



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT

Spécialité: BIOLOGIE VEGETALE

Intitulé

Utilisation des systèmes biologiques dans l'épuration des eaux  
usées cas de la région d'Annaba

Presentée par: M<sup>lle</sup> KLECHE Meriem

Membre de Jury:

DJEBAR Mohamed Réda	(Pr)	Président	Université d'Annaba
BERREBBAH Houria	(Pr)	Directeur de thèse	Université d'Annaba
MEKSEM Leila	(Pr)	Examineur	Université d'Annaba
SOUIKI Lynda	(MC.A)	Examineur	Université de Guelma
KACHI Slimane	(MC.A)	Examineur	Université de Guelma
MEZEDJRI Lyamine	(MC.A)	Examineur	Université de Skikda

Année universitaire: 2012-2013



## Remerciements

Ces recherches ont été effectuées au Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba, dirigé par monsieur le Professeur **Mohammed-Rede DJEBAR**. Je tiens à le remercier de l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire et de l'intérêt qu'il a témoigné à mon égard. Je le remercie chaleureusement de me faire l'honneur de présider ce jury.

Ma reconnaissance va tout particulièrement à madame **BERREBBAH- DJEBAR Houria**, Professeur à L'Université de Annaba, qui a assuré la direction de ce travail. L'attention qu'elle a portée à ma recherche, ses conseils, ses discussions critiques ainsi que sa disponibilité attentive et amicale ont permis de mener à bien la réalisation de ce travail.

Monsieurs **S. KACHI**, Maitre de conférences A, à l'université de Guelma, **L.MEZEDJRI**, Maitre de conférences A, à l'Université de Skikda, madame **L.MEKSEM**, Professeur à l'Université de Annaba ainsi que madame **L. SOUIKI** Maitre de conférences à l'Université de Guelma, qui ont bien voulu accepter de faire partie du jury de cette thèse. Je leur en suis très reconnaissante et leur exprime toute ma gratitude.

Je remercie très vivement Monsieur **G. LE FEVRE**, Docteur au laboratoire d'Electrochimie, Chimie des Interfaces et Modélisation pour l'Energie ; Paris ; Pour m'avoir accueillie et aidée à réaliser les examens de microscopie électronique à balayage.

Je remercie enfin tous mes amis du Laboratoire particulièrement **Ramdani K.** et **grara N.** pour leur aide.

*Dédicaces*

*A dieu tout puissant pour m'avoir donné la force pour*

*la réalisation de ce travail.*

*Je dédie cette thèse à mes chers parents.*

*A ma famille.*

*A toute personne qui m'a aidé*

*dans la réalisation de ce travail.*

*Merci.*

## Résumé

La phytoremédiation est devenue actuellement une nécessité. Ainsi, dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'épuration biologique des eaux usées de Oued Meboudja. Les analyses physicochimiques des eaux après épuration ont mis en évidence un abattement important des matières en suspension, de la DCO et de la DBO5 et du taux de métaux présents au niveau des racines à l'exemple du Fer et du Zinc .

Nous avons également mis en évidence des modifications importantes de certains paramètres biométriques et physiologiques tels l'augmentation du nombre de racines et l'intensification du métabolisme respiratoire à travers la consommation d'oxygène par les racines isolées de *Phragmites australis* , placées en milieu pollué.

Sur le plan biochimique et enzymatique, nos résultats ont confirmé l'implication des enzymes de la métabolisation au niveau des racines et des feuilles, avec l'augmentation des activités GST, CAT et APX traduisant une métabolisation racinaire intense en milieu pollué.

La dernière partie de notre travail est consacrée à l'étude de la dispersion des métaux au niveau des tissus racinaires par Microscopie Electronique à balayage et par ICP-EDX. Nous avons ainsi localisé un ensemble de métaux principalement le Fer et le Zinc, dont la concentration semble moins importante au niveau des racines après épuration.

**Mots clés:** *Phragmites australis*, racines, Phytoremédiation , détoxification, GSH, GST, APX et MEB.

## **Abstract**

The Phytoremediation has now become a necessity. Thus, in our work, we are interested in the biological wastewater treatment of Oued Meboudja. The physicochemical analysis of water after treatment showed a significant reduction of suspended matter, COD and BOD5 and rate of metals in roots for example iron and zinc.

We also highlighted some significant changes in biometric and physiological parameters such as increasing the number of roots and increased respiratory metabolism through the oxygen consumption in isolated roots of *Phragmites australis*, placed in a polluted environment.

On biochemical and enzymatic level, our results confirmed the enzymes involvement in metabolism in the roots and leaves with increasing in GST, CAT and APX activities reflecting intense root metabolism in polluted environment.

The last part of our work is devoted to the study of the dispersion of metals in root tissue by scanning electron microscopy and ICP-EDX. We have located a set of metal mainly iron and zinc, which the concentration seems less important in roots after treatment.

**Keywords:** *Phragmites australis* roots, phytoremediation, detoxification, GSH, GST, APX and SEM.

## الملخص

إن معالجة التلوث باستعمال النباتات أصبحت في وقتنا الحالي ضرورة ملحة. من خلال هذا العمل قمنا بالمعالجة البيولوجية لمياه الصرف لواد مبعوجة وقد أظهرت التحليل الفيزيوكيميائية للمياه بعد المعالجة انخفاضاً كبيراً في المواد العالقة، COD و BOD5 ومعدل المعادن على مستوى الجذور مثل الحديد والزنك.

أبرزنا أيضاً بعض التغييرات الهامة لبعض المعايير البيومترية و الفسيولوجية مثل زيادة عدد الجذور وزيادة النشاط التنفسي عن طريق استهلاك الأوكسجين من قبل جذور معزولة من *Phragmites australis* ، وضعت في بيئة ملوثة.

على مستوى الدراسة البيوكيميائية والأنزيمية، أكدت نتائجنا مشاركة الإنزيمات في عملية التمثيل الغذائي في الجذور والأوراق مع زيادة في نشاط GST، CAT و APX و التي تعكس التمثيل الغذائي المكثف للجذور في البيئة الملوثة.

الجزء الأخير من عملنا خصص لدراسة انتشار المعادن في الأنسجة الجذرية بواسطة المجهر الإلكتروني و ICP-EDX، من خلالها تم تحديد مجموعة من المعادن الموجودة، أهمها الحديد والزنك، وبتراكيز أقل بعد المعالجة.

الكلمات المفتاحية : *Phragmites australis*: الجذور، المعالجة بالنبات، إزالة السموم، GST، APX ,MEB.

# Sommaire

Résumés

Liste des Figures

Liste des tableaux

Liste des planches

Liste des abréviations

## Chapitre I: Introduction Générale

Généralité.....	01
1. Les milieux humides.....	02
2-La bio- remediation.....	04
-Phytoextraction ou phytoaccumulation.....	04
-Phytotransformation ou phytodegradation.....	04
-Rhizofiltration.....	04
-Phytovolatisation.....	05
3-Différentes méthodes de traitement des eaux usées.....	05
3-1-Les filtres horizontaux .....	06
3-2-Les filtres verticaux.....	07
3-3-Systèmes à hybrides.....	08
4-Les milieux humides artificiels.....	09
4-1-Rôles des plantes.....	09
4-2- Oxygénation de la rhizosphère.....	10
4-3-Ancrage des microorganismes.....	11
4-4- Enlèvement de la matière organique.....	12
4-5-Enlèvement des métaux.....	12
5- But du travail.....	14

## Chapitre II : Partie Physicochimique

1-Introduction.....	15
2 Matériel et méthodes.....	16
2-1Matériel biologique.....	16
2-2Prélèvement des eaux.....	17
2-3 Mise en place du dispositif.....	18
2-4 Présentation de la zone d'étude.....	19
2-5 Situation géologique et hydrologie d'Oued Meboudja.....	19
3-Méthode d'analyse des eaux.....	21
4- Dosage des métaux au niveau des plantes.....	21
-Minéralisation végétale.....	22
5-Résultats.....	23
5-1 Paramètres physicochimiques des eaux usées.....	23
5-1-1 Température.....	23
5-1-2 pH.....	23
5-1- 3 Conductivité électrique.....	23
5-1-4 Ammonium.....	25
5-1-5 Nitrates.....	25
5-1-6 Nitrites.....	25
5-1-7 Orthophosphates.....	27
5-1-8 Matières en suspension.....	27
5-1-9 Demande chimique en oxygène(DCO).....	29
5-1-10 Demande biochimique en oxygène (DBO <sub>5</sub> ) .....	29
5-2 Dosage des métaux au niveau des racines.....	31
5-2-1 Variation du taux de Fer au niveau des racines.....	31

5-2-2 Variation du taux de Zinc au niveau des racines.....	31
Discussion.....	33
Conclusion.....	38

### **Chapitre III : Partie Biométrie et physiologique**

1-Introduction.....	39
2- Matériel et méthodes.....	39
2-1 Nombre moyen des racines.....	39
2-2 Activité respiratoire.....	39
3-Résultats.....	41
3-1 nombre moyen des racines.....	41
3-2 Activité respiratoire.....	42
Discussion.....	43
Conclusion.....	44

### **Chapitre IV : Partie Biochimique et enzymatique**

1. Introduction.....	45
2-Matériel et méthodes.....	48
2-1 Matériel biologique.....	48
2-2 Dosages biochimiques.....	48
2-2-1 Dosage des protéines totales.....	48
2-2-1 Dosage de la proline.....	48
2-2-3 Dosage de la <i>chlorophylle a,b et (a+b)</i> au niveau des feuilles.....	48
2-3 Dosage des biomarqueurs.....	48
*Préparation de l'extrait enzymatique.....	48
2-3-1 Dosage du glutathion GSH.....	49

2-3-2 Mesure de l'activité Glutathion –S Transferase .....	49
2-3-3 Mesure de l'activité Catalase .....	49
2-3-4 Mesure de l'activité Ascorbate Peroxydase .....	49
3-Analyse statistique.....	49
4-Résultats.....	50
4-1 Paramètres biochimiques.....	50
4-1-1 Variation de la teneur en protéines totales chez <i>Phragmites australis</i> .....	50
*Au niveau des racines.....	50
*Au niveau des feuilles.....	50
4-1-2 Variation de la teneur en proline chez <i>Phragmites australis</i> .....	52
*Au niveau des racines.....	52
*Au niveau des feuilles.....	52
4-1-3 Variation de la teneur en chlorophylle au niveau des feuilles de <i>Phragmites australis</i> .....	54
* Variation de la teneur en <i>chlorophylle a</i> .....	54
*Variation de la teneur en <i>chlorophylle b</i> .....	54
*Variation de la teneur en <i>chlorophylle a+b</i> .....	54
4-2 Paramètres enzymatiques.....	57
4-2-1 Variation du taux de GSH chez <i>Phragmites australis</i> .....	57
*Au niveau des racines.....	57
*Au niveau des feuilles.....	57
4-2-2 Variation de l'activité GST chez <i>Phragmites australis</i> .....	59
*Au niveau des racines.....	59
*Au niveau des feuilles.....	59
4-2-3 Variation de l'activité Catalase chez <i>Phragmites australis</i> .....	61

*Au niveau des racines.....	61
*Au niveau des feuilles.....	61
4-2-4 Variation de l'activité Ascorbate Peroxydase (APX) chez <i>Phragmites australis</i> .....	63
*Au niveau des racines.....	63
*Au niveau des feuilles.....	63
Discussion.....	65
Conclusion.....	70

## **Chapitre V : partie Microscopie Electronique à Balayage**

1-Introduction.....	71
2-Matériel et méthodes.....	71
2-1 Principe de la Microscopie Electronique à Balayage(MEB).....	71
3-Résultats.....	72
3-1 Observation microscopique(MEB).....	72
3-2 Identification des dépôts par rayon X.....	72
Discussion.....	77
Conclusion.....	77
<b>Conclusion générale</b> .....	78
<b>Références bibliographiques</b> .....	80
<b>Annexes</b> .....	94

## **LISTE des planches**

<b>planche</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Observation au microscope électronique a balayage de la distribution des métaux au niveau des racines témoins (a) et traitées (b, c, d) après E1.	<b>73</b>
<b>2</b>	Observation au microscope électronique a balayage de la distribution des métaux au niveau des racines témoins (a) et traitées (b, c, d) après E2.	<b>74</b>
<b>3</b>	Spectres par EDS des métaux lourds dans une racine témoin et traitée après E1.	<b>75</b>
<b>4</b>	Spectres par EDS des métaux lourds dans une racine témoin et traitée après E2.	<b>76</b>

## Liste des abréviations

ICP : Spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif

E1 : Epuration 1.

E2 : Epuration 2.

ETM : éléments trace métallique.

GST : glutathione *S*-transferase

EDS: Energy dispersive X-ray spectrometry

## ANNEXES

**Tableau 1 : Normes algérienne pour le dosage physicochimiques des eaux usées.**

<b>Paramètres</b>	<b>valeurs</b>
Température	<b>30C°</b>
pH	<b>6,5- 8,5</b>
Matières en suspension	<b>35mg /l</b>
DCO	<b>120mg/l</b>
DBO5	<b>40mg/l</b>
nitrate	<b>0,1mg/l</b>
Orthophosphate	<b>0,5mg/l</b>
Ammonium	<b>2-8mg/l</b>
nitrite	<b>0,3-1mg/l</b>

**Tableau 2 : norme international des métaux lourds aux niveaux des plantes**

Fer	<b>0,04mg/l</b>
Zinc	<b>0,03mg/l</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
<b>1</b>	Schéma d'un filtre horizontal en coupe transversale (Pascale, 2007).	<b>06</b>
<b>2</b>	Schéma d'un filtre vertical (deuxième étage) en coupe transversale (Pascale, 2007).	<b>07</b>
<b>3</b>	Roseaux ( <i>Phragmites australis</i> ) ( <a href="http://www.afleurdepeau.com">www.afleurdepeau.com</a> )	<b>17</b>
<b>4</b>	Système d'épuration (les deux étages d'épurations). <i>(Laboratoire de toxicologie cellulaire)</i>	<b>18</b>
<b>5</b>	Situation géographique de Oued Meboudja Annaba (Djabri 1996)	<b>20</b>
<b>6</b>	Schéma de l'électrode à oxygène ( <i>Djebar et Djebar, 2000</i> )	<b>40</b>
<b>7</b>	Variation de la consommation en O <sub>2</sub> (nmoles/g de poids frais) chez <i>Phragmites australis</i> placées dans des eaux usées (E1, E2) et témoins	<b>42</b>
<b>8</b>	Schéma simplifié de détoxification des xénobiotiques, d'après Coleman <i>et al.</i> (1997)	<b>47</b>
<b>09</b>	Variations des teneurs en protéines totales au niveau des racines de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration	<b>51</b>
<b>10</b>	Variations des teneurs en protéines totales au niveau des feuilles de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>51</b>
<b>11</b>	Variations des teneurs en proline au niveau des racines de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>53</b>
<b>12</b>	Variations des teneurs en proline au niveau des feuilles de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>53</b>
<b>13</b>	Variations des teneurs en chlorophylle <i>a</i> au niveau des feuilles <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>55</b>

<b>14</b>	Variations des teneurs en chlorophylle <i>b</i> au niveau des feuilles de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>55</b>
<b>15</b>	Variations des teneurs en chlorophylle <i>a+b</i> chez les feuilles de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>56</b>
<b>16</b>	Variations du taux de GSH au niveau des racines de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>58</b>
<b>17</b>	Variations du taux de GSH au niveau des feuilles de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>58</b>
<b>18</b>	Variations de l'activité GST au niveau des racines de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>60</b>
<b>19</b>	Variations de l'activité GST au niveau des feuilles de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>60</b>
<b>20</b>	Variations de l'activité Catalase au niveau des racines de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>62</b>
<b>21</b>	Variations de l'activité Catalase au niveau des feuilles de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>62</b>
<b>22</b>	Variations de l'activité APX au niveau des racines de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>64</b>
<b>23</b>	Variations de l'activité APX au niveau des feuilles de <i>Phragmites australis</i> . Après épuration.	<b>64</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
<b>1</b>	Principaux éléments étudiés et méthodes d'analyse pour chaque échantillon d'eau.	<b>21</b>
<b>2</b>	Variations de la température avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>24</b>
<b>3</b>	Variations du pH avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>24</b>
<b>4</b>	Variations de la conductivité avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>24</b>
<b>5</b>	Variations des teneurs en ammonium avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>26</b>
<b>6</b>	Variations des teneurs en nitrates avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées	<b>26</b>
<b>7</b>	Variations des teneurs en nitrites avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>26</b>
<b>8</b>	Variations des teneurs en orthophosphates avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>28</b>
<b>9</b>	Variations des MES avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>28</b>
<b>10</b>	Variations des teneurs en DCO avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>30</b>
<b>11</b>	Variations des teneurs en DBO <sub>5</sub> avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>30</b>
<b>12</b>	Variations des teneurs en Fer avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>32</b>
<b>13</b>	Variations des teneurs en Zinc avant et après séjour des plants de <i>Phragmites australis</i> dans les eaux usées.	<b>32</b>
<b>14</b>	Evolution du nombre de racines de <i>Phragmites australis</i> placées dans les eaux usées (E1, E2) et Témoin (T).	<b>41</b>



**GENERALITES**

L'eau est une source de vie précieuse. Après l'oxygène, elle est notre second besoin vital. Si l'on peut résister 5 semaines à la faim, on ne peut pas rester plus de 3-4 jours sans boire !

Partout sur la planète, le développement des activités humaines, domestiques ou industrielles, est tributaire de la ressource en eau. Cette diversité des usages induit une série d'impacts variés sur la qualité de l'eau.

Il existe pourtant un point commun, intrinsèquement lié à la nature de l'eau : qu'elle soit intégrée à la filière agroalimentaire ou qu'elle soit solvant universel, l'eau poursuit son cycle en rejoignant, tôt ou tard, la nappe, la rivière, le fleuve en y emportant ce dont on l'a chargée. (Kengne, 2000).

Les sites, ayant utilisé ou généré des produits dangereux ou toxiques, constituent autant de lieux potentiellement pollués et les principales catégories de polluants incluent les solvants industriels, les produits pétroliers, les métaux lourds et les pesticides. C'est ainsi que les rejets d'eaux dites "usées" ont considérablement évolué en quantité et en complexité. Les rejets domestiques simples s'enrichissent de produits plus complexes (lessives...) et les réseaux d'assainissement recueillent des rejets industriels, commerciaux ou artisanaux aux caractéristiques très diverses. (Maystre, 2000).

Les eaux de pluies, lessivant des surfaces croissantes de bitume et de toitures, se chargent en produits minéraux et organiques et augmentent ainsi le flux polluant à traiter. Lorsque les eaux usées ne sont pas traitées, les cours d'eau sont dépassés dans leur capacité naturelle d'épuration et se retrouvent pollués. (Maystre, 2000).

Le traitement ou l'épuration des eaux usées a donc pour objectif de réduire la charge polluante qu'elles véhiculent afin de rendre au milieu aquatique une eau de qualité, respectueuse des équilibres naturels et de ses usages futurs (pêche, loisir, alimentation, utilisation agricole ou industrielle, etc.). (Bouffard, 2000).

Depuis la "Décennie internationale de l'eau potable et de l'assainissement", de nombreux efforts ont été consentis dans le secteur de l'approvisionnement en eau potable et de l'assainissement, en Afrique. (Doulaye, 2002)

Ces efforts ont été investis afin d'épurer les eaux usées rejetées par les industries et les productions agricoles. La dilution des eaux usées dans les cours d'eau, qui était pratique courante, a donc laissé place à l'utilisation d'usines d'épuration sophistiquées et très performantes qui utilisent les dernières technologies.

Ces usines coûtent cependant très cher à construire et à opérer, puisqu'elles nécessitent l'intervention de spécialistes et consomment beaucoup d'énergie. Les petites municipalités n'ont donc pas les moyens de s'offrir de telles installations pour épurer leurs eaux usées aussi est-il opportun de se tourner vers des technologies plus abordables mais pouvant offrir un rendement adéquat. (Bouffard, 2000).

Beaucoup d'intérêt a été porté ces dernières décennies à la phytoépuration des eaux usées. Les technologies développées exploitent les capacités d'adaptation des systèmes racinaires aux fortes charges polluantes et aux conditions d'anoxie ou d'hypoxie du substrat, entraînant des relations symbiotiques entre les microorganismes et les racines qui favorisent l'élimination des polluants (Kern & Idler , 1999).

En effet, les marais naturels regorgent de microorganismes, de plantes et d'animaux dont la chaîne alimentaire agit sur l'eau, pour la libérer de polluants comme la matière organique, l'azote et le phosphore.( Vidali, 2001).

De plus, depuis une vingtaine d'années, des marais construits par l'homme ont été aménagés en Europe et aux Etas-Unis dans le but d'utiliser leur potentiel dans le traitement des eaux résiduaires de petites municipalités. Ces systèmes de marais, conçus pour optimiser les mécanismes d'épuration de la nature, n'utilisent que l'énergie du soleil et du vent pour fonctionner. Qui plus est, ils sont économiques à construire et n'exigent qu'une intervention minimale de la part de l'opérateur. Le faible coût et les bonnes performances des marais épurateurs sont donc à l'origine d'un engouement récent pour cette technologie encore méconnue. (Bouffard, 2000).

### **1. Les milieux humides :**

Les milieux humides peuvent être considérés comme des écotones entre les milieux terrestres et aquatiques. Ils présentent en effet certaines structures et fonctions caractéristiques des écosystèmes terrestres, et d'autres typiques des milieux aquatiques.

Leur végétation, bien qu'adaptée à tolérer l'inondation, est enracinée dans le sol et ressemble ainsi énormément à la végétation terrestre, alors que les processus biogéochimiques qui ont lieu dans leurs sédiments et leur chaîne alimentaire ressemblent plutôt à ceux du milieu aquatique.

De plus, les milieux humides représentent une mosaïque temporelle et spatiale complexe, ayant des caractéristiques structurales et fonctionnelles particulières (Lemly, 1997).

En effet, la structure et la composition en espèces de la végétation sont en fonction de la profondeur de l'eau et de la nature du sol ; un même milieu humide peut donc avoir un aspect très différent selon la quantité d'eau disponible au cours de la saison de croissance.

Le choix du procédé de traitement de la pollution résulte d'une combinaison de critères : le lieu du traitement (in-situ, ex-situ), l'action à conduire (stabilisation, extraction ou dégradation) et la technique à mettre en oeuvre pour y parvenir (mécanique, chimique ou biologique). Les méthodes physico-chimiques comme l'incinération, l'extraction ou la photo-oxydation, sont très coûteuses, nécessitent souvent un traitement ex-situ des sols et peuvent produire de nouveaux déchets ou bien des gaz à effet de serre. L'excavation du sol, souvent préalable à ces traitements, est une étape limitante car elle déstructure les sols et augmente l'érosion.

De plus, elle limite l'implantation ultérieure d'une activité biologique en raison de la suppression de la terre arable qui contient les éléments nutritifs essentiels aux végétaux. Les alternatives récentes aux méthodes classiques de dépollution des sols font appel à des processus biologiques. En effet, les microorganismes et les plantes sont envisagés pour décontaminer de nombreux types de pollution (VILA, 2006).

Au cours de leur évolution, les plantes ont développé des mécanismes complexes pour absorber les substances organiques ou minérales du sol, de l'eau et de l'air à travers leurs racines et leurs feuilles, lesquelles sont ensuite transportées dans d'autres parties de la plante pour être utilisées, transformées, dégradées ou stockées (Cunningham *et al.*, 1996)

La phytoremédiation permet de restaurer grâce aux plantes, les ressources essentielles que sont l'eau, les sols et l'air lorsqu'elles sont contaminées. Elle a pour but d'éliminer, contenir, ou rendre moins toxiques les contaminants environnementaux et permet de réduire le risque de dégradation des écosystèmes naturels.

La plante devient alors un système de pompage et de filtration dont les racines et les feuilles sont les extracteurs pouvant trouver, altérer et/ou transporter des éléments et des composés contre des gradients chimiques importants.) (Dosnon-Olette .2009)

Dans les années 1990, différents chercheurs ont suggéré que la végétation pourrait être utilisée pour augmenter la dégradation microbienne des polluants.

Après les pesticides, l'intérêt se porte sur les polluants organiques : leur dégradation pourrait être favorisée, *in situ*, lorsque les plantes et les micro-organismes de la rhizosphère sont exposés longtemps à un toxique (Walton et Anderson, 1992).

Lors d'une exposition chronique, les microorganismes qui peuvent dégrader un toxique ou survivre à des concentrations de toxiques élevées dans un sol, ont naturellement des chances de devenir plus abondant sur un terrain pollué. De plus, les taux de dégradation microbienne peuvent être accélérés par une plante-hôte associée. On comprend donc l'avantage des espèces végétales natives de la région ou très adaptées au site, à son environnement.

## 2-La bio-remédiation

Plusieurs mécanismes permettent aux plantes l'élimination des polluants par phytoremédiation (Schröder *et al.*, 2002) :

-**La phytoextraction ou phytoaccumulation** utilise des plantes qui absorbent et concentrent dans leurs parties récoltables (feuilles, tiges, racines) les polluants provenant des sols ou des eaux. On utilise ce terme souvent dans le cas des métaux lourds et des composés organiques, avec l'utilisation de plantes accumulatrices et/ou hyperaccumulatrices qui sont capables de tolérer et d'accumuler ces polluants. (Pilon-Smits, 2005)

- **La phytotransformation ou phytodégradation** utilise les propriétés de certaines plantes à produire des enzymes qui catalysent la dégradation des substances absorbées ou adsorbées, celles-ci sont alors transformées en substances moins toxiques ou non toxiques par la métabolisation des contaminants dans les tissus des plantes ou par les organismes de la rhizosphère maintenue par la plante (on parle alors de **rhizodégradation, de phytostimulation ou encore de bioremédiation**). (Blauboer, 1996)

- **La rhizofiltration** permet la dépollution et la restauration des eaux de surface et souterraines. Les contaminants sont absorbés ou adsorbés par les racines des plantes en milieu humide. Lors de grande capacité d'absorption par ces dernières on parle de « **phytopumping** », on utilise le plus souvent des arbres (comme le saule ou le peuplier) pour assécher les terrains et extraire les polluants du sol. (Schröder *et al.*, 2002)

-**La phytovolatilisation** est le processus par lequel les plantes transforment les contaminants du sol ou des eaux polluées en éléments volatiles et les relâchent dans l'atmosphère via leurs feuilles. (Corgie et al., 2004).

En effet, leur productivité primaire est supérieure à celle des écosystèmes aquatiques ainsi que de la plupart des écosystèmes terrestres (Reddy et Gale, 1994).

La pédologie est également un domaine important pour l'étude des milieux humides. En effet, le sol joue un rôle actif dans l'amélioration de la qualité de l'eau. Il influence directement la croissance des plantes par sa teneur en éléments nutritifs disponibles, ainsi que l'activité microbienne par son contenu en matière organique facilement dégradable.

De plus il retient une partie des nutriments par la formation de complexes ou encore par la liaison des éléments chimiques avec les particules du sol. (Hammer, 1992 ; Raimond, 1994).

### **3. Différentes méthodes de traitement des eaux usées**

Les milieux humides naturels ont servi pendant de nombreuses années à traiter les eaux usées domestiques en Europe, aux Etats-Unis et au Canada (Pries, 1994). Ce genre de traitement doit cependant être utilisé avec prudence pour éviter de surcharger les écosystèmes et les cours d'eau en aval. Leur utilisation est d'ailleurs en déclin depuis l'instauration des programmes de protection des milieux humides (Brown, 1994). L'étude de ces systèmes a cependant conduit à une meilleure compréhension de la capacité des milieux humides à assimiler les polluants et a aussi permis de définir des critères de conception pour de nouvelles installations de traitement naturel des eaux.

Les milieux humides artificiels, construits dans le seul but de servir au traitement des eaux usées, sont de plus en plus populaires et leurs utilisations pour le traitement secondaire des effluents liquides est grandement avantageux pour l'environnement. On s'entend en général pour appeler milieu humide artificiel un milieu construit spécifiquement pour le traitement des eaux usées et imitant le plus possible le fonctionnement des milieux humides naturels. (Brown, 1994).

Les milieux humides artificiels peuvent être regroupés en trois catégories principales : Les filtres verticaux, horizontaux et systèmes hybrides.

### 3.1. Les filtres horizontaux

Les filtres horizontaux sont des bassins remplis de manière homogène de sable, de gravier ou de sol en place, et dans lesquels ont été plantés des macrophytes.

L'effluent est réparti sur toute la largeur et la hauteur du filtre par un système répartiteur situé à une extrémité du bassin ; il s'écoule ensuite dans un sens principalement horizontal au travers du substrat. La plupart du temps, l'alimentation a lieu en continu et les matériaux sont pratiquement saturés en permanence.

Le niveau d'eau doit être maintenu à environ 5 cm sous la surface du matériau. Ceci permet d'éviter les écoulements préférentiels en surface et d'assurer un flux homogène. (Boutin et al., 1997)

**En effet** l'eau ne doit pas circuler au-dessus de la surface pour ne pas court-circuiter la biomasse active située dans le filtre et responsable du traitement ; il n'y a donc pas d'eau libre. Figure (1).

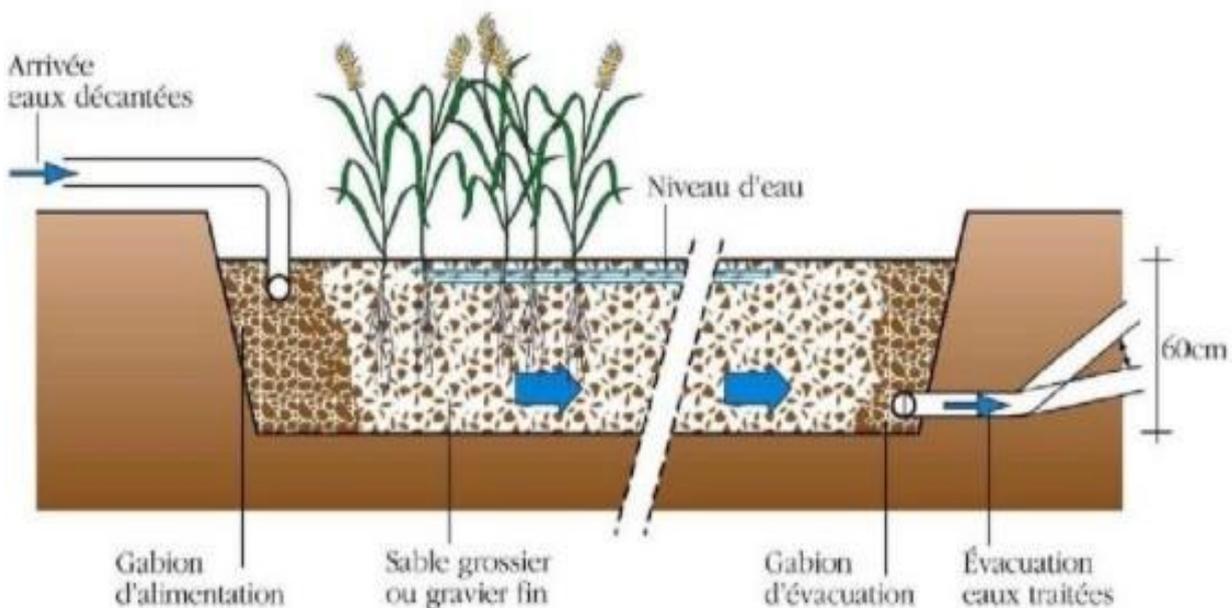


Figure 1 : Schéma d'un filtre horizontal en coupe transversale (Pascale, 2007).

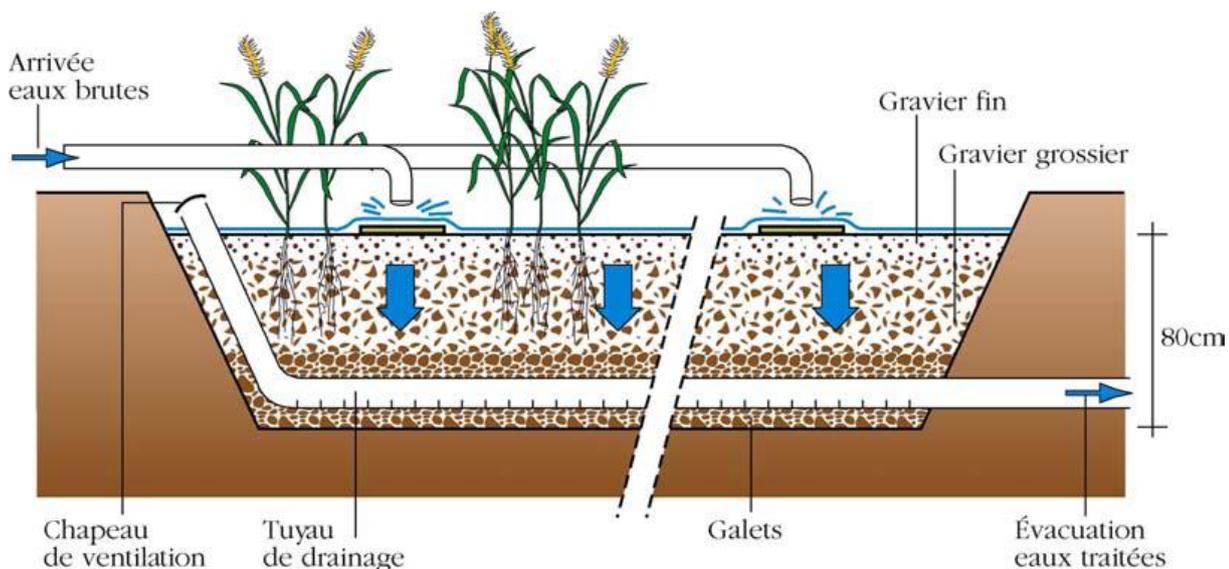
### 3.2. Les filtres verticaux

Les filtres verticaux sont des bassins remplis de couches de graviers de granulométries différentes superposées, et selon leur place dans la filière de traitements recouverts ou non d'une couche de sable, dans laquelle sont plantés les macrophytes.

Suite à des travaux conduits, notamment en France par le Cemagref, en parallèle sur les lits d'infiltration percolation sur sable et les filtres plantés de roseaux (Liénard et al., 1990 ; Guilloteau et al., 1993a et b ; Boutin et al., 1997), la conception des systèmes a évolué.

On mentionnera :

- l'alimentation par un système dit de "bâchées", c'est à dire par à-coups : après stockage temporaire le liquide est déversé rapidement sur le filtre, grâce à des pompes ou à un siphon auto-amorçant, de manière à submerger la totalité de la surface. Ce dispositif permet une infiltration homogène au travers du filtre. Figure (2).
- Les eaux sont collectées dans le fond du bassin par une couche drainante constituée de gros graviers disposés autour d'un réseau de tuyaux de drainage connecté à l'atmosphère par des cheminées d'aération.



**FILTRE VERTICAL : ALIMENTATION INTERMITTENTE  
AVEC AÉRATION PAR LA SURFACE**

**Figure 2 : Schéma d'un filtre vertical (deuxième étage) en coupe transversale (Pascale, 2007).**

L'aération est assurée par trois processus qui se conjuguent à des degrés divers et présentés ici vraisemblablement en ordre décroissant, tant il est difficile de pouvoir les quantifier avec précision :

\*la diffusion qui opère à la fois depuis la surface des filtres dès lors qu'ils ne sont pas recouverts par une lame d'eau et par le dispositif d'aération de la couche drainante.

Elle permet un renouvellement de la phase gazeuse des espaces inter granulaires en milieu non saturé.

\*La convection liée au déplacement des lames d'eau apportées à chaque bûchée qui agit, de façon très simplifiée, à la manière d'un piston poussant les gaz vers la couche drainante mais aussi aspirant de l'air via la surface dès lors que celle-ci est dénoyée.

\*Enfin, les apports excrétés par les racines des plantes et déjà mentionnés. Les filtres verticaux sont donc par essence aérobies.

L'oxygénation plus importante que dans les filtres horizontaux, assure, outre l'élimination des matières organiques dissoutes, une bonne nitrification. Grâce à la bonne oxygénation du filtre, les processus anaérobies y sont pratiquement absents et il n'y a donc pas de mauvaises odeurs générées.

### **3.3. Les systèmes hybrides**

Les systèmes hybrides sont en fait l'association en série de filtres verticaux et de filtres horizontaux. L'association la plus courante est mise en oeuvre de façon relativement limitée au Etats-Unis, en Allemagne, en Autriche et en France (Boutin, 1987) est constituée de deux étages consécutifs de filtres verticaux en parallèle suivis de deux ou trois étages de filtres horizontaux en série.

L'intérêt d'une telle association est d'obtenir une bonne nitrification dans les filtres verticaux qui sont bien oxygénés, mais aussi une dénitrification dans les filtres horizontaux où l'on trouve les conditions d'anoxie nécessaires à cette réaction. Les rendements de la dénitrification ne sont pas très élevés car les bactéries dénitrifiantes ont besoin de matière organique pour se développer et dénitrifier correctement. Or, en sortie des filtres verticaux, la majeure partie de la matière organique a été dégradée, elle n'est donc plus disponible pour les bactéries.

#### 4. Les milieux humides artificiels

La recherche a mis en évidence l'importante activité hétéro trophique des milieux humides, ce qui leur confère une grande capacité à décomposer et à transformer la matière organique et les autres substances retrouvées dans les eaux usées (Brix, 1997 ; Reimold, 1994). Ils peuvent aussi agir en tant que sources, transformateurs et réservoirs de nutriments et de carbone (Brix, 1997), empêchant ainsi la surcharge des cours d'eau adjacents tout en favorisant le recyclage des éléments nutritifs dans l'écosystème.

Dans un marais, les polluants sont enlevés via une combinaison de processus physiques, chimiques et biologiques tels la sédimentation, la précipitation, l'adsorption aux particules du sol, l'assimilation par les tissus végétaux ainsi que l'assimilation et la transformation par les microorganismes (Brix, 1993).

##### 4.1. Rôles des plantes

Les plantes caractéristiques des milieux humides sont capables de tolérer une grande gamme de régimes hydriques allant d'une brève sécheresse à une inondation permanente. Les plantes émergentes enracinées dans le substrat sont généralement désignées sous le terme de macrophytes (Greenway, 1997).

Plusieurs études comportant une comparaison entre un milieu humide avec macrophytes et un autre possédant les mêmes caractéristiques physiques mais sans macrophytes ont démontré que la présence de ces dernières améliore significativement l'efficacité du traitement des eaux usées (Breen et Chick, 1995 ; Breen, 1997 ; Lee et *al.*, 1993).

Cependant, l'importance de la réduction de la concentration des éléments nutritifs de l'eau par l'assimilation directe des macrophytes ne fait pas l'unanimité. Alors que la plupart des études semblent démontrer qu'elles ont un rôle minime à jouer dans l'enlèvement direct des nutriments par assimilation (Jewel, 1994 ; Breen et Chick, 1995), certains soutiennent que dans certaines conditions, l'assimilation par les macrophytes est le principal mécanisme d'enlèvement (Breen, 1990 ; Rogers et *al.*, 1990).

Néanmoins, bien qu'elles aient en général une capacité restreinte pour réduire la concentration des éléments nutritifs, habituellement très élevée dans les eaux usées, il est certain qu'elles contribuent grandement à l'établissement de conditions favorables à l'amélioration de la qualité de l'eau (Jewel, 1994 ; Breen et Chick, 1995).

En effet, les macrophytes agissent comme catalyseurs des réactions d'épuration en augmentant la diversité des environnements dans la zone racinaire et en favorisant une variété de réactions chimiques et biochimiques qui accroissent l'épuration (Jenssen *et al.*; 1993) ; les plus importantes seront détaillées plus loin dans cette section. De façon générale, l'importance des macrophytes pour améliorer l'efficacité de traitement d'un étang est bien reconnue puisque la majorité des études constituées ne comprennent pas la comparaison d'un marais filtrant avec un marais contrôle.

#### **4.2. Oxygénation de la rhizosphère**

Dans un marais à écoulement de surface, l'eau est oxygénée par contact avec l'air ambiant. Toutefois, à cause du faible taux de diffusion de l'oxygène dans l'eau, ce sont des conditions anaérobies qui se développent dans le sol. Afin de survivre dans ces conditions, les macrophytes ont du évoluer de façon à être en mesure de fournir de l'oxygène à leurs racines, même s'ils se retrouvent dans un milieu très pauvre en oxygène. Sans oxygène, les racines ne peuvent en effet assimiler les éléments nutritifs et l'eau nécessaire au métabolisme de la plante (Barclay et Crawford, 1982).

L'adaptation qui permet aux macrophytes de survivre dans les milieux humides est essentiellement de nature morphologique. La tige et les feuilles possèdent de larges espaces intercellulaires qui forment un réseau continu des feuilles jusqu'aux racines ; ce réseau d'aération interne est appelé aerenchyme. Cette caractéristique particulière permet aux macrophytes de survivre dans un milieu inapproprié pour les plantes terrestres (Barclay et Crawford, 1982). L'aerenchyme peut occuper jusqu'à 60% du volume total de la plante chez certaines espèces (Brix, 1994). Ces espaces permettent le transport de l'oxygène des feuilles jusqu'aux parties souterraines par diffusion moléculaire passive résultant d'un gradient de pression partielle à travers l'aerenchyme ou par simple courant de convection (convection throughflow) (Brix, 1994).

La force qui engendre le courant de convection est un gradient de température et de vapeur d'eau entre l'air des espaces intercellulaires de la plante et l'air ambiant (Brix *et al.*, 1996).

En effet, le contraste entre l'air chaud et humide de l'aerenchyme et l'air plus froid et plus sec de l'atmosphère ambiante, provoque la mise en pression (pressurisation) de l'air à l'intérieur de l'aerenchyme (Grosse *et al.*, 1996a).

Ce mode de transport est plus efficace que la simple diffusion et procure aux espèces qui en bénéficient un avantage compétitif pour survivre à de plus grandes profondeurs d'eau (Tornbjerg *et al.*, 1994 ; Grosse *et al.*, 1996a).

Ce mouvement interne de l'oxygène à travers la plante, en plus de permettre l'oxygénation des tissus racinaires, permet aussi d'oxygéner la rhizosphère par excrétion d'air au niveau des racines (Brix, 1994).

Une fois les besoins pour la respiration racinaire satisfaits, l'oxygène en excès peut en effet être relâché dans la rhizosphère (Shipper et Reddy, 1996).

Par ailleurs, le problème des macrophytes n'est pas uniquement de croître dans un substrat pauvre en oxygène, mais aussi de résister à la haute demande du milieu externe pour leur oxygène interne (Brix et Sorrell, 1996). La perte d'oxygène due à la forte demande externe pourrait, en effet, être un facteur plus limitant que l'absence d'oxygène dans les sédiments (Brix et Sorrell, 1996).

Afin d'assurer leur métabolisme racinaire, les plantes doivent donc minimiser leur perte d'oxygène. Pour ce faire, elles conservent l'oxygène interne dont elles ont besoin grâce aux couches subérisées et lignifiées de l'hypoderme et du cortex externe de la racine (Armstrong et Armstrong, 1988). Ainsi, l'excrétion se situe surtout au niveau sub-apical et il n'y a généralement pas d'excrétion d'oxygène au niveau des vieilles racines et des rhizomes (Armstrong et Armstrong, 1988).

#### **4.3. Ancrage des microorganismes**

Le transport d'oxygène vers la zone racinaire puis la rhizosphère y crée un microenvironnement oxygéné qui stimule la décomposition aérobie de la matière organique et l'établissement des bactéries nitrifiantes (Brix, 1997 ; Brix, 1994). Ceci permet la transformation du carbone et de l'azote, ce qui est essentiel dans le traitement des eaux usées (Reddy *et al.*, 1990).

En effet, la décomposition de la matière organique et la plupart des processus de traitement des eaux usées sont attribuables à des microorganismes aérobies (Brix, 1993 ; D'Angelo et Reddy, 1994).

On sait par ailleurs que la densité des populations microbiennes pouvant être supportées dans un certain volume est généralement proportionnelle à la surface spécifique (Brgoon et *al.*, 1991). Or, non seulement les racines fournissent une surface d'ancrage importante au niveau de la rhizosphère, mais les tiges et les feuilles des macrophytes contribuent, elles aussi, à accroître la surface disponible. Les bactéries, les algues et les périphyton peuvent ainsi être présents dans toute la colonne d'eau (Surrency, 1993), et le bio film qui s'établit sur ces surfaces est responsable de la majorité des processus qui ont lieu dans un marais (Brix, 1997).

#### **4.4. Enlèvement de la matière organique**

La matière organique présente, dans un milieu humide lors du traitement des eaux usées, provient en bonne partie des eaux usées elles mêmes ; mais une partie vient aussi de la sénescence des algues et des macrophytes (Gal et *al.*, 1992 ; Mann et Wetzel, 1996).

Une bonne partie des solides en suspension contenus dans les eaux usées est enlevée par décantation très tôt après leur arrivée dans le marais (Price et Robert, 1997).

La décomposition de cette matière organique dans les sédiments est principalement contrôlée par la nature du substrat et par la disponibilité d'accepteurs d'électrons (Moore et *al.*, 1992 ; Reddy et D'Angelo, 1997).

Pour une décomposition efficace, il est important d'avoir une alternance de zones réductrices et oxydantes (Armstrong et *al.*, 1990). Or les marais offrent un fort gradient de potentiel réducteur et d'oxygène dissout, ce qui crée des interfaces aérobies entre les sédiments et la zone racinaire (Reddy et D'Angelo, 1997). Ainsi, en général, la décomposition aérobie a lieu dans la colonne d'eau, à l'interface eau sédiments et dans la rhizosphère, tandis que la décomposition anaérobie prend place dans les sédiments (Moore *et al.*, 1992).

#### **4.5. Enlèvement des métaux**

Les milieux humides ont également la capacité de réduire la concentration de certains métaux dans l'eau.

Les mécanismes responsables d'enlèvement des métaux dans ce type de système sont, par ordre d'importance : les réactions chimiques et microbiologiques d'oxydation et de réduction menant à leur précipitation, l'adsorption aux particules de sol, la complexification avec les matières organiques des sédiments et l'assimilation biotique (Skousen et *al.*, 1994 ; Gersberg et *al.*, 1985, cité dans Crites et *al.*, 1997).

Ces mécanismes sont grandement influencés par le potentiel d'oxydoréduction, qui modifie le degré d'oxydation des constituants du sol et influence ainsi la mobilité et la biodisponibilité des métaux.

En présence d'un environnement réducteur dans les sédiments, les métaux existent sous forme non ionique ou encore sous forme de complexes insolubles. Sous ces formes, les métaux sont peu mobiles et leur disponibilité pour les organismes vivants est faible (Hawkins et *al.*, 1997).

Les formes ioniques sont solubles dans l'eau et leur contact avec l'oxygène présent dans la rhizosphère provoque leur oxydation et leur précipitation, favorisant ainsi l'accumulation, à la surface des racines, d'une couche d'hydroxydes métalliques appelée plaque racinaire (root plaque) (St-Cyr et Campbell, 1996). L'oxydation des métaux dans la rhizosphère diminue l'exposition des plantes aux formes réductrices toxiques des métaux qui s'accumulent dans les sols anaérobies, tout en les rendant bio disponibles pour les plantes et les microorganismes pour lesquels ils constituent des oligoéléments essentiels.

De plus, les plaques racinaires tendent à lier d'autres éléments comme le phosphore, les rendant ainsi bio disponibles (St-Cyr et Campbell, 1996), il semble que certains métaux particulièrement toxiques comme le sélénium puissent être enlevés par volatilisation (Zhang et Moore, 1997 ; Azaizeh et *al.*, 1997).

## 5. BUT DU TRAVAIL

Dans ce travail nous nous proposons de mettre en place un système d'épuration des eaux usées de Oued Meboudja. En effet les eaux drainées par Oued Meboudja sont chargées d'effluents provenant des complexes industriels avoisinants. Le but de cette étude est de déterminer si les milieux humides artificiels ou marais épurateurs peuvent constituer un système adéquat pour le traitement des eaux usées domestiques, industrielles et agricoles au niveau de Oued Meboudja (Nord Est algérien). Pour cela, nous avons mis en place un système d'épuration au laboratoire (simulation in vitro) semblable aux marais filtrants (marais à écoulement vertical). Ce système est composé de deux bacs l'un situé en hauteur et le second en contre bas pour recevoir les eaux qui s'écoulent à partir du premier bac, dans lesquels des macrophytes (*Phragmites australis*) ont été plantées.

Notre travail est subdivisé en quatre grandes parties :

- Une partie consacrée aux analyses physicochimiques d'échantillons d'eau provenant de notre site d'étude et ce pour toutes les saisons.
  
- Une partie consacrée au suivi des variations biométrique physiologiques à travers notamment la mesure des longueurs moyennes des racines des échantillons de *Phragmites australis* ainsi que l'évaluation du métabolisme respiratoire des racines isolées par le biais de la technique de la polarographie que nous avons adaptée au laboratoire à ce type d'études.
  
- La troisième partie de notre travail est consacrée au suivi des variations biochimiques et enzymatiques déployées par les plantes placées en milieu défavorable et particulièrement les enzymes de la détoxification.
  
- La quatrième partie a été effectuée au laboratoire de chimie analytique de l'université Paris VII. Nous nous sommes intéressés à la localisation des principaux métaux au niveau des racines de *Phragmites australis* par microscopie électronique à balayage et à leur identification par la technique de l'ICP.



## 1. Introduction

La gestion des déchets en général et des déchets liquides en particulier constitue aujourd'hui, une question environnementale très préoccupante dans les pays en voie de développement. Si ce constat est général, la situation est particulièrement grave dans les zones urbaines en raison des fortes densités de population et l'industrialisation intensive. Face à cette menace, la plupart des pays africains, au lendemain de leur indépendance ont opté pour les systèmes classiques d'épuration des eaux usées (boues activées notamment) (Agendia, 1995 ; Kengne, 2000). Mais, ce choix technologique s'est souvent révélé très inadapté à cause du coût très élevé des installations et de leur équipement, de l'absence de techniciens bien préparés à assurer leur maintenance et des choix de priorité fait par les puissances publiques : d'où la vétusté du matériel, la surcharge et l'abandon des ouvrages.

Par ailleurs, la croissance démographique dans ces pays et la propagation des industries et l'activité agricole intense sont si rapides qu'à moyen terme, les systèmes d'assainissement à envisager doivent être flexibles et modulables, ce qui n'est pas le cas de ces derniers. Pourtant, pour apporter des solutions à ce problème, il existe des alternatives connues, tant du point de vue technique, que du point de vue socio-économique : ce sont les méthodes naturelles de traitement des eaux usées (Ghrabi *et al.*, 1993). Parmi ces dernières notons, les lagunages, et en particulier, le lagunage à macrophytes et à microphytes.

Dans cette technique, les plantes ont développé des mécanismes complexes pour absorber les substances organiques ou minérales de l'eau à travers leurs racines et leurs feuilles, lesquelles sont ensuite transportées dans d'autres parties de la plante pour être utilisées, transformées, dégradées ou stockées (Cunningham *et al.*, 1995).

La présente étude a donc pour but, d'évaluer les performances épuratoires physico-chimiques d'une installation de lagunage, exploitée successivement sous la filière à macrophytes, (*Phragmites australis*) et de voir si ces milieux humides artificiels ou marais épurateurs peuvent constituer un système adéquat pour le traitement des eaux usées domestiques, industrielles et agricoles. Pour atteindre ce but, nous avons mis en place un système d'épuration au laboratoire (simulation *in vitro*) semblable au marais filtrant (marais à écoulement vertical). Ce système est composé de deux bacs : l'un situé en hauteur et le second en contre bas pour recevoir les eaux qui s'écoulent du premier bac, dans lesquels des macrophytes ont été plantées (*Phragmites australis*).

Nous avons choisi de travailler sur les eaux de Oued Meboudja en raison de leur forte pollution par des effluents du complexe sidérurgique (ISPAT), des eaux ménagères, des eaux de vanes et des eaux d'irrigation agricole.

## 2. Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale a été effectuée au laboratoire de toxicologie cellulaire de l'université d'Annaba.

### 2-1. Matériel biologique

Dans notre travail, nous avons utilisé un *macrophyte* réputé pour son fort pouvoir épurateur c'est : le roseau commun (*Phragmites australis*) qui est l'une des espèces végétales envahissantes (Jodoin *et al.*, 2008). Le roseau est probablement une des plantes vasculaires les plus répandues dans le monde (Mal & Narine, 2004). C'est une espèce hydrophile qui se trouve naturellement dans les milieux humides ou les plaines inondables, comme les marais d'eau douce ou saumâtre (Meyerson *et al.*, 2000) et les rives des fleuves, des rivières et des lacs (Wilcox *et al.*, 2003, Hudon *et al.*, 2005). Le roseau se dissémine soit de manière sexuée, soit par propagation végétative (Mal & Narine, 2004). Une colonie de roseau s'implante généralement dans un nouveau site par le biais de la germination d'une graine disséminée par le vent ou l'eau (Alvarez *et al.*, 2005), ou par l'enracinement d'un fragment de tige ou de rhizome (Bart & Hartman, 2003, Hudon *et al.*, 2005).

Une fois implantée, une colonie s'étend par propagation végétative à l'aide d'un réseau de rhizomes et de stolons (Haslam, 1972, Mal & Narine, 2004) c'est une plante qui résiste aux milieux les plus argileux et rocailleux, facile à planter en milieux marécageux (Fauteux, 2002). C'est une plante herbacée, halophyte à tamarix des oueds, à nappe phréatique persistante, à faible profondeur (2 à 3 m) ; Sa hauteur est de 1 à 5 mètres. Cette plante comporte 2 sortes de tiges : les unes souterraines, appelées rhizomes, les autres aériennes dressées et simples, portant de longues feuilles rubanées qui se terminent par des inflorescences (Gausen *et al.*, 1982). Elles sont dressées au bord de l'eau (nappe de roseau) et appelées roseliers ou phragmitaires (Gaujous, 1995).

Les roseaux sont des macrophytes qui appartiennent au groupement des heliophytes et se caractérisent tout particulièrement par leurs systèmes racinaires très actifs et capables de résister à des conditions très difficiles même lorsque la partie aérienne de la plante est desséchée.

Le développement de nouvelles tiges intervient entre le printemps et l'automne (d'avril à octobre).

Ce végétal peut même supporter des périodes de gel dont l'action est positive sur la déshydratation des boues (phénomène gel-degel-retractation) (Esser, 1999).

Les roseaux sont capables d'absorber et de concentrer des quantités importantes de polluants et ils contribuent à l'autoépuration des eaux. Leur développement s'accélère dans les eaux calmes et les rivières (Dajoz, 1985)

### **Systématique :**

Nous avons opté pour la classification proposée par **Quezel et al. (1962-1963)**.

Règne : Végétale.

Embranchement : Spermaphytes.

Sous/emb : Angiospermes.

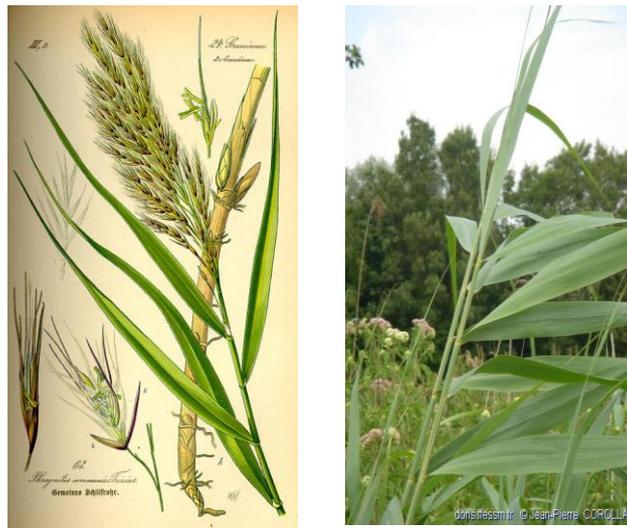
Classe : Monocotylédones.

Ordre : Graminales.

Famille : Graminées.

Genre : *Phragmites*.

Espèce : *australis*.



**Figure 3** : Roseaux (*Phragmites australis*)  
([www.afleurdepeau.com](http://www.afleurdepeau.com))

### **2-2 Prélèvement de l'eau**

Nos prélèvements ont été effectués au niveau de Oued Meboudja situé à proximité du lieu dit « Pont Bouchet » à une profondeur de 50 cm environ. Nos échantillons ont été prélevés loin des obstacles naturels comme le recommande Rodier (1996). Les eaux potables sont prélevées directement du robinet.

### 2-3 Mise en place du dispositif

L'expérience est réalisée au laboratoire dans des conditions in vitro, nous avons construit un système d'épuration type marais filtrant (marais à écoulement vertical), ce dernier est composé de deux bacs reliés entre eux par un tuyau, le premier situé à une hauteur de 53.5 cm (1er étage) et contient trois couches de graviers de granulométrie et d'épaisseur différentes (couche filtrante, couche de transition et couche drainante).

Le deuxième situé à une hauteur de 21 cm (deuxième étage) contenant aussi trois couches : deux composées de graviers et la troisième qui est la plus épaisse est constituée de sable, dans ces derniers des macrophytes ont été plantés (*Phragmites australis*), le premier bac est irrigué directement par l'eau de Oued Meboudja et le deuxième reçoit l'eau du premier étage. En parallèle, un troisième bac irrigué par de l'eau de robinet servira de témoin. On place dans chaque bac une quantité équivalente de roseaux qui séjournent une dizaine de jours au moins (Geneviève, 2002). Figure 4

Cette expérience est répétée quatre fois, à chaque saison (printemps et été, automne, hiver).



**Figure 4** : Système d'épuration (les deux étages d'épurations).

*(Laboratoire de toxicologie cellulaire)*

### **2-4 Présentation de la zone d'étude**

La région de Méboudja est connue, essentiellement, pour sa vocation agricole depuis une vingtaine d'années. C'est une vallée qui a connu un développement industriel important, ce qui a engendré des rejets abondants, non traités dans les milieux naturels. Ces rejets non contrôlés ont généré une pollution de l'eau des oueds.

Les cartes de vulnérabilité montrent que les eaux de Oued Méboudja sont très polluées, ce qui explique l'eutrophisation observée (Djabri et al., 1997).

Le canal de Oued Méboudja prolonge le canal principal du lac Fetzara en aval du pont vanne, il draine, en plus des eaux provenant du lac Fetzara, celles issues d'une région couvrant près de 276.25 Km<sup>2</sup>.

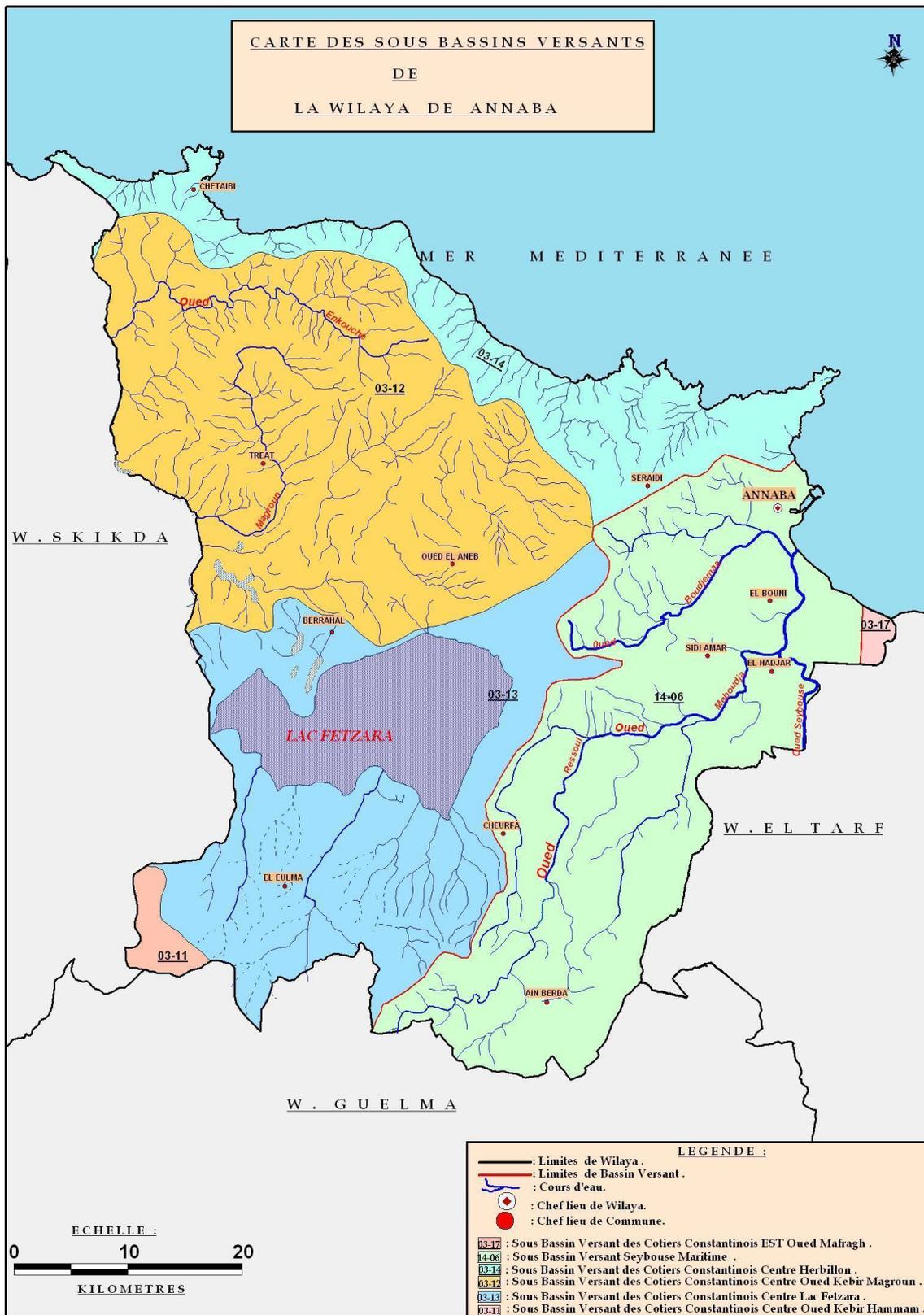
Cette dernière est composée de petits sous bassins : le sous bassin versant nord et le sous bassin sud. Il constitue la limite Ouest du complexe ISPAT (Annaba) et rejoint la Seybousse à environ 8 Km de l'embouchure vers la mer Méditerranée (Direction des Services Agricole d'Annaba 2000). Ce canal reçoit les effluents domestiques des régions de Sidi Amar et El-Hadjar et les rejets de la zone industrielle de Berrahel. Il reçoit également près de 4.5 millions de m<sup>3</sup> d'eaux usées et de rejets liquides du complexe ISPAT (Djabri, 1991).

### **2-5 Situation géologique et hydrologie de Oued Méboudja**

Oued Méboudja traverse les plaines de Annaba à l'Est du lac Fetzara, il est bordé au Nord par le massif métamorphique de l'Edough et au Sud par le piémont de la chaîne numidique (Abadlia, 1999). (figure5)

#### **\* Hydrologie de Oued Meboudja**

Le réseau hydrologique de l'Oued et ses effluents dépend étroitement des paramètres climatiques.



**Figure 5: Situation géographique de Oued Meboudja Annaba (Djabri 1996)**

### 3-Méthodes d'analyses des eaux

Pour les différentes analyses physicochimiques, nous avons prélevé des échantillons d'eau usée des différents bacs plantés de roseaux (après épuration), ainsi que les eaux usées brutes d'Oued Meboudja.

Les analyses ont été effectuées au niveau du laboratoire d'analyse « horizon » Annaba. Le tableau (1) regroupe les principaux paramètres et méthodes utilisés.

**Tableau 01** : Principaux éléments étudiés et méthodes d'analyse pour chaque échantillon d'eau.

Rep	Eléments	Méthode d'analyse
01	DCO	Rodier 1996
02	DBO5	Rodier 1996
03	Nitrite	Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire : ISO 7890 – 1 – 1984.
04	Nitrate	Méthode spectrométrique au diméthyle 2,6 phénols. ISO-6777: 1984.
05	Ortho phosphate	Dosage spectrométrique à l'aide du molybdate d'ammonium ISO 6878 -1 :1986.
06	Température	Lecture directe (thermomètre)
07	MES	Rodier 1996
08	pH	Rodier 1996
09	Ammonium	Rodier 1996
10	Conductivité	Rodier 1996

### 4-Dosage des métaux au niveau des plantes

Le dosage des métaux au niveau des plantes a été réalisé au laboratoire de chimie analytique de l'université Paris VII (France) par la méthode de l'ICP (*Inductivety CoupledPlasma Mass-Spectrometer, Elan 6000, Perkin*) et cela après une minéralisation des racines par la méthode de (Cirad, 2004).

**- Minéralisation du végétal :**

Cette méthode de mise en solution d'éléments minéraux contenus dans un matériel végétal s'adresse à des matrices appropriés, pauvres en silice et dont le résidu, après passage au four, est très réduit.

500 mg de matériel végétal préalablement séché, sont introduits dans une capsule en quartz, la capsule est placée dans un four dont la température est augmentée progressivement jusqu'à atteindre 500 C° et sera ainsi maintenue pendant 4 - 5 heures :

Après refroidissement, les cendres sont humectées avec quelques gouttes d'eau ; puis on ajoute 2.5 ml de HCL à 37 % ; on laisse en contact 10 minutes et on filtre avec de l'eau distillée dans des fioles jaugées de 50 ml.

Après avoir ajusté au trait de jauge puis homogénéisé par agitation manuelle ; les solutions sont transvasées dans des godets préalablement rincés avec la solution et sur lequel le numéro de l'échantillon est inscrit (CIRAD, 2004)

## 5-Résultats

### 5-1 Paramètres physico-chimiques des eaux usées :

Nos dosages ont dans un premier temps mis en évidence une forte pollution dépassant parfois les normes algériennes (voir Annexe).

#### 5-1-1 La température :

Le tableau (2) montre que les températures sont stables durant notre expérimentation (26,59 C°). Cependant, nous constatons une légère diminution de la température au niveau des deux bacs, et ceci est observé particulièrement en Hiver où la température diminue pour atteindre 20,54C°.

#### 5-1-2 Le pH :

Les variations du pH des eaux durant notre expérimentation sont illustrées sur le tableau (3). Ainsi nous constatons une légère diminution du pH après la première et deuxième épuration des eaux usées. En automne cette diminution est de 1,6 degré pour la deuxième épuration.

#### 5- 1-3 La conductivité électrique (CE) :

Le tableau (4) met en évidence les variations de la conductivité des eaux dans les bacs à épuration. Nous constatons une diminution très apparente de la conductivité électrique des eaux après passage dans les deux bacs. Ainsi après une première épuration la conductivité diminue d'environ 10% par rapport aux eaux n'ayant pas été en contact avec les plantes. Après le second passage (deuxième épuration) , la conductivité diminue d'environ 60% en Automne et de 15% au printemps. Celle-ci passe en effet de 825 à 156 après passage dans les deux bacs.

**Tableau 2: Variations de la température avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.**

Saisons	Température en (°C)		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
<b>Printemps</b>	18	16	14
<b>Eté</b>	21	19	18,01
<b>Automne</b>	25,5	23	21,7
<b>Hiver</b>	26,59	21,5	20,54

**Tableau 3: Variations du pH avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.**

Saisons	pH		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
<b>Printemps</b>	7,5	7	7,1
<b>Eté</b>	8	7,6	7,1
<b>Automne</b>	8,7	7,5	7,1
<b>Hiver</b>	7,9	7,6	7,2

**Tableau 4: Variations de la conductivité avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.**

Saisons	Conductivité en ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
<b>Printemps</b>	825	289	156
<b>Eté</b>	1020	850	350
<b>Automne</b>	1580	1100	500
<b>Hiver</b>	1490	1150	950

#### 5-1-4 l'ammonium

Le tableau (5) regroupe les valeurs en ammonium obtenues durant notre expérimentation. Nous constatons que ces dernières sont conformes aux normes Algériennes (qui sont de 500mg/l). De plus après épuration, nous constatons une réduction de ce composant dans les deux étages d'épurations, et ce quelques soient les saisons. Ainsi le taux d'ammonium diminue d'une façon considérable après la deuxième épuration du printemps pour passer de 60mg /l à 0,18 mg/l après la deuxième épuration.

#### 5-1-5 nitrates

Les teneurs en nitrates dans les eaux avant et après passage des roseaux dans les deux bassins sont illustrées dans le tableau (6). Ces taux révèlent une importante pollution azotée. Cependant après passage des plants de *Phragmites australis*, nous constatons une diminution du taux de  $\text{NO}_3^-$  (une dizaine de jours dans chaque étage d'épuration). En effet la filtration de  $\text{NO}_3^-$  est de 40% pour E2 en automne et la diminution est plus importante au printemps ; Où elle atteint 80% après passage dans le deuxième bac.

#### 5-1-6 nitrites

Le tableau (7) regroupe les valeurs des taux de nitrites après passages succesifs dans les bacs à épuration plantés de roseaux. Nous constatons que ces valeurs sont conformes aux normes algériennes, sauf pour les échantillons recueillis en automne où le taux de nitrates dépasse les normes, même après la deuxième épuration, en effet le taux de nitrites est de 3,46 mg/l pour les eaux brutes et de 1,06 mg/l après épuration.

**Tableau 5:** Variations des teneurs en ammonium avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.

Saisons	Concentrations en ammonium en (mg/l)		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
Printemps	60	2,8	0,18
été	2,5	0,3	0,1
Automne	33	15	3
Hiver	24	11	2

**Tableau 6:** Variations des teneurs en nitrates avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.

Saisons	Concentrations en nitrates en (mg/l)		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
Printemps	29,7	10,25	5
été	26	20	5
Automne	23,5	20,81	13
Hiver	8,93	7,54	5,11

**Tableau 7:** Variations des teneurs en nitrites avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.

Saisons	Concentrations en nitrites en (mg/l)		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
Printemps	0,85	0,5	0,06
été	0,35	0,2	0,03
Automne	3,46	1,9	1,06
Hiver	0,5	0,32	0,06

### 5-1-7 Les orthophosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ )

Les variations des teneurs en ortho phosphates dans les eaux usées avant et après séjour des roseaux sont illustrées dans le tableau (8). Nos résultats révèlent une importante pollution phosphorée. Ces résultats sont remarquables le plus, durant la deuxième et la troisième saison (été et Automne). Après passage des plants de *Phragmites australis*, nous remarquons une diminution significative du taux d'ortho phosphates. En effet le taux de  $\text{PO}_4^{3-}$  diminue de plus de 95% à 98% durant ces deux saisons et ce pour toutes les conditions étudiées.

### 5-1-8 Les matières en suspensions (MES)

L'évolution des matières en suspension, est représentée dans le tableau (9). Ainsi nous constatons une diminution très importante de la teneur en matières en suspensions après la première et deuxième épuration. La différence est de l'ordre de 80% et 90% respectivement pour les eaux usées après épuration 1 et épuration 2 et ce quelque soit la saison.

**Tableau 8: Variations des teneurs en orthophosphates avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.**

Saisons	Concentrations en orthophosphates en (mg/l)		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
Printemps	55,5	39	4,5
Eté	240	30	4,5
Automne	82,5	44	1,2
Hiver	40	21,9	0,9

**Tableau 9: Variations des MES avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.**

Saisons	MES en (mg/l)		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
Printemps	125	80	20
Eté	111	67,33	32
Automne	95,33	19,95	10,11
Hiver	75,22	8,99	4,65

### 5-1-9 Demande chimique en oxygène DCO

Le tableau (10) illustre les valeurs de la DCO avant et après épuration. Nous constatons que ces dernières dépassent largement les normes Algériennes (qui sont de 120mg/l). Exception faites pour les mesures effectuées en hiver ou la valeur de la DCO est conforme aux normes. Après épuration, nous constatons une réduction de la DCO au niveau des deux étages d'épurations. Ainsi le taux de la DCO diminue d'environ 80 à 90 % après la deuxième épuration pour les trois autres saisons, cela dit, au printemps, la valeur de la DCO reste supérieure à la norme(160mg/l) .

### 5-1-10 Demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>)

Les valeurs de la demande biochimique en oxygène sont représentées dans le tableau (11) . Au printemps et en été, les valeurs de la DBO<sub>5</sub> sont supérieures à celles obtenues durant l'hiver et l'automne avec respectivement 805 mg/l et 250 mg/l (elles sont supérieures aux normes Algériennes qui sont de 40 mg/l) . En présence des plants de *Phragmites australis*, la DBO<sub>5</sub> tend à diminuer d'environ 5 à 10%, en automne, après première épuration, et d'environ 35% après la deuxième épuration avec un abattement d'environ 95% au printemps pour atteindre 43 mg/l (proche de la norme algérienne) ; un troisième bassin d'épuration peut donner un meilleur rendement.

**Tableau 10:** Variations de la DCO avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.

Saisons	DCO en (mg/l)		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
<b>Printemps</b>	1000	500	160
<b>Eté</b>	750	143	35
<b>Automne</b>	605	250	60
<b>Hiver</b>	96,66	53	23,23

**Tableau 11 :** Variations de la DBO<sub>5</sub> avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.

Saisons	DBO <sub>5</sub> en (mg/l)		
	Eau brute	Epuration 1	Epuration 2
<b>Printemps</b>	805	550	43
<b>Eté</b>	250	160	80
<b>Automne</b>	140	120	94
<b>Hiver</b>	99,01	71,03	40

## 5-2 Dosage des métaux au niveau des racines

### 5-2-1 Variations du taux de Fer au niveau des racines

Le tableau (12) représente les variations du taux de Fer au niveau des racines de *Phragmites australis*, avant et après passage dans les eaux usées, ces résultats révèlent que nos échantillons d'eau sont fortement chargés en métaux lourds et spécialement en Fer, probablement en raison des rejets du complexe sidérurgique. La teneur en fer au niveau des racines des plants du premier bassin est supérieure à celle des témoins. Nous avons noté une accumulation très élevée au niveau des racines après la première épuration et ce pour les quatre saisons d'études. Ce résultat est observé le plus en automne avec un taux de fer de 0,97 mg/l chez le témoin et 8,55mg/ l pour les racines du premier bassin, le taux de Fer diminue de manière plus importante au niveau des racines des plantes placées dans le deuxième bac à épuration avec 4,45mg/l ( ces valeurs restent élevées par rapport aux autres saisons).

### 5-2-2 Variations du taux de zinc au niveau des racines

Le tableau (13) illustre les variations du taux de Zinc au niveau des racines de *Phragmites australis* durant notre expérimentation. Nous constatons que pour les racines issues de la première épuration le taux de zinc est largement supérieur à celui trouvé au niveau des racines témoins. Le taux le plus marquant est observé en automne où nous avons noté 0,051 mg/l pour les témoins et 2,5 mg/l après séjour dans le premier bassin d'épuration. Ce taux diminue pour atteindre 0,989mg/l. Cette variation du taux de zinc avant et après passage dans les deux bacs à épuration est constatée durant les trois autres saisons. Cependant ce taux reste toujours supérieur aux normes.

**Tableau 12 : Variations des teneurs en Fer avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.**

Saisons	Fer en (mg/l)		
	Témoin	Traité 1 (R)	Traité 2 (R)
<b>Printemps</b>	1,73	4,32	2,37
<b>Eté</b>	1,523	5,12	2,25
<b>Automne</b>	0,979	8,55	4,45
<b>Hiver</b>	1,231	7,228	3,112

**Tableau 13 : Variations des teneurs en Zinc avant et après séjour des plants de *Phragmites australis* dans les eaux usées.**

Saisons	Zinc en (mg/l)		
	Témoin	Traité 1 (R)	Traité 2 (R)
<b>Printemps</b>	0,039	0,989	0,733
<b>Eté</b>	0,032	0,591	0,37
<b>Automne</b>	0,051	2,25	0,989
<b>Hiver</b>	0,049	1,612	0,531

## Discussion

Les analyses physicochimiques effectuées avant et après passage des eaux usées par le système d'épuration, ont mis en évidence :

-Une diminution du pH qui peut aller de 0,5 à 1.5 unités au niveau du deuxième étage. Elle atteint en automne une diminution de 1,6 unités.

Ceci pourrait s'expliquer par l'accumulation des ions H<sup>+</sup> suite à l'activité des bactéries nitrifiantes, ou à la production d'ions H<sup>+</sup> par la plante (*Bowes et Beer, 1987; Ndzomo et al., 1994*) pour compenser le prélèvement de certains cations (nutrition minérale). D'un autre côté, l'accumulation de CO<sub>2</sub> due au métabolisme des plantes ou à la dégradation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes (*Attionu, 1976; Sridhar et Sharma, 1985; Jedicke et al., 1989*), ainsi que, la sécrétion d'exsudats (acides organiques) au niveau des racines des plantes (*Bowes et Beer, 1987; Good and Patrick, 1987*), contribuent également à cette diminution du pH. Ces résultats sont en accord avec ceux de *Awuah et al. (2001)* et (2002), ainsi qu'avec ceux de *Kone (2002)*.

Les valeurs de la température durant les quatre saisons d'étude pourraient influencer l'épuration (*Poulet et al., 2003*). Une température élevée augmente l'activité des microorganismes dégradeurs. Dans notre cas, ceci est confirmé par la diminution de la DBO<sub>5</sub>. Selon *Ayaz et al., (2001)* La variation de la température est imputable aux fluctuations du débit d'eau de refroidissement à travers les deux étages d'épuration.

Concernant la conductivité électrique, sa diminution dans les quatre saisons peut s'expliquer selon *Coulibaly et al. (2008b)* par une rétention de sels dans le massif filtrant. Ces sels peuvent être retenus par diverses réactions physicochimiques et biochimiques (absorption, échanges ioniques, oxydation, neutralisation).

Selon *Chafai, (1996)* les eaux des unités industrielles sont généralement caractérisées par une conductivité électrique (CE) élevée favorisant la corrosion des matériaux, et une modification de leur saveur (teneur en Cl<sup>-</sup>). Les valeurs enregistrées, révèlent que quelle que soit la saison, la conductivité électrique est élevée en raison de la charge organique. Mais l'existence des filtres plantés permet une très forte réduction de ce paramètre.

Nous avons également mis en évidence une diminution des ions ammonium et nitrates après passage par les deux étages d'épuration. Selon Reddy *et al.*, (1999) La réduction des ions ammonium et des nitrates serait la conséquence d'une faible volatilisation des xenobiotiques.

Ainsi Jetten *et al.*, (2001) et Schmidt *et al.*, (2002) stipulent que la diminution de l'ammonium et du nitrate indiquent qu'une nitrification a lieu. Si la nitrification produit seulement du nitrite et pas de nitrate, une oxydation anaérobie de l'ammonium est possible. Les bactéries *Anammox* sont très sensibles à l'oxygène. Lorsque l'oxygène est limité dans le milieu, les bactéries *Anammox* peuvent coexister avec les bactéries nitrifiantes, en particulier *Nitrosomonas* qui est responsable de la transformation de  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{NO}_2^-$ . Dans cette association, l'oxygène est utilisé par *Nitrosomonas* pour l'oxydation de l'ammonium, les nitrites formés sont ensuite utilisés par les bactéries *Anammox*, comme accepteurs d'électrons, pour l'oxydation de l'ammonium en azote élémentaire ( $\text{N}_2$ ).

Ainsi, les principaux mécanismes d'enlèvement de l'azote dans un milieu humide sont la nitrification et la dénitrification (Pride *et al.*, 1990 ; Martin et Moshiri, 1994). Les macrophytes absorbent principalement de l'azote inorganique sous forme de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) (Reddy et D'Angelo, 1997).

Cependant Brix (1994) ajoute que même si les macrophytes sont en général des plantes très productives, la quantité de nutriments qui peuvent être assimilés par celles-ci est insignifiante par rapport à la charge présente dans les eaux usées, selon Weisner *et al.* (1994) qui a travaillé sur des nitrates marqués ( $^{15}\text{N}-\text{NO}_3$ ) et additionnés à un milieu humide, seulement 6 à 17% des nitrates marqués ont été incorporés dans la biomasse végétale (détectés dans les tiges, racines et rhizomes vivants). Dans cette même expérience, 56 à 82% des nitrates marqués ont complètement disparu du milieu (non détectés dans l'eau, les macrophytes, les sédiments et les périphytons); les chercheurs ont attribué cette disparition à la dénitrification. Ainsi, en ce qui concerne l'enlèvement de l'azote, la dénitrification semble jouer un rôle beaucoup plus important que l'assimilation par les plantes (Brix, 1993 ; Moore et Reddy, 1992).

Selon Wood (1990) les nitrates stables en conditions aérobies, peuvent être assimilés directement par les plantes où ils servent d'accepteurs d'électrons dans le processus de dénitrification.

Concernant les taux de nitrites, nos résultats révèlent qu'ils dépassent largement les normes, en raison d'une importante pollution azotée traduite par une réduction des nitrates et nitrites en Ammonium (Gaujous, 1995). Cependant, après séjours des roseaux dans les eaux usées les valeurs ont diminué, du fait de la nitrification bactérienne comme le stipule (Sun *et al.* 1998).

Concernant les orthophosphates, nos résultats ont mis en valeur des teneurs supérieures aux normes algériennes.

Ceci serait du aux eaux de lessivages des terres cultivées ou traitées par certains pesticides (Rodier, 1996). Ces valeurs ont tendance à diminuer en présence des plants de *Phragmites australis* ce qui concorde avec les travaux de (Sun *et al.* 1998) et ceux de (Lienard, 1990).

Les roseaux possèdent un système racinaire très actif et capable de résister aux plus dangereux xénobiotiques tels que les métaux lourds, les détergents et pesticides (Esser, 1999). Nos résultats concernant les matières en suspension, ont mis en évidence une diminution de ces dernières après passage par les deux étapes d'épuration. Cette diminution peut être expliquée par le maintien d'une surface ombragée grâce aux plantes émergentes atténuant ainsi la croissance des algues et permettant de maintenir de bons rendements d'enlèvement pour les MES (80 à 90%) (Hancock *et al.*, 1991).

Selon Cooper (1990a) Les systèmes à écoulement horizontal ou vertical, offrent de très bons rendements d'enlèvement des MES pouvant varier de 90 à 95% lorsque le milieu filtrant est bien choisi et qu'il n'y a pas de court-circuitage. En général, l'usage d'un milieu sableux assure une très bonne filtration, ( Kone 2002).

Un bon abattement des MES engendrera un abattement des hydrocarbures (fixées aux MES pour l'essentiel) et des métaux sous forme particulaire. En général, les concentrations en métaux particuliers sont d'autant plus importantes que les particules sont de petites tailles (< 10 µm). La majorité des particules ont une taille inférieure à 100 µm avec une taille moyenne de 30 µm pour des ruissellements routiers (Bulc *et al.*, 2003).

Concernant la DBO<sub>5</sub>, Vaillant (1973) la définit comme étant un critère de pollution bien adapté aux eaux peu ou modérément polluées. La DBO<sub>5</sub> d'une eau usée ne doit pas dépasser les 40 mg/l. (*journal officiel de la république algérienne n°46, 1993*). Nos résultats ont mis en évidence des valeurs supérieures à la norme, avec une DBO<sub>5</sub> pouvant atteindre 140 mg/l en Automne.

Selon Polprasert et Khatiwada, (1998) L'élimination de la matière organique dans les bassins à macrophytes est basée sur une relation symbiotique plantes-bactéries, dans laquelle les bactéries utilisent l'oxygène fourni au milieu par les plantes pendant la photosynthèse pour dégrader le carbone organique.

- C'est ce qui explique la diminution de ce paramètre après passage des eaux d'Oued à travers les deux étages d'épuration plantés de roseaux.

Ceci concorde avec les résultats de (Sankar 2000 et Kadlec et Knight 1996) qui montrent que *Phragmites australis* possède des sites dans leurs zones racinaires qui favorisent la croissance bactérienne et permettent ainsi la dégradation de la matière organique et donc la diminution de la DBO<sub>5</sub>. *Phragmites australis* a la particularité de créer un environnement oxydant dans la zone racinaire et de procurer du carbone et de l'énergie aux microorganismes. Rivera et al. (1997) ajoutent que la diminution de la DBO<sub>5</sub> après bioépuration est facilitée par la température qui favorise la croissance des bactéries. Ceci a été également confirmé par les travaux de (Copper,1996) sur le traitement des eaux usées domestiques. Ainsi nos résultats sont en accord avec ceux de (Levasseur,2000) qui a utilisé des filtres plantés de roseaux pour la déshydratation du lisier et a confirmé une diminution de la DBO<sub>5</sub> après le séjour de *Phragmites australis*.

Concernant la DCO nous avons noté un abattement d'environ 85% au printemps et en été ; ceci pourrait s'expliquer par la charge importante en polluants vu le manque de pluviométrie.

Aussi l'abattement de la DCO est visiblement dû à la rétention physique de la matière organique de l'eau usée dans les filtres et l'oxydation de celle-ci par la flore microbienne.

Ce résultat est probablement lié à la présence des plantes qui créent des conditions physicochimiques favorables à l'oxydation de la matière organique par la flore microbienne. Celle-ci apporte de l'oxygène dans le massif filtrant via les racines et les rhizomes (Brix, 1994).

Selon Silvestre et al, (1997) l'abattement observé sur ce paramètre peut s'expliquer par la présence des roseaux qui oxygènent le massif filtrant par l'intermédiaire des rhizomes.

Selon Tchobanoglous, (1987) l'abattement de la DCO est dû principalement à la sédimentation des polluants dans les deux bassins d'épuration expérimentation.

Concernant le taux de métaux lourds au niveau des racines, nous avons noté une accumulation importante de Fer et de Zinc dans les racines des deux bassins d'épuration.

Selon Levitt, (1980) Certains éléments métalliques tels que le Fer, le Zinc et le Cuivre sont essentiels aux organismes vivants à de faibles concentrations. Cependant aux fortes concentrations ces éléments peuvent être l'origine d'un stress oxydatif avec pour conséquence une modification de la réaction physiologique.

Toujours selon Levitt (1980) deux stratégies principales sont impliquées dans ce phénomène de résistance de la plante contre le stress métallique :

- **La stratégie d'évitement** : par laquelle les plantes se protègent du stress métallique en limitant leur absorption ;
- **La stratégie de tolérance** : qui fait référence aux réactions permettant de limiter les effets néfastes des métaux dans l'organisme.

Dans notre travail nous avons noté une accumulation des métaux particulièrement en hiver et en automne. C'est ainsi que Duman *et al.* (2007) ont mis en évidence une accumulation plus importante en ETMs en automne et en hiver, dans les racines de deux espèces de macrophytes dont *P. australis*.

Ils expliquent ce résultat par le fait que la plante accumule davantage d'éléments trace métalliques dans les derniers mois de sa vie jusqu'à sa mort en hiver. En effet, Duman *et al.* (2007) ont observé une diminution de l'accumulation des ETMs du printemps à l'été, puis une forte accumulation en automne et en hiver. Ce qui concorde avec nos résultats.

D'une manière générale, il a aussi été démontré par Mishra *et al.*, (2008) que les macrophytes accumulaient davantage d'ETMs au niveau des racines qu'au niveau des tiges et des feuilles.

Selon l'étude établie par Cardwell *et al.*, (2002) Ce phénomène s'explique essentiellement par le fait que les sédiments, dans lesquels les macrophytes prennent racines, sont généralement plus concentrés en ETMs que dans l'environnement aquatique au sein duquel ils évoluent.

Cooper *et al.*, (1998) explique l'abatement des métaux par le fait que les formes particulières des métaux sont retenues par filtration et les formes solubles sont éliminées par précipitations sous formes d'oxydes ; grâce à l'action de bactéries métallo oxydantes ou sulfato réductrices suivant la zone du filtre, ainsi qu'au niveau de l'interface racines/sédiments où les gradients redox sont élevés.

Selon Ye *et al.*, (1997b) *Phragmites australis* présente une forte tolérance au Zinc et au Fer , mais aussi au Plomb et au Cadmium. Ce qui confirme leur concentration importante au niveau des racines.

Après la deuxième épuration la concentration en métaux diminue ce qui pourrait s'expliquer selon Baker et Walker, (1990) ; par le fait que la stratégie d'exclusion, adoptée par les espèces *tolérantes*, consiste à réduire l'absorption du Fer et du Zinc par les racines et leur transfert vers les parties aériennes.

Ainsi, Salt et al. (1999) ont montré, que le Zn (étant dans les racines sous forme du complexe Zn-histidine) est transporté vers les parties aériennes essentiellement sous forme cationique libre  $Zn^{2+}$  avec une faible proportion liée aux acides organiques (principalement au citrate). Le Zn est finalement stocké dans les vacuoles des cellules foliaires sous forme de complexe avec le citrate.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Bordeleau (1998), qui stipule que *Phragmites australis* grâce à ses racines va assimiler les métaux et diminuer ainsi leur concentration dans le milieu, Alors que Sevrin *et al.* (1995) explique la diminution du taux de fer par son accumulation dans les microorganismes que contiennent les eaux usées.

### Conclusion :

Nos résultats ont montré que l'utilisation d'un marécage artificiel à écoulement vertical où la phytoépuration par des macrophytes permettrait de réduire la charge polluante de l'oued, Nos résultats ont révélé également un fort pouvoir épurateur de *Phragmites australis* avec une diminution de la plupart des paramètres physicochimiques étudiés. En effet les matières en suspension ont été enlevées avec une efficacité hautement significative de 90%, quand aux orthophosphates  $PO_4^{3-}$  la capacité d'enlèvement est hautement significative et atteint jusqu'à 95%, les nitrates, aussi, ont montré une diminution de 50% et un abattement très important de 70 à 90% a été enregistré pour la DCO et la DBO<sub>5</sub>, pour les éléments traces métalliques les résultats ont révélé que *Phragmites australis* est une plante hyperaccumulatrice et peut tolérer un très haut niveau de pollution de tout type, mais après un deuxième passage dans le bassin d'épuration le taux de métaux diminue énormément par rapport aux racines du premier bassin.



### 1-Introduction :

Une plante est considérée comme un bon candidat pour la phytoremédiation si en plus de son pouvoir de décontamination, elle possède un bon potentiel de stabilisation du sol. Ce dernier est fonction du développement et de l'architecture du système racinaire. (Vietmeyer 1993).

Les plantes peuvent agir de façon directe : en absorbant le polluant ou de façon indirecte : en activant sa dégradation dans la rhizosphère. Cette technologie émergente et prometteuse peut être appliquée aux métaux, aux hydrocarbures, aux pesticides, aux composés nitroaromatiques et aux solvants chlorés (Susarla et al, 2002).

Les végétaux ont un système racinaire très étendu qu'ils utilisent pour extraire l'eau et les minéraux nécessaires à leur croissance du sol. Lors de cette extraction, ils absorbent aussi d'autres composés dissous dans la phase aqueuse. Cette caractéristique est importante dans le processus de phyto-dépollution car les végétaux sont capables d'absorber de grandes quantités d'eau qu'ils puisent à des profondeurs de 2 à 5 mètres, voire plus pour certaines plantes comme la luzerne ou les plantes phréatophytes. ( Pilon-Smits, 2005).

Dans ce chapitre nous avons suivi la croissance racinaire et l'activité respiratoire des racines de *Phragmites australis* afin d'étudier la résistance et/ou la réaction des racines vis à vis des différents polluants et métaux lourds en particulier présents dans les eaux usées.

## 2-Matériel et méthodes

### 2-1. Nombre moyen des racines

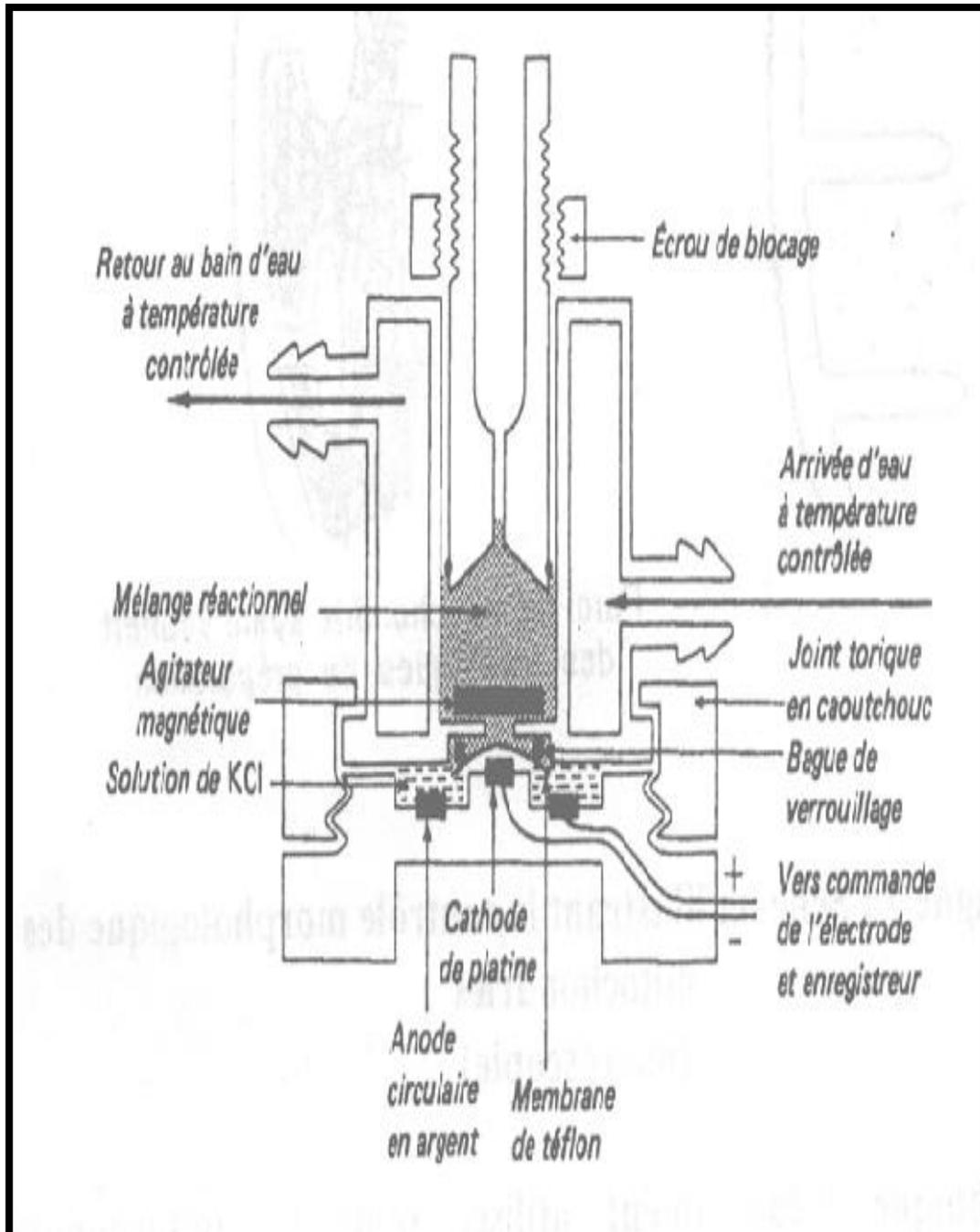
Le nombre moyen de racines est déterminé, pour chaque roseau, pour chaque condition de traitement, et cela par le dénombrement du nombre de racines. Ces dernières sont suivies pendant cinq jours, par un marquage à l'encre de chine.

### 2-2- L'activité respiratoire (MR)

Le métabolisme respiratoire est évalué par la mesure de l'intensité respiratoire (IR) des racines isolées de roseau. Celle ci est suivie à l'aide d'une électrode à oxygène de Clark (Hansatech Ltd, Kinj's Lym, U.K) (Figure 7) couplée à un ordinateur. Le milieu réactionnel renferme de l'eau distillée additionnée à un tampon phosphate (10mM) ajusté à pH 7.2 avec 0.5 à 1 g de racines isolées.

La cellule en verre, d'un volume réglable de 1 à 20 ml, est thermo statée à  $25^{\circ}\text{C} \pm 0.02^{\circ}\text{C}$ . La concentration initiale en oxygène du milieu de l'électrode en équilibre avec l'atmosphère est de 240  $\mu\text{moles}$  (Djebar et Djebar, 2000).

Les mesures sont effectuées sur des racines isolées après une durée de 12 jours de fonctionnement du système d'épuration.



**Figure 6:** Schéma de l'électrode à oxygène (Djebar et Djebar, 2000)

### 3-Résultats

#### 3-1.Nombre moyen des racines (NBR)

L'évolution du nombre moyen de racines avant et après épuration est illustrée dans le tableau (14). Nos résultats mettent en évidence une augmentation du nombre de racines après la première et seconde épuration et ce quelque soit la saison. Cette augmentation est nettement plus remarquable durant la deuxième épuration.

**Tableau14 :** Evolution du nombre de racines de *Phragmites australis* placées dans les eaux usées (E1, E2) et Témoin (T).

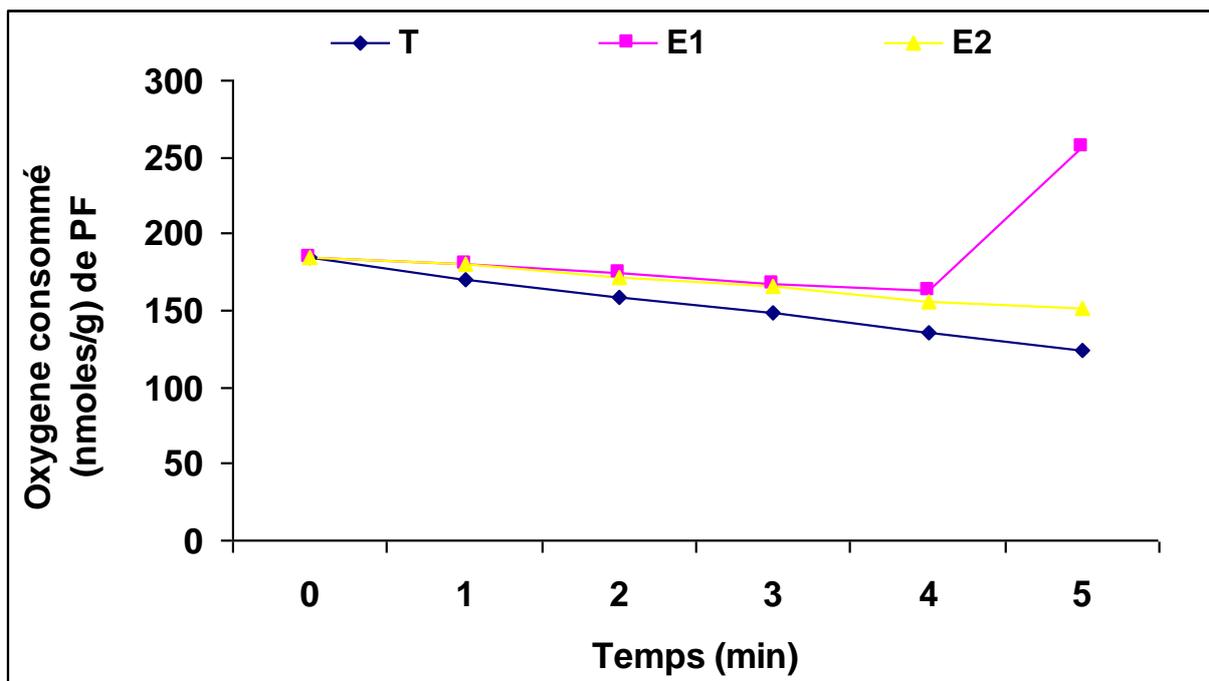
Saisons	Nombre moyen des racines		
	temoin	epuration 1	epuration 2
Printemps	4,83	6,8	9,15
été	3,93	6,07	9,25
Automne	4,25	7	8,5
Hiver	3	5,45	7

### 3-2. L'activité respiratoire

La figure (8) illustre l'évolution de la concentration d'oxygène consommée par les racines de *Phragmites australis* ayant séjourné dans des eaux usées et des témoins.

On observe une forte stimulation de l'activité respiratoire à partir de la quatrième minute surtout au niveau du premier étage où la pollution est extrêmement forte. En effet le taux d'oxygène consommé après la quatrième minute est de l'ordre de 256,33 nmole/g de PF, alors que chez les témoins il ne dépasse pas 151,33 nmole/g de PF.

Quand aux résultats du test t de STUDENT ils montrent qu'il existe des différences significatives (\*),  $p \leq 0.05$  entre le témoin et le deuxième étage d'épuration à hautement significatives (\*\*)  $p \leq 0.01$  entre T et E1.



**Figure 7:** Variation de la consommation en O<sub>2</sub> (nmol/g de poids frais) chez *Phragmites australis* placés dans des eaux usées (E1, E2) et témoins T.

**Discussion :**

Le séjour des racines dans le bac E1 se manifeste par un développement important de l'appareil racinaires. Cette stimulation des racines au niveau des étages d'épuration est probablement due à la quantité importante des nitrates dans les eaux usées qui sont nécessaires pour la croissance des plantes.

Esser, (1999) traduit cette augmentation par le fait que les roseaux possèdent un système racinaire très actif et capable de résister aux plus dangereux xénobiotiques tels que les métaux lourds, les détergents et pesticides .

Selon Folsom et Price (1991), les racines des roseaux constituent la seule partie de la plante qui peut résister à l'hiver rigoureux, à la sécheresse et aussi à des concentrations très élevées de polluants, ce qui explique leur croissance. Dans notre travail, nous avons mis en évidence un appareil racinaire plus développé chez les plantes placées en milieu pollué.

Selon Pilon-Smits (2005) Les plantes envisagées pour la dépollution doivent avoir une croissance rapide, une forte production de biomasse et être compétitives vis-à-vis des plantes endogènes du site, elles doivent aussi être tolérantes à la pollution pour permettre une extraction optimum du polluant.

Moffat et al., (2000) stipulent que les plantes utilisées pour la phytoépuration ont une croissance rapide . Sandermann (1994) ajoute que Pour les mécanismes de phyto-dépollution en général, les plantes ayant un système racinaire large et dense sont privilégiées car elles ont une plus grande capacité d'absorption et elles explorent une plus vaste zone de sol. Ce qui s'explique dans notre cas par une augmentation du nombre de racines des plants issus des eaux usées.

La mesure des variations de l'intensité respiratoire, suite au séjour des roseaux dans les deux étages d'épuration, montre une stimulation significative entre T et E1 et à hautement significative entre T et E2.

Cette augmentation de l'intensité respiratoire des racines est due à l'absorption des différentes substances et polluants que contient l'eau usée.

Cette stimulation est due probablement à un phénomène lié à la fois à l'induction d'enzymes de détoxification comme les monooxygénases à Cyt P450 comme le stipule( Solt *et al.* 1998) et à la présence de micro-organismes autour des racines. Ceux-ci seraient responsables du dégagement d'oxygène (Pallshelli, 2003).

Selon Morel et Kane (2002) Les macrophytes ont deux fonctions : favoriser le développement bactérien en oxygénant le milieu et extraire les polluants en produisant de la biomasse. Ce qui est visible dans notre cas par l'augmentation du nombre de racines et par la stimulation de la respiration.

Selon Meksem (2007) l'influx des xénobiotiques à l'intérieur de la plante serait à l'origine du déclenchement des phénomènes de détoxification/biodégradation. Ce phénomène fait appel aux oxygénases à cytochromes P450, d'où cette avidité pour l'O<sub>2</sub> traduite par la stimulation respiratoire observée.

Dans notre cas, nous pouvons supposer que l'augmentation du nombre de racines chez les plantes placées dans une eau usée, se fait au dépend d'une augmentation de la consommation énergétique de la racine. Selon Grene, (2002), Kiss et al. (2003), Kuciel et Mazurkiewicz (2004) ; les R.O.S dérivent du métabolisme respiratoire et photosynthétique.

### **Conclusion**

Dans cette partie, nous confirmons que les eaux usées stimulent le développement de l'appareil racinaire des roseaux ainsi que l'activité respiratoire des racines issues des deux bassins d'épuration par rapport au témoin. .

## 1-Introduction

Les plantes prélèvent des espèces solvatées. Il est nécessaire que l'élément passe en solution pour être absorbé par la racine. Actuellement, on estime que pour la majorité des métaux et métalloïdes, le prélèvement se fait sous des formes ioniques. (Lasat et al., 1998).

Pour certains métaux tels que le Fe, Zn, Cu et Pb, des formes complexées par des ligands organiques semblent intervenir dans le prélèvement. (Sarret et al, 2002). **Les éléments métalliques sont-ils absorbés tout le long de la racine ou préférentiellement par certaines zones ?** Les poils racinaires, formés par les cellules épidermiques, ont été longtemps considérés comme les principaux sites de l'absorption racinaire, du fait qu'ils augmentent considérablement la surface d'échange avec le milieu. (Sarret et al, 2002).

Ainsi, à l'aide de la microscopie à balayage, nous avons eu pour objectif la localisation et l'identification des métaux au niveau des racines. L'intérêt de cette étude est de savoir si les différents métaux pénètrent à l'intérieur des racines ou restent adsorbés à la surface de ces derniers. Grâce à la forte profondeur de champ du microscope électronique à balayage, nous pouvons observer la surface en contraste topographique, il est possible d'accéder à l'aspect morphologique de la surface de la plante. (Delaunay, 2010).

## 2-Matériel et Méthodes

### 2-1 Principe de la microscopie électronique à balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage permet d'observer avec une bonne résolution spatiale (jusqu'à quelques nm) la surface d'un échantillon massif.

L'interaction électron-matière génère différents types d'électrons qui permettent d'obtenir différentes informations suivant les électrons collectés (Delaunay, 2010).

Les échantillons des racines sont coupées puis lavées avec de l'eau et sèches pour être mis dans des tubes en plastique couverts de résine (on laisse reposer 48 heures) à l'air libre sous une température ambiante. Les échantillons sont ensuite coupés à l'aide d'un cutter en fine lamelle pour être ensuite observés par MEB.

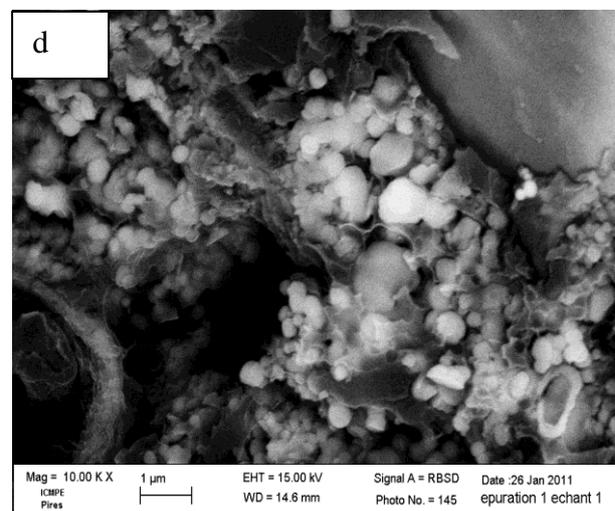
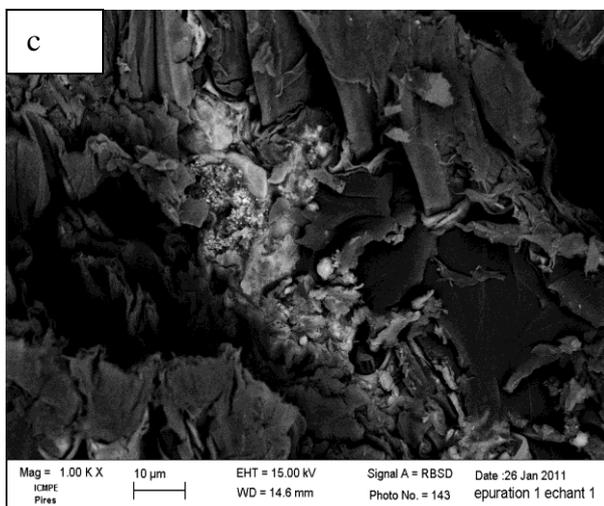
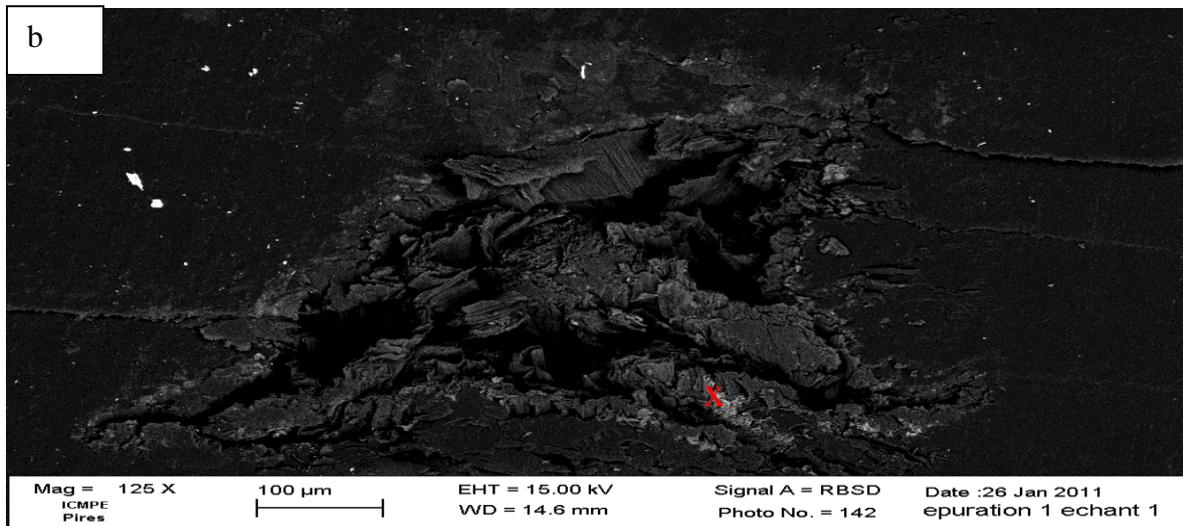
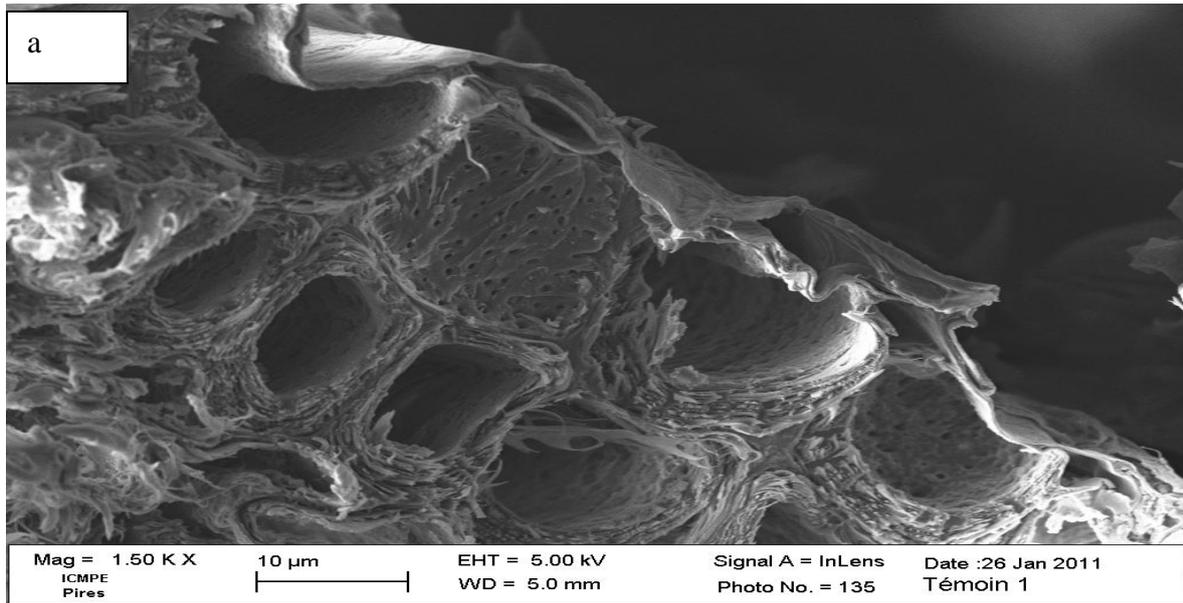
### 3-Résultats

**3-1 Observation microscopique (MEB) :** la distribution des métaux au niveau des racines témoins (a) et traitées (b, c, d) (planche 1) après E1 ont mis en évidence une accumulation des métaux dans l'épiderme des racines. Après épuration ( E2) cette accumulation est toujours persistante(planche 2) visible sous forme de dépôts blanchâtres. Chez les témoins, nous ne notons aucune présence de métaux.

### 3-2 Identification des dépôts par rayon X :

Les planches (3) et (4) confirment que l'élément le plus abondant est le Fer avec des concentrations importantes. Cependant même après la deuxième épuration, les dépôts métalliques persistent. Ce résultat nous laisse envisager une troisième épuration. .

L'analyse par rayons x, nous a permis de détecter d'autres métaux tels l'Aluminium ou le Cadmium. Les pics de fer diminuent durant la deuxième épuration mais ne disparaissent pas complètement.



**Planche 1: Observation au microscope électronique a balayage de la distribution des métaux au niveau des racines témoins (a) et traitées (b, c, d) après E1.**

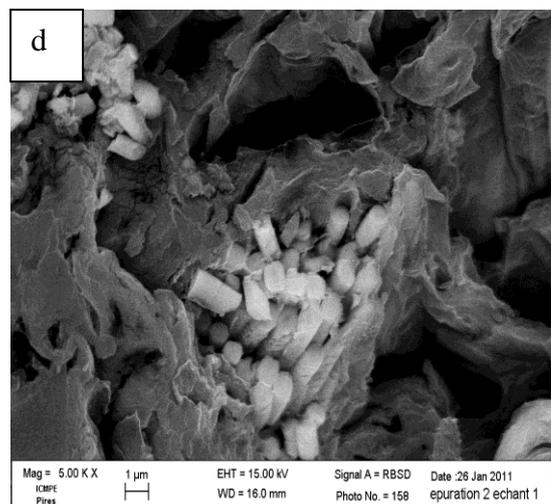
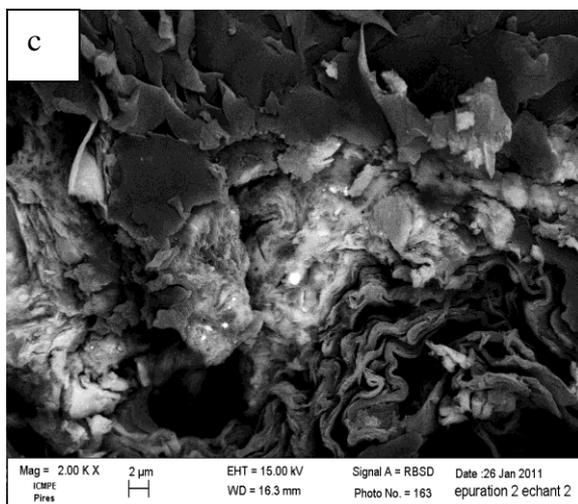
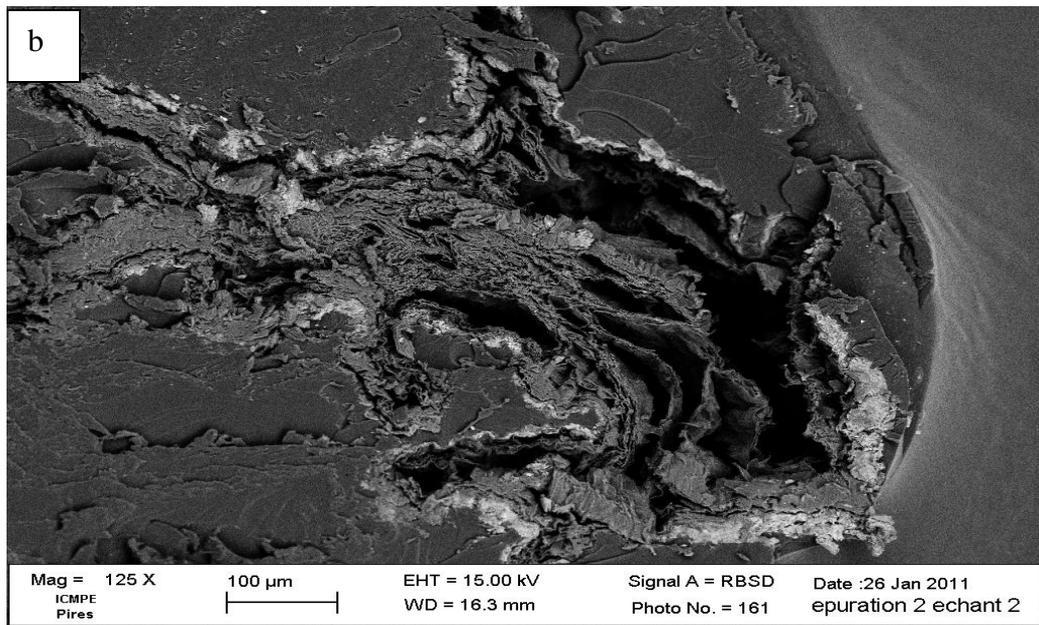
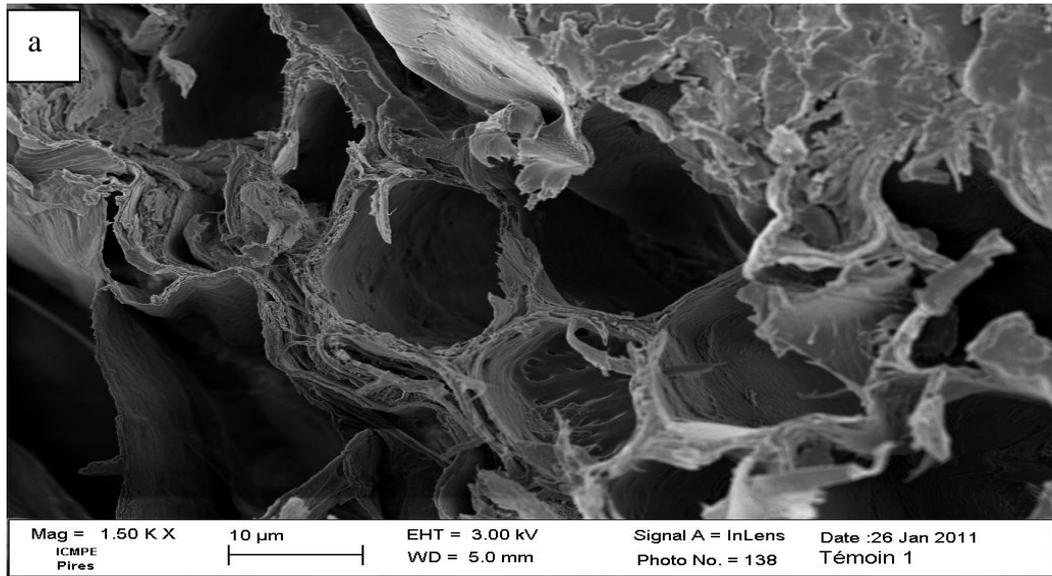


Planche 2: Observation au microscope électronique a balayage de la distribution des métaux au niveau des racines témoins (a) et traitées (b, c, d) après E2.

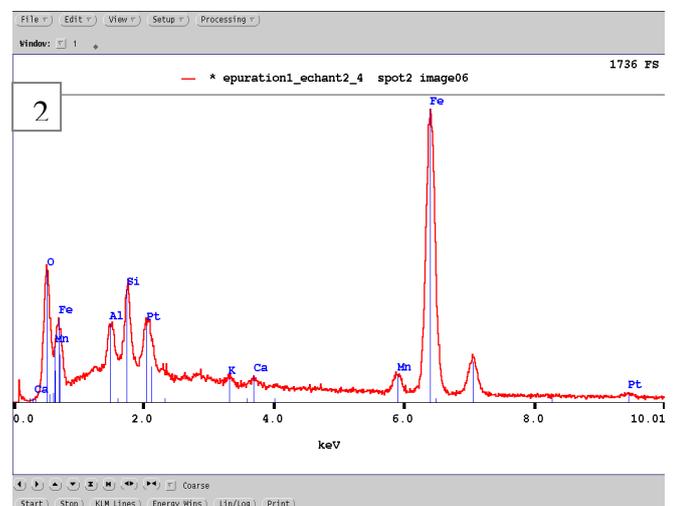
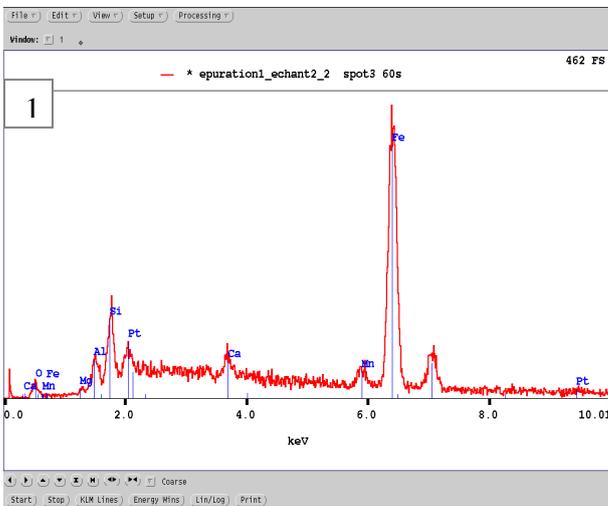
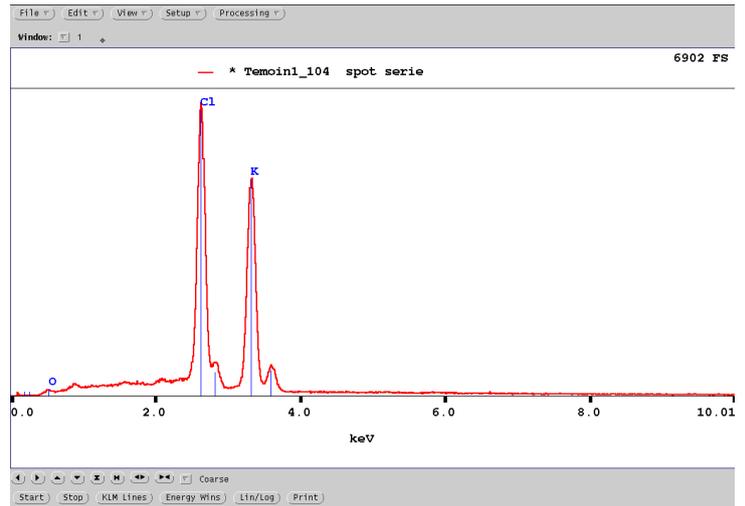
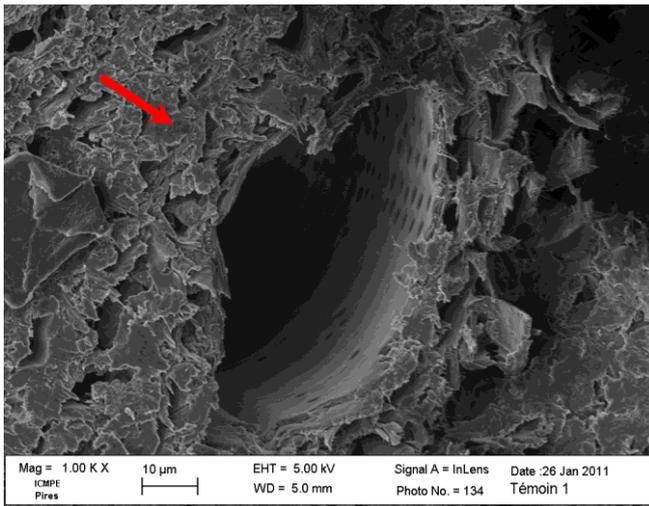


Planche 3 : Spectres par EDS des métaux lourds dans une racine témoin et traitée après E1.

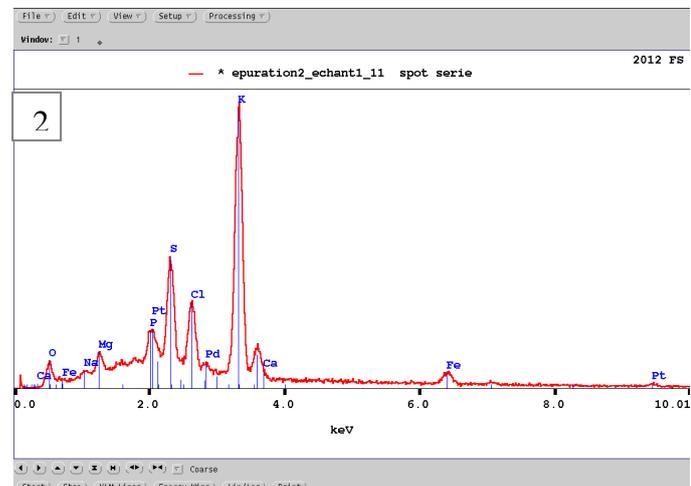
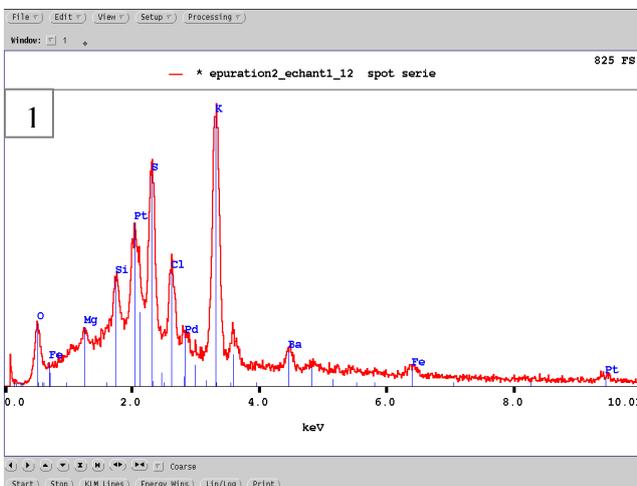
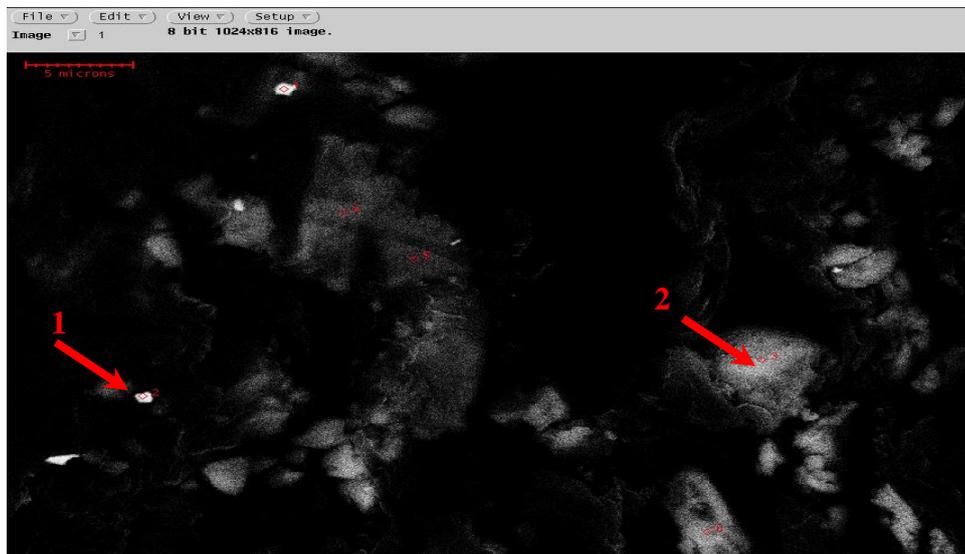
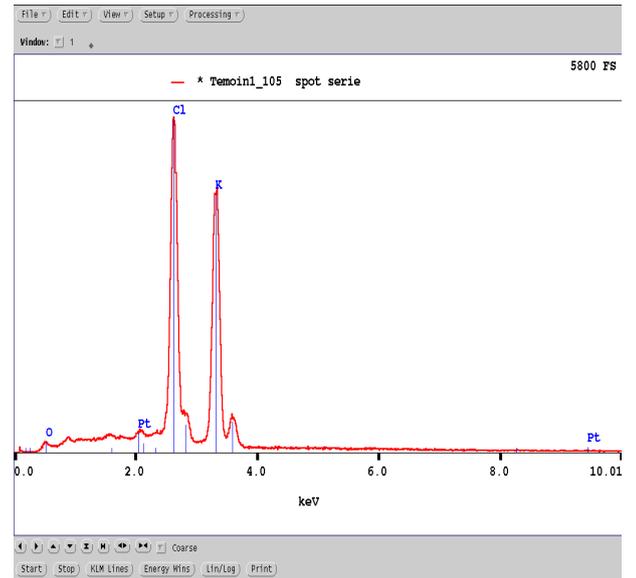
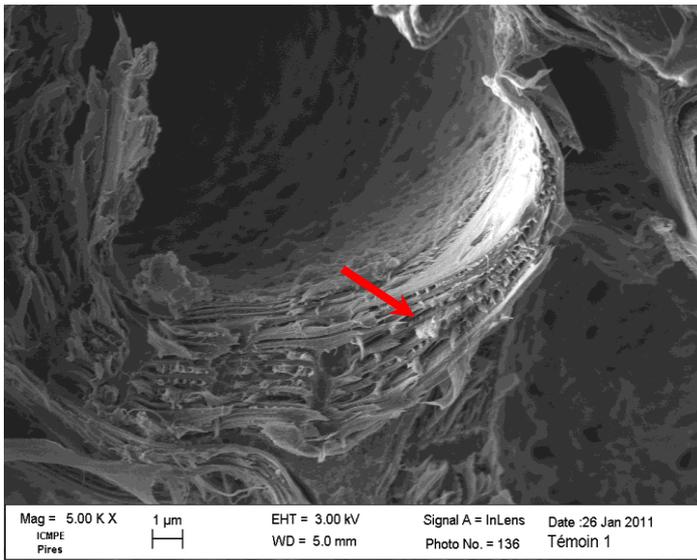


Planche 4 : Spectres par EDS des métaux lourds dans une racine témoin et traitée après E2.

## Discussion

L'exposition des plantes aux différents polluants se trouvant dans les eaux usées peut modifier leur aspect tissulaire. Piechalak *et al.*, (2002) explique que les macrophytes accumulent un taux important de métaux lourds .

Selon Ortega-Villasante *et al.*, (2007) les racines des roseaux paraissent donc augmenter leur capacité de tolérance aux métaux aussi bien en les complexant avec le glutathion qu'en prenant en charge les ROS induits indirectement par leur présence. De plus Carranza-Alvarez *et al.*, (2008) stipulent que chez l'espèce *Phragmites australis*. Il existe un pouvoir accumulateur en métaux supérieur dans les racines que dans les tiges. Ceci a été confirmé par nos résultats. Fediuc et Erdei, (2002) rajoutent que *P. australis* est généralement connue pour accumuler davantage certains ETMs (Zn, Cu, Pb, Fr et Cd).

## Conclusion

*Phragmites australis* sont connus par leur pouvoir accumulateurs et peuvent répondre à la pollution d'une manière sensible et efficace, d'où l'intérêt de leur utilisation dans la phytoremédiation.



### 1-Introduction

Tous les organismes vivants de la planète ont besoin d'une quantité minimale de nutriments contenant des métaux. Au-delà de ce minimum, la présence de ces composés peut devenir rapidement toxique et même létale. La nature a développé des mécanismes de défense envers ces agents toxiques comme la production de protéines ou polypeptides pouvant complexer, chélater ou séquestrer ces métaux à l'intérieur de la cellule. Ce type de molécules s'appelle des métallothionéines (MT) pour les organismes supérieurs ou encore des phytochélatines (PC) pour les plantes et organismes inférieurs, ( Grill *et al.*, 1988).

Ces composés métalliques et organiques peuvent avoir des effets moléculaires indirects dus à la formation d'espèces d'oxygène réactives qui sont potentiellement préjudiciables pour l'intégrité de certains compartiments cellulaires. Le stress oxydant correspond à l'ensemble des effets néfastes liés aux formes actives de l'oxygène (FAO) (Coeurdassier, 2001).

Les FAO dérivent de l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) par réduction électronique univalente (radical superoxyde  $O_2^{\circ-}$ ) divalente (peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ ) ou trivalente (radical hydroxyde  $OH^{\circ}$ ). Les oxyradicaux sont produits continuellement par les systèmes biologiques et les mécanismes responsables de leur production et impliquent des molécules endogènes ou des molécules exogènes (Ribera, 1998). Au cours de la phase I du métabolisme des polluants, les enzymes microsomiques (en particulier les MFO à cytochrome P450) peuvent induire la production d'oxyradicaux en liaison avec les activités NADH et NADPH-cytochrome réductase (Ribera, 1998).

La majorité des ions ne traversent les membranes plasmiques hydrophobes que grâce à un ligand transporteur. Une fois dans la cellule, le métal sera capté par un autre ligand afin de prévenir sa diffusion vers l'extérieur. Ces différents ligands constituent un système de « piégeage cinétique » dont l'efficacité dépend de l'importance de leur synthèse et de la force de liaison avec le métal ( Simkiss et Taylor, 1995).

### \*Les mécanismes de détoxication

De façon générale, l'absorption du xénobiotique est un pré-requis pour avoir un contact rapproché entre le polluant et les enzymes localisées dans le cytosol des cellules végétales (Schröder et Collins, 2002). Une fois le xénobiotique entré dans le tissu végétal, le contaminant peut-être transformé par une variété de réactions biochimiques.

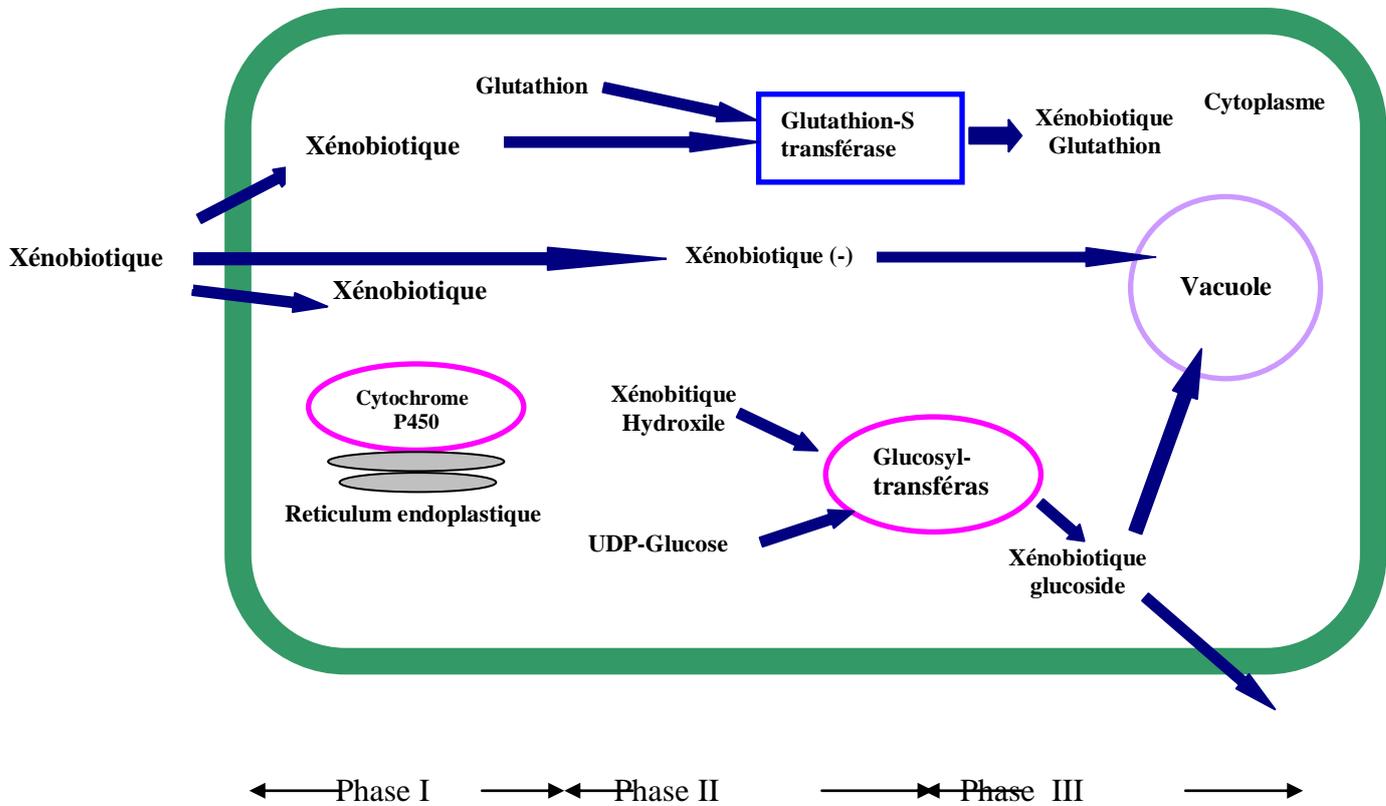
Les plantes abritent diverses fonctions enzymatiques pouvant s'attaquer aux contaminants et les détoxifier, ce qui est à l'origine du terme « green liver », représentant le métabolisme des xénobiotiques par les plantes (Sandermann, 1994 ; Schäffner *et al.*, 2002).

La métabolisation des xénobiotiques chez les plantes se fait le plus souvent par trois étapes consécutives ( Sandermann, 1992, 1994; Coleman *et al.*, 1997) :

- **Phase I** : étape de conversion/activation (oxydation, réduction et hydrolyse) des composés lipophiles des xénobiotiques (Komives et Gullner, 2005); cette transformation est principalement régit par le cytochrome P-450 monooxygénase. ( Pflugmacher *et al.*, 1999).

- **Phase II** : étape de conjugaison des métabolites des xénobiotiques de la phase I à des molécules endogènes hydrophiles comme les sucres, les acides aminés ou le glutathion (Coleman *et al.*, 1997; Dietz et Schnoor, 2001); cette conjugaison est principalement due aux glucosyltransférases (GTs) et aux glutathion-S-transférases (GSTs) (Pflugmacher *et al.*, 1999; Loutre *et al.*, 2003).

- **Phase III** : étape de compartimentation dans la vacuole ou de fixation aux composants de la paroi cellulaire, comme la lignine ou l'hémicellulose, des xénobiotiques modifiés (Coleman *et al.*, 1997; Dietz et Schnoor, 2001).



**Figure 8** : Schéma simplifié de détoxication des xénobiotiques, d'après Coleman *et al.* (1997)

**\*Objectif du travail**

L'objectif de cette étude est d'élucider les effets du stress oxydant induit par les eaux usées chargées en métaux lourds sur les différents organes (racines et feuilles) du roseau *Phragmites australis*

**2- Matériel et méthodes****2-1 Matériel biologique : racines et feuilles de *phragmites australis*****2-2 Dosage biochimiques**

**2-2-1 Dosage des protéines totales :** Les protéines totales de *Phragmites australis* sont dosées selon la méthode de Bradford, (1976) utilisant l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard (Merk). La gamme étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère de BSA (1mg/ml). La lecture se fait à une longueur d'onde de 595 nm.

**2-2-2 Dosage de la proline :** La technique de dosage de la proline utilisée est celle de Troll et Lindsley, (1955), modifiée par Dreider et Goring (1974). La détermination des densités optiques des échantillons est réalisée à la longueur d'onde 528 nm.

**2-2-3 Dosage des chlorophylles a, b et (a+b) au niveau des feuilles :** L'extraction de la chlorophylle a été effectuée, selon la méthode de Holden,(1975) .

**2-3 Dosage des Biomarqueurs**

- **Préparation de l'extrait enzymatique :** L'extrait enzymatique a partir des racines de *Phragmites australis* est obtenu selon la méthode de Loggini *et al.*,(1999). L'extrait sera utilisé pour la mesure de l'activité ascorbate-peroxydase (APX), gaïacols-peroxydase (GPX) et Glutathion transférase (GST).

**2-3-1 Dosage du Glutathion (GSH) :** L'extrait enzymatique est homogénéisé dans une solution d'E.D.T.A à 0,02M et subit une déprotéinisation par l'acide sulfo-salicylique 0,25%. Après centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes le surnageant est utilisé pour le dosage spectrophotométrique avec le réactif DTNB 0,01M à la longueur d'onde 412nm. Les concentrations du GSH sont dosées par la méthode de Weckbecker et Cory, (1988) et exprimées en  $\mu\text{M}$ / mg de protéines.

**2-3-2 Mesure de l'activité Glutathion S-Transférase (GST) :** Le dosage de l'activité glutathion S-transférase est réalisé selon la méthode de (Habig *et al.*, 1974).

**2-3-3 Mesure de l'activité Catalase (CAT) :** Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de Cakmak et Horst,( 1991). La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes (spectrophotomètre Jenway 6300) pour une longueur d'onde de 240nm.

**2-3-4 Mesure de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX) :** Le dosage spectrophotométrique de l'activité ascorbate-peroxydase est réalisé suivant le protocole adopté par Nakano et Azada (1987). La lecture est effectuée à 290nm (spectrophotomètre GeneSys 8).

**3. Analyses statistiques:** Nous avons effectué l'analyse de la variance à deux critères de classification, pour la comparaison des paramètres biochimiques de la plante. Ce test est réalisé à l'aide du logiciel d'analyse de traitement statistique des données: Minitab (Version 13-31 pour Windows xp. 2000).

## 4- Résultats

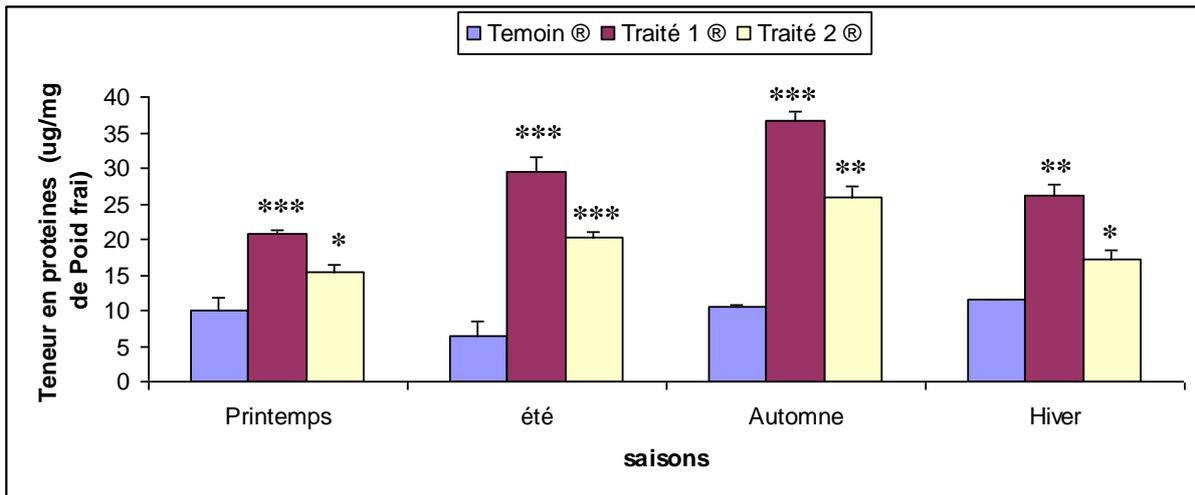
### 4-1 Paramètres biochimiques :

#### 4-1-1 Variation de la teneur en protéines totales chez *Phragmites australis* :

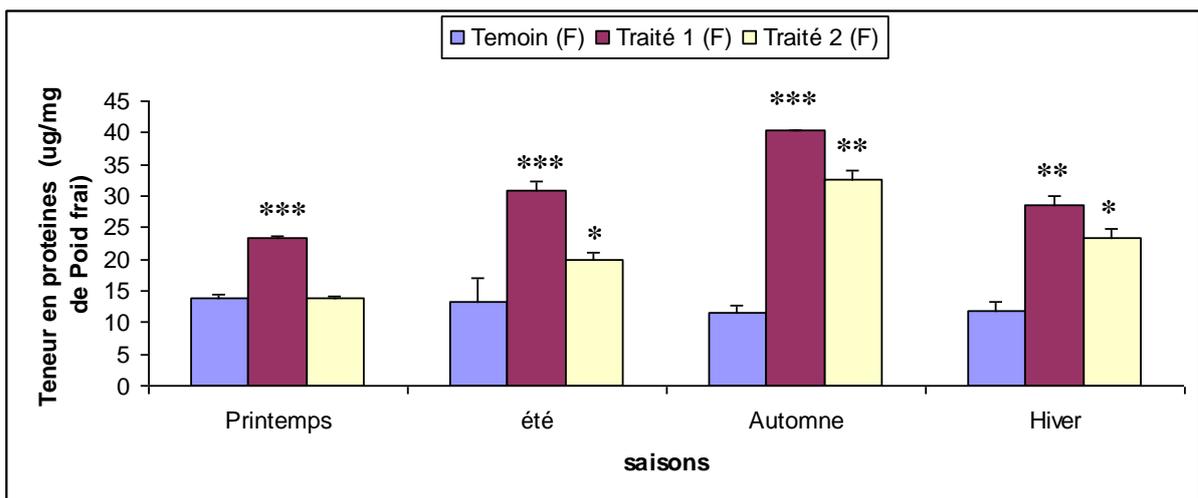
\* **Au niveau des racines** : La figure (09) représente les variations des teneurs en protéines au niveau des racines de *Phragmites australis*. Nous constatons pour les plantes placées dans le premier étage d'épuration (E1) que le taux de protéine augmente de plus de 100% (de manière hautement significative avec  $p \leq 0,001$ ) par rapport aux plantes témoins et ce pendant les quatre saisons. En effet le taux de protéine est de l'ordre de 29.45  $\mu\text{g}$  chez les racines des plantes de E1 en été, alors que chez les témoins le taux ne dépasse pas 06.42  $\mu\text{g}$ . En hiver ce taux est de 36.650  $\mu\text{g}$  pour E1 avec des témoins ne dépassant pas les 10.503  $\mu\text{g}$ . (une augmentation de plus de 100%). Ce taux diminue jusqu'à 26  $\mu\text{g}$  pour l'étage E2 mais reste toujours supérieur au témoin. Cette observation est la même pour l'ensemble des quatre saisons.

\* **au niveau des feuilles** : La figure (10) représente les variations des teneurs en protéines au niveau des feuilles de *Phragmites australis*, ce taux des est de l'ordre de 23.49  $\mu\text{g}$  en ce qui concerne les roseaux du E1 pour le printemps , pour les témoins il est de 13.95  $\mu\text{g}$  (une augmentation de plus de 45%) et ce taux diminue encore plus pour atteindre 13,94  $\mu\text{g}$  . Enfin, le même résultat est obtenu en été mais en automne le taux de protéine de E1 dépasse d'environ 4 fois le témoin , en hiver ce taux de protéine est de 28,5  $\mu\text{g}$  pour E1, avec des témoins ne dépassant pas les 11, 81  $\mu\text{g}$ .

L'analyse de la variance entre les témoins et les deux étages d'épurations, donne des résultats très significatifs (\*\*),  $p \leq 0.005$  à très hautement significatifs (\*\*\*),  $p \leq 0.001$  pour les roseaux places dans les bacs E1 et E2 par rapport aux témoins.



**Figure 09 :** Variations des teneurs en protéines totales au niveau des racines de *Phragmites australis*. Après épuration.

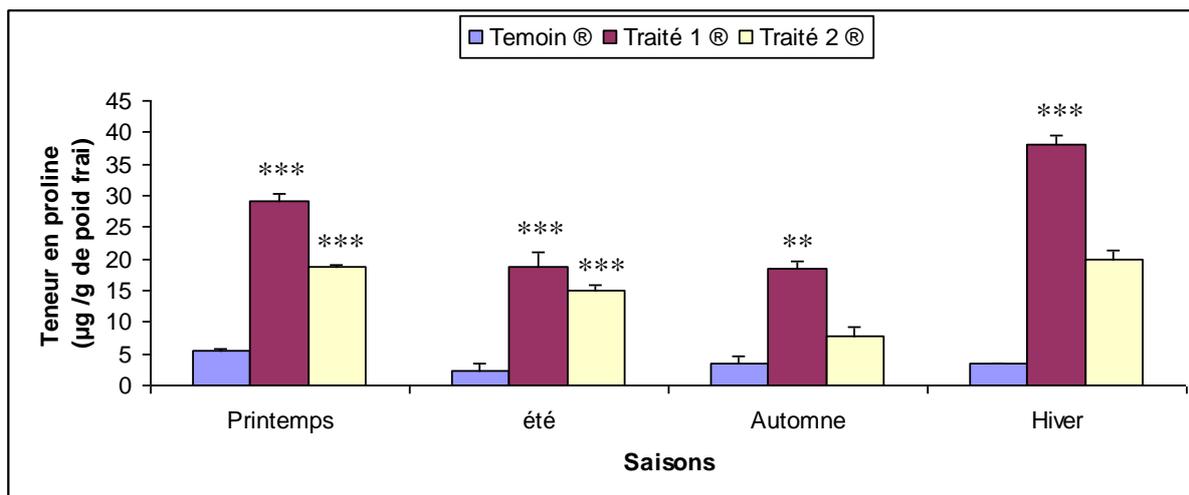


**Figure 10 :** Variations des teneurs en protéines totales au niveau des feuilles de *Phragmites australis*. Après épuration.

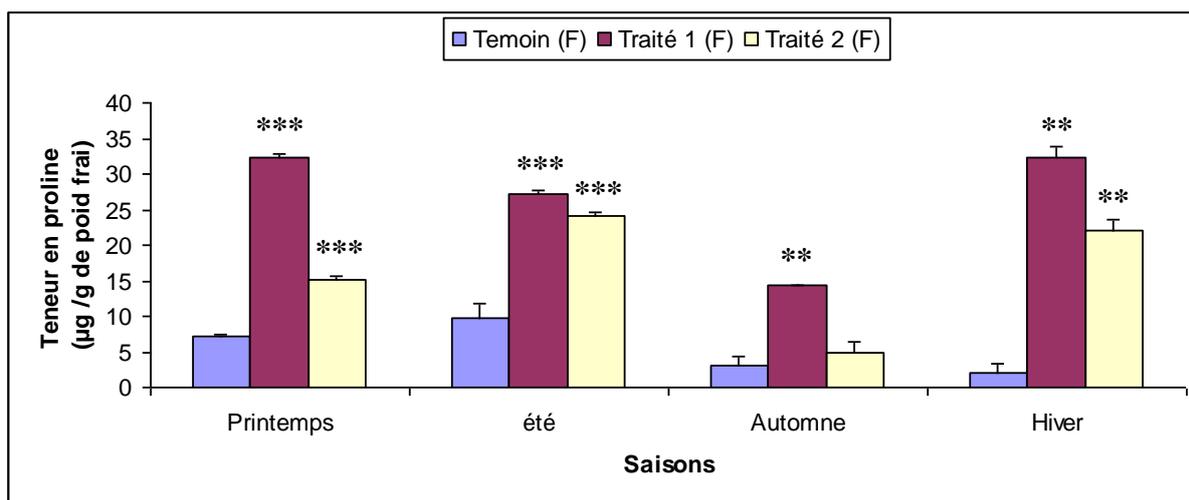
**4-1-2 Variation de la teneur en proline chez *Phragmites australis* :**

**\*Au niveau des racines :** La figure (11) illustre l'effet de l'épuration biologique sur le taux en proline au niveau des racines de *Phragmites australis*. Nous constatons que ce taux est élevé chez les roseaux du premier bassin durant les quatre saisons. Cette augmentation est très hautement significative pour les saisons du printemps et l'été, pour le printemps ce taux est de 5,33 mg / g pour le témoin et de 29,25 mg / g après un passage dans le premier bassin pour atteindre 18,87 mg / g après le deuxième passage. Cette différence est hautement significative avec  $p \leq 0.001$ . En automne le taux de proline est de 3,34 mg / g pour le témoin ce taux atteint 18,34 mg / g pour la première épuration cette différence est hautement significative avec un  $p \leq 0.001$ . Ce taux diminue après le deuxième passage pour atteindre 7.80 mg / g avec une différence non significative.

**\* Au niveau des feuilles :** La figure (12) met en évidence une teneur en proline plus élevée chez les feuilles des végétaux placées dans une eau polluée par rapport à celles placées dans une eau potable avec une différence très hautement significative pour les deux premières saisons (printemps et été) . Pour l'automne et l'hiver ce taux reste supérieur pour les feuilles traitées en E1 comparées au témoin avec une différence hautement significative  $p \leq 0.001$ . Cette différence est hautement significative avec un  $p \leq 0.001$ .



**Figure 11** : Variations des teneurs en proline au niveau des racines de *Phragmites australis*. Après épuration.



**Figure 12** : Variations des teneurs en proline au niveau des feuilles de *Phragmites australis*. Après épuration.

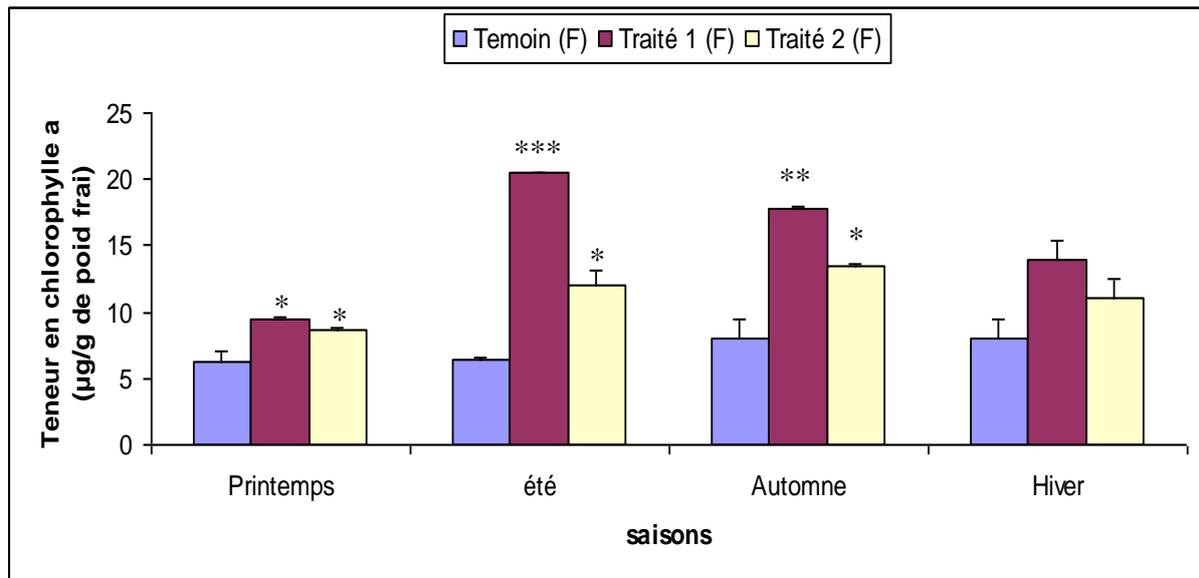
#### 4-1-3 Variation de la teneur en *chlorophylle* au niveau des feuilles de *Phragmites australis*:

\* **Variation de la teneur en *chlorophylle a*** : La figure (13) met en évidence les variations de la teneur en chlorophylle a au niveau des feuilles. Nous constatons que chez les plantes placées dans une eau usée, la teneur en chlorophylle a est plus élevée par rapport aux plantes témoins. Cependant, cette différence est significative avec  $p \leq 0,05$  pour le printemps, elle est très hautement significative pour l'été avec un  $p \leq 0,001$ .

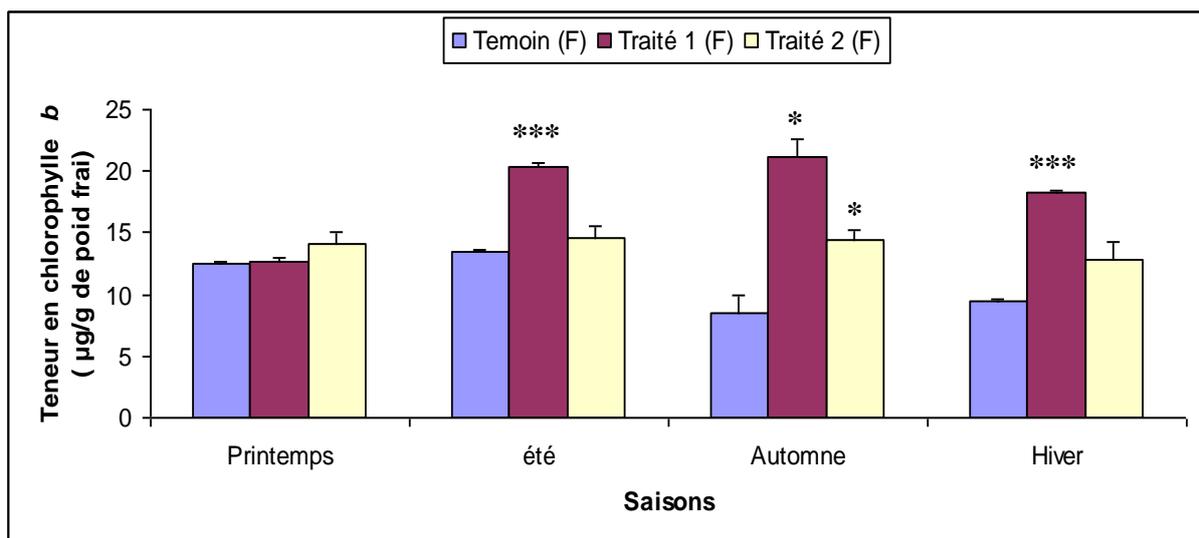
\***Variation de la teneur en *chlorophylle b*** : La figure (14) illustre les variations de la teneur en chlorophylle b chez les feuilles témoins et traitées. Nous constatons que chez les plantes placées dans une eau usée, la teneur en chlorophylle b est plus élevée par rapport aux feuilles témoins. L'analyse statistique révèle une différence non significative avec un  $p > 0,05$  cependant l'augmentation est significative voir très hautement significative pour l'hiver avec un témoin de  $17,64 \mu\text{g/g}$  et un traitée issu du premier bassin de  $32,41 \mu\text{g/g}$ .

\***Variation de la teneur en *chlorophylle a + b*** : La figure (15) illustre les variations de la teneur en chlorophylle a + b au niveau des feuilles. Nous constatons que chez les roseaux placés dans une eau usée, la teneur en chlorophylle a + b est plus élevée par rapport aux roseaux témoins. Cependant, cette différence n'est pas significative avec  $p > 0,05$  pour l'automne, mais pour les trois autres saisons nous constatons que chez les plantes placées dans les étages d'épurations, les teneurs en chlorophylles (a+b) sont plus élevées par rapport aux plantes témoins. Cette augmentation est de l'ordre de 50% après une première épuration et de 30% après E2 et ce indépendamment des saisons.

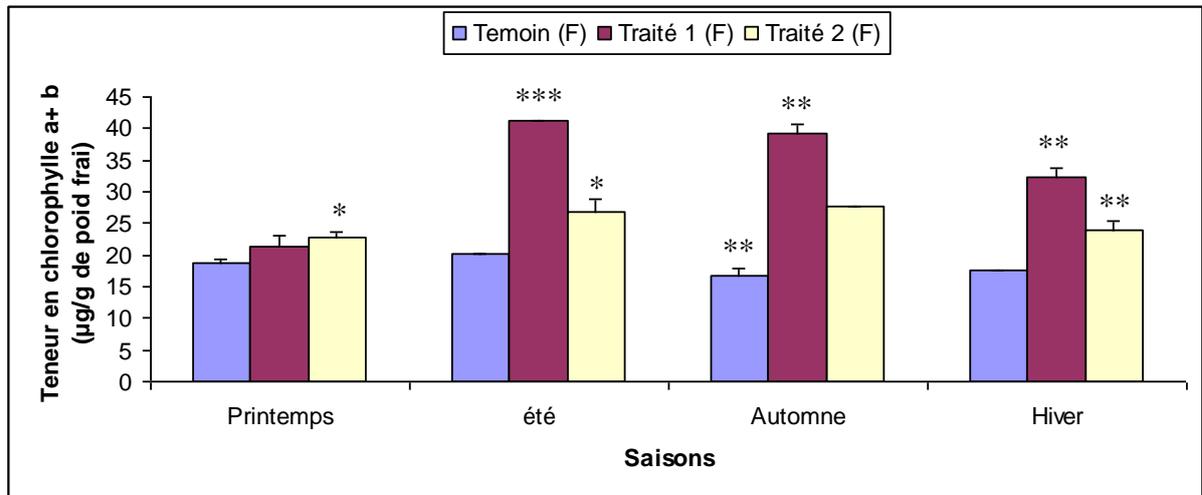
L'analyse de la variance entre le témoin et les deux étages d'épurations, donne des différences hautement significatives (\*\*) voir très hautement significative avec un  $p \leq 0,001$ .



**Figure 13 :** Variations des teneurs en *chlorophylle a* au niveau des feuilles de *Phragmites australis*. Après épuration.



**Figure 14 :** Variations des teneurs en *chlorophylle b* au niveau des feuilles de *Phragmites Australis*. Après épuration.



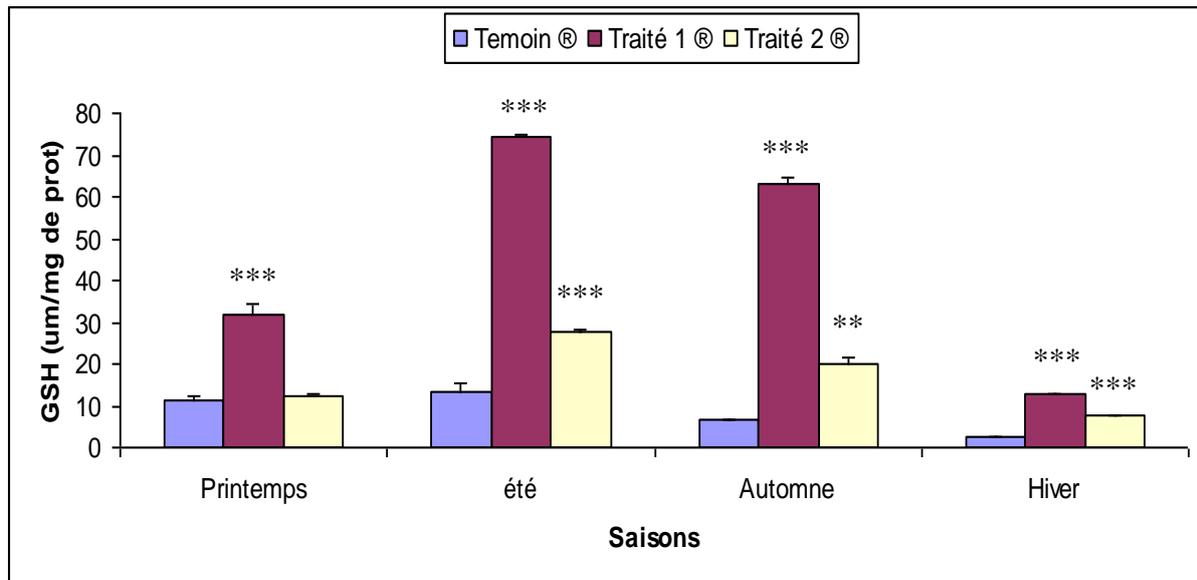
**Figure 15** : Variations des teneurs en *chlorophylle a+b* au niveau des feuilles de *Phragmites australis*. Après épuration.

## 4-2 Paramètres Enzymatiques

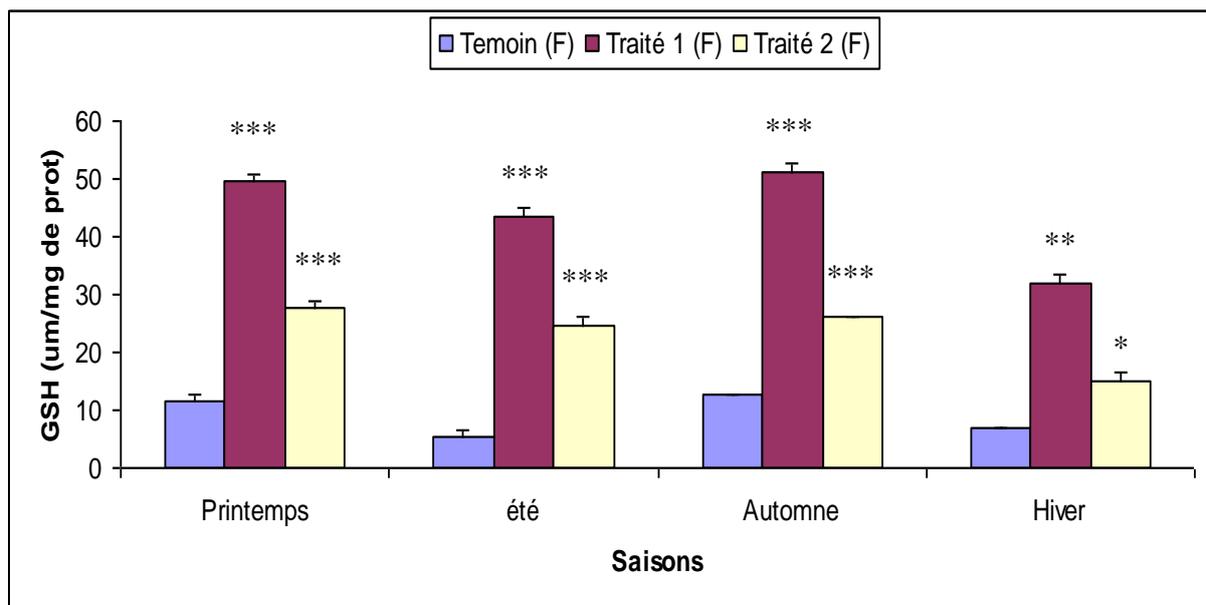
### 4-2-1 Variation du taux de GSH chez *Phragmites australis*:

\* **Au niveau des racines** : La figure (16) met en évidence l'évolution du taux de GSH au niveau des es deux étages E1 et E2 et du témoin. On observe une évolution très importante du taux de GSH au niveau des racines des plants issus des deux bassins d'épuration par rapport aux racines témoins. Ce résultat est valable pour les quatre saisons, particulièrement pour E1. Cette augmentation est plus importante en automne où le taux de GSH est pratiquement dix fois supérieur à celui des témoins, En effet le taux de GSH est 63,155  $\mu\text{mole/mg}$  de protéines pour E1, et de 6,713  $\mu\text{mole/min/mg}$  de protéines chez les témoins ainsi qu'en été où le taux de **GSH est de** 74,17  $\mu\text{mole/mg}$  de protéines pour E1, et de 13,37  $\mu\text{mole/min/mg}$  de protéines chez les témoins. Ce taux a tendance à diminuer pendant la deuxième épuration pour atteindre 20  $\mu\text{mole/mg}$  de protéines pour l'automne et 27,75  $\mu\text{mole/mg}$  de protéines pour l'été. L'analyse de la variance entre le témoin E1 et E2, révèle des différences très hautement significative (\*\*\*)  $p \leq 0.001$  pendant la première épuration et une différence hautement significative (\*\*) a très hautement significative pour la deuxième épuration avec une différence non significative pour la deuxième épuration en hiver.

\* **Au niveau des Feuilles** : La figure (17) représente l'évolution du taux de GSH au niveau des feuilles de *Phragmites australis*. Nous constatons que chez les plantes placées en E1 et E2, le taux de GSH tend à augmenter par rapport aux témoins, le taux est trois fois a 4 fois supérieur à celui des témoins particulièrement durant les trois premières saisons. En effet le taux de GSH est de l'ordre de 51,23  $\mu\text{mole/mg}$  de protéines chez les feuilles en E1 en automne, alors que chez les témoins le taux ne dépasse pas les 12,56  $\mu\text{mole/mg}$  de prot. Pour l'été il est de l'ordre de 43,29  $\mu\text{mole/mg}$  de prot en ce qui concerne les roseaux en E1, alors que pour les témoins il est de 5,45  $\mu\text{mole/mg}$  de prot. Enfin au printemps le taux de GSH est de l'ordre de 49,48  $\mu\text{mole/mg}$  de prot en E1 et de 11,45  $\mu\text{mole/mg}$  de prot pour les feuilles témoins .L'analyse de la variance entre le témoin et E1 et E2, révèle des différences très hautement significatives (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .



**Figure 16 :** Variations du taux de GSH au niveau des racines de *Phragmites australis*. Après épuration.

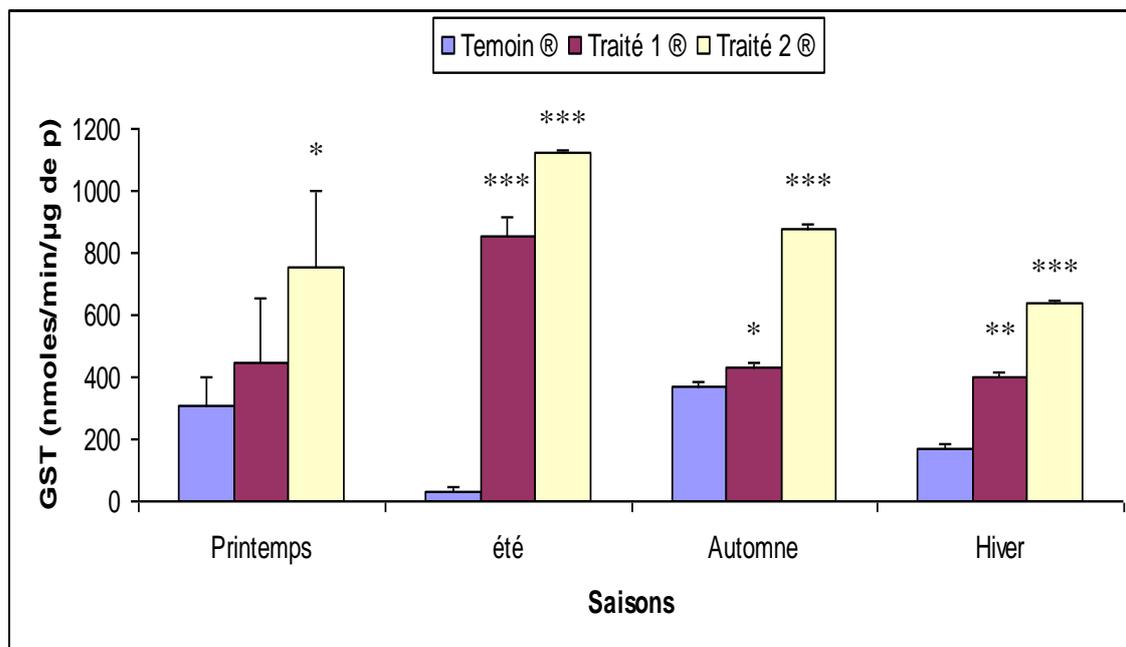


**Figure 17 :** Variations du taux de GSH au niveau des feuilles de *Phragmites australis*. Après épuration.

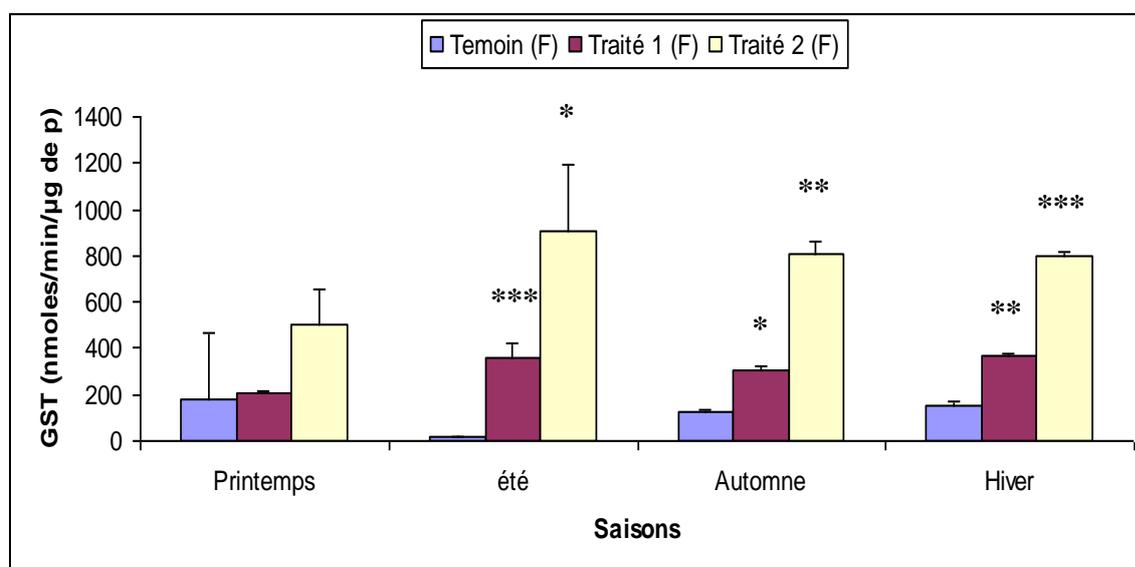
**4-2-2 Variation de l'activité GST chez *Phragmites australis* :**

**\*Au niveau des racines :** Les données obtenues après dosage de l'activité spécifique GST exprimées en nmol/min/ $\mu$ g de protéines mesurées au niveau des racines sont regroupées dans la figure 18. On remarque que l'activité GST augmente au niveau du premier bassin, cette augmentation persiste pour le deuxième bassin et ce résultat est enregistré pour les quatre saisons d'étude. Ceci a été confirmé par l'étude de variance a deux facteurs contrôlés qui montre une différence très hautement significative (\*\*\*) entre l'activité du GST au niveau des deux bassins d'épuration et les témoins et ceci pour les mesures effectuées en été.

**\*Au niveau des feuilles :** La figure (19) représente l'évolution de l'activité GST chez les feuilles. On observe que celle-ci est plus élevée chez les feuilles des végétaux placées dans une eau polluée par rapport à celles placées dans une eau potable. Cette augmentation est plus importante dans le deuxième bassin d'épuration, pour l'été elle est 14,46 nmole/min/ $\mu$ g de prot pour les les plants témoins et de 360,47 nmole/min/ $\mu$ g de prot pour ceux du premier bassin. Elle est trois fois supérieure pour ceux du deuxième bassin avec une valeur de 903,03 nmole/min/ $\mu$ g de prot. Ce résultat est similaire pour l'automne et l'hiver avec des différences significatives voir très hautement significatives. Pour le printemps ce taux reste supérieur pour les feuilles traitées du premier bassin d'épuration comparées aux témoins avec une différence non significative avec  $P > 0,05$ .



**Figure 18 :** Variations de l'activité GST au niveau des racines de *Phragmites australis*. Après épuration.

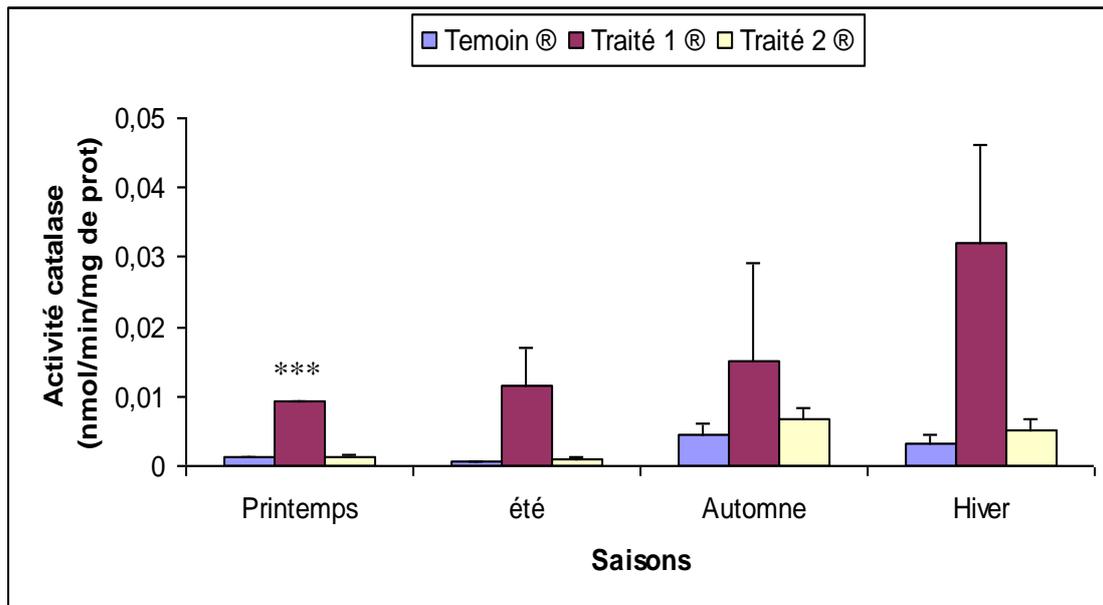


**Figure 19 :** Variations de l'activité GST au niveau des feuilles de *Phragmites australis*. Après épuration.

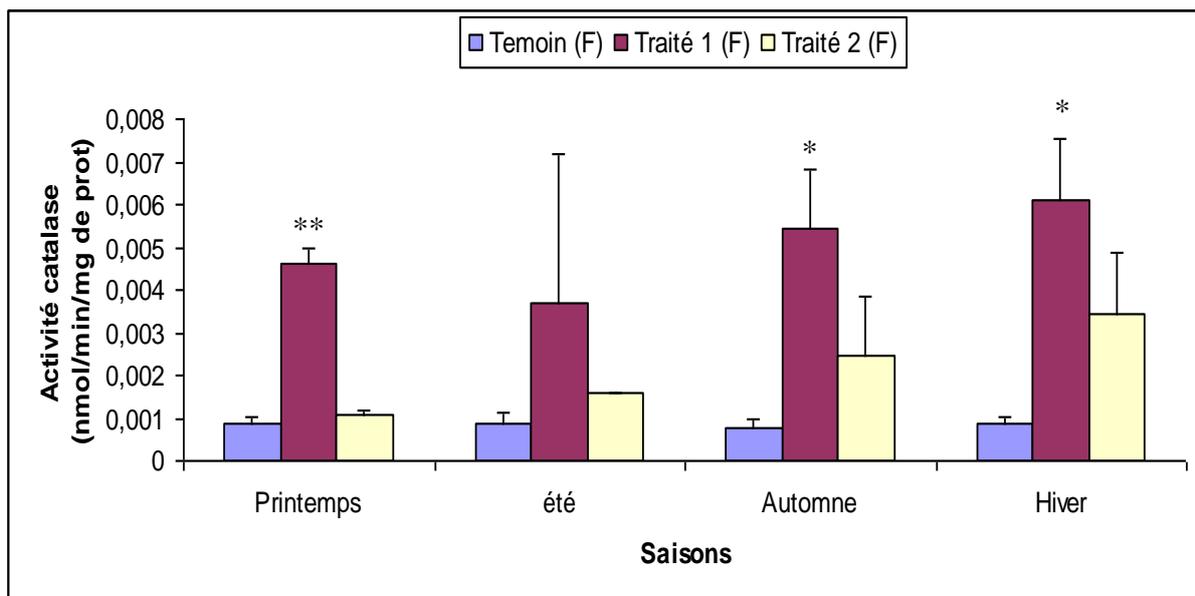
#### 4-2-3 Variation de l'activité catalase chez *Phragmites australis* :

\* **Au niveau des racines** : La figure (20) représente les variations de l'activité catalase au niveau des racines des deux étages d'épurations. On constate que celle-ci est supérieure à celle des racines témoins particulièrement chez E1 (3 fois supérieur à plus par rapport aux témoins). Cette augmentation est plus importante durant l'été 0,00056 nmole/min/mg de prot pour le témoin et de 0,011 nmole/min/mg de prot pour la première épuration, pour l'automne ce taux est de 0,0045 nmole/min/mg de prot pour le témoin et de 0,015 nmole/min/mg de prot pour les traitées. Ce taux tend à diminuer durant la deuxième épuration. L'analyse de la variance entre le témoin et E1 et E2, donne des différences non significatives, sauf durant le printemps où celle-ci est très hautement significative (\*\*\*) ,  $p \leq 0.001$ .

\* **Au niveau des feuilles** : Les résultats concernant l'activité catalase au niveau des feuilles sont représentés sur la figure (21). Ils révèlent que cette dernière augmente d'une façon très importante durant la première épuration par rapport au témoin. Après la deuxième épuration nous avons noté une diminution du taux de catalase mais par rapport à la deuxième épuration. Ce résultat est similaire pour les quatre saisons. Pour le printemps le taux de catalase est de 0,00086 n mol/min/mg de protéine, il est de 0,0046 n mol/min/mg de protéine pour le premier bassin et de 0,0010 n mol/min/mg de protéine pour le deuxième bassin d'épuration. L'analyse de la variance a révélé une différence hautement significative (\*\*), entre les témoins et les traitées pour l'automne et l'hiver et significative  $P \leq 0,05$  pour le témoin et les échantillons du premier bassin.



**Figure 20** : Variations de l'activité Catalase au niveau des racines de *Phragmites australis*. Après épuration.



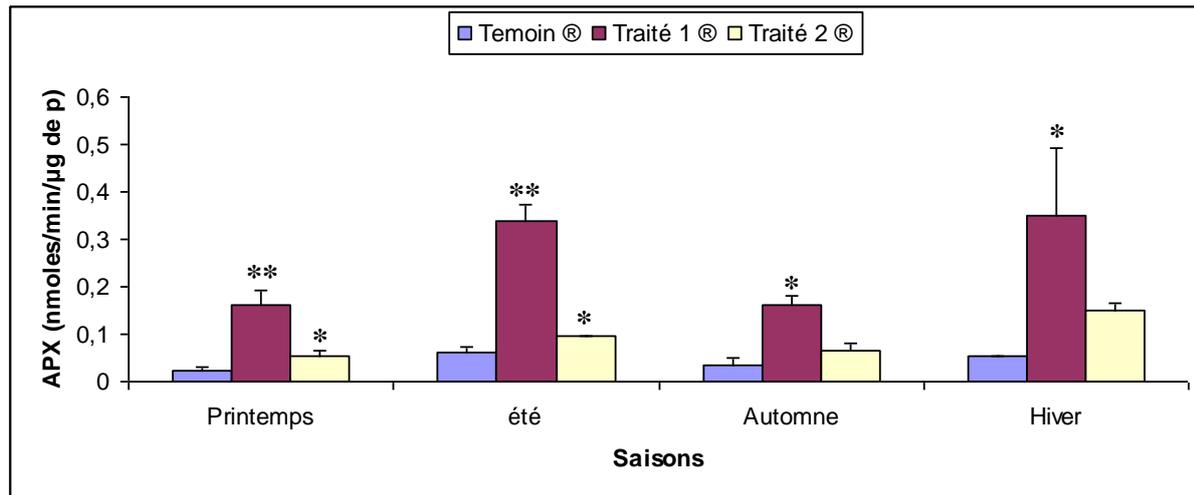
**Figure 21** : Variations de l'activité Catalase au niveau des feuilles de *Phragmites australis* Après épuration.

**4-2-4 Variations de l'activité Ascorbate Peroxydase (APX) chez *Phragmites australis* :****\* Au niveau des racines :**

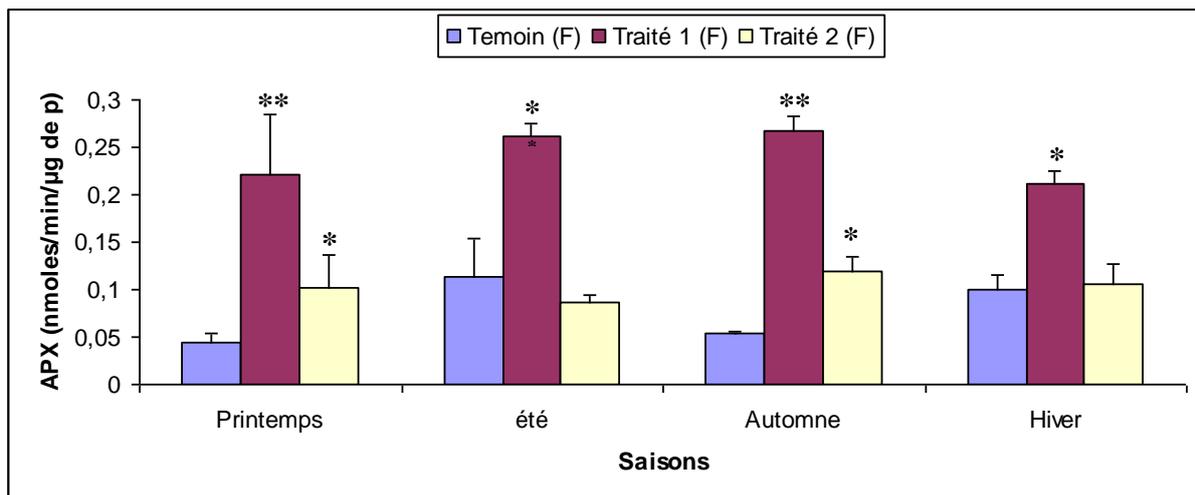
La figure (22) met en évidence les variations de l'activité APX au niveau des racines de *Phragmites australis* placées dans des bacs à épuration et les témoins. Nous constatons qu'après séjour des roseaux dans les deux étages d'épurations, l'activité enzymatique de l'APX a tendance à augmenter d'une manière significative après séjour dans le deuxième bassin. Ceci a été confirmé par l'analyse de variance qui a révélé des différences significatives (\*) voire hautement significatives (\*\*) pour les échantillons des deux bassins d'épuration et les témoins au printemps et en été, elle est significative (\*) pour l'automne et l'hiver.

**\* Au niveau des feuilles :**

La figure (23) montre que l'activité APX au niveau des feuilles des deux étages d'épurations est supérieure à celle des témoins. Dans des eaux usées brutes l'activité APX est très élevée puis diminue à partir de la deuxième épuration. Elle est de 0,220 nmol/min/ $\mu$ g de prot pour les feuilles du premier bassin et de 0,043 nmol/min/ $\mu$ g de prot pour atteindre 0,0102 pour la deuxième épuration au printemps. L'analyse statistique a révélé des différences significatives (\*) à hautement significatives (\*\*) entre l'activité APX témoin et celle des deux bassins d'épuration en automne et au printemps. En hiver et en été la différence est significative (\*) entre l'activité APX des feuilles témoins et celles du premier bassin d'épuration.



**Figure 22** : Variations de l'activité APX au niveau des racines de *Phragmites australis*. Après épuration.



**Figure 23** : Variations de l'activité APX au niveau des feuilles de *Phragmites australis*. Après épuration.

**Discussion :**

De nombreuses études ont montré que la plupart des métaux lourds sont considérés comme de véritables agents toxiques, perturbant certains systèmes enzymatiques et également les activités métaboliques et physiologiques chez l'homme, l'animal et le végétal (Iskan et *al.*, 1994).

Les métaux engendrent des radicaux oxygénés tels que le puissant radical hydroxyle OH toxiques au niveau cellulaire qui sont à l'origine du phénomène connu sous le terme plus général « stress oxydatif ». Chez les Mollusques les métaux lourds peuvent induire un état de stress général, entraînant la réduction de leurs capacités d'adaptation à l'anoxie (Le Bras, 2007). Nombre de ces métaux, Cu, Zn, Ni, Fe, Co, Se et Ba sont aussi impliqués au niveau de processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes; la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires; le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress (Rengel, 1999).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence un taux de chlorophylle élevé chez les feuilles traitées par rapport aux témoins, ceci pourrait s'expliquer selon Lichtenthaler et Miehe, (1997) par le fait que lorsqu'une plante subit un stress, la réaction photochimique diminue au profit de l'émission de fluorescence et de la production de chaleur ce qui se traduit dans notre cas par une augmentation du taux de chlorophylle.

La chlorophylle paramètre susceptible de nous indiquer un éventuel stress, car considérée comme bio marqueur de la toxicité des végétaux puisque des corrélations entre les densités cellulaires et les paramètres de la fluorescence photosynthétiques ont montré que ces dernières pouvaient être considérées comme bio marqueur de la toxicité dans le cadre de la pollution environnementale (Dewez et *al.*, 2005).

Nous avons montré une stimulation du taux de chlorophylle (a, b et a+b) chez les plantes placées dans les deux étages d'épuration et surtout dans E1 par rapport au témoin. Cette augmentation pourrait traduire une stimulation de la photosynthèse et peut être également expliquée, par les besoins en précurseurs pour la synthèse de certains polypeptides spécifiques (phytochélatines) via la photo respiration (Robert et Roland, 1998 ; Lidia et *al.*, 2004).

Nos résultats ne semblent pas concorder avec ceux de Puritch et Barcker (1967) qui mettent en évidence un effet toxique de l'ammonium sur la synthèse des chlorophylles de même qu'une perturbation de l'aspect morphologique externe et interne des chloroplastes des feuilles de *Lycopersicon esculentum*. Mill. qui apparaissent suite au traitement à l'ammonium.

D'autres travaux, (Havaux, 1988 ; Djekoun et Ykhlef, 1996) montrent une réduction de la photosynthèse, suite à une sécheresse. Cette réduction de la photosynthèse est liée, d'une part à la fermeture des stomates (Johnson et *al.*, 1984) et d'autre part, à la réduction de l'activité photochimique du PSII (effet « non stomatiques »).

En revanche les résultats obtenus dans notre travail concordent beaucoup plus avec ceux de Harrieche (2004), qui rapporte un effet stimulateur du cadmium sur la teneur en chlorophylle, ainsi que ceux de Kleche (2005) qui met en évidence une augmentation du taux de chlorophylle chez *Phragmites australis* après séjour de cette dernière dans les eaux usées, il en est de même pour ceux de Meksem (2007) qui montre une stimulation de la chlorophylle chez deux variétés de blé suite à leurs traitements par deux fongicides.

Pour confirmer ce stress en présence d'une eau polluée nous nous sommes intéressés aux variations du taux de protéines dans les racines, et feuilles. En effet, selon Sandermann (1992) et Solt *et al.*, (2003), en présence de xénobiotiques, la plante augmente la synthèse protéique en particulier des phytochélatines dont le rôle est la détoxification des xénobiotiques, particulièrement les métaux.

Nos résultats montrent une augmentation du taux de protéine dans les racines et feuilles de *Phragmites australis* cette augmentation est significative au niveau du E1 ce qui montre un fort niveau de pollution des eaux usées, par contre dans E2 nous avons mis en évidence une augmentation non significative par rapport aux témoins cela confirme que l'eau du deuxième étage après passage par la première épuration a été filtrée.

Selon Zienk (1996) l'augmentation du taux de protéines dans les racines et les feuilles des roseaux placés dans une eau polluée est due au fait qu'au niveau cellulaire des réactions de détoxification ont lieu grâce aux phytochélatines. Ceci induit la formation d'un complexe protéine/ métal.

Les phytochélatines piègent le xénobiotique et/ ou le métal en association à un groupe SH (sulfhydryle), il se forme un complexe thiolate métal qui devient immédiatement inactif. Cette réaction rend le métal inactif et permet son stockage dans les vacuoles (Ortiz et al., 1996 ; Vogeli et al., 1990).

L'augmentation de la synthèse de phytochélatines et d'enzymes de détoxification, pourrait expliquer dans notre cas l'augmentation du taux de protéines totales que nous avons mis en évidence.

L'autre élément indicateur d'un effet de stress chez le végétal est l'augmentation du taux de proline.

Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation hautement significative du taux de proline chez les racines des roseaux traités. La proline peut jouer un rôle osmoprotecteur (Paleg et al., 1984 ; Delauney et Verma, 1993 ; Taylor, 1996), stabilisateur des protéines (Kuznetsiv et sheveyakova, 1997, Shah et Dubey, 1998), inhibiteur des métaux (Farago et Mullen, 1979) et inhibiteur de la peroxydation (Mehta et gaur, 1999). Cette augmentation du taux de proline peut être expliquée selon Ober et sharp (1994), par un effet de stress chez la plante. La synthèse de la proline peut impliquer également un allègement de l'acidification du cytoplasme qui permet de maintenir le rapport NADP/NADPH à une valeur compatible à celle du métabolisme (Hare et Cress, 1997). Selon Monneveux et Nermann (1989), l'accumulation de proline est associée à la résistance de la plante au stress, ce qui pourrait donc être l'un des facteurs qui expliquent le mieux la stratégie d'adaptation des plantes.

Ainsi, il apparaît que *Phragmites australis* s'adapte parfaitement aux conditions les plus extrêmes en déclenchant des phénomènes métaboliques adéquats (Sanderman, 1992).

Bensoltane (2006) a enregistré une augmentation de la proline lors d'un stress du au  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  chez les mousses et les lichens. Cette accumulation, a été démontrée chez de nombreuses variétés de blé et dans plusieurs types de stress (osmotiques, hydriques, thermiques) (Huang et Cavalieri, 1979 ; Hubac et Viera, 1980 ; Bellinger et al., 1989 ; Ober et sharp, 1994), ce qui est en accord avec les résultats que nous avons trouvé ainsi que ceux de Gherroucha et Djekoun (1997) qui ont montré que l'application foliaire de l'IAA et  $\text{GA}_3$  et leur interactions sur la croissance du blé, sous condition de salinité induit une augmentation de la teneur en proline en fonction des concentrations de sel.

Afin de mettre en évidence l'intervention des systèmes de détoxification, dans l'adaptation de la plante aux variations du milieu, notamment en présence de polluant, nous avons suivi l'évolution d'enzymes de détoxification dont la catalase et la peroxydase connues dans la réduction des taux d' $H_2O_2$  néfaste pour l'intégrité cellulaire (Willekens et al., 1997 ; Blokhina, 2000).

Ainsi les xénobiotiques sont à l'origine de la synthèse de radicaux libres en quantités importantes provoquant ainsi un véritable stress oxydatif. Nous avons noté une augmentation de l'activité catalase et de l'APX. Nos résultats concordent avec ceux de Youbi (2006) et Meksem (2007) qui ont travaillé sur une variété de blé dur *Triticum durum* soumises à deux fongicides Artea et Punch et qui ont mis en évidence une augmentation de l'activité catalase. La totalité des enzymes impliquées dans la détoxification des ROS, présente une nette augmentation d'activité.

De plus la Catalase et l'APX ont des rôles complémentaires dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, ces deux enzymes ont une localisation cellulaire différente (peroxysome et cytosol respectivement) et les molécules cibles (réduction de  $H_2O_2$  pour la Catalase, aussi bien que  $H_2O_2$  et hydroperoxydes toxiques pour les APX) (Barata et al., 2005). L' $H_2O_2$  pénètre dans les cellules par diffusion, où il est détoxifié, mais l'excès pourrait changer la physiologie de la cellule. Ceci serait dû principalement aux cations de Cu et de Fe libres dans le cytosol et qui vont réagir avec  $H_2O_2$  dans la réaction de Fenton, par conséquent, il y a production d'hydroxyle (Cavaletto, 2002).

Nous avons constaté lors de notre étude que les effets significatifs de l'activité Catalase sont observés dès les plus faibles concentrations et cela est peut être dû à la sensibilité de ce biomarqueur, en effet la Catalase est considérée comme l'un des biomarqueurs les plus sensibles du stress oxydatif (Livingstone, 2001), particulièrement vis à vis des polluants chimiques dans le milieu aquatique (Regoli et al., 2003).

Le glutathion est un peptide faisant partie d'un système enzymatique complet comprenant notamment la GST et jouant un rôle central dans le mécanisme d'élimination du peroxyde d'hydrogène, ainsi que la prise en charge des lipides peroxydés, en plus des phytochélatines qui servent à séquestrer les métaux.

Le glutathion réduit GSH est utilisé aussi comme donneur d'électrons pour la production de l'enzyme clé du système qui est la glutathion peroxydase (Greene et al., 2002). Ainsi, nous avons mis en évidence une augmentation du taux de GSH pour les plantes placées en milieu pollué, ce résultat concorde avec ceux de Fabrizio *et al.* (2003) ainsi que Grara (2011) qui ont montré une augmentation du taux de glutathion lors d'un stress au Cadmium chez les roseaux *Phragmites australis*, ainsi que ceux de Kamara et Pflugmacher (2006), sur deux espèces *Phragmites australis* et *Quercus suber* plantées dans des eaux polluées.

Des polymères constitués à partir du glutathion, les phytochélatines [ $\gamma$ (glu-cys)ngly] servent à séquestrer des métaux lourds comme le cadmium le zinc ou le Fer. (Menone and Pflugmacher, 2005).

De plus l'exposition des roseaux aux eaux usées augmentent la concentration en GSH selon le type cellulaire (Pathak et Khandelwal, 2006). De façon générale, l'augmentation de GSH permet à la cellule de mettre en place des mécanismes de défense alors qu'aux fortes concentrations du toxique, les systèmes antioxydants sont submergés et la synthèse diminue. La synthèse de GSH en présence de métaux serait un mécanisme de protection dans lequel le métal se fixe aux groupements thiols du GSH, prévenant ainsi les dommages cellulaires (Hatcher et al., 1995; Shukla et al., 2000).

D'un autre côté la réduction du taux de GSH peut être expliquée également par l'augmentation de l'utilisation de ce dernier par la GST dans la réaction de conjugaison, ceci est confirmé par nos résultats qui indiquent une induction de l'activité GST en présence des métaux lourds, ces résultats sont en accord avec les travaux de (Canesi et al., 1999 ; Regoli et al., 1998).

Concernant les taux de GST (glutathion S-transférase), nos résultats traduisent un phénomène de résistance aux métaux lourds, ce qui suggère que cette variabilité devrait être due en partie au degré selon lequel les organismes peuvent détoxifier ces métaux aux différents stades de leur cycle vital. D'autre part les réactions des métaux avec le glutathion se traduisent soit par la formation de complexes [ métal- GSH ] ou par l'oxydation du GSH (Regoli et Principato, 1995) , Selon l'étude de Christie et Costa (1984) les métaux qui entraînent l'oxydation du GSH sont le Cu, le Co, le Mn, le Fe et le Cr. tandis que les complexes stables avec le GSH sont formés par le Zn, le Cd, le Hg, le Pb et le Ni, ces deux réactions pourraient expliquer la diminution du glutathion dans le deuxième bassin d'épuration (Halliwell et Gutteridge, 1985 ; Stohs et Bagchi, 1995) .

Selon Canesi et Viarengo (1997), une diminution du contenu de glutathion est principalement corrélée à une diminution de l'activité de la glutamyl cystéine synthétase, cette dernière intervient dans la biosynthèse de GSH.

L'attaque radicalaire des membranes provoque des modifications de la perméabilité membranaire liées à la formation de peroxydes lipidiques (Lawton et Donaldson 1991).

Notre hypothèse est que l'induction du système enzymatique GST peut être expliquée par l'entrée des particules métalliques dans l'organisme et le déclenchement du système de détoxification. Cependant Pflugmacher *et al.* (1997) notent une augmentation de la GST au niveau des racines par rapport aux feuilles et tiges ceci s'explique par le fait que les racines absorbent plus de polluant que leurs feuilles.

Il apparaît cependant que les xénobiotiques existants dans les eaux usées induisent une réponse différente du système antioxydant existants dans les racines et les feuilles de *P.Australis*. Ce type d'observation a déjà été rapportée chez *Pisum sativum* (Dixit *et al.*, 2001), qui ont montré que les feuilles présentent principalement une stimulation des enzymes du système antioxydant.

#### **Conclusion :**

Dans cette partie, nos résultats semblent converger vers la mise en évidence du caractère toxique oxydatif des métaux étudiés, à travers l'étude des métabolites et des activités antioxydantes d'enzymes telles que la GST, CAT et l'APX ainsi que la proline.

De ce fait une étude de la bioaccumulation/comparative de certains métaux étudiés aux niveaux des différents compartiments de la plante s'avère complémentaire et pourrait nous aider à élucider la différence de toxicité observée dans notre travail.



## Conclusion Générale

L'utilisation des milieux humides pour le traitement des eaux usées représente plusieurs avantages par rapport aux systèmes de traitement conventionnels. En effet, la source d'énergie nécessaire à leur fonctionnement est principalement l'énergie solaire, ils sont conçus avec une technologie simple à gérer de plus ils sont peu coûteux à construire et à exploiter.

D'un autre coté, l'utilisation des milieux humides artificiels n'engendre que peu ou pas de production de boues (*Peterson, 1998*). Enfin, ce genre d'unité de traitement augmente la superficie des milieux humides disponibles pour la faune et la flore, tout en rendant l'aspect d'une station de traitement beaucoup plus esthétique et socialement acceptable.

Ainsi, le traitement des eaux usées par ce procédé peut être une solution à la fois peu onéreuse et efficace, puisque, les eaux une fois épurées, peuvent être rentabilisées aussi bien pour l'irrigation que pour l'industrie.

Nos résultats ont révélé un fort pouvoir épurateur de *Phragmites australis* qui s'est traduit par :

- une diminution significative de la plupart des paramètres physicochimiques des eaux usées. En effet les matières en suspension ont été enlevées avec une efficacité de 90%, jusqu'à 80% pour la DBO<sub>5</sub> et la DCO, 50% pour les nitrates, il en est de même pour les chlorures et les ortho phosphates PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>
- l'un des aspects les plus marquants de notre travail, concerne l'abattement des métaux. En effet, nous avons mis en évidence une forte capacité d'absorption racinaire particulièrement du Fer et du Zinc.

Nous avons montré aussi une augmentation significative des biomarqueurs de la toxicité (enzymes de détoxifications) en l'occurrence la catalase et le glutathion, aussi bien au niveau des racines et des feuilles ou nous avons mis en évidence également une augmentation significative des paramètres biochimiques (protéines, chlorophylle et proline).

. De plus le métabolisme respiratoire a révélé une stimulation significative de la consommation d'oxygène au niveau des racines de *Phragmites australis* placées en milieu pollué.

En perspectives, il serait intéressant de:

- Doser les métaux lourds rejetés dans les eaux par le complexe ISPAT.
- Investir d'autres aspects toxicologiques en mettant l'accent entre autres sur les processus de détoxification qui ont lieu au niveau cellulaire (Phase I et II) et ce, afin de mieux cerner le devenir des xénobiotiques et leur capacité cytotoxique.
- Envisager une troisième épuration pour optimiser le rendement épuratoire des bacs.
- Faire des essais combinés d'épuration chimique et biologique pour améliorer l'abattement des polluants.

## Références Bibliographique

- Abadlia S., 1999.** Etude de l'interaction entre les sels solubles et certains métaux lourds (cuivre, plomb) dans les eaux de l'Oued Meboudja (Annaba). *Mémoire d'ingénieur en écologie environnement. Univ. Annaba.* 50p.
- Agendia P.L., 1995.** Treatment of sewage using aquatic plants: Case of the Biyeme Assi Domestic sewage (Yaounde). Doctorat d'Etat thesis, U.Y.I.
- Alvarez M.G., Tron F. & Mauchamp, A. (2005)** Sexual versus asexual colonization by *Phragmites australis*: 25-year reed dynamics in a Mediterranean marsh, Southern France. *Wetlands*, **25**, 639-647.
- Armstrong J., and Armstrong W., 1988.** *Phragmites australis* –A preliminary study of soil oxidizing sites and internal air transport pathways. *New Phytol* **108**: 373-382.
- Armstrong W., Armstrong J., and Beckett P.M., 1990.** Measurement and modelling of oxygen release from roots of *Phragmites australis*. Constructed wetlands in water pollution control. *Editeurs: P.F. Cooper et C. Findlater. Pergamon Press, Oxford.* 605p.
- Attionu R.H., 1976.** Some effects of water lettuce (*Pistia stratiotes, L.*) On its habitat. *Hydrobiologia* **50(3)**: 245-254.
- Awuah E., Anohene, F., Asante, K., Lubberding, H., and Gijzen, H., 2001.** Environmental conditions and pathogen removal in macrophyte and algal based domestic wastewater treatment systems. *Water Science and Technology* **44(6)**: 11-18.
- Awuah E., Lubberding, H.J., Asante, K., and Gijzen, H.J., 2002.** The effect of pH on enterococci removal in Pistia-, duckweed- and algae-based stabilization ponds for domestic wastewater treatment. *Water Sci Technol* **45(1)**: 67-74.
- Azaizeh H.A., Gowthaman, S., and Terry, N., 1997.** Microbial selenium volatilization in rhizosphere and bulk from a constructed wetland. *J. Environ. Qual* **26**: 666-67
- Ayaz S.C. & Akça L., 2001.** Treatment of wastewater by natural systems. *Environment international*, **26**, 189-195.
- Baker A. J. M and Walker P. L., 1990.** Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In *Heavy Metal Tolerance in Plants : Evolutionary Aspects* (ed. A. J. Shaw), pp. 155-178. CRC Press, Boca Raton.
- Barata C., Varo I., Navarro J.C., Arun S., Porte C., 2005.** Antioxidantenzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol*, **140**, 175–186.
- Barclay A.M., and Crawford M.M., 1982.** Plant growth and survival under strict anaerobiosis. *J. Exp. Bot* **33**: 541-549.

## Références Bibliographique

- Bart D., & Hartman J.M., 2003.** The role of large rhizome dispersal and low salinity windows in the establishment of common reed, *Phragmites australis*, in salt marshes: new links to human activities. *Estuaries*, **26**, 436-443.
- Bellinger Y., Bensaoud A., and Larher F., 1989.** Physiologie breeding of winter cereals for stress environments. Colloque, N°3, Montpellier, France.
- Bensoltane S., 2006.** Evaluation de la toxicité du nitrate d'ammonium (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) sur différents modèles biologiques: Mammifères, Végétaux, et Protistes ciliés. Thèse de doctorat d'état en Eco toxicologie Animale. Université d'Annaba. 153p.
- Blaauboer B.M., 1996.** Biotransformation: detoxication and bioactivation. In: Toxicology: Principles and Applications, M. A. Hollinger, eds (Boca Raton, Florida: CRC Press) pp. 41-61.
- Blokhina O., 2000.** Anoxia an oxidative stress: lipid Peroxidation, antioxidant status and mitochondrial functions in plants. Doctorale thesis, University of Helsinki, pp 11-33.
- Bordeleau J., 1998.** Les marais filtrants en agriculture, séminaire de génie agro-alimentaire. Université Laval.
- Bouffard V., 2000.** Milieux humides artificiels pour l'amélioration de l'efficacité de traitement des eaux usées domestiques d'une petite municipalité. *Mémoire du grade de maitre ès sciences. Université de Sherbrook.* 150p.
- Boutin C., 1987.** Domestic wastewater treatment in tanks planted with rooted macrophytes: case study; description of the system; *design criteria and efficiency Article de revue, Water Science and Technology*, vol. 19, no. **10**:29-40.
- Boutin, C., Liénard, A., and Esser, D., 1997.** Development of a new Generation of Reed-Bed Filters in France : First results. *Wat.Sci.Tech.*, 35 (5), 315-322
- Bowes, G., and Beer, S., 1987.** Physiological Plant Processes: Photosynthesis. *Aquatic plant for water treatment and resource recovery.* Reddy, K. R. and Smith, W. H. Orlando, Mangnolia Publishing Inc: 311-335.
- Bradford, M., 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-Dye Binding. *Analytical biochem* **72**: 248-254.
- Breen P.F., 1990.** A mass balance approach for assessing the potential of artificial wetlands for wastewater treatment. *Wat. Res* **24**: 689-967.
- Breen P.F., and Chick A.J., 1995.** Rootzone dynamics in constructed wetlands receiving wastewater: a comparison of vertical and horizontal flow systems. *Wat. Sci. Tech* **32(3)**: 281-290.
- Breen P.F., 1997.** The performance of vertical flow experimental wetland under a range of operational formats and environmental conditions. *Wat. Sci. Tech* **35(5)**: 167-174.
- Brix H., and Schierup H.H., 1989.** The use of aquatic macrophytes in water pollution control. *Ambio* **18(2)**: 100-107.

## Références Bibliographique

- Brix H., 1993.** Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance. 9-22 dans *Constructed wetlands for water quality improvement*. Editeur: *Gerald A. Moshiri*. Lewis Publishers. Boca Raton. 632p.
- Brix H., 1994.** Functions of macrophytes in constructed wetlands. *Wat. Sci. Tech* **29**: 71-78.
- Brix H., and Sorrell B.K., 1996.** Oxygen stress in wetland plants: comparison of deoxygenated and reducing root environments. *Functional Ecology* **10**: 521-526.
- Brix H., 1997.** Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands. *Wat. Sci. Tech* **35**: 11-17.
- Brooks R.R., 1998.** Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 55-94.
- Brown D.S., 1994.** Constructed wetlands in the USA. *Water Qual. Int* **4**: 25-28.
- Bulc T., and Slak A.S., 2003.** Performances of a constructed wetland for highway runoff treatment. *Water Sciences Technology*, 48: 315-322.
- Burgoon P.S., Debusk T.A., Reddy and Koopman B., 1991.** Vegetated submerged beds with artificial substrates II: N and P removal. *J. Environ, Eng* **117**: 408-424.
- Cakmak, I., et Horst, W.J., 1991.** Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant* 83: 463-468.
- Canesi L., Viarengo A., 1997.** Age-related differences in glutathione metabolism in mussel tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B Comp. Biochem*, 116, 217-221.
- Canesi L., Viarengo A., Leonzio C., Filippelli M., Gallo G., 1999.** Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*, 46, 67-76.
- Cardwell A.J., Hawker D.W., Greenway M. 2002.** Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. *Chemosphere*, 48, pp. 653-663.
- Carranza-Alvarez C., Alonso-Castro A.J., Alfaro-De La Torre M.C., Garcia-De La Cru R.F., 2008.** Accumulation and Distribution of Heavy Metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an Artificial Lagoon in San Luis Potosí, México. *Water Air Soil Pollut*, 188, pp. 297-309.
- Cavaletto M., Ghezzi A., Burlando B., Evangelisti V., Ceratto N., Viarengo A., 2002.** Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part*, 131, 447-455.
- Chafia M., 1996** . Mycromycete des sédiments d'oueds et effluents industriels de l'est Algérien. Thèse de doctorat Université Joseph Fourier, Grenoble I – p 129.
- Christie N.T., Costa M., 1984.** Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothioneins and DNA. *Biol. Trace Elem. Res*, 6, 139-158.
- CIRAD., 2004.** Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement. Analyse des végétaux, laboratoire d'analyse, département PERSYST, 7p.

## Références Bibliographique

- Coeurdassier M., 2001.** Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnia stagnalis* et *Lymnia palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques. Thèse de doctorat, université de franche comté, France. 281p.
- Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.G.E., 1997.** Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci* 2, 144-151.
- Cooper P.F., 1990a.** European design and operations guidelines for reed bed treatment systems. Papiers préparés pour conférence tenue à Cambridge en Angleterre. 25p.
- Cooper A. B., 1996.** Reed beds and constructed wetlands for water treatment. WRC / seven Trent Water Workshop June 19- 21.
- Copper P., and Green B., 1998.** Constructed wetlands for wastewater treatment in Europe. Ed. Vymazal J., Brix H., Cooper P.F, Green M.B, Haberl R.; Backhuys Publishers, Leiden (Netherlands), pp.315-335.
- Corgie S.C, Beguiristain, T and Leyval, C., 2004.** Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3552-3557
- Coulibaly L., Savane L., Gourene.,2008.** domestic Wastewater treatment with a vertical completely drained pilot scale constructed wetland planted with *corchorus oliterius*. *Afr.J.Agricult.Re: sous presse.*
- Crites R.W., Dombeck G.D., Watson R.C., and Williams C.R., 1997.** Removal of metals and ammonia in a constructed wetlands. *Water Environ. Res* 69: 132-135.
- Cunningham S.D. et Berti W.R. - 1993 -** Remediation of contaminated soils with green plants: an overview, *In Vitro Cell Dev Biol*, Vol. 29, pp. 207-212
- Cunningham S.D., Berti, W.R., Huang J.W., 1995.** Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393–397.
- Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W., 1996.** Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393–397.
- Dajoz R., 1985.** Précis d'écologie. *Edition Dunod.* 331p.
- D'angelo E.M., and Reddy K.R., 1994.** Diagenesis of organic matter in a wetland receiving hypereutrophic lake water II: role of inorganic electron acceptors in nutrient release. *J. Environ. Qual.* 23:937-943.
- Delauney A.J., and Verma DPS., 1993.** Proline biosynthesis and osmoregulation in plant. 14: 215-223.
- Delaunay S., 2010.** Réactivité de la magnétite dans les conditions représentatives du circuit secondaire des réacteurs à eau sous pression. Thèse de doctorat . université pierre et marie curie. Paris. 290p.
- Dewez D., Geoffroy L., Vernet G., Popovic R., 2005.** Détermination de photosynthétiques et enzymatiques biomarqueurs de sensibilité utilisés pour évaluer les effets toxiques du cuivre et du fludioxonil sur l'algue *Scenedesmus obliquus*. *Aquat. Toxicol.* 74, 150–159.
- Dietz AC, Schnoor JL, 2001.** Advances in phytoremediation. *Environ Health Persp* 109, 163-168.

## Références Bibliographique

- Direction Des Services Agricoles De Annaba., 2000.** Etude d'aménagement des terres agricoles dans la région périphérique du lac Fezara. 36p.
- Dixit V., Pandey,V.,Shyam,R., 2001.** Differential responses to cadmium in roots leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad), *J. Exp. Bot*, 52, 1101–1109.
- Djabri L., 1991.** Mécanisme de la pollution et vulnérable des eaux de la Seybousse, origine géologique industrielle agricole et urbaine. *Thèse de doctorat. Université d'Annaba.* 140p
- Djabri L., Mani. A., Houll A., and Hessadi D., 1997.** Vulnérabilité à la pollution des eaux de la vallée de la Seybousse. Exemple de la zone industrielle de Oued Meboudja. *Laboratoire de la pollution de l'eau. Université de Annaba.* 100p.
- Djebbar M. R., Djabar H., 2000.** Bioénergétique, les mitochondries végétales. *Synthèse.*(8) 23- 25.
- Djekoune A., and Yakhlef N., 1996.** Déficit hydrique, effets stomatiques et non stomatiques et activité photosynthétique chez quelques géotypes de blé tétraploïdes. 3<sup>ème</sup> Réunion du réseau SEWANA, de blé dur, IA Hassan II, 6-7 décembre 1996.
- Dosnon-Olette R ., 2009.** Phytoremédiation d'eaux contaminées par des pesticides : tolérance et capacité d'élimination par des plantes aquatiques. Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.266p
- Doulaye K., 2002.** Microphytes et macrophytes en Afrique de l'ouest et du centre : état des lieux, performances épuratoire et critères de dimensionnement. Thèse de doctorat. Université de Lausanne.
- Dreider W., and Gauring M., 1974.** Deiner flus hoher salzkonzentration auf verschiedene physiologische parameter von maiswurzeln *wiss. Z. der HU. Berlin Nath. Naturwiss R., 23:* 641-644.
- Duman F., Cicek M., Sezen G. 2007.** Seasonal changes of metal accumulation and distribution in common club rush (*Schoenoplectus lacustris*) and common reed (*Phragmites australis*). *Ecotoxicology*, 16, pp. 457-463.
- Esser D., 1999.** Les phragmifiltres. Journée d'information technique « les filtres plantés de roseaux ». Metz. 8 avril 1999. Agence de l'eau Rhin–meuse. P 14.
- Fabrizio P., Maria A., Pasqualini P.S., and Massacci A., 2003.** Interaction of Cadmium with Glutathione and Photosynthesis in Developing Leaves and Chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudell. 133p.
- Farago M. E., Mullen W. A., 1979.** Plantes with accumulate metals. Part IV. A possible copper – proline complex from the roots of *Armeria maritime* Tnorg chin- *Acta .( 32) L93 – L94.*
- Fauteux A., 2002.** Des roseaux contre les eaux usées. Revue de la science au Québec. Nouvelle édition. 340p.
- Fediuc E., Erdei L., 2002.** Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. *J Plant Physiol*; 71,159:265.
- Folsom B.L .,Pirce R.A., 1991.** A plant bioassay for assessing plant uptake of contaminants from freshwater soils or dredged materials, plants toxicity assess 2. 172-177.

## Références Bibliographique

- Gale P.M., Reddy K.R., and Graetz D.A., 1992.** Mineralization of sediment organic matter under anoxic conditions. *J. Environ. Qual* **21(3)**: 394-400.
- Gaugous D., 1995.** La pollution des milieux aquatiques. Aide mémoire, 2<sup>ème</sup> édition. Edition Masson. 136p.
- Gausсен H., Leroy J.F., Ozenda P., 1982.** Précis de botanique, végétaux supérieurs. 2<sup>ème</sup> édition. Edition Masson. 170p
- Genevieve T., 2002.** L'épuration industrielle ou groupée par lagunage. *Extrait du bulletin communal de Septembre*
- Gersberg R.M., Lyon S.R., Elkins B.V., and Goldman C.R., 1985.** The removal of heavy metals by artificial wetlands. *Proc. Water reuse Symposium III, future of water reuse. AWWAR esearch Foundation.* 138p.
- Ghrabi A., Ferchichi M. and Drakidès C., 1993.** Treatment of wastewater by stabilization ponds-application to tunisian conditions. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 28. 10, pp. 193-199.
- Grara N., 2011.** Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux. Thèse de Doctorat. université de Annaba.
- Grill E., W. Gekeler E.L. Winnacker & M.H. Zenk. 1988.** Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.*, 150 : 197-202.
- Good B.J., and Patrick JR., 1987.** Root-Water-Sediment Interface Processes. *Aquatic plant for water treatment and resource recovery. Orlando, Mangnolia Publishing Inc:* pp 359-343.
- Greenway M., 1997.** Suitability of aquatic macrophytes for constructed wetlands receiving swage effluent in Queensland. *Manuscrit non- publié.* **27**: 111-119.
- Grene R., 2002.** Oxydative stress and acclimation mechanisms in plants. *The American society of plant biologists. The arabiodopsis book*, pp 1-20.
- Grene R., Erturk N., and Heath L.S., 2002.** Role of superoxide dismutase (SODS) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1331-1341.
- Grosse W., Jovy K., and Tiebel H., 1996a.** Influence of plants on redox potential and methane production in water-saturated soil. *Hydrobiol* **340**: 93-99.
- Guilloteau J.A., Liénard A., Vachon A., and Lesavre, J., 1993a.** Wastewater treatment by infiltration basins. *Case study : Saint Symphorien de Lay, France. Wat. Sci. Tech.*, 27 (9), pp 97-104.
- Habig W.H., Pabst M.J, Jakoby W.B., 1974.** Glutathion S-Transferases. The First enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
- Hatcher E. L., Chen Y., Kang Y. J., 1995.** Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free radical biology & medicine*, 19, 805-12.

## Références Bibliographique

- Hellawell J.M., 1986.** Biological indicators of freshwater pollution and environmental management .Elsevier Applied publishers, London and New –York, 530.
- Hammer D.A., 1992.** Creating freshwater wetlands. Lewis Publishers, Boca Raton, 298p.
- Hancock J., Lakshime R., and Budd H., 1991.** Advanced wastewater treatment with lemna technology. *Lemna Corporation, Compte rendu de conference "Constructed wetlands for water quality improvement- An international symposium-Pensasla Floride.* 21p
- Hare P.D., and Cress W.A., 1997.** Metabolism implecation of stress. Induced praline accumulation In plant. Pant growth regule. 21: 79-102.
- Harrieche O., 2004.** Impact du cadmium et de l'interaction cadmium-calcium sur la germination et la croissance du blé dur (*Triticum durum* Desf., variété Vitron). Effets sur la respiration des racines. Mémoire de Magistère. Université d'Annaba. 79p.
- Haslam S.M. (1972)** *Phragmites communis* Trin. (*Arundo phragmites* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel). *Journal of Ecology*, **60**, 585-610.
- Havaux M., 1988.** Effects of temperature on the transitions between state 1 and state 2 in intact maize leaves. *Plant Physiol. Biochem* 26: 245-251.
- Hawkins W.B., Rodgers J.H., Gillespie W.B. Dunn A.W., Dorn P.B., and Cano M.L., 1997.** Design and construction of wetlands for aqueous transfers and transformations of selected metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf* **36**: 238-248
- Hazemann J. L., 2001.** Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2854-2859.
- Holden M., 1975.** Chlorophylls I, chemistry and biochemistry of plant pigments. 2<sup>ème</sup> édition. T. w. Goodwin. Edition. Academic press, New York, pp 1-37.
- Huang H.C.A., and Cavalieri A.J., 1979.** Praline metabolism during water stress in mulberry. *American Fern Journal* 74(2): 37-39.
- Hubac S., and Viera D., 1980.** Action de la proline exogène sur l'activité de la voie du glycolate chez *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi n.c. *Physiologia Plantarum* (3)50: 255.
- Hudon C., Gagnon, P. & Jean, M., 2005.** Hydrological factors controlling the spread of common reed (*Phragmites australis*) in the St. Lawrence River (Québec, Canada). *Écoscience*, **12**, 347-357.
- Iscan M., Coban, T., Eke B.C., 1994.** Differential combined effect of cadmium and nickel on hepatic and renal glutathione-S- transferase of the guinea pig. *Environ .Health. Perspect* ,19, 69-72.
- Jedicke A., Furch, B., Saint P.U., and Schlueter U.B., 1989.** Increase in the oxygen concentration in Amazon waters resulting from the root exudation of two notorious water plants, *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae). *Amazoniana* **11(1)**: 53-70.
- Jenssen P.D., Maehlum T., and Krogstad T., 1993.** Potential use of constructed wetlands for wastewater treatment in northern environments. *Wat. Sci. Tech* **28(10)**: 149-157.

## Références Bibliographique

- Jetten M. S., Wagner M., Fuerst J., van Loosdrecht M., Kuenen, G. and Strous M., 2001.** "Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process." *Current Opinion in Biotechnology* **12**(3): 283-288.
- Jewell W.J., 1994.** Resource-recovery wastewater treatment. *Amer. Sci* **82**: 366-375.
- Jodoin Y., Lavoie C., Villeneuve P., Thériault M., Beaulieu, J. & Belzile F.,(2008).** Highways as corridors and habitats for the invasive common reed *Phragmites australis* in Quebec, Canada. *Journal of Applied Ecology*, **45**, 459-466.
- Johnson R.C., Nguyen H.T., and Croy L.I., 1984.** Osmotic adjustment and solute accumulation in two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Sci* **24**: 957-962.
- Journal Officiel De La République Algérienne., N°46. 1993.** Valeurs limites normales des paramètres de rejets des installations des déversements industrielles.
- Kadlec R.H. , Knight R.L., 1996.** Treatment wetlands. CRC Press/Lewis Publishers, Boca raton, Florida, USA. 893p.
- Kamara S., and Pflugmacher S., 2006.** *Phragmites australis* and *Quercus robur* leaf extracts affect antioxidative system and photosynthesis of *Ceratophyllum demersum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**: 240–246.
- Kengne I.N.M., 2000.** Evaluation d'une station de lagunage à macrophytes à Yaoundé : performances épuratoires, développement et biocontrôle des diptères Culicidae. Thèse doctorat 3e cycle, Fac Sci. UYI.
- Kern I. & Idler C., 1999,** Treatment of domestic and agricultural wastewater by reed bed systems. *Ecological Engineering*, **12**, 13-25.
- Kiss S.A., Varga I.S., Galbacs Z., Maria T.H., and Csikkel A.S., 2003.** Effect of age and magnesium supply on the free radical and antioxidant content of plants. *Acta Biologica Szegediensis* **47**(1-4): 127-130
- Klèche M., 2005.** Modifications physiologiques biochimiques observées chez "*Phragmites australis*" placée dans une eau polluée "Cas de oued Meboudja". *Mémoire de Magister. Université d'Annaba*. 66p.
- Komives T, Gullner G, 2005.** Phase I Xenobiotic Metabolic Systems in Plants. *Zeitschrift für Naturforschung [c]* **60**, 179-185.
- Kone D., 2002.** Epuration des eaux usées par lagunage à microphytes et à macrophytes en Afrique de l'ouest et du centre : état des lieux, performances épuratoires et critères de dimensionnement. *Thèse de doctorat. Fondation universitaire Luxembourgeoise, Arlon, Belgique, et de nationalité Ivoirienne*. 170p.
- Kuciel R., and Mazurkiewikz A., 2004.** Formation and detoxification of reactive oxygen species. *Biochemistry and molecular biology education* **32**(3): 183-186.
- Kuznetsov V.V., Shevyakova N.I ., 1997.** Stress Responses of tobacco cells to high temperature and salinity : Proline phosphorylation of polypeptides. *Physiol. Plant* . (100) 320-386.

## Références Bibliographique

- Lasat M. M., Baker A. J. M., and Kochian L. V. 1998.** Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 118, 875-883.
- Lawton L.J., Donaldson W.E., 1991.** Lead- induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxydation. *Biol. Trace Elem. Res.*, 28, 93-97.
- Le Bras, G.J., 2007.** Ecotoxicologie et méthodes d'investigation « les bio-indicateurs » version 2.0, Isa & Université Catholique de Lille, 91.
- Lee S.E., Kwang S., Kim, K., Kim S., and Kim., C.W., 1993.** Enhancement of phosphorus and nitrogen removal with a side stream biological nutrient removal process. *Wat. Sci. Tech* **28(7)**: 89-96.
- Lee C.G., Chon, H.T. & Jung, M.C., 2001.** Heavy metal contamination in the vicinity of the DadukAu-Ag-Pb-Zn mine in Korea. *Appl. Geochem.* 16: 1377-1386.
- Lemly A.D., 1997.** Risk assessment as an environmental management tool: considerations for freshwater wetlands. *Environ. Manage* **21(3)**: 343-358.
- Levitt J., 1980.** Responses of plants to environmental stresses. Volume II: Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press, New York.
- Levresseur P. Janvier R., Rorkin I., 2000.** *Techniporc*, 23 (6).9-16.
- Lichtenthaler HK., Miehe J.A., 1997.** Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends Plant Sci* 2, 316-320.
- Lidia B., Vysotskaya N., Tatyana N., Leila Timergalina V., Aleksandr – Dedov YU., and Stanislqv., 2004.** Effect of partial root excision on transpiration, root hydrolic conductance and leaf growth in wheat seedlings. *Plant Physiologie and Biochemistry* 1 42(3): 251-255.
- Liénard A., Boutin C., and Esser D., 1990 a.** Domestic wastewater treatment with emetgent hydrophyte beds in France Pergarnon Press, IAWPRC Conference "*Advances in water Pollution Control*", pp. 183-1 92.
- Livingstone D.R., 2001.** Contaminant -stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* ,42,656-666.
- Loggini et al., 1999 in Youbi M., 2005 .** Effets de deux fongicides Artea et Punch nouvellement introduits en Algérie sur la physiologie et le métabolisme respiratoire du blé dur (*Triticum durum Desf*). Thèse de Magister de l'Université Badji Mokhtar de Annaba.
- Loutre C., Dixon D.P., Brazier M., Slater M., Cole D.J., Edwards R., 2003.** Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. *Plant J* 34, 485-493.
- Mal T.K. & Narine L., 2004.** The biology of Canadian weeds. 129. *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Canadian Journal of Plant Science*, **84**, 365-396.
- Mara D.D., 1982.** Waste in hot climates In : Water, Wastes & Health in hot climates. A Technical and Economic Apraisal. ELBS (editor), Amley Inter sciences, , pp. 241-263.

## Références Bibliographique

- Martin C.D., and Moshiri, G.A., 1994.** Nutrient reduction in an in-series constructed wetland system treating landfill leachate. *Wat. Sci. Tech* **29(4)**: 267-272.
- Maystre L.Y., 2000.** L'assainissement urbain en Afrique : enjeux et attentes. In: *Assainissement urbain en Afrique, Actes du séminaire international de Gorée*, Gorée- Dakar. Aquadev. pp. 17-22. 408.
- Meagher R.B and Heaton A.C.P., 2005.** Strategies for the engineered phytoremediation of toxic element pollution: mercury and arsenic. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **32**, 502-513.
- Mehta SK., Gaur JP., 1999.** Heavy metal -induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chorella vulgaris*. *New phytol.* (143 ) 253-259.
- Meksem L., 2007.** Etude des effets de deux fongicides: Le Flamenco SC et le Tilt 250 EC sur la physiologie, la croissance et le métabolisme énergétique des racines isolées de *Triticum durum* DESF: variétés GTA dur et Vitron. 162 p. *Thèse de doctorat d'état en biologie végétale. Université d'Annaba.* 162 p.
- Menone M.L., Pflugmacher S., 2005.** Effects of 3-chlorobiphenyl on photosynthetic oxygen production, glutathione content and detoxication enzymes in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Chemosphere* **60**, 79–84.
- Meyerson L.A., Saltonstall, K., Windham, L., Kiviat, E. & Findlay S., 2000.** A comparison of *Phragmites australis* in freshwater and brackish marsh
- Mishra K.M., Upadhyay A.R., Pandey S.K., Tripathi B.D. (2008).** Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent. *Environ Monit Assess*, **141**, pp. 49-58.
- Moffat A. J., Armstrong A. T., and Ockleston J. 2001.** The optimization of sewage sludge and effluent disposal on energy crops of short rotation hybrid poplar. *Biomass -Bioener.* **20**, 161-169.
- Mnnerveaux PH., Nermmar M., 1986.** Contribution à la résistance à la sécheresse chez le blé tendre. Etude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement . *Agronomie* (6). p17.
- Moore P.A., Reddy K.R., and Graetz D.A., 1992.** Nutrient transformations in sediments by oxygen supply. *J. Environ. Qual* **21**: 387-393.
- Morel M.A., KANE M., 2002 .** Lagunage à macrophytes : une technique permettant l'épuration, le recyclage des eaux valorisées et la valorisation de la biomasse, h2o.net : [http://www.h2o.net/magazine/dossiers/infrastructures/urbain/assainissement/lagunage\\_dakar/francais/cerer](http://www.h2o.net/magazine/dossiers/infrastructures/urbain/assainissement/lagunage_dakar/francais/cerer).
- Nakano Y., Azada K., 1987.** Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts : its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.***28**: 131-140.
- Ndzomo G.T., Ndoumou D.O., and Awah A.T., 1994.** "Effect of Fe-2+, Mn-2+, Zn-2+, and Pb-2+ on H+/K+ fluxes in excised *Pistia stratiotes* roots." *Biologia Plantarum Prague* **36(4)**: 591-597.

## Références Bibliographique

- Norme internationale ISO-7890-1: 1984.** Qualité d'eau, dosage des nitrites.
- Norme internationale ISO-6777: 1984.** Qualité d'eau, dosage du nitrate.
- Norme internationale ISO-6878-1: 1986.** Qualité d'eau, dosage d'orthophosphate.
- Ober E.S., and Sharp R.E., 1994.** Praline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiol.* 105: 981-987.
- Ortega-Villasante C., Hernandez LE., Rellan-Alvarez R., Del Campo FF., Carpena- Ruizro., 2007.** Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytologist* 176: 96-107.
- Ortiz D.F., Kreppel L., Spenser D.M., Scheel G., Mc Donald G., OW., and DW., 1992.** Heavy metals tolerance in the fission yeast requires an ATP binding cassette- type vacuolar membrane transporter. *EMBO* 11: 3491-3499.
- Paleg L.G., Stewart G.R., Bradbeer J.W. , 1984.** Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Physiol* (75). 974-978.
- Pallastrelli C., 2003.** Station d'épuration alternative. Edition Jura Batir. P1/3.
- Pascale M., 2007.** Les filtres plantés de roseaux pour le traitement des eaux usées domestiques conception et performances. *24 et 25 avril, les journées de l'eau de l'assemblée des pays de Savoie.* 155p.
- Pathak N., Khandelwal S., 2006.** Influence of cadmium on murine thymocytes: potentiation of apoptosis and oxidative stress. *Toxicology letters*, 165, 121-32.
- Peterson H.G., 1998.** Use of constructed wetlands to process agricultural wastewater. *Can. J. Plant Sci* 78: 199-210.
- Pflugmacher S., Geissler, K., Steinberg C., 1997.** Activity of Phase I and Phase II detoxication enzymes in different cormus parts of *Phragmites australis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 62–66.
- Pflugmacher S, Wiencke C, Sandermann H, 1999.** Activity of phase I and phase II detoxication enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. *Mar Environ Res* 48, 23-36.
- Piechalak A., Tomaszewska B., Baralkiewicz D., Malecka A., 2002.** Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 60: 153-162.
- Pilon-Smits E., 2005 .** Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56, 15-39.
- Price T., and Probert, D., 1997.** Role constructed wetlands in environmentally-sustainable developments. *Applied Energy* 57 (2/3): 129-174.
- Pride R.E., Nohrstedt S.J., and Benefield L.D., 1990.** Utilization of created wetlands to upgrade small municipal wastewater systems. *Wat. Air Soil Pollut* 50: 371-385.
- Pries J.H., 1994.** L'utilisation des terres humides à des fins de traitement des eaux usées et des eaux pluviales au Canada. *Communication n° 1994-1. Conseil nord américain de conservation des terres humides (Canada). Ottawa.*
- Polprasert C., Khatiwada N.R., and Bhurtel J., 1998.** A model for organic matter removal in free water surface constructed wetlands. *Wat. Sci. Tech* 38(1): 369-377.

## Références Bibliographique

- Poulet J. B. et al. 2003** . Guide de recommandations pour les stations à lits plantés de macrophytes. *Document interne*, INSA de Strasbourg.
- Puritch G.S., and Barker A.V., 1967**. Structure and function of leaf tomato chloroplasts during ammonium toxicity. *Plant. Physiol* (42): 1229-1238.
- Quezal P., Santa, L., 1962-1963**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. *Edition CNRS, tome 2. Paris*. 170p.
- Reddy K.R., D'angelo E.M., and Debusk T.A., 1990**. Oxygen transport through aquatic macrophytes: the role in wastewater treatment. *J. Environ. Qual.* **19**: 261-267.
- Reddy K.R., and Gale P.M., 1994**. Wetland processes and water quality: a symposium overview. *J. Environ. Qual* **23**: 875-877.
- Reddy K.R., and D'Angelo E.M., 1997**. Biogeochemical indicators to evaluate pollutant removal efficiency in constructed wetlands. *Wat. Sci. Tech* **35**: 1-10.
- Reddy K.R., Kadlec Flaig, E. and Gale M.P., 1999**. Phosphorus retention in streams and wetlands. A review CRC. Press LLC. *Critical review in Environmental Sciences and Technology*, 29, pp. 83-146.
- Reimold R.J., 1994**. Wetlands functions and values. 55-78. dans *Applied wetlands science and technology*. Editeur: D. M. Kent. Lewis Publishers. Boca Raton, 436p.
- Ribera D., 1998**. Habilitation à Diriger des Recherches (HDR). Rapport N°126, Université Bordeaux I.
- Regoli F., Principato G., 1995**. Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31,143-164.
- Regoli F., Nigro M., Orlando E., 1998**. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat Toxicol*, 40, 375-392.
- Regoli F., Winston G.W., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., 2003** . Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European Anguilla *anguilla*. *Environ Toxicol Chem*, 22,2120-2129.
- Rengel Z., 1999**. Heavy Metals as Essential Nutrients. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 231- 251.
- Rivera F., Warren A., Curds C.R., Robles E., Gutierrez A., Gallegos E., and Calderon A., 1997**. The application of the root zone method for the treatment and reuse of high-strength abattoir waste in Mexico. *Wat. Sci. Tech* **35(5)**: 271-278.
- Robert D., and Roland J.C., 1998**. Organisation cellulaire: Biologie végétale. Ed Doin 1: 125-345.
- Rodier J., 1996**. Analyse de l'eau naturelles, eaux résiduaires et eau de mer. *Edition Dunod*. 1134p.
- Rogers K.H., Breen P.F., and Chick A.J., 1990**. Hydraulics, root distribution and phosphorus removal in experimental wetland systems. Pp. 587-590 dans *Constructed wetlands in water pollution control*. Editeurs: P. F. Cooper et C. Findlater. Pergamon Press. Oxford, 605 p.

## Références Bibliographique

- Salt D. E., Prince R. C., Baker A. J. M., Raskin I., and Pickering I. J., 1999.** Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 33, 713-717.
- Sander mann H., 1992.** Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci* 17, 82-84.
- Sander mann H., 1994.** Higher plant metabolism of xenobiotics; the "green liver" concept. *Pharmacogenetics* 4, 225-241.
- Sankar U., 2000.** Economic analysis of environmental problems industries. UNDP. Report Chennai madras School of economics allied Publishers. New Delhi.
- Sarret G., Vangronsveld J., Manceau A., Musso M., D'Haen J., Menthonnex J. J., Schipper, L.A., and Reddy, K.R., 1996.** Determination of oxidation in the rhizosphere of *Sagittaria lancifolia* using methyl fluoride. *Soil Sci. Soc. Am. J* 60: 611-616.
- Sarret G., Vangronsveld J., Manceau A., Musso M., D'Haen J., Menthonnex J-J., Hazemann J-L., 2001.** Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Environment science and technology* 35: 2854-2859.
- Schäffner A, Messener B, Langebartels C, Sander mann H, 2002.** Genes and enzymes for *in-planta* phytoremediation of air, water and soil. *Acta Biotechnol* 22, 141-151.
- Schmidt I., Sliemers O., Schmid M., Cirpus I., Strous M., Bock E., Kuenen J. G. and Mann C.J., and Wetzel R.G., 1996.** Loading and utilization of organic carbon from emergent macrophytes. *Aquat. Bot* 53: 61.
- Scholz M., Jing, XU., and Dodson H., 2001.** Comparison of filter media, plant communities and microbiology within constructed wetlands treating wastewater containing heavy metals. 76: 827-835.
- Schröder P., Collins C. 2002.** Conjugating Enzymes Involved in Xenobiotic Metabolism of Organic Xenobiotics in Plants. *Int. J. Phytorem.* 4, 247-265.
- Schroder P., Maier M and Debus R., 2005.** Détoxification of Herbicides in *Phragmites australis*. *Naturforsch.* 60C: 317-324.
- Servais S., 2004.** Altération mitochondriale et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: Effets de l'age et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse doctorat, Université Claude bernard- Lyon 1, France, pp. 19-35.
- Severin-Rayssac J., De la Noüe J., Proulx D., 1995.** Le recyclage du lisier de Porc par lagunage. Edition Tec et Doc Lavoisier. p18.
- Shah K., Dubey R.S., 1998.** Effect of Cadmium on praline accumulation and ribonuclease activity in rice seedling : role of praline as a possible enzyme protectant. *Biol plant* (40).121-130.
- Shukla G. S., Shukla A., Potts R. J., Osier M., Hart, B. A., Chiu J. F., 2000.** Cadmium-mediated oxidative stress in alveolar epithelial cells induces the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit and glutathione S-transferase alpha and pi isoforms: potential role of activator protein-1. *Cell biology and toxicology*, 16, 347- 62.

## Références Bibliographique

- Silvestre P., Gaber J., Geai S., 1997.** Conception des dispositifs de traitement des eaux pluviales. L'eau et la route, volume 7. Ed. SETRA.
- Simkiss K., Taylor M.G., 1995.** Transport of Metals across Membranes. In "Metal speciation and bioavailability in aquatic systems". A. Tessier et D. R. Turner, Wiley. 3: 2-39
- Skousen J., Sextstone A., Garbutt K., and Sencindiver J., 1994.** Acid mine drainage treatment with wetlands and anoxic limestone drains. 263-281 dans Applied wetlands science and technology. Editeur: D. M. Kent. Lewis Publishers. Boca Raton, 436p.
- Solt J.P., Sneller F.E.C., Bryngelsson T., Lundborg T., Scht H., 2003.** Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. Environmental and experimental botany. (49). 21-28.
- Sridhar M.K.C., and Sharma B.M., 1985.** "Some observations on the oxygen changes in a lake covered with *Pistia stratiotes* L." *Water Res* **19(7)**: 935-939.
- St-cyr L., and Campbell P.G.C., 1996.** Metals (Fe, Mn, Zn) in the root plaque of submerged aquatic plants collected in situ: relations with metal concentrations in the adjacent sediment and in the root tissue. *Biogeochemi* **33**: 45-76.
- Stohs S.J., Bagchi D., 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.*, **18(2)**, 321-336.
- Sun G.K., Gray R., and Biddlestone A.J., 1998.** Treatment of agricultural and domestic effluents in constructed downflow reed beds employing recirculation, pp 529-536.
- Sun G.K., Gray R., and Biddlestone A.J., 1999.** Treatment of agricultural wastewater in a pilot-scale tidal flow reed bed system, pp 233-237.
- Surrency D., 1993.** Evaluation of aquatic plants for constructed wetlands. In: Moshiri, G.A. (Ed.), *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 349-357.
- Susarla S., Medina, V.F and McCutcheon S.C., 2002.** Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* **18**, 647-658.
- Taylor C.B., 1996.** Proline and water deficit biosynthesis and osmoregulation in plant. (4). 215-223.
- Tchobanoglous G., 1987.** Aquatic plant systems for water treatment: engineering consideration. In: *Aquatic Plants for Wastewater Treatment and Resource Recovery*. Reddy K.R. and Smith W.H. (editors), Magnolia Publishing Inc., Orlando. pp. 27-48
- Tornbjerg T., Bendix M., and Brix, H., 1994.** Internal gas transport in *Typha latifolia* L. and *Typha angustifolia* L. II. Convective throughflow pathways and ecological significance. *Aquat. Bot.* **49**: 91-105.
- Troll W.J., and Lindesley J., 1955.** A photometric for the determination proline. *J biochem* **215**: 655-660.
- Vaillant J.R., 1973.** Perfectionnement et nouveautés pour l'épuration des eaux résiduaires, eaux usées urbaines et eaux résiduaires industrielles. *Edition Eyrolles Paris*. 413p.
- Vidali M., 2001.** Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* **73**, 1163-1172.

## Références Bibliographique

**Vietmeyer N.D.,1993.** Vetiver grass. A thin green line against erosion. Board on Science and Technology for International Development. National Research council. National Academy Press. Washington, D.C. 171 pp.

**VILA M., 2006.** Utilisation de plantes agronomiques et lacustres dans la dépollution des sols contaminés par le RDX et le TNT : approches en laboratoire. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse.120p.

**Vogeli- lange R., Wagner G.J., 1990.** Subcellular localization of cadmium-binding peptides in baccolleaves –plant. *Physiol* (92). 1082-1093.

**Walton B.T. et Anderson T.A., 1990.** Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere : potential application to biological remediation of waste sites, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 56 (4), pp. 1012-1016.

**Weisner S.E.B., Eriksson P.G., Graneli W., and Leonardson L., 1994.** Influence of macrophytes on nitrate removal in wetlands. *Ambio* **23**: 363-366.

**Weckbecker G., Cory J.G.,1988.** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse *leukenaia L* 1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40: 257-264.

**Wilcox K.L., Petrie S.A., Maynard L.A. & Meyer S.W., 2003** Historical distribution and abundance of *Phragmites australis* at Long Point, Lake Erie, Ontario. *Journal of Great Lakes Research*, **29**, 664-680.

**Wood A.,1990.** Constructed wetlands for wastewater treatment-Engineering and design considerations. 481-494 dans *Constructed wetlands in water pollution control. Editeurs: P.F. Cooper et B. C. Find later. Pergamon Press. Oxford*, 605 p.

**Ye Z.H., Baker A.J.M., Wong M.H., Willis A.J., 1997b.** Zinc, lead, and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *Typha latifolia*. *New Phytologist* 136, 469–480.

**Zhang Y., and Moore J.N., 1997.** Environmental conditions controlling selenium volatilization from a wetland system. *Environ. Sci. Technol* **31**: 511-517.

**Zienk N.H., 1996.** Heavy metal detoxification in higher plant a review-gene. **179**: 21-30.

## Références Bibliographique

## Biochemical Changes Observed in Isolated Roots of *Phragmites australis* Treated with Industrial Wastewater

<sup>1</sup>Kleche Myriam, <sup>1</sup>Berrebah Houria <sup>2</sup>Rouabhi Rachid and <sup>1</sup>Djebar Mohammed Reda

<sup>1</sup>Cellular Toxicology Laboratory, Annaba University, Annaba, 23000, Algeria

<sup>2</sup>Biology Departments, Tebessa University, Tebessa, 12000, Algeria

---

**Abstract:** The objective of this study is to highlight the behavior of isolated roots of a plant known for this potential bio-purification (sewage plant): *Phragmites australis* treated with wastewater discharges from the steel complex of El Hadjar (Annaba). The analysis of the dust released from the complex shows that the majority of the rejected elements are heavy metals with very high concentrations. The evolution of the total protein levels of isolated roots shows that they are much higher than in the roots treated especially during the month of June. Concerning, the content of Proline it varies between 4 and 20 mg/g in roots PF witnesses. In the presence of wastewater rates are 6 times higher; indicating that treatment with wastewater strongly stimulates the synthesis of proline (indicator parameter of stress). Monitoring of the peroxidase enzyme activity (enzyme oxidative stress) shows that the values obtained in isolated roots of *Phragmites australis* controls tend to decrease as a function of time (less than 50%). Parallel in the presence of water, these values increase to reach a max level. This increase is by 20% during the month of March, 40% and 60% for the months of June and October. Finally, Polarographic monitoring of the respiration of isolated roots showed a high consumption of oxygen at the roots witnesses (nearly 90%). The respiratory activity is strongly reduced in the presence of sewage; the reduction is 50% /10 minutes. *Phragmites australis* is a plant that adapts well to oxidative stress generated by wastewater from industrial sources resulted in high levels of proline. This stress causes the activation of detoxification involving the use of anti-oxidant enzyme activities, confirmed by stimulating the synthesis of total protein and by inhibition of respiratory metabolism of the plant.

**Key words:** *Phragmites australis* % Oxidative stress % Respiratory metabolism % Detoxification

---

### INTRODUCTION

Environmental pollution is a major problem in the world. Water pollution attracts the attention of all decision makers and subject to all policies in both developed countries and developing countries [1]. Given this situation, it becomes essential to find techniques that are effective cleansing and yet inexpensive. Among them, technical treatment plants helophytic plays a very important particularly those using the *Phragmites australis* which is the case in our study.

The potential of this plant between plants is rather old [2] Indeed, it is reported that plants play an important role in the treatment of effluents from industrial chemical compounds such as pesticides or heavy metals. Numerous research reports the use

of this plant in various phytopurification of xenobiotics [3-6].

The reed is a rhizome plant essential for the multiplication of bacteria on roots that gives the soil a high permeability as well as an important interface between wastewater and soil [7, 8].

Most of the works conducted so far have concerned the role and potential of the plant in phytopurification; however, very few studies have focused on the biochemical and physiological changes brought out in the plant during its treatment by the wastewater.

This aspect is the major aim of our research work. Thus we sought to identify the physiological and biochemical changes resulting from treatment of *Phragmites australis* by sewage polluted by industrial wastewater generated by steel mills complex of Annaba (East-Algeria).

## MATERIALS AND METHODS

The plant model used is represented by isolated roots of reed (*Phragmites australis*) from plants have reached maturity harvested in November 2008 from a sampling site considered unpolluted (SERAI DI). The wastewater used for treating plants from Wadi Meboudja near the steel complex and two steel mills.

**Analysis of Discharges Steel:** The analysis of the quantitative and qualitative composition of the compound released by the mills of the steel complex is carried out by mass spectrophotometry.

**Treatment Plants:** Each pilot test consists of 10 plants; the plants are arranged in trays of 100 liters of capacity as the case with tap water (control plants) or sewage (treated plants) and for a period of 10 to 15 days [9].

**Determination of Total Protein:** The determination of total protein was done by the method of [10] using bovine serum albumin (BSA) as standard.

**Determination of Proline:** The assay of proline was carried out by the method of [1] modified by [12].

**Determination of Peroxidase Activity GPX:** The peroxidase activity was measured spectrophotometric at 470 nm by the method of [13] based on measuring the intensity of the color of the oxidation product of guaiacol obtained by the action of peroxidase after intake of hydrogen peroxide.

**Measurement of Respiratory Activity:** The measurement of respiratory metabolism of isolated roots of *Phragmites australis* is achieved through oxygen electrode type Hansatech. The method used is that of [14] in which the environment is constantly stirred by a magnetic stirrer.

## RESULTS

**Composition of Discharges from Steel Mills Complex:** The results of discharges analysis from the mills of the steel complex of El Hadjar are summarized by Table 1.

According to the Table, we find that the composition of discharges from steel complex is predominantly rich in heavy metals with concentrations higher than those allowed by WHO [15] particularly for iron.

Table 1: Composition of discards of complex steel mills

Compounds	Tenors (ppm)
Cr	10.7
Zn	720.0
Pb	86.4
Cr	22.0
Ni	2.5
Mn	860.0
Fe	6600.0

**Changes in Total Protein Level:** The Figure 1 shows the changes in protein level obtained from isolated roots of *Phragmites australis*, Controls and in treated wastewater.

We notice that the average content of total protein is much higher in treated plant roots. However, the difference between the roots of control plants and treated is growing more and more during the months of June and October. Indeed, it was during these two months that the recorded rates of total protein higher. At the roots of control plants these rates remain close whatever the season.

**Changes in Proline Levels:** Figure 2 represents changes in the average recorded levels of proline isolated from the roots of *Phragmites australis* controls and treated by wastewater.

This figure shows that the average rates of proline are high in roots isolated from plants which have remained in the wastewater. These rates are much higher in the roots of plants treated. We note that the difference between the rates of proline isolated from roots of treated plants also increases depending on the season and reached the peak of observable during the months of June and October.

**Variations of Peroxidase Activity (GPX):** The activity of peroxidase in nmol/min /mg of protein is shown in Figure3.

In Figure 3 we observed that the average recorded values of GPX activity are between 0.46 and 0.22 (50% reduction). Among isolated from roots of control plants the highest values are obtained during the months of January and March. In isolated roots of plants treated with wastewater, it is noted that these values increase with time to reach almost a max from March with a peak of apparent during the month of October. This value is 3 times higher than in roots isolated from plants.

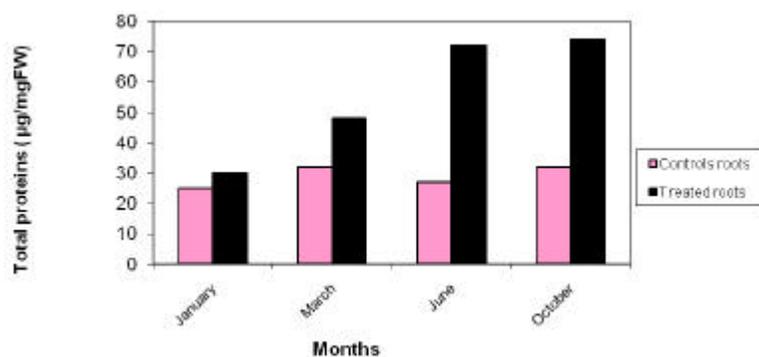


Fig. 1: Changes in total protein isolated from the roots of *Phragmites australis*

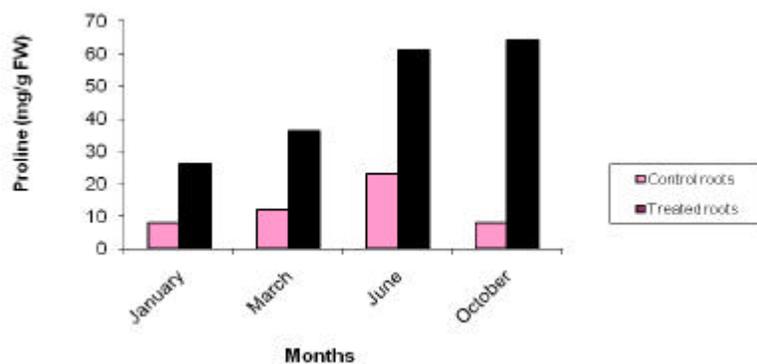


Fig. 2: Variations in average grades of proline isolated from the roots of *Phragmites australis*

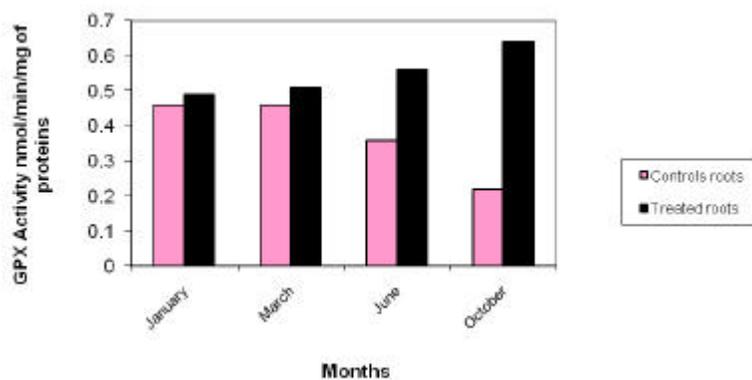


Fig. 3: Variations of the GPX activity of *Phragmites australis* isolated roots according to the treatment of wastewater

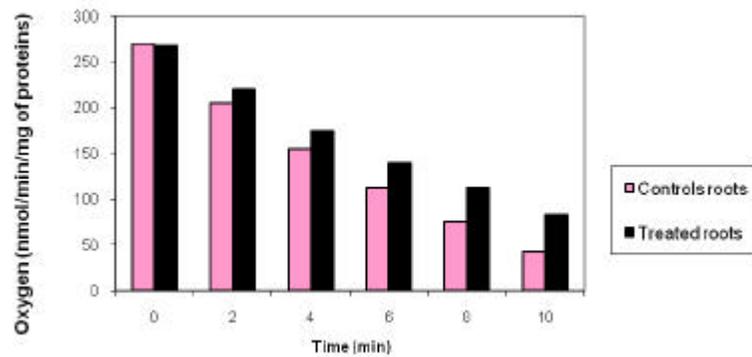


Fig. 4: Changes in respiratory activity of isolated roots of *Phragmites australis*

**Variations of Respiratory Activity:** Variations in the respiratory activity of isolated roots of treated plants and witnesses are presented by Figure 4.

This figure shows that the consumption of oxygen in the isolated witnesses roots of *Phragmites australis* is important in function of time. It goes from 270 nmol of O<sub>2</sub>/ml to 31 nmol/ml, representing consumption of about 90% O<sub>2</sub> environment measurement and for 10 minutes of recording. In isolated roots of treated plants, we find that the consumption of O<sub>2</sub> initially significant at 2 and 4 min of recording at a slow trend from 6 min of recording. Concerning the roots of plants treated by sewage this reduction reached 90% of the respiratory time equal to 10 minutes.

## DISCUSSION

The objective of this study is to highlight one part of the quantitative and qualitative composition of industrial waste generated by the units of the complex steel mills and the other to monitor physiological and biochemical changes observed in *Phragmites australis* in the treatment of wastewater from industrial sources.

The results obtained show that the discharges generated by the steel complex units are loaded with heavy metal concentrations far exceeding those permitted by WHO. In qualitative terms, these discharges are composed of heavy metals such as Zn, Cu, Pd, etc..., with the addition of a very large amount of iron (close to the complex).

Alongside the model plant used in our study "*Phragmites australis*" treated sewage loaded metal compounds present a rate of total protein that increases depending on the season especially during the months of June and October. This protein synthesis could be explained by the activation of detoxification systems of *Phragmites australis*.

Indeed, the work of [16] and [17] support our observations in this work the stimulation of protein synthesis was due to the synthesis of phytochelatin whose role in the detoxification is well known. According to [18] these particular proteins PCS (phytochelatin synthesis) plays a key role in the mechanism to capture heavy metals; the catalyzes glutathione enzyme from phytochelatin production of heavy metal chelators promote their sequestration in the vacuoles.

In our case, the stimulation of protein in the isolated roots of *Phragmites australis* explained by the fact that

these bodies are real sites of resistance to oxidative stress. This confirms the results reported by [18]. In addition, high levels of proline in the roots observed in plants treated by sewage and just confirm the fact that the roots are indeed in the presence of oxidative stress. Thus the role of proline could affect the root osmoprotection [19, 20]. Which would stabilize the protein levels [21], inhibitor of heavy metals [22] and reduce peroxidation [23]?

The values of peroxidase activity showed a strong stimulation observed during the months of June and October. These values indicate a high antioxidant capacity of *Phragmites australis* in the presence of oxidative stress produced in conditions of heavy metal pollution. This supports the observations of [24, 25].

Finally, the respiratory metabolism of isolated roots of *Phragmites australis* treated with wastewater is highly disturbed. This result could be explained by a slowing of the respiratory activity of isolated roots of *Phragmites australis* and processed to the activation of detoxification systems/sequestration of heavy metals contained in wastewater. This regulatory mechanism of the plant is a strategy adapted it to better withstand xenobiotics and continue its growth. In this option the work of [26, 27] and [28] support this hypothesis in plants.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the General Direction of Research from the Algerian Ministry of High Teaching and Scientific Research.

## REFERENCES

1. Kemps, M.C., 1996. Design subsurface flow. Westland treating municipal water in 5<sup>th</sup> international conference on wetland system for water pollution control, Vienna. P. III /3.
2. Radoux, M. and D. Kemps, 1988. Épuration comparée des eaux usées domestique par trois plantations héliophytique et par un lagunage a microphyte sous un même climat tempérée. Acta Ecologia Applic., 9(1): 25-38.
3. Brix, M. and M.M. Scheirup, 1989. The use of aquatic macrophytes in Water pollution control. Am. Bio., 18: 100-107.
4. Biddlestone, A.J., K.R. Gray and G.D. Job, 1991. Treatment of dairy farm wastewaters in engineered reed bed systems. Process Biochemistry, 26: 265-268.

5. Abissy, M. and L. Mandi, 1999. Utilisation des plantes aquatiques enracinées pour le traitement des eaux usées urbains: cas du roseau. *Revue des Sciences de l'eau.*, 12(2): 285-315.
6. Souiki, L., R. Rouabhi, H. Berrebbah and M.R. Djebbar, 2008. Survey of the physico-chemical quality of the wastewaters of Biskra city rejected in Chabat Roba, Messdour and Wadi Z'ommor (Algeria). *African Journal of Environmental Science & Technology*, 2(8): 231-238.
7. Haslam, S.M., 1972. Biological flora of the British Isles. *Journal of Ecology*, 60(2): 585-609.
8. Gesberg, R.M., B.V. Elkins, S.R. Lyon and C.R. Goldman, 1986. Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands. *Water Res.*, 20(3): 363-368.
9. Genevieve, T., 2002. L'épuration industrielle ou groupée par lagunage. Extrait du bulletin communal de Septembre.
10. Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-Dye Binding. *Analytical Biochem.*, 72: 248-254.
11. Troll, W. and J. Lindesley, 1955. A photometric for the determination proline. *J. Biochem.*, 215: 655-660.
12. Dreier, W. and M. Goring, 1974. Der ein flush holher salz Konzentration auf weishidence physiologishe parameter Von Maiswirzeln Wiss Z der. Berlin. *Nath. Naturriss. Res.*, 23: 641-644.
13. Fielding, J.L. and J.L. Hall, 1978. Abiochemical and cytochemical study of peroxidase activity in root of *Psum satvum*. *J. Exp. Bot.*, 29: 279-986.
14. Djebbar, M.R. and H. Djebbar, 2000. Bioénergétique, les mitochondries végétales. *Synthèse*. 8: 23-25.
15. Kleche, M., 2005. Modifications physiologiques et biochimiques observées chez *Phragmites australis* placées dans une eau polluées cas de \* Oued Meboudja +. Thèse de magister, Ecotoxicologie, Université de Annaba, 86 pages.
16. Sanderman, H., 1982. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.*, 17: 82-84.
17. Solt, J.P., F.E.C. Sneller, T. Bryngelsson, T. Lundborg and H. Scht, 2003. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 49: 21-28.
18. Brix, M. and M.M. Scheirup, 1989. The use of aquatic macrophytes in Water pollution control. *Am. Biolo.*, 18: 100-107.
19. Taylor, C.B., 1996. Proline and water deficit biosynthesis and osmoregulation in Plant, 4: 215-223.
20. Roy, D., N. Basu, A. Bannia and S.K. Banerjee, 1993. Concentration of exogenous L. proline with NaCl in salt sensitive utilization of rice. *Biologica Plantarum*, 35(1): 69-72.
21. Shah, K. and R.S. Dubey, 1998. Effect of Cadmium on praline accumulation and ribonuclease activity in rice seeding: role of proline as a possible enzyme protectant. *Biologica plantarum*, 40: 121-130.
22. Fagro, E.M., 1994. Plants and the chemical elements biochemistry. Uptake, Tolerance and toxicity, Edition VCM, pp: 320-231.
23. Mehta, S.K. and J.P. Gaur, 1999. Heavy metal induced proline accumulation and diets role in ameliorating metal toxicity in *Chorella vulgaris*. *New Phytol*, 143: 253-259.
24. Fedice, E. and I. Etdet, 2002. Phytological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. *J. Plant Physiol.*, 159: 265-271.
25. Negura, A., S. Duna, M. Stefan, L. Negura and N. Srefan, 2007. Activité de la superoxyde dismutase et de la peroxydase dans les feuilles de grand roseau "*Phragmites ausrtalis*", dans les lacs de la rivière CIRIC. *Sectiunea Generica Si Biologie Milealara*, III: 51-54.
26. Schroder, P., H. Maier and R. Debus, 2005. Detoxification of Herbicides in *Phragmites australis*. *Narurforsh*, 60C: 317-324.
27. Hennouni, N., M.R. Djebbar, R. Rouabhi, M. Youbi and H. Berrebbah, 2007. Effects of Artea, a systemic fungicide, on the antioxidant system and the respiratory activity of durum wheat (*Triticum durum L.*). *African Journal of Biotechnology*, 7(5): 591-594.
28. Sbartai, H., R. Rouabhi, I. Sbartai, H. Berrabbah and M.R. Djebbar, 2008. Induction of anti-oxidative enzymes by cadmium stress in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *African Journal of Plant Science*, 2(8): 072-076.

This is a refereed journal and all articles are professionally screened and reviewed

**ORIGINAL ARTICLE****Tolerance And Accumulation Of Xenobiotic By *Phragmites Australis* : Worms Of New Methods Of Bio-Depollution****Kleche meriem, Berrebbah Houria, Souiki Lynda, Grara Nedjoud and Djebar Mohamed Reda***Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, 23000, B.P. 12. Algeria.*Kleche meriem, Berrebbah Houria, Souiki Lynda, Grara Nedjoud and Djebar Mohamed Reda:  
Tolerance And Accumulation Of Xenobiotic By *Phragmites Australis* : Worms Of New Methods Of  
Bio-Depollution**ABSTRACT**

This work has two parts at first we were interested in variations of physicochemical parameters of waste water loaded with discharges from industrial bins after passing through a purifying E1 and E2. It is a lagoon system designed vertical flow in the laboratory of *Phragmites australis* and compounds. Our results showed a significant reduction of suspended COD and BOD<sub>5</sub> and conductivity. The second part of this study is restricted to the study of biochemical and enzymatic potential changes before and after treatment. Our results confirm the ability of roots of *Phragmites australis* to accumulate and transfer the metals and the involvement of enzymes of metabolism in the roots.

**Key words:** *Phragmites australis*, roots, Phytoremediation, detoxification, GSH, GST, physicochemical parameters.

**Introduction**

Water is a source of invaluable life. After oxygen, it is our second vital need. If one can resist 5 weeks the hunger, one cannot remain more than 3-4 days without drinking!

But everywhere on planet, the development of the human, domestic or industrial activities, is dependent on the water resource. The diversity of the uses induces a series of impacts varied on the quality of water.

There is however a common point, intrinsically related to the nature of water: that it is integrated into the agroalimentary die or that it is universal solvent for all kinds of cleanings, water continues its cycle while joining, early or late, the tablecloth, the river, the river. Water carries there that of which one charged it, i.e., symbolically: filth and soap [20].

With the development of town planning and industrialization, as well as the evolution of the modes of consumption, the water discharges known as "worn" evolved/moved considerably in quantity and complexity. The simple domestic rejections grew rich by more complex products (detergents...) and the networks of cleansing collect industrial, commercial or artisanal wastes to the very diverse characteristics. The rainwater, washing increasing bitumen surfaces and roofs, takes care in mineral and organic products and increases by as much flow

polluting to treat. When worn water is not treated, the rivers are exceeded in their natural capacity of purification and find polluted. The treatment or the purification of worn water aims thus to reduce the polluting load which they convey in order to return in the aquatic environment a water of quality, respectful of natural balances and its uses future (fishing, leisure, food, agricultural or industrial use, ...). [1].

Many interest were carried these last decades with the phytoepuration worn water. Developed technologies exploit the capacities of adaptation of the systems racinaires to the strong polluting loads and the conditions of anoxia or hypoxia of the substrate, involving symbiotic relations between the micro-organisms and the roots which support the elimination of the pollutants [21]. The goal of this present study is to evaluate the physicochemical performances épuratoires of an installation of lagunage, exploited successively under the die with macrophytes, (*phragmites australis*) and to see whether these artificial wet mediums or purifying marshes can constitute an adequate system for the domestic water treatment worn, industrial and agricultural.

And this through the study of the capacities of the roots with absorber/adsorber metal particles present in water used, like elucidating the effects of the stress oxidizing induced by worn heavy metal

**Corresponding Author**

Grara Nedjoud., laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University of Annaba, 23000, B.P.12. Algeria.  
E-mail: grara120@yahoo.f

water charged on the various bodies (roots and sheets) with the reed *phragmites australis*. To achieve this goal, we set up a system of purification at the laboratory (in vitro simulation) similar to the filter marsh (marsh with vertical flow). This system is composed of two vats: one located in height and the second in against bottom to receive water which runs out of the first vat, in which macrophytes were planted (*Reeds australis*).

Our choice it is related to water of Meboudja Wadi because of their strong pollution by effluents of the iron and steel complex, waste waters, water of valves and water of agricultural irrigation.

## Material and Methods

### 1-1 Description of the system of purification:



**Fig. 1:** System of purification (two stages of purifications). (*Laboratory of Cellular Toxicology*)

### 1-2 biological Material:

In this work, we used a *macrophyte* considered for its strong purifying capacity the common reed (*phragmites australis*). it is one of the invading vegetable species (Jodoïn and Al 2008). The reed is probably one of the vascular plants most widespread in the world (Badly & Narine, 2004). The reeds are able to absorb and to concentrate significant quantities of pollutants and they contribute to the self-purification of water. Their development accelerates in calm water and the rivers (Dajoz,

In our work we built a standard system of purification filter marsh (marsh with vertical flow), this last are composed of two vats connected to each other by a pipe, the first located at height a 53.5 cm (1<sup>st</sup> stage) and contain three layers of gravels of different granulometry and thickness.

The second located at a 21 cm height (second stage) also containing three layers: two made up of gravels and the third which is thickest consists of sand, in the latter of the macrophytes were planted (*phragmites australis*), the first vat is irrigated directly by the water of Wadi Meboudja and the second receives the water of the first stage. In parallel, a third vat irrigated by water of tap will be used as witness. One places in each vat an equivalent quantity of reeds which remain ten days at least [12]. (figure1).

1985) Once established in the vat, the plant develops a very significant system racinaire.

### 1-3 Methods of analyses of water:

For the various physico-chemical analyses, we took worn water samples of the various planted vats of reeds (after purification), as well as rough worn water of Meboudja Wadi.

The analyses were carried out on the level of the analysis laboratory " horizon " Annaba. The table (1) gathers the principal parameters and methods used.

**Table 1:** Principal studied parameters and methods of analysis for each water sample.

	Elements	Method of analysis
01	COD	Rodier, 1996
02	BOD5	Rodier, 1996
03	MIS	Rodier, 1996
04	Conductivity	Rodier, 1996

## 2. biochemical parameters:

### 2-1 Proportioning of total proteins:

The total proteins of *phragmites australis* are proportioned according to the method of Bradford, (1976) using the albumin of ox serum (BSA) like standard (Merk). The range calibration is carried out starting from a solution mother of BSA (1mg/ml). The reading is done with at ( $\lambda = 595$  nm).

### 2-2 Proportioning of the prolin:

The assay technique of the proline used is that of Troll and Lindsley, [37], modified by Dreider and Goring [9]. The determination of the optical densities of the samples is carried out with the at ( $\lambda = 528$  nm).

## 3. Proportioning of Biomarkes:

### 3.1. Preparation of the enzymatic extract:

The enzymatic extract from the roots of Reeds australis is obtained according to the method of Loggini *et al.*, [24]. the extract will be used for the measurement of the activity ascorbate-peroxidase (APX), guaiacol-peroxidase (GPX) and Glutathione transferase (GST).

#### 3-1. Activity Glutathione S-Transferase (GST):

The proportioning of the activity glutathione S-transferase is carried out according to the method of [14].

#### 3-2 Glutathione (GSH):

The enzymatic extract is homogenized in a solution of (E.D.T.A) with 0,02M and undergoes a deproteinisation by the acid sulfo-salycilic 0,25%. After centrifugation to (2000 tours/mn) during 10 minutes the supernatant is used for proportioning spectrophotometric with reagent DTNB 0,01M at 412nm. The concentrations of the GSH are proportioned by the method of Weckbecker and Cory, [39] and are expressed in  $\mu\text{M}$  / mg of protein.

## Results

### 1 Analysis of the variations of the physicochemical parameters of worn water:

#### 1-1 Variation of the chemical demand for oxygen DCO:

The table (02) illustrates the values of the DCO before and after purification. We note that these last are very high. After purification, we note a reduction of the DCO on the level of the two stages of purifications. Thus the rate of the DCO decreases by approximately 80 A 90 % after the second purification for the three other seasons, however, in spring, the value of the DCO remains higher a norme(160mg/l).

#### 1-2 Variation of the biochemical Demand for oxygen (DBO5):

The values of the biochemical demand for oxygen are represented in the table (03). In spring and in summer, the values of the DBO5 are higher than those obtained during the winter and the autumn with respectively 805 mg/l and 250 mg/l. In the presence of the seedlings of *phragmites australis* the DBO5 tends to decrease by approximately 5 to 10%, in autumn, after the first purification, and by approximately 35% after the second purification with an abatement from approximately 95% in spring to reach 43 mg/l (near to the Algerian standard); a third basin of purification can give a better output.

#### 1-3 Variation of the Matter in suspension (MIS):

The evolution of the matter in suspension, is represented in table (04). Thus we note a very significant reduction in the content of suspended matter after the first and the second purification. The difference is about 80% and 90% respectively for the water used after purification 1 and purification 2 and this some are the season.

#### 1-4 Variation of electric conductivity (EC):

The table (05) highlights the variations of the conductivity of water in the vats at purification. We note a very apparent reduction in the electric conductivity of water after passage daN the two vats. Thus after the first purification conductivity decreases by approximately 10% compared to water not having been in contact with the plants. After the second passage (the second purification), conductivity decreases by approximately 60% in Autumn and 15% in spring.

**Table 2:** Variations of the contents of DCO before and after stay of the plants of reeds *Phragmites australis* in worn water.

Seasons	Concentrations of COD (mg/l)		
	Raw water	Epuration 1	Epuration 2
Spring	1000	500	160
Summer	750	143	35
Autumn	605	250	60
Winter	96,66	53	23,23

**Table 3:** Variations of the contents BOD 5 before and after stay of the plants of reeds *Phragmites australis* in worn water.

Seasons	Concentrations of BOD <sub>5</sub> (mg/l)		
	Raw water	Eputation 1	Eputation 2
Spring	805	550	43
Summer	250	160	80
Autumn	140	120	94
Winter	99,01	71,03	40

**Table 4:** Variations of MIS before and after stay of the plants of reeds *Phragmites australis* in worn water.

Seasons	MIS (mg/l)		
	Raw Water	Eputation 1	Eputation 2
Spring	125	80	20
Summer	111	67,33	32
Autumn	95,33	19,95	10,11
Winter	75,22	8,99	4,65

**Table 5:** Variations of conductivity before and after stay of the plants of reeds *Phragmites australis* in worn water

Seasons	Conductivity (µs/cm)		
	Raw Water	Eputation 1	Eputation 2
Spring	825	289	156
Summer	1020	850	350
Autumn	1580	1100	500
Winter	1490	1150	950

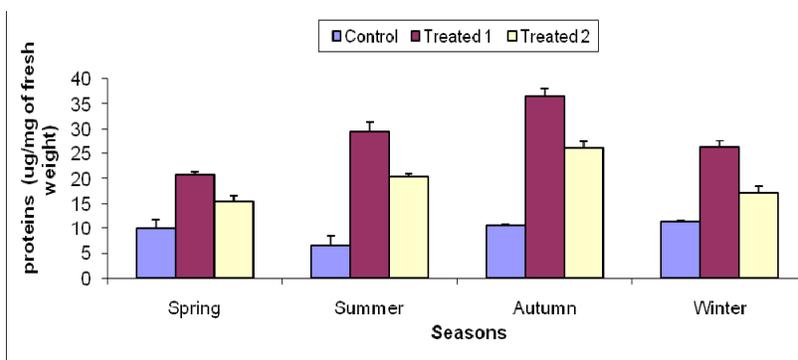
### Biochemical Parameters:

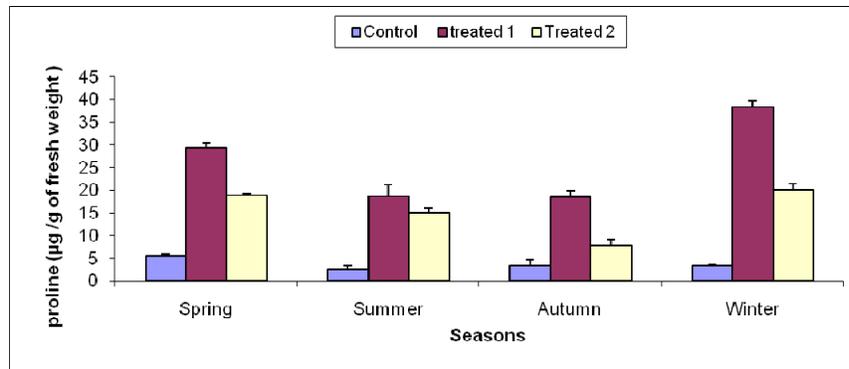
#### Variation of the content of total proteins on the level of the roots of *Phragmites australis*:

Figure (02) represents the variations of the contents of proteins on the level of the roots of *Reeds australis*. We note for the plants placed in the first stage of purification (E1) that the protein rate increases of more than 100% (in a highly significant way with  $p = 0,001$ ) compared to the pilot plants and this during the four seasons. Indeed the protein rate is about 29.45 µg at the roots of the plants of E1 in summer, whereas at the witnesses the rate does not exceed 06.42 µg. In winter this rate is of 36.650 µg for E1 with witnesses not exceeding the 10.503 µg. (an increase of more than 100%). This rate decreases up to 26 µg for the stage E2 but remains always higher than the witness. This observation is the same one for all four season.

#### 2-2 Variation of the content of prolin on the level of the roots of *Pragmites australis*:

Figure (03) illustrates the effect of biological purification on the rate in proline on the level of the roots of *Reeds australis*. We note that this rate is high at the reeds of the first basin during the four seasons. This increase is very highly significant for the seasons of spring and the summer, for spring this rate is 5,33 Mg / G for the witness and 29,25 Mg / G after a passage in the first basin to reach 18,87 Mg / G after the second passage. This difference is highly significant with  $p = 0.001$ . In autumn the rate of proline is 3,34 Mg / G for the witness this rate reaches 18,34 Mg / G for the first purification this difference is highly significant with a  $p = 0.001$ . Ce rate decreases after the second passage to reach 7.80 Mg / G with a non significant difference.

**Fig. 2:** Variations of the contents of total proteins at the roots of *Phragmites australis* placed in worn water (E1, E2) and control



**Fig. 3:** Variations of the contents of proline at the roots of *Phragmites australis* placed in worn water (E1, E2) and control

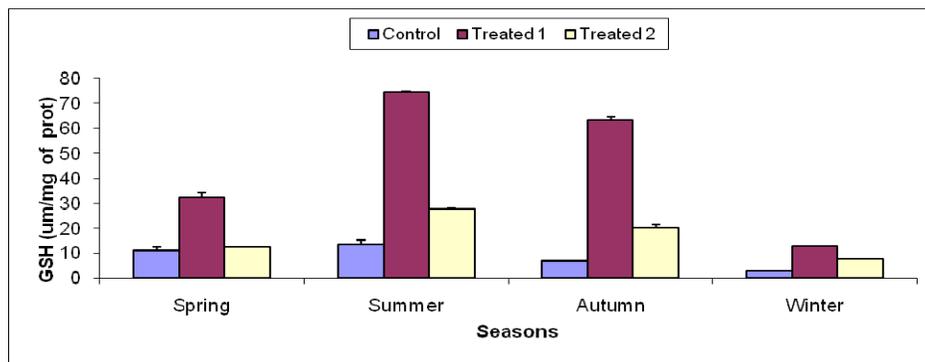
*Variation of rate GSH on the level of the roots of Phragmites australis:*

The figure (04) highlights the evolution of the rate of GSH at the level of are two stages E1 and E2 and of the witness. One observes a very significant evolution of the rate of GSH on the level of the roots of the seedlings from the two basins from purification compared to the pilot roots. This result is valid for the four seasons, particularly for E1. This increase is more significant in autumn where the rate of GSH is practically ten times superior with that of the witnesses, Indeed the rate of GSH is 63,155 µmole/min/mg proteins for E1, and of 6,713 protein µmole/min/mg for the witnesses as in summer when the rate of **GSH is of 74,17** protein µmole/mg for E1, and of 13,37 protein µmole/min/mg at the witnesses. This rate tends to decrease during the second purification to reach 20 µmole/mg proteins for the autumn and 27,75 protein µmole/mg for the summer. The analysis of the variance between the witness E1 and E2, reveals differences very highly significant

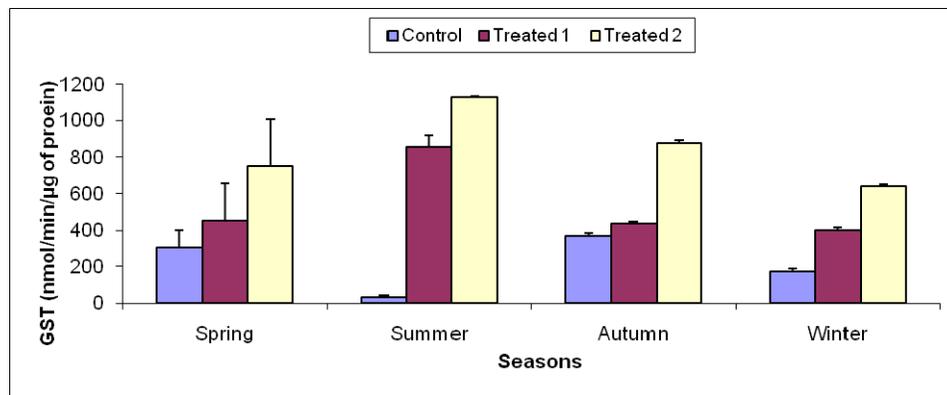
(\*\*\*)  $p = 0.001$  during the first purification and a highly significant difference (\* \*) has very highly significant for the second purification with a nonsignificant difference for the second purification in winter.

*3-2 Variation of activity GST on the level of the roots of Phragmites australis:*

The data obtained after proportioning of activity specific GST expressed in protein nmoles/min/µg measured to the level of the roots are gathered in figure 05. It is noticed that activity GST increases on the level of the first basin, this increase persists for the second basin and this result is recorded for the four seasons of study. This was confirmed by the study of variance has two controlled factors which shows a difference very highly significant (\*\*\*) between the activity of the GST on the level of the two basins of purification and the witnesses and this for the measurements taken in summer.



**Fig. 4:** Variations of the contents of GSH at the roots of *Phragmites australis* placed in worn water (E1, E2) and Control



**Fig. 5:** Variations of the contents of GST at the roots of *Phragmites australis* placed in worn water (E1, E2) and Control.

#### Discussion:

In this work we highlighted a strong presence of xenobiotic at the level of used water, like on the level of the roots of seedlings of *Phragmites australis* placed in worn metal mais water charged this pollution has tendency decreased after both purification.

According to Polprasert and khatiwada, [29] the elimination of the organic matter in the macrophyte basins is based on a symbiotic relation plant-bacteria, in which the bacteria use the oxygen provided to the medium by the plants during photosynthesis to degrade organic carbon.

It is what explains the reduction in this parameter after passage of water of Wadi through the two stages of purification planted of reeds.

This agrees with the results of [32,18] which show that *Phragmites australis* has sites in their zones racinaires which support the bacterial growth and thus allow the degradation of the organic matter and thus the reduction in the DBO<sub>5</sub>. Thus our results are in agreement with those of [23] which used planted filters of reeds for the dehydration of the liquid manure and confirmed a reduction in the DBO<sub>5</sub> after the stay of *Phragmites australis*.

The abatement of the DCO is obviously á the physical retention of the organic matter of the water used in the filters and the oxidation of this one by the microbial flora.

This result is probably related to the presence of the plants which create physico-chemical conditions favorable to the oxidation of the organic matter by the microbial flora. This one brings oxygen in the filter solid mass via the roots and the rhizomes [3]. According to Woodland and *et al.*, [39] the abatement observed on this parameter can be explained by the presence of the reeds which oxygenate the filter solid mass by the intermediary of the rhizomes.

Concerning eclectic conductivity, its reduction in the four seasons can be explained according to

Coulibaly and *et al.*, [6] by a salt retention in the filter solid mass. These salts can be retained by various physico-chemical and biochemical reactions (absorption, exchanges ionic, oxidation, neutralization).

Our results concerning the suspended matter, highlighted a reduction in these last after passage by the two stages of purification. This reduction can be explained by the maintenance of a shaded surface thanks to the emergent plants attenuating the growth of the algae thus and making it possible to maintain good outputs of removal for MIS (80 to 90%) [16].

According to Cooper [5] the systems with horizontal or vertical flow, offer very good outputs of removal as of MY which can vary from 90 to 95% when the filter medium is well chosen and that there is no short-circuiting. In general, the use of a sandy medium ensures a very good filtration, [22].

Concerning the biochemical parameters Our results show an increase in the protein rate in the roots of *Phragmites australis* this increase is significant on the level of E1 what shows a strong level of pollution waters used, on the other hand in E2 we highlighted a nonsignificant increase compared to the witnesses that confirms that the water of the second stage after passage by the first purification was filtered.

According to Zienk [40] the increase in the protein rate in the roots and the sheets of the reeds placed in a polluted water is due to the fact that on the cellular level of the reactions of detoxification take place thanks to the phytochélatines. This induces the formation of a complex protein / metal. The phytochélatines trap the xénobiotique one and / or metal in association with a group HS (sulfhydrile), it is formed a complex thiolate metal which becomes immediately inactive. This reaction makes metal inactive and allows its storage in vacuoles [28,38].

The other indicating element of an effect of stress at the plant is the increase in the rate of the proline. In our work, we highlighted a highly significant increase in the rate of proline at the roots

of the treated reeds. The proline can play a role osmoprotector [36], stabilizer of the proteins [33], inhibitor of metals [10] and inhibitor of the peroxidation [26]. This increase in the rate of proline can be explained according to Ober and sharp [27], by an effect of stress at the plant.

In order to highlight the intervention of the systems of detoxification, in the adaptation of the plant to the variations of the medium, in particular in the presence of pollutant, we followed the evolution of enzymes of detoxification (GSH, GST). This experiment highlighted an increase in the rate of GSH for the plants placed in polluted medium, this result agrees with those of Fabrizio and *et al.*, [10] as Grara [13] which showed an increase in the rate of glutathion at the time of a stress to Cadmium at the reeds *Phragmites australis* like those of Kamara and Pflugmacher [19], out of two species *Phragmites australis* and *Quercus suber* planted in polluted water. Concerning the rates of GST (glutathion S-transférase), our results translate a phenomenon of resistance to heavy metals, which suggests that this variability should be due partly to the degree according to which the organizations can detoxify these metals at the various stages of their vital cycle. In addition the reactions of metals with the glutathion are translated is by the formation of complexes [metal GSH] or by the oxidation of the GSH [30], According to the study of Christie and Costa [4] metals which involves the oxidation of the GSH are Cu, Co, the mn, Fe and Cr while the stable complexes with the GSH are formed by Zn, Cd, Hg, Pb and Ni, these two reactions could explain the reduction in the glutathion in the second basin of purification [15,35]. It appears however that xenobiotic what exists in worn water induces an answer different from the antioxydant system existing in the roots and the sheets of *Phragmites australis* This type of observation was already brought back at *Pisum sativum* [8], which showed that the sheets present mainly a stimulation of the enzymes of the antioxydant system.

## References

1. Bouffard, V., 2000. Milieux humides artificiels pour l'amélioration de l'efficacité de traitement des eaux usées domestiques d'une petite municipalité. *Mémoire du grade de maître ès sciences. Université de Sherbrook*. pp: 150.
2. Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-Dye Binding. *Analytical biochem* 72: 248-254.
3. Brix, H., 1994. Functions of macrophytes in constructed wetlands. *Wat. Sci. Tech*, 29: 71-78.
4. Christie, N.T., M. Costa, 1984. Disposition of metals in cells: interactions with membranes, glutathione, metallothioneins and DNA. *Biol. Trace Elem. Res.*, 6: 139-158.
5. Cooper, P.F., 1990a. European design and operations guidelines for reed bed treatment systems. *Papiers préparés pour conférence tenue à Cambridge en Angleterre.*, pp: 25.
6. Coulibaly, L., L. Savane, Gourene., 2008. domestic Wastewater treatment with a vertical completely drained pilot scale constructed wetland planted with *corchorus oliterius*. *Afr.J.Agricult.Re: sous presse*.
7. Dajoz, R., 1985. Précis d'écologie. *Edition Dunod*. p: 331.
8. Dixit, V., V. Pandey, R. Shyam, 2001. Differential responses to cadmium in roots leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad), *J. Exp. Bot.*, 52: 1101-1109.
9. Dreider, W., and M. Gauring, 1974. Deerin flus hoher salzkonzentrationent auf vershidene physiologische parameter von maiswurzeln wiss. Z. der HU. Berlin Nath. Naturwiss R., 23: 641-644.
10. Fabrizio, P., A. Maria, P.S. Pasqualini and A. Massacci, 2003. Interaction of Cadmium with Glutathione and Photosynthesis in Developing Leaves and Chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudell., pp: 133.
11. Farago, M.E., W.A. Mullen, 1979. Plantes with accumulate metals. Part IV. A possible copper – proline complex from the roots of *Armeria maritime* Tnorg chin- Acta., (32) L93-L94.
12. Genevieve, T., 2002. L'épuration industrielle ou groupée par lagunage. *Extrait du bulletin communal de Septembre*.
13. Grara, N., 2011. Evaluation de la toxicité de certains polluants industriels sur un animal bioaccumulateur (gastéropode *Helix aspersa*) : Cas des métaux. Thèse de Doctorat. université de Annaba, pp: 120.
14. Habig, W.H., M.J. Pabst, W.B. Jakoby, 1974. Glutathion S-Transferases. The First enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
15. Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge, 1985. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford-University Press, New York.
16. Hancock, J., R. Lakshime and H. Budd, 1991. Advanced wastewater treatment with lemna technology. *Lemna Corporation, Compte rendu de conference "Constructed wetlands for water quality improvement- An international symposium-Pensasla Floride*. 21.
17. Jodoin, Y., C. Lavoie, P. Villeneuve, M. Thériault, J. Beaulieu, & F. Belzile, 2008. Highways as corridors and habitats for the invasive common reed *Phragmites australis* in Quebec, Canada. *Journal of Applied Ecology*, 45: 459-466.

18. Kadlec, R.H., R.L. Knight, 1996. Treatment wetlands. CRC Press/Lewis Publishers, Boca raton, Florida, USA. pp: 893.
19. Kamara, S. and S. Pflugmacher, 2006. *Phragmites australis* and *Quercus robur* leaf extracts affect antioxidative system and photosynthesis of *Ceratophyllum demersum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 240-246.
20. Kengne, I.N.M., 2000. Evaluation d'une station de lagunage à macrophytes à Yaoundé : performances épuratoires, développement et biocontrôle des diptères Culicidae. Thèse doctorat 3e cycle, Fac Sci. UYI.
21. Kern, I. & C. Idler, 1999, Treatment of domestic and agricultural wastewater by reed bed systems. *Ecological Engineering*, 12: 13-25.
22. Kone, D., 2002. Epuration des eaux usées par lagunage à microphytes et à macrophytes en Afrique de l'ouest et du centre : état des lieux, performances épuratoires et critères de dimensionnement. *Thèse de doctorat. Fondation universitaire Luxembourgeoise, Arlon, Belgique, et de nationalité Ivoirienne*. pp: 170.
23. Levresseur, P., R. Janvier, I. Rorkin, 2000. *Techniporc*, 23(6) : 9-16.
24. Loggini and *et al.*, 1999 in M. Youbi, 2005. Effets de deux fongicides Artea et Punch nouvellement introduits en Algérie sur la physiologie et le métabolisme respiratoire du blé dur (*Triticum durum Desf*). Thèse de Magister de l'Université Badji Mokhtar de Annaba.
25. Mal, T.K. & L. Narine, 2004. The biology of Canadian weeds. 129. *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Canadian Journal of Plant Science*, 84: 365-396.
26. Mehta, S.K., J.P. Gaur, 1999. Heavy metal - induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chorella vulgaris*. *New phytol.*, (143): 253-259.
27. Ober, E.S. and R.E. Sharp, 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiol.*, 105: 981-987.
28. Ortiz, D.F., L. Kreppel, D.M. Spenser, G. Scheel, G. Mc, O.W. Donald and D.W., 1992. Heavy metals tolerance in the fission yeast *Saccharomyces cerevisiae* and ATP binding cassette- type vacuolar membrane transporter. *EMBO* 11: 3491-3499.
29. Polprasert, C., N.R. Khatiwada and J. Bhurtel, 1998. A model for organic matter removal in free water surface constructed wetlands. *Wat. Sci. Tech*, 38(1): 369-377.
30. Regoli, F., G. Principato, 1995. Glutathione, glutathione-dependant and antioxidant enzymes in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: implication for the biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31: 143-164.
31. Rodier, J., 1996. Analyse de l'eau naturelles, eaux résiduaires et eau de mer. *Edition Duno*. pp:1134.
32. Sankar, U., 2000. Economic analysis of environmental problems industries. UNDP. Report Chennai madras School of economics allied Publishers. New Delhi.
33. Shah, K., R.S. Dubey, 1998. Effect of Cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedling : role of proline as a possible enzyme protectant. *Biol plant*, (40): 121-130.
34. Silvestre, P., J. Gaber, S. Geai, 1997. Conception des dispositifs de traitement des eaux pluviales. L'eau et la route, volume 7. Ed. SETRA.
35. Stohs, S.J., D. Bagchi, 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.*, 18(2): 321-336.
36. Taylor, C.B., 1996. Proline and water deficit biosynthesis and osmoregulation in plant., (4): 215-223.
37. Troll, W.J. and J. Lindesley, 1955. A photometric for the determination proline. *J biochem* 215: 655-660.
38. Vogel-Lange R., G.J. Wagner, 1990. Subcellular localization of cadmium-binding peptides in tobacco leaves -plant. *Physiol.*, (92): 1082-1093.
39. Weckbecker, G., J.G. Cory, 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse *leukemia L 1210* cells in vitro. *Cancer letters*, 40: 257-264.
40. Zienk, N.H., 1996. Heavy metal detoxification in higher plant a review-gene., 179: 21-30.



Scholars Research Library

Annals of Biological Research, 2013, 4 (3):130-133  
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



## Phytoremediation using *Phragmites australis* roots of polluted water with metallic trace elements (MTE).

<sup>1</sup>Meriem Kleche, <sup>1</sup>Houria Berrebbah, <sup>1,2</sup>Nedjoud Grara, <sup>1</sup>Samira Bensoltane, <sup>2</sup>Mohamed Djekoun and <sup>1</sup>Mohamed-Reda Djebbar

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

<sup>2</sup>Department of Biology, University 8 May, 1945, Guelma, Algeria

---

### ABSTRACT

*This work aims the study of the ability of Phragmites australis roots to accumulate and transfer metals such as iron and zinc present in water filled with discharges from industrial sources. We are interested in the movement and distribution of these metals in the roots through a lagoon system designed for vertical flow in the laboratory through two trays where treatment plants Phragmites australis were planted. The results showed the presence of high concentrations of metals such as iron and zinc concentrates in the roots. After purification, the concentrations of these metals are highly decreased, confirming the effectiveness of the system.*

**Keywords:** *Phragmites australis*, pollution, metals, SEM-EDS, MTE.

---

### INTRODUCTION

Management of wastes in general and liquid wastes in particular manner constitutes today, a very alarming environmental question in developing countries. The majority of the African countries, shortly after their independence chose the traditional systems of purification of wastewater (activated sludge in particular) [1, 2] natural methods of wastewater treatment. This is macrophytes lagoon, technique in which the plants develop complex mechanisms to absorb the organic or mineral substances of water through their roots and their sheets, which are then transported in other parts of the plant to be used, transformed, degraded or stored [3].

The purpose of the present study is to estimate the purification performance of an installation of lagoon with macrophytes, (*Phragmites australis*) with vertical flow and this through the study of the capacities of roots to absorb/adsorb the metal particles present in wastewater. We were interested particularly in the industrial wastes of an iron and steel complex located in the area of Annaba (Northeastern Algerian) because of the presence of water strongly charged with metals.

Two techniques are used in the identification and the localization of metals: Scanning Electronic Microscopy observation (SEM) and analysis by X-rays (ICP: Inductively Coupled Plasma, OES: Optical Emission Spectrometry) of the fragments of isolated roots.

## MATERIALS AND METHODS

### Description of purification system

Our tests are performed with batch cultivation in identical containers of 40 liters. The experiment was performed with two tanks; the first tank is filled with a mixture of raw sewage not settled collected directly from the Oued carting industrial waste water. In which were planted reeds (*Phragmites australis*); the flow is vertical.

### Biological Material

In our work, we used a macrophyte known for its strong purifier: common reed (*Phragmites australis*) an invasive plant species [4]. The reed is probably one of the most common vascular plants in the world [5]. Once implanted in the tray, the plant root system develops in very important manner.

### Analysis of metals in the roots

Root samples were collected, weighed, and mineralized method of CIRAD (2004) [6]. This method of solution of minerals contained in plant material is intended for appropriate matrices poor in silica and the residue that, after passing the oven is very small. From roots, solutions dissolved heavy metals were determined ICP/OES [6].

### Analysis with the SEM (scanning electronic microscopy)

Roots were observed by scanning electronic microscopy to visualize the state of the roots and the distribution of different metals [7].

### Identification of metals by X-rays

The SEM observation is coupled to an Energy Dispersive Spectrophotometer (EDX system) which allows the analysis of X-rays emitted by the sample for the qualitative determination of metals [7].

## RESULTS

### Variations of the Iron rate and Zinc on the level of the roots

Tables (1) and (2) represent changes in the rate of iron and zinc in roots of *Phragmites australis*, before and after treatment E1 and E2. These results indicate that our water samples are heavily laden with heavy metals and especially iron, probably due to the release of the steel, it is the same for Zinc. We found an increase in the Iron and Zinc level through seasons. On the other hand we confirmed the decrease of about 50% of the content in both metals after the first and second treatment E1, E2 suggesting a high capacity for accumulation in the roots.

Table 01: Changes in levels of iron in the roots before and after treatment 1 and 2.

Seasons	Iron (mg/l)		
	Control	E1 (Roots)	E2 (Roots)
Spring	1,73	4,32	2,37
Summer	1,523	5,12	2,25
Autumn	0,979	8,55	4,45
Winter	1,231	7,228	3,112

Table 02: Changes in levels of zinc in the roots before and after treatment 1 and 2.

Seasons	Zinc (mg/l)		
	Control	E 1 (Roots)	E 2 (Roots)
Spring	0,039	0,989	0,733
Summer	0,032	0,591	0,37
Autumn	0,051	2,25	0,989
Winter	0,049	1,612	0,531

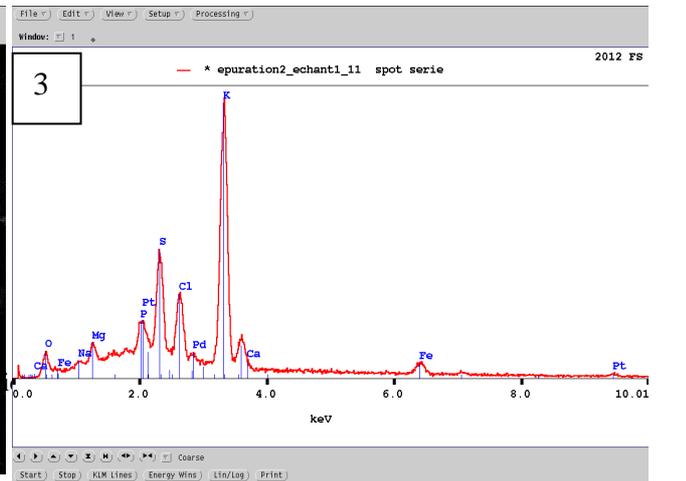
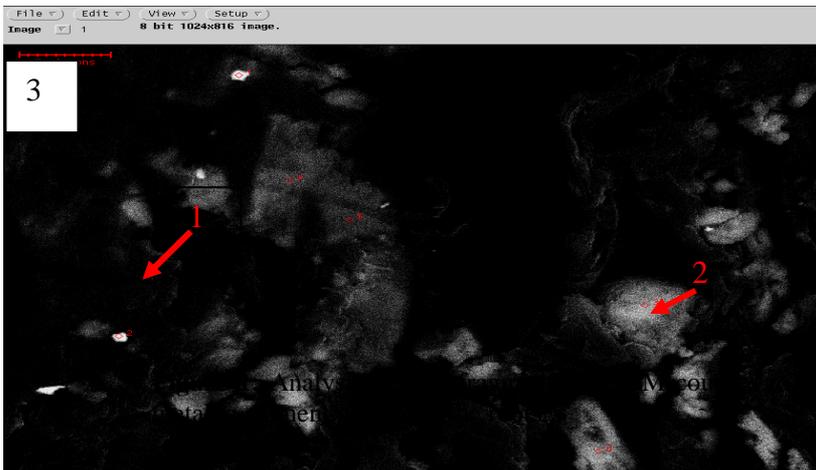
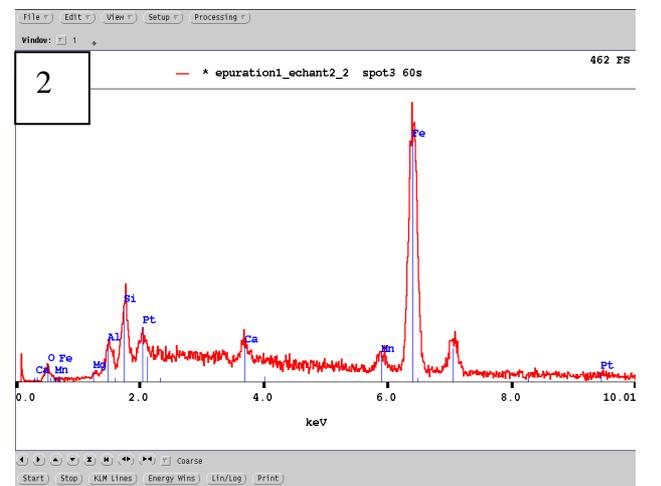
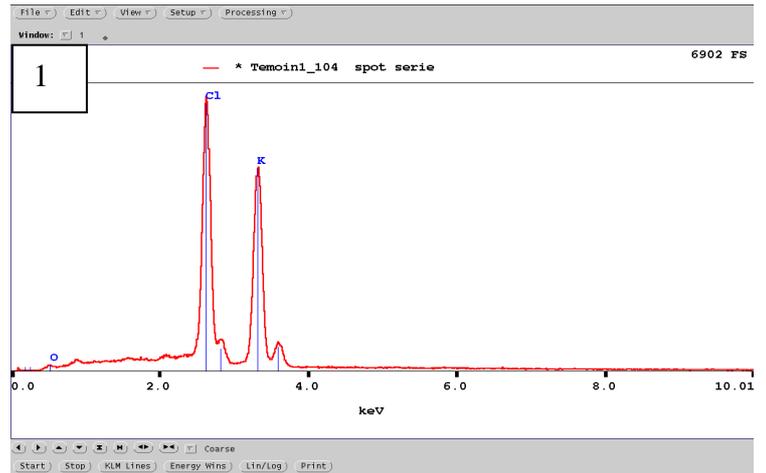
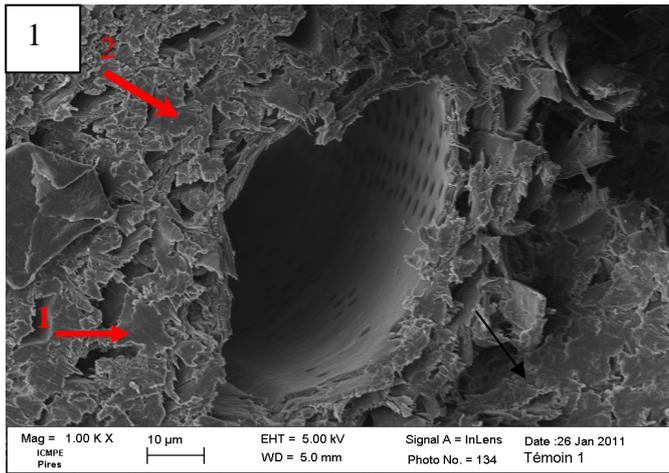
E1: purification 1; E2: purification 2.

### Scanning Electronic microscopy

Distribution of metals in the control roots (1) and treated (2), after E1 showed a high accumulation of metals in the epidermis of roots. Same observation after treatment (E2) (3) visible as a whitish deposits.

### Identification of the deposits by SEM-EDX

Spectra (2) and (3) confirm that the most abundant element is iron with high concentrations. However, even after the second treatment, the metal deposits persist. This result suggests the design of a third cleansing tank. On the other hand, the X-ray analysis reveals the presence of other metals from industrial sources such as aluminum or cadmium. In contrast, the peak corresponding to iron decreased significantly after the second treatment without disappearing completely.



**DISCUSSION**

In this work, we have demonstrated a strong presence of metals in the roots of plants *Phragmites australis* planted in hydroponic wastewater loaded with metals correlated with a significant decrease in water growth medium. According to Ye *et al.* (1997b) *Phragmites australis* has a high tolerance to zinc and iron, but also to Lead and Cadmium, which probably explains the strong presence of these elements in the roots. Indeed Piechalak *et al.* (2002) [8] showed that macrophytes were able to accumulate significant levels of heavy metals. After the second treatment (E2) metal concentration decreased, probably as explained [9] because of the exclusionary strategy adopted by tolerant species, it is to reduce the absorption of Iron and Zinc by roots and their transfer to the aerial parts [10].

On the other hand, [11] showed that Zn (being in the roots form complex Zn-histidine) is transported to the aerial parts mainly in cationic form free  $Zn^{2+}$  with a small proportion associated organic acids (mainly citrate) to be finally stored in the vacuoles of the leaf cells as a complex with citrate.

The observation by SEM showed the presence of iron-rich particles around the roots and a layer of aluminum silicate. Our results are in agreement with those of Bordeleau (1998) [12], which states that *Phragmites australis* with its roots assimilate metals and reduces their concentration in the medium, while Sevrin *et al.* (1995) explains the decrease in the rate of iron accumulation by microorganisms contained in sewage. However, according to Ortega-Villasante *et al.* (2007) [13, 14], the roots of reeds seem therefore increase their capacity for tolerance to both metals by complexing with glutathione in supporting ROS induced indirectly by their presence. Moreover, [15] Carranza-Alvarez *et al.* (2008) state that in the species *Phragmites australis*, There is a power metal accumulator higher in roots compared to stems. In addition, *P. australis* is generally known to accumulate some advantage MTE (Zn, Cu, Pb, and Cd) (Fediuc and Erdei, 2002) [16].

### CONCLUSION

*Phragmites australis* are known for their accumulator power, can response to the pollution in a sensitive and effective manner, hence the importance of their use in phytoremediation. Our results showed that the use of a vertical flow constructed wetland where phytopurification by macrophytes would reduce the pollution of wastewater particularly those charged in metals.

Our results also revealed strong purifying/accumulator power of *Phragmites australis* roots, particularly for trace elements. This hyper accumulation is probably the cause of their high tolerance to high levels of pollution.

### Acknowledgments

The authors are grateful to Professor Gregory Lefèvre doctor at the laboratory of Electrochemistry, chemistry of the Interfaces and Modelisation for Energy, National School of Chemistry, Paris.

### REFERENCES

- [1] P.L. Agendia, PhD thesis , U.Y.I.,**1995**.
- [2] I.N.M. Kengne , PhD thesis ,UYI, **2000**.
- [3] S.D Cunningham, W.R.Berti, J.W.Huang, *Trends Biotechnol.*,**1995**, 13, 393–397.
- [4] Y.Jodoin, C .Lavoie., P.Villeneuve, M .Theriault., J.Beaulieu & F .Belzile , *Journal of Applied Ecology* .,**2008**, 45, 459-466.
- [5] T.K. Mal and L.Narine, *Canadian Journal of Plant Science.*, **2004**,84,365-396.
- [6] CIRAD.,**2004**. Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement. Analyse des végétaux, laboratoire d'analyse, département PERSYST, 7pages.
- [7] S.Delaunay, PhD thesis ,Université pierre et marie curie.Paris ,France ., **2010**.
- [8] Z.H.Ye, A.J.M.Baker, M.H., A.J.Wong Willis, *New Phytologist*, **1997b**, 136, 469–480.
- [9] A.Piechalak, B.Tomaszewska, D.Baralkiewicz, A.Malecka, *Phytochemistry* .,**2002**,60 ,153-162.
- [10] A. J. M .Baker and P. L.Walker, *Boca Raton.*, **1990**, 155-178.
- [11] D. E.Salt, R. C.Prince, A. J. M.Baker, I.Raskin, and I. J.Pickering,*Environ. Sci. Technol.***1999**., 33,713-717.
- [12] J.Bordeleau, Séminaire de génie agro-alimentaire, Université Laval, **1998**.
- [13] J.Sevrin-Rayssac, J.De la Noüe, D.Proulx, *Tec et Doc Lavoisier.*, **1995**,18.
- [14] Ortega-Villasante C., Hernandez LE., Rellan-Alvarez R., Del Campo FF., Carpena- Ruizro., *New Phytologist.*, **2007**, 176 ,96-107.
- [15] C.Carranza-Alvarez, A.J.Alonso-Castro, M.C.Alfaro-De La Torre, R.F.Garcia-De La Cru, *Water Air Soil Pollut.*, **2008**,188, 297-309.
- [16] E.Fediuc, L.Erdei, *J. Plant. Physiol.***2002**, 71,159:265.