



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



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE: Sciences

DEPARTEMENT : Biologie

MEMOIRE DE MASTER

Présentées par : HAMDI Bouchra Manal et REZZOUG Asma

DOMAINE : Science de la Nature et de la Vie

FILIERE : Biologie

OPTION : Microbiologie Infectieuse et Environnementale

Thème

**Isolement et identification des bactéries à partir d'un
site contaminé par les dérivées pétroliers et l'étude
de la biodégradation**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
M. GHERMAOUI Mohamed	Maitre Assistant Classe A	Président
M. SIFI Ibrahim	Maitre Assistant Classe A	Examineur
M. GOUZI Hicham	Maitre de Conférences Classe A	Rapporteur
M. CHAIBI Rachid	Maitre de Conférences Classe B	Co-rapporteur

Promotion Juin 2015

Remerciements

On aimerait, avant tout propos, exprimer notre reconnaissance à l'Eternel mon ALLAH pour ce que suis car aucune vraie réussite n'est possible sans ALLAH. Qu'il me soit permis de lui rendre témoignage pour les merveilles qu'il ne cesse d'accomplir dans ma vie.

Avant d'entamer la présentation de ce travail, nous profite de l'occasion pour remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements pour vos respectueux, enseignant, Monsieur GOUZI Hicham, d'avoir accepté nos encadrer pour notre projet de fin d'études, ainsi que son soutien, ses remarques pertinentes et son encouragement.

Nos remerciements vont aussi à tous nos professeurs de département de Biologie et à tous les personnels de laboratoire biologique, Amar Thledji-Laghout, de leurs générosités ainsi leurs soutiens nous obligent de leurs témoigner notre profond respect et notre royale. À notre cher enseignant, le chef département CHAIBI Rachid, qui nous soutenions jusqu'au bout, et qui nous cessée de nous donner des conseils très importants en signe de reconnaissance. En aucun doute, nos vifs remerciements et nos respectueuses et cordiales salutations vont en réciprocité à l'ensemble des personnels travaillants au laboratoire central de l'hôpital, particulièrement, Madame RANANE.A et MILODI .K pour leurs aides à la réalisation de ce présent travail.

Nous adressons à toutes personnes travaillent au niveau de laboratoire vétérinaire, surtout, Madame KHACHBA. Fatna.

Nous ne pourrais pas oublier les membres du jury que nous les remercier infiniment afin de prendre la peine à lire et à corriger notre mémoire.

Enfin un grand merci à tous nos camarades de Master de la promotion 2014-2015.

Dédicaces

Que ce travail témoigne de mes respects :

A mes parents :

Grace à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux .en signe de reconnaissance de l'immense bien que vous avez fait pour moi concernant mon éducation qui aboutit aujourd'hui à la réalisation de cette étude.

Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi, ce travail constitue le fruit de leurs interminables conseils ; assistance et soutien moral.

Ames sœurs (Siham, Fatima, Hanane) et à ***mes frères*** (kaddour, Amine, Ahmed, Hamza).

A mes amies intimes :

Asma, Fréha, Amira, Nour reçoivent à travers ce travail tout mon respect, ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

A mes ennemis,...un grand merci, grâce à vous, ma foi en dieu a grandi.

Ames nièces et mes neveux,

Ce modeste travail doit vous servir d'exemple pour réussir et faire mieux que votre tante ; je vous aime tous.

HAMDI Bouchra Manal

Dédicaces

Ma vie, c'est une pièce de théâtre.

Dés lors, je dédie ce modeste travail :

A celui qui l'a créé, ALLAH, le tout puissant, le miséricordieux.

Aux deux metteurs en scène de cette pièce :

Papa, mon exemple éternel, mon soutien moral.

Maman, la lumière de mes jours, une femme parfaite, toujours prête à se sacrifier pour mon bonheur.

A l'héros de cette pièce, mon fiancé, source de ma joie et d'espoir.

Aux Alliés :

Mes sœurs, j'ai trouvé en vous le réconfort dans mes plus durs moments.

A mes deux meilleures amies, Bouchra Manal, Amira, Fraiha et Nour vous étiez mon refuge pour mes plus fous délires.

A mes tantes maternelles et paternelles.

A mes ennemis,...un grand merci, grâce à vous, ma foi en dieu a grandi.

Grace à vous, MA PIECE DE THEATRE, est un succès.

REZZOUG Asma

Liste d'abréviation

4-NP : 4-nitrophénol.
ADH : Arginine Dihydrolase.
AMC : Amoxiline.
AMX : Amoxicillin + Clavulanic Acid.
API : Appareillage de Procédé d'Identification.
BN : Bouillon Nutritif.
BTEX : Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylènes.
CAZ : Ceftazidime.
CIT : Citrate perméase.
Col : Colistine.
DO : Densité optique.
E : Erythromycine.
ENR : Enrofloxacin.
GM : Gentamicine.
GN : Gélose Nutritive.
HAP : Hydrocarbures Aromatique Polycyclique.
ISO : Organisation internationale de normalisation.
LDC : Lysine Décarboxylase.
MH : Muller Hinton.
MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris).
N : Neomycine.
ODC : Ornithine Décarboxylase.
ONPG : Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside.
OXC : Oxacycline.
PEN : Pénicilline.
PNP : *p*-nitrophénol.
RPM : Rotation Par Minute.
SP : Spiramycine.
SPN : Spectinomycine.
SSS 200 : Sulfonamide.
SXT : Trimethoprim + Sulfamethoxazole.
TCA : Acide tri-carboxylique.

TDA : Tryptophane Désaminase.

TET : Tétracycline.

TSI : Triple Sugar Iron.

UFC : Unités Formants Colonies.

VAN : Vancomycine.

VP : Voges-Proskauer.

Liste des figures

Figure 01 : Schéma représente la structure chimique de phénol.....	9
Figure 02: Structure chimique du cyclohexane.....	10
Figure 03: Structure chimique du 4-nitrophénol.....	11
Figure 04: Mise en évidence des phénomènes d'adaptation dans les sols.....	14
Figure 05 : Métabolisme général d'un substrat organique.....	16
Figure 06: Le principe essentiel de la biodégradation aérobie des hydrocarbures.....	17
Figure 07 : La biodégradation de phénol par <i>Pseudomonas putida</i> en condition aérobie.....	18
Figure 08: Localisation de site des prélèvements.....	19
Figure 09 : Aspect des échantillons des sols	20
Figure 10 : Schéma d'isolement par la technique des dilutions	21
Figure 11 : Technique des stries	22
Figure 12 : Réaction d'hydrolyse de l'ONPG	25
Figure 13 : La souche de référence ATCC 27853 sur milieu solide.....	29
Figure 14 : La production de la biomasse dans le BN	32
Figure 15: Aspect microscopique (a) et macroscopique (b) des souches isolées.....	36
Figure 16: Aspect culturaux des souches bactériennes S4, S8 et S11 sur milieu Chapman et MacConkey	38
Figure 17: Résultat de l'antibiogramme sur la souche 4 (S4)	38
Figure 18: Résultat de l'antibiogramme sur la souche 8 (S8)	39
Figure 19: Résultat de l'antibiogramme sur la souche 11 (S11)	39
Figure 20 : Distribution des souches en fonction de chaque échantillon	41
Figure 21: Adaptation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans un bouillon nutritif + phénol	42
Figure 22: Dosage colorimétrique de phénol	42
Figure 23: Culture sur milieu gélosé de phénol de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Figure 24: Culture à partir de milieu qui contient le 4-nitrophénol (à gauche) et la culture à partir de milieu sans 4-nitrophénol (à droite)	44
Figure 25: Culture de <i>Pseudomonas</i> sur milieu solide de cyclohexane (à gauche) et leur repiquage sur milieu MH (à droite)	44
Figure 26 : Résultat de la cinétique de dégradation du phénol à 100 mg/L par <i>Bacillus</i> sp. À 37°C et à pH 7.0. (A) variation de la biomasse au cours du temps ; (B) variation du phénol résiduel en fonction du temps	45

Liste des tableaux

Tableau 01 : Représentation des différents types de composition polaire avec des exemples.....	4
Tableau 02 : Regroupements des polluants prioritaires.....	6
Tableau 03 : La toxicité des HAP.....	8
Tableau 04 : Les caractéristiques des échantillons des sols prélevés	20
Tableau 05 : Aspect macroscopique des colonies isolées	35
Tableau 06 : Résultats des tests biochimiques des souches bactériennes	37
Tableau 07: nombre des colonies par dilutions décimales de chaque échantillon (Annexe 02)	
Tableau 08: Aspect microscopique des souches isolées (Annexe 02)	
Tableau 09 : La mesure des zones d'inhibition de l'antibio-résistance (mm) (Annexe 02)	

Sommaire

Liste d'abréviations	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	IV
Introduction générale.....	1

Partie I : synthèse bibliographique

1. Hydrocarbures.....	3
1.1 Définition.....	3
1.2 Classification	3
1.2.1 Les hydrocarbures saturés	3
1.2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	3
1.2.3 Composés polaires	4
1.2.4 Asphaltènes	5
2. Impact des hydrocarbures sur l'environnement.....	5
2.1 La pollution des sols.....	5
2.2 Toxicité.....	6
2.3 Types de polluants.....	9
2.3.1 Le phénol.....	9
2.3.2 Le cyclohexane.....	10
2.3.3 Le para-nitrophénol.....	11
3. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement.....	13
3.1 Le processus de transformation.....	13
3.2 Le processus biotique.....	13
3.2.1 Bioremédiation.....	13
3.2.2 Types de bioremédiation.....	14
3.2.3 Facteurs influençant la biodégradation	14
3.2 La biodégradation des hydrocarbures	15
3.2.1 En condition anaérobie.....	16
3.2.2 En condition aérobie.....	16

Parti II : Matériels et Méthodes

1. Matériels	19
1.1 Site du prélèvement du sol	19
1.2 Méthode d'échantillonnage	19

2. Méthodes	20
2.1 État de sol	20
2.2 Analyse microbiologique	20
2.2.1 Préparation des dilutions et mise en culture	20
2.2.2 Dénombrement	21
2.3 Isolement et purification des souches bactériennes	22
2.4 Identification	23
2.4.1 Etude morphologique	23
2.4.4.1 Aspect macroscopique	23
2.4.4.2 Aspect microscopique	23
2.4.2 Analyse biochimique	24
2.4.2.1 Etude des enzymes respiratoires	24
2.4.2.2 Métabolisme des glucides	25
2.4.2.3 Métabolisme des acides-aminée	27
2.4.3 Isolement sur des milieux sélectifs	28
2.4.4 L'antibiogramme	29
2.4.5 Identification par la galerie API 20E	30
2.5 La biodégradation	31
2.5.1 Etude de la biodégradation du phénol	31
2.5.1.1 Adaptation des souches et la production de la biomasse	31
2.5.1.2 La culture minérale	32
2.5.1.3 Culture sur milieu solide	33
2.5.1.4 Etude cinétique de la dégradation du phénol par Bacillus sp ...	33
2.5.2 Biodégradation de 4-Nitrophénol	33
2.5.4 Biodégradation du cyclohexane	33

Partie III : Résultats et discussion

1. Evaluation et étude de la flore microbienne	35
1.1 Estimation de la flore microbienne totale (étude quantitative)	35
1.2 Etude qualitative de la flore microbienne	35
1.2.1 Aspect macroscopique des colonies isolées	35
1.2.2 Aspect microscopique des souches isolées	35
1.3 Analyses biochimique	37
1.4 Croissance sur les milieux sélectifs	38

1.5 L'antibiogramme	38
1.6 Identification des souches isolées	39
1.6.1 La souche S4	39
1.6.2 La souche S8	40
1.6.3 La souche S11	40
1.7 Répartition des souches bactérienne dans le sol	41
2. La biodégradation	41
2.1 Le phénol	41
2.2 Le 4-Nitrophénol	43
2.3 Le cyclohexane	44
2.4 Etude cinétique de dégradation du phénol par <i>Bacillus</i> sp	45
Conclusion	46
Références bibliographiques	
Annexe 01	
Annexe 02	
Résumé	

Introduction générale

L'effet de la pollution sur les différents compartiments environnementaux de la biosphère (sol, eau, air) constitue aujourd'hui un thème d'actualité touchant les domaines sociaux.

Le sol constitue un objet favorable de nombreuses menaces et nous constatons en effet une augmentation de la teneur en polluants de nombreux sols (Perfumo et al., 2010). La pollution des sols est principalement issue d'une extraction, transformation et utilisation des produits pétroliers dans des différents domaines (industrielle, pharmaceutique, agroalimentaire.. etc).

Les polluants organiques ont des caractéristiques physico-chimiques (volatilité, solubilité ... etc.) qui leur confèrent un caractère de danger pour les organismes vivants. Ils entrent dans la chaîne alimentaire, et même menacent la santé humaine (Gabet, 2004) en raison de leur propriété mutagène et cancérogène (Juhasz et Naidu, 2000 ; Baird et al., 2005). En revanche ces altérations ne font qu'augmenter l'adaptation de certains genres bactériens via l'expression de gènes d'intérêt, leur permettant d'utiliser ces composés comme sources de carbone et d'énergie, tandis que d'autres deviennent incapables de survivre (Heinaru et al., 1999).

Pour neutraliser ces polluants, une technique très prometteuse et efficace qui est simple et peu coûteuse se reflète dans leur traitement biologique. Cette méthode d'élimination qui est la biodégradation consiste à utiliser des microorganismes qui ont la capacité de dégrader le polluant et donc de le métaboliser en substances non toxiques grâce à des réactions biochimiques. Plusieurs travaux ont montré que les bactéries isolées du sol *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus lentus*, *Ralstonia* ...etc sont capables de dégrader plusieurs types de polluants organiques avec une certaine variabilité de préférence (Heinaru et al., 1999 ; Sahar zaki, 2006 ; Daffri et al., 2014 ; Opere et al., 2013). La plupart de ces bactéries ont été isolées pour la plus part à partir du sol contaminés par le pétrole, des eaux usées et des effluents industriels pharmaceutiques.

D'après nos connaissances aucune étude portant sur la flore bactérienne du sol contaminé par les dérivés du pétrole (gasoil, essence, huile minérale....etc). Pour cela, nous nous sommes intéressés dans un premier temps d'isoler et d'identifier quelques souches bactériennes présentes au niveau du sol prélevé auprès d'une station de service de la Wilaya de Laghouat et de réaliser ensuite des tests de capacité de dégradation de quelques polluants organiques (phénols et dérivés).

Ce manuscrit a été organisé en différentes parties décrivant les étapes successives de cette étude.

La première partie présente un rappel bibliographique aussi précis que possible sur les hydrocarbures, leur impact sur l'environnement ainsi que leur devenir.

Dans la deuxième partie, nous décrirons les procédures expérimentales mises en jeu dans cette étude.

La troisième partie est consacrée à une discussion des résultats expérimentaux obtenus de l'isolement, l'identification des bactéries du sol contaminé et des tests de dégradation des polluants choisis.

Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la dégradation des polluants par les bactéries du sol, sont regroupées dans la dernière partie.

Partie I :

Synthèse bibliographique

1. Hydrocarbures

1.1 Définition

Les hydrocarbures sont des composés organiques contenant exclusivement des atomes de carbones « C » et d'hydrogène « H ». Qui peuvent être acycliques (aliphatiques) à chaîne ouverte ou cycliques à chaîne fermée ; saturés ou non (Heider et *al.*, 1999).

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, peut être classés en quatre familles principales variables selon leur origine : les hydrocarbures saturés, les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques, les composés polaires et les asphaltènes (Lefebvre, 1978).

1.2 Classification

1.2.1 Les hydrocarbures saturés

Alcanes linéaires (n-alcanes, C_nH_{2n+2})

Dont la longueur de chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) (Soltani, 2004 ; Seo et *al.*, 2009).

Alcanes ramifiés

Les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2). Es autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoides (Seo et *al.*, 2009 ; Soltani, 2004).

Cycloalcanes

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués (Seo et *al.*, 2009).cette famille peut représenter 30 à 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (Soltani, 2004).

1.2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés chimiques constitués de plusieurs cycles aromatiques juxtaposés plus ou moins substitués (Costes et *al.*, 1997 ; Soltani, 2004).

Ces molécules sont issues de la décomposition de la matière organique à des températures très élevées, de l'ordre de 1000°C, lors de phénomènes de combustions incomplètes (Leoz-garziandia, 2000).A l'état pur les HAP sont solides souvent colorés et cristallins à température ambiante (Gabet, 2004).

Selon leur nombre de cycles et donc leur poids moléculaire, les HAP sont présents dans l'atmosphère sous deux formes, gazeuse pour les plus légers dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180 g.mol⁻¹ (entre deux et quatre cycles), et particulaire pour les plus

lourds dont les masses molaires varient de 200 à 280 g.mol⁻¹(de quatre cycles et plus) (Seo et *al.*, 2009 ; Gabet, 2004).ce sont des composés neutres et non polaires (Gabet, 2004).

Les HAP présentent un caractère génotoxique élevé, seize d'entre eux ont été classés par l'EPA (*American Environmental Protection Agency*) comme polluants fortement toxiques.

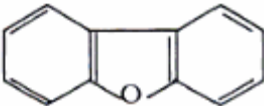
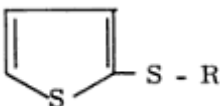
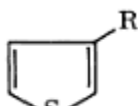
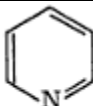
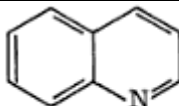
Les HAP sont très stables, peu volatils et hydrophobes. A l'état pur, les HAP sont des solides souvent colorés et cristallins à température ambiante. Leurs propriétés physico-chimiques varient avec la masse molaire et leur structure.les HAP ont un point de fusion supérieur à 100°C et un point d'ébullition élevé (supérieur à 300°C). Ce sont des composés neutres et non polaires (Samanta et *al.*, 2002).

Les HAP sont moins abondant que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (Soltani, 2004).

1.2.3 Composés polaires

Le Tableau (1) regroupe les composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques (Lefebvre, 1978).

Tableau 1 : Représentation des différents types de composition polaire avec des exemples.

Les composés polaires	Exemples
-des composés oxygénés : phénols, alcools, aldéhydes,... (Soltani, 2004 ; Lefebvre, 1978).	Dibenzofuranne. Source : (Lefebvre, 1978). 
- des composés soufrés (dans la plupart des cas plus abondants): mercaptans, sulfures, disulfure,... (Soltani, 2004 ; Lefebvre, 1978).	Sulfures de thiophényle Des alkylthiophènes   Source : (Lefebvre, 1978).
- des composés azotés : pyridines, quinoléines,... (Soltani, 2004 ; Lefebvre, 1978).	 Pyridine  Quinoléine Source : (Lefebvre, 1978).

1.2.4 Asphaltènes

Correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, non volatiles. Les asphaltes constituent un ensemble de produits qui sont précipités au cours de l'opération technique de désasphaltage aux solvants insolubles dans le pentane ou l'hexane (Lefebvre, 1978 ; Soltani, 2004).

2. Impact des hydrocarbures sur l'environnement

2.1 La pollution des sols

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel (dégradation, altération) qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine (Françoise, 2010).

La notion de la pollution est toute relative. On peut considérer qu'il y a pollution par les hydrocarbures lorsque l'action de ceux-ci peut être considérée comme néfaste aux conditions de vie et affecte toutes une population (Homme, animales et végétales) directement ou indirectement (Bertrand et *al.*, 1989 ; Bocard, 2006). L'ADEME (Agence pour le Développement et la Maîtrise de l'Energie) définit un site pollué comme étant : « Un site sur lequel une pollution d'origine industrielle du sol ou du sous sol est susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou pour l'environnement ».

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans les chaînes alimentaires. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (OMS, 2000 ; Gabet, 2004).

Le **Tableau 2.**Regroupements des polluants prioritaires (Agteren et *al.*, 1998) :

Acénaphthalène	Chlorofluorocarbones	Fluorène
Acénaphthylènes	Chlorométhanés	Formaldéhyde
Acroléine	Chloronaphthalènes	Hexachlorobutadiène
Acrylonitrile	Chloronitroanilines	Hexachlorocyclohexane
Anthracene	Chloronitrobenzènes	Hydrazine
Benzène	Chloronitotoluenes	Indéno [1.2.3-cd] pyrène
Benzidine	Chlorophénols	Isopropylbenzène
Benzo[a]pyrène	Chloropropanes	Le bromure de méthyle
Benz[a]anthracène	Chloropropènes	L'huile minérale
Benz[b]fluoranthène	Chlorotoluènes	Naphtalène
Benz[g,h,i]pyrène	Chlorotoluidines	Phénanthrène
Benz[k]fluoranthène	Chrysène	Phénol
Biphényle	Dibenz [a, h] anthracène	Phtalates
Bis (2-chloroisopropyle) éther	1.2-Dibromethane	Biphényles polychlorés
l'acide chloracétique	1,3-Dichloro-2-propanol	Dioxines polychlorés
Chloroanilines	Diethylamine	Polychloroterphényles
Chlorobenzènes	Diméthylamine	L'oxyde de propylène
Chlorobenzidines	Epichlorhydrine	Pyrène
2-Chloro-1,3-butadiène	Ethane	Styrène
Chloroéthanés	Ethylbenzène	Toluène
2-Chloroéthanol	L'oxyde d'éthylène	Trichloroacétaldéhyde
Chloroéthènes	Fluoranthène	Xylènes

Les risques que font courir les pollutions du milieu souterrain par les hydrocarbures concernent en premier la qualité des eaux souterraines, les rendant impropres pour certaines utilisations (eau potable en particulier) (Scriban, 1999 ; Bocard, 2006).

2.2 Toxicité

Les hydrocarbures présentent des risques toxicologiques, mutagènes voire même cancérigènes pour de nombreux organismes. Les HAP se trouvent dans l'environnement à des doses faible, mais leur caractère hydrophobe entraine leur bioconcentration dans la chaine alimentaire (Jukazs et Naidu, 2000 ; Baird et *al.*, 2005).

Le phénomène de toxicité à moyen terme dus aux propriétés chimique des composés, apparaissent lorsque les animaux absorbent des quantités importantes de produits, des effets toxiques qui affectent les organismes au niveau de leur croissance et de leur reproduction peuvent être provoqués par des expositions à plus long terme avec de faible concentration.

Dans l'eau, l'impact sur la vie aquatique dépend de la toxicité liée à la composition chimique et des capacités de résistance des espèces biologique.

Sur le sol, la végétation se montre en général plus sensible aux produits raffinés et elle s'accommode assez bien de la présence persistante de résidus solides (boulettes de pétrole) dans le sol (Picot et *al.*, 2013).

La toxicité des HAP varie en fonction de la molécule considérée, du type d'exposition (aigue ou chronique), de l'organisme et des cellules cibles ainsi que des conditions environnementales (Fent, 2003). Trois mécanismes généraux ont été décrits : la narcose nonpolaire (ou toxicité de base) (Saiz et *al.*, 2009; Sverdrup et *al.*, 2002), l'activation biochimique (Fent, 2004; Lundstedt et *al.*, 2007) et la toxicité photo-induite (photoactivation par les UV) (Botta et *al.*, 2009; Teranishi et *al.*, 2010). La narcose non polaire résulte de l'absorption cutanée et/ou de l'ingestion de HAP provenant de l'eau interstitielle des sols et leur partage dans les lipides corporels ; elle constitue l'un des principaux modes de toxicité des HAP pour les invertébrés dans le sol directement exposés aux contaminants (Sverdrup et *al.*, 2002). Les deux autres mécanismes (activation biochimique et toxicité photo-induite), sont impliqués dans la majorité des effets toxiques (génotoxicité, mutagénicité, cancérogénicité, tératogénicité, immunotoxicité perturbation du système endocrinien) (**Tableau 3**) (Kanaly et Harayama, 2010). En effet, les HAP, molécules relativement simples et chimiquement stables, doivent souvent subir une activation biologique (métabolisation par des enzymes de détoxification cellulaire) ou physico-chimique (photooxydation) pour être transformés en métabolites réactifs. Ils acquièrent alors des propriétés électrophiles et peuvent exercer une toxicité directe sur les biomolécules (Miller et Ramos, 2001).

Tableau 3 : La toxicité des HAP (Kanaly et Harayama, 2010).

Toxicité des HAP				
HAP	Toxicité	Cancérogénèse	Mutagenèse	Rapporté dans
Naphtalène	Modérée	Non confirmée		EPA-TSCA
Acénaphthène	Modérée		Constatée	EPA-TSCA
Acénaphtylène	Modérée		Constatée	EPA-TSCA
Fluorène	Faible		Constatée	EPA-TSCA, IARC
Phénanthrène	Modérée		Constatée	EPA-TSCA, IARC
Anthracène	Modérée		Constatée	EPA-TSCA, IARC
Fluoranthène	Modérée	Non confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC
Pyrène	Modérée	Non confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC
Benzo(e)pyrène		Non confirmée	Constatée *	IARC
Benzo(g,h,i)perylène		Non confirmée	Constatée	IARC
Benzo(a)anthracène	Elevée	Confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC
Chrysène		Confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC
Benzo(b)fluoranthène		Confirmée	Constatée	IARC
Benzo(k)fluoranthène		Confirmée	Constatée	IARC
Benzo(a)pyrène	Elevée	Confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC
Indeno(1,2,3-cd)pyrène		Confirmée	Constatée	EPA-TSCA, IARC
Dibenzo(a,h)anthracène	Elevée	Confirmée	Constatée *	EPA-TSCA, IARC

(*) Mutagène pour l'homme

IARC : Centre International de Recherche sur le Cancer

EPA-TSCA: Environmental Protection Agency-Toxic Substances Control Act.

2.3 Types de polluants

Les groupes de composés pétroliers polluants pour lesquelles la bio-dépollution est possible sont : Les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fuels, kérosène, huiles minérales). Les déchets d'exploitation du pétrole (boues et résidus d'huiles de forages) (Bertrand *et al.*, 1972).

Ils existent d'autres polluants organiques, qu'ils ont un impact sur l'environnement, tels que : le phénol, le cyclohexane, le para-nitrophénol.

2.3.1 Le phénol

Le phénol le dérivé mono-hydroxylé du benzène (C_6H_5OH ou C_6H_6O) (**Figure 2**). Est un produit dangereux pour tous les organismes vivants, il est facilement absorbé par toutes les voies d'exposition a un large spectre d'action.

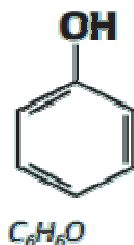


Figure 1 : Schéma représente la structure chimique de phénol (Bonnard *et al.*, 2011).

➤ Utilisation :

Mais aussi est largement employé dans l'industrie, on le rencontre dans :

- L'industrie des matières plastiques.
- L'industrie des fibres synthétiques.
- L'industrie pétrolière.
- L'industrie pharmaceutique.
- L'industrie des détergents.
- L'industrie des pesticides.
- L'industrie des colorants et des additifs pour huiles.

➤ Toxicité :

Plusieurs expérimentations appliquées sur des animaux confirment la toxicité de phénol. Il est absorbé facilement par ingestion, par inhalation ou à travers la peau, le phénol est éliminé rapidement, essentiellement dans l'urine sous forme de dérivé sulfo-conjugué ou glucurono-conjugué.

Le phénol par voie orale et cutanée (selon la concentration), irritant pour le tractus respiratoire et corrosif pour la peau c'est la toxicité aigue. Une exposition prolongé au phénol induit des effets d'intensité variable selon l'espèce, en particulier sur le système nerveux central, le cœur, le foie et les reins appelé aussi la toxicité sub-chronique et chronique. Mais aussi il a un effet génotoxique in vitro provoquent une mutation pour les cellules de mammifère ; in vivo, il augmente légèrement le taux de micronoyau dans les érythrocytes, à des doses toxiques uniquement. Et aussi effets cancérogènes.

Pour leur toxicité sur l'homme est caractérisé par :

- Pour les intoxications aigue professionnelles sont rares et interviennent essentiellement par voie cutanée, la faible volatilité du phénol limitant les risques d'inhalation de concentrations importantes ;
- Pour la toxicité chronique se caractérise par des troubles digestifs, nerveux et cutanés ;
- L'effet cancérogène : une étude de mortalité chez des salariés employés dans des industries produisant du phénol ne montre pas d'augmentation statistiquement significative de cancers.
- L'effet sur la reproduction : aucune donnée humaine n'a été publiée (Bonnard et *al.*, 2011).

2.3.2 Le cyclohexane

Le cyclohexane (C_6H_{12}) (**Figure 3**) est un liquide incolore et mobile, d'odeur acre, volatil, insoluble, stable dans les conditions normales d'utilisation, très inflammable (Vollhardt et *al.*, 2004).



Figure 2: Structure chimique du cyclohexane (Francis et *al.*, 2000).

➤ Utilisation

Le cyclohexane est utilisé principalement comme

- matière première dans l'industrie chimique.
- La fabrication du nylon (matière de base).
- Dans les peintures et encres d'imprimerie.
- Dans les industries pharmaceutiques.

➤ Toxicité

Le cyclohexane présente une toxicité modérée qui se manifeste à des doses assez élevée, ne présent pas ni un profil génotoxique et ni une toxicité aiguë (Bonnad *et al.*, 2010).

2.3.3 Le para-nitrophénol

Le 4-Nitrophénol (4-NP) aussi appelé *p*-nitrophénol (p-NP) est un composé phénolique ($C_6H_5NO_3$) qui comporte un groupe nitro à l'opposé du groupe hydroxyle sur le cycle benzylique. Sa formule moléculaire est dans la (**Figure 4**). Nitrophénol est un solide très stable d'odeur caractéristique. Il apparait sous forme de cristaux jaunes pâles (Salehi *et al.*, 2011).

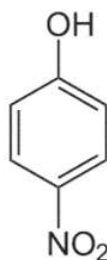


Figure 3: Structure chimique du 4-nitrophénol (Salehi *et al.*, 2011).

- Utilisation

Le 4-NP rentre dans :

- la fabrication des teintures ; des herbicides, fongicides, insecticides, matières explosives.
- d'indicateur et de matière première pour les pesticides ;
- Il est également un intermédiaire de synthèse et un produit de dégradation des produits pharmaceutiques (exemple: paracétamol) (Salehi *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2009).
- Toxicité

Le p-NP est un composé toxique qui pénètre dans l'environnement qui peut atteindre

- l'être humain, comme produit hydrolytique, pendant la dégradation de plusieurs pesticides (Guang-Cai *et al.*, 2006).
- L'inhalation de para-nitrophénol provoque une irritation des voies respiratoires, la toux et l'essoufflement.
- L'ingestion de para-nitrophénol provoquer la formation de méthémoglobine, entraînant une cyanose, la bronchite... et d'autres symptôme moins grave (Suresh *et al.*, 2006).
- En raison de leur toxicité et leur réactivité, la présence des composés de phénol dans l'environnement a suscité une grande préoccupation (Peng *et al.*, 2009; Yongliang *et al.*, 2009).

3. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

3.1 Le processus de transformation

Parmi l'ensemble des substances organiques naturelles ou xénobiotique, les hydrocarbures constituent une classe très diversifiée sur le plan de la structure chimique et dont la caractéristique physico-chimique principale est une très faible solubilité dans l'eau, mis à part les aromatiques légers (Bocard, 2006).

Donc des différents traitements ont été appliqués pour l'élimination et la dépollution d'environnement.

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacé, transformer ou éliminé. Parmi les différents facteurs environnementaux (Zou et al., 2009 ; Picot et al., 2013).

Processus physiques

Constituent la majorité des techniques mises en œuvre actuellement ; elles consistent à séparer les polluants, sans les modifier ou les détruire. Les procédés d'adsorption sur charbon, d'extraction, de lavage et de confinement sont les plus souvent utilisés (Scriban, 1999).

Processus chimique

Les méthodes chimiques telles que l'oxydation ou la neutralisation ont pour but de détruire les polluants ou de les transformer en une forme moins nocive pour l'environnement, en provoquant des réactions chimiques entre le polluant et le réactif ajouté. Ils peuvent être applicables *in-situ* ou après excavation des sols (Colin, 2000).

Processus biologique

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Les microorganismes sont responsables de ce traitement, en particulier les bactéries. La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone (Colin, 2000).

3.2 Le processus biotique

3.2.1 Bioremédiation

La dépollution des sols par voie biologique est un axe de recherche qui se développe de manière importante depuis quelques années. La biodégradation utilise l'action de microorganismes ou de végétaux pour dépolluer les sols. Il s'agit donc de la bioremédiation. Jugée rentable et efficace contre l'élimination de composés pétroliers et notamment des hydrocarbures BTEX (Tarayre 2012 ; Jin et al. 2013).

La décontamination se fait *in situ* en introduisant dans le sol les éléments nécessaires au développement de la biomasse ou bien *ex situ* en traitant le sol excavé (Colin, 2000). Pour la dégradation des hydrocarbures, différents micro-organismes sont utilisés tels que *Arthrobacter*, *Novocardia* ou *Pseudomonas*. Si la flore locale est inadaptée à la dégradation des polluants ou est peu abondante, des souches bactériennes performantes allochtones peuvent être ajoutées au sol (Colin, 2000).

3.2.2 Types de bioremédiation

Plusieurs techniques de bioremédiation sont connues. Grâce à une dégradation par la microfaune ou d'autres processus naturels (dilution, absorption, évaporation), la teneur en polluants des sols peut diminuer. Réalisée par l'intermédiaire d'actions de microorganismes ou de plantes, cette dégradation naturelle est appelée l'atténuation naturelle. Des microorganismes exogènes, parfois génétiquement modifiés, peuvent être nécessaires à la dépollution de sols. Cette technique, la bio-augmentation, repose sur la capacité de certains microorganismes à minéraliser, décomposer ou transformer des contaminants en substances moins nocive (Tarayre, 2012).

3.2.3 Facteurs influençant la biodégradation

Les propriétés physico-chimiques telles que la densité, la solubilité ou le coefficient de partage influent par exemple sur cette biodégradabilité. Le coefficient de partage correspond au rapport des concentrations en substances polluantes absorbées par le milieu récepteur et la concentration de substances polluantes dissoutes dans le fluide.

Cependant, la biodégradation des hydrocarbures dépend de nombreux paramètres comme la température ou la présence d'eau dans les sols. Ainsi, il est important de connaître la structure et la nature du sol. L'humidité, la salinité, le pH, le taux d'oxygène ainsi que la composition chimique sont des paramètres à suivre. En effet, ceux-ci doivent permettre une efficacité optimale des microorganismes et donc se rapprocher au maximum des conditions optimales de croissance de ces microorganismes (OMI, 2005; Picot et *al.*, 2013).

Malgré la diversité des hydrocarbures et par conséquent de leur biodégradabilité, cette dernière est soumise à quelques règles. Plus la chaîne d'un hydrocarbure aromatique sera longue, plus sa biodégradabilité sera difficile.

Concernant les solvants chlorés, ils sont d'autant plus dégradables s'ils ne comportent que très peu d'atomes de chlore. Plus l'hydrocarbure comportera de cycles, plus sa biodégradabilité sera importante (Tarayre 2012).

La biodégradation des hydrocarbures est aussi plus importante lorsque l'on sélectionne au préalable un consortium bactérien adapté aux polluants (Mazzeo et *al.*, 2010).

Dans un milieu pollué par de l'essence sans plomb, un consortium contenant des bactéries des genres *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Burkholderia*, *Alcanivorax*, *Rhodococcus* et *Bacillus*, est capable de dégrader 95% des hydrocarbures BTEX présents dans le milieu (Morlett-Chávez et al., 2010).

Les mécanismes de l'adaptation

Trois types d'adaptation sont généralement proposés pour la biodégradation des pesticides et autres polluants (Spain, 1990) :

- des micro-organismes dégradant le produit sont présents dans le sol, mais leur taux de population est faible. Cette population va alors progressivement augmenter à un niveau suffisant pour provoquer une disparition significative du produit (Aelion et al., 1987).
- ces micro-organismes sont présents, mais les enzymes nécessaires à la dégradation doivent être synthétisées. La phase de latence sera alors plus longue que précédemment.
- une adaptation génétique s'ajoute aux phénomènes précédents. Elle se traduit sous la forme d'un transfert de gènes codant pour les enzymes de dégradation, ou par l'acquisition de nouvelles capacités par l'intermédiaire de mutations. La phase de latence est alors souvent très longue (Figure 4).

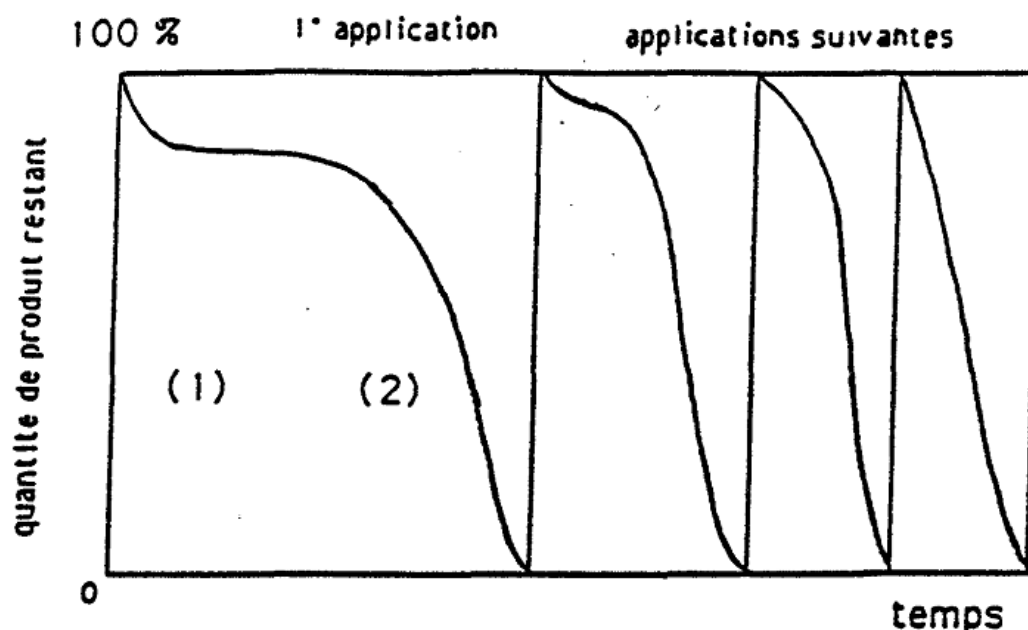


Figure 4: Mise en évidence des phénomènes d'adaptation dans les sols (Martins, 1993).

(1) = phase de latence; (2) = phase de biodégradation.

3.2 La biodégradation des hydrocarbures

L'utilisation de méthodes biologiques dans la dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures se basant sur le phénomène de la biodégradation par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes (Riser, 1998 ; Soltani, 2004).

La biodégradation biotique des hydrocarbures est déterminée par des paramètres environnementaux, physico-chimiques et biologiques et dépend fortement des populations de microorganismes présents (Agterén et *al.*, 1998 ; Picot et *al.*, 2013).

Une grande diversité de bactéries et champignons peut dégrader les polluants organiques dans le sol (biodégradation), dont les hydrocarbures et leurs produits de dégradation. Ces derniers deviennent de nouvelles sources de carbone dans le sol : les microorganismes s'en nourrissent et les transforment en eau et en CO₂. Cependant, tous les composés organiques ne seront pas dégradés de la même façon (Lévêque, 2008 ; Técher, 2011 ; Picot et *al.*, 2013).

En revanche, la culture de bactéries étant plus rapide, ajouté au fait que les bactéries assimilent mieux certaines molécules, l'usage de ces dernières est préféré. Dans cette optique, cette synthèse traitera donc des bactéries dégradant les hydrocarbures. Lorsque l'on nomme les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures, presque tous les clades phylogénétiques sont représentés. Aussi, on retrouve aussi bien des bactéries Gram négatives que des bactéries Gram positives (Técher, 2011).

De nombreuses espèces de microorganisme, principalement des bactéries. Ces organismes ubiquistes dégradant les hydrocarbures (Atlas, 1995 a, b; Olivera et *al.*, 1997). Ils ont même été rencontrés dans les écosystèmes extrêmes comme les régions polaires (Whyte et *al.*, 1995; Aislabie et *al.*, 1998), les déserts (Al-Hadrami et *al.*, 1995) ou les sources chaudes (Zarilla et Perry, 1984) mais aussi des champignons, ont la capacité génétique d'oxyder une grande partie des hydrocarbures et des produits associés (Agterén et *al.*, 1998 ; Bocard, 2006).

Exemples des genres bactériens décrits comme aptes à dégrader les hydrocarbures : *Aeromonas*, *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Bacillus*, *Beneckea*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Cytophaga*, *Erwina*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leucothrix*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Myxobacterium*, *Nocardia*, *Peptococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sarcina*, *Serratia*, *Shewanella*, *Spherotilus*, *Xanthomonas* (Morlett-Chávez et *al.* 2010 ; Tarayre 2012).

Exemples des champignons dépollueurs : *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium torquatum*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* (Rama et *al.*, 1993).

En utilisant, dans la plupart des cas, une fraction d'un substrat comme source de carbone pour synthétiser leurs constituants cellulaires et donc se développer et se diviser (synthèse de la biomasse) et en utilisant pour ce faire l'énergie libérée par l'oxydation de la fraction

complémentaire du substrat selon la voie catabolique du métabolisme général (**Figure 5**).les microorganismes sont adaptés à un milieu spécifique (Bocard, 2006).

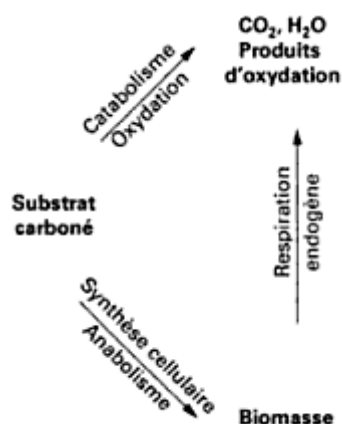


Figure 5 : Métabolisme général d'un substrat organique (Bocard, 2006).

3.2.1 En condition anaérobie

Leur dégradation en milieu anaérobie est plus complexe et moins bien connue (Picot et *al.*, 2013 ; Agteren et *al.*, 1998). Les enzymes ne sont pas toujours spécifiques et sont capables de s'attaquer à des structures chimiques similaires aux substances naturelles. La spécificité des microorganismes est également très variable et ils s'attaquent souvent à une gamme plus ou moins large de composés organiques.

En revanche, en condition anaérobie, le stade ultime de la biodégradation est rarement atteint. Il y a alors apparition en plus du méthane, de composés organiques carbonés partiellement oxydés tels que divers acides organiques.

L'absence de minéralisation complète est un phénomène d'importance car la biodégradation entraîne parfois la production de métabolites plus toxiques que le produit initial (Picot et *al.*, 2013).

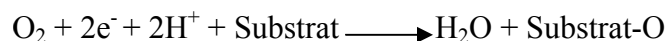
3.2.2 En condition aérobie

En fait la biodégradation des hydrocarbures s'effectue le plus souvent en milieu aérobie (O_2) avec formation finale de dioxyde de carbone (CO_2) et d'eau (H_2O).

Plusieurs familles d'enzymes catalysent les réactions d'oxydation des hydrocarbures dont les mono-oxygénases et les di-oxygénases (ces dernières caractéristiques des microorganismes procaryotes). En condition aérobie, la biodégradation est généralement totale.

Les réactions d'incorporation d'un ou deux atomes d'oxygène au sein d'un substrat hydrocarboné est :

- Pour les réactions catalysées par les mono-oxygénases



- Pour les réactions catalysées par les di-oxygénases

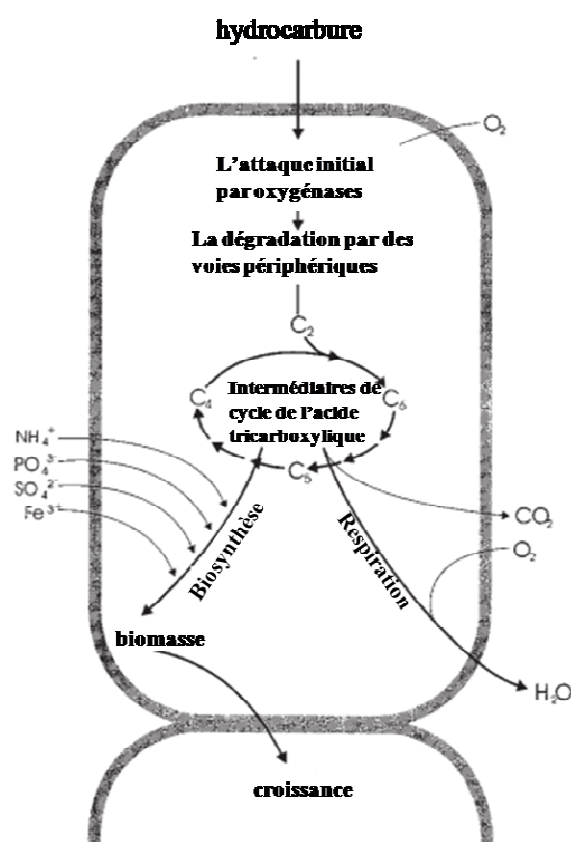
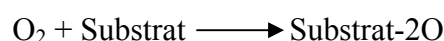


Figure 6: Le principe essentiel de la biodégradation aérobie des hydrocarbure (Wolfgang et al., 2000).

La **Figure 7** présente la biodégradation de phénol par *Pseudomonas putida* en condition aérobie, qui commence par la formation de catéchol après une rupture par l'enzyme hydroxylase. Le catéchol peut encore être dégradé par l'intermédiaire de méta (rupture d'une liaison entre un carbone portant un groupement hydroxyle et le carbone immédiatement voisin ne portant pas de groupement hydroxyle) ou le clivage ortho (rupture de la liaison entre les deux groupements hydroxyle) par le catéchol 2,3-di-oxygénase. Donne un aldéhyde semi-2-

Hydroxymuconique. Cependant, une série d'activité enzymatique a lieu. Tels que hydrolase, aldehyde déshydrogénase, l'isomérase, décarboxylase, hydratase et aldolase, arrivant au pyruvate comme un produit final qui va être entré dans le cycle d'acide tricarboxylique TCA.

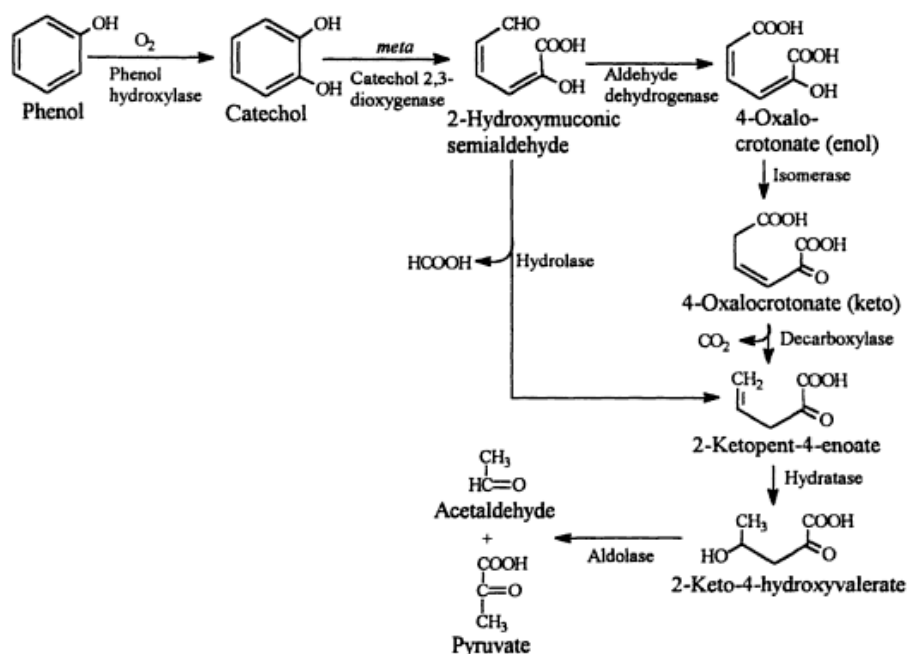


Figure 7 : La biodégradation de phénol par *Pseudomonas putida* en condition aérobie (Agteren et al., 1998).

La biodégradation non-enzymatique

Les micro-organismes peuvent contribuer à la dégradation des polluants de manière indirecte par leur impact sur le milieu. L'activité microbienne se traduit souvent sous la forme d'une acidification ou d'une alcalinisation (cycle de l'azote) du milieu environnant. Aussi, elle pourra entraîner des modifications de pH qui provoqueront des hydrolyses acides ou alcalines de certains composés (Paul et Clark, 1989).

Partie II :

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1 Site du prélèvement du sol

Quatre échantillons du sol contaminé par les dérivés pétroliers (huiles, essence, gasoil) ont été prélevés à partir d'une station de service de la ville de Laghouat (Figure 08).

La station de service étudiée (figure 08) est une station ancienne qui a été installée sur site de plus de 20 ans.



Figure 08: Localisation de site des prélèvements (google maps).

1.2 Méthode d'échantillonnage

Un point essentiel pour la valeur des résultats de l'analyse est celui du choix des échantillons représentatifs de l'état microbiologique régnant dans le sol étudié, avant de commencer l'échantillonnage nous avons examiné le terrain du point de vue de son uniformité, genre de sol, disponibilité de matière organique (Simonart, 1957). Quatre prélèvements du sol pollué ont été réalisés à l'aide d'une spatule stérile à une profondeur de 20 cm selon la norme ISO 10381-1994 pour les analyses microbiologiques. Les prélèvements sont faits dans les mêmes conditions physiques (température et humidité) et dans le même jour. Les échantillons sont transportés vers le laboratoire avec soin et puis ils ont été conservés dans des flacons stériles à 4°C pour garder leur humidité. Le séchage des échantillons tue une partie de la microflore et rend impossible la détermination de la biomasse microbienne (Itab, 2002).

2. Méthodes

2.1 État de sol

Les quatre échantillons du sol (figure 09) ont une couleur et textures différentes (tableau 04) en raison de la différence d'endroit de prélèvement et de la nature du polluant.

Tableau 04 : Les caractéristiques des échantillons des sols prélevés.

sol	couleur/odeur
Echantillon 1	Marron / odeur +
Echantillon 2	Noire / odeur ++
Echantillon 3	Marron foncé / odeur ++
Echantillon 4	Marron / odeur +

+ : présence d'odeur. ++ : odeur forte.



Figure 09 : Aspect des échantillons des sols (originale : Rezzoug et Hamdi, 2015).

2.2 Analyse microbiologique

2.2.1 Préparation des dilutions et mise en culture

La méthode standard de dénombrement est de culture sur boîte de pétri, la technique de dénombrement dite « technique du nombre le plus probable » et elle permet l'estimation de la population bactérienne. A partir des quatre échantillons du sol contaminé, nous avons préparé quatre solutions mères en mettant 5g du sol sec dans 45 ml d'eau physiologique stérile.

Les suspensions ont subi ensuite une série de dilution de 10^{-1} à 10^{-8} (figure 10) dans les 15 min qui suit la préparation des solutions mère, la verrerie utilisé dans la dilution à été autoclavé à 1 bars pendant 20 min. Après étalement sur un milieu gélosé d'un volume de 0,1 ml après agitation mécanique, la suspension est rendue rigoureusement homogène pour un maximum de garantie et de précision (Meyer et *al.*, 2004). Les milieux utilisés sont des milieux riches : le milieu MH et milieu GN (Annexe 01).

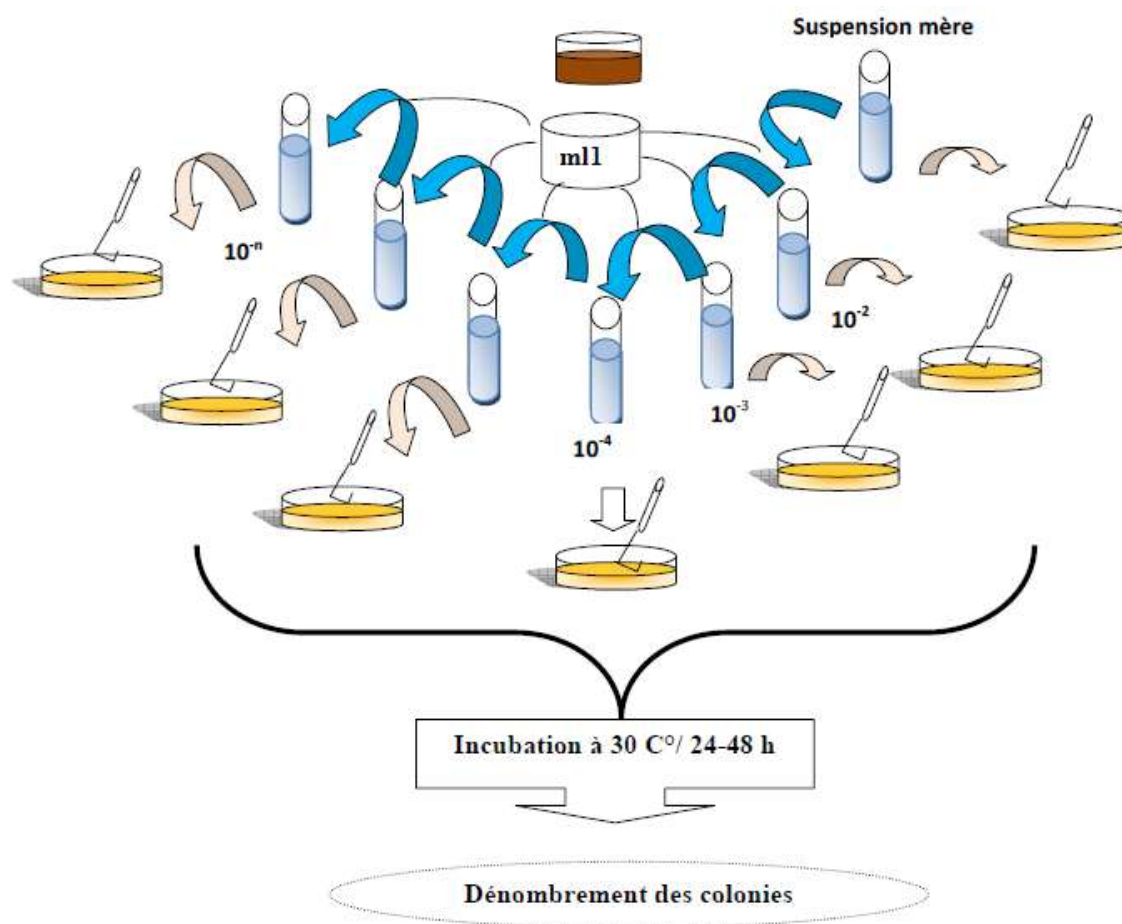


Figure 10 : Schéma d'isolement par la technique des dilutions (Bouderhem, 2011).

2.2.2 Dénombrement

Le nombre de colonie apparue après culture sur milieu solide répond au nombre de cellule microbienne présentes dans le volume analysés de la suspension, le nombre de colonie retenue après culture doit être compris entre 30 et 300 colonies (Meyer et *al.*, 2004)

Après 24h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies.

Selon Marchal et Bourdon (1991), le nombre de germes par gramme de sol est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule:

$$N = ((n / d. V1) \times V2) / m$$

Avec

N : nombre des microorganismes en UFC/g.

n: nombre des colonies dénombrées.

V1: volume prélevé (0.1ml).

V2 : volume de la solution mère (45 mL)

m : Masse du sol (5 g)

d: facteur de dilution.

2.3 Isolement et purification des souches bactériennes

Un seul type de microorganisme ne peut pas être étudié dans une culture mélangée. On a besoin d'une culture pure, une population de cellules provenant d'une seule cellule pour caractériser une espèce individuellement (Lansing et *al.*, 2010). On obtient des colonies pure par la technique des stries (figure 11), le mélange microbien est transféré au bord d'une boîte gélosée à l'aide d'une boucle d'inoculation après stérilisation et étalement sur la surface de la boîte en suivant un motif défini après avoir strié un secteur la boucle d'inoculation est stérilisée et utilisée pour strier un échantillon prélevé de ce premier secteur, un troisième secteur est strié de la même manière mais en prélevant l'échantillon dans le second secteur (Lansing et *al.*, 2010). La sélection est basée sur l'aspect macroscopique des colonies : la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité...etc. le repiquage est subit de façon successif à fin d'obtenir des colonies pure, l'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

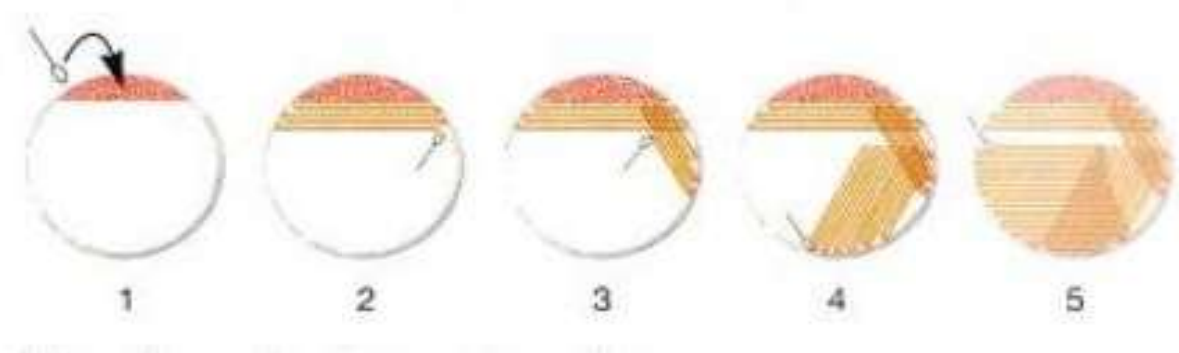


Figure 11 : Technique des stries (Lansing et *al.*, 2010)

Les souches isolées ont par la suite conservée dans des tube à vise contenant un milieu GN incliné ensemencé par la méthode se stries sur la pente, incubé à 37°C pendant 24h et puis conservé à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaine a fin de pouvoir toujours disposer des cellules viables. La réactivation doit se faire tout les mois (Denis *et al.*, 2007).

Les souches ont été conservées également par congélation à – 18°C dans un milieu de conservation (annexe 01) à base de glycérol à une concentration de l'ordre de 50% qui protègent les cellules bactériennes contre la formation des cristaux de glace intra-celullaires ou extra-celullaires qui peuvent être très dommageable pour les cellule. La congélation est réalisé à fin de conserver les souches pour une utilisation ultérieur (Denis *et al.*, 2007).

2.4 Identification

L'identification des bactéries isolées est réalisée à l'aide de leur aspect morphologique et leurs propriétés biochimiques.

2.4.1 Etude morphologique

2.4.1.1 Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des cultures sur milieu solide constitue encore une part importante de l'identification d'un microorganisme, on peut caractériser les bactéries selon l'aspect des colonies formées. Plusieurs critères peuvent être alors envisagés :

- La taille ;
- La forme : punctiforme, ronde régulière, dentelée irrégulière (striation radiale ou concentrique) ;
- L'aspect : colonie rugueuses, ou R (*rough*), ou S (*smooth*), à surface lisse, brillante et régulière ; colonie muqueuses, ou M, à l'aspect gras et coulant.
- Le volume : colonie bombées ou plates, étalées ;
- La couleur : selon l'élaboration d'un pigment (Meyer *et al.*, 2004).

2.4.1.2Aspect microscopique

Observation à l'état frais

La coloration de bleu de méthylène permet l'observation de la morphologie cellulaire, la présence ou l'absence des spores (Delrass, 2008).

Coloration de Gram

La coloration de Gram divise la plupart des bactéries en deux groupes, elle est basée sur la nature biochimique de la paroi bactérienne sur base de la perméabilité de leur paroi à l'Alcool, elle nous permet de visualisé la forme des bactéries, le regroupement et la pureté, cette coloration est réalisé systématiquement à partir d'une colonie sur une lame bien propre (Scaechter *et al.*, 1993).

La coloration de Gram utilise 4 réactions :

- Le Cristal Violet qui colore tout en violet.
- Le Lugol faible qui se complexe au cristal violet, formant un colorant violet soluble dans l'alcool.
- L'Alcool ou l'Alcool/Acétone qui décolore certaines bactéries (celles dont la paroi est perméable à l'alcool), mais pas d'autres (celles dont la paroi est imperméable à l'alcool).
- La Safranine (ou la Fuchsine de Ziehl, diluée 10 x v/v), qui colore en rouge/rose les bactéries décolorées par l'alcool, sans modifier la couleur des autres bactéries (violet foncé/bleu) (Galet et *al.*, 2009).

Test KOH

Le test KOH est une méthode de déterminer rapidement le Gram d'une bactérie (positif ou négatif), sur une lame propre à l'aide d'une pipette pasteur on met une colonie et on ajoute une goutte d'une solution de KOH à 3% et on mélange avec la même pipette, après quelque seconde on tire le mélange vers le haut, s'il y a une formation d'un filament, la colonie isolée est donc constituée de bactéries à Gram négatif, et s'il n'y a pas la formation du filament visqueux donc la colonie est constituée de bactéries à Gram positif (Delrass, 2008).

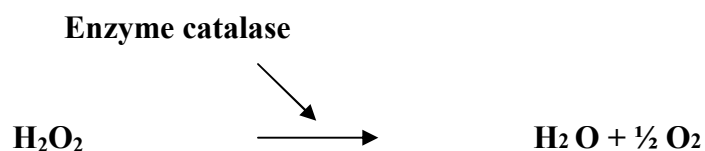
2.4.2 Analyse biochimique

L'identification du genre bactérien s'est basée sur quelques tests biochimiques ainsi que l'utilisation de la galerie Api 20E et Api 20NE.

2.4.2.1 Etude des enzymes respiratoires

➤ Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante:



Sur une lame propre, à l'aide d'une pipette pasteur on dépose une colonie bactérienne jeune sur laquelle on dépose une goutte d'eau oxygénée. La présence de catalase est révélée immédiatement par la présence des bulles d'air qui correspondent à l'oxygène dégagé.

➤ Recherche de l'oxydase

Le test oxydase est à la base d'identification des bactéries à Gram négatif. Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes porteurs de coenzymes hémiques. La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé (Marchal et al., 1991). Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine (Marchal et al., 1991). Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air. phénylène diamine oxydase réactif incolore composé rose violette noircissant à l'air (Marchal et al., 1991). A partir d'une culture jeune on racle une colonie et on la dépose sur le disque d'oxydase, la lecture est immédiate.

2.4.2.2 Métabolisme des glucides

Recherche de la β -galactosidase ou ONPG – hydrolase

Pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et la β -galactosidase (figure 12). L'ONPG soit β - galactoside possède une structure analogue au lactose. Le lactose est formé de molécules de glucose et de galactose, tandis que l'ONPG est composée d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose.

L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre du milieu, Une suspension bactérienne dense de 5 ml incubé avec un disque d'ONPG à 37°C pendant 24h. La réaction se déroule comme suite :



Figure 12 : Réaction d'hydrolyse de l'ONPG (Marchal et al., 1991).

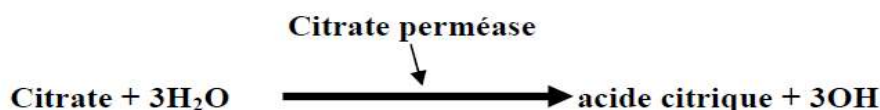
Lecture

- Réaction ONPG+ : coloration jaune
- Réaction ONPG - : pas de coloration

Recherche de citrate perméase

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons (de couleur verte) (Annexe 01), qui ne contient que le citrate ($C_6H_5O_7$) comme seule source de carbone qui est le citrate de sodium.

Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation de citrate provoque l'alcalinisation du milieu selon la réaction suivante :



L'ensemencement se fait sur la pente du milieu selon une strie longitudinale au moyen d'une anse de suspension bactérienne. La suspension en eau physiologique stérile d'une densité moyenne (environ $5 \cdot 10^8$ bactéries par ml) elle est préparé à partir d'un milieu gélosé d'une culture jeune. L'incubation est faite à $37^\circ C$ pendant quelque jours l'observation est faites à chaque jours, le vise de tube est n'est pas revissées à fond (Marchal et *al.*, 1991).

Lecture

- Bactéries « citrate-positives » : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu)
- Bactéries « citrate-négatives » : pas de culture (coloration verte du milieu inchangée) (Marchal et *al.*, 1991).

Milieu Gélose-Glucose-Lactose-saccharose- H_2S (TSI)

C'est un milieu complexe permet la confirmation du glucose (caractère d'identification de famille, avec ou sans production de gaz), et d'orienter l'identité du genre par l'étude de l'attaque du lactose, la fermentation du saccharose et de la production d' H_2S . Dans le culot le glucose est toujours attaqué par voie fermentative, l'acidification conduit a un changement de couleur vers le jaune, sur la pente (en anaérobiose), le glucose est attaqué par voie oxydative, l'acidification sera donc faible. L'ensemencement est réalisé sur la surface abondamment, puis le culot par pique à l'aide d'une pipette pasteur. Le visse du tube reste débouché de façon à permettre l'aération du milieu. L'incubation est à $37^\circ C$ pendant 24h (Marchal et *al.*, 1991).

Lecture

- Culture glucose-positive : culot jaune
- Culture glucose-négative : culot inchangé
- Culture lactose-positive : pente virant au jaune.
- Culture lactose-négative : pente alcalinisé (rouge groseille).
- Culture H₂S-positive : noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot (Marchal et *al.*, 1991).

Test mannitol-mobilité

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose, cette dégradation conduit à la formation de fructose dont l'attaque aboutit à des acides à chaînes très courtes. Le milieu mannitol-mobilité (Annexe 01) permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. L'ensemencement se fait par pique centrale à l'aide d'une pipette pasteur ou d'un fil bien droit, chargé de culture (jeune) à partir d'un milieu solide incubé 24h à 37°C (Marchal et *al.*, 1991).

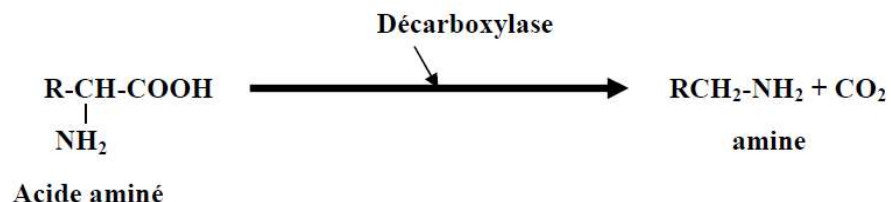
Lecture

- La fermentation du mannitol entraîne le virage au jaune.
- Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu.
- Les bacilles immobiles croissent uniquement le long de la pique d'ensemencement (Marchal et *al.*, 1991).

2.4.2.3 Métabolisme des acides-aminés

Recherche des décarboxylases

Les décarboxylases scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de CO₂ suivant la réaction :



L'importance taxonomique des décarboxylases est hautement spécifique et considérable, surtout en ce qui concerne :

- La lysine-décarboxylase ou LDC (lysine + LDC = cadavérine)
- L'ornithine-décarboxylase ou ODC (ornithine + ODC = putrescine)
- L'arginine-décarboxylase ou ADC (arginine + ADC = agmatine)
- L'arginine-dihydrolase ou ADH (arginine + ADH = ornithine)

Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (3,5 à 5,5) et des conditions d'anaérobiose (Marchal et *al*, 1991). La bactérie est mise dans des 4 tubes contenant les milieux, le quatrième s'agit d'un témoin et puis, une goutte de vaseline stérile est ajoutée pour créer l'anaérobiose.

Lecture

Se faites en comparaison avec le témoin

- Virage de couleur vers le jaune : positif
- Pas de changement de couleur : négatif

2.4.3 Isolement sur des milieux sélectifs

Milieu de Chapman

Le milieu Chapman (annexe 01) Permet l'isolement sélectif de *staphylococcus* sur la base d'une tolérance à une forte teneur en NaCl. L'ensemencement est effectué en stries, les boîtes ensemencées sont mis 24 à 36h à l'étuve à 37°C et en cas de résultat négatif nous avons les laisser ensuite 24h à la température du laboratoire (Marchal et Boudron , 1991).

Lecture

Les colonies de *St. Aureus* s'entourent d'un halo jaune du à l'attaque du mannitol et élaborent leur propre pigment, les autres espèces de *Staphylococcus* donnent généralement des colonies petite. D'autres bactéries comme *Bacillus* peuvent se développer sur ce milieu, mais les délais de croissance et l'aspect des colonies permettent de les différencier facilement (Marchal et *al.*, 1991).

Milieu de MacConkey

Ce milieu (Annexe 01) permet d'éliminer la flore secondaire des produit poly-microbiens grâce à l'action de deux inhibiteurs : le cristal violet (inhibiteur de la flore Gram-positive) et les sels biliaires (sélection des entérobactéries). Les boîtes ensemencées sont mis 24 à 36h à l'étuve à 37°C (Marchal et *al.*, 1991).

Lecture

- Bactéries lactose-positives : colonies de grande taille rouge brique à rose entourées d'un halo opaque du à la précipitation des sels biliaire et les bactéries lactose-négatives : colonies incolores (Marchal et al., 1991).

Milieus de King

Les milieux de King A et King B (annexe 01) sont destinés à la différenciation des espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigment spécifique. L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu :

- ✓ La production de la pyocyanine, due spécifiquement de *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✓ La production de pyoverdine, caractéristique du groupe fluorescent.

L'ensemencement du genre *Pseudomonas* dans un tube de milieu King A et un autre de milieu King B en faisant une strie médiane à la surface de la gélose à l'aide d'une anse de culture prise sur une gélose. L'incubation est à 30°C pendant 1 à 4 jours jusqu'au quelque semaine (Marchal et al., 1991). Nous avons utilisé une souche de référence ATCC 27853 origine MNHN de *Pseudomonas aeruginosa* (figure 13) en utilisant une culture du même milieu de King pour la comparaison des résultats.



Figure 13 : La souche de référence ATCC 27853 sur milieu solide (originale : Rezzoug et Hamdi, 2015).

2.4.4 L'antibiogramme

➤ Inoculum

A partir d'une colonie pure de 18h (sur milieu Mueller Hinton) on racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et on décharge l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et son opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland ou à une D.O de 0,8 à 0,10 lue à 625nm. L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum (OMS, 2005).

➤ Ensemencement

On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et on frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées, et on répète l'opération deux fois en tournant la boîte 60° à chaque fois sans passant l'écouvillon sur lui même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (OMS, 2005).

➤ L'application des disques d'antibiotiques

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre une large gamme d'antibiotique à été utilisé. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre (OMS, 2005).

➤ L'incubation

18 heure à 35°C et peut être prolongée (OMS, 2005).

➤ Lecture

La mesure se faites avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée. On compare les résultats aux valeurs critiques figurants dans les tables de lecture n°9, 10, 11, 12, 13 (OMS, 2005).

2.4.5 Identification par la galerie API 20E

Est réalisé pour compléter la gamme des tests biochimiques non effectué, les caractères choisis dans les galeries API sont comparables à ceux recherchés dans les méthodes conventionnelles d'identification, mais la lecture des tests est souvent plus rapide (Marchal et al., 1991). Les tests sont :

- ONPG'ase.
- ADH, ODC, LDC.
- H₂S (réduction de thiosulfate et formation d'un sulfure de fer noir)
- TDA : la cupule contient du tryptophane en proportion importante et le sel de fer est ajouté après l'incubation.
- Indole : la cupule contient de l'eau peptonée enrichie en tryptophane et la caractérisation se fait avec le réactif de Kovacs.
- AMC (VP) : (actyl-méthyl-carbinol), la mise en évidence se fait par la réaction habituelle avec les réactifs classique a-naphtol et soude 4N.

- Fermentation des glucides : l'indicateur de pH est le bleu de bromothymol, permet la mise en évidence la production du gaz. Sont étudié : glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, amygdaline, arabinose (Marchal et al., 1991).

➤ Préparation de l'inoculum

Une seule colonie bien isolée est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur à partir d'une culture jeune de 18h sur milieu solide, et la mettre dans l'ampoule API NaCl 0,85% (medium) ou dans des tubes contenant 5ml d'eau physiologique stérile, une suspension bactérienne est réalisé en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu d'une opacité de 3 Mac Farland (fiche technique API 20^E).

➤ Inoculation de la galerie

L'introduction de la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette, pour les tests CIT, VP et GAL, le tube et la cupule sont remplie. Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE on créant l'anaérobiose en remplissant leur cupule avec l'huile de paraffine. L'incubation est faite à 37°C pendant 24h (fiche technique API 20^E).

➤ Lecture

L'ajout des réactifs pour quelque test après l'incubation (test TDA, VP, IND). Le virage de couleur indique la réaction positive (fiche technique API 20^E).

2.5 La biodégradation

Les souches bactériennes isolée à partir d'un site contaminé par les dérivés pétroliers, ont la capacité de dégradé quelques polluants organiques comme source de carbone pour leur croissance (Seo et al., 2008). Pour cela, les bactéries isolées à partir de nos échantillons seront cultivées en milieu minérale agar ou dans un milieu minéral en présence de quelques polluants organiques largement rencontrés dans les eaux usées.

2.5.1 Etude de la biodégradation du phénol

A partir de nos souches bactériennes isolé et bien purifiée nous avons les utilisé dans l'étude de la biodégradation du phénol.

2.5.1.1 Adaptation des souches et la production de la biomasse

A partir d'une culture pure sur un milieu solide à l'aide d'une anse de platine nous avons raclé une biomasse importante et puis la mettre dans un flacon contenant un volume de 90 ml de bouillon nutritif (Annexe 01) autoclavé à 1B pendant 20 min, et en ajoutant la solution de phénol (Annexe 01) pour l'obtention d'un bouillon de culture de phénol (Kafilzadeh et al., 2011).

La concentration de phénol utilisé pour l'adaptation est en raison de 50 mg/L. l'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48h jusqu'à le milieu devient trouble et la biomasse soit importante. La biomasse microbienne (figure 14) a été récupérée par la suite par une centrifugation de 4000 t/m pendant 15 min.



Figure 14 : La production de la biomasse dans le BN (originale : Rezzoug et Hamdi, 2015).

2.5.1.2 La culture minérale

A pour but de mettre le phénol comme la seule source de carbone pour la croissance microbienne (Bared et *al.*, 2010), nous avons utilisé un milieu minérale (Yi Li et *al.*, 2010) (figure 16) (Annexe 01) qui contient les sels minéraux nécessaire à la croissance des bactéries (Bared et *al.*, 2010), le milieu doit ajuster avec une solution de NaOH à 1N ou le HCl jusqu'à un pH de 7,2 car c'est le pH optimal de la biodégradation (Daffri et Bousseboua, 2014).

Dans des flacons contenant un volume de 45ml de milieu minérale autoclavé à 1B pendant 20 min, on ajoute aseptiquement une concentration de phénol et la bactérie, et à chaque concentration on mit un témoin sans l'ajout de la bactérie pour la comparaison des résultats. Les flacons sont incubé à 37°C et la lecture des résultats se fait après 24h (Bared et *al.*, 2010). Les différentes concentrations de phénol ajouté sont : 25mg/L, 50mg/L, 100mg/L, et une concentration de 1000mg/l est incubé pendant une semaine (Jiang et *al.*, 2007 ; Garcia et *al.*, 1998 ; Calvario-Rivera et *al.*, 2008).

La lecture des résultats de biodégradation se fait par deux méthodes : le dosage colorimétrique de phénol avec une solution de carbonate de sodium (600 µl) (Annexe 01) et le réactif folin ciocalteu (200 µl) (Annexe 01), qui est une méthode habituellement utilisé pour mesurer les phénols totaux dans une solution. Lorsqu'ils sont en présence de phénols, les acides présents dans le réactif sont réduits en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (Waterhouse, 2010). La 2 ième méthode est s'agit de la mesure de la biomasse microbiennes produite dans une culture de phénol, la biomasse à été estimé par la mesure de la densité optique (DO) par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600 nm, la transformation de la DO en UFC/ ml est faites par la relation: 0,7 DO $\longrightarrow$ 10^8 UFC/ml (Bared et *al.*, 2010).

2.5.1.3 Culture sur milieu solide

Le milieu solide utilisé est un milieu minéral additionné de 15 g/L d'Agar (Sgountzos et al., 2006) l'inoculum bactérien est prélevé à partir de la culture en milieu liquide qui a été déjà adapté au phénol. L'ajout du phénol est après autoclavage du milieu avant solidification.

L'ensemencement est un ensemencement en surface en faisant un râteau à l'aide d'une pipette pasteur, les boîtes de pétrie ont mis à l'étuve à 37°C et l'incubation dure quelque jour.

2.5.1.4 Etude cinétique de la dégradation du phénol par *Bacillus* sp.

Dans un flacon de 250 mL, on introduit 50 mL de phénol à 100 mg/L préparé dans du milieu minérale à pH 7.0. Ce milieu est inoculé par une suspension de bactérienne de *Bacillus* adaptée au phénol dont la densité optique du milieu est ajustée à 0.01 (620 nm). Le flacon est incubé à 37°C sous agitation à 250 rpm pendant 24 heures. Des prélèvements sont effectués chaque 2 heures pour estimer la biomasse et la concentration du phénol résiduel à l'aide de la méthode de Folin Ciocalteu (Wilfred et Ralph, 2006).

2.5.2 Biodégradation de 4-Nitrophénol

Culture sur milieu liquide

Dans des flacons contenant un volume de 45 ml de milieu minérale (Annexe 01) autoclavé à 1B pendant 20 min, nous avons introduit d'un volume de 1 ml d'une suspension bactérienne, et une concentration de 50 mg/L de la solution de Nitrophénol (Annexe 01). Pour l'estimation de la biodégradation nous avons mis des témoins pour chaque bactérie avec le même volume de la suspension microbienne et sans l'ajout du polluant. Les flacons ont par la suite incubé à 37°C pendant quelque jour.

Pour confirmer que notre bactérie a dégradé le 4-Nitrophénol nous avons réalisé une culture sur milieu solide de type Muller-Hinton en faisant une dilution de 10^{-2} de chaque culture et des témoins. Le volume de l'inoculum est 0,1 ml à partir de la dilution préparée, l'incubation se fait à 37°C pendant 24h. La lecture des résultats est faite par dénombrement des colonies sur milieu MH en comparant avec la culture des témoins, si les colonies de la culture qui contient le polluant sont supérieures à celles des témoins, on confirme que notre bactérie a dégradé le Nitrophénol par l'estimation que la biomasse est plus élevée par rapport à la biomasse de départ.

2.5.3 Biodégradation du cyclohexane

Les alicycliques sont des composantes majeures de pétrole brut (Okoh, 2006). Leur quantité relative dans le pétrole brut (20 à 70%) dépend de la nature et l'origine du pétrole (Ilori, 1999; Maier, 2009). Ils trouvent habituellement leur chemin dans le sol et les eaux naturelles, les

bactéries extraite à partir des sols contaminé ont la capacité de dégradé ces composantes y compris le cyclohexanone et le cyclohexane (Opere, 2013). La solution de cyclohexane (1%) (Annexe 01) est ajouté sur les boîtes gélosé, l'ensemencement de la bactérie se fait en surface.

Partie III :

Résultats et discussion

1. Evaluation et étude de la flore microbienne

1.1 Estimation de la flore microbienne totale (étude quantitative)

Nous avons pu déterminer dans chaque échantillon du sol prélevé au niveau de la station-service du carburant la flore microbienne totale. Les résultats trouvés montrent que les échantillons E1 et E4 sont les plus chargés avec une flore totale de $2,44 \cdot 10^{10}$ UFC/g et $2,2 \cdot 10^9$ UFC/g, respectivement, tandis qu'une charge microbienne relativement faible a été observée dans les échantillons E2 et E3 pour être $5,94 \cdot 10^4$ UFC/g et $4,4 \cdot 10^7$ UFC/g, respectivement.

La différence de charge microbienne entre les échantillons peut être expliquée par l'hétérogénéité du sol prélevé, de son état de pollution et surtout de ses propriétés physico-chimiques qui favorise l'installation d'une flore bactérienne ou non.

Sur l'ensemble des colonies isolées sur milieu solide, seulement trois souches (S4, S8 et S11) bactériennes montrent des caractéristiques morphologiques, biochimiques et culturelles différentes.

1.2 Etude qualitative de la flore microbienne

1.2.1 Aspect macroscopique des colonies isolées

Le Tableau (5) regroupe les résultats de l'examen macroscopique des différentes colonies isolées à partir du sol contaminé par les dérivés du pétrole.

Tableau 05 : Aspect macroscopique des colonies isolées.

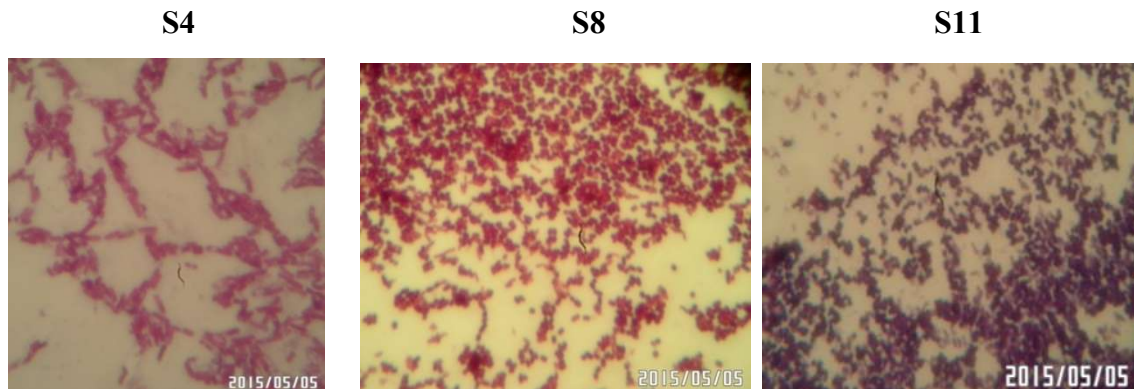
Souche	Diamètre (mm)	Chromogénèse	Forme	Elévation	contour	Opacité	Surface	Consistance
S4	2	Beige	Ronde	Convexe	Irrégulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
S8	2	Beige	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	Crémeuse
S11	1	Jaune	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	Crémeuse

1.2.2 Aspect microscopique des souches isolées

L'observation microscopique (figure 15) a été réalisée suivant deux étapes après une observation à l'état frais et après coloration de Gram et au bleu de méthylène. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 08 (annexe 02).

Les résultats montrent une variété de type bactérien. Les souches isolées ont des formes différentes : des bacilles, des coccobacilles et des cocci. Elles sont assemblées en différents arrangements soit en amas, en paires, ou isolées. Elles présentent aussi une paroi de Gram positive ou négative. La coloration de bleu de méthylène et de Gram a révélé la présence de spores chez les bacilles, les coccobacilles et les cocci sont dépourvus.

(a)



(b)



Figure 15: Aspect microscopique (a) et macroscopique (b) des souches isolées
(originale :Rezzoug et Hamdi 2015).

Les bactéries de sol ont une très grande variété de forme, elles peuvent être mobile ou immobiles et elles possèdent ou non des formes de résistance (kystes ou spores) (Madigan et Martinko, 2010).

A cause de la structure solide du sol et de l'absence d'eau en quantité suffisante, les bactéries de sol sont peu mobiles et se fixent plutôt sur toutes sortes de supports où elles se développent en microcolonies de manière à rester en contact avec leurs ressources en eau et en nutriments (Boussboua, 2002 ; Boudierhem, 2011). Les souches les plus fréquemment décrites dans la biodégradation des hydrocarbures appartiennent aux genres de Gram positif. D'autres souches Gram négatives ont la capacité de dégradation des hydrocarbures assez large (Vandecasteele, 2005 ; Boudierhem, 2011).

1.3 Analyses biochimique

Le Tableau (6) regroupe les résultats tests biochimiques les plus courants réalisé sur les trois souches bactériennes S4, S8 et S11. Certains tests biochimiques ont été effectués à l'aide des galeries API 20^E. Le Gram des souches à été confirmé par le test KOH.

Tableau 06 : Résultats des tests biochimiques des souches bactériennes :

Test		Souches bactériennes		
Test biochimique		S4	S8	S11
	Gram	+	-	+
	Glucose	+	+	-
	Saccharose	+	-	-
	Mannitol	+	-	-
	Mobilité	+	+	-
	Arabinose	/	+	/
	Melrose	/	+	/
	ONPG	-	-	-
	H ₂ S	-	-	-
	Sorbitol	/	-	/
	CIT	+	+	+
	VP	/	-	/
	Inositol	/	-	/
	Rhamnose	/	+	/
	Amygdaline	/	-	/
	LDC	+	-	-
	ODC	+	-	-
	ADH	-	+	-
	Uréase	/	+	/
	TDA	/	+	/
	Indole	/	-	/
Enzymes respiratoires	Oxydase	-	+	-
	catalase	+	+	+
Milieux de king	King A	-	+	-
	King B	-	+	-

+ : résultat positif - : résultat négatif / : non effectué

1.4 Croissance sur les milieux sélectifs

Le milieu Chapman est un milieu sélectif qui permet la croissance des germes à Gram positif, les souches S4 et S11 peuvent pousser sur ce milieu. Le milieu macConkey est un milieu sélectif pour l'isolement des germes à Gram négatif. Seulement la souche S8 qui a pu pousser sur ce milieu (figure 16).

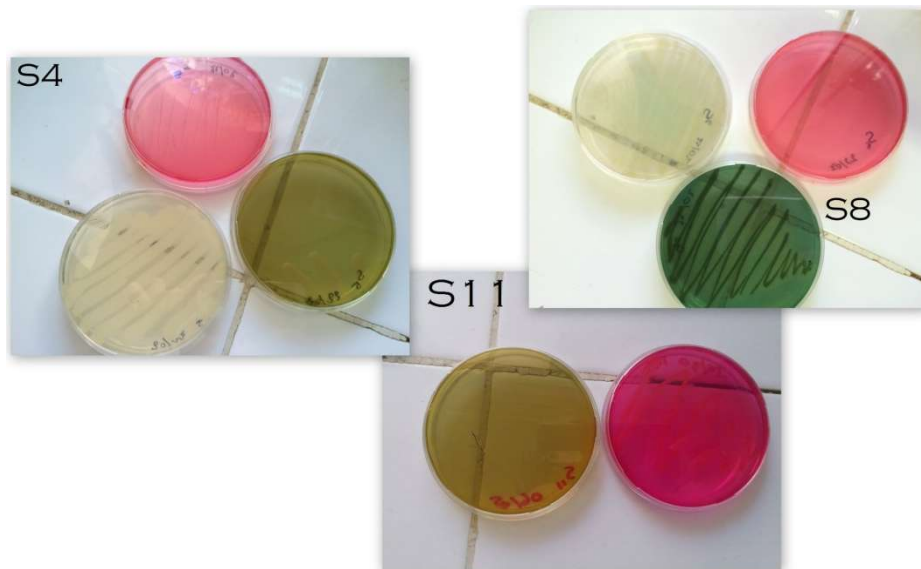


Figure 16: Aspect cultureux des souches bactériennes S4, S8 et S11 sur milieu Chapman et MacConkey (originale :Rezzoug et Hamdi 2015).

1.5 L'antibiogramme

D'après les résultats indiqués dans le tableau 09 (annexe 02) la souche S4 a une résistance seulement contre la pénicilline et l'oxacilline, et une sensibilité vis à vis aux autres antibiotiques testés (figure 17).



Figure 17: Résultat de l'antibiogramme sur la souche 4 (S4) (originale :Rezzoug et Hamdi 2015).

Pour la souche S8 a une résistance contre une large gamme d'antibiotiques (amoxiline, oxaciline , spectinomycine spiramycine, tétracycline et Trimethoprim-Sulfamethoxazole).

Cette souche est sensible vis-à-vis de la pénicilline, de l'enrofloxacin, de la neomycine, la gentamycine, l'érythromycine, la colistin et la ceftazidime (figure 18).

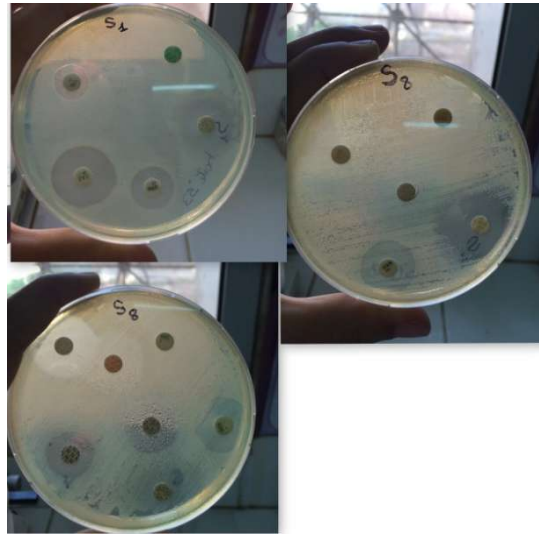


Figure 18: Résultat de l'antibiogramme sur la souche 8 (S8) (originale :Rezzoug et Hamdi 2015).

La souche S11 a une résistance contre la pénicilline, sulfonamides, oxaciline, Trimethoprim + Sulfamethoxazole et une sensibilité vis-à-vis enrofloxacin, neomycine, gentamycine, erythromycine, vancomycine, spiramycine, spectinomycine et la tétracycline (figure 19).

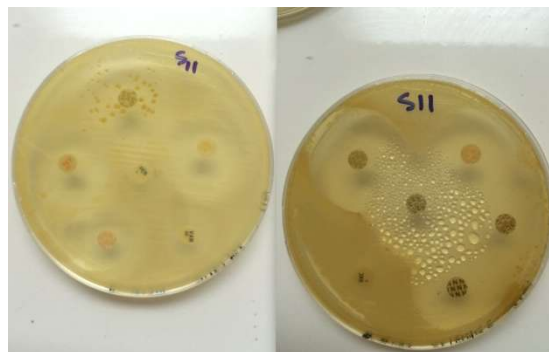


Figure 19: Résultat de l'antibiogramme sur la souche 11 (S11) (originale :Rezzoug et Hamdi 2015).

1.6 Identification des souches isolées

1.6.1 La souche S4

En raison de leur morphologie de forme de bacille, Gram positif, sporulé, catalase positive, oxydase négative, elle oxyde le glucose, citrate perméase positive, ONPG négative,

mobile, aérobic strict, la souche S4 a été affiliée au genre *Bacillus*, espèce non identifiée (Lotfabad et al., 2009). Selon Marchal et Boudron, *Bacillus* a la capacité de se développer sur milieu Chapman.

Les genres *Bacillus* ont une résistance naturelle contre la pénicilline G, amino- et carboxy-pénicillines et les céphalosporines (comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2012).

1.6.2 La souche S8

D'après les examens macroscopique et microscopique, les colonies sont translucide lisse et brillante et donne une pigmentation verte sur milieu GN et MH, une forme cellulaire de coccobacille de Gram négative catalase et oxydase positive, la souche S8 appartenant au genre *Pseudomonas* (Madigan et Martinko, 2010 ; Singleton, 1999). Cette souche est rattachée à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* vu les résultats positifs trouvés lors des tests biochimiques effectués sur le glucose, le saccharose, le mannitol, l'arabinose, le melrose, le citrate perméase, le rhamnose, l'uréase, l'ADH, et le tryptophane.

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est caractérisée par la production des pigments de pyocyanine et pyoverdine sur milieu King A et King B. Ces pigments diffusent dans les cultures sur gélose et les colonies colorent le milieu en bleu verdâtre ou jaune verdâtre (Marchal et al., 1991 ; Singleton, 1999). Cette bactérie a une résistance naturelle contre : les aminopénicillines, céphalosporines 1^{ère} et 2^{ème} génération, céfixime, céfuroxime, céfotaxime, ceftriaxone, ertapénème, kanamycine, tétracyclines, chloramphénicol, triméthoprim, quinolones (comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2012).

Pseudomonas aeruginosa est un microbe pathogène opportuniste important, fortement résistant à un grand nombre de désinfectants et d'antibiotiques. Cette bactérie vit à l'état saprophytique dans l'eau, le sol et sur les végétaux (Sotirova et al., 2009). Elle est par ailleurs connue par sa capacité à biodégrader les composés hydrocarbonés. En effet, plusieurs chercheurs l'ont isolé à partir des sols contaminés par les hydrocarbures (Sifour et al., 2007 ; Chabouni ; 2008 ; YIN et al., 2009 ; Lotfabad et al., 2009).

1.6.3 La souche S11

Cette souche est apparentée au genre *Micrococcus* en raison de sa forme cocci à gram positive et de leurs cellules qui se présentent soit en amas ou isolées. Les colonies paraissent jaunes à orange, translucide. Cette souche n'oxyde pas le glucose à mobilité et oxydase négative. L'espèce est non identifiée. Selon Marchal et Boudron à la différence avec *Staphylococcus*, *Micrococcus* pousse en milieu Chapman en 48h avec des colonies plus au

moins petite (figure 16). *Micrococcus* à une résistance naturelle contre les furanes (comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, 2012).

1.7 Répartition des souches bactérienne dans le sol

D'après les résultats présentés dans la figure ci-dessous le genre *Pseudomonas* est le genre le plus trouvé dans les 4 échantillons de sols en raison de leur caractère ubiquitaire (Madigan et Martinko, 2010).

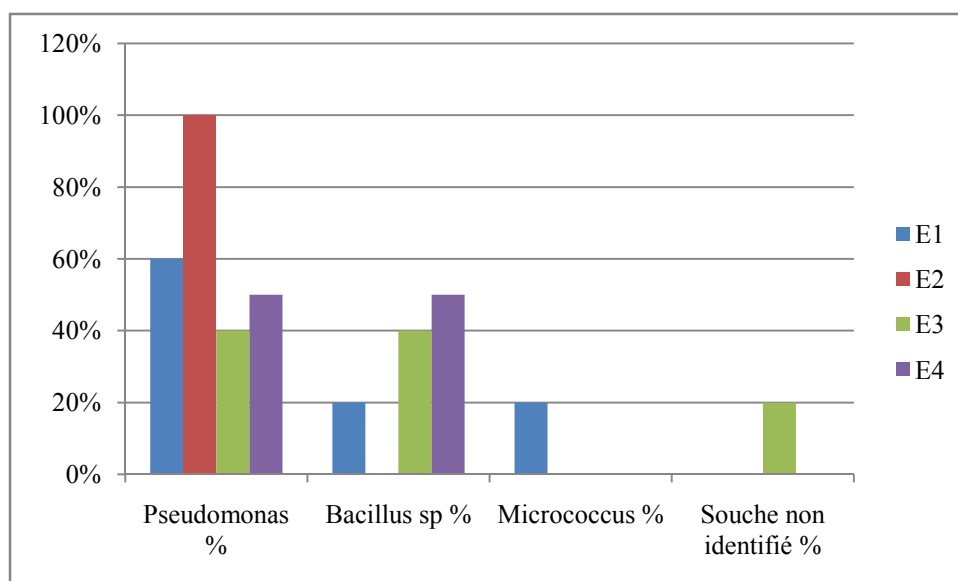


Figure 20 : Distribution des souches en fonction de chaque échantillon.

Selon Bidaud, les *Pseudomonas* représentant 3 à 20% des UFC, et les genres *Bacillus* est également bien représenté dans les sols de 7 à 67% des UFC. Les conditions environnementales variables du sol contribuent au développement des microorganismes et de leur biodiversité (Lansing et al., 2010). L'isolement sur milieu de culture ne permettent de détecter qu'une faible proportion des microorganismes présents, moins de 1% des bactéries sont cultivables (Wards et al., 1990 ; Amann et al., 1995).

2. La biodégradation

2.1 Le phénol

La vitesse de dégradation à été amélioré par l'utilisation des souches adaptées au phénol (figure 21). Kyung et Sung (2009) ont montré que la culture des bactéries en présence de concentrations faibles de phénol, et leur adaptation répétée aux mêmes concentrations de phénol a montré une augmentation du taux et de la vitesse de dégradation de ce polluant. Les réponses de l'adaptation incluent la sélection naturelle de mutants possédant les enzymes de dégradation avec des spécificités de substrat larges, ou même avec de nouvelles activités métaboliques. Le phénomène d'adaptation peut être défini comme les changements

intervenant à la suite d'une perturbation, et visant à rétablir un nouvel équilibre dans la communauté microbienne (Bidaud, 2013).



Figure 21: Adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* dans un bouillon nutritif + phénol (originale : Rezzoug et Hamdi, 2015).

Pseudomonas aeruginosa et *Bacillus. sp* ont la capacité de dégradé le phénol comme une source de carbone et d'énergie pour leur croissance. Le résultat à été confirmé par la disparition des traces de phénol en présence de la bactérie dans la culture minérale de phénol. Ce résultat est révélé par le dosage colorimétrique de phénol (figure 22). En revanche par la production de la biomasse microbienne qui a été estimé par la mesure de la DO de T_0 et de T_f .



Figure 22: Dosage colorimétrique de phénol (originale : Rezzoug et Hamdi, 2015).

La biomasse de départ (0,05) est l'équivalent de $7,14 \cdot 10^6$ UFC/ml. Selon Margesin et Schinner (2001), une teneur $\geq 10^6$ est suffisante pour procéder à la biodégradation des composés organiques. Sur le milieu solide il y'avait l'apparition des colonies petites et rondes (figure 23).



Figure 23: Culture sur milieu gélosé de phénol de *Pseudomonas aeruginosa* (originale : Rezzoug et Hamdi, 2015).

Selon les travaux des chercheurs (Emtiazi et *al.*, 2005 ; Sahar zaki, 2006 ; Varma et *al.*, 2008 ; Zlatka et *al.*, 2007 ; Sgountzos et *al.*, 2006) plusieurs espèces bactériens isolé à partir d'un site contaminé par le pétrole et les dérivés pétroliers ont capable de dégradé le phénol comme seule source de carbone et d'énergie.

Les principaux microorganismes isolés et étudiés dans la dégradation du phénol sont : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas corrugata* (Heinaru et *al.*, 1999). *pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Ralstonia*, (Sahar zaki, 2006).

Ces microorganismes ont des propriétés physiologiques et un système enzymatique approprié. La dégradation de phénol est caractérisée par un clivage du noyau (ortho ou méta) par une mono oxygénase ou dioxygénase induite lors de la croissance. Les activité spécifique des enzymes dioxygénase de l'hydrolyse de phénol est par la fission de catéchol par le catéchol-1,2-dioxygénase par voie d'ortho-clivage et catéchol 2,3-dioxygénase par méta-clivage qui ont été étudié (Heinaru et *al.*, 1999 et Sahar zaki, 2006 ; Preti et Shekhar, 2004).

2.2 Le 4-Nitrophénol

Seulement la souche *Bacillus. Sp* a pu dégrader le 4-Nitrophénol par une augmentation de la biomasse dans un milieu minérale + une concentration de 25mg /l de 4-nitrophénol, cette augmentation de biomasse est estimé par une IIème culture sur milieu MH (figure 24).

Quelques microorganismes isolés à partir des écosystèmes pollués (eaux usée, rivières, eaux souterraines, des sols traités par des pesticides et de l'atmosphère urbaine) ont la capacité de dégradé les PNP en les utilisant comme source de carbone, d'azote et d'énergie (Daffri et *al.*, 2014).



Figure 24: Culture à partir de milieu qui contient le 4-nitrophénol (à gauche) et la culture à partir de milieu sans 4-nitrophénol (à droite) (originale : Rezzoug et Hamdi, 2015).

2.3 Le cyclohexane

Seulement la souche de *Pseudomonas aeruginosa* a pu pousser sur le milieu solide qui contient le cyclohexane par l'apparition de quelque colonie après une incubation qui a été duré plusieurs jours (figure 25). La confirmation de résultat est fondée par la méthode d'écouvillonnage (3 stries ont été prélevées) à partir la culture de cyclohexane et ensemencé sur milieu MH (figure 25).

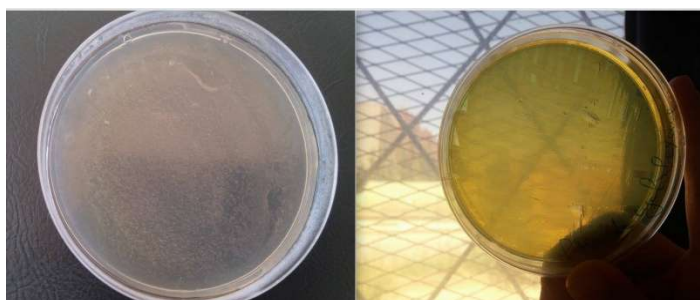


Figure 25: Culture de *Pseudomonas* sur milieu solide de cyclohexane (à gauche) et leur repiquage sur milieu MH (à droite) (originale : Rezzoug et Hamdi, 2015).

Quelques bactéries ont la capacité d'utilisé le pyrène en tant que seule source de carbone sont capables de croître sur des composés alicycliques luxuriante que substrats seuls (Opere et *al.*, 2013).

2.4 Etude cinétique de dégradation du phénol par *Bacillus* sp.

La bactérie *Bacillus* sp I2 a été cultivée en mode discontinu (batch) en présence de phénol à 100 mg/L à pH 7.0 et à 37°C sous agitation à 250 rpm. Nous avons observé que cette souche bactérienne est capable d'assimiler parfaitement le phénol comme seule source de carbone.

D'après la Figure (A et B) on constate qu'il existe une corrélation étroite entre la consommation du phénol du milieu et l'augmentation de la biomasse. Après 4 heures d'incubation de la bactérie, environ 50% du phénol à était transformé.

Nos résultats sont similaires par rapport à ceux cités dans la littérature (Li et al, 2010 ; Firozjaee, et al, 2011 ; Aravindhnan et al., 2014).

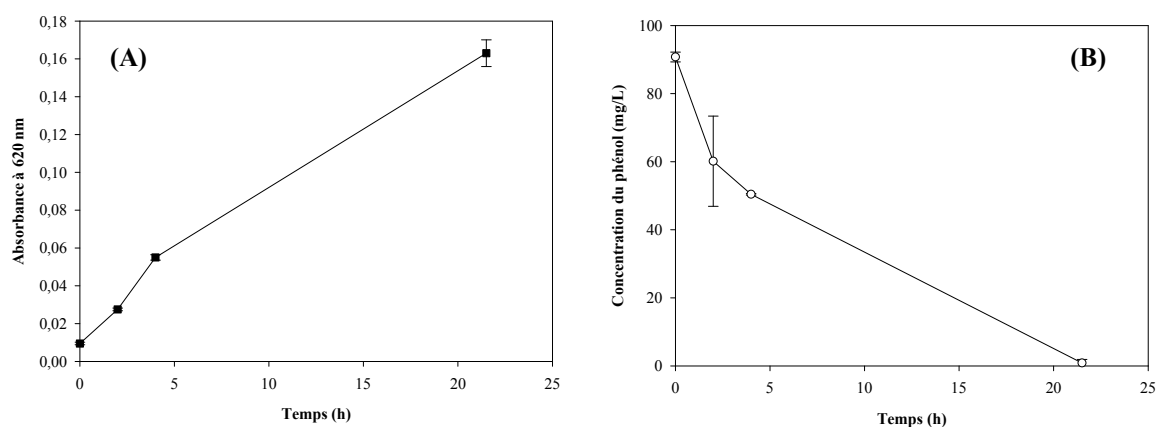


Figure 26: Résultat de la cinétique de dégradation du phénol à 100 mg/L par *Bacillus* sp. À 37°C et à pH 7.0. (A) variation de la biomasse au cours du temps ; (B) variation du phénol résiduel en fonction du temps.

Conclusion générale

La station de service des carburants constitue un milieu naturel pour l'isolement des bactéries capables de dégrader les polluants organiques tels que les hydrocarbures aromatiques, les phénols etc.

Cette étude a montrée l'existence d'une flore bactérienne au niveau du sol contaminé par les dérivés pétroliers. Cette flore était répartie de manière hétérogène d'un prélèvement à un autre.

Les analyses microbiologiques indiquent la présence de bactéries de différentes formes avec présence des bacilles, des coccobacilles et des cocci. Les principaux genres bactériens trouvés sont *Pseudomonas*, *Bacillus* sp. Et *Micrococcus*. Le genre *Pseudomonas* est l'espèce omniprésente dans le sol.

Les deux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont capables de dégrader le phénol comme seule source de carbone. Le para-nitrophénol est dégradé seulement avec les bactéries du genre *Bacillus* sp. De même, *Pseudomonas* a la capacité d'assimiler le cyclohexane comme substrat.

L'étude cinétique de dégradation du phénol par *Bacillus* sp indique que cette souche utilise ce polluant comme source d'énergie et pour la croissance.

La bactérie *Bacillus* peut être utilisée pour l'élimination du phénol présent dans les eaux usées provenant des activités industrielles et pharmaceutique.

A fin de compléter cette étude, il serait envisageable d'identifier les bactéries à l'échelle moléculaire par la méthode de PCR et de déterminer les conditions optimales de dégradation du phénol par les bactéries les plus actives sur ce dernier.

*Références
bibliographique*

- ❖ **Aelion C.M., Swindoll C.M., Pfaender K., 1987.** Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.53, n09, 2212-2217.
- ❖ **Aislabie, J., McLeod, M. and Fraser, M., 1998.** Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 210-214.
- ❖ **Al-Hadrami, M.N., Lappin-Scott, H.M. and Fisher, P.J., 1995.** Bacterial survival and n-alkane degradation Within Omani crude oil and a mousse. *Marine Pollution Bulletin* 30, 403-408.
- ❖ **Amann R.L., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995.** Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59:143-169.
- ❖ **Aravindhana. R, Naveen. N, Anand. G, Raghava Rao. J et Nair, B., 2014.** Kinetics of biodegradation of phenol and a Polyphenolic compound by a mixed culture containing pseudomonas aeruginosa and bacillus subtilis. *Leather Process Technology Division, Csir-Central Leather Research Institute.*
- ❖ **Atlas, R.M., 1995a.** Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation* 35, 1-3.
- ❖ **Atlas, R.M., 1995b.** Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* 31, 4-12.
- ❖ **Baird W.M., L.A. Hooven., B.Mahadevan., 2005.** *Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action.* *Environ Mol Mutagen* 45(2-3: 106-114.
- ❖ **Bared Razika., Boucheta Abbes., Chaib Messaoud., Kacimi Soufi., 2010.** Phenol and Benzoic Acid Degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Water Resource and Protection* pp 788-791.
- ❖ **Bertrand J.C., Miller G., 1989.** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les hydrocarbures.in *microorganismes dans les écosystèmes océaniques.* Bianchi M. (ed). *Paris: Masson.*P.343-385.
- ❖ **Bidaud Christine., 2013.** Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué. *Chemical and Process Engineering. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 1998.* French. NNT : 1998INPG4205.P. 39.

- ❖ **Bocard Christian., 2006.** marées noires et sols pollués par des hydrocarbures : enjeux environnementaux et traitement des pollutions. chapitre : l'écodynamique des hydrocarbures et la modélisation. *Editions Technip, Paris*. P. 93-121.
- ❖ **Botta, C., Di, G., Carole, Sabatier, A.-S. & De Méo, M., 2009.** Effects of UVA and visible light on the photogenotoxicity of benzo[a]pyrene and pyrene. *Environmental Toxicology*, 24(5), 492-505.
- ❖ **Bouderhem Amel., 2011** utilisations des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodetection et la bioremediation des sols pollués par les hydrocarbures thèse de magister, spécialité Microbiologie, université d'Ouargla Kasdi Merbah.
- ❖ **Bousseboua H., 2002.** Microbiologie générale. Ed. Université Mentouri Constantine, P. 240.
- ❖ **Calvario-Rivera Claudia., Gabriela A. Va'zquez-Rodriguez., Gilles Roux., Julio Weissman-Vilanova., 2008.** Modélisation de la cinétique de biodégradation de phénol par granules aérobies, the canadian journal of chemical engineering VOLUME 86: 15–22.
- ❖ **Chabouni S., 2008.** Essai d'utilisation des souches bactériennes dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures « pétrole ». Mémoire de DES Microbiologie. Université Kasdi Merbah Ouargla. P. 78.
- ❖ **Colin F., 2000.** Pollution localisée des sols et des sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés, *Académie des sciences, rapport n° 44, Editions Tec&Doc*, P .417.
- ❖ **Costes J.M., Druelle V., 1997.** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : la réhabilitation des anciens sites industriels, *Revue de l'institut Français du Pétrole*, Vol. 52, No. 4, P.425-440.
- ❖ **Daffri Amel., Harzallah Bisma., et Bousseboua Hacène., 2014.** Biodegradation of High Concentration of *p*-Nitrophenol (PNP) by Wastewater Microflora, *Journal of Agricultural Science and Technology A* 4 .P .300-306.
- ❖ **Dari razika., 2013.** Dénombrement de la biomasse microbienne des sols arides exemple d'un sol salé sous deux types de cultures.
- ❖ **Delrass camille., 2008.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire
- ❖ **Denis françois., Marie-Cécile poly., Martin christian., Bengin eduard et Quentin roland., 2007.** Bactériologie médicale ; elsever masson edition. P. 29.

- ❖ **Djellali Souad., 2014.** Elaboration, caractérisation et biodégradabilité des mélanges PEBD/PLA et PEBD/EGMA/PLA.P.14.
- ❖ **Djerbaoui Amina Nesrine., 2011.** utilisation de souches bactériennes autochtones dans la production de bio-surfactant et la bioremédiation des sols de Hassi Messoud contaminés par les hydrocarbures. mémoire magister université Kasdi Merbah – ouargla. P.5-10.
- ❖ **Emtiazi, G., Shakarami, H., Nahvi, I. and Mirdamadian, S. H. 2005.** Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *Escherichia* African Journal of Biotechnology Vol. 4 (2), pp. 172-176.
- ❖ **Farshid Kafilzadeh., Sara Rafiee., Yaghoob Tahery., 2011.** Evaluation of Bioremediation of naphthalene using native bacteria isolated from oil contaminated soils in Iran, Annals of Biological Research 2 (6) :610-616.
- ❖ **Fent, K., 2004.** Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205(3), 223-240
- ❖ **Firozjaee. T, Najafpour. G , Khavarpour. M , Bakhshi.Z et Mousavi .N., 2011.** Phenol Biodegradation Kinetics in an Anaerobic Batch Reactor. Iranica Journal of Energy & Environment Vol. 2, N°1, P 68.73.
- ❖ **Francis A. Carey., Richard J. Sundberg., 2000.** Chimie organique avancée: Structures moléculaires et mécanismes réactionnels. 3eme édition. *De Boeck. Université Paris, Bruxelles.* P. 130-141.
- ❖ **Françoise Nési ., 2010.** La pollution des sols: Conférence du Forum des juges de l'Union européenne pour l'environnement. *Etablissements Emile Bruylant, S.A. Bruxelles.* P.158.
- ❖ **Gabet S., 2004.** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. *Thèse de doctorat de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau,* P. 177.
- ❖ **Galet Philippe, Luc. B, JAN. J., 2009.** Bactériologie médicale tropical, P .8.
- ❖ **Guang-Cai Chen., Xiao-Quan Shan., Yu-Sheng Wang., Bei Wen., Zhi-Guo Pei., Ya-Ning Xie., Tao Liu., Joseph J. Pignatello., 2006.**Effect of copper on the adsorption of p-nitrophenol onto soils, *Environmental Pollution* 139 . 541-549.
- ❖ **Heider J., Sporman A.M., Beller H.R., Widdel F., 1999.** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS. Microbiology.*22:459-473.

- ❖ **Heinaru Eeva., Jaak Truu., Ulrich Stottmeister et Ain Heinaru., 1999.** Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds FEMS Microbiology Ecology 31 pp 195-205.
- ❖ **Ilori MO., 1999.** Utilisation of cyclohexanol by bacteria in tropical estuarine water. Folia Microbiol. 44:553-556.
- ❖ **Itab, 2002.** Activités biologique et fertilité du sol, P .23.
- ❖ **Ivanka Stoilova., Albert Krastanov., Veselin Stanchev., David Daniel., Maria Gerginova et Zlatka Alexieva., 2006.** Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells, Enzyme and Microbial Technology 39 p 1036–1041.
- ❖ **Johnson Wiliam A., 2003.** invitation à la chimie organique. Traduit de l'anglais par danielle Volant-Baeyens, Pauline Slosse et Bernadette Devos-Wilmet. 1ere édition De Boeck Université. Paris. P .313-314.
- ❖ **Juhasz A.L., R. Naidu., 2000.** *Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene.* In Biodeterior biodegradation 45: 57-88. In Lafortune Isabella., 2007. Etude de la diversité d'un consortium bactérien capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un système biphasique. Mémoire de maîtrise. Université du Québec. INRS-Institut Armand-Frappier.P.9-10.
- ❖ **Kanaly, R. A. & Harayama, S., 2010.** Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbial Biotechnology*, 3(2), 136-164.
- ❖ **Lansing. M, Prescott. L, Klein. M, Sherwood. C, Woolverton., 2010.** Microbiologie 3ème édition ; p 113.
- ❖ **Lefebvre Gilles., 1978.** Chimie des hydrocarbures. Cours de l'Ecole Nationale Supérieure du Pétrole et des Moteurs. *Edition Technip, Paris.* P. 13-60.
- ❖ **Lévêque Christian., 2008.** la biodiversité au quotidien : le développement durable à l'épreuve des faits. *Edition Quae, IRD. Paris.* P.145.
- ❖ **Lotfabadt. B., Shourianm., Roostaazadr., Najafabadia. R., Laurent P., Buchon L., Guespin-michel J. F. et Orange N., 2000.** Production of pectatylases and cellulases by *Chryseomonas luteola* strain MFCLO depends on the growth temperature and the nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 1538-1543.

- ❖ **Lundstedt, S., White, P. A., Lemieux, C. L., Lynes, K. D., Lambert, I. B., Åberg, L., Haglund, P. & Tysklind, M., 2007.** Sources, Fate, and Toxic Hazards of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) at PAH- contaminated Sites. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 36(6), 475-485.
- ❖ **M.H. van Agteren, Sytze Keuning, D. Janssen., 1998.** Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds.P.1-9, 219-227.
- ❖ **Madigan. M., et Martinko. J., 2007.** Biologie des microorganismes 11^e édition Pearson education, traduction française coordonnée par **Daniel prieur.** P 269.
- ❖ **Marchal N., j.l. Bourdon., cl. Richard., 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 4 ème édition, p 32, 39, 264, 293, 294, 269, 270, 261, 262, 263, 265, 266, 230, 117, 118, 104, 105.
- ❖ **Martins J., 1993.** "Les aspects hydrodynamiques, physico-chimiques et biologiques du devenir des pesticides dans les sols : application au transfert du pentachlorophénol en colonnes". *Thèse Université de Grenoble I.* P. 305.
- ❖ **Mazzeo D.E.C, Levy C.E, de Angelis D., Marin-Morales M.A., 2010.** BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the Total Environment*. 4334–4340.
- ❖ **Meyer Alphonses., Deiana. J, Bernard. A., 2004.** Cours de microbiologie générale ; 2 ème édition ; p 118.
- ❖ **Mi Jin H, Choi E.J, Jeon C.O., 2013.** Isolation of a BTEX-degrading bacterium, Janibacter sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. *Bioresource Technology* 145. 57–64.
- ❖ **Miller, K. P. & Ramos, K. S., 2001.** Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metabolism Reviews*, 33(1), 1-35.
- ❖ **Morlett-Chávez J.A, Ascacio-Martínez J.A, Rivas-Estilla A.M, Velázquez-Vadillo J.F, Haskins W, Barrera-Saldaña H.A, Acuña-Askar K., 2010.** Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64 .581-587.
- ❖ **N.Bonnad., M.Falcy., A.Fastier., D.Jargot., 2010.** Fiche Toxicologique de cyclohexane établie par les services techniques et médicaux de l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité).Vol . 7-7.

- ❖ **N.Bonnard, M-T.Brondeau, D. Jargot, D. Lafon, S. Miraval, O. Schneider., 2011.** Fiche Toxicologique de phénol établie par les services techniques et médicaux de l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité).Vol. 8-8.
- ❖ **Okoh AI., 2006.** Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 1:38-50.
- ❖ **Olfa BEN SAID., M. EL BOUR., M. S. GOÑI., M. DALLELI., R. DURAN., P. AISSA., 2007.** Caracterisation preliminaire à partir de la lagune de bizerte (tunisie) des bacteries tolerantes aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (haps) *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô*, Vol. 34, pp 129-133.
- ❖ **Olivera, N.L., Esteves, J.L. and Commendatore, M.G., 1997.** Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediment in Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration Biodegradation* 40, 75-79.
- ❖ **OMS, 2005.** Standarisation de l'antibiogramme en medicine humaine a l'echelle nationale, 4 ième edition, selon la recomandation de l'OMS.
- ❖ **OMS., 2000.** Air Quality Guidelines for Europe.World Health Organization. 2ème édition. P.59-97.
- ❖ **Opere Bolanle O., Oluwafemi S. Obayori* and Adebajji A. Raji., 2013.** Degradation of cyclohexane and cyclohexanone by *Bacillus lentus* strain LP32, african journal of biotechnology 6632-6635.
- ❖ **Organisation Maritime Internationale (OMI) ., 2005.** Manuel sur la pollution par les hydrocarbures : Section IV. Lutte contre les déversements d'hydrocarbures, chapitre : Biorestauration. *Copyright* .P.157-165.
- ❖ **Paul E.A., Clark F.E., 1989.** *Academic Press Inc*, San Diego, Ca., "Soil microbiology and biochemistry".
- ❖ **Peng Ye, Ann T. Lemley., 2009.** Adsorption effect on the degradation of 4,6-o-dinitrocresol and p-nitrophenol in a montmorillonite clay slurry by AFT, *Water Research* 43 .1303-1312.
- ❖ **Perfumo A., Smyth T. J. P., Marchant R. et Banat, I. M., 2010.** Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1501–1512.
- ❖ **Picot André, Montandon Frédéric., 2013.** Ecotoxicochimie des hydrocarbures. chapitre : évaluation toxicologique des produits pétroliers.P.91-202.

- ❖ **Preti saxena et Shekhar thakur., 2004.** Purification and caracterization of catechol 1, 2-dioxygenase of *Pseudomonas fluorescens* for degradation of 4-chlorobenzoic acid Biochemical Engineering Journal 30, pp 134-138.
- ❖ **Rama Rao P., Mahmoud S.k., 1993.** Bull. Environ. Contam. Toxicol: Microbial abundance and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil Vo1.50, 486-491.
- ❖ **Riser-Roberts Eve., 1998.** Remediation of Petroleum Contaminated Soils: Biological, Physical, and chemical processes.P.1-3.
- ❖ **Sahar zaki., 2006.** Detection of *meta*- and *ortho*-cleavage dioxygenases in bacterial phenol-degraders J. Appl. Sci. Environ. Mgt. 10 : 75 – 81.
- ❖ **Saiz, E., Movilla, J., Yebra, L., Barata, C. & Calbet, A., 2009.** Lethal and sublethal effects of naphthalene and 1,2-dimethylnaphthalene on naupliar and adult stages of the marine cyclopoid copepod *Oithona davisae*. *Environmental Pollution*, 157(4), 1219-1226.
- ❖ **Samanta S.K., Singh O.M., Jain R.K., 2002.** Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation – review, *Trends in Biotechnology*, 20, (6), 243-248.
- ❖ **Sanchez J. Luis Garcia., Kamp Bernhard., Kira A. Onysko,Hector Budman., Campbell W. Robinson., 1998.** Double Inhibition Model for Degradation of Phenol by *Pseudomonas putida* Biotechnol Bioeng 60, 560–567.
- ❖ **Schaechter. M, Medoff. G, Eisenstein. B., 1993.** microbiologie et pathologie infectieuse ; 2 ième édition. P 32.
- ❖ **Scriban R., 1999.** Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols contaminés par les polluants organiques. 5ème édition. *Ed Lavoisi*.
- ❖ **Seo Jong-Su., Young-Soo Keum., Qing X. Li., 2008.** Bacterial Degradation of Aromatic compounds. International Journal of Environmental Research and Public Health 6(1): 278-309.
- ❖ **Sgountzos I.N., S. Pavlou., C.A. Paraskeva et A.C. Payatakes., 2006.** Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* in sand beds during biodegradation of phenol Biochemical Engineering Journal 30 pp164–173.
- ❖ **Sifour M., Al-jilawi M. H. et Aziz J. M., 2007.** Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. Pak. J. Biol. Sci., 10 (8) : 1331-1335.

- ❖ **Simonart. P., 1957.** Symposium sur les Méthodes d'Etude Microbiologique du Sol, p 208
- ❖ **Singleton P., 1999.** Bactériologie, Edition Duonod 4ème édition Paris. P.415.
- ❖ **Soltani M., 2004.** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique, P. 284.
- ❖ **Sotirova A., Spasova D., Vasileva-tonkova E. et Galabova D., 2009.** Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiological Research, 164 : 297—303.
- ❖ **Spain J.C., 1990.** A.C.S. Symposium Series, “In Enhanced biodegradation of pesticides in the environment”: Microbial adaptation in aquatic ecosystems.
- ❖ **Suresh B., Pakala., Purushotham Gorla., Aleem Basha Pinjari., Ravi Kumar Krovidi., Rajasekhar Baru., Mahesh Yanamandra., Mike Merrick., Dayananda Siddavattam., 2006.** Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia sp.* strain DS00. *Springer-Verlag*. 10.1007/s00253-006-0595-z. Vol.11.
- ❖ **Sverdrup, L. E., Ekelund, F., Krogh, P. H., Nielsen, T. & Johnsen, K., 2002.** Soil microbial toxicity of eight polycyclic aromatic compounds: effects on nitrification, the genetic diversity of bacteria, and the total number of protozoans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(8), 1644-50.
- ❖ **Tarayre. C., 2012.** Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires Européennes. P .116.
- ❖ **Técher D., 2011.** Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus*. Université Paul Verlaine de Metz, P. 307.
- ❖ **Teranishi, M., Toyooka, T., Ohura, T., Masuda, S. & Ibuki, Y., 2010.** Benzo[a]pyrene exposed to solar-simulated light inhibits apoptosis and augments carcinogenicity. *Chemico-Biological Interactions*, 185(1), 4-11.
- ❖ **Vandecasteele J.P., Hermann M., 2005.** Regulation of a Catabolic Pathway Lysine Degradation in *Pseudomonas putida* European Journal of Biochemistry Volume 31, Issue 1, p 80–85.
- ❖ **Vollhardt K. Peter C., Neil Eric Schore., 2004.** Traité de chimie organique 4ème édition, *De Boeck Université Bruxelles*. P. 137-140.

- ❖ **Ward D.M. Weller R., Bateson M.M. 1990.** 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a wellstudied thermal community. *FEMS Microbiol. Rev.*, 6, 105-115.
- ❖ **Waterhouse Andrew., 2010.** Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine, *Methods in Enzymology* pp 152-178.
- ❖ **Whyte, L.G., Geer, C.W. and Innis, W.E., 1995.** Assessment of biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. Abstract of General Meeting of the American Society for Microbiology 95, P. 468.
- ❖ **Wilfred Vermerris., Ralph Nicholson., 2006.** Phenolic Compound Biochemistry, edition 01 springer Netherlands, Copyright Holder Springer Science+Business Media B.V.
- ❖ **Wolfgang fritche., martin hofrichter., 2000.** Aerobic Degradation by Microorganisms. *Jena, Germany*. 146-155.
- ❖ **Yan Jiang., Jianping Wen., Jing Bai., Xiaoqiang Jia., Zongding Hu., 2007.** Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. (2007) *Journal of Hazardous Materials* 147 p 672–676.
- ❖ **Yi Li. , Jing Li., Chao Wang., Peifang Wang., 2010.** Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1, *Bioresource Technology* xxx–xxx.
- ❖ **Yin H., qiang J., jia Y., Ye J., Peng H., Qin H., Zhang N. et He B., 2009.** Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry* 44 : 302–308.
- ❖ **Yongliang Zheng., Deli Liu., Shiwang Liu., Shangying Xu., Yongze Yuan., Li Xiong., 2009.** Kinetics and mechanisms of p-nitrophenol biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* HS-D38, *Journal of Environmental Sciences* 21. 1194-1199.
- ❖ **Z. Salehi, H. Yoshikawa, R. Mineta, Y.Kawase., 2011.** Aerobic biodegradation of p-nitrophenol by acclimated waste activated sludge in a slurry bubble column, *Process Biochemistry* 46. 284-289.
- ❖ **Zarilla, K.L. and Perry, J.J., 1984.** *Thermoleophilum album* gen. nov and sp. nov, a bacterium obligate for thermophily and *n*-alkane substrates. *Archives of Microbiology* 137, 286-290.
- ❖ **Zlatka Alexieva., Maria Gerginova ., Plamena Zlateva. , Jordan Manasiev., Danka Ivanova et Nely Dimova., 2007.** Monitoring of aromatic pollutants biodegradation *Biochemical Engineering Journal* 40 pp 233–240.

- ❖ **Zou, H., Yi, C., Wang, L., Liu, H., Xu, W., 2009.** Thermal degradation of poly(lactic acid) measured by thermogravimetry coupled to fourier transform infrared spectroscopy. Journal of thermal analysis and calorimetry, 97 (3), 929-935.

Annexe

- **Mulleur-Hinton agar composition** (en raison de gramme par litre d'eau distillé) (Marchal et *al.*, 1991):

Infusion de viande de bœuf	300
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1,5
Gélose	17

- **La composition de gélose nutritive (GN)** (en raison de g/L d'eau distillé) (Marchal et *al.*, 1999)

Macération de viande (ou eau distillé + extrait de viande)	1 litre
Peptone tryptique	15
NaCl ou KCl	5
Agar	15 à 20

- **La composition de bouillon nutritive** (en raison de g/L d'eau distillé)

Peptone tryptique	15
Extrait de viande	3
Extrait de levure	1
NaCl ou KCl	15 à 20

- **La composition du milieu mannitol-mobilité** (en raison de g/L d'eau distillé) (Marchal et *al.*, 1991)

Peptone tryptique de viande	20
Agar	4
Mannitol	2
Rouge de phénol à 1%	4

pH 7,6 – 7,8

- **Composition du milieu Chapman** (en raison de g/L d'eau distillé) (Marchal et *al.*, 1991)

Peptone	11
---------------	----

Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Mannitol	10
Agar	15
Rouge de phénol	0,025

pH final 7,4 - 7,5

➤ **Composition du milieu macConkey** (en raison de g/L d'eau distillé) (Marchal et al., 1991) :

Peptone de caséine	17
Peptone de viande	3
Lactose	10,0
Mélange des sels biliaire	1,5
Chlorure de sodium	5
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,01
Agar agar	13,5

➤ **Composition du milieu King A** (en raison de g/L d'eau distillé) (Marchal et al., 1991)

Peptone de gélatine	20
Glycérol	10
Sulfate de potassium anhydre	10
Gélose (Agar)	15

pH 7,2

➤ **Composition du milieu King B** (en raison de gramme par litre d'eau distillé) (Marchal et al., 1991)

Protéase peptone n°3 ou polypeptone (BBL)*	20
Glycérol	10
Phosphate bipotassique anhydre	1,5
Sulfate de magnésium (7H ₂ O)	1,5
Gélose (Agar)	15

➤ **Composition du milieu TSI** (en raison de gramme par litre d'eau distillé) (Marchal et al., 1991)

Extrait de viande de bœuf	3
Extrait de levure	3
Peptone	20
Chlorure de sodium	5
Citrate ferrique	0,3
Thiosulfate de sodium	0,3
Lactose	10
Glucose	1
Saccharose	10
Rouge de phénol	0, 05
Agar	12

pH 6,7

➤ **Composition du milieu minérale (g/l)**

Na ₂ HPO ₄	3,8
KH ₂ PO ₄	1
NaCl	1
MgSO ₄	0,2
NH ₄ Cl	0,1

pH final doit être 7,2

➤ **Composition de milieu de conservation**

MgSO ₄	2,46g/l
Tris-Hcl	2,42g/l
Glycerol à 100%.....	32,5 ml

pH final 8 ajusté avec le Hcl

MgSO₄ à 1M, tris : hydroxyméthyl-amino-méthane.

➤ **Solution de phénol**

La solution du phénol utilisé dans l'étude de la biodégradation est en raison de 0,1% en mettant 0,1g du phénol dans 10ml d'eau distillé stérile.

➤ **solution de 4-Nitrophénol**

0,1 g de 4-Nitrophénol est ajouté dans 10 ml d'eau distillé stérile.

➤ **solution de cyclohexane**

Le cyclohexane est dissoute dans une solution de triton X 100 à 0,1%, et puis la préparation de la solution de cyclohexane en raison de 1%.

➤ **Solution de carbonate de sodium**

200 g de carbonate de sodium anhydre est ajoutés Dans 800mL d'eau distillée.

➤ **Réactif de folin ciocalteu**

Ce réactif est décrit comme étant du tungstate de sodium, du molybdate de sodium, du sulfate de lithium, du brome, de l'acide chlorhydrique concentrée et de l'acide phosphorique.

Tableau 07: nombre des colonies par dilutions décimales de chaque échantillon

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
E1	I	I	81	76	70	45	0	0
E2	66	2	1	0	0	0	0	0
E3	264	137	90	21	0	0	0	0
E4	I	I	119	74	59	22	13	2

I : indénombrable

Tableau 08: aspect microscopique des souches isolées

Etat frais			Coloration de gram		Coloration au bleu de méthylène
colonie	mobilité	arrangement	Forme de cellules	Gram	Présence de spores
S4	Non mobile	En amas	bacilles	positif	présence
S8	mobile	Isolé/ en paire/ en amas.	colibacilles	négatif	Pas de spores
S11	Non mobile	En amas / isolé	cocci	positif	Pas de spores

Tableau 09 : la mesure des zones d'inhibition de l'antibio-résistance (mm)

	S4	S11	S8
ENR	29,38	32,19	21,67
N	23,39	27,93	15,86
E	23,97	28,35	22,64
GM	25,05	22,69	18,6
PEN	<6	<6	20,46
SXT	28,32	<6	<6
TET	22,63	25,18	<6
SSS 200	33,49	<6	23,5
VAN	19,83	20	19,59

SP	25,05	24,21	<6
SPN	26,34	25,78	<6
OXC	<6	<6	<6
AMC			<6
COL			13,78
CAZ			22,23

Isolement et identification des bactéries à partir d'un site contaminé par les dérivées pétroliers

Résumé. Les bactéries du sol ont la capacité de dégrader divers composés organiques présents dans un site pollué par le pétrole ou ses dérivés. Ce milieu constitue donc un choix convenable pour l'isolement des souches qui peuvent être exploitées pour le traitement des milieux pollués. Pour cela, l'objectif de cette étude était d'isoler et d'identifier les bactéries à partir d'un sol prélevé auprès d'une station de service des carburants de la région de Laghouat. Les bactéries ont été isolées dans des milieux sélectifs et leur identification a été réalisée à l'aide de leurs caractéristiques morphologiques et leurs propriétés biochimiques.

Les analyses microbiologiques montrent la présence d'une biomasse bactérienne considérable et d'autre part une diversité avec dominance de deux genres *Pseudomonas* sp. Et *Bacillus* sp. Le test de biodégradation de quelques polluants organiques (phénol, p-nitrophénol et cyclohexane) montre que seulement *Pseudomonas* et *Bacillus* sont capables de dégrader totalement le phénol comme seule source de carbone et d'énergie. Ces deux bactéries peuvent être exploitées au niveau d'une station d'épuration des eaux usées ou être utilisées comme bio-stimulants.

Mots clés : Station de service, Sol, bactéries, identification, polluants organique, dégradation.

Isolation and identification of bacteria from a site contaminated with petroleum derivatives

Abstract. Soil bacteria have the ability to degrade various organic compounds present in a site polluted by oil or its derivatives. This medium is therefore a suitable choice for the isolation of strains that can be exploited for the treatment of polluted environments. For this, the objective of this study was to isolate and identify the bacteria from a soil collected from a fuel service station in Laghouat region. The bacteria were isolated in selective media and identification was carried out using morphological characteristics and biochemical properties.

Microbiological analyzes show the presence of a considerable bacterial biomass and also a variety with dominance of two *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. The biodegradation test of some organic pollutants (phenol, p-nitrophenol and cyclohexane) shows that only *Pseudomonas* and *Bacillus* are capable of degrading completely the phenol as sole source of carbon and energy. Both bacteria can be exploited at a sewage plant wastewater or used as bio-stimulants.

Keywords: Service Station, Sol, bacteria, identification, organic pollutants, degradation

عزل وتحديد البكتيريا من موقع ملوث بالمشتقات النفطية

ملخص. بكتيريا التربة لديها القدرة على تحليل المركبات العضوية المختلفة الموجودة في موقع ملوث بالنفط أو مشتقاته. إذن يشكل هذا الوسط، الوسط المناسب لعزل سلالات التي يمكن استغلالها لعلاج المناطق الملوثة. لهذا، كان الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتعريف البكتيريا التي تم جمعها من محطة خدمة وقود في منطقة الأغواط. تم عزل هذه البكتيريا في أوساط محددة لها، وأجري تحديد السلالات باستخدام الخصائص المورفولوجية وخصائص الكيمياء الحيوية. أظهرت الدراسة الميكروبيولوجية على وجود كتلة حيوية بكتيرية كبيرة و متنوعة، حيث هناك بكتيريتين سائدتين هما *Bacillus*, *Pseudomonas*. وقد أجريت بعض الاختبارات على مجموعة من الملوثات العضوية (الفينول، P- نيتروفينول والهكسان الحلقي) حيث أظهرت أن كل من *Bacillus*, *Pseudomonas* قادرة استعمال تلك الملوثات (كالفينول...) كمصدر وحيد للكربون والطاقة. و يمكن استغلال كل من هاتين البكتيريتين في معالجة مياه محطة الصرف الصحي أو استخدامها كمنشطات حيوية.

الكلمات المفتاحية : التحلل البيولوجي، الملوثات العضوية، الفينول، تحديد، العزلة، الزائفة، العصوية.