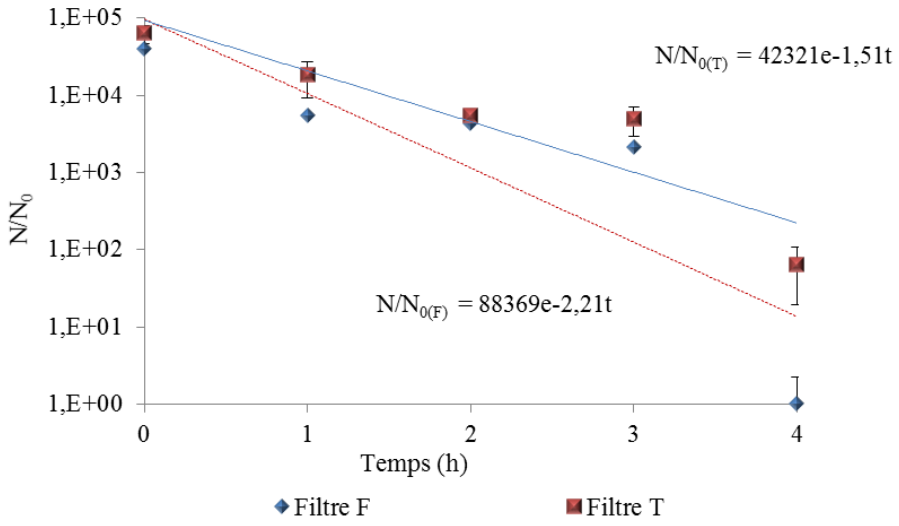


Figure 41. Suivi de l'inactivation d'une bactérie pathogène *S.typhi* au niveau des deux filtres (T) et (F) avec un titre phagique égal à 10^5 PFU/mL ; T: filtre témoin ; F: filtre avec inoculation du phage

Tableau 15. Constantes cinétiques d'inactivation de *S. typhi*

Bactérie	***K***		***A***	
	K_T	K_F	A_T	A_F
S. typhi	1,51	2,21	42321	88369

K: coefficient d'inactivation bactérienne ou coefficient de désinfection ; ***A*** : taux d'abattement bactérien

Les courbes cinétiques peuvent être partagées en 2 phases (Figure 42). Dès la première phase, une amélioration de l'inactivation bactérienne est notée (Tableau 16) de 2U-$\log_{10}$ par rapport au témoin (souche autochtone seules).

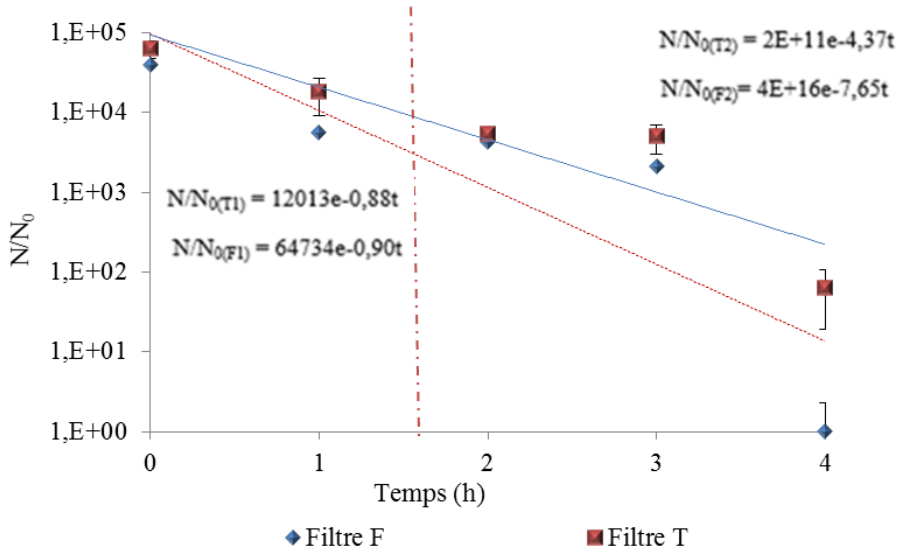


Figure 42. Phases de l'inactivation de *S. typhi* au niveau des deux filtres (T) et (F) avec un titre phagique égal à 10^5 PFU/mL; T: filtre témoin; F: filtre avec inoculation du phage.

Tableau 16. Constantes cinétiques d'inactivation de *S.typhi*

	K		***A***	
	T	**F**	**T**	**F**
Première phase	0,88	0,90	12013	64734
Deuxième phase	4 ,37	7,65	2 E+11	4 E +16

Légende: ***K***: coefficient d'inactivation bactérienne ; ***A*** : taux d'abattement bactérien.

Les résultats obtenus sont très proches de ceux de l'étude précédente au cours de laquelle une souche bactérienne, sélectionnée comme étant la plus antagoniste envers *S. typhi*, est inoculée au lieu du phage au sein de la rhizosphère du filtre.

Dans les mêmes conditions expérimentales, le suivi de la cinétique d'inactivation de *S. typhi* a montré que l'injection de la souche bactérienne d'intérêt au sein de la rhizosphère du filtre planté (**I**) améliore de 1U-Log_{10} la cinétique de l'inactivation de la souche pathogène *S. typhi* en comparaison avec le filtre témoin (**T**) pour une seule injection et de 3U-Log_{10} pour trois injections rapprochées.

Plusieurs études témoignent de l'efficacité des systèmes à macrophytes dans l'élimination des souches bactériennes pathogènes. Diverses interactions comme l'antibiose, l'antagonisme biologique, la compétition pour les éléments nutritifs et le parasitisme peuvent être responsables de la réduction du nombre de bactéries dans un système à macrophytes (Hill and Sobsey 2001).

2.4. Utilisation des phages lytiques spécifiques en tant que biocapteur pour détecter les bactéries actives dans l'eau traitée

La présence des bactéries viables mais non cultivables (BVNC) notamment les pathogènes sont considérées comme une menace pour la santé publique et la sécurité sanitaire des aliments et de l'eau. Pour résoudre ce problème sanitaire, Nous avons utilisé la variation des constantes d'infectiosité des phages telles que la prolongation de la période de latence, la réduction de taux de libération des virions infectieux (*burst size*) et le taux d'adsorption des phages à leurs cellules hôtes. En se basant sur des résultats antérieurs réalisés sur l'étude des relations entre les phages et les cellules hôtes dans des conditions stressantes telles que : (i) la flexibilité du cycle de réplication des phages corrélée par l'état physique des cellules hôtes bactériennes (Ben Said et *al*., 2010). (ii) la capacité des bactéries BVNC à soutenir le cycle phagique (Ben Said et al., 2011), nous pouvons détecter les bactéries actives dans l'eau et

surtout les BVNC qui ont perdu leur aptitude à la culture dans les milieux habituels mais ont conservé la sensibilité aux phages.

Le but du présent travail est d'étudier la capacité de phage spécifique pour la bactérie *S. typhi* à se propager dans des cellules bactériennes après traitement. La flexibilité de l'interaction phage-hôte dans le mode de propagation lytique typique a été utilisée comme bio-indicateur pour la détection de bactéries viables et actives dans des conditions de stress indétectables par les méthodes d'évaluation classiques.

Malgré leur petite taille et leur impuissance de survie sans leurs cellules hôtes respectives, les bactériophages ont montré une grande habilité et une perspicacité dans leur lutte contre les facteurs de stress dans le but de multiplication et de survie.

Afin de contrôler l'existence de bactéries actives viables non cultivables (ABVNC), nous surveillons l'infectivité et l'amplification des phages au contact d'un phage lytique et spécifique. Ainsi, nous avons infectés l'eau traitée par un phage spécifique avec un cycle de réplication lytique court.

L'analyse du résultat était basée sur la détermination du taux d'amplification du phage et la détermination des paramètres d'infection du phage : lorsqu'on note une augmentation du titrage des phages, on peut conclure la présence des bactéries viables non cultivables dans un échantillon d'eau traitée. Cependant, le déclin du titrage des phages montre une probabilité de présence de bactéries actives potentielles, mais nous devrons ainsi prolonger le cycle des phages pour confirmer cette hypothèse. Inversement, lorsqu'on détermine le titre phagique de départ au moment de l'inoculation (P_0), ce résultat pourrait confirmer l'absence de bactéries cibles actives.

La suspension bactérienne traitée par filtre planté de macrophytes est hétérogène et peut comprendre divers états bactériens : bactéries viables et cultivables, bactéries AVNC, Bactérie non-AVNC et bactéries mortes. En réponse à cette hétérogénéité, les phages vont sélectionner les bactéries de «bonne qualité», les bactéries qui peuvent permettre le cycle des phages et la libération du virus mature et infectieux. En effet, au contact de bactéries hôtes stressées, le virus doit sélectionner les bactéries permissives et les plus appropriées pour assurer la multiplication du virus et sa persistance dans un environnement hostile.

Dans des conditions favorables, pour l'hôte infecté, la progéniture du phage sera libérée après une période d'éclipse (e) à un temps fixe. Après un temps de lyse fixé (tL), la cellule infectée sera lysée et libère (b) la quantité de progéniture du phage (*burst size*). La taille de de libération va dépendre du taux de maturation (m) et du temps de lyse (tL) comme suit:

Cependant, dans notre cas, tous les paramètres cinétiques ont été prolongés dans le temps, les paramètres cinétiques de croissance des phages définissant l'interaction phage-cellule hôte (extension de la période de latence, réduction des tailles d'éclatement, adsorption en corrélation avec l'état métabolique et physiologique de la bactérie hôte (Lingchong et al. 2002).

En fait, lorsque nous infectons une densité bactérienne initiale de 10^3 CFU / mL par des phages spécifiques ; on peut noter une diminution du titre des phages matures libres après 2 h de temps de contact (Figure 43). Le taux de libération des phages matures était inférieur à ce que l'on supposait et ce résultat peut être expliqué par l'extension des périodes d'éclipse et de latence du cycle lytique du phage dans la relation avec l'état physiologique et la diminution du taux de croissance de l'hôte. Cette réponse peut représenter une stratégie d'adaptation du phage testé afin de persister dans des conditions environnementales défavorables.

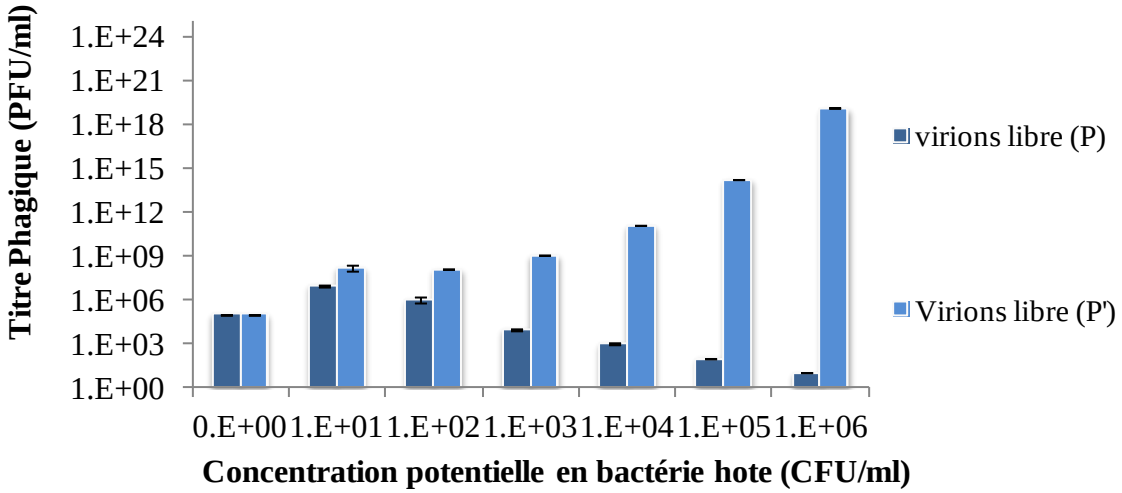


Figure 43. Détermination du titre phagique (aprés 2h et 18h de contact phage-bactéries)

La modélisation de la croissance des phages spécifiques en relation avec les cellules hôtes privées de nourriture a été déterminée selon le modèle utilisé par Mudgal et al. (2006) avec modifications.

Ce modèle est appliqué à une concentration de bactéries privées de nourriture supérieure à 10^2 UFC / mL.

$$\frac{PN}{P0} = M\ exp(-rN)$$

Où ; P_0: le titre initial du phage PA; P_N: Titres du phage PA après 2 heure d'incubation à 37 °C en présence de N: concentration de bactérie hôte permissive; M: les cellules hôtes actives non encore lysées; r: le taux d'infectiosité du phage.

Le taux d'infectiosité des phages (*r*), déterminé par l'analyse des courbes d'adsorption (Figure 43) ; ont montré que le niveau d'infectiosité des phages diminuait avec l'augmentation de la concentration de bactéries hôtes. Cette diminution des titres phagiques en présence d'une densité bactérienne élevée de cellules traitée, peut être expliquée par différentes hypothèses, comme suit :

En contact avec une croissance bactérienne lente (à cause du stress tel que la carence nutritive, désinfection, etc.), le développement des phages peut même être arrêté (Los et al. 2003). Pour surmonter ce problème de cycle de multiplication et de persistance, la lysogénisation est une stratégie adoptée par certains groupes de bactériophages (phages tempérés). Dans le même sens, dans certaines conditions d'infection ; les phages virulents peuvent imiter cette stratégie pour pouvoir persister. Par conséquence, lorsque la physiologie de la bactérie hôte était perturbée par un stress, le phage lytique ne libère pas des virions infectieux. Au lieu de cela, son génome peut être maintenu dans la cellule hôte infectée jusqu'à la reprise de la croissance de l'hôte, avec une petite poussée de phage de la progéniture est produite. Ce maintien du génome du phage dans la cellule, sans sa réplication, est appelé pseudolysogénie (Łos et al. 2003). Ainsi, la prévention de la lyse des phages matures peut être utilisée comme stratégie bénéfique pour assurer la persistance du phage et maintenir la viabilité de l'hôte bactérien. Dans le même contexte, Erez et al. (2017) ont suggéré que les phages utilisent un système de communication à petites molécules pour coordonner les décisions de lyse-lysogénie.

La diminution du taux délibération des virions matures par une forte densité de bactéries traitées pourrait également être attribuée au changement morphologique des hôtes. En effet, Zeng et al. (2013) ont montré que les cellules VNC étaient plus petites que les bactéries normales viables et cultivables.

De plus, les interactions hôte-phage peuvent être contrôlées par le système de communication bactérien, le quorum sensing (QS). En effet, de nouvelles connaissances continuent d'être révélées sur le rôle important de la détection du quorum dans la régulation de la sensibilité aux phages (Kamran et al. 2014).

Le système du quorum (QS) est un processus de communication bactérienne cellule-cellule qui implique la production, la détection et la réponse à des molécules de signalisation extracellulaires appelées auto inducteurs (Rutherford and Bassler 2012).

Saucedo-Mora et al. (2017) ont supposé que la détection du quorum pouvait en outre contrôler la sensibilité au phage et, par conséquent, ce système pourrait servir de stratégie pour protéger les bactéries de l'infection par les phages (Høyland-Kroghsbo et al. 2013; Kamran et al. 2014). Cette preuve peut nous conduire au fait que lorsque nous infectons des bactéries dans des conditions défavorables par le ou les phages lytiques, principalement une forte densité bactérienne (de 10^3 à 10^6 CFU/mL) ; par suite, nous ne pouvons pas apprécier le taux d'infectiosité réel du phage.

Toutes ces hypothèses peuvent limiter l'utilisation du taux d'infectiosité des phages pour estimer la viabilité d'une forte densité des bactéries dans des conditions de stress. Cependant, nous ne pouvons pas négliger la capacité du phage à interagir avec une cellule hôte dans ces conditions défavorables. En effet, on peut observer une diminution des titres de phages par rapport à la concentration initiale du virus injecté (P_0). La réduction du titre de phage peut mettre en évidence la capacité des phages à reconnaître et à se fixer à leurs cellules hôtes malgré le stress photocatalytique (Figure 43). Par conséquent, ces "phages engagés" capables de reconnaître les bactéries cibles avec une probabilité de libération de phages, pourraient être utilisés comme outils de diagnostic et de détection des bactéries actives dans l'échantillon testé (eaux usées traitées, échantillons d'aliments...) à court terme (dans les 2 à 4h).

En complément de la première partie de cette étude, et pour comprendre l'influence de la densité bactérienne sur l'infectivité des phages, nous avons déterminé le taux d'infectiosité du phage après prolongation du temps soit après 18h (P').

Lorsque nous avons prolongé le temps de contact, les titres de phages ont été augmentés, démontrant par conséquent la capacité des bactéries stressées et surtout les bactéries qui ont perdus leur capacité de se cultiver sur milieu de culture usuel à assurer le déroulement du cycle phagique et à libérer de nouveaux phages infectieux.

La prolongation du cycle phagique (temps de latence et le temps de lyse) était corrélée à l'état physiologique des bactéries hôtes. Par conséquent, les "phages engagés" ont besoin de plus de temps pour atteindre les objectifs du cycle viral, à savoir la dissémination et la persistance.

L'étude de l'interaction entre les cellules hôtes et les phages lytiques a permis d'apprécier l'existence de bactéries actives parmi la densité bactérienne viable mais non cultivable non encore ressuscitée.

$$N = M + S + I$$

Où; N: la densité totale des cellules hôtes actives; M: Densité des cellules hôtes infectées dans lesquelles les phages "engagés" étaient capables de se lier et d'infecter les cellules avec une probabilité de production de virions (déterminé après une extension du temps de contact; 18 h); S: les densités de cellules hôtes sensibles dans lesquelles la multiplication des phages s'est produite instantanément après l'infection des phages (déterminée après un court temps de contact; 2h); et I: cellule hôte non infectée.

$$M = \alpha + ß + \gamma$$

Où, (α): La densité de cellules hôtes infectées dans lesquelles les phages "engagés" étaient capables d'infecter des cellules hôtes sans probabilité de production de virions (phages défectueux); et (ß): densité des cellules hôtes infectées dans lesquelles le phage est capable d'interagir avec les cellules hôtes avec une probabilité de production de nouveaux phages après une prolongation du cycle phagique; et (γ): bactéries métaboliquement mortes ou encore les bactéries résistantes au phage.

Le risque pour la santé publique n'est pas uniquement fonction de l'abondance des contaminants présents dans l'eau dans le microorganisme, mais aussi de leur capacité à survivre dans les milieux récepteurs et à maintenir leur virulence (Maalej et al. 2004). Il serait important de mettre au point des méthodes sensées et fiables, telles que l'utilisation de phages lytiques spécifiques pour surveiller la qualité microbienne et détecter les bactéries actives sous-estimées par les méthodes d'évaluation conventionnelles.

La détermination du taux d'infectiosité des phages a été utilisée comme biocapteur de l'état physiologique des cellules hôtes cibles, principalement pour les bactéries pathogènes dans un état viable mais non cultivable.

3. Conclusion partielle

Dans cette étude, Notre recherche a été dirigée vers l'amélioration de l'inactivation des bactéries pathogènes par les filtres plantés de macrophytes. Pour ce fait, nous avons proposé d'exploiter d'une part l'activité antagoniste des bactéries et d'autre part des bactériophages spécifiques.

Les résultats issus de l'étude de criblage des isolats bactériens ont montré que la souche bactérienne PFH_1 est la plus antagoniste envers *S.typhi*. La souche PFH_1 a des caractéristiques qui lui confèrent une grande flexibilité pour être manipulée. Elle possède les trois formes de mobilité, elle est productrice de lipase et de protéase. Elle est aussi productrice des métabolites

secondaires tels que les sidérophores. Ces propriétés permettent à la bactérie de résister lors de son injection dans la partie rhizosphérique des filtres plantés.

Après une seule injection de la bactérie antagoniste dans le filtre planté, la cinétique de l'inactivation de *S.typhi* a montré qu'après 3 heures de monitoring, l'injection de PFH_1 au sein de la rhizosphère du filtre planté (**F**) améliore de 1U-Log_{10} la cinétique de l'inactivation de *S. typhi* en comparaison avec le filtre témoin.

En prenant en considération le temps de latence déterminé par la cinétique de croissance de la bactérie PFH_1, l'injection séquentielle de cette dernière dans le filtre **F** a amélioré l'abattement de *S.typhi* de 2U-Log_{10} par rapport au filtre témoin.

Après isolement, purification et amplification des particules phagiques, le spectre d'infectiosité des 3 phages isolés à partir des eaux usées (ϕI, ϕII, ϕIII) a été testé. Le phage ϕII a montré une spécificité pour la souche de *S. typhi* ATCC 560.

La bio-inoculation de phage ϕII spécifique pour la souche pathogène ; *S. typhi* au niveau de la rhizosphère d'un filtre planté de roseaux a permis d'améliorer l'abattement de cette bactérie de 2U-Log_{10}.

En se basant sur l'étude de l'interaction entre le phage et la cellule hôte, le bactériophage peut être utilisé comme un matériel biologique pour la détection des bactéries viables pathogènes et le suivi et le contrôle spécifique d'une ou des bactéries pathogènes potentiellement présentent dans l'eau traitée.

L'utilisation du phage d'intérêt dans cette étude permet d'une part, l'amélioration de l'abattement bactérien et par suite l'optimisation du procédé de traitement par macrophytes et d'autre part le contrôle microbiologique de l'eau.

La bio-inoculation par de(s) phage(s) présente plusieurs avantages à savoir : la spécificité envers les souches pathogènes ciblées, mais reste à optimiser cette technique en tenant compte du cycle phagique (temps de sélection des bactéries permissives, période d'éclipse, temps de maturation...).

Partie III

Utilisation d'un substrat organique pour améliorer la dénitrification : Quantification des bactéries dénitrifiantes par PCR quantitative en temps réel dans deux milieux filtrants

1. Introduction

Au cours des dernières décennies, le développement rapide de l'agriculture, l'industrialisation accélérée, et la demande croissante des ressources en eau causent la pollution des eaux de surface et la détérioration de la qualité des eaux souterraines. En outre, la pollution par les nitrates est considérée comme l'une des principales menaces pour la qualité des eaux souterraines dans les zones agricoles (Zhai et al. 2017). L'excès en nitrates présente des risques potentiels d'eutrophisation et de prolifération d'algues toxiques dans les eaux réceptrices. Les nitrates sont identifiés comme l'un des contaminants dangereux de l'eau de boisson car ils peuvent causer une méthémoglobinémie infantile (syndrome du bébé bleu) et la réduction des nitrates en nitrites dans la salive pourrait induire la formation de nitrosamines, carcinogènes connus. La limite maximale admissible de concentration en nitrates dans l'eau potable est de 50 mg L^{-1} fixée par l'Organisation Mondiale de la Santé (Wang and Chu 2016).

En tant que l'une des technologies écologiques les plus répandues, les filtres plantés de macrophytes constituent un moyen rentable et durable de traitement des eaux usées (Wu et al. 2014a). Ces systèmes peuvent être utilisés avec succès pour éliminer l'azote des effluents à traiter (Vymazal 2009). Dans un filtre planté de macrophytes, trois composantes essentielles participent ensemble à l'élimination du polluant : le substrat ou matériau de remplissage, les plantes et les microorganismes (Li et al. 2014). Le matériau de remplissage constitue un support pour la croissance des plantes et des microorganismes. Il joue également un rôle important dans l'élimination de la charge polluante de l'effluent à traiter grâce à des processus physicochimiques comme la filtration et la sorption (Gorito et al. 2017).

Afin d'améliorer la dénitrification dans les filtres plantés de macrophytes, des chercheurs ont proposé l'utilisation d'un substrat naturel et riche en carbone comme matériau de remplissage. Récemment, certains bioabsorbants comme l'écorce de pin, bagasse de canne à sucre et le liège granulé ont été considérés comme des alternatives intéressantes aux matériaux de substrat commun dans les filtres plantés en raison de leur faible coût (Saeed and Sun 2011, 2013; Shen et al. 2015; Wu et al. 2015c).

Actuellement, avec le développement des outils de la biologie moléculaire, il est possible d'évaluer l'effet de la nature de substrat sur la structure et la diversité de la communauté microbienne dans les filtres plantés de macrophytes (Adrados et al. 2014).

Dans ce travail, l'élimination des nitrates des eaux souterraines issues de l'agriculture a été étudiée, en utilisant un système hybride de filtres plantés de macrophytes (à écoulement

horizontal et vertical) rempli de liège ou de gravier. Les gènes codés pour les enzymes de la dénitrification ont été quantifiés par PCR quantitative en temps réel (qPCR).

2. Résultats

2.1. Performance d'élimination des nitrates

Les résultats d'analyse des paramètres physico-chimiques des eaux souterraines ont enregistré une faible concentration de matière organique pour les deux sites pilotes, à l'exception du mois de novembre à Bellvís où les valeurs de 72 mg L^{-1}et 30,5 mg L^{-1} ont été mesurées respectivement pour la DCO et la DBO_5 (Aguilar et al. 2019).

A Bellvis où le liège a été exploité comme matériau de remplissage des filtres plantés de macrophytes, nous avons enregistré un abattement des nitrates important qui varie de 80% à 99%. Alors qu'avec le gravier à Vilanova, l'abattement des nitrates est faible de 4 à 42 % (Tableau 17). D'après ces résultats, le liège s'avère un bon substrat pour éliminer les nitrates des eaux usées.

Le liège est connu depuis l'antiquité pour sa faible densité, son comportement hydrophobe, son pouvoir élastique élevé, son isolation phonique et électrique. Il présente une structure en nid d'abeille relativement homogène composée de cellules de polyèdre. Chaque cellule est constituée de deux bases hexagonales à faces prismatiques. Le liège est utilisé dans plusieurs applications industrielles, parmi lesquelles les plus connues sont les bouchons en liège pour l'industrie vinicole, les panneaux isolants, les revêtements de sols et de murs, biosorbants, joints adhésifs... (Motte et al., 2017).

La composition chimique du liège, en particulier sa teneur élevée en subérine lui confère la caractéristique d'être un bon adsorbant des polluants des eaux usées. Les bouchons naturels et modifiés ont déjà été étudiés comme adsorbant vis-à-vis de certains métaux tels que le cadmium, le chrome, le cuivre, le nickel, le plomb, le zinc et l'uranium (Lopes et al. 2014).

Tableau 17. Pourcentage d'abattement des nitrates

Abattement des nitrates en %	Juillet	Aout	Septembre	Octobre	Novembre	Decembre
Vilanova	29	22	22	25	4	42
Bellvis	92	99	88	98	80	99

Les principaux paramètres qui affectent la performance de système utilisé dans cette étude sont : La mode de fonctionnement du système soit comme un système hybride (filtre planté à écoulement vertical suivi du filtre planté à écoulement horizontal) soit comme un système de filtre à écoulement horizontal, le type de substrat utilisé (gravier ou liège) et la charge en nitrates. L'eau traitée a été utilisée pour irriguer la végétation utilisée comme système complémentaire pour le contrôle et l'amélioration des eaux souterraines à l'échelle locale.

2.2.PCR quantitative en temps réel

2.2.1. Les courbes d'étalonnages

La PCR quantitative en temps réel a servi pour déterminer le nombre de copies des gènes codant pour l'*ARN 16S*, *nirS* et *nosZ*.

Afin de quantifier les gènes qui codent pour les enzymes de dénitrification *nirS* et *nosZ*, Les Courbes d'étalonnages pour la PCR en temps réel ont été établis suite à des dilutions en cascade des amplicons d'ADNr 16S et des gènes *nirS* et *nosZ* résultant de la PCR conventionnel (figure 44).

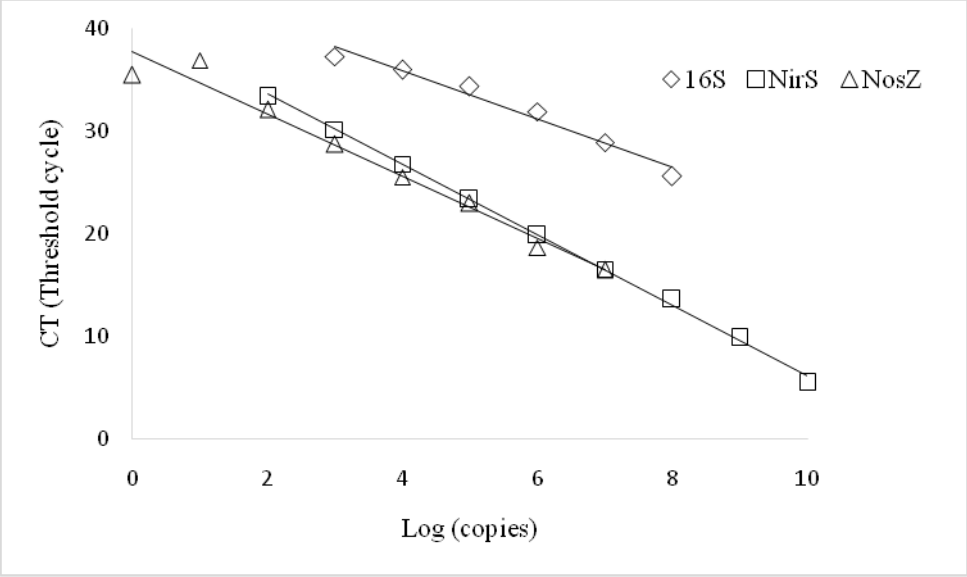


Figure 44. Courbes d'étalonnage de l'ADNr *16S*, *nirS*, and *nosZ* assays

nirS: y=-3,43x + 40,45, R2: 0,9987; nosZ: y=-3,03x + 37,70, R2 : 0,972 16S: y=-2,35x + 45,25, R2: 0,9703

2.2.2. Quantification des gènes *nirS* et *nosZ*

Le nombre de copies des gènes nirS et nosZ dénitrifiants dans les deux substrats, le liège et le gravier, ont été déterminés par PCR en temps réel (Figure 45). Les résultats ont montré des quantités significatives pour les deux communautés dénitrifiantes. *NosZ* a montré des

niveaux significatifs plus élevés (p = 0,05) pour le système de liège chez Bellvis, alors que pour les gènes *nir*S, les différences n'étaient pas significatives (p =0,18). Les résultats n'ont pas révélé de différences significatives entre différents traitements.

Le liège est un produit naturel de composition chimique complexe, composé principalement de subérine, de lignine, de cires et de polysaccharides (cellulose et hémicellulose), qui sont des composants structurels, mais comprennent également d'autres extractibles tels que les tanins (Dordio, et al., 2017). De nos résultats, il semble clair que les sources de carbone disponibles du liège favorisent la croissance bactérienne dénitrifiante, et stimulent la présence des gènes *nosZ* et *nirS*. Avec ses conditions anaérobies, les filtres plantés à écoulement horizontal (HSSF) développent la croissance de la communauté dénitrifiante (Vymazal 2013b).

La comparaison entre deux milieux filtrants, le liège et le gravier, a montré que le liège pourrait être un bon milieu granulaire pour éliminer les nitrates par filtres plantés de macrophytes. En effet, les résultats des analyses physicochimiques et microbiologiques ont été cohérents et confirment bien l'efficacité de l'élimination des nitrates en utilisant le liège comme milieu filtrant.

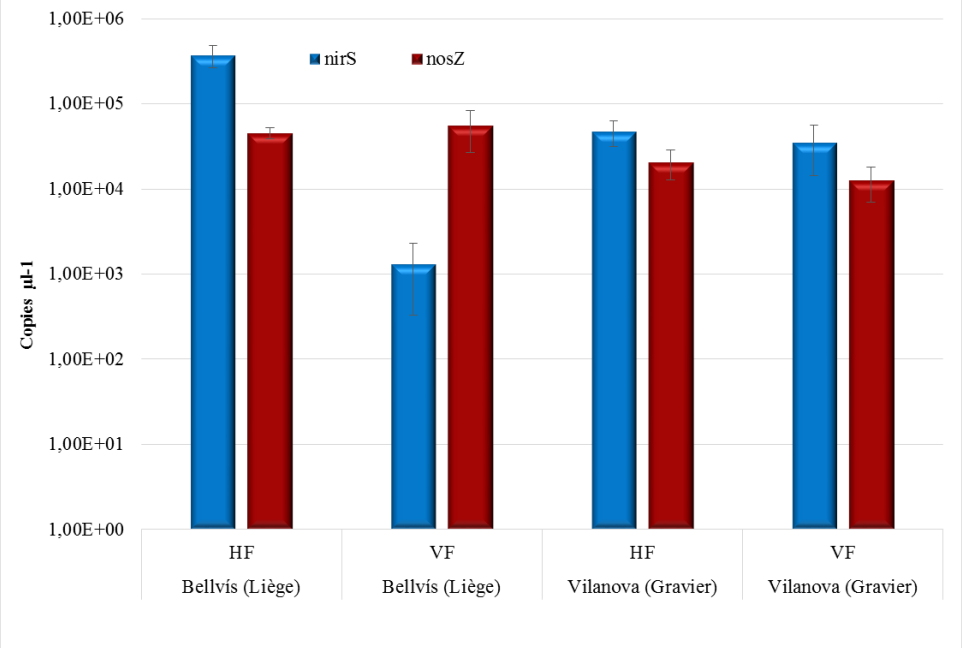


Figure 45. Nombre de copies des gènes *nirS* et *nosZ* dans les différens filtres plantés de macrophytes en Bellvis (cork) et Vilanova de la Barca (gravel)

3. Conclusion partielle

Dans cette étude, l'amélioration des filtres plantés de macrophytes a été basée essentiellement sur l'utilisation de liège comme matériau de remplissage. Deux pilotes

expérimentaux ont été installés dans deux régions agricoles à Catalogne pour traiter les eaux contaminées par les nitrates issues des activités agricoles. Ces pilotes se diffèrent entre eux par la nature de matériau de remplissage : l'un a été rempli par le gravier et l'autre par le liège.

La PCR quantitative en temps réel a été utilisée pour quantifier deux gènes codant pour deux enzymes impliquées dans la dénitrification (*nirS* codant pour la nitrite réductase cd1 et nosZ codant l'oxyde nitreux réductase). Des analyses physicochimiques et microbiologiques ont été réalisées afin de déterminer l'effet de liège sur la communauté bactérienne dénitrifiante. Dans cette recherche, les deux gènes ont été abondants dans les deux types de substrat liège et gravier. Le *NosZ* a montré des niveaux significatifs plus élevés ($p = 0,05$) pour le système de liège chez Bellvis, alors que pour les gènes *nirS*, les différences n'étaient pas significatives ($p = 0,18$).

Les résultats obtenus ont montré bien que l'élimination des nitrates a été améliorée avec le système de filtres plantés remplis de liège en Bellvís. De ce fait, le liège pourrait être un matériau alternatif pour éliminer les nitrates et minimiser leur impact sur l'environnement. En plus de la nature de matériau filtrant, le type de traitement par les filtres plantés de macrophytes : horizontal ou vertical a également un effet sur la structure de la communauté bactérienne dénitrifiante.

En conséquence, l'utilisation d'un substrat naturel avec une technologie écologique naturelle pourrait présenter une approche innovante et efficace pour l'élimination de la pollution dans les bassins hydrographiques, tout en améliorant l'économie circulaire des activités agricoles.

L'utilisation du liège comme matériau de remplissage dans les filtres plantés de macrophytes présente une idée originale et dirige notre recherche vers d'autres perspectives. La quantification de la caummunauté bactérienne dénitrifiante au sein des filtres plantés constitue une étude fondamentale pour confirmer le rôle important que peut jouer un substrat naturel pour améliorer l'abattement d'un nutriment des eaux usées. Dans ce sens, notre vision est d'appliquer cette méthode simple et naturelle pour éliminer un nutriment autre que les nitrates des eaux usées. Ainsi, le liège peut être exploité de différentes manières à savoir il peut être additionné au gravier dans un bassin à macrophytes déjà existant, comme il peut être utilisé seul pour former une étape de traitement en amont d'un système à macrophytes. En outre, d'autres recherches restent à réaliser pour définir les caractéristiques que possède un support en liège. Dans le chapitre suivant, nous avons essayé de dégager quelques caractéristiques du liège qui confirme son pouvoir épuratoire.

Partie IV

Amélioration de la dénitrification dans les filtres plantés de macrophytes par nanobiostimulation

1. Introduction

La nanotechnologie est une science fascinante récemment intégrée dans plusieurs domaines. Elle connue un essor important depuis ces dernières années à l'échelle mondiale. Dans le domaine de traitement des eaux, les nanoparticules sont utilisées principalement comme adsorbants ou dans la photocatalyse. Les nanomatériaux sont d'excellents adsorbants, catalyseurs et capteurs en raison de leur grande surface spécifique et de leur grande réactivité. Récemment, il a été démontré que plusieurs nanoparticules naturelles et modifiées avaient de fortes propriétés antimicrobiennes, notamment le chitosane, les nanoparticules d'argent (nAg), le TiO_2 photocatalytique, le fullerol, les nanoparticules de fullerène aqueuses (nC60) et les nanotubes de carbone (CNT) (Qilin et al. 2008). L'effet des nanoparticules sur les microorganismes varie principalement selon la nature des nanoparticules et la dose testée (Zhang et al. 2006).

L'activité antimicrobienne des nanoparticules de TiO_2 a été bien abordée dans plusieurs études**.** Par ailleurs, il y a très peu d'études qui s'intéressent à l'impact de TiO_2 sur une fonction microbienne spécifique telle que la dénitrification et même son impact sur la structure de la communauté microbienne (Li et al. 2016).

Dans ce chapitre, la bioinoculation, l'utilisation d'un substrat naturel et la nanobiostimulation ont été étudié afin d'améliorer l'abattement des nitrates par les filtres plantés de macrophytes.

L'objectif principal de ce travail est d'adapter une souche bactérienne à une concentration bien déterminée des nanoparticules de TiO_2 afin de stimuler l'expression des gènes de dénitrification avant qu'elle soit injectée dans le filtre planté de macrophytes rempli de liège ou de gravier. Dans notre étude, l'effet de TiO_2 sur la souche PFH1 sélectionnée comme une souche dénitrifiante a été évaluée. En effet, la souche étudiée a été mise en contact avec des doses croissantes de TiO_2. L'évaluation de son activité dénitrifiante a été suivie par analyse chromatographique. Notre objectif est de déterminer la dose optimale des nanoparticules qui permet de stimuler la dénitrification.

2. Résultats

2.1. Caractérisation des matériaux de remplissage : gravier et liège par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ou FTIR)

Après l'analyse de liège et de gravier par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRAffinity-1 SHIMADZU), les spectres de la figure 46 ont été obtenus. Différents pics (bandes d'absorptions) plus ou moins larges ont été enregistrés. Chaque pic est compris entre deux nombres d'ondes qui sont liés en réalité à des liaisons chimiques. En effet, le spectre infrarouge du gravier montre trois pics remarquables de 2280 cm^{-1} à 2320 cm^{-1}, de 2380 cm^{-1} à 2460 cm^{-1} et de 2610 à 2720 cm^{-1} avec une transmittance (en %) qui varie de l'un à l'autre. Le gravier est un matériau minéral granuleux et non consolidé produit par la désagrégation naturelle des roches causée par l'altération atmosphérique.

Le spectre infrarouge du liège présente des pics d'intensités différentes (faible, moyenne ou forte) en fonction du nombre d'onde. Un pic entre 800 et 1000 cm^{-1} de faible intensité, un autre de 1900 à 2900 cm^{-1} d'intensité très forte et un autre pic de 3000 à 3200 cm^{-1} de faible intensité ont été enregistrés.

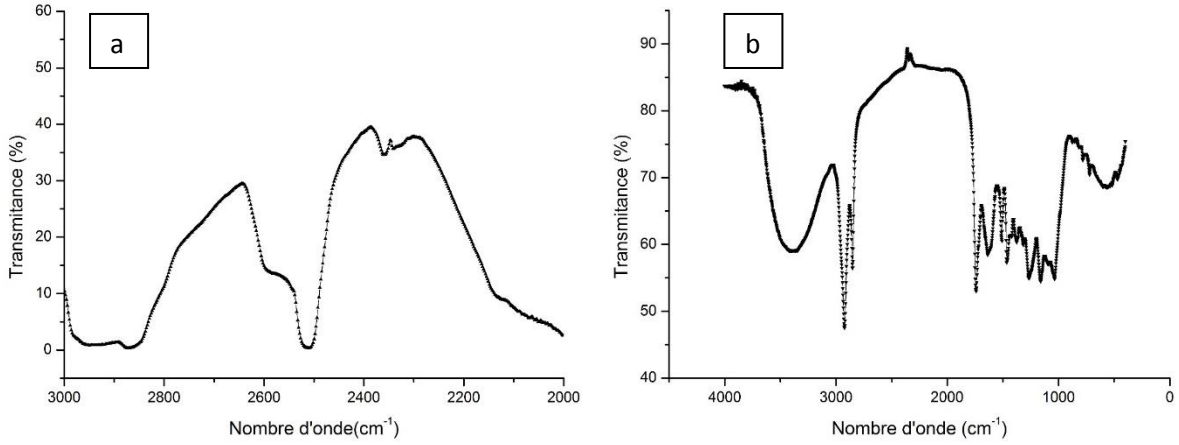


Figure 46. Spectres IR du gravier (a) et du liège (b)

Le bois et ses composants ont fait l'objet d'études analytiques, notamment par spectroscopies Raman et infrarouge. Il peut être identifié par la reconnaissance des bandes de vibration de la cellulose et de la lignine, ses principaux constituants. Le spectre est caractérisé par des bandes dominantes qui correspondent à la liaison C – H à 2 923, 2 850, 1 464 et 1 373 cm^{-1}. Les liaisons C – H aliphatiques et oléfiniques sont abondantes dans la subérine. Une bande de C = O intense à 1 741 cm − 1 et une bande de C – O – C avec deux pics situés à 1 161 et 1257 cm^{-1} à partir d'esters en unités subordonnées. De plus, la large bande à 3 450 cm^{-1} indique

la présence de groupes OH. Le pic à 1 511 cm^{-1} correspond à la liaison C = C dans le cycle aromatique dans la lignine. Les unités polysaccharidiques sont caractérisées par les pics à 1.031 et 1.089 cm^{-1} qui correspondent à C – H et C – O. Le pic à 1 610 cm^{-1} correspond à l'étirement C = C dans le cycle aromatique de la subérine ou aux composants extractifs du liège. Les profiles FTIR obtenus sont en accord avec ceux publiés par des recherches antérieurs (Cordeiro et al. 1998; Lopes et al. 2014).

La composition chimique du liège est : 45% subérine, 27% lignine, 12% cellulose et polysaccharides, 6% tanins, 5% cires, 5% cendres et autres composants. Alors que sa composition organique contient le Carbone (C), l'Oxygène (O), l'Hydrogène (H) et l'Azote (N) (Lopes et al. 2014).

2.2. Etude de la formation du biofilm sur le liège et le gravier

L'évaluation de l'aptitude de matériau (liège ou gravier) à supporter le biofilm a été réalisée en mesurant la masse de biofilm formée par particule ainsi par estimation de la biomasse formée en mesurant l'absorbance à 600nm (Figure 47).

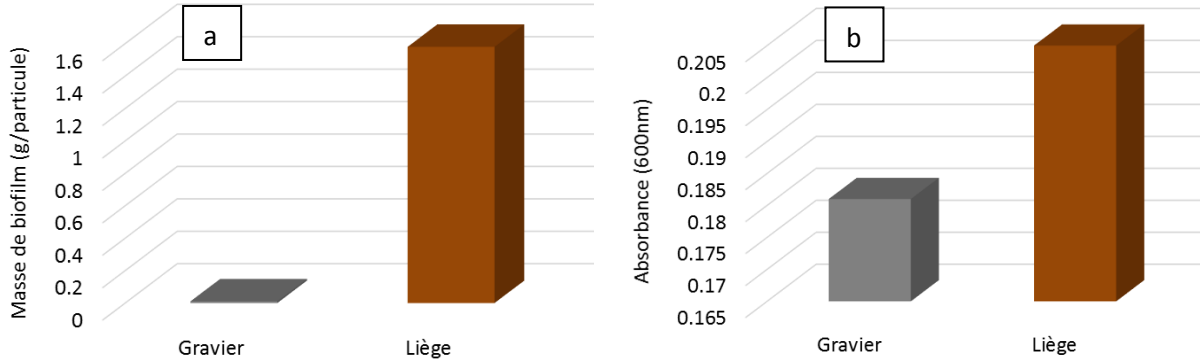


Figure 47. Susceptibilité de liège et de gravier à supporter le biofilm bactérien (a)Masse de biofilm formé en Gramme par particule. (b) Absorbance du biofilm formé par 20g de substrat à 600nm.

Les résultats obtenus ont montré une différence nette entre les deux supports testés. En effet le liège est avéré comme étant le plus susceptible à être colonisé par la biomasse bactérienne et donc un bon support pour le biofilm bactérien. On constate aussi que le liège est plus apte à la formation de biofilm que le gravier grâce à sa structure poreuse, d'où dans le cas de liège la masse de biofilm formée atteint 1,58g par particule alors qu'elle est trop faible de l'ordre de 0,01g dans le cas de gravier.

De même pour l'absorbance du biofilm formé par 20g de substrat (liège et gravier) et mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à 600nm, on remarque que cette absorbance se diffère pour les deux substrats étudiés, elle est d'une valeur de 0,181 pour le gravier alors

qu'elle est plus importante chez le liège et atteint presque le double 0,205. Par conséquence, le liège constitue le matériau le plus adéquat pour la formation du biofilm par rapport au gravier.

2.3. Cinétique d'abattement des nitrates : Comparaison entre le liège et le gravier

Pour évaluer les performances épuratoires sur l'abattement des nitrates des deux substrats testés (le liège et le gravier), le suivi de l'assimilation des nitrates au cours du temps a été réalisé (Figure 48).

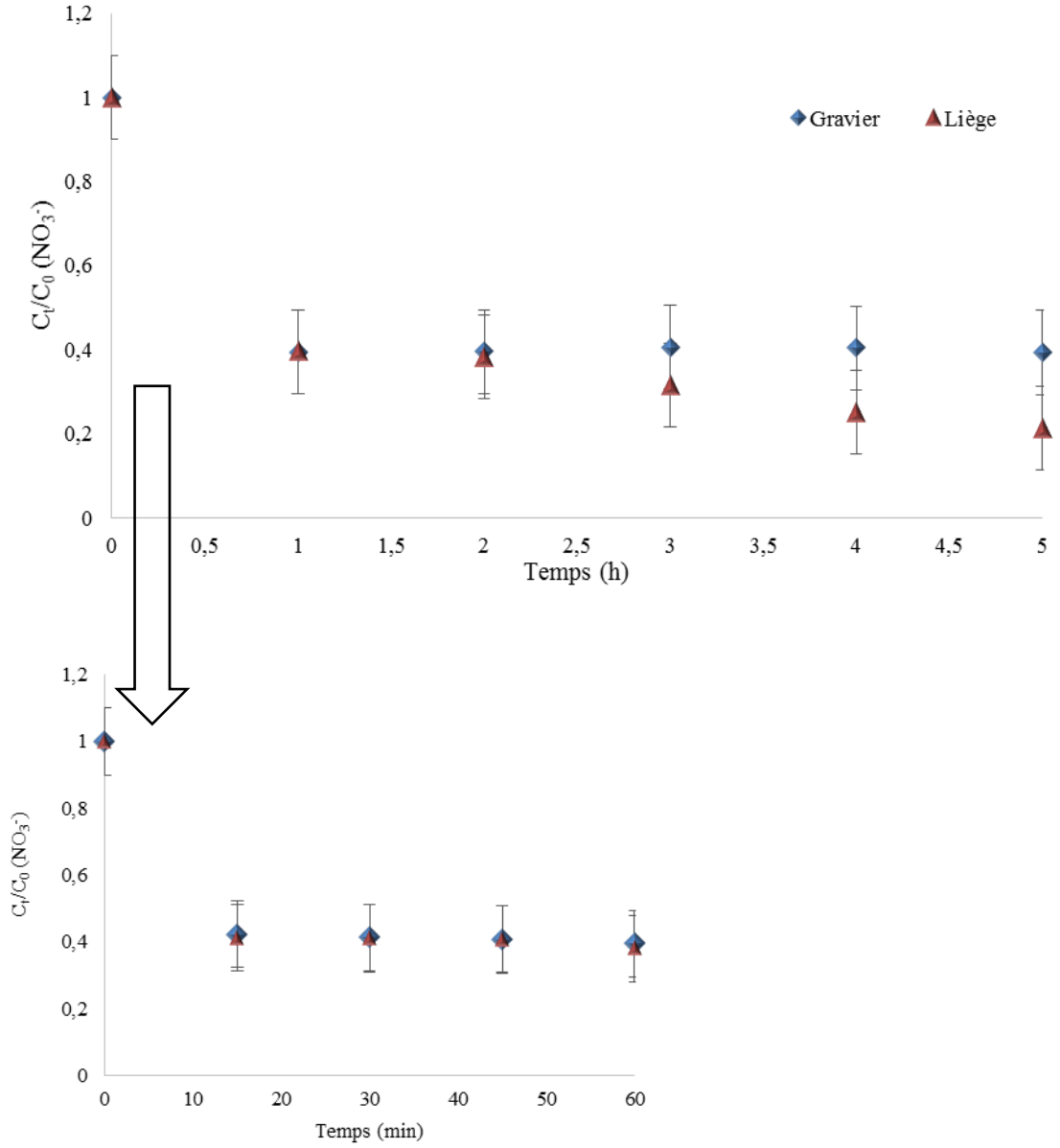


Figure 48. Cinétique d'abattement des nitrates au cours du temps par les deux types de filtres plantés (liège et gravier) avec une concentration initiale de $[NO_3^-]_{initiale}$ = 90mg/L. (a) au cours du temps de suivi ; (b) au cours de la première heure

D'après la cinétique d'abattement des nitrates au cours du temps par les deux types de filtre planté (liège et gravier), et avec une concentration initiale (90mg/L), une différence significative entre la cinétique d'abattement des nitrates en utilisant le liège comme matériau de remplissage et celle en utilisant le gravier. L'abattement des nitrates a été amélioré avec le liège. En effet, Après 5 heures de suivi la concentration des nitrates enregistrée pour le gravier et le liège vaut respectivement 35 mg/L et 19 mg/L. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents (Chapitre 3). Ce qui confirme bien l'efficacité de liège dans l'élimination de certains polluants des eaux usées notamment les nitrates. En effet, le liège constitue un environnement propice pour le développement de la biomasse microbienne dénitrifiante au niveau de la rhizosphère, Ce qui augmente la performance épuratoire de système de traitement des eaux usées étudié.

Une chute brusque de la concentration en nitrates dès la première heure de la mise en contact de la solution en nitrates avec les différents composants du système expérimental. Pour mieux apprécier cette chute, des prélèvements rapprochés (chaque 15 min) ont été réalisés et toujours la même constatation a été notée. En effet, cet abattement remarquable des nitrates dès la première heure peut être expliqué par les différents mécanismes intervenant dans l'élimination de la pollution des eaux usées par les filtres plantés de macrophytes en particulier le rôle des plantes et de matériau de remplissage (voir chapitre I). Pour expliquer ce résultat, différentes hypothèses peuvent être proposées à savoir : la filtration mécanique du polluant à travers le matériau de remplissage ou par les racines des plantes qui forme un réseau à l'intérieur du système. Ainsi les nitrates peuvent être rapidement assimilés par la plante. Ces nutriments sont essentiels pour la croissance de ses tissus (Márquez et al. 2005), ils peuvent être emmagasinés dans les racines et rhizomes, les tiges et les feuilles (O.S. Kucuk, F. Sengul 2004) ce qui explique leur diminution dans les deux filtres plantés.

2.4. La bioinoculation de la souche PFH1

2.4.1. Estimation de la biomasse rhizosphérique avant et après inoculation de la souche PFH1

Afin d'évaluer la bonne intégration de la souche d'intérêt au niveau de la biomasse rhizosphérique du prototype expérimental, la biomasse bactérienne a été estimée par mesure de l'absorbance par spectrophotomètre UV-Vis à 600nm. Pour ce fait, des prélèvements avant et après inoculation à partir des bassins remplis de gravier et de liège ont été effectués.

D'après les histogrammes (figure 49), la biomasse bactérienne augmente après l'inoculation pour les deux prototypes de liège et de gravier. En présence de liège elle passe de 0,012 à 0,078 après inoculation de la souche PFH1. De même pour le gravier, cette biomasse rhizoshérique passe d'une valeur de 0,004 à une valeur de 0,071 après inoculation. Ce qui montre bien que la souche d'intérêt PFH1 a bien colonisé la rhizosphère.

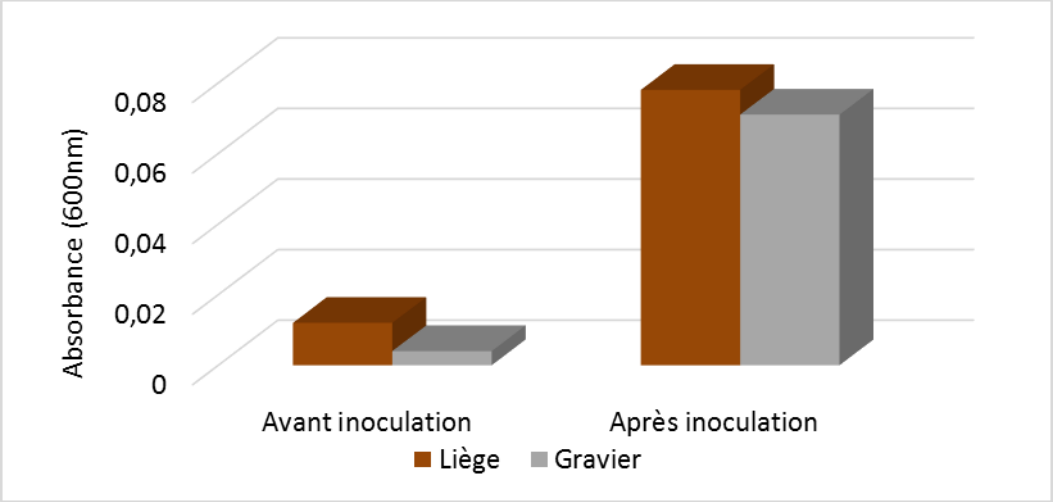


Figure 49. Histogrammes de l'estimation de la biomasse rhizosphérique avant et aprés bioinoculation de la souche (PFH1).

2.4.2. Cinétique d'abattement des nitrates en présence de l'inoculum bactérien

La Figure 50 montre les différentes courbes de cinétique d'abattement des nitrates avec filtres de liège non inoculé, liège inoculé, gravier non inoculé et gravier inoculé.

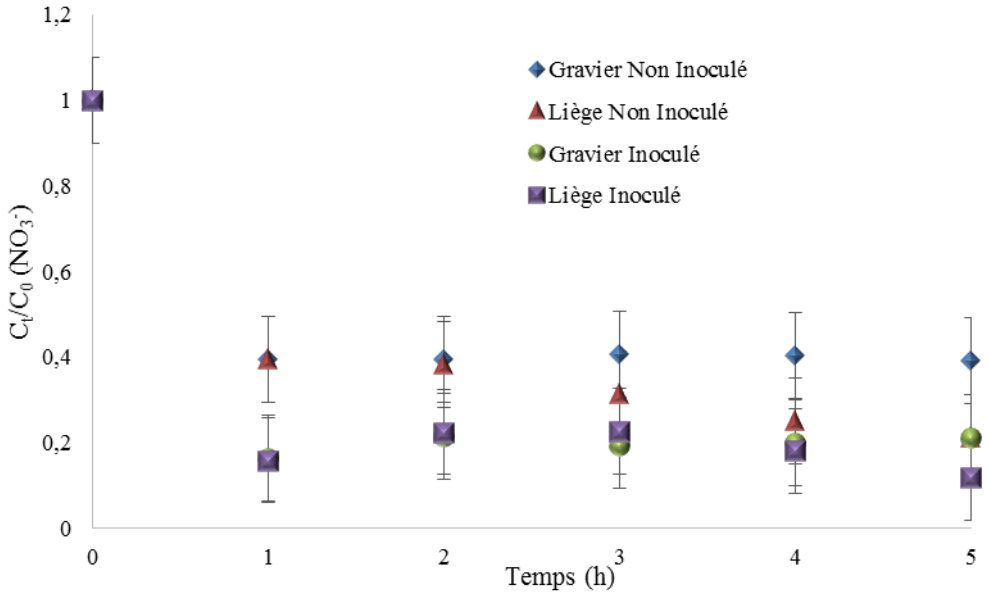


Figure 50. Cinétique d'abattement des nitrates par filtres plantés (support gravier et liège inoculés et non inoculés) avec une concentration initiale de $[NO_3^-]_{initiale}$ = 90mg/L.

Après 5 heures de suivi, la concentration des nitrates a diminué de 90 mg/L à 35,36 mg/L pour le gravier non inoculé, de 90mg/ L à 19,15 mg/L pour le liège non inoculé, de 90mg/L à 19,36 mg/L pour le gravier inoculé et de 90mg/L à 0,204mg/L pour le liège inoculé.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que l'injection de l'isolat bactérien PFH1 au sein de la rhizosphère du mini filtre (inoculé) a permis d'améliorer sa performance en terme de dénitrification par rapport au témoin**.** La comparaison entre les différentes cinétiques d'abattement des nitrates obtenues montre que le meilleur abattement est obtenu dans le cas de filtre de liège inoculé.

2.5. Effet d'une nanoparticule, le dioxyde de Titane (TiO_2) sur la dénitrification

2.5.1. Test quantitatif

Afin d'améliorer la dénitrification de la souche bactérienne la plus dénitrifiante (PFH1), on a ajouté à celle-ci des concentrations bien déterminées de TiO_2. Après 7 jours d'incubation la concentration restante en nitrate a été mesurée à l'aide de la chromatographie ionique. La variation de l'assimilation des nitrates par la souche PFH1 en présence de TiO_2, est présentée par la figure 51.

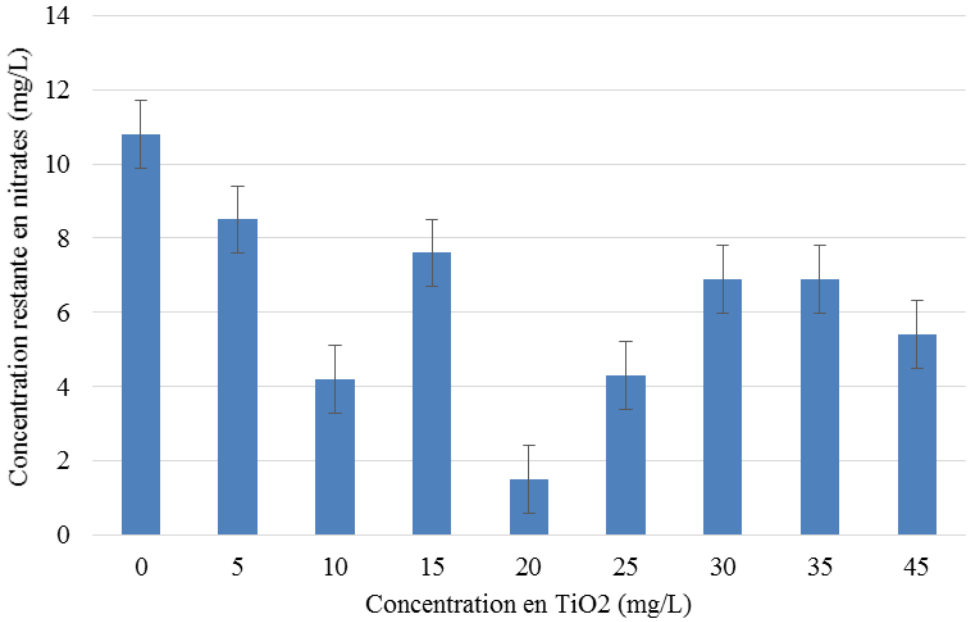


Figure 51. Histogrammes de la cinétique d'abattement des nitrates avec la souche PFH1 à différentes concentrations de TiO_2.

Les résultats obtenus montrent que l'assimilation des nitrates par la souche PFH1 en présence de TiO_2 varie selon la concentration utilisée en TiO_2. En effet, l'abattement des nitrates en présence de TiO_2 s'améliore par rapport au témoin (Absence de TiO_2). La concentration de 20mg/L de TiO_2 est avérée la concentration optimale pour un abattement efficace des nitrates.

2.5.2. Application d'un inoculum bactérien en présence de TiO_2 pour l'amélioration de l'effet rhizosphérique d'un système de traitement des eaux usées par filtre planté de macrophytes à écoulement horizontal

Afin d'améliorer l'effet rhizosphérique de ce système de traitement des eaux usées par filtre planté de macrophytes, on a utilisé les nanoparticules de TiO_2 en présence de l'inoculum bactérien PFH1. Le tableau 18 montre la différence d'abattement entre filtres plantés remplis de (gravier, gravier inoculé, gravier inoculé par la souche adaptée au TiO_2) et (liège, liège inoculé, liège inoculé par la souche adaptée au TiO_2) au bout d'une heure.

Tableau 18 . L'abattement des nitrates au bout d'une heure

	Gravier	**Liège**
Non inoculé	0,6	0,6
Inoculé	0,71	0,84
Inoculé par la souche adaptée au TiO_2	0,83	0,84

D'après ce tableau on constate que l'abattement des nitrates augmente progressivement au bout d'une heure dans le cas des filtres remplis de gravier et de liège. En effet on remarque que dans le cas du filtre de gravier (non inoculé) l'abattement est de l'ordre de 0,6. Cet abattement passe à 0,71 en cas de filtre de gravier inoculé avec la souche PFH1 et atteint la valeur maximale de 0,83 dans le cas de filtre de gravier inoculé par la souche PFH1 adaptée au TiO_2.

En présence de liège, l'abattement des nitrates est de l'ordre de 0,6 dans le cas de filtre de liège (non inoculé), cet abattement passe à 0,84 en cas de filtre de liège inoculé avec la souche PFH1 et dans le cas de filtre de liège inoculé par la souche PFH1 adaptée au TiO_2.

Par suite en comparant l'abattement obtenu par les deux substrats, on peut déduire que l'abattement des nitrates en cas de filtre de gravier inoculé par la souche PFH1 adaptée au TiO_2 est presque égale l'abattement des nitrates en cas de filtre de liège inoculé (avec la souche PFH1).

Les résultats préliminaires obtenus nous amènent à pousser notre recherche vers l'application d'une inoculation (par une seule ou plusieurs souches bactérienne d'intérêts) nanostimulée(s) par le dioxyde de titane pour améliorer la performance épuratoire d'un filtre planté de macrophytes existant dont le matériel de remplissage est le gravier (station El Menzah). La figure 52 montre les résultats en rendement (%) obtenus avec les deux substrats utilisés calculé après 5 heures de suivi de la réduction des nitrates.

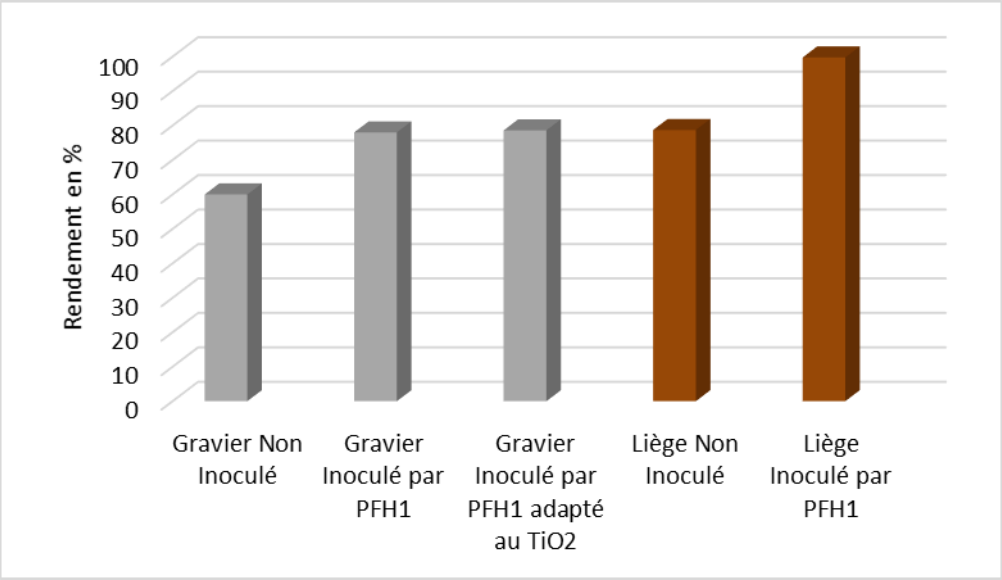


Figure 52. Le rendement épuratoire obtenu en % par les deux matériaux de remplissage.

D'après la figure 52, le rendement épuratoire est de plus en plus important en passant du filtre non inoculé vers le filtre inoculé par la souche PFH1. En effet ce rendement est de l'ordre de 60% pour le filtre de gravier non inoculé alors qu'il atteint une valeur de 78% dans les deux cas du filtre de gravier inoculé par la souche PFH1 et de gravier inoculé par la souche PFH1 adapté au TiO_2. Ce rendement est plus important dans le cas de filtre de liège, il est égale à 78% en présence de filtre de liège non inoculé alors qu'il atteint le maximum dans le cas de filtre de liège inoculé par la souche PFH1 avec un rendement de 99%. En effet le filtre planté de gravier inoculé par la souche PFH1 adapté au TiO_2 a le même rendement que le filtre de liège non inoculé (78%), d'où on peut déduire que le liège (inoculé et non inoculé) est plus efficace comme matériau de remplissage puisqu'il présente un meilleur rendement par rapport au gravier.

3. Conclusion partielle

Notre objectif principal est toujours l'amélioration de la performance épuratoire des filtres plantés de macrophytes. La démarche suivie dans ce chapitre était de confirmer le pouvoir épuratoire de liège à éliminer les nitrates, de combiner le liège et la bioinoculation des souches d'intérêt et particulièrement d'exploiter l'action des nanoparticules sur les gènes de dénitrification.

Le rendement épuratoire est de l'ordre de 60% pour le filtre rempli de gravier non inoculé alors qu'il atteint une valeur de 78% dans les deux cas du filtre de gravier inoculé par la souche PFH1 et de gravier inoculé par la souche PFH1 adapté au TiO_2. Ce rendement est plus important dans le cas de filtre de liège, il est égale à 78% en présence de filtre de liège non inoculé alors qu'il atteint le maximum dans le cas de filtre de liège inoculé par la souche PFH1 avec un rendement de 99%.

La stimulation de la bioinoculation par l'ajout de dioxyde de titane (TiO_2), a montré une amélioration concernant l'abattement des nitrates présents dans les filtres plantés de macrophytes.

En effet cette inoculation de la souche dénitrifiante nanostimulée par le dioxyde de titane permet d'améliorer le processus d'élimination de nitrate au niveau du filtre planté de macrophytes existant.

Les essais de la nanostimulation réalisés constituent un nouvel axe de recherche dans notre étude. Comme perspective, une étude moléculaire est nécessaire pour évaluer la réponse des gènes impliqués dans la dénitrification en présence de TiO_2.

Partie V

Discussion générale des résultats

Discussion générale

Nombreuses études ont montré l'efficacité des filtres plantés de macrophytes dans le traitement des eaux usées de différentes provenances. En se basant sur des phénomènes naturels, la pollution est éliminée à un coût significativement inférieur à ceux des techniques conventionnelles de traitement, résultat confirmé par plusieurs auteurs et dans plusieurs régions dans le monde (Decamp and Warren, 2000; Ghrabi et al., 2011; Kato et al., 2013; Gruyer et al., 2013; Alfredo et al., 2016; Cui et al., 2016; Diaz and Nadu, 2016; Carvalho et al., 2017; Aguilar et al., 2019).

Dans un filtre planté de macrophytes, la plante joue un rôle primordial dans l'épuration des eaux usées. Elle libère au niveau rhizosphérique de l'oxygène et des exsudats racinaires qui stimulent la multiplication et l'abondance des microorganismes (Lünsmann et al., 2016). Toutefois, la performance de ces systèmes est limitée par les conditions opératoires d'où la nécessité d'intervenir pour garder leur meilleure performance.

Récemment, des recherches ont été orientées vers le développement des systèmes de filtres plantés de macrophytes pour apporter une amélioration dans les performances épuratoires (Zaytsev et al. 2011; Hussain et al. 2012; Wakako et al. 2013; Meng et al. 2014; Shao et al. 2014; Shehzadi et al. 2014; Wu et al. 2015b; Liu et al. 2015; Shen et al. 2015; Tee et al. 2015; Pei et al. 2016; Ilyas and Masih 2017). Les travaux de recherche entrepris dans cette thèse vont dans cette orientation et notre objectif principal est d'améliorer la performance épuratoire des systèmes de traitement des eaux usées par filtres plantés de macrophytes pour renforcer l'abattement des nitrates et des bactéries pathogènes dans le système.

La bioinoculation ou bioaugmentation a été définie comme étant l'ajout des microorganismes au système étudié afin de renforcer la communauté microbienne y existante (Herrero and Stuckey 2014). Selon notre étude, la bioinoculation de la souche PFH_1 MG770377 a permis un abattement important des nitrates par rapport au témoin. Après 18 h, une concentration initiale de 8,75 mg/L de NO_3^- est totalement assimilée au niveau du filtre inoculé par la souche d'intérêt alors qu'au niveau du le filtre témoin, nous avons enregistré une concentration résiduelle égale à 1mg/L de NO_3^-.

Par une seule inoculation de la bactérie antagoniste PFH_1, l'élimination des bactéries pathogènes est également améliorée de 1,6 U-Log10. Au niveau de filtre témoin, l'inactivation des bactéries pathogènes est due à la biomasse autochtone, alors que dans le filtre inoculé,

l'addition de la souche antagoniste améliore significativement l'inactivation des bactéries pathogènes. Par une série de bioinoculation, la réduction des bactéries pathogènes a été améliorée par rapport au filtre de 2 U-Log10 (N /N_0). L'injection des phages spécifiques a permis de réaliser un abattement de *S. typhi* de 3U-Log_{10} au niveau du filtre inoculé (**F**) contre un abattement de 2U-Log_{10} déterminé au niveau du filtre témoin (**T**), après 4,5 heures. L'injection du phage au sein de la rhizosphère du filtre planté (**F**) améliore la cinétique de l'inactivation de *S. typhi* en comparaison avec le filtre témoin.

Zhao et al. (2019) ont appliqué la bioaugmentation de deux souches bactériennes *Pseudomonas* sp. ZXY-1 et *Arthrobacter* sp. ZXY-2 pour améliorer la dégradation d'atrazine (herbicide). Leur objectif était d'évaluer l'effet de la bioinoculation sur la dégradation de l'atrazine et sur la communauté microbienne autochtone. Deux pilotes de laboratoires composés de filtres plantés de macrophytes (*Acorus calamus*) et remplis par un sol pris d'une usine polluée par l'atrazine. Les systèmes ont été alimentés par une solution synthétique renfermant 5mg/L d'atrazine. Après 33 jours de fonctionnement, un abattement d'atrazine de 87,1% a été enregistré, alors que le filtre témoin n'a pas dépassé 20,22%, ce qui a confirmé l'apport de la bioinoculation des bactéries d'intérêt pour l'élimination de l'atrazine.

Al-Baldawi et al. (2017) ont appliqué la bioaugmentation pour améliorer l'élimination des hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) dans les filtres plantés de macrophytes. Un consortium de trois souches bactériennes rhizosphériques (*Bacillus aquimaris, Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus*), qui ont la capacité d'utiliser des composés hydrocarbonés comme seules sources de carbone, a été injecté dans les filtres plantés par *Scirpus grossus*. Les résultats ont montré des abattements de l'ordre de 72% et 84% pour, respectivement, les filtres témoin et inoculé par les bactéries.

Pour corriger le dysfonctionnement des systèmes de traitement des eaux usées à basse température, Liu et al. (2018) ont sélectionnés sept souches bactériennes psychrophiles pouvant se développer à des basses températures (nitrifiantes et dénitrifiantes). Deux stratégies ont été suivies pour la bioaugmentation : la première a consisté en une injection directe des bactéries sélectionnées et la deuxième stratégie a consisté à enrober les bactéries avant leur injection dans le système de traitement des eaux usées. Les résultats obtenus sont montré l'efficacité de la bioaugmentation dans l'amélioration de l'abattement de $NH4^+$-N à des basses températures.

Wan et al. (2018) ont appliqué la bioaugmentation pour améliorer l'élimination des microcystines (toxines) par filtres plantés de macrophytes. Après 7 jours de l'injection d'un consortium de trois bactéries d'intérêt *Sphingopyxis, Methylotenera* et *Pseudomonas* , ils ont

noté une amélioration dans l'élimination des microcystines. La figure 53 montre l'élimination des microcystines dans les filtres plantés de macrophytes avec et sans bioaugmentation. Après 12h, la concentration de microcystines a enregistré une diminution significative pour le filtre planté avec bioaugmentation par rapport au témoin. Pour le filtre non planté, une diminution légère de la concentration des microcystines a été enregistrée et attribuée par les auteurs à la photodégradation. L'analyse microbiologique (figure 53b) a montré une abondance moins élevée de l'ADN 16S dans le filtre avec bioaugmentation. Ceci est dû à la compétition des bactéries exogènes avec la population bactérienne autochtone. Le gène *mlrA* codant pour l'enzyme de dégradation des microcystines est significativement plus abondant dans le filtre planté de macrophytes avec bioaugmentation par rapport à celui sans bioaugmentation. Les résultats obtenus ont bien confirmé que les systèmes de filtres plantés de macrophytes peuvent supporter la croissance des bactéries exogènes et maintenir leur activité.

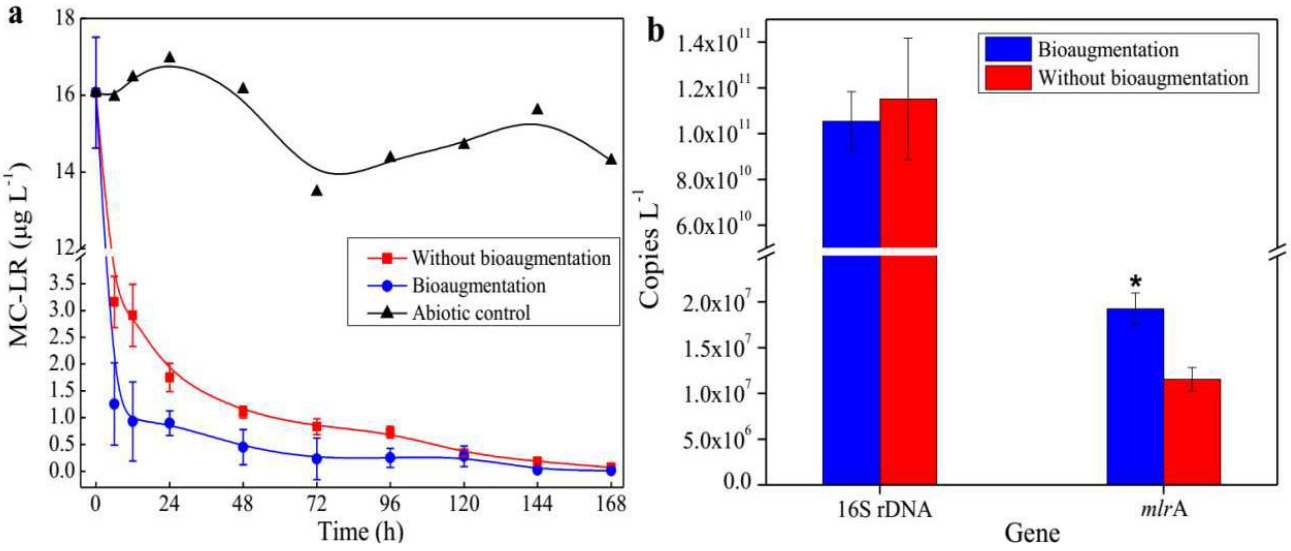


Figure 53. Effet de la bioaugmentation dans l'élimination des microcystines et abondance des gènes dans les filtres plantés de macrophytes (Wan et al. 2018).

Le modèle de Chick-Watson est le plus connu et le plus employé pour décrire l'inactivation des microorganismes dans un réacteur du fait de sa simplicité et de ses bons résultats (Watson 1908). Il corrèle assez bien les données expérimentales pour un certain nombre de désinfectants et de microorganismes (Lambert and Johnston 2000).

Dans le premier et le deuxième chapitre de cette thèse, ce modèle mathématique a été adapté pour décrire l'abattement des nitrates et l'inactivation des bactéries pathogènes (tableau 19). Les constantes cinétiques ainsi déterminés sont récapitulés dans le tableau 20. Les résultats obtenus ont montré que le coefficient cinétique (**k**) déterminé à partir de l'abattement dans le filtre planté inoculé par les bactéries d'intérêt, est toujours supérieur à celui déterminé dans le

cas de filtre planté témoin non inoculé. Ce coefficient reflète la performance de système à éliminer les nitrates et les bactéries pathogènes. Il dépend principalement du type de microorganisme, de la température et du pH (Lambert and Johnston 2000).

Tableau 19. Modèle de Chick-Watson appliqué pour l'abattement des nitrates et l'inactivation des bactéries pathogènes

	Abattement des nitrates	**Inactivation des bactéries pathogènes *S. typhi***
Equation	$C/C_o = A \exp(-k^n t)$	$N/N_o = A' \exp(-k'^n t)$
Significations des termes de l'équation	***C*** : la concentration de nitrate à un temps t, exprimé en mg/L C_0 : la concentration de nitrate à un temps zéro, exprimé en mg/L ***A*** : le taux de dénitrification à un intervalle de temps déterminé ***k*** : coefficient de dénitrification ***n*** : le facteur de dilution supposé égale à 1 pour le modèle de premier ordre de Chick Watson (CW).	***N*** : Nombre des bactéries viables cultivables à un temps ***t*** N_0 : Nombre des bactéries viables cultivable à un temps t_0 ***k'*** : Coefficient d'inactivation ***A'*** : Le taux d'abattement ***n*** : Seuil d'inactivation ou le seuil des séries d'événements subis par la bactérie après désinfection, ***n***=1 pour le modèle de premier degré.
	t : le temps exprimé (h)	

Tableau 20. Tableau récapitulatif des constantes cinétiques déterminées à différents essais

		Abattement des nitrates $[NO_3^-]$=90mg/L		**Inactivation des bactéries pathogènes**			
				Par inoculation des bactéries antagonistes		**Par inoculation des bactériophages spécifiques**	
		Phase I	**Phase II**	**Une seule inoculation**	**Trois inoculations séquentielles**	**Titre phagique= 10^3 PFU/mL**	**Titre phagique= 10^5 PFU/mL**
Filtre témoin	**K**	0,38	0,25	0,015	0,351	0,73	1,51
	A	1,33	1,046	1,644	1,805	3,043	42321
Filtre inoculé	**K**	0,7	0,35	0,029	1,333	0,88	2,21
	A	1,864	0,862	1,533	30,405	4,655	88369

Shayeb et al. (1998) ont appliqué le modèle de Chick-Watson pour modéliser la désinfection par le chlore des eaux usées épurées. Le coefficient k déterminé a été de 0,42 pour les coliformes totaux, il a été de 1,63 pour les coliformes fécaux et de 1,23 pour les

streptocoques fécaux. Ils ont montré que l'utilisation de ce modèle n'est possible que si on l'adapte en tenant compte de la modification de la vitesse de désinfection au cours du processus.

Toscano et al. (2009) ont décrit le marais artificiel comme étant un réacteur fermé (black box) à l'intérieur duquel des interactions entre le matériau de remplissage, les plantes et les microorganismes sont méconnues. Le plus souvent, l'interprétation de la performance de ces système est modélisée par un modèle mathématique simple appelé modèle de réacteur à écoulement piston « Plug Flow Reactor model ». Ce modèle néglige les effets de plusieurs facteurs à l'intérieur du filtre planté à savoir : la dispersion longitudinale de l'effluent, la présence des zones mortes et de court-circuit et la résistance racinaire des plantes.

Ces dix dernières années, des modèles numériques ont été développés pour mieux comprendre le processus d'épuration des eaux usées dans les filtres plantés de macrophytes et tendent à résoudre la complexité de ces systèmes (Langergraber 2008; Langergraber et al. 2009; Toscano et al. 2009; Meyer et al. 2015; Tomenko et al. 2007; Bonner et al. 2017; Gargallo et al. 2017). Très peu d'études sont disponibles concernant l'utilisation des bactériophages pour l'inactivation des bactéries pathogènes dans les filtres plantés de macrophytes. La plupart des études traitent l'utilisation des bactériophages comme bio-indicateurs pour détecter la présence des bactéries dans les eaux usées traitées (Shapiro and Kushmaro 2011; BenSaid and Otaki 2012; Jun et al. 2016; Dias et al. 2018). Dans notre étude, l'application de bactériophage spécifique pour *S. typhi* a montré son efficacité dans l'amélioration de la performance du système étudié pour l'inactivation des bactéries pathogènes. Zhang et al. (2013) ont utilisé des bactériophages spécifiques pour inactiver *Pseudomonas aeruginosa* par les systèmes de filtration des eaux usées. Zhang and Hu (2013) ont isolé des phages spécifiques pour *P. aeroginosa* des eaux usées et ont comparé les résultats obtenus avec ceux obtenus en utilisant le chlore pour l'inactivation de cette bactérie. Les résultats ont montré que le rendement d'élimination de biofilm de *P. aeroginosa* était de 40% pour le chlore alors que pour les phages, à 10^7 PFU/mL, était de 89%. Ils ont constaté que les phages à une concentration inférieure de 10^5 PFU/mL suivi de chlore inactivent à 96% les biofilms. Ces résultats ont suggéré qu'une combinaison entre le traitement par les phages et le traitement par le chlore est une solution prometteuse pour contrôler et éliminer les biofilms bactériens de diverses surfaces. Maal et al. (2015) ont isolé et identifié deux bactériophages spécifiques pour *Escherichia coli* et les ont utilisé pour le traitement des eaux usées.

Les bactériophages sont aussi utilisés pour traiter le biofilm dans le milieu industriel. Ils peuvent être appliqués pour empêcher la formation de biofilm ou pour l'éradiquer. Ils pénètrent

à l'intérieur du biofilm et détruisent les cellules bactériennes en dégradant leurs exopolysaccharides par les dépolymérases phagiques (Xu et al. 2017). Ye et al. (2019) ont discuté l'application des phages en agriculture pour inactiver les bactéries pathogènes dans le sol et ont abouti à déduire la capacité potentielle des phages à cibler et inactiver les cellules bactériennes hôtes.

L'exploitation des phages comme une approche réaliste dans le contrôle des agents pathogènes a suscité un intérêt considérable ces dernières années en raison de l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques. Cette approche pourrait aider à prédire la contamination bactérienne dans les eaux usées (Jassim et al. 2016).

Dans notre étude, La modélisation de la croissance des phages spécifiques en relation avec les cellules hôtes privées de nourriture, a été déterminée selon le modèle utilisé par Mudgal et al. (2006). Il existe très peu de modèles mathématiques qui décrivent le dynamisme phage-cellule hôte. Certains modèles ont été focalisés sur des aspects bien déterminés de l'interaction entre le phage et la cellule hôte. Dans leur étude, Worley-Morse and Gunsch (2015) ont étudié l'inactivation d'*Escherichia coli* K-12 MG1655 par le coliphage Ec2 sous une grande variété de concentrations de phages et de bactéries allant de 10^6 à 10^8 UFC/mL et de 10^6 à 10^8 PFU/mL à la température ambiante (20-22° C) dans un milieu de culture minimum. Pour prédire les taux de désinfection en termes des concentrations initiales des phages et des bactéries, deux différents modèles ont été développés et évalués: le premier a été numérique et s'est basé sur le modèle d'agrégation de particules et le deuxième est une méthode statistique impliquant plusieurs modèles de régression linéaire. Les résultats ont suggéré qu'un processus de désinfection à base de phages pourrait être efficace à l'inactivation des bactéries à savoir les bactéries pathogènes dans les effluents hospitaliers et les bactéries responsables de la formation des mousses dans le traitement des eaux usées par boues activées.

Dans le troisième et le quatrième chapitre de cette thèse, l'utilisation du liège comme matériau de remplissage dans les filtres plantés de macrophytes est une nouvelle approche pour renforcer la dénitrification par ces systèmes de traitement des eaux usées. La comparaison entre deux milieux filtrants, le liège et le gravier, a montré que le liège pourrait être un bon milieu granulaire pour éliminer les nitrates dans les filtres plantés de macrophytes. Les résultats des analyses physicochimiques et microbiologiques ont été cohérents et confirment bien l'efficacité de l'élimination des nitrates en utilisant le liège comme milieu filtrant.

Lopes et al. (2014) ont utilisé le liège comme biosorbant pour éliminer le mercure des eaux usées. Les résultats obtenus ont montré que seulement 25 mg/L de liège ont suffi pour

éliminer 94% du mercure pour une concentration initiale de 500 µg/L. Machado et al. (2017) ont comparé la performance épuratoire des agrégats légers d'argile et de granulés de liège. Les deux substrats ont été utilisés comme matériau de remplissage dans des filtres plantés de macrophytes pour le traitement d'un effluent pharmaceutique riche en Furosémide. Des études cinétiques ont été effectuées sur trois concentrations différentes de furosémide sur une période de sept jours. Les granulés de liège ont enregistré une performance épuratoire plus élevée au cours des premières 24 heures de temps de contact par rapport à l'autre adsorbant. Dordio et al. (2011) ont évalué la capacité du liège granulé dans l'élimination des mélanges d'ibuprofène (IB), de carbamazépine (CB) et d'acide clofibrique (CA) des eaux usées. Des rendements d'élimination élevés ont été atteints pour IB et CB, tandis qu'une performance moins satisfaisante a été observée pour CA. L'élimination simultanée des trois composés mélangés dans la même solution aqueuse n'a montré aucune différence significative par rapport à l'élimination des composés isolés dans des solutions séparées. Pintor et al. (2015) ont utilisé les granulés de liège pour l'élimination des huiles et des graisses des eaux usées issues de la raffinerie d'huiles végétales.

Dans cette recherche, la quantification des deux gènes *nirS* codant pour la nitrite réductase cd1 et nosZ codant l'oxyde nitreux réductase par la technique de PCR quantitative, a été réalisée pour des échantillons prélevés dans les filtres remplis de gravier et de liège. Notre objectif était d'évaluer l'abondance de la communauté dénitrifiante dans les filtres plantés de macrophytes. Les résultats obtenus ont montré que les deux gènes étudiés ont été abondants dans les filtres indépendamment de matériau de remplissage liège ou gravier particulièrement au niveau du système à écoulement horizontal. Le gène *NosZ* a montré des niveaux significatifs plus élevés ($p = 0,05$) pour le système rempli de liège, alors que pour les gènes *nirS*, les différences n'étaient pas significatives ($p = 0,18$).

Récemment la PCR quantitative en temps réel a été largement employée en microbiologie environnementale pour détecter et quantifier les microorganismes d'intérêt dans les eaux usées (Kim et al. 2013). Nombreuses recherches ont été conduites pour quantifier les marqueurs de la dénitrification (Scala and Kerkhof 1998; Delorme et al. 2003; Henry et al. 2006; Horn et al. 2006; Wallenstein et al. 2006; Ruiz-rueda and Hallin 2009; Chon et al. 2011; Song et al. 2014; Baker et al. 2015). Chon et al. (2011) ont quantifié les gènes *narG, nirS, and nosZ* par PCR quantitative en temps réel dans deux marais artificiels et ont également évalué l'effet de la variation de la température saisonnière sur l'abondance de ces gènes impliqués dans le processus de la dénitrification. Les résultats ont montré que les trois gènes fonctionnels sont

abondants dans les deux sites étudiés avec un nombre qui allait de 10^6 à 10^9 copies / g de sol. Sans tenir compte des variations saisonnières, les gènes fonctionnels réduisant les nitrites ont été dominants par rapport aux deux autres gènes. Cependant, les gènes fonctionnels réducteurs des nitrates et de nitrites ont été dominants pendant les saisons relativement froides et chaudes. Une autre étude réalisée par Henry et al. (2004) qui a pour objectif la quantification du gène *nirK* codant pour la nitrite réductase, a montré des densités *nirK* variant de $9,7 \times 10^4$ à $3,9 \times 10^6$ copies/ g de sol. Ces gènes *nosZ, nirS et nirK ont été quantifiés également par* Baker et al. (2015) dans les systèmes de drainage agricoles.

La stimulation des bactéries dénitrifiantes par le dioxyde de titane a été testée. L'exposition de la souche bactérienne PFH_1 à différentes concentrations de TiO_2 a permis de conclure que la réponse de la bactérie varie selon la concentration de TiO_2 testée. Une concentration de 20mg/L de TiO_2 s'est avérée stimulante pour l'activité dénitrifiante, toutefois la toxicité des nanoparticules de TiO_2 sur l'activité microbienne reste méconnu. Les travaux de Li et al. (2016), portée la toxicité des nanoparticules de TiO_2 sur l'activité dénitrifiante de la souche bactérienne *Pseudomonas stutzeri* CFY1, ont mis en évidence l'activation des gènes de dénitrification à une concentration de TiO_2 égale à 50mg/L, alors que les concentrations plus faibles (de 5 à 25 mg/L) de TiO_2 ont un effet inhibiteur sur la dénitrification. Dans leur recherche, Yang and Alvarez (2015) ont montré que des concentrations sub-létales de nanoparticules d'argent (AgNPs) stimulent le développement biofilm. Ils ont travaillé sur des cultures bactériennes mélangées avec des eaux usées provenant d'une station d'épuration. L'observation par microscope en fluorescence a montré que le biofilm bactérien est plus développé après une exposition à 21,6 µg / L d'AgNPs. Pour mieux comprendre les mécanismes de développement de biofilm, des expériences ont été menées sur une culture pure de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. L'exposition de PAO1 à des concentrations sublétales d'AgNPs (10,8 et 21,6 µg / L) a également stimulé le développement de biofilm en activant le quorum sensing, la sécrétion des lipopolysaccharides et les gènes de biosynthèse et de résistance aux antibiotiques.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ouvrent des perspectives pour d'autres expérimentations. En effet, une étude complète est nécessaire pour comprendre les mécanismes intervenant dans l'épuration des eaux usées à l'intérieur des filtres plantés de macrophytes. La modélisation et la simulation numérique de ces systèmes est importante pour décortiquer leur complexité. De même, l'étude et l'optimisation de chaque paramètre influençant le fonctionnement du système est indispensable pour le bon déroulement de l'expérimentation et

pour l'obtention d'un résultat fiable. Ainsi, l'utilisation des techniques moléculaires avant et après l'intervention pour améliorer la performance épuratoire de ces systèmes est nécessaire pour investiguer la structure et la diversité de la communauté microbienne. Il est important de comprendre le comportement et le dynamisme de la communauté microbienne au niveau rhizosphérique et d'étudier la synergie entre la plante et le microorganisme.

Les applications réussies de l'utilisation des phages dans le traitement des eaux usées nécessite une meilleure compréhension de la diversité et des interactions de la communauté microbienne. Les stratégies d'évaluer la croissance des phages spécifiques en relation avec les cellules hôtes doivent être développées. La manipulation avec de la matière vivante (bactérie ou phage) reste toujours délicate mais efficace si elle est prise dans les bonnes conditions de travail. La combinaison entre des méthodes naturelles pour traiter les eaux usées nécessite une bonne connaissance de chaque méthode et une meilleure optimisation des paramètres expérimentaux.

Enfin, la simplicité d'un système de filtre planté de macrophytes cache derrière elle une complexité qui sera toujours un problème à résoudre. Ce merveilleux écosystème attire l'attention des chercheurs depuis sa découverte et constitue un axe évolutif vers le développement durable (solutions régis par des lois naturelles : nature-based solutions).

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

A l'échelle mondiale, Les systèmes de traitement des eaux usées par filtres plantés de macrophytes suscitent de plus en plus d'intérêt grâce à leur simplicité, son faible coût par rapport aux méthodes conventionnelles et son excellente intégration paysagère. Ces systèmes s'annoncent très prometteurs dans le domaine de traitement des eaux usées et permettent le recyclage et la réutilisation des eaux traitées dans une économie circulaire. Néanmoins, pour assurer la durabilité et la bonne performance des filtres plantés de macrophytes, l'amélioration de ces systèmes de traitement des eaux usées devient un sujet d'actualité autour duquel se déroulent plusieurs recherches.

L'objectif principal de cette thèse est de présenter des solutions innovatrices afin d'améliorer les systèmes de traitement des eaux usées par les filtres plantés de macrophytes tout en gardant leur cadre écologique et naturel. Notre étude se focalise principalement sur l'élimination des nitrates, vu sa toxicité sur l'environnement ainsi que sur la santé humaine et sur l'élimination des bactéries pathogènes. En se basant sur des méthodes naturelles comme la bioinoculation des bactéries d'intérêt et des bactériophages, l'utilisation d'un substrat naturel et la nanobiostimulation des bactéries d'intérêt, la pollution est éliminée à des coûts significativement inférieurs à ceux des techniques de traitement conventionnelles.

Pour la bioinoculation des bactéries d'intérêt, nous avons pu isoler de l'environnement 19 souches bactériennes en se basant sur des tests biochimiques.

L'étude de criblage des isolats bactériens, nous a permis de sélectionner la souche PFH_1, isolée à partir des feuilles des plantes comme étant la souche la plus dénitrifiante et la plus antagoniste envers la souche pathogène *S.typhi*.

Le séquençage de de l'ARNr 16S de la bactérie PFH_1 a révélé une similitude de 99% avec *Enterobacter cloacae*, bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Des études ont montré la capacité pertinente d'*Enterobacter* Sp. à éliminer les polluants des eaux usées (Lu et al. 2006).

La PCR quantitative en temps réel nous a permis de détecter l'existence chez la bactérie sélectionnée de deux marqueurs de la dénitrification : les gènes *NirS* et *nosZ*. Ce résultat confirme bien le pouvoir dénitrifiant de la souche PFH1.

Avant de procéder à l'injection directe de la souche PFH_1 au niveau de la rhizophère du filtre planté, des essais *in vitro* ont été réalisés. La cinétique de la réduction des nitrates par la souche PFH_1 a été caractérisée par deux phases : (i) une cinétique rapide de la dénitrification maximale. (ii) suivi par une cinétique lente et tend à être constant au cours du temps. Le

pourcentage d'assimilation par PFH_1 de nitrate *in vitro* est égal à 80% pour les concentrations initiales testées des nitrates.

La bioinoculation de la souche d'intérêt au niveau du filtre F a permis un abattement des nitrates important par rapport au témoin par exemple après 18 h, une concentration initiale de 8,75 mg/l de NO_3^- est totalement assimilée au niveau du filtre (**F**) alors qu'au niveau du le filtre témoin, nous avons enregistré une concentration égale à 1mg/L de NO_3^-.

Après une seule injection de la bactérie antagoniste PFH_1 au sein de la rhizosphère du filtre planté (**F**), la cinétique de l'inactivation de *S.typhi* a été améliorée de 1U-Log_{10} après 3 heures de monitoring en comparaison avec le filtre témoin.

En prenant en considération le temps de latence déterminé par la cinétique de croissance de la bactérie PFH_1, l'injection séquentielle de cette dernière dans le filtre **F** a amélioré l'abattement de S. typhi de 2U-Log_{10} par rapport au filtre témoin.

Les résultats obtenus permettent de conclure que la bioinoculation présente une méthode simple et efficace pour améliorer la performance des filtres plantés de macrophytes. En effet, les résultats préliminaires ont montré l'effet bénéfique de la souche bioinoculée (PFH_1) dans la rhizosphère a permis d'augmenter remarquablement l'efficacité du système de traitement de l'eau pour la réduction des nitrates et des bactéries pathogènes avec une réduction du temps de contact.

La bio-inoculation de phage spécifique pour la souche pathogène ; *S. typhi* au niveau de la rhizosphère du filtre planté de roseaux a permis d'améliorer l'abattement de cette bactérie de 2U-Log_{10}.

De plus, le bactériophage a été utilisé comme un matériel biologique pour la détection des bactéries viables pathogènes et le suivi et le contrôle spécifique d'une ou des bactéries pathogènes potentiellement présentent dans l'eau traitée.

L'utilisation du phage d'intérêt dans cette étude permet d'une part, l'amélioration de l'abattement bactérien et par suite l'optimisation du procédé de traitement par macrophytes et d'autre part le contrôle microbiologique de la qualité des eaux traitées.

La bio-inoculation par des phages présente plusieurs avantages à savoir : la spécificité envers les souches pathogènes ciblées, mais reste à optimiser cette technique en tenant compte du cycle phagique.

En outre, l'utilisation d'un substrat naturel avec une technologie écologique naturelle peut présenter une approche innovante et efficace pour l'élimination de la pollution dans les bassins hydrographiques, tout en améliorant l'économie circulaire des activités agricoles.

Le liège a montré le meilleur abattement des nitrates qui varie de 80% à 90% par rapport au gravier (4à 70%).

La combinaison de la bioinoculation et l'utilisation du liège comme matériau de remplissage a permis d'aboutir à l'élimination totale des nitrates (100%).

De façon inattendue, nous avons mis en évidence l'effet stimulateur de TiO2 sur le processus de dénitrification et la recherche dans cet axe est encore en cours. Ainsi, l'inoculation de la souche dénitrifiante nanostimulée par le dioxyde de titane permet d'améliorer le processus d'élimination des nitrates par les filtres plantés de macrophytes.

Comme perspectives déduites, on peut s'intéresser à :

- ✓ Réaliser une étude moléculaire en vue d'étudier l'expression des gènes impliqués dans la dénitrification dans différentes conditions de traitement.
- ✓ Utiliser de bio-polymères naturels pour protéger l'inoculum d'intérêt.
- ✓ Elargir le spectre de sélection des microorganismes d'intérêt l'inoculum : sélection des microorganismes ayant les capacités de solubiliser le phosphate inorganique, inhiber la croissance mycélienne des champignons phytopatogènes, etc.
- ✓ Appliquer les résultats obtenus pour améliorer les rendements épuratoires d'une station de filtres plantés de macrophytes à l'échelle réelle.

Cette étude a contribué à une stratégie respectueuse de l'environnement visant à améliorer le processus de traitement de l'eau par filtres plantés de macrophytes.

Références bibliographiques

Abdel-Shafy HI, El-Khateeb MA, Regelsberger M, et al (2009) Integrated system for the treatment of blackwater and greywater via UASB and constructed wetland in Egypt. Desalin Water Treat 8:272–278 . doi: 10.5004/dwt.2009.788

Abissy M, Mandi L (1999) Utilisation des plantes aquatiques enracinées pour le traitement des eaux usées urbaines : cas du roseau. Rev des Sci l'eau 12:285–315 . doi: 10.7202/705353ar

Achouri F, Corbel S, Balan L, et al (2016) Porous Mn-doped ZnO nanoparticles for enhanced solar and visible light photocatalysis. Mater Des 101:309–316 . doi: 10.1016/j.matdes.2016.04.015

Adrados B, Sánchez O, Arias CA, et al (2014) Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. Water Res 55:304–312 . doi: 10.1016/j.watres.2014.02.011

Aguiar FC, Segurado P, Urbanič G, et al (2014) Comparability of river quality assessment using macrophytes: A multi-step procedure to overcome biogeographical differences. Sci Total Environ 476–477:757–767 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.021

Aguilar L, Gallegos Á, Arias CA, et al (2019) Microbial nitrate removal efficiency in groundwater polluted from agricultural activities with hybrid cork treatment wetlands. Sci Total Environ 653:723–734 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.426

Al-Baldawi IA, Abdullah SRS, Anuar N, Mushrifah I (2017) Bioaugmentation for the enhancement of hydrocarbon phytoremediation by rhizobacteria consortium in pilot horizontal subsurface flow constructed wetlands. Int J Environ Sci Technol 14:75–84 . doi: 10.1007/s13762-016-1120-2

Alcamo J, Döll P, Henrichs T, et al (2003) Development and testing of the WaterGAP 2 global model of water use and availability Development and testing of the WaterGAP 2 global model of water use and availability. Hydrol Sci 48:317–337 . doi: 10.1029/2001 WR000355; Döll, P., Kaspar, F., Alcamo, J., Computation of global water availability and water use at the scale of large drainage basins (1999) Math. Geol., 4, pp. 115-122; Döll, P., Kaspar, F., Lehner, B., A global hydrological m(TRUNCADO)

Alfredo J, Molina J, Suárez J, et al (2016) Performance of constructed wetland applied for domestic wastewater treatment : Case study at Boimorto (Galicia , Spain). Ecol Eng 95:324–329 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.06.049

Ali M, Rousseau DPL, Ahmed S (2018) A full-scale comparison of two hybrid constructed wetlands treating domestic wastewater in Pakistan. J Environ Manage 210:349–358 . doi: 10.1016/j.jenvman.2018.01.040

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl Acids Res 25:2389–402

Alufasi R, Gere J, Chakauya E, et al (2017) Mechanisms of pathogen removal by macrophytes in constructed wetlands. Environ Technol Rev 6:135–144 . doi: 10.1080/21622515.2017.1325940

Amann RI, Ludwig W, Schleifer K (1995) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. 59:143–169

Ameta R, Solanki MS, Benjamin S, Ameta SC (2018) Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: Emerging Green Chemical Technology. Elsevier Inc.

Références

Anany H, Brovko LY, Arabi T El (2015) Bacteriophages as antimicrobials in food products: applications against particular pathogens. In: Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. Elsevier Ltd, pp 89–116

Ávila C, Matamoros V, Reyes-Contreras C, et al (2014) Attenuation of emerging organic contaminants in a hybrid constructed wetland system under different hydraulic loading rates and their associated toxicological effects in wastewater. Sci Total Environ 470–471:1272–1280 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.065

Avila C, Pelissari C, Sezerino PH, et al (2017) Enhancement of total nitrogen removal through effluent recirculation and fate of PPCPs in a hybrid constructed wetland system treating urban wastewater. Sci Total Environ 584–585:414–425 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.024

Baker BH, Kröger R, Brooks JP, et al (2015) Investigation of denitrifying microbial communities within an agricultural drainage system fitted with low-grade weirs. Water Res 87:193–201 . doi: 10.1016/j.watres.2015.09.028

BenSaad M, Bousselmi L, Ghrabi A (2015) A new approach for local waste water management Sanitation case study of rural school (Chorfech 24) Presentation of case study. 2013

BenSaid M, Otaki M (2012) Use of lytic phage to control Salmonella typhi ' s viability after irradiation by pulsed UV light. Ann Microbiol 62:107–111 . doi: 10.1007/s13213-011-0234-5

Bonanno G (2013) Ecotoxicology and Environmental Safety Comparative performance of trace element bioaccumulation and biomonitoring in the plant species Typha domingensis , Phragmites australis and Arundo donax. Ecotoxicol Environ Saf 97:124–130 . doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.07.017

Bonner R, Aylward L, Kappelmeyer U, Sheridan C (2017) A comparison of three different residence time distribution modelling methodologies for horizontal subsurface flow constructed wetlands. Ecol Eng 99:99–113 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.11.024

Bothe H FS et NW (2007) Biology of the nitrogen cycle, Elsevier B

Boutin C (2003) C. Boutin To cite this version:

BOUTIN C, LIENARD A (2003) 03/Constructed wetlands for wastewater treatment: the french experience. 1St Int Semin Qaquatic Macrophytes Wastewater Treat Constr Wetl 1987:437–466

Braker G, Fesefeldt A, Witzel K-P (1998) Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (\textit{nirK} and \textit{nirS}) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. Appl Environ Microbiol 64:3769–3775

Braker G, Tiedje JM (2003) Nitric oxide reductase (norB) genes from pure cultures and environmental samples. Appl Environ Microbiol 69:3476–3483 . doi: 10.1128/AEM.69.6.3476-3483.2003

Briandet R (2011) The Spatial Architecture of Bacillus subtilis Biofilms Deciphered Using a Surface-Associated Model and In Situ Imaging. 6: . doi: 10.1371/journal.pone.0016177

Brouillet J.L.a, Picot B.b, Sambuco J.P.a, Gaillard L.c, Soteras G.a VI. (2008) Ecotechniques D'Assainissement Des Eaux Usees Domestiques : Evolution Et Perspectives. 1–17

Cabello P, Rold??n MD, Moreno-Vivi??n C (2004) Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. Microbiology 150:3527–3546 . doi: 10.1099/mic.0.27303-0

Carvalho PN, Arias CA, Brix H (2017a) Constructed wetlands for water treatment: New developments. Water (Switzerland) 9:1–9 . doi: 10.3390/w9060397

Références

Carvalho PN, Arias CA, Brix H (2017b) Constructed Wetlands for Water Treatment: New Developments. Water 9:397 . doi: 10.3390/w9060397

Chang J, Fan X, Sun H, et al (2014) Plant species richness enhances nitrous oxide emissions in microcosms of constructed wetlands. Ecol Eng 64:108–115 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2013.12.046

Chen Y, Wen Y, Zhou Q, Vymazal J (2014) Effects of plant biomass on denitrifying genes in subsurface-flow constructed wetlands. Bioresour Technol 157:341–345 . doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.137

Chen ZJ, Tian YH, Zhang Y, et al (2016) Effects of root organic exudates on rhizosphere microbes and nutrient removal in the constructed wetlands. Ecol Eng 92:243–250 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2016.04.001

Chon K, Chang JS, Lee E, et al (2011) Abundance of denitrifying genes coding for nitrate (narG), nitrite (nirS), and nitrous oxide (nosZ) reductases in estuarine versus wastewater effluent-fed constructed wetlands. Ecol Eng 37:64–69 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2009.04.005

Coleman J, Sextone;, Keith Hench; Keith Garbutt; Alan Sextone GB and JS (2001) Treatment of domestic wastewater by three plant species in constructed wetlands. Water Air Soil Pollut 128:283–295 . doi: 10.1023/A

Cooper P (2009) What can we learn from old wetlands? Lessons that have been learned and some that may have been forgotten over the past 20 years. Desalination 246:11–26 . doi: 10.1016/j.desal.2008.03.040

Cordeiro N, Belgacem MN, Silvestre AJD, et al (1998) Cork suberin as a new source of chemicals. 1. Isolation and chemical characterization of its composition. Int J Biol Macromol 22:71–80 . doi: 10.1016/S0141-8130(97)00090-1

Cui L, Li W, Zhang Y, et al (2016) Nitrogen removal in a horizontal subsurface flow constructed wetland estimated using the first-order kinetic model. Water (Switzerland) 8: . doi: 10.3390/w8110514

Dahloff I (2002) Molecular community analysis aof microbial diversity. Curr Opin Biotechnol 13:213–217

Decamp O, Warren A (2000) Investigation of Escherichia coli removal in various designs of subsurface flow wetlands used for wastewater treatment. Ecol Eng 14:293–299 . doi: 10.1016/S0925-8574(99)00007-5

Delorme S, Philippot L, Edel-hermann V, et al (2003) Comparative Genetic Diversity of the narG , nosZ , and 16S rRNA Genes in Fluorescent Pseudomonads. 69:1004–1012 . doi: 10.1128/AEM.69.2.1004

Denk TRA, Mohn J, Decock C, et al (2017) The nitrogen cycle: A review of isotope effects and isotope modeling approaches. Soil Biol Biochem 105:121–137 . doi: 10.1016/j.soilbio.2016.11.015

Desmet NJS, Van Belleghem S, Seuntjens P, et al (2011) Quantification of the impact of macrophytes on oxygen dynamics and nitrogen retention in a vegetated lowland river. Phys Chem Earth 36:479–489 . doi: 10.1016/j.pce.2008.06.002

Di Francesco A, Martini C, Mari M (2016) Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? Eur J Plant Pathol 145:711–717 . doi: 10.1007/s10658-016-0867-0

Dias E, Ebdon J, Taylor H (2018) The application of bacteriophages as novel indicators of viral pathogens in wastewater treatment systems. Water Res 129:172–179 . doi: 10.1016/j.watres.2017.11.022

Références

Diaz PM, Nadu T (2016) Constructed Wetlands and Water Hyacinth Macrophyte as a Tool for Wastewater Treatment : A Review. Adv Civ Eng 2:1–12

Donde OO, Xiao B (2017) Understanding wastewater treatment mechanisms: A review on detection, removal, and purification efficiencies of faecal bacteria indicators across constructed wetlands

Dordio A V., Gonçalves P, Texeira D, et al (2011) Pharmaceuticals sorption behaviour in granulated cork for the selection of a support matrix for a constructed wetlands system. Int J Environ Anal Chem 91:615–631 . doi: 10.1080/03067319.2010.510605

Dublanchet A (2017) La phagothérapie en 2017, état des lieux. 7:142–143

Duckworth DH (1976) "Who discovered bacteriophage?" Bacteriol Rev 40:793–802 . doi: 10.1128/mmbr.40.4.793-802.1976

Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, et al (2017) Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. Nature 541:488–493 . doi: 10.1038/nature21049

Fan J, Wang W, Zhang B, et al (2013) Nitrogen removal in intermittently aerated vertical flow constructed wetlands: Impact of influent COD/N ratios. Bioresour Technol 143:461–466 . doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.038

Fang Z, Song HL, Cang N, Li XN (2013) Performance of microbial fuel cell coupled constructed wetland system for decolorization of azo dye and bioelectricity generation. Bioresour Technol 144:165–171 . doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.073

Faulwetter JL, Gagnon V, Sundberg C, et al (2009) Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. Ecol Eng 35:987–1004 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2008.12.030

Feigenbaum D, Nsamirizi A, Sinclair-Desgagné CIRANO B (2004) Montréal Septembre 2004 Série Scientifique Scientific Series Les Nanotechnologies : leurs bénéfices et leurs risques potentiels

Filloux A, Vallet I (2003) Biofilm : mise en place et organisation d ' une communauté bactérienne. Med Sci 19:77–83

Foladori P, Bruni L, Tamburini S (2015) Bacteria viability and decay in water and soil of vertical subsurface flow constructed wetlands. Ecol Eng 82: . doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.04.058

Gagnon V, Chazarenc F, Comeau Y, Brisson J (2007) Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands. Water Sci Technol 56:249–254 . doi: 10.2166/wst.2007.510

Garfí M, Flores L, Ferrer I (2017) Life Cycle Assessment of wastewater treatment systems for small communities: Activated sludge, constructed wetlands and high rate algal ponds. J Clean Prod 161:211–219 . doi: 10.1016/j.jclepro.2017.05.116

Gargallo S, Martín M, Oliver N, Hernández-Crespo C (2017) Biokinetic model for nitrogen removal in free water surface constructed wetlands. Sci Total Environ 587–588:145–156 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.089

Gentry TJ, Rensing C, Pepper IL (2004) New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. Crit Rev Environ Sci Technol 34:447–494 . doi: 10.1080/10643380490452362

Ghrabi A, Bousselmi L (2019) Guide d'Assainissement des Ecoles Primaires en Milieu Rural. La Gestion Locale de l'Eau

Références

Ghrabi A, Bousselmi L, Masi F, Regelsberger M (2011) Constructed wetland as a low cost and sustainable solution for wastewater treatment adapted to rural settlements: The Chorfech wastewater treatment pilot plant. Water Sci Technol 63:3006–3012 . doi: 10.2166/wst.2011.563

Gilbride KA, Lee DY, Beaudette LA (2006) Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. J Microbiol Methods 66:1–20 . doi: 10.1016/j.mimet.2006.02.016

Gorito AM, Ribeiro AR, Almeida CMR, Silva AMT (2017) A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation. Environ Pollut 227:428–443 . doi: 10.1016/j.envpol.2017.04.060

Gruyer N, Dorais M, Zagury GJ, Alsanius BW (2013) Removal of plant pathogens from recycled greenhouse wastewater using constructed wetlands. Agric Water Manag 117:153–158 . doi: 10.1016/j.agwat.2012.11.009

Guittonny-Philippe A, Masotti V, Höhener P, et al (2014) Constructed wetlands to reduce metal pollution from industrial catchments in aquatic Mediterranean ecosystems: A review to overcome obstacles and suggest potential solutions. Environ Int 64:1–16 . doi: 10.1016/j.envint.2013.11.016

Haichar Z, Santaella C, Heulin T (2014) Soil Biology & Biochemistry Root exudates mediated interactions belowground. Soil Biol Biochem 77:69–80 . doi: 10.1016/j.soilbio.2014.06.017

Headley T, Nivala J, Kassa K, et al (2013) Escherichia coli removal and internal dynamics in subsurface flow ecotechnologies: Effects of design and plants. Ecol Eng 61:564–574 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2013.07.062

Helen D, Kim H, Tytgat B, Anne W (2016) Highly diverse nirK genes comprise two major clades that harbour ammonium- producing denitrifiers. BMC Genomics 1–13 . doi: 10.1186/s12864-016-2465-0

Hench KR, Bissonnette GK, Sexstone AJ, et al (2003) Fate of physical, chemical, and microbial contaminants in domestic wastewater following treatment by small constructed wetlands. Water Res 37:921–927 . doi: S0043-1354(02)00377-9 [pii]

Henry S, Baudoin E, López-Gutiérrez JC, et al (2004) Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. J Microbiol Methods 59:327–335 . doi: 10.1016/j.mimet.2004.07.002

Henry S, Bru D, Stres B, et al (2006) Quantitative Detection of the nosZ Gene , Encoding Nitrous Oxide Reductase , and Comparison of the Abundances of 16S rRNA , narG , nirK , and nosZ Genes in Soils. 72:5181–5189 . doi: 10.1128/AEM.00231-06

Herrero M, Stuckey DC (2014) Chemosphere Bioaugmentation and its application in wastewater treatment : A review. Chemosphere 44: . doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.10.033

Hill VRR, Sobsey MDD (2001) Removal of Salmonella and microbial indicators in constructed wetlands treating swine wastewater. In: Water Science and Technology. pp 215–222

Horn MA, Drake HL, Schramm A (2006) Nitrous Oxide Reductase Genes (nosZ) of Denitrifying Microbial Populations in Soil and the Earthworm Gut Are Phylogenetically Similar Nitrous Oxide Reductase Genes (nosZ) of Denitrifying Microbial Populations in Soil and the Earthworm Gut Are Phylogen. Appl Environ Microbiol 72:1019–1026 . doi: 10.1128/AEM.72.2.1019

Horn TB, Zerwes FV, Kist LT, Machado ??nio Leandro (2014) Constructed wetland and photocatalytic ozonation for university sewage treatment. Ecol Eng 63:134–141 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2013.12.012

Høyland-Kroghsbo NM, Mærkedahl RB, Svenningsen S Lo (2013) A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. MBio 4:1–8 . doi: 10.1128/mBio.00362-12

Hua G, Zeng Y, Zhao Z, et al (2014) Applying a resting operation to alleviate bioclogging in vertical flow constructed wetlands: An experimental lab evaluation. J Environ Manage 136:47–53 . doi: 10.1016/j.jenvman.2014.01.030

Huang J, Cao C, Yan C, et al (2017) Impacts of silver nanoparticles on the nutrient removal and functional bacterial community in vertical subsurface flow constructed wetlands. Bioresour Technol 243:1216–1226 . doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.178

Huang S, Chen C, Yang X, et al (2011) Distribution of typical denitrifying functional genes and diversity of the nirS-encoding bacterial community related to environmental characteristics of river sediments. Biogeosciences 8:3041–3051 . doi: 10.5194/bg-8-3041-2011

Hussain SA, Prasher SO, Patel RM (2012) Removal of ionophoric antibiotics in free water surface constructed wetlands. Ecol Eng 41:13–21 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2011.12.006

Huybens N, D MJETM (2009) Les techniques de biologie moléculaire d ' analyse des populations bactériennes complexes. 112–128

Ilyas H, Masih I (2017) Intensification of constructed wetlands for land area reduction : a review. 12081–12091 . doi: 10.1007/s11356-017-8740-z

Jasper JT, Nguyen MT, Jones ZL, et al (2013) Unit process wetlands for removal of trace organic contaminants and pathogens from municipal wastewater effluents. Environ Eng Sci 30:421–436 . doi: 10.1089/ees.2012.0239

Jassim SAA, Limoges RG, El-Cheikh H (2016) Bacteriophage biocontrol in wastewater treatment. World J Microbiol Biotechnol 32:1–10 . doi: 10.1007/s11274-016-2028-1

Jia W, Zhang J, Li P, et al (2011) Nitrous oxide emissions from surface flow and subsurface flow constructed wetland microcosms: Effect of feeding strategies. Ecol Eng 37:1815–1821 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2011.06.019

Jones CM, Stres B, Rosenquist M, Hallin S (2008) Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. Mol Biol Evol 25:1955–1966 . doi: 10.1093/molbev/msn146

Ju X, Wu S, Zhang Y, Dong R (2014) Intensified nitrogen and phosphorus removal in a novel electrolysis-integrated tidal flow constructed wetland system. Water Res 59:37–45 . doi: 10.1016/j.watres.2014.04.004

Jun JW, Giri SS, Kim HJ, et al (2016) Bacteriophage application to control the contaminated water with Shigella. Nat Publ Gr 1–7 . doi: 10.1038/srep22636

Juzan L, Pernelle J-J, Dabert P (2012) Les outils de la biologie moléculaire pour l'analyse microbiologique des boues activées. Sci Eaux Territ Numéro 9:76 . doi: 10.3917/set.009.0076

Kadlec, R.H. and Knight R (1996) Treatment wetlands. In: Lewis Publ. Boca Raton Florida

Kaevska M, Lvoncik S, Slana I, et al (2014) Confirm Internalization of Mycobacteria in Plants. 80:3888–3894 . doi: 10.1128/AEM.00496-14

Kamran MT, Samreen Z, Hassani TM, et al (2014) Quorum sensing effect the lysis mechanism of T4 bacteriophage. IJISR 10:421–424

Références

Kato K, Inoue T, Ietsugu H, et al (2013) Performance of six multi-stage hybrid wetland systems for treating high-content wastewater in the cold climate of Hokkaido, Japan. Ecol Eng 51:256–263 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2012.12.002

Keffala C, Ghrabi A (2005) Nitrogen and bacterial removal in constructed wetlands treating domestic waste water. Desalination 185:383–389 . doi: 10.1016/j.desal.2005.04.045

Khan A, Singh P, Srivastava A (2017) Synthesis , nature and utility of universal iron chelator - Siderophore : A review Microbiological Research Synthesis , nature and utility of universal iron chelator – Siderophore : A review. Microbiol Res 0–1 . doi: 10.1016/j.micres.2017.10.012

Khdhiri H, Potier O, Leclerc JP (2014) Autoépuration en eau courante: Evaluation de l'oxygénation dans les cascades en marches d'escalier. Rev des Sci l'Eau 27:127–136 . doi: 10.7202/1025563ar

Kim J, Lim J, Lee C (2013) Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. Biotechnol Adv 31:1358–1373 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.010

Kouki SS, Saidi N, M'hiri F, et al (2011) Isolation and characterization of facultative mixotrophic ammonia-oxidizing bacteria from constructed wetlands. J Environ Sci 23:1699–1708 . doi: 10.1016/S1001-0742(10)60596-7

Kraiem K, Kallali H, Wahab MA, et al (2019) Comparative study on pilots between ANAMMOX favored conditions in a partially saturated vertical flow constructed wetland and a hybrid system for rural wastewater treatment. Sci Total Environ 670:644–653 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.220

Kuiper I, Lagendijk EL, Bloemberg G V, Lugtenberg BJJ (2004) Rhizoremediation : A Beneficial Plant-Microbe Interaction Bioremediation : A natural method. 17:6–15

Kurzbaum E, Kirzhner F, Sela S, et al (2010) Efficiency of phenol biodegradation by planktonic Pseudomonas pseudoalcaligenes (a constructed wetland isolate) vs. root and gravel biofilm. Water Res 44:5021–5031 . doi: 10.1016/j.watres.2010.07.020

Lambert RJW, Johnston MD (2000) Disinfection kinetics : a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor / time curves. 907–913

Langergraber G (2008) Modeling of processes in subsurface flow constructed wetlands: A review. Vadose Zo J 7:830–842 . doi: 10.2136/vzj2007.0054

Langergraber G, Rousseau DPL, García J, Mena J (2009) CWM1: A general model to describe biokinetic processes in subsurface flow constructed wetlands. Water Sci Technol 59:1687–1697 . doi: 10.2166/wst.2009.131

Lanone S, Boczkowski J (2010) Les sources de nanoparticules. Rev Fr Allergol 50:211–213 . doi: 10.1016/j.reval.2010.01.039

Lee C, Beauchemin KA (2014) A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. Can J Anim Sci 94:557–570 . doi: 10.4141/cjas-2014-069

Lemanceau P (1992) Bénéfiques De Rhizobactéries Sur Les Plantes :

Li D, Cui F, Zhao Z (2013) The impact of titanium dioxide nanoparticles on biological nitrogen removal from wastewater and bacterial community shifts in activated sludge. doi: 10.1007/s10532-013-9648-z

Li D, Li B, Wang Q, et al (2016) Toxicity-of-TiO2-nanoparticle-to-denitr...mmunity-structures-in-activated-sludge.pdf. Chemosphere 144:1334–1341

Li L, He C, Ji G, et al (2015) Nitrogen removal pathways in a tidal fl ow constructed wetland under fl ooded time constraints. Ecol Eng 81:266–271 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.04.073

Li Q, Mahendra S, Lyon DY, et al (2008) Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. Water Res 42:4591–4602 . doi: 10.1016/j.watres.2008.08.015

Li Y, Zhu G, Jern W, Keat S (2014) Science of the Total Environment A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands : Design , performance and mechanism. Sci Total Environ 468–469:908–932 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.09.018

Liénard A, Boutin C, Molle P, et al (2004) Constructed Wetlands and Waste Stabilization Ponds for municipal wastewater treatment in France : comparison of performance and maintenance operations in terms of durability and reliability. 9ème Conférence Sur Les Marais Artif 6ème Conférence Sur Le Lagunage Nat 13–23

Liu C, Xie J, Song M, et al (2018) Nitrogen removal performance and microbial community changes in subsurface wastewater infiltration systems (SWISs) at low temperature with different bioaugmentation strategies. Bioresour Technol 250:603–610 . doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.089

Liu M, Wu S, Chen L, Dong R (2014) How substrate influences nitrogen transformations in tidal flow constructed wetlands treating high ammonium wastewater? Ecol Eng 73:478–486 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2014.09.111

Liu R, Zhao Y, Doherty L, et al (2015) A review of incorporation of constructed wetland with other treatment processes. Chem Eng J 279:220–230 . doi: 10.1016/j.cej.2015.05.023

Liu W-Y, Wong C-F, Chung KM-K, et al (2013) Comparative Genome Analysis of Enterobacter cloacae. PLoS One 8:e74487 . doi: 10.1371/journal.pone.0074487

Lopes CB, Oliveira JR, Rocha LS, et al (2014) Cork stoppers as an effective sorbent for water treatment: The removal of mercury at environmentally relevant concentrations and conditions. Environ Sci Pollut Res 21:2108–2121 . doi: 10.1007/s11356-013-2104-0

Los M, Wegrzyn G, Neubauer P (2003) A role for bacteriophage T4 rI gene function in the control of phage development during pseudolysogeny and in slowly growing host cells. Res Microbiol 154:547–552 . doi: 10.1016/S0923-2508(03)00151-7

Lu W-B, Shi J-J, Wang C-H, Chang J-S (2006) Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate Enterobacter sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. J Hazard Mater 134:80–86 . doi: 10.1016/j.jhazmat.2005.10.036

Lünsmann V, Kappelmeyer U, Taubert A, et al (2016) Aerobic toluene degraders in the rhizosphere of a constructed wetland model show diurnal polyhydroxyalkanoate metabolism. Appl Environ Microbiol AEM.00493-16-

Maal KB, Delfan AS, Salmanizadeh S (2015) Isolation and Identification of Two Novel Escherichia coli Bacteriophages and Their Application in Wastewater Treatment and Coliform ' s Phage Therapy. 8: . doi: 10.5812/jjm.14945

Maalej S, Gdoura R, Dukan S, et al (2004) Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in Aeromonas hydrophila exposed to natural seawater at low temperature. J Appl Microbiol 97:557–565 . doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02336.x

Références

Machado AI, Dordio A, Fragoso R, et al (2017) Furosemide removal in constructed wetlands: Comparative efficiency of LECA and Cork granulates as support matrix. J Environ Manage 203:422–428 . doi: 10.1016/j.jenvman.2017.08.002

Makvana, Sharna (2013) Assessment of pathogen removal potential of root zone technology from domestic waste- water. Univ J Env Res Technol 3:401–406.

Márquez AJ, Betti M, García-Calderón M, et al (2005) Nitrate assimilation in Lotus japonicus. J Exp Bot 56:1741–1749 . doi: 10.1093/jxb/eri171

Martin GD, Coetzee JA (2014) Competition between two aquatic macrophytes, Lagarosiphon major (Ridley) Moss (Hydrocharitaceae) and Myriophyllum spicatum Linnaeus (Haloragaceae) as influenced by substrate sediment and nutrients. Aquat Bot 114:1–11 . doi: 10.1016/j.aquabot.2013.11.001

Maynard A, Michelson E (2006) Safe Handling of nanotechnology. Nature 444:267–269

Mburu N, Rousseau DPL, Stein OR, Lens PNL (2014) Simulation of batch-operated experimental wetland mesocosms inAQUASIM biofilm reactor compartment. J Environ Manage 134:100–108 . doi: 10.1016/j.jenvman.2014.01.005

Mccrank J (2009) Les applications de la nanotechnologie dans le secteur forestier Les applications de la nanotechnologie dans le secteur forestier. Canada, pp 5–7

Meng P, Pei H, Hu W, et al (2014) How to increase microbial degradation in constructed wetlands: Influencing factors and improvement measures. Bioresour Technol 157:316–326 . doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.095

Merghem KA, Halouani H El, Alnedhary AA, et al (2016) Etude de l ' impact des rejets d ' eaux usées brutes et épurées sur la qualité de l ' Oued Bani Houat (Bassin de Sanaa) : Etude spatio-temporelle (Impact of raw and treated wastewater on quality surface water of Wadi Bani Houat (Sanaa Basin) Study sp. 7:1516–1530

Meyer D, Chazarenc F, Claveau-Mallet D, et al (2015) Modelling constructed wetlands: Scopes and aims - a comparative review. Ecol Eng 80:205–213 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2014.10.031

Monier J-M, Cécillon S (2015) Les outils de biologie moleculaire et leur utilisation dans le domaine de la gestion des sites pollues. 1–39

Motte JC, Delenne JY, Barron C, et al (2017) Elastic properties of packing of granulated cork: Effect of particle size. Ind Crops Prod 99:126–134 . doi: 10.1016/j.indcrop.2017.01.043

Mudgal P, Breidt F, Lubkin SR, Sandeep KP (2006) Quantifying the significance of phage attack on starter cultures: A mechanistic model for population dynamics of phage and their hosts isolated from fermenting sauerkraut. Appl Environ Microbiol 72:3908–3915 . doi: 10.1128/AEM.02429-05

Naga Siva Kumar Gunda RC and SKM (2016) As featured in : Analyst 141:2920–2929 . doi: 10.1039/c6an00400h

Nations U, Settlements H CONSTRUCTED WETLANDS MANUAL

Neilands JB (1995) Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds *

Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants : mechanisms and controls Christophe Nguyen To cite this version : HAL Id : hal-00886190 Review article Rhizodeposition of organic C by plants : mechanisms and controls. doi: 10.1051/agro

Nie, L., Shah, S., Rashid, A., Burd, G. I., Dixon, D. G. & Glick BR (2002) Phytoremedation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium Enterobacter cloacae CAL2. Plant Physiol Biochem 40:355–361

Nivala J, Wallace S, Headley T, et al (2013) Oxygen transfer and consumption in subsurface flow treatment wetlands. Ecol Eng 61:544–554 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2012.08.028

O.S. Kucuk, F. Sengul IKK (2004) Removal of ammonia from tannery effluents in a reed bed constructed wetland. water Sci Technol 48:179–186

O'Toole GA, Kolter R (1998a) Initation of biofilm formation in Pseudomans fluorescens WC365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 28:449–461

O'Toole GA, Kolter R (1998b) Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Mol Microbiol 30:295–304 . doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x

Ostroumov SA (2005) On the Multifunctional Role of the Biota in the Self-Purification of Aquatic Ecosystems. 36:414–420

Ostroumov SA (2014) Aquatic ecosystem as a bioreactor : Water purification and some other functions .

Pajares S, Bohannan BJM (2016) Ecology of Nitrogen Fixing , Nitrifying , and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. 7:1–20 . doi: 10.3389/fmicb.2016.01045

Payne W. (1981) Denitrification, Wiley-Inte. New York,

Pei H, Shao Y, Chanway CP, et al (2016) Bioaugmentation in a pilot-scale constructed wetland to treat domestic wastewater in summer and autumn. 7776–7785 . doi: 10.1007/s11356-015-5834-3

Pereira S, Pereira C, Santos L, et al (2016) Potential of phage cocktails in the inactivation of Enterobacter cloacae — An in vitro study in a buffer solution and in urine samples. Virus Res 211:199–208 . doi: 10.1016/j.virusres.2015.10.025

Petroliers DH, Zaghden H, Oudot J, et al (2013) fractions hydrocarbures qui font partie du pétrole . Des sédiments ont été prélevés dans deux sites de la baie de Sfax . C ' est cas des sédiments présentant le pouvoir autoépurateur plus élevé et cultivés dans de l ' eau de mer enrichie , le milieu de cu. 7159

Petty NK, Evans TJ, Fineran PC, Salmond GPC (2006) Biotechnological exploitation of bacteriophage research. 25: . doi: 10.1016/j.tibtech.2006.11.003

Philippot L (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. 1577:355–376

Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P, Van Der Putten WH (2013) Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. Nat Rev Microbiol 11:789–799 . doi: 10.1038/nrmicro3109

Pintor AMA, Martins AG, Souza RS, et al (2015) Treatment of vegetable oil refinery wastewater by sorption of oil and grease onto regranulated cork - A study in batch and continuous mode. Chem Eng J 268:92–101 . doi: 10.1016/j.cej.2015.01.025

POULET J, TERFOUS A (2004) Stations D'Epuration a Lits Filtrants Plantes De Macrophytes Waste Water Treatment Plants With Macrophytes. Courr du … 103–106

Priemé A, Braker G, Tiedje JM (2002) Diversity of Nitrite Reductase (nirK and nirS) Gene Fragments in Forested Upland and Wetland Soils. 68:1893–1900 . doi: 10.1128/AEM.68.4.1893

Puig S, Coma M, Desloover J, et al (2012) Autotrophic denitrification in microbial fuel cells treating low ionic strength waters. Environ Sci Technol 46:2309–2315 . doi: 10.1021/es2030609

Qu X, Alvarez PJJ, Li Q (2013) Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. Water Res 47:3931–3946 . doi: 10.1016/j.watres.2012.09.058

Ravat F, Jault P, Gabard J (2015) Bactériophages et phagothérapie : Utilisation de Virus Naturels pour traiter les infections bactériennes. Ann Burns Fire Disasters 28:13–20

Regelsberger M, Baban A, Bouselmi L, et al (2007) Zer0-M, sustainable concepts towards a zero outflow municipality. Desalination 215:64–72 . doi: 10.1016/j.desal.2006.12.007

Rehman F, Pervez A, Khattak BN, Ahmad R (2017) Constructed Wetlands: Perspectives of the Oxygen Released in the Rhizosphere of Macrophytes. Clean - Soil, Air, Water 45: . doi: 10.1002/clen.201600054

Reimmann C, Ginet N, Michel L, et al (2002) Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in Pseudomonas aeruginosa PAO1. 923–932

Rezania S, Park J, Rupani PF, et al (2019) Phytoremediation potential and control of Phragmites australis as a green phytomass : an overview

Risch E, Boutin C, Roux P, Héduit A (2011) Modèle ACV – Filière de traitement des eaux usées par filtres plantés de roseaux à flux verticaux (FPRv) - Rapports d'ACV et données d'inventaire. 1–51

Rondon MR, Ballering KS, Thomas MG (2004) Identification and analysis of a siderophore biosynthetic gene cluster from Agrobacterium tumefaciens C58. Microbiology 150:3857–3866 . doi: 10.1099/mic.0.27319-0

Roose-amsaleg C, Laverman A, Vilain G, Garnier J (2010) Bactéries dénitrifiantes , dénitrification dans les compartiments eau , sédiment , sol. 1–9

Roussel-Delif L, Tarnawski S, Hamelin J, et al (2005) Frequency and diversity of nitrate reductase genes among nitrate-dissimilating Pseudomonas in the rhizosphere of perennial grasses grown in field conditions. Microb Ecol 49:63–72 . doi: 10.1007/s00248-003-0228-3

Ruiz-rueda O, Hallin S (2009) Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. 67:308–319 . doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00615.x

Rutherford ST, Bassler BL (2012) Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harb Perspect Med 2: . doi: 10.1101/cshperspect.a012427

Saeed T, Afrin R, Muyeed A Al, Sun G (2012) Treatment of tannery wastewater in a pilot-scale hybrid constructed wetland system in Bangladesh. Chemosphere 88:1065–1073 . doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.055

Saeed T, Sun G (2012) A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: Dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. J Environ Manage 112:429–448 . doi: 10.1016/j.jenvman.2012.08.011

Saeed T, Sun G (2013) A lab-scale study of constructed wetlands with sugarcane bagasse and sand media for the treatment of textile wastewater. Bioresour Technol 128:438–447 . doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.052

Saeed T, Sun G (2011) Enhanced denitrification and organics removal in hybrid wetland columns: Comparative experiments. Bioresour Technol 102:967–974 . doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.056

Saucedo-Mora MA, Castañeda-Tamez P, Cazares A, et al (2017) Selection of functional quorum sensing systems by lysogenic bacteriophages in pseudomonas aeruginosa. Front Microbiol 8:1–10 . doi: 10.3389/fmicb.2017.01669

Sawaittayothin V, Polprasert C (2007) Nitrogen mass balance and microbial analysis of constructed wetlands treating municipal landfill leachate. 98:565–570 . doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.002

Scala DJ, Kerkhof LJ (1998) Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. FEMS Microbiol Lett 162:61–68 . doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12979.x

Schneider J, Matsuoka M, Takeuchi M, et al (2014) Understanding TiO $_2$ Photocatalysis: Mechanisms and Materials. Chem Rev 114:9919–9986 . doi: 10.1021/cr5001892

Sehar S, Sumera, Naeem S, et al (2014) A comparative study of macrophytes influence on wastewater treatment through subsurface flow hybrid constructed wetland. Ecol Eng 81:62–69 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.04.009

Severin BBF, Suidan MT, Engelbrecht RS (1984) Series-event kinetic model for chemical disinfection. 110:430–439

Shahnewaj K, Mannan B (2013) Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. 42:19–33 . doi: 10.4038/cjsbs.v42i1.5896

Shao Y, Pei H, Hu W, et al (2014) Bioaugmentation in lab scale constructed wetland microcosms for treating polluted river water and domestic wastewater in northern China. Int Biodeterior Biodegrad 95:151–159 . doi: 10.1016/j.ibiod.2014.05.027

Shapiro OH, Kushmaro A (2011) Bacteriophage ecology in environmental biotechnology processes. Curr Opin Biotechnol 22:449–455 . doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.012

Sharma S, Radl V, Hai B, et al (2007) Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. 68:445–452 . doi: 10.1016/j.mimet.2006.10.001

Shayeb H, Riabit T, Roustan M, Hassan A (1998) Étude Expérimentale Et Modélisation De La Désinfection Par Le Chlore Des Eaux Usées Épurées. Rev des Sci l'eau 11:517 . doi: 10.7202/705319ar

Shehzadi M, Afzal M, Khan MU, et al (2014) Enhanced degradation of textile effluent in constructed wetland system using Typha domingensis and textile effluent-degrading endophytic bacteria. Water Res 58:152–159 . doi: 10.1016/j.watres.2014.03.064

Shen Z, Zhou Y, Liu J, et al (2015) Enhanced removal of nitrate using starch/PCL blends as solid carbon source in a constructed wetland. Bioresour Technol 175:239–244 . doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.006

Sindhu SS, Rakshiya YS, Sahu G (2009) Biological Control of Soilborne Plant Pathogens. Pest Technol 3:10–21 . doi: 10.1017/S0889189300002253

Song HL, Li XN, Lu XW, Inamori Y (2009) Investigation of microcystin removal from eutrophic surface water by aquatic vegetable bed. Ecol Eng 35:1589–1598 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2008.04.005

Song K, Suenaga T, Hamamoto A, et al (2014) Abundance , transcription levels and phylogeny of bacteria capable of nitrous oxide reduction in a municipal wastewater treatment plant. J Biosci Bioeng xx: . doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.028

Srivastava JK, Chandra H, Kalra SJS, Mishra P (2016) Plant – microbe interaction in aquatic system and their role in the management of water quality : a review. Appl Water Sci. doi: 10.1007/s13201-016-0415-2

Sujatha N. and KA (2013) Siderophore Production By the Isolates of Fluorescent Pseudomonads. Int J Curr Res Rev 5:1–7

Taghavi S, van der Lelie D, Hoffman A, et al (2010) Genome Sequence of the Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium <italic>Enterobacter</italic> sp. 638. PLoS Genet 6:e1000943 . doi: 10.1371/journal.pgen.1000943

Tee HC, Lim PE, Seng CE, et al (2015) Enhancement of azo dye Acid Orange 7 removal in newly developed horizontal subsurface-flow constructed wetland. J Environ Manage 147:349–355 . doi: 10.1016/j.jenvman.2014.09.025

Tee HC, Lim PE, Seng CE, Nawi MAM (2012) Newly developed baffled subsurface-flow constructed wetland for the enhancement of nitrogen removal. Bioresour Technol 104:235–242 . doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.032

Tian S, Wang Z, Shang H (2011) Procedia Environmental Sciences Study on the Self-purification of Juma River. 11:1328–1333 . doi: 10.1016/j.proenv.2011.12.199

Tomenko V, Ahmed S, Popov V (2007) Modelling constructed wetland treatment system performance. Ecol Modell 205:355–364 . doi: 10.1016/j.ecolmodel.2007.02.030

Torrens A, Molle P, Boutin C, Salgot M (2009) Removal of bacterial and viral indicator in vertical flow constructed wetlands and intermittent sand filters. Desalination 246:169–178 . doi: 10.1016/j.desal.2008.03.050

Toscano A, Langergraber G, Consoli S, Cirelli GL (2009) Modelling pollutant removal in a pilot-scale two-stage subsurface flow constructed wetlands. Ecol Eng 35:281–289 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2008.07.011

Trivedi P, Pandey A, Palni LMS (2012) Bacteria in agrobiology: Plant probiotics. Hardcover

Truu M, Juhanson J, Truu J (2009a) Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. Sci Total Environ 407:3958–3971 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.036

Truu M, Juhanson J, Truu J (2009b) Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. Sci Total Environ 407:3958–3971 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.036

Tse C, Capeau J (2003) abc Quantification des acides nucléiques. 279–293

Tu YT, Chiang PC, Yang J, et al (2014) Application of a constructed wetland system for polluted stream remediation. J Hydrol 510:70–78 . doi: 10.1016/j.jhydrol.2013.12.015

Turki Y, Ouzari H, Mehri I, et al (2012) Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for the biocontrol of Salmonella of wastewater. FRIN 45:1099–1105 . doi: 10.1016/j.foodres.2011.05.041

Vymazal J (2009) The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. Ecol Eng 35:1–17 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2008.08.016

Vymazal J (2008) Constructed Wetlands for Wastewater Treatment : A Review. 12 th World Lake Conf (Taal 2007) 965–980

Vymazal J (2011) Long-term performance of constructed wetlands with horizontal sub-surface flow : Ten case studies from the Czech Republic. Ecol Eng 37:54–63 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2009.11.028

Vymazal J (2013a) Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: A review. Ecol Eng 61:582–592 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2013.06.023

Vymazal J (2013b) The use of hybrid constructed wetlands for wastewater treatment with special attention to nitrogen removal: A review of a recent development. Water Res 47:4795–4811 . doi: 10.1016/j.watres.2013.05.029

Vymazal J (2014a) Removal of Enteric Bacteria in Constructed Treatment Wetlands with Emergent Macrophytes : A Review. doi: 10.1081/ESE-200055851

Vymazal J (2005) Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. Ecol Eng 25:478–490 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2005.07.010

Vymazal J (2014b) Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review. Ecol Eng 73:724–751 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2014.09.034

Vymazal J, Kr??pfelov?? L (2011) A three-stage experimental constructed wetland for treatment of domestic sewage: First 2 years of operation. Ecol Eng 37:90–98 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2010.03.004

Wakako IO, Miyahara M, Kim SW, et al (2013) Bioaugmentation of a wastewater bioreactor system with the nitrous oxide-reducing denitrifier Pseudomonas stutzeri strain TR2. Seibutsu-kogaku Kaishi 115:37–42 . doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.08.015

Wallace S, Parkin G, Cross C (2001) Cold climate wetlands: design & performance. Water Sci Technol 44:259–265

Wallenstein MADW, Yrold DADM, Irestone MARYF (2006) ENVIRONMENTAL CONTROLS ON DENITRIFYING COMMUNITIES AND DENITRIFICATION RATES : INSIGHTS FROM MOLECULAR METHODS. 16:2143–2152

Wan X, Ruan W, Wang R, et al (2018) Enhanced removal of Microcystis bloom and microcystin-LR using microcosm constructed wetlands with bioaugmentation of degrading bacteria. Chemosphere 210:29–37 . doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.140

Wang J, Chu L (2016) Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. Biotechnol Adv 34:1103–1112 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.07.001

Wang Z, Huang M, Qi R, et al (2016) Enhanced nitrogen removal and associated microbial characteristics in a modified single-stage tidal flow constructed wetland with step-feeding. Chem Eng J. doi: 10.1016/j.cej.2016.11.060

Watson H. (1908) A NOTE ON THE VARIATION OF THE RATE OF DISIN- FECTION WITH CHANGE IN THE CONCENTRATION OF THE DISINFECTANT. J Hyg (Lond) 8:536–542

Weber KP;, RL. L (2008) Pathogen removal in constructed wetlands. Ecology, conservation, and restoration, NY: Nova P. New York,

Weber KP, Legge RL (2008) Pathogen Removal in Constructed Wetlands

Wijtzes T, Rombouts FM, Kant-Muermans MLT, et al (2001) Development and validation of a combined temperature, water activity, pH model for bacterial growth rate of Lactobacillus curvatus. Int J Food Microbiol 63:57–64 . doi: 10.1016/S0168-1605(00)00401-3

Withey S, Cartmell E, Avery LM, Stephenson T (2005a) Bacteriophages - Potential for application in wastewater treatment processes. Sci Total Environ 339:1–18 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.09.021

Withey S, Cartmell E, Avery LM, Stephenson T (2005b) Bacteriophages — potential for application in wastewater treatment processes. 339:1–18 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.09.021

Woese CR (1987) Bacterial evolution. Microbiol Rev 51:221–271

Worley-Morse TO, Gunsch CK (2015) Modeling phage induced bacterial disinfection rates and the resulting design implications. Water Res 68:627–636 . doi: 10.1016/j.watres.2014.10.025

Wu H, Fan J, Zhang J, et al (2015a) Strategies and techniques to enhance constructed wetland performance for sustainable wastewater treatment. Environ Sci Pollut Res 22:14637–14650 . doi: DOI: 10.1007/s11356-015-5151-x

Wu H, Fan J, Zhang J, et al (2015b) Strategies and techniques to enhance constructed wetland performance for sustainable wastewater treatment. Environ Sci Pollut Res 22:14637–14650 . doi: 10.1007/s11356-015-5151-x

Wu H, Zhang J, Hao H, et al (2014a) Bioresource Technology A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment : Design and operation. Bioresour Technol. doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.068

Wu H, Zhang J, Ngo HH, et al (2015c) A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. Bioresour Technol 175:594–601 . doi: 10.1016/j.biortech.2014.10.068

Wu M, Li Q, Tang X, et al (2014b) Arsenic (V) removal in wetland filters treating drinking water with different substrates and plants. Intern J Environ Anal Chem 94:618–638 . doi: 10.1080/03067319.2013.864647

Wu S, Austin D, Liu L, Dong R (2011) Performance of integrated household constructed wetland for domestic wastewater treatment in rural areas. Ecol Eng 37:948–954

Wu S, Carvalho PN, Müller JA, et al (2016) Sanitation in constructed wetlands: A review on the removal of human pathogens and fecal indicators. Sci Total Environ 541:8–22 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.09.047

Wu S, Kuschk P, Brix H, et al (2014c) Development of constructed wetlands inperformance intensifications for wastewater treatment: A nitrogen and organic matter targeted review. Water Res 57:40–45 . doi: 10.1016/j.watres.2014.03.020

Wu Y, Li T, Yang L (2012) Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: A review. Bioresour Technol 107:10–18 . doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.088

Xu AH, Roberts N, Singleton FL, et al (2018) Survival and Viability of Nonculturable Escherichia coli and Vibrio cholerae in the Estuarine and Marine Environment Stable URL : https://www.jstor.org/stable/4250723. 8:313–323

Xu D, Jia R, Li Y, Gu T (2017) Advances in the treatment of problematic industrial biofilms. World J Microbiol Biotechnol 33: . doi: 10.1007/s11274-016-2203-4

Xu D, Li Y, Howard A (2013) Influence of earthworm Eisenia fetida on removal efficiency of N and P in vertical flow constructed wetland. 5922–5929 . doi: 10.1007/s11356-013-1860-1

Yang Y, Alvarez PJJ (2015) Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles Stimulate Biofilm Development. Environ Sci Technol Lett 2:221–226 . doi: 10.1021/acs.estlett.5b00159

Ye F, Li Y (2009) Enhancement of nitrogen removal in towery hybrid constructed wetland to treat domestic wastewater for small rural communities. Ecol Eng 35:1043–1050 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2009.03.009

Ye M, Sun M, Huang D, et al (2019) A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. Environ Int 129:488–496 . doi: 10.1016/j.envint.2019.05.062

Younger PL, Henderson R (2014) Synergistic wetland treatment of sewage and mine water: Pollutant removal performance of the first full-scale system. Water Res 55:74–82 . doi: 10.1016/j.watres.2014.02.024

Zaytsev I, Mander Ü, Lõhmus K, Nurk K (2011) Enhanced denitrification in a bioaugmented horizontal subsurface flow filter. Ecol Eng 37:1050–1057 . doi: 10.1016/j.ecoleng.2010.10.007

Zeng B, Zhao G, Cao X, et al (2013) Formation and resuscitation of viable but nonculturable Salmonella typhi. Biomed Res Int 2013: . doi: 10.1155/2013/907170

Zhai Y, Zhao X, Teng Y, et al (2017) Groundwater nitrate pollution and human health risk assessment by using HHRA model in an agricultural area, NE China. Ecotoxicol Environ Saf 137:130–142 . doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.11.010

Zhang DQ, Jinadasa KBSN, Gersberg RM, et al (2014) Application of constructed wetlands for wastewater treatment in developing countries - A review of recent developments (2000-2013). J Environ Manage 141:116–131 . doi: 10.1016/j.jenvman.2014.03.015

Zhang Y, Hu Z (2013) Combined treatment of Pseudomonas aeruginosa biofilms with bacteriophages and chlorine. Biotechnol Bioeng 110:286–295 . doi: 10.1002/bit.24630

Zhang Y, Hunt HK, Hu Z (2013a) Application of bacteriophages to selectively remove Pseudomonas aeruginosa in water and wastewater filtrationsystems. Water Res 47:4507–4518 . doi: 10.1016/j.watres.2013.05.014

Zhang Y, Hunt HK, Hu Z (2013b) Application of bacteriophages to selectively remove Pseudomonas aeruginosa in water and wastewater filtration systems. Water Res 47:4507–4518 . doi: 10.1016/j.watres.2013.05.014

Zhao C, Xie HJ, Mu Y, et al (2014) Bioremediation of endosulfan in laboratory-scale constructed wetlands: effect of bioaugmentation and biostimulation. Environ Sci Pollut Res 21:12827–12835 . doi: 10.1007/s11356-014-3107-1

Zhao X, Bai S, Li C, et al (2019) Bioaugmentation of atrazine removal in constructed wetland: Performance, microbial dynamics, and environmental impacts. Bioresour Technol 289:121618 . doi: 10.1016/j.biortech.2019.121618

Zheng X, Huang H, Su Y, et al (2015) Long-term effects of engineered nanoparticles on enzyme activity and functional bacteria in wastewater treatment plants. Water Sci Technol 72:99 . doi: 10.2166/wst.2015.194

Zurita F, Belmont MA, De Anda J, White JR (2011) Seeking a way to promote the use of constructed wetlands for domestic wastewater treatment in developing countries. Water Sci Technol 63:654–659 . doi: 10.2166/wst.2011.229

Site internet :
http://www.onas.nat.tn/Fr/page.php?code=75

Brevet: Myriam Ben Said**,** Otaki Masahiro, Abdennaceur Hassen (2009). Method for detection of active non-cultivable bacteria using lytic bacteriophage: Use of bacteriophage for the determination of bacteriological quality of treated water. Brevet d'invention **TN 2009/0228**, INNORPI-TUNISIE.

Publications

Publications

- **Ben Saad M**., Ben Said M., Sanz-Sáez I., Sánchez O., Morató J., Bousselmi L., Ghrabi A. (2019). Enhancement of rhizocompetence in pathogenic bacteria removal of horizontal subsurface flow constructed wetland system, water science and technology. Water Science and Technology (79) 251-259 https://doi.org/10.2166/wst.2019.028. (IF= 1,624).

- Aguilar L., Gallegos Á, Arias C. A., Ferrera I., Sánchez O., Rubio R., **Ben Saad M**., Missagia B., Caroh P., Sahuquillo S., Pérez C., Morató J. (2019). Microbial nitrate removal efficiency in groundwater polluted from agricultural activities with hybrid cork treatment wetlands. Science of the Total Environment (653) 723–734 (IF=5,589).

- **Ben Saad M**., Ben Said M., Bousselmi L., Ghrabi A. (2016). Application of bioinoculation to enhance rhizocompetence of horizontal subsurface flow constructed wetland system. Desalination and Water Treatment. Volume 57, Issue 46, 1 October 2016, Pages 22133-22139. (IF=1,434).

- **Ben Saad M**., Bousselmi L., Masi F., Ghrabi A. (2015). A new approach for local wastewater management sanitation case study of rural school (Chorfech 24). Water Practice and Technology 10 (3) 474-477 (indexed by google scholar).

- Ben Said M., **Ben Saad M**., Achouri F., Bousselmi L., Ghrabi A. (2019). Detection of active bacteria under stress conditions using lytic phage. Water Science and Technology (80) 282-289. (IF=1,624).

- **Chapitre d'ouvrage**:
  Ben Saad M., Aguilar L. , Gallegos A. , Missagia B. , Rubio R. , Ben Said M. ,Alberto Arias C., Ghrabi A., Morato J. (2018) REAGRITECH: A Relevant Model of Sustainable Water Management, Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions 61-63.