



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



Université Amar Telidji- Laghouat

FACULTE DE SCIENCES

DEPARTEMENT : Biologie

MEMOIRE DE MASTER

Présentées par : Barkat Hayat et Kired Oum Hani

DOMAINE : Science de la nature et de la vie

FILIERE : Microbiologie

OPTION : Microbiologie infectieuse et environnementale

Thème

**Etude cinétique de la dégradation du phénol par *Bacillus*
sp. I2 isolée à partir du sol contaminé par les dérivés de
pétrole**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
M. SIFI Brahim	Maitre Assistant Classe A	Président
M. MESSOUDI Oumar	Maitre Assistant Classe B	Examineur
Dr. HICHAM Gouzi	Maitre de Conférences Classe A	Rapporteur

Promotion: Juin 2015

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions le bon Dieu qui à aluminé notre chemin et qui nous a armés de force et de sagesse, ainsi la bonne volonté pour achever ce modeste travail.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre promoteur **Mr. GOUZI. H** qui a encadré nous dans ce travail pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi durant la période de la réalisation de ce travail.

Nous remercions tous les personelles de **L'INSTITU REGIONALE VITRINAIRE DE LAGHOUAT** de ces collaboration.

Nous 'adressesons également notre remerciements, à tous mes enseignants, qui l'ont donnée les bases de la science, et surtout **Mr. OUINTEN.M**

Nous remercions très sincèrement, les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de faire partie de la commission d'examineur.

Nous voulons remercier également tout les personnels du laboratoire de département de biologie pour sa gentillesse et son soutien.

Nos derniers remerciements, mais non les moindres s'adressent à tous nos amis de la promotion 2010, pour avoir beaucoup de sollicitudes et de chaleur humaine dont nous avions tant besoin.

Mes remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de loin à élaboration ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À mes très chers parents que j'aime plus que tous au monde et à lesquelles je dois toute ma vie et toutes mes réussites.

*A ma chère **maman** qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ses sacrifices et privations ne l'ont pas empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.*

*A mon cher **papa** qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*A ma sœur **Leïla** mon frère **Yahia Zakaria** qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements.*

A ma grande famille, grands et petits.

A mes chères Ami (e) s :

Aïcha , Hassna, Soumia, Noussaïba, Imane, Massouda, Azziz et Abdelkader

A tous mes ami(e)s de la promotion

En témoignage de ma profonde affection

Hayat

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

*A ma chère **maman** qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ses sacrifices et privations ne l'ont pas empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.*

*A mon cher **papa** qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*A mes **frères** : Hamada, Kadour, Issa, Khald, Mohamed, et mes **sœurs** : Rabia, Mbarka, Hadjr, Fadila, qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements.*

A ma grande famille, grande et petite.

A tous mes ami(e)s

Adle, Aicha, Aziz, Bahiya, Hayat, Iman, Mohamed, Rahma, Zohra bachirie.

A tous mes ami(e)s de la promotion

Oum hani

Résumé. L'objectif de ce travail est d'isoler des bactéries à partir du sol contaminé par les carburants au niveau d'une station-service de la région de Laghouat et d'étudier la cinétique de dégradation du phénol comme polluant organique.

Parmi les bactéries isolées, seulement la souche *Bacillus sp. I2* est capable d'assimiler le phénol présent dans le milieu minéral. Cette bactérie dégrade le phénol aux concentrations allant jusqu'à 700 mg/L. La température et le pH optimaux de dégradation du phénol par *Bacillus sp.* sont respectivement, 30°C et 7-8. La dégradation du phénol s'effectue en aérobiose. L'agitation du milieu à 250 rpm et la concentration en biomasse accélèrent la vitesse de dégradation du phénol. La cinétique de croissance de *Bacillus sp. I2* en présence du phénol suit parfaitement le model cinétique de Monod. Les paramètres cinétique de croissance sont : $\mu_{max} = 0.16 \text{ h}^{-1}$ et $K_s = 34.8 \text{ mg/L}$.

Mots clés : Station-service, sol, *Bacillus*, phénol, dégradation, cinétique.

ملخص. الهدف من هذا العمل هو عزل البكتيريا من التربة الملوثة بالوقود في محطة وقود التي تقع بمنطقة الأغواط ودراسة حركية تحلل الفينول كملوث عضوي.

من بين البكتيريا المعزولة *Bacillus sp. I2* فقط قادرة على استيعاب الفينول موجودة في المتوسط المعدني. هذه البكتيريا تفكك تركيزات الفينول التي تصل إلى 700 ملغ / ل، في درجة الحرارة ودرجة الحموضة المثلى لتحلل الفينول 30°C و7-8 على التوالي. يتم تحلل الفينول في ظل الظروف الهوائية. وتحت سرعة تحريك 250 دورة في الدقيقة بحيث يؤثر تركيز الكتلة الحيوية على تسريع عملية تحلل الفينول. ان حركية النمو لدى *Bacillus sp. I2* في وجود الفينول يتبع تماما النموذج الحركي لمونود. بحيث المعلمات حركية للنمو هي $\mu_{max} = 0.16 \text{ h}^{-1}$ و $K_s = 34.8 \text{ ملغ / ل}$.

كلمات البحث: محطة الوقود، التربة، *Bacillus sp. I2*، الفينول، التحلل، الحركية.

Summary. The objective of this work is isolate bacteria from soil contaminated with fuel at a gas station in Laghouat region and study the phenol degradation kinetics as organic pollutant.

Among the bacteria isolated, only the strain *Bacillus sp. I2* is able to assimilate the phenol present in the mineral medium. This bacterium degrades phenol concentrations up to 700 mg / L. The temperature and pH optima of degradation of phenol by *Bacillus sp. I2* are respectively, 30°C and 7-8. The degradation of phenol is carried out under aerobic conditions. The stirring of the medium at 250 rpm and the biomass concentration accelerates the rate of degradation of phenol. The growth kinetics of *Bacillus sp. I2* in presence of phenol perfectly follows the kinetic model of Monod. The growth kinetics parameters are: $\mu_{max} = 0.16 \text{ h}^{-1}$ and $K_s = 34.8 \text{ mg / L}$.

Keywords: station, soil, *Bacillus*, phenol, degradation kinetics.

TABLE DE LA MATIER

Résumé	I
Liste de Figure	IV
Liste de Tableau	VI
Liste d'abréviation	VII
Introduction	1

Parti 1 : Rappel Bibliographie

I. Cas particulier des stations-service.....	4
I. 1. Les Sources de pollution ponctuelle en milieu urbain.....	4
I. .2. Les hydrocarbures pétroliers	5
I. .3. Les stations-service cas particulière de pollution	7
I.3.1. Carburants.....	7
I.4. Biodégradation.....	9
II. Phénol – ses propriétés et son importance	10
II.1. Propriétés physico-chimiques	10
II.2. Origine et composition:.....	11
II.3. Production.....	12
II.4. Principales sources d'exposition.....	12
II. 5. Devenir dans l'environnement.....	12
II .6. Les normes en vigueur.....	14
III. Écotoxicologie	14
VI. Traitement d'élimination de phénol.....	16
VI.1. Méthodes non destructives.....	16

VI.2 Méthodes destructives	17
V. La biodégradation de phénol	17
V.1 aérobies biodégradations.....	18
V.2. Biodégradation anaérobie de phénol.....	19

Parti 2 : Matériel et méthode

1. Echantillonnage	21
2. Isolement de microflore.....	23
3. Sélection des souches susceptibles de dégrader le phénol.....	23
3.1. Test d'adaptation.....	23
3.2.1. Test de tolérance à des concentrations toxiques de phénol.....	26
4. Identification d'isolat capable de dégrader le phénol.....	27
5. Etude de cinétique de biodégradation de phénol.....	29
5.1. Étude de la dégradation en fonction de concentration du phénol.....	30
5.2. Étude de la dégradation en fonction de température.....	31
5.3. Étude de la dégradation en fonction du pH.....	32
5.4. Étude de la dégradation en fonction de la densité cellulaire.....	32
5.5. Étude de la dégradation en fonction de différente vitesse d'agitation.....	32
5.6. Étude de la dégradation en fonction d'aération.....	32
6. Conservation des souches.....	33

Parti 3 : Résultat et discussion

I. Résultat.....	34
II. Etude de cinétique.....	34
III. Discussions.....	42

Parti 4 : Conclusion

Conclusion.....	43
Reference bibliographique.....	VII
Annexe.....	XVIII

LISTE DE FIGURE

Figure 01 : Composition de pétrole brut	7
Figure 02 : Composants de l'essence	9
Figure 03 : Composants de gasoil	9
Figure 04 : Structure chimique de la molécule de phénol (C ₆ H ₅ OH)	11
Figure 05 : La voie aérobie pour la biodégradation du phénol.....	20
Figure 06 : La voie anaérobie pour la biodégradation du phénol	21
Figure 07 : Localisation des sites d'échantillonnage	21
Figure 08 : Les échantillons de sol prélevé.....	22
Figure 09 : Dosage colorimétrique de test d'adaptation	24
Figure 10 : Dosage colorimétrique de test de dégradation en T ₀	25
Figure 11 : Dosage colorimétrique de test de dégradation en T _{finale}	26
Figure 12 : L'aspect macroscopique d'isolat (2).....	26
Figure 13 : L'aspect microscopique d'isolat (2).....	27
Figure 14 : Le milieu de culture incubé et agité.....	29
Figure 15 : Dosage colorimétrique de phénol au t ₀	30
Figure 16 : Conservation des souches au sable stérile.....	33
Figure 17 : Effet de température sur la biodégradation de phénol; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO _{620nm}), (B) évolution de phénol résiduel en fonction du temps	33
Figure 18 : Effet de la température sur la vitesse spécifique de croissance (μ)	35
Figure 19 : Effet de pH la biodégradation de phénol ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO _{620nm}), (B) Evolution de phénol résiduel en fonction de temps	35
Figure 20 : Effet du pH sur la vitesse spécifique de croissance (μ).	36
Figure 21 : L'effet des différentes vitesses d'agitation sur la biodégradation de phénol ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO _{620nm}), (B) l'évolution de phénol résiduel en fonction de temps	37
Figure 22 : L'effet d'aération sur la biodégradation de phénol ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO _{620nm}), (B) l'évolution de phénol résiduel au fonction de temps	38

Figure 23 : Effet de biomasse sur la dégradation de phénol **39**

Figure 24: Effet de concentration de phénol sur la cinétique de biodégradation ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO_{620nm}), (B) évolution de phénol résiduel en fonction de temps **39**

LISTE DE TABLEAU

Tableau 01 : Classification des composés phénolique	XIX
Tableau02 : Propriétés physico-chimiques de phénol	11
Tableaux 3 : List des diffèrent microorganismes inclus en dégradation de phenol	XX
Tableau 04 : Les différents isolats obtenus à partie d'échantillons de sol	23
Tableau 05 : Pourcentage de distribution de chaque isola dans le sol prélevé	23
Tableau 06: Caractéristique Morphologies et biochimique d'isolat apte à dégrade le phenol.....	28
Tableau 07 : Comparaisons de gamme de concentration de phénol.....	35
Tableau 08 : Les paramètres de Haldane pour différentes bactéries cultivées dans le phénol.....	43

Liste d'abréviation

BN	Bouillon nutritive
CF	Concentrations efficaces
DO	Densité Optique
FCB	Facteurs de bioconcentration
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
Ks	constance de dissociation (mg/L) ;
O.M.S	Organisation mondiale de la santé
Rpm	Toures par minute
S	Phénol (mg/L) ;
μ	Vitesse spécifique de croissance (h ⁻¹) ;
μ_{\max}	Vitesse spécifique de croissance maximale (h ⁻¹).

INTRODUCTION

Depuis toujours l'Homme agit plus ou moins directement sur l'environnement, cette action a pris plus d'ampleur au cours des derniers siècles avec l'apogée de l'industrie et les progrès dans les sciences et technologique qu'elles soient industrielles, agricoles ou domestique. Ses activités rejettent des quantités croissantes de substance polluantes ou de déchets. Cette pollution présente des risque pour la santé humaine par l'exposition directe avec les polluants ou indirecte via l'eau, l'air les sédiments et le sol (Flambeau, 1999 ; Christophe, 2007).

La prise de croissance de ces risque conduit à la nécessité d'établir des diagnostics de la pollution de mettre en œuvre des moyens pour y remédier (Soltani, 2004). Dans nombreux environnement contaminés notamment le sol et l'eau, présents des contaminations multiple, à la fois organique et métallique, ce qui rend plus complexe encore d'évaluation des risque et traitement de la contamination (Martin, 2011).

La pollution de sol risque silencieux négligeable par le monde, ainsi les autorisations d'exploitation délivrées jusqu'il y a peu ne mentionnaient aucune précaution à prendre pour prévenir la pollution de sol et de sous-sol (Morini, 2007). Ce manque de cadre législatif passait bien sur un problème (Aüllo, 2013). Mais de plus en plus ou reconnaît que le sol est un milieu écologique sensible au même titre que le milieu atmosphérique ou le milieu aquatique (Bernal-Martinez, 2005).

La pollution de sol par les carburants devenus un composant épineux de développement urbain et comme un cas particulière les stations-service, qui représente source importante de pollution urbain (Sangely, 2010). L'exploitation de ce type d'activité représente une source potentielle de pollution atmosphérique, pollution de sol et des eaux, mais la contamination de sol par les dérivés des hydrocarbures constitue un des risque majeurs pour l'environnement et constitué le thème centrale de ce travail (Chebli, 2012).

On peut dire que le phénomène de pollution des sols et sous-sols provenant des stations-service, se décline en deux catégories: d'une part, une pollution chronique se produisant sur une longue période et étant due le plus souvent à la corrosion des cuves et des canalisations enterrées (Piedrafita et Victoria, 2007). D'autre part, la pollution accidentelle due au

déversement d'hydrocarbure lors du remplissage des stockages de la station ou de la distribution de carburant. (Vrignaud, 1998 ; Piedrafita et Victoria, 2007).

A l'heure actuelle, la technique de biorémediation c'est avéré l'un des processus les plus compatibles à l'environnement et efficace en terme d'élimination des polluants par rapport aux techniques physico-chimiques. La biotechnologie visent à optimiser le potentiel biologique naturel de dégradation des hydrocarbure grâce aux microorganismes qui jouent un rôle important dans la biorémediation des milieux pollués par le baie de dégradation, qui transforment la structure des produits chimiques introduits dans l'environnement par l'action enzymatique ou métabolique (Zarafi et al, 2007 ; Patil, 2014). Un grand nombre de composés organiques naturels et synthétiques sont biodégradables par des microorganismes dans le cadre de leur métabolisme normal de l'énergie et croissance (Sarwade et Gawai, 2014).

Le secteur des produits chimique organiques est la plus grande source de phénol qui est un composé polaire oxygénée de famille d'hydrocarbure aromatique hétérocyclique. cette substance sert principalement à fabriquer de résines phénoliques et est surtout émise par les raffineries de pétrole, les sidérurgies, les usines d'épuration des eaux usées et l'industrie des colorants et des matières plastiques.

Les effluents industriels contiennent des quantités non négligeables en phénol. Par conséquent, ce composé est à l'origine des effets écotoxiques aigus et chroniques chez la faune et la flore. Plusieurs travaux ont été consacrés au développement de méthodes d'élimination de ce polluant à partir des eaux usées et la plus part d'entre elles repose sur l'utilisation des bactériés (ECSC, 2003).

D'après nos connaissances peu de travaux ont été réalisé sur la dégradation du phénol par les bactéries isolées à partir du sol provenant de la station-service de distribution de carburant.

Pour cela, l'objectif principal de ce travail est tout d'abord d'isoler et d'identifier les bactéries capables de dégrader le phénol comme seule source de carbone en solution. Ensuite, nous sommes intéressé à optimiser les conditions physicochimiques pour améliorer la cinétique de biodégradation du phénol.

Ce mémoire a été organisé en différents parties décrivant les étapes successives de cette étude.

La première partie concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur les station-service de distribution des carburants et l'impact de ses derniers sur l'environnement, sur le phénol est ses propriétés physico-chimiques et toxicologique. Les bioprocédés de dégradation du phénol ont été également décrit dans cette partie.

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

Parti 1

Rappel Bibliographique

La pollution des sols est une composante épineuse du développement urbain à laquelle se trouvent confrontées les collectivités locales, et les institutions en charge, tant pour garantir la santé des populations que pour accompagner le développement économique. Les pouvoirs publics n'ont le plus souvent pas de légitimité, ni de moyens propres pour intervenir. Mais ils peuvent jouer un rôle important d'information, de facilitateurs et de coordinateurs pour trouver des solutions acceptables. Le milieu urbain est en effet à l'origine de plusieurs sources de pollution des sols (Piedrafita et Victoria, 2007).

I. Cas particulier des stations-service

Comme nous avons déjà mentionné, les stations-service sont une source importante de pollution urbaine et elles vont être le fil conducteur de ce mémoire. L'exploitation de ce type d'activité représente une source potentielle de nuisances (trafic, bruit, pollution atmosphérique, pollution du sol et des eaux) pour le voisinage direct, mais aussi pour l'environnement en général (Ould Amar, 2013). Mais la contamination des sols par les carburants constitue un des risques majeurs pour l'environnement et constitue le thème central de ce travail (Piedrafita et Victoria, 2007). Le phénomène de pollution des sols et sous-sols provenant des stations-service se décline en deux catégories:

D'un côté, une pollution chronique se produisant sur une longue période et étant due le plus souvent à la corrosion des cuves et des canalisations enterrées (Vrignaud, 1998 ; Piedrafita et Victoria, 2007). De l'autre côté la pollution accidentelle due au déversement d'hydrocarbure lors du remplissage des stockages de la station ou de la distribution de carburant (Vrignaud, 1998).

I. 1. Les Sources de pollution ponctuelle en milieu urbain

La présence d'un type ou autre de polluant n'a pas du tout la même signification en terme d'évaluation des risques. Par exemple concernant les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), polluants caractéristiques des stations-service, des travaux récents montrent que les HAP responsables de la toxicité sont les HAP nitrés qui ne représentent qu'une petite partie des HAP (INRS, 2006). C'est pourquoi il est très important d'établir une caractérisation des polluants provenant des stations-service (Piedrafita et Victoria, 2007).

I. .2. Les hydrocarbures pétroliers

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts (**Favenec, 1998**. Soltani, 2004).

D'après Franennec et *al.*,1998 et même Céfal en 2004, Les hydrocarbures sont des composés organiques dont la formule chimique comprend uniquement des atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H), ils ont pour formule brute C_nH_m où n et m sont deux entiers naturels.

Les hydrocarbures pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon l'origine (Fig 1):

a) Les hydrocarbures saturés représentent (30 à 70 %) d'hydrocarbure pétrolier:

Les 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) (**Lefebvre. G., 2005**);

Les alcanes ramifiés: les plus abondants sont les *iso*-alcanes (Saliot, 1981 ; **Céfal, 2004**);

Les cycloalcanes: renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués.(**Lefebvre, 2005**)

b) Les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %),

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts (Bouchez et *al.*, 1996; Saliot, 1981). Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques (Neff, 1979). En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes (Soltani, 2004).

c) Les composés polaires de(5 à 25 %)

Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que:

- Composés oxygénés: (phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,...)

- Composés soufrés: (mercaptans, sulfures, disulfures,...). Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés (Soltani, 2004 ; **Céfal, 2004**).

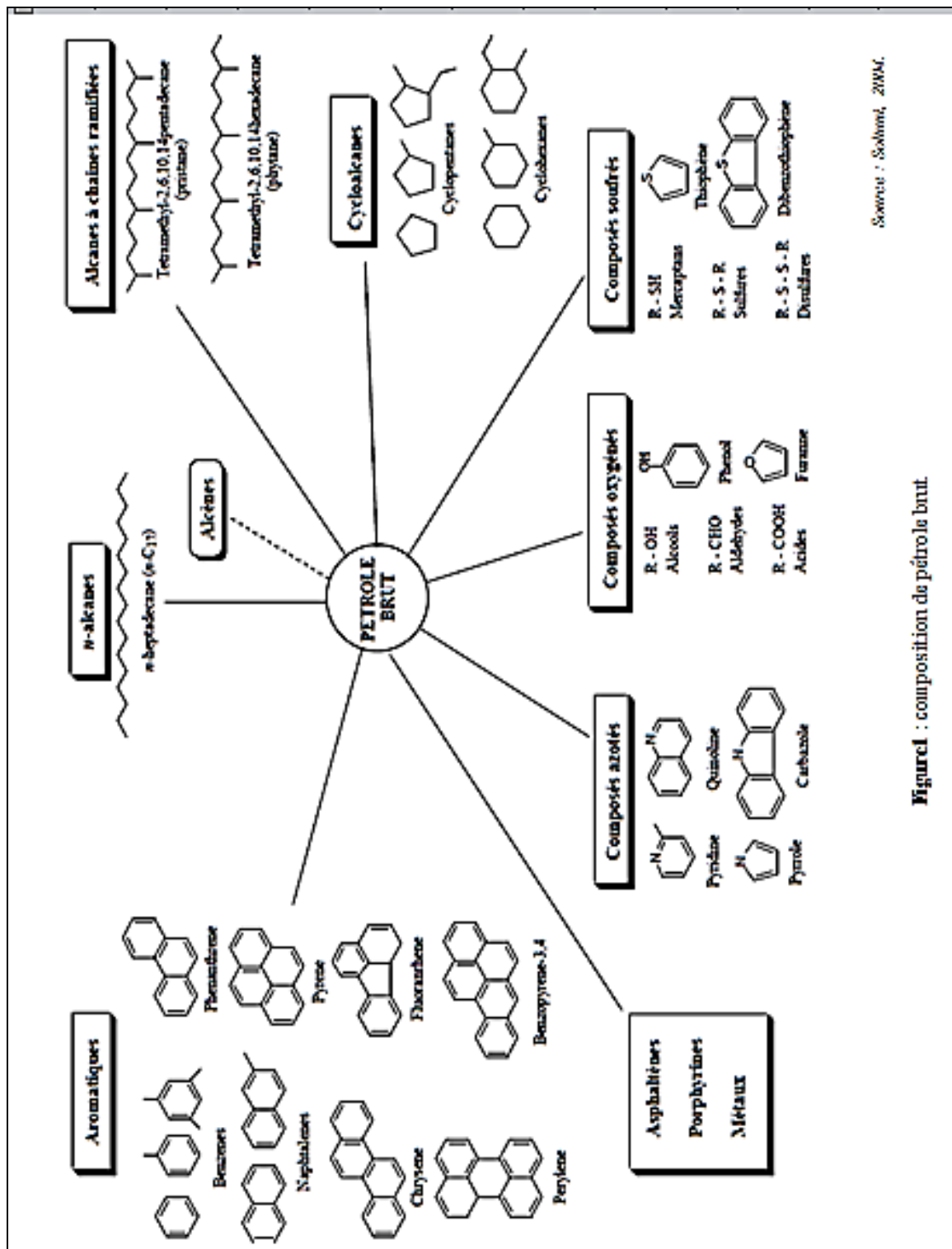
- Composés azotés: (pyridines, quinoléines,...)

d) les asphaltènes et les métaux lourds (0 à 10 %)

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, La structure de ces composés est mal connue du fait, d'une part de leur composition chimique complexe (Eglinton et *al*, 1962; Saliot, 1981 ; **Céfal, 2004**).

Les métaux sont également présents mais à l'état de traces.

Les plus abondants sont le vanadium et le nickel, mais du fer, du sodium, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés (Soltani, 2004 ; **Céfal, 2004 ;Lefebvre, 2005**)



Source : Sobkow, 2004.

Figure 1 : composition de pétrole brut.

I. .3. Les stations-service cas particulière de pollution

Les principaux liquides qui peuvent se trouver dans une station-service et susceptibles de provoquer une pollution du sol et/ou des eaux souterraines sont les carburants (essence, gazole) et les lubrifiants (huiles, graisses, liquides de freins).

1.3.1. Carburants

Les carburants tels que l'essence et le gazole sont stockés et vendus dans les stations-service. Il s'agit des mélanges complexes d'hydrocarbures pétroliers. La composition en hydrocarbures dépend de facteurs comme l'origine du pétrole brut soumis au raffinage et les conditions de raffinage (Piedrafita et Victoria, 2007).

En outre, divers additifs sont ajoutés en petites quantités (voire en traces) pour améliorer les propriétés techniques des carburants: produits antidétonants, anti-oxydants, antigels, substituts du plomb et colorants.

1.3.1. 1. Essence et Gasoil :

L'essence est un liquide incolore ayant une odeur caractéristique. Elle peut être colorée en jaune. Elle se compose principalement de chaînes d'hydrocarbures de 4 à 12 atomes de carbone.

Le diesel se compose de fractions plus lourdes, principalement de chaînes d'hydrocarbures de 10 à 28 atomes de carbone (INRS, 2002).

L'essence contient autour de 230 hydrocarbures individuels et le gazole entre 2000 et 4000 hydrocarbures que sauf pour le cas des n-alcanes et quelques branches d'hydrocarbures ne peuvent pas être identifiés comme des composants séparés.

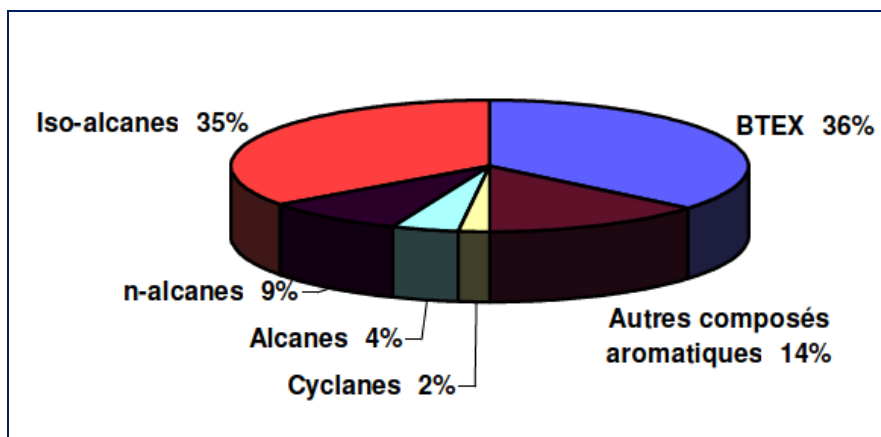
La proportion que les composants mentionnés représentent dans l'essence et le gazole est différente comme nous pouvons constater dans les graphiques ci-dessous (fig2 et3). (Marchal et al ; 2003).

1.3.1. 2. Supercarburant sans plomb

: composé par hydrocarbures (paraffiniques, naphténiques, aromatiques et oléfiniques) avec principalement des hydrocarbures de C4 à C12 (benzène, n-hexane et toluène). Eventuellement contient des composés oxygénés : Méthanol, Ethanol, Ethers, Alcool (iso-propylique, iso-butylique et ter-butylique) et même des additifs multifonctionnels améliorant les performances.

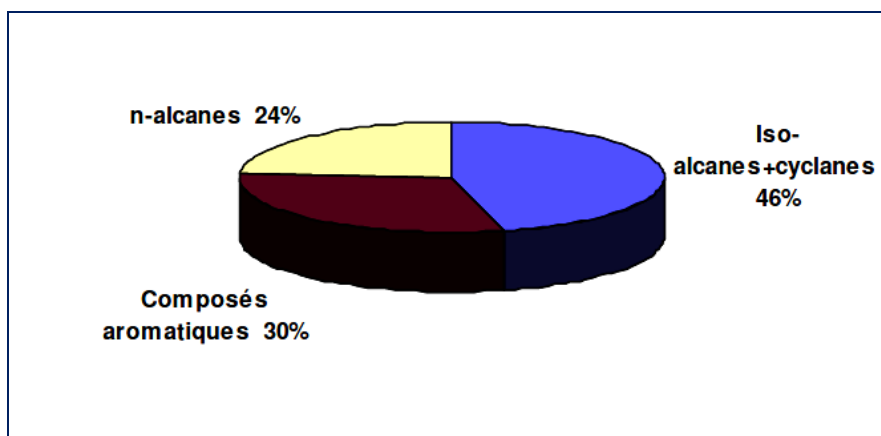
I.3.1. 3. Diesel :

constitué par des hydrocarbures (paraffiniques, naphthéniques, aromatiques et oléfiniques avec principalement des hydrocarbures de C9 à C20). Eventuellement : des esters d'huiles végétales tels que l'ester méthylique d'huile de colza et des additifs multifonctionnels améliorant les performances.(INERIS, 2002)



Source : (Marchal et al ; 2003)

Figure 02 : Composants de l'essence



Source : (Marchal et al ; 2003)

Figure 03 : Composants de gasoil

I.3.2. Lubrifiants

Les lubrifiants provenant des véhicules routiers soient présentes aussi sur une station-service.

On y observe principalement les types de polluants suivants : huiles usées, graisses ou liquides de freins.

Les lubrifiants sont un mélange d'huile de base et d'additifs qui renforce les qualités naturelles de l'huile de base. Les huiles de base sont le constituant principal de l'huile (75 à

85%). Elles peuvent être d'origine minérale ou synthétique. Les bases minérales sont produites par le raffinage du pétrole brut et les bases synthétiques par synthèse chimique.

Les lubrifiants pétroliers sont difficilement dégradables aussi bien dans le sol que dans l'eau. Perdues sur le sol, ces huiles peuvent être entraînées jusqu'aux nappes phréatiques ou jusqu'aux rivières.

I.4. Biodégradation

Le devenir des polluants rejetés dans l'environnement est principalement gouverné par les processus de biodégradation (Piedrafita et Victoria, 2007). L'existence de ces phénomènes dépend de la biodégradabilité intrinsèque du polluant mais aussi de la présence de microflore dégradatrices compétentes dans les sols et les eaux souterraines et des facteurs environnementaux du site et même la composition de polluant (Solano et al, 2001).

Comme nous avons déjà mentionné, l'essence est un mélange complexe d'environ 200 hydrocarbures, tous identifiables et le gazole un mélange de 2000 et 4000 hydrocarbures qui pour la plupart ne peuvent pas être identifiés comme des composants séparés (Marchal et al ; 2003 ; Piedrafita et Victoria, 2007).

En outre, la capacité de dégradation des carburants est largement répandue parmi les microflore de l'environnement (Marc et al, 2005 ; Aouad et Bouziane, 2012 ; Xiangsheng et al, 2012). Les microflore des sols pollués présentent en général une capacité de dégradation légèrement supérieure à celle des sols non pollués (Piedrafita et Victoria, 2007). Plusieurs mécanismes peuvent rendre compte de l'efficacité des microflore provenant d'environnements pollués :

- la présence de microorganismes ayant un métabolisme spécialisé ;
- l'existence de cométabolisme ;
- des interactions positives entre souches (coopération) (Calvo et al, 2003).

II. Phénol – ses propriétés et son importance :

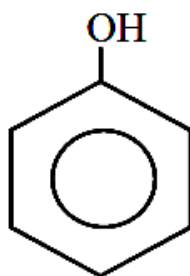
Le terme phénolique très large et comprends des composé chimiques divers. Ces composés sont classifiés par Harborne and Simmonds (1964) selon le nombre de carbones dans la molécule (tableau1 Annexe) (Ralph et Wilfred, 2006).

Le phénol est un composé aromatique (figure 4) (Chandana Lakshmi et al, 2011). Il a été découvert par Runge en 1834 dans le goudron provenant de la houille (Bouazza, 2012).

Mais c'est en 1842 que la vraie composition chimique et son poids moléculaire de 94,11g/mol ont été donnés par le chimiste français Auguste Laurent (Messikh, 2008). En

tant que groupe, à l'état naturel, la majorité des composés phénoliques est d'origine végétale et comprend les composés phénoliques simples comme par exemple le salicylate, la gallate, l'hydroxyquinone, le benzoate et les arômes ainsi que des composés phénoliques polymères tels que les lignines, les flavonoïdes, les tannins et quelques autres (Ralph et Wilfred, 2006 ; Messikh.2008). Au total, quelques milliers de phénols produits par les plantes ont été identifiés (Messikh, 2008).

Industriellement, le phénol est un composé important, il est utilisé dans la fabrication des antioxydants, des herbicides, des adhésifs, des résines synthétiques et des peintures et il aussi utilisé par les développeurs de photos, en médecine et dans la production pharmaceutique(Mosbahou et *al.*2007).



Source : Hasan et Jabeen, 2014

Figure.04 : Structure chimique de la molécule de phénol (C₆H₅OH)

II.1. Propriétés physico-chimiques :

Le phénol pur est un solide blanc à rose pâle à 20°C qui se présente sous forme d'une masse cristalline(Shiu *et al.* 1994; Mackay *et al.* 1995 ; Michałowicz et Duda, 2007). Ses propriétés physico-chimiques sont présentées dans le tableau 2 Annexe. En e d'impuretés ou sous l'influence de l'humidité, de la lumière, de l'air et de certains catalyseurs comme le cuivre et le fer, ce produit peut se teinter en jaune ou en rouge (Bouazza, 2012).Il est également très soluble dans de nombreux solvants organiques usuels, notamment l'éthanol, l'éther et l'oxyde de diéthyle (Messikh, 2008 et Bouazza, 2012).

Tableau02 : Propriétés physico-chimiques de phénol

Propriété	Grandeur	Travaux cités
Point de fusion (°C)	41	Verschueren, 1983
Point d'ébullition (°C)	182	Verschueren, 1983
Tension de vapeur (Pa)	47	Dean, 1985
Constante de la loi d'Henry (Pa·m ³ /mol)	0,059	Abd-El-Bary <i>et al.</i> , 1986
pKa	9,99	Dean, 1985
Log K _{co} (coefficient de sorption sur le carbone organique)	1,15-3,49	DMER et AEL, 1996
Log K _{oe} (coefficient de partage entre l'octanol/eau)	1,46	Fujita <i>et al.</i> , 1964
Solubilité dans l'eau (mg/L)	88, 360	Blackman <i>et al.</i> , 1955

Source :ECSC, 2003.

II.2. Origine et composition:

Le phénol est présent à l'état naturel dans le bois et les aiguilles de pin, dans l'urine des herbivores (sulfate phénolique) et dans le goudron de houille (Messikh, 2008 et Bouazza, 2012). Les phénols monovalents forment dans la nature de nombreuses substances odorantes (par exemple vanille, thymol dans le thym, carvacrol, zingivérone dans le gingembre, aldéhyde salicylique). Parmi les phénols polyvalents de synthèse, l'hexachlorophène est particulièrement toxique (Hank, *et al.*, 2010). La décomposition de déchets organiques divers ; le métabolisme humain et animal sont également responsables de la présence naturelle du phénol dans l'environnement. Les incendies de forêt peuvent en augmenter les concentrations naturelles (Bouazza, 2012).

II.3. Production

Le phénol est obtenu par distillation du goudron de houille. Cependant, la méthode de synthèse qui prévaut à l'heure actuelle est la dissociation de l'hydroperoxyde de cumène, avec comme sous-produit l'acétone (Messikh, 2008 ; Michałowicz et Duda, 2007).

Le phénol est aussi parfois produit à partir du benzène en passant par l'acide sulfonique de benzène ou par le chlorobenzène (Messikh, 2008 et Bouazza, 2012 ; Michałowicz et Duda, 2007). Des émissions sont produites par la combustion incomplète d'essence et de goudron de houille, dans les effluents des cokeries ainsi que sous la forme de métabolites dans la photolyse du benzène et du chlorobenzène (Amrouche et *al.*, 2011).

II. 4. Principales sources d'exposition

La présence de phénol dans l'environnement provient des eaux résiduaires et des flux d'air rejetés lors de la production, de la transformation ou de l'utilisation du phénol (Harzallah, 2011). Les échappements des moteurs thermiques, la dégradation photochimique du benzène. Le phénol est fabriqué en tant qu'intermédiaire de la préparation d'autres produits chimiques et il peut être libéré comme sous-produit ou contaminant (Mosbahou et *al.*, 2007). Il en est de même pour les usines de cokéfaction et de carbonisation à basse température, de la combustion du bois et du tabac (Messikh, 2008). Les incendies de forêt peuvent en augmenter les concentrations naturelles (Arutchelvan et *al.*, 2005)

La décomposition de déchets organiques divers, le métabolisme humain et animal sont également responsables de la présence de phénol dans l'environnement (Bouazza, 2012).

II. 5. Devenir dans l'environnement

Il existe plusieurs synthèses des publications scientifiques sur la vitesse de dégradation du phénol dans divers milieux. Environnement Canada, 2003 propose selon (Shiu et *al.*, 1994; Mackay et *al.*, 1995), que la photo-oxydation dans l'air et la biodégradation dans l'eau et le sol soient les principaux facteurs de disparition du composé. Voici un court résumé du devenir du phénol dans chaque milieu (DMER et AEL, 1996 *in* ECSC, 2003).

I. 5. 1. Atmosphère

Dans l'atmosphère, le phénol existe surtout en phase gazeuse (Eisenreich et *al.*, 1981). Les vapeurs de phénol sont plus lourdes que l'air et forment des mélanges explosifs sous l'effet de la chaleur (Messikh, 2008). Sa demi-vie estimative y varie en général selon des conditions atmosphériques précises (p. ex., température, moment de l'année); les publications donnent des temps de 2,28 à 22,8 h pour sa réaction avec les radicaux

hydroxyles (RIVM, 1986; Howard, 1989; Howard et *al.*, 1991 ; DMER et AEL, 1996 *in* ECSC, 2003), ainsi que Shui et *al.*, (1994) avancent une demi-vie de 17 h dans l'air sous l'action de la photo-oxydation. En raison de sa courte durée de vie, le phénol ne devrait pas franchir de grandes distances dans l'atmosphère selon les travaux d'Environnement canadienne en 2003.

I. 5. 2. Sols

Les propriétés physico-chimiques du sol qui influent sur le devenir et le comportement du phénol sont le pH, la capacité d'échange, la teneur en matière organique, la teneur en argile et la texture du sol. Le phénol peut participer à de nombreux processus entraînant son élimination, notamment la biodégradation, l'adsorption et la désorption, la volatilisation et l'oxydation. Ces processus déterminent sa mobilité (p. ex., sa lixiviation), sa répartition et sa persistance dans le sol. La demi-vie signalée du phénol, du fait de la biodégradation, dans les divers types de sols, varie de 2,7 à 552 h (Alexander et aleem, 1961; Scott et *al.*, 1982; Federle, 1988; Howard et *al.*, 1991; Loehr et Mathews, 1992; DMER et AEL, 1996 *in* ECSC,2003).

Le phénol est sensible aux agents oxydants (notamment aux ions métalliques tels que les ions manganèse et fer) et il peut, par auto-oxydation, former des complexes colorés tels que les quinones (Rineheart, 1973).

I. 5. 3. Eau

Le phénol réagit comme un acide faible dans l'eau (ECSC, 2003). Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer. Il se dissout lentement et même dilué, continu de former des solutions toxiques (Messikh, 2008).Le phénol peut participer à de nombreux processus qui entraîneront sa disparition, notamment la biodégradation, la photo-oxydation, la photolyse et la volatilisation. le phénol n'est pas persistant dans l'eau et qu'il est totalement biodégradé en environ 70 h (Mackay et *al.*, 1995; DMER et AEL, 1996 *in* ECSC , 2003). L'ECSC a été signalé par Howarden 1989 une demi-vie de 100 h dans l'hypothèse d'une réaction avec le radical hydroxyle, et de 19,2 h dans celle d'une réaction avec le radical.

I. 5. 4. Sédimentation

Selon les propriétés physico-chimiques du phénol on ne s'attend donc pas à ce qu'il soit considérablement adsorbé sur les matières en suspension ou les sédiments (ECSC,

2003), ainsi que (Shiu et *al.* 1994), ont chiffré à 550 h la demi-vie du phénol dans les sédiments, par suite de sa biodégradation.

I. 5. 5. Biote

Après le calcul de le logarithme des facteurs de bioconcentration (FCB) de de 7,6 par le groupe chercheur d'ECSC en 2003, la bioaccumulation du phénol ne devrait pas être considérable.

II .6. Les normes en vigueur

Les niveaux élevés typique de concentration de phénol dans les eaux usées notamment les usines qui produisent le phénol parfois atteindre jusqu' à 3000–4000 mg/L (Godjevargova et *al.*, 2003 in Li et *al.*, 2010). La U.S. EPA fixe le teneur de phénol dans les eaux purifiées rejetées aux eaux de surface entre 0.01 – 2.0 µg/L, et moins que 1 ng/m³ dans (Li et *al.*, 2010 ; Michałowicz et Duda, 2007)

L'organisation mondiale de la santé (O.M.S), indique comme teneur des phénols dans l'eau destinée à la consommation de 0.5 µg /l (Marchand, 1989 ; Bouazza 2012), par contre la réglementation Algérienne fixe cette teneur en phénol pour les rejets industriels à 0.5 mg/l selon le Décret exécutif n°93-160 du 10 Juillet 1993 (Bouazza, 2012).

III. Écotoxicologie

III. 1. Organismes aquatiques

La toxicité aiguë du phénol pour les organismes dulçaquicoles a été très étudiée. Les poissons et les invertébrés se sont révélés sensibles à des concentrations efficaces CF entre 2 mg.l⁻¹ jusqu'à 2 000 mg.l⁻¹ varies selon l'espèce et même la qualité d'eau (McLeay, 1976; Kishino et Kobayashi, 1995). Les concentrations efficaces peuvent inhiber la multiplication cellulaire notamment au stade embryonnaire et des tétrades particulièrement les amphibiens, ces effets toxiques signalés après une exposition de courte durée au phénol chez les organismes marins (Kamshilov et Flerov, 1978).

En revanche les algues d'eau douce sont moins sensibles que le poisson et les invertébrés à l'exposition aiguë au phénol. Chez les plantes macroscopiques aquatiques et les plantes vasculaires reprennent de croissance anormale si la concentration efficace située

entre 3-1 500 mg.l⁻¹ toujours variable selon l'espèce (Blackman et *al.*, 1955; Rowe et *al.*, 1982 in ECSC, 2003).

III. 2. Organismes terrestres

Plusieurs chercheurs ont signalé les effets du phénol sur des organismes terrestres. Les végétaux terrestres ont abouti à la mise en évidence de concentrations correspondant à des effets chroniques de 79 à 170 mg/kg de poids sec (ECSC, en 1995 et 2003). Parmi les espèces de végétaux examinés, la plus sensible était la laitue. Le phénol inhibe considérablement la nitrification, plus particulièrement aux concentrations supérieures à 500 mg/kg. Une seule étude portait sur les effets du phénol sur la faune. L'accroissement du taux de mortalité chez les lombrics exposés à des concentrations de 188 à 6 900 mg/kg.(Neuhauser et *al.*, 1986; Neuhauser et Callahan, 1990; Environnement Canada, 1995) selon un rapport publié par ECSC, 2003.

Concernent les mammifères examinés *in vitro* et même *in vivo*, aucune toxicité pour la reproduction et le développement ni effets cancérigène (Wagenheim et Bolcsfoldi, 1988 ; bonnard el *al.*, 2011), ailleurs les expériences *in vitro* obtenu des résultats que le phénol est mutagène *in vitro* ; *in vivo*, il augmente légèrement le taux de micronoyaux dans les érythrocytes, à des doses toxique uniquement(bonnard el *al.*, 2011).

III. 3. Homme

Le phénol présente une toxicité aiguë pour l'être humain, après exposition par voie orale et cutanée, les enfants étant plus susceptibles que les adultes, Il est également très irritant pour la peau, les yeux et les muqueuses. (ECSC, 2003 ; bonnard el *al.*, 2011). L'exposition prolongée entraîne une paralysie du système nerveux central ainsi que des atteintes rénales et pulmonaires(Messikh.2008).Cette paralysie peut entraîner la mort. Pour ce qui concerne les autres sièges du cancer, aucune association cohérente entre l'exposition au phénol et la mortalité accrue due au cancer ne se trouvait dans les études épidémiologiques (Wilcosky et *al.*, 1984; Dosemeci et *al.*, 1991; Siemiatycki, 1991; Pottern et *al.*, 1992; Kogevinas et *al.*, 1995 in ECSC, 2003).

VI. Traitement d'élimination de phénol

Face à des contraintes réglementaires de plus en plus sévères, la lutte contre la pollution industrielle s'est intensifiée. Les effluents doivent être alors soumis à des traitements spécifiques pour satisfaire aux normes de rejet édictées par la législation. Les différents

procédés de traitements, selon l'origine (type d'industrie), la nature (organique ou minérale), et la forme de la pollution (soluble, colloïdale et en suspension).

Plusieurs méthodes ont été proposées pour l'élimination du phénol, que ce soit physico-chimique ou biologique, celles qui ont pour objectif la récupération d'une partie du phénol dissous, alors que d'autres visent la destruction du phénol (Messikh, 2008).

VI.1. Méthodes non destructives

Ces méthodes ne modifient pas la nature des espèces, elles visent simplement l'extraction des substances toxiques du milieu pollué, ailleurs (Messikh, 2008). Ces techniques sont généralement accompagnées par des procédés de recyclage ou de récupération.

Adsorption: le charbon actif est l'agent le plus couramment utilisé et peut adsorber jusqu'à trois fois son poids en produits organiques (Marchand, 1998 ; Messikh, 2008). Le charbon peut être ensuite brûlé ou régénéré par pyrolyse (Patil, 2014). Cette technique se limite aux concentrations de substances toxiques très diluées (Messikh, 2008 et Patil, 2014).

Extraction liquide- liquide : cette technique est basée sur la différence de solubilité des polluants entre une phase aqueuse et une phase organique insoluble (Patil, 2014). Les solvants sont ensuite régénérés par distillation ou par réextraction (Marchand, 1998).

Stripping : le stripping par le gaz ou par la vapeur d'eau est sans doute la technique la plus performante et la moins coûteuse pour isoler les substances organiques volatiles, ou même les solvants organiques d'une eau polluée. Ensuite les solvants et les produits toxiques sont séparés par décantation du condensât et sont finalement recyclés ou brûlés.

Procédés membranaires : Ces procédés visent à concentrer les eaux polluées. Les concentrats sont ensuite recyclés ou minéralisés par oxydation ultérieure (Messikh, 2008 ; Hank, et al, 2010 et Patil, 2014).

Distillation : L'évaporation est également une des méthodes couramment utilisées. Cependant, elle présente souvent un problème de contamination du distillat par des produits volatils.

V.2 Méthodes destructives :

Elles transforment les substances toxiques en d'autres produits ou les détruisent complètement (Hank, et al, 2010). Le but de telles techniques est de diminuer la toxicité des eaux résiduaires.

Oxydation chimique : Elle est employée généralement lorsque les processus biologiques ont peu d'efficacité. Cette technique utilise plusieurs oxydants : le chlore, l'ozone comme l'oxydant le plus fort, et même le Peroxyde d'hydrogène (Messikh, 2008 ; Hank, et *al.*, 2010 et Patil, 2014).

Traitement biologique : La purification des eaux polluées par voie biologique est une des méthodes les plus utilisées. C'est généralement la dernière étape d'une série de procédés de traitement (Messikh, 2008 et Patil, 2014). Elle n'assure en effet qu'une élimination partielle du COT composé organique totale (minéralisation de substrat organique) et les micro-organismes ne supportent pas des concentrations de produits toxiques supérieures à des valeurs comprises entre 1 et 5 ppm (Agteren, 1998). Le traitement biologique est en perpétuel développement (Patil, 2014).

V. La biodégradation de phénol

La biodégradation est un processus par lequel les organismes microbiens transforment la structure des produits chimiques introduits dans l'environnement par l'action enzymatique ou métabolique (EPA, 2009 in Patil, 2014). Un grand nombre de composés organiques naturels et synthétiques sont biodégradables par des microorganismes dans le cadre de leur métabolisme normal de l'énergie et croissance (Sarwade et Gawai, 2014). Une partie de la matière organique, servant de primaire d'électrons et la source d'énergie, est converti en produits finis oxydés par des réactions d'oxydation / réduction (Basha et *al.*, 2010). L'autre partie du carbone organique est synthétisé en matériau cellulaire (Patil, 2014).

Mécanisme de phénol biodégradation

Le phénol est utilisé par les microorganismes aérobies et anaérobies sont présenté au tableau 3 Annexe. Les microorganismes se dégradent le phénol par l'action de diverses enzymes (Sahar, 2006 ; Basha et *al.*, 2010). Ces enzymes peuvent inclure hydroxylases, oxygénases, peroxydases, tyrosinases, laccase et oxydases (Nair et *al.*, 2008 in Patil, 2014 ; Basha et *al.*, 2010).

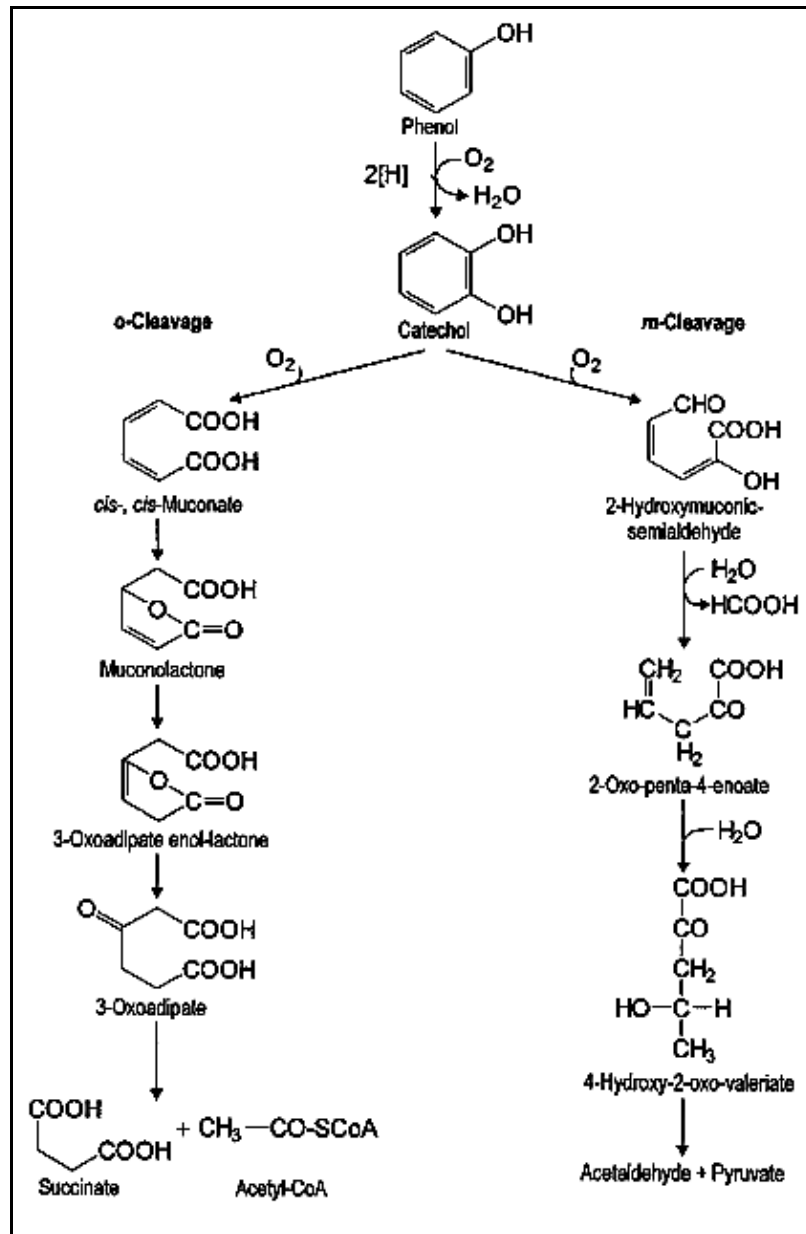
V.1 biodégradation aérobie

Dans la première étape de la voie aérobie pour la biodégradation du phénol (Fig.5), le phénol-hydroxylase (phénol monooxygénase) utilise de l'oxygène moléculaire pour l'ajouter à un second groupe hydroxyle en position ortho (Basha et *al.*, 2010 ; Patil, 2014 ; Sahar, 2006).

La molécule de catéchol résultant peut ensuite être dégradée par deux voies alternatives (ortho ou méta clivage) en fonction du microorganisme responsable (Sarwade et Gawai, 2014).

La voie de clivage ortho est également connue en tant que voie de β -cétoadipate. Le catéchol est dégradée soit par méta-clivage par le catechol 2,3-dioxygénase ou ortho-clivage par la catéchol 1,2-dioxygénase. Les intermédiaires de deux ortho et méta voie de clivage sont encore métabolisés en cycle de Krebs (Sahar, 2006).

Les organismes qui utilisent le phénol par voie aérobie sont *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (Kang et Park, 1997 in Patil, 2014 et Hasan et Jabeen, 2015), *Streptococcus sp.* (Mohite et Jalgaonwala, 2011 in Patil, 2014), *Candida tropicalis* (Tuah et *al.*, 2009 in Patli, 2014), *Comamonas testosteroni* (Arai et *al.*, 2000 in Patil, 2014), *Acinetobacter*, (Paller et *al.*, 1995 in Hasan et Jabeen, 2015) *Alcaligenes*, (Hughes et *al.*, 1984 ; Leonard et Lindley, 1998 in Hasan et Jabeen, 2015) *Bacillus*, (Buswell, 1975 in Hasan et Jabeen, 2015) *Burkholderia*, (Schroeder et *al.*, 1997; Solomon et *al.*, 1994 in Hasan et Jabeen, 2015) *Nocardia*, (Rizzuti et *al.*, 1979 in Hasan et Jabeen, 2015) *Nocardioides*, (Cho et *al.*, 2000 in Hasan et Jabeen, 2015) *Ralstonia* (Leonard et Lindley, 1991 in Hasan et Jabeen, 2015) and *Rhodococcus* (Hensel et Staube, 1990 in Hasan et Jabeen, 2015).



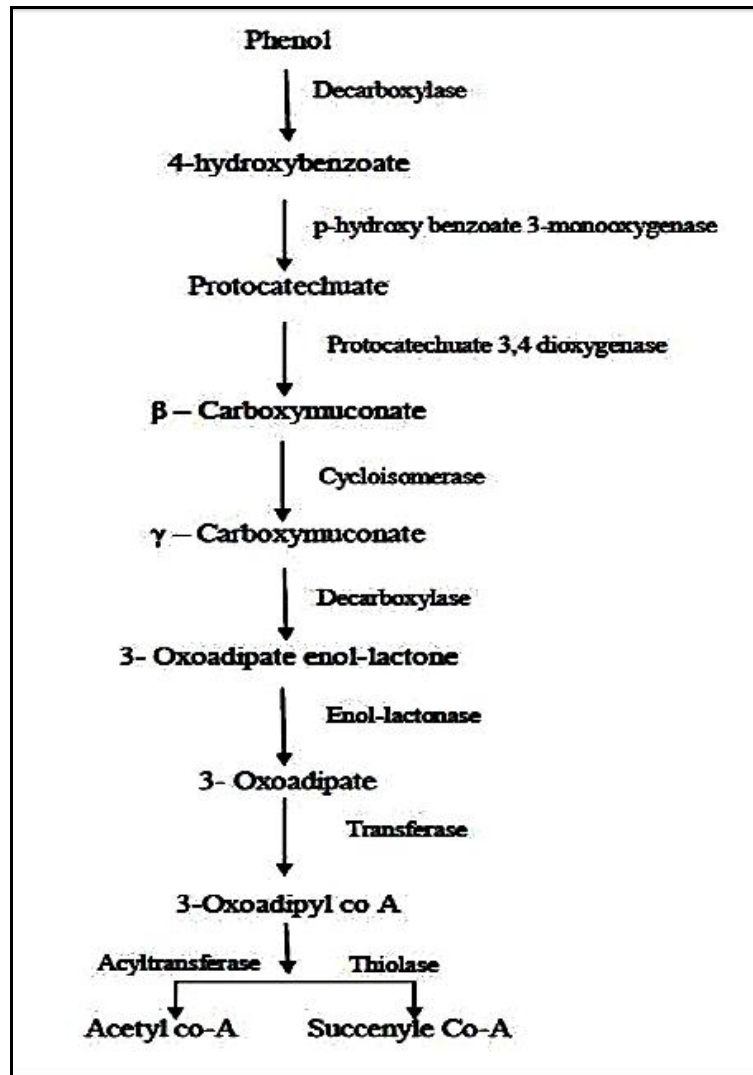
Source : Basha et al., 2010

Figure 05 : la voie aérobie pour la biodégradation du phénol

V.2. Biodégradation anaérobie de phénol

Le phénol peut également être dégradé en l'absence d'oxygène et il est moins avancé que le processus aérobie (Fig 6) (Sarwade et Gawai, 2014). Dans cette voie phénol carboxylé en 4-hydroxybenzoate par décarboxylase qui est la première étape clé dans la voie anaérobie (Basha et al., 2010 ; Sarwade et Gawai, 2014). L'enzyme impliquée est la benzoate 4-hydroxy carboxylase. La dégradation anaérobie de plusieurs autres composés

aromatiques a été démontrée qu'inclure une réaction de carboxylation. Les microorganismes capables de dégrader le phénol dans des conditions anaérobies étaient *Thauera aromatica* et *Desulphobacterium phenolicum* (Basha et al., 2010 ; Patil, 2014).



Source : Basha et al., 2010

Figure 06: la voie anaérobique pour la biodégradation du phénol

Parti 2

Matériels et méthodes

MATERIEL ET METHODE



Figure 7: Localisation des sites d'échantillonnage (Google maps 2015).

1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été exécuté le janvier 2015, à partir d'une station-service de wilayat de Laghouat, qui situé au Nord-Est de wilaya (Fig 7) (Google maps), leur activité de distribution du carburants sont limitées de (Essence, Gazoil, Supercarburant sans plomb, des huiles de frais, et un lavage).

On a éliminé la couche supérieure de sol et les végétaux de (1-2cm) (Koutny et *al*, 2003 ; Patil, 2012). L'échantillonne de sol sélectionné de (5 à 20cm) lorsqu' il y a un maximum d'activité microbienne par rapport au profondeur (Agneszka et *al*, 2012 ; Dong et *al*, 2008). Cette dernière a été prélevée par une spatule stérilisée.

L'échantillonne de sol a été conservé dans des boites en plastique stérile et à température ambiante au cour de travail (Patil, 2012). Le sol sélectionné de quatre site différentes de même station-service dans les mêmes conditions et le même jour (Fig 8) (Simonart, 1957 ; Soudi et kolahcki, 2011). L'échantillonne a été conservé à température 4c° pendent 2 semaine avant utilisé (Koutny et *al*, 2003).

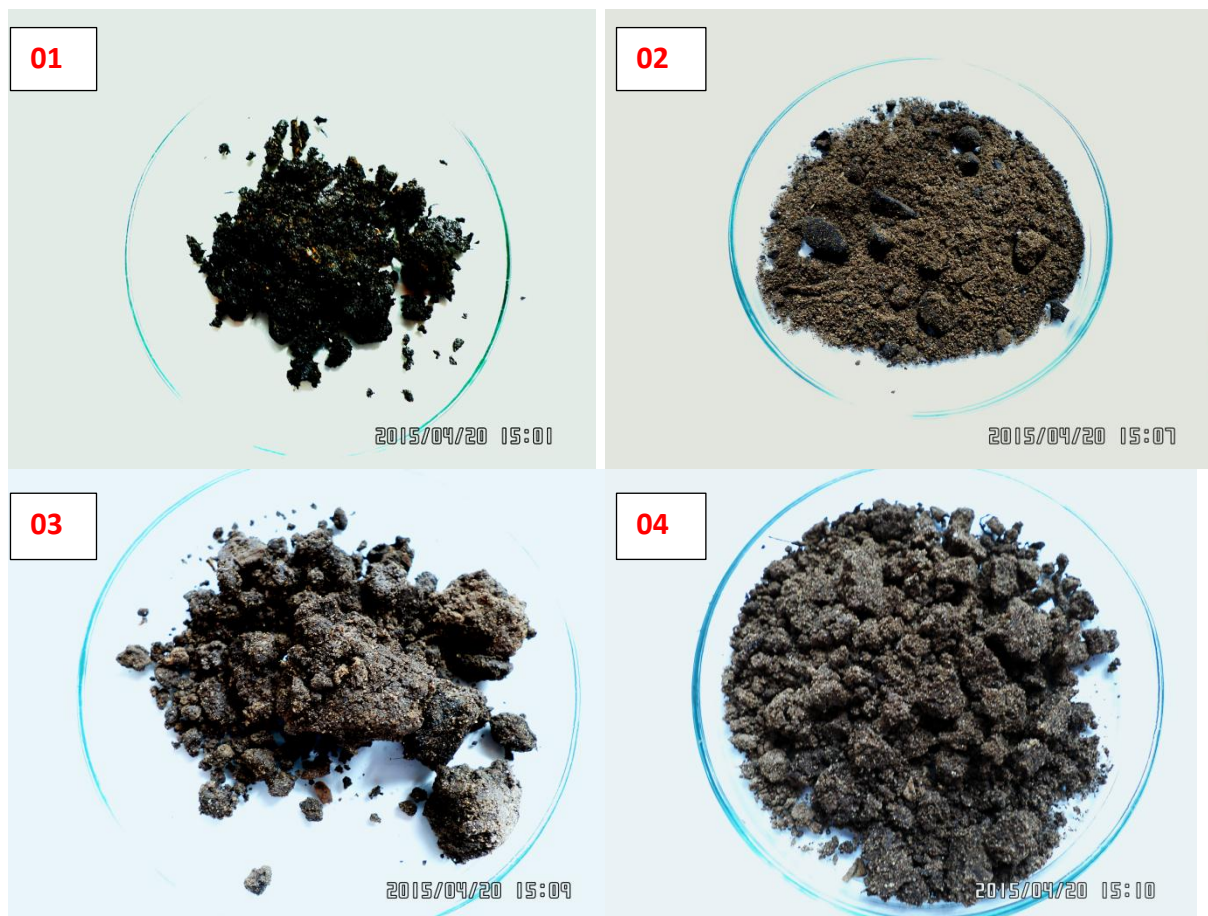


Figure 8 : les échantillons de sol prélevé

2. Isolement de microflore

On ajout un gramme de sol de les quatre stations-service dans 10ml de l'eau physiologie stérile, et agité par le vortex jusqu'à bien homogénéisé (Dong et *al*, 2008).

On a préparé une série de dilution de 10^{-1} à 10^{-9} (Manji, 2010). Mise en culture 1 ml de série de dilution en (GN) (Annexe) (Manji, 2010 ; Hasan et Jabeen, 2015), la culture est incubé en 37°C pendant 24h (Ainon et *al*, 2011).

Après 24h on a purifié les colonies par repiquages successifs selon la méthode en quadrant. La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité. (Matter, 2001)

Finalement on a 03 différents isolats répètes en 09 colonies (tableau 4), en trouve que les isola I1 et I2 les plus dominantes dans le sol pollué par les carburent (Tableau 5)

Tableau 04 : Les différents isolas obtenus à partie d'échantillons de sol

Echantillons	Isolas
Echantillon 01	E1. E2
Echantillon 02	E3. E4. E5
Echantillon 03	E6. E7
Echantillon 04	E8. E9

Tableau 05 : Pourcentage de distribution de chaque isola dans le sol prélevé

Isolas	Pourcentage
I1	44.44%
I2	44.44%
I3	11.12%

3. Sélection des souches susceptibles de dégrader le phénol

3.1. Test d'adaptation

Les 03 isolas purifiées obtenu (I1. I2. I3) sont mise en culture dans des flacons de 250 ml qui contient 50 ml de bouillon nutritive (BN) (Annexe) avec 100mg.l^{-1} de phénol, les flacons incubé à la température 37°C pendant 72h (Ainon et *al*, 2011 ; Kafilzadeh et *al*, 2011).

Après 72h, on a déterminé l'adaptation des bactéries au phénol, et l'incorporation de polluant dans leur métabolisme comme source de carbone et d'énergie par l'estimation de phénol résiduel, à l'aide d'un dosage colorimétrique (méthode Folin-Ciocalteu) (Wilfred et Ralph, 2006).

3.1.1. Estimation de phénol

a) Principe

Ce dosage non spécifique s'effectue à partir des extraits aqueux (Bellebcir, 2008). L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. (Wilfred et Ralph, 2006). Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols (Il réagit avec la fonction $-OH$ des phénols) (Catalano et *al.*, 1999 ; Kylli, 2011). Cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleue foncée (RIMA-OIV, 2010 ; Wilfred et Ralph, 2006 ; Aravindhan et al, 2014).

b) Méthode

Dans des tubes à essai, un volume de 1 ml d'échantillon d'inoculum centrifugé à 4 000rpm pendant 10min, 0.5ml de surnagent ajouté a 2.7ml d'eau distillé et 200 μ l de Folin-Ciocalteu, après 3min on ajout 600 μ l de carbonate de sodium (20%). Un témoin est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesuré à 765 nm (Kylli, 2011 ; Mangwan et *al.*, 2014).

On a obtenu un sel isolat apte à dégrader le phenol une dégradation complète (I2) la solution devient transparente para rapport au témoin (Fig 9). En revanche il y à une autre capable à dégrader le phénol partiellement (I3), et une troisième incapable de dégradé le phénol (I1).

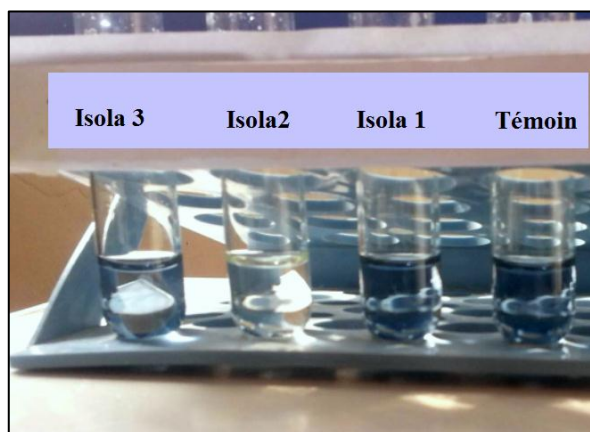


Figure 9: Dosage colorimétrique de test d'adaptation

3.2. Test de dégradation de phénol

On choisit l'isolat (I2) dans le test de dégradation, lorsqu'il a une bonne adaptation au phénol. Elle utilise le phénol comme un métabolisme ou co-métabolisme d'une telle sorte qu'elle est capable d'utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie et d'incorporer ce polluant organique dans son métabolisme.

Pour réaliser cet objectif, on met la bactérie dans un milieu minéral et le phénol de concentration (100 mg.l^{-1}) comme la seule source de carbone (Li et al, 2010).

Dans un flacon de 250ml, on remplit 50ml de milieu minéral (Annexe) de pH7 ajusté par le HCl avec le culot bactérien (Heinaru et al.2005), obtenu par la centrifugation à 4 000rpm et rincé par 5ml de milieu minéral à partir de bouillon nutritif de test d'adaptation (Shourian et al.2009), la DO densité optique de biomasse bactérienne a été 0.01A mesurée par le spectrophotomètre à 625nm (Doumandji et al, 2011).

En T_0 , on a fait un dosage colorimétrique d'inoculum (Fig 10), par méthode Folin-Ciocalteu pour comparer au T_{finale} , où il se fait une minéralisation de phénol.

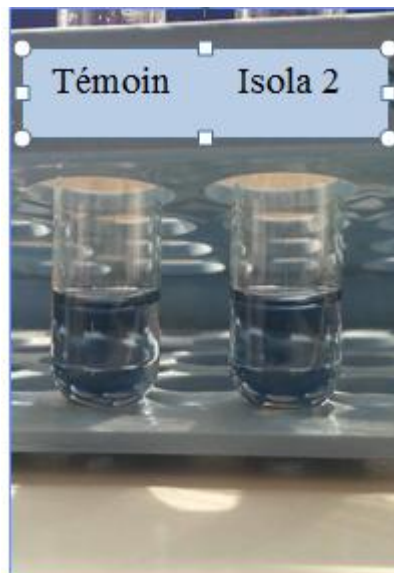


Figure10: Dosage colorimétrique de test de dégradation en T_0

Le flacon inoculé est incubé pendant 48h à 37°C et agité en shaker à 250rpm (Kang, et Park, 1997 ; Aïnon et al, 2011).

Après 48h on a une dégradation complété de phénol, confirmé par un dosage colorimétrique (Folin-Ciocalteu) (Fig 11).



Figure 11: Dosage colorimétrique de test de dégradation en T_{finale}

4. Identification d'isola capable à dégradé le phénol

On a choisir l'isolat (I2) pour notre démarche, lorsqu'il a une capacité considérable à minéralisé le phénol, et à une vitesse énorme de dégradation.

Ont identifié l'isola (I2) selon la description de Berge's manuel (Vol.3) (William et Whitman, 2009). L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification (Tableau). L'identification a été exécuté dépend de la morphologie (Fig 12), coloration de gram (Fig 13), sporulation et les caractéristique biochimique qui réalisé par une collaboration avec **Laboratoire Vétérinaire Régional de Laghouat.**



Figure 12: l'aspect macroscopique d'Isola (2)

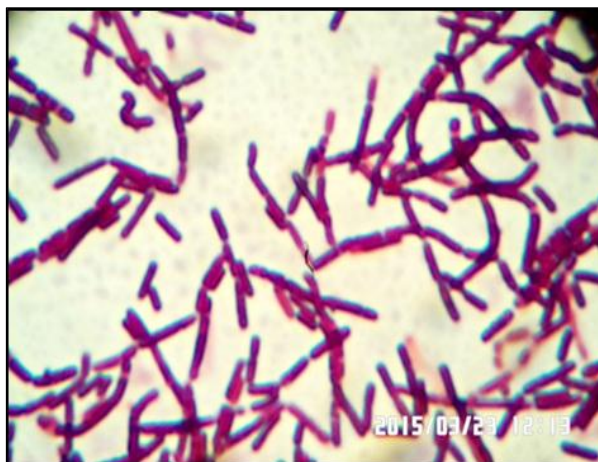


Figure 13: Aspect microscopique d'Isola (2)

Tableau 6: Caractéristique Morphologies et biochimique d'isolat apte à dégrade le phenol.

Tests	Isola 2
Morphologie :	
Description de colonie :	Large Sec, Crème, Contours Irrégulier de Colonies
Elévation	Plat
Opacité	Opaque
Description de cellule :	
Forme de cellules	Bacilles
Gram	Positif
Mobilité	Non Mobile
Formation des spores	Positif
Tests enzymes respiratoires	
Catalase	Positif
Oxydase	Négatif
Biochimique :	
Métabolisme glucidique	
Glucose	+
Saccharose	+
Mannitol/Mobilité	+
H ₂ S	Non Mobile
ONPG	-
Citrate perméase	+
Croissance sur les milieux sélectifs	
Milieu Chapman	+
Milieu macConkey	-
Milieu King A	-
Milieu King B	-
Antibiogramme :	
ENR	29,38
N	23,39
E	23,97
GM	25,05
PEN	<6 (Résistante)
STX	28,32
TET	22,63
SSS 200	33,49
VAN	19,83
SP	25,05
SPN	26,34
OXC	<6 (Résistante)

Après l'identification on peut dire que l'isola (2) ; c'est *Bacillus sp. I2* selon la description de Berge's manuel (Vol.3) (William et Whitman, 2009).

5. Etude de cinétique de biodégradation de phénol

On a choisir *Bacillus sp. I2* pour notre démarche, lorsqu'il a une capacité considérable à minéralisé le phénol, et à une vitesse énorme de dégradation. Lorsqu'il a une bonne adaptation au phénol, elle utilise le phénol comme un métabolisme ou co-métabolisme d'une tel sorte, elle est capable d'utilise le phénol comme source de carbone et d'énergie et incorporé ce polluant organique dans leur métabolisme. Par le teste de dégradation on a été confirmé que *Bacillus sp.I2* peuvent utilise le phénol comme la seule source de carbone et d'énergie.

Pour cette raison en exploite la capacité enzymatique de la bactérie pour suivez la cinétique de biodégradation de phénol, et même profité le potentiel biologique naturel de dégradation.

La croissance et la biodégradation de tout microorganisme dépend de divers paramètres physico-chimiques. Pour cette raison la démarche suivant exécuté pour évaluer l'influence des facteurs physico-chimique (comme la température de l'incubateur, le pH du milieu et de la concentration de phénol qui est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie, et même l'influence de densité cellulaire, la vitesse d'agitation et le taux d'aération) sur le dégradation, et déterminé les paramètres optimale qui accélère la bioprocessus de dégradation.

Étude sur la croissance des bactéries à différentes variable ont été effectués pour optimiser les conditions. L'augmentation de biomasse est estimée par l'augmentation de la densité optique, en parallèle l'augmentation de croissance cellulaire indique l'augmentation du taux de dégradation.

5.1. Test de tolérance à des concentrations toxiques de phénol

Afin de déterminé la capacité de tolérance de notre bactérie isolé a des concentration toxique de phénol, qui peuvent être inhibé la croissance et le développement de la bactéries

*Bacillus sp.*I2, l'isola cultivé en 50ml de milieu minéral avec des différents concentration relativement élevés de phénol (200. 500.700.1000mg.l⁻¹), avec une densité cellulaire bactérienne initial (DO_{620nm} 0.01A) et à température 37C° sous une vitesse d'agitation 250rpm, et en pH 7 de milieu jusqu'à la minéralisation de phénol. Tout fois un dosage colorimétrique qui confirme le taux de dégradation de phénol.

1ml de prélèvement mesuré pour déterminé l'augmentation de biomasse bactérienne à DO_{620nm} (Doumandji et *al.*, 2011), 1 ml milieu de culture centrifugé à 4 000 rpm pendant 10 min (Shourian et *al.*2009). Le surnageant a été recueilli dans tubes à essai propres pour évaluer le phénol résiduel, ce dernier a été déterminée à l'aide d'un dosage biochimique colorimétrique (Folin-Ciocalteau) comme décrit ci-dessus d'absorbance 765nm.

5.2. Etude de cinétique

5.2.1. Étude de la dégradation en fonction de concentration du phénol

Pour déterminer la capacité de dégradation de *Bacillus sp.* I2, elle a été cultivé dans 50ml de milieu minimal avec des concentrations de phénol initial varie de (25. 50.100.150.200mg.l⁻¹) (Heinaru et *al.*, 2005 ; Rivera et *al.*, 2008 ; Firozjaee, et *al.*, 2011 ; Aravindhan et *al.*, 2014), tandis que la densité des cellules initial dans chaque flacon était constante (DO₆₂₀ 0,01A) en double exemplaire. Le milieu de culture était ajusté à pH 7 (Heinaru et *al.*2005). Ensuite été secoué à une vitesse constante de 250rpm et à une température de 37C° (Fig 14) (Kang, et Park, 1997 ; Ainon et *al.*, 2011 et Aravindhan et *al.*, 2014).



Figure 14: le milieu de culture incubé et agité

Bien sûr le temps de prélèvement a été aussi constant (2 heure), 1ml de prélèvement mesuré pour déterminer l'augmentation de biomasse bactérienne à DO_{620nm} (Doumandji et *al.*, 2011), 1 ml milieu de culture centrifugé à 4 000 rpm pendant 10 min (Shourian et *al.*, 2009). Le surnageant a été recueilli dans tubes à essai propres pour évaluer le phénol résiduel (Fig 15), ce dernier a été déterminée à l'aide d'un dosage biochimique colorimétrique (Folin-Ciocalteu) comme décrit ci-dessus d'absorbance 765nm (Kylli, 2011 ; Mangwan et *al.*, 2014).



Figure 15 : Dosage colorimétrique de phénol au t_0

La cinétique de croissance cellulaire dans une culture discontinue (Batch) peut être modélisée par l'équation suivante :

$$\mu = \frac{dx}{dt}$$

Le taux de croissance spécifique (μ) est une fonction de la concentration du substrat (S). Cinétique Monod et Haldane sont les deux équations les plus largement utilisés pour calculer la croissance cinétique de tous les systèmes microbiens (Khleifat.2006 ; Sgountzos et *al.*,2006. et Li et *al.* 2010). Selon l'équation de Monod, le phénol est considéré comme un composé non inhibiteur et la cinétique d'inhibition de la non Monod équation est donnée comme suit mentionné par Sgountzos et *al.*, 2006 et **Khazi et al., 2010** :

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S}$$

Avec :

S : phénol (mg/L) ;

K_s : constance de dissociation (mg/L) ;

μ : vitesse spécifique de croissance (h⁻¹) ;

μ_{max} : Vitesse spécifique de croissance maximale (mg/L).

5.2.2. Étude de la dégradation en fonction de température

Pour étudier l'effet de la température sur la vitesse de dégradation, *Bacillus sp* I2 a été cultivé dans 50ml de milieu minéral contenant le phénol de concentration 50mg.l⁻¹ dans une fourchette de températures (30. 37.42 et 45C°) (El-Naas et *al.*, 2009 ; Lakshm et Sridevi, 2009 ; Khazi et *al.*, 2010 ; Patil et *al.*, 2014), en revanche la densité cellulaire initial a été fixé à (DO_{620nm} 0.01A). Ainsi le pH ajusté à 7 et l'agitation à 250rpm. Tout fois les études de cinétiques ont été effectuées pour chaque expérience indépendamment de la détermination de la biomasse bactérienne et le phénol résiduel.

A cet effet, toujours le prélèvement a été effectué dans un temps constant, et suivi les mêmes étapes précédemment.

5.2.3. Étude de la dégradation en fonction du pH

Afin d'évaluer l'effet du pH sur le taux de dégradation de phénol, les cellules de *Bacillus sp* .I2 ont été cultivées dans un volume de 50 ml de milieu minimal (Bhavna et *al.*, 2011), contenant 50mg.l⁻¹ de phénol sous une agitation rotatif à 250rpm, tout fois la densité cellulaire bactérienne initial (DO_{620nm} 0.01A). Le pH de la solution a été ajusté pour être dans la plage entre (2.4.6.7.8) (Khleifat, 2006 ; Agarry et *al.*, 2008 ; Velluru et *al.*, 2011 ; Sivasubramanian et Namasivayamn 2015).

A chaque fois la biomasse a été mesuré par le spectrophotomètre à loguer d'onde 620nm, et le phénol absorbé à 765nm après un dosage colorimétrique.

5.2.4. Étude de la dégradation en fonction de la densité cellulaire

Pour étudier l'effet de la densité cellulaire sur le taux de dégradation de phénol, *Bacillus sp* .I2 à différents densité cellulaire initiale (DO 0.011, 0.089, 0.0129, 0.0165, et 0.231A) (Khleifat, 2006 ; Jiang et *al.*2007), a été mis en culture dans 50ml de milieu minéral avec 50mg.l⁻¹ de phénol. Le milieu de culture ajusté à un pH7 et ensuit incubé à température 37C° et agité a une vitesse de 250rpm (Razika et *al.*2010).

D'autre part tous les étapes de mesure l'augmentation de biomasse bactérienne et le dosage de phénol résiduel maintenu sont constant, et dans les mêmes conditions de travail.

5.2.5. Étude de la dégradation en fonction de différente vitesse d'agitation

Lorsque l'agitation à un effect important d'homogénéation de milieu et l'accélération de bioprocessus de dégradation, *Bacillus sp* I2 mis en 50ml de milieu de culture minéral, qui contient 50mg.l⁻¹ de phénol, avec une densité cellulaire bactérienne initial (DO_{620nm} 0.01A). Tous les autres paramètres maintenu sont constant ; pH 7, température 37C° et vitesse d'agitation entre (0.150, 250rpm) (Khleifat, 2006 ; Razika et al.2010 ; Velluru et al., 2011).

5.2.6. Étude de la dégradation en fonction d'aération

Tant que le molécule d'oxigène est utilisé par l'enzyme de phénol hydroxylase dans la première étape de la voie aérobie de biodégradation du phénol, donc il représente le molécule clé de réussir de dégradation, c'est pour cela on étudie l'influence d'oxygène à la vitesse de dégradation.

Bacillus sp I2 cultivé en 50ml de milieu minérale de concentration 50mg.l⁻¹ de phénol (Razika et al.2010), avec une densité cellulaire bactérienne initial (DO_{625nm} 0.01A). Le processus se déroule dans un flacon de 250ml corrélié a une pompe d'oxygène ou il injecté dans le flacon après une filtration par une pièce de roche perméable (Hannaford et Kuek, 1999 ; Khleifat, 2006), a été stérilisé sous un flux d'air humide de 120C°/1b pendant 20min. l'oxygéné pompé a l'intérieure de flacon par la pompe à travers d'un capillaire en plastique aussi autoclaves. Les autres paramètres d'expérience sont les même, pH 7, température 37C°, agitation 250rpm.

6. Conservation des souches

Pour conserver les souches sporulées à long terme dans un support inerte, la conservation des souches bactériennes sporulées dans le sable stérile.

En remplissant 2/3 de tube à visser stérilisé ou moins deux fois à 120°C pendant 20 min, ensuite le tube inoculé avec 1 ml de suspension dense dans milieu minérale stérile, et conservé à température ambiante pendant une ou deux semaines, il sont ensuite stockés, puis à température 4°C (Fig 16) (Botton et al., 1990).

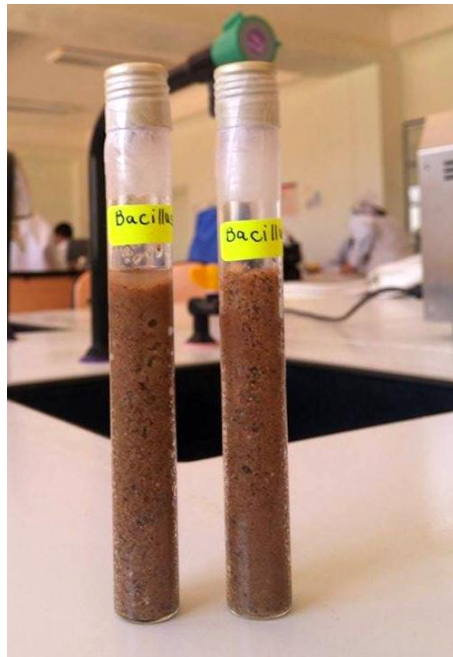


Figure 16: Conservation des souches au sable stérile

Parti 3

Résultats et Discussion

I. Résultats

I.1 Test de tolérance de *Bacillus sp* I2 au phénol

La bactérie *Bacillus sp.*I2 a été cultivée en mode discontinu (batch) en présence de différentes concentrations de phénol comprise entre 200-1000 mg/L. Cette souche bactérienne est capable d'assimiler le phénol comme seule source de carbone jusqu'à une concentration de 700 mg/L. La vitesse de dégradation dépend étroitement de la concentration du phénol présent dans le milieu. On note une dégradation totale du phénol à 200mg/l et 500mg/l après 48 et 96 heures d'incubation, respectivement. La dégradation du phénol est très lente au concentration de 700 mg/L où elle totale après 114 heures de culture.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres chercheurs. D'après le Tableau (8), on remarque que les espèces bactériennes de *Pseudomonas* possèdent une tolérance similaire au phénol par rapport à notre souche.

I2-Etude de cinétique

I2.1. Effet de Température

La figure 16 montre le profil typique d'évolution de la concentration du phénol résiduel et de l'augmentation de biomasse en fonction du temps, à différentes températures d'incubation (30. 37. 45°C), *Bacillus sp.* I2 a été mise en culture en présence du 50 mg/L de phénol.

On remarque que la croissance bactérienne et la consommation de phénol étaient rapides entre 30 et 37°C (Fig16).

La figure 17 représente le taux de croissance spécifique en fonction de la température. Il est clair que la température optimale de croissance de *Bacillus sp.* I2 est à 30°C. Plusieurs travaux ont trouvé que la dégradation du phénol et la croissance bactérienne sont optimales à 30°C (Paraskevi et *al.*,2005 ;Shourian et *al.*, 2009 ; Wenlai et *al.*, 2012 ;Awa et *al.*,2013).

A température 45°C, on remarque un grand ralentissement de dégradation, liée à une longue phase de latence où il se déroule un nouvel arrangement moléculaire et un autre comportement physiologique, pour adapté à une fourchette de température différente

(Khazi et al., 2010.). Une diminution de biomasse est notée après 4 heures d'incubation à 45°C.

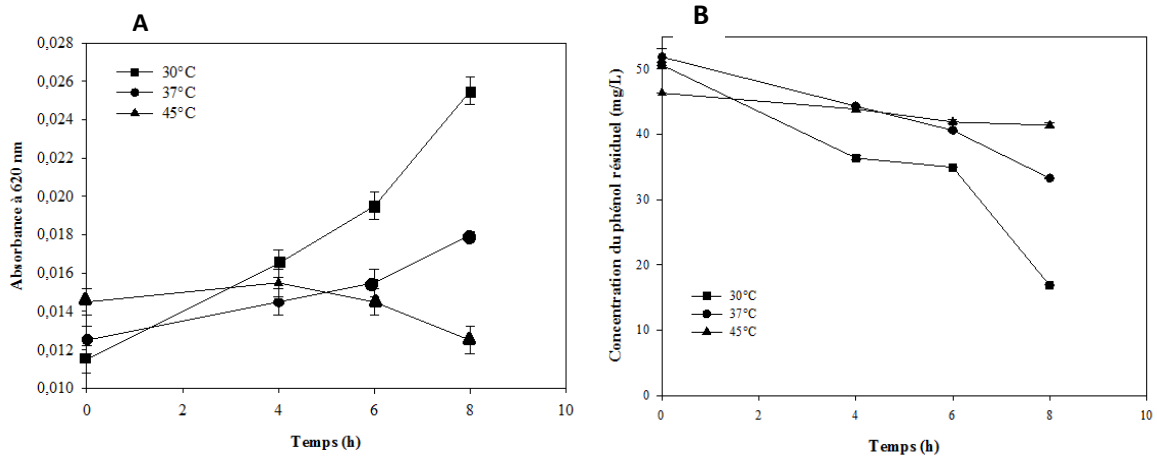


Figure 16 : Effet de température sur la biodégradation de phénol; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO_{620nm}), (B) évolution de phénol résiduel en fonction du temps

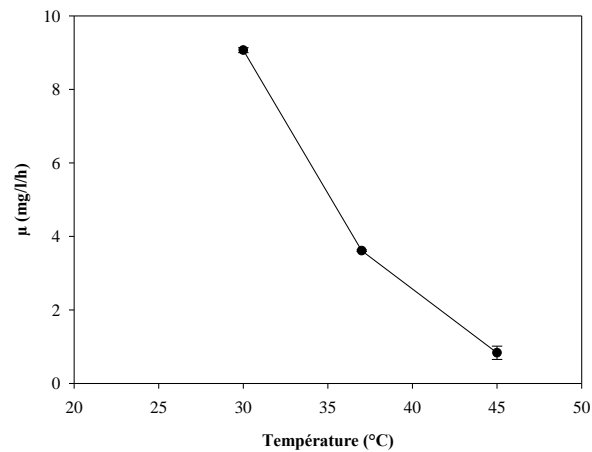


Figure 17 : Effet de la température sur la vitesse spécifique de croissance (μ)

I2.2. Effet de pH

D'après la Figure (18), on remarque que la vitesse de dégradation de phénol est également affectée par le pH initial du milieu de culture. Le taux de dégradation du phénol et la biomasse augmentent de manière significative aux pH compris entre 7-8 où le phénol du milieu est complètement épuisé rapidement après 5 heures de culture de la bactérie. Une chute considérable de la densité cellulaire est observée à pH 7 et 8.

Nous avons remarqué aussi que la croissance et la vitesse de dégradation du phénol sont très lentes à pH 6 et seront totalement inhibés aux pH acides.

La figure 19 montre la variation de la vitesse spécifique de croissance (μ) en fonction de pH, qui confirme aussi que le pH optimal pour la croissance et la dégradation de le phénol est situé entre 7-8.

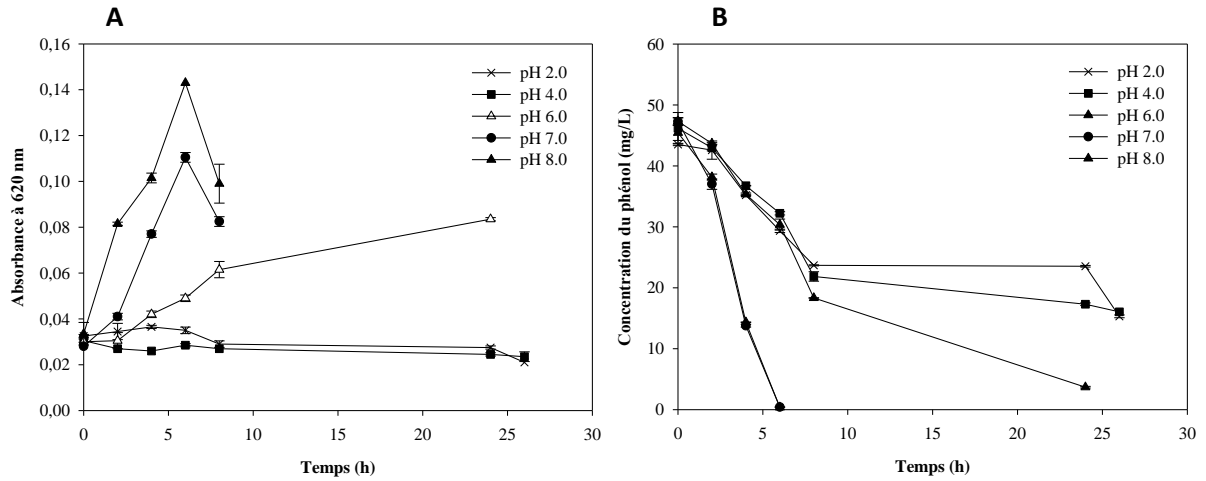


Figure 18 : Effet de pH la biodégradation de phénol ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO_{620nm}), (B) Evolution de phénol résiduel en fonction de temps

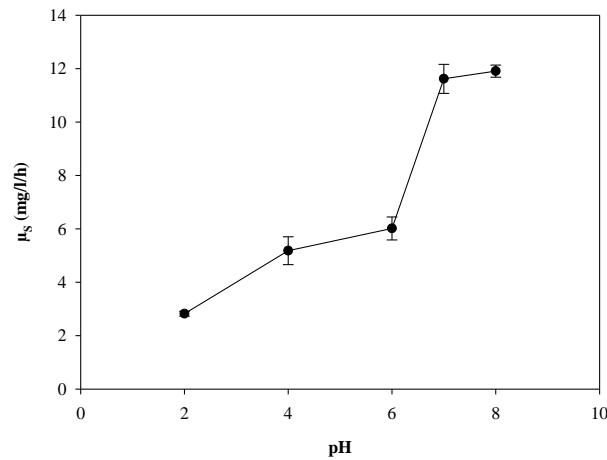


Figure 19 : Effet du pH sur la vitesse spécifique de croissance (μ).

I2.3. Effet de l'agitation

L'agitation agit sur l'homogénéisation du milieu de culture et sur la vitesse de croissance et le taux de dégradation des substrats par les bactéries.

Nous avons pu étudier l'effet de l'agitation du milieu de culture sur la croissance en biomasse et le taux de dégradation du phénol par *Bacillus sp. I2* en culture liquide et en mode batch (discontinu).

D'après la Figure (20), on remarque qu'en absence d'agitation du milieu la bactérie dégrade difficilement le phénol en solution. La dégradation du phénol qui s'accompagne d'une augmentation de la biomasse est obtenue à une vitesse d'agitation de 250 rpm. Dans ces conditions expérimentale, la bactérie dégrade totalement le phénol à 50 mg/L seulement après 24 heures.

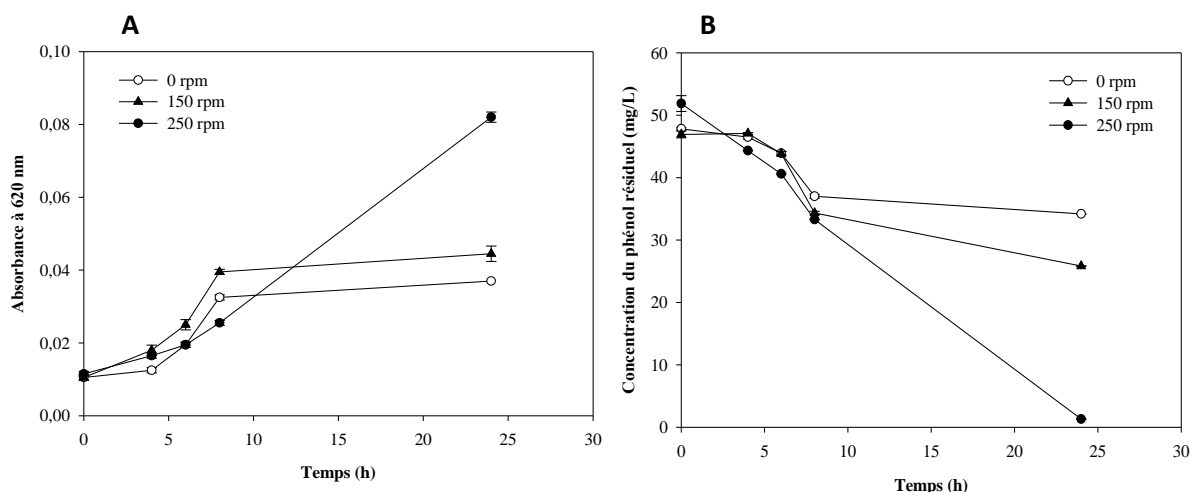


Figure 20 : l'effet des différentes vitesses d'agitation sur la biodégradation de phénol ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO_{620nm}), (B) l'évolution de phénol résiduel au fonction de temps

I2.4. Effet de l'aération

La dégradation du phénol est le plus souvent une réaction d'oxydation où l'oxygène dissous est le facteur clé qui décide de la vitesse de dégradation de la matière organique dans des conditions de croissance aérobies (Khazi et al., 2010 ; Amrouche1 et al, 2011). Pour cela, nous avons étudiée l'effet de l'aération du milieu de culture sur l'assimilation du phénol par la souche bactérienne *Bacillus* sp. I2. Pour cela, la cinétique de dégradation a était suivie en présence et absence d'aération et les résultats ainsi obtenu sont représenté dans la Figure (21).

D'après la Figure (21) on constate que l'aération du milieu accélère de manière significative la vitesse de dégradation du phénol qui s'accompagne aussi d'une augmentation de la biomasse bactérienne. Tandis que le milieu non aéré *Bacillus* sp. I2 dégrade très lentement le phénol où la biomasse observée est faible.

Nos résultats sont similaires par rapport à ceux trouvé par Hannaford et Kuek (1999) et Khleifat (2006).

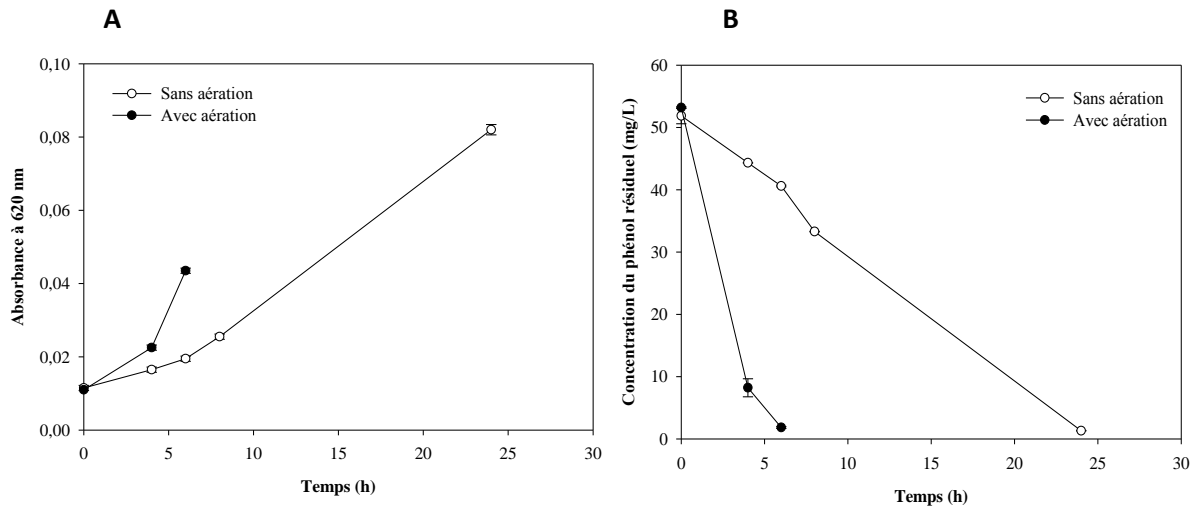


Figure 21 : l'effet d'aération sur la biodégradation de phénol ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO_{620nm}), (B) l'évolution de phénol résiduel au fonction de temps

I2.5. Effet de la biomasse

L'effet de la densité cellulaire sur le taux de dégradation de phénol à 50 mg/L a été étudiée en mesurant la biomasse le substrat résiduel au cours du temps d'incubation ceci pour différentes concentrations de bactérie.

D'après la Figure (22), la densité bactérienne influe nettement sur la vitesse de dégradation du phénol. Ces résultats sont en accord avec ceux cités dans la littérature (Khleifat, 2006 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Shourian, *et al.*, 2009).

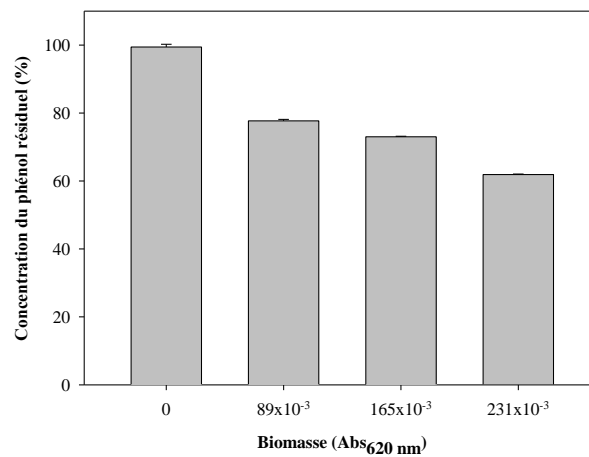


Figure 22: Effet de biomasse sur la dégradation de phénol

12.6. Effet de la concentration du phénol

Les paramètres cinétique μ_{\max} et K_s de *Bacillus* sp I2 ont été déterminés à l'aide la représentation de Monod en études l'effet de la concentration du phénol sur la croissance de cette bactérie à pH 7.0 et 37°C.

D'après la Figure (23) on constate qu'il existe une corrélation entre la concentration du phénol présent dans le milieu et la biomasse. Il en résulte une augmentation significative de biomasse lorsque la concentration du phénol est relativement élevée. La bactérie transforme rapidement le phénol à de faible concentration.

Nos résultats sont similaires par rapport à ceux cités dans la littérature (Heinaru et *al.*, 2005 ; Rivera et *al.*, 2008 ; Li et al, 2010 ; Firozjaee, et *al.*, 2011 ; Aravindhan et *al.*, 2014),

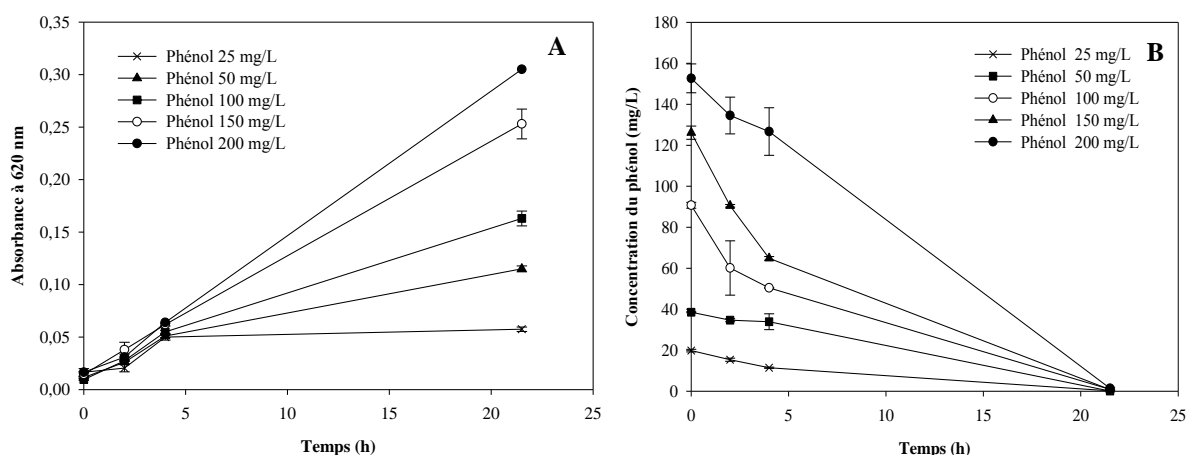


Figure 23 : Effet de concentration de phénol sur la cinétique de biodégradation ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO_{620nm}), (B) évolution de phénol résiduel en fonction de temps

Les vitesses spécifiques (μ) pour les différentes concentrations du phénol ont été estimées à partir des courbes du logarithme népérien de la biomasse en fonction du temps (Sgountzos et *al.*, 2006).

Nos résultats ont été parfaitement ajustés par le modèle cinétique de croissance de Monod. Ceci confirme que la bactérie n'a pas subi un phénomène d'inhibition par excès de substrat qui est le plus souvent observé pour la plus part des bactéries cultivées en présence du phénol (Li et *al.*, 2010 ; Arutchelvan et *al.*, 2006 ; Kumar et *al.*, 2005).

Les paramètres cinétiques de croissance de *Bacillus* sp. I2 ainsi calculés sont $\mu_{\max} = 0,16 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 3,80 \text{ mg/L}$.

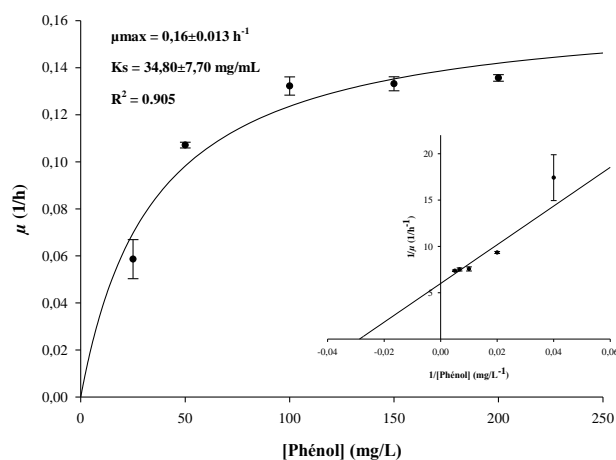


Figure 24 : la vitesse spécifique de croissance (μ) au fonction de phénol

II. Discussion

Bacillus sp. I2 isolée à partir du sol contaminé par les dérivés pétroliers est une souche bactérienne tolérante au phénol puisque elle a la capacité de dégrader des concentrations relativement élevées de ce polluant grâce aux enzymes monooxygénase, la 1,2 dioxygénase 2-3-dioxygénase pour (ortho-metclavage) respectivement. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres chercheurs (Tableau 8). Les bactéries du genre *Pseudomonas putida* se comportent de manière similaire par rapport à notre souche.

Tableau 7: Seuil de dégradation du phénol par quelques bactéries.

Espèce bactérienne	Gamme de concentration (mg/L)	Référence
<i>P. putida</i> CCRC14365	0–600	Chung et al., 2003 in Banerjee et Ghoshal, 2010
<i>P. putida</i> DSM548	0–100	Alvaranet al., 2000 in Banerjee et Ghoshal, 2010
<i>P. putida</i> DSM50222	0–700	Hill et Robinson, 1975 in Banerjee et Ghoshal, 2010
<i>Bacillus</i> . sp I2	0–700	(Notre étude)

La variation du rendement de croissance des cellules avec la concentration du phénol peut être rationalisée par un bilan matière sur la base de la consommation de phénol.

D'après Wang et Loh (1999), le phénol a été assimilé par la bactérie *Bacillus*.sp I2 sous forme de biomasse et d'énergie.

L'effet de la température sur la dégradation du phénol montre que *Bacillus* sp. I2 est une espèce mésophile. L'inhibition de la croissance totale de *Bacillus* sp I2 a eu lieu à 45 °C, elle a été une influence néfaste sur la multiplication cellulaire. La diminution de la biomasse à 45°C est due à la mort cellulaire.

Plusieurs travaux ont trouvé que la dégradation du phénol et la croissance bactérienne sont optimales à 30°C (Paraskevi et al., 2005 ; Shourian et al., 2009 ; Wenlai et al., 2012 ; Awa et al., 2013). Selon Khleifat (2006), El-Naas et al. (2008) et Li(2010) la limite de tolérance des bactéries est à 45°C. La température affecte les activités enzymatiques microbiennes ainsi la voie métabolique. La diminution de la dégradation en raison à température plus élevée tel que 45C° pourrait être attribué à l'effet de la température sur enzyme spécifique au phénol.

La bactérie *Bacillus* sp. I2 est une espèce alcalophiles (Sarwade et Gawai, 2014), c'est-à-dire qu'elle dégrade parfaitement le phénol aux pH relativement alcalin. Aux pH acide, l'inhibition de la biodégradation du phénol peut être expliquée par l'apparition des conditions de croissance défavorables pour la population bactérienne. Cette différenciation à la règle principale de réactions chimiques pourrait être due à des différences pénétration efficace de phénol dans les cellules bactérienne à travers la membrane cellulaire (Khleifat, 2006 ; Ho et al.,2009 ; Khazi et al., 2010).

De même les bactéries *Pseudomonas putida* (Kumar et al, 2005 ; Abuhmed et al., 2004 ; Farashevi et al., 2005) et *Bacillus brevis* (Arutchelvan et al., 2006) dégradent le phénol efficacement à pH 7 et 8, respectivement.

Une partie de phénol, joue un rôle de donneur d'électrons et source d'énergie, est converti en produits finis oxydés par des réactions d'oxydation / réduction (Basha et al., 2010). L'autre partie du carbone organique est transformée en matériau cellulaire (Patil, 2014). L'étude de l'effet d'aération a montré que la vitesse de dégradation du phénol par *Bacillus* sp. I2 augmente considérable ceci s'explique par le rôle essentiel de l'oxygène pour que la phénol hydroxylase assure la première étape de la voie de biodégradation du phénol (Jiang et al., 2007). Hannaford et Kuek, 1999 et Khleifat (2006) et Shourian, et al., (2009) ont trouvé que la dégradation du phénol par les bactéries est plus favorable en présence d'aération.

La vitesse d'agitation affecte aussi la cinétique de biodégradation du phénol car elle assure l'homogénéisation et l'aération du milieu. Shourian et *al.* (2008, 2009) et Kang et Park (1996) ont rapporté aussi que la dégradation du phénol est optimale lorsque le milieu de culture est mis en agitation à une vitesse de 250 rpm.

D'après le Tableau (8), *Bacillus* sp. I2 a la même affinité pour le phénol par rapport aux bactéries *Bacillus brevis*, *Pseudomonas putida* MTCC 1194 et *Corynebacterium* sp. DJ1 tandis que la bactérie *Pseudomonas*. Sp a une faible affinité vis-à-vis de ce substrat. *Bacillus subtilis* à une affinité excellente vis-à-vis du phénol.

Tableau 8 : Les valeurs des paramètres cinétique μ_{\max} et K_S de dégradation du phénol par quelques bactéries.

Souche bactérienne	μ_{\max} (h ⁻¹)	K_S (mg/L)	Référence
<i>Bacillus</i> Sp. I2	0.16	34.8	Cette étude
<i>Bacillus brevis</i>	0.026	29.3	Arutchelvan et <i>al.</i> (2006)
<i>Bacillus subtilis</i>	0.305	3.02	Aravindhan at <i>al.</i> (2014)
<i>Pseudomonas putida</i> MTCC 1194	0.3	36.3	Kumar et <i>al.</i> (2005)
<i>Pseudomonas putida</i> F1 (ATCC 700007)	0.051	18	Abuhmed et <i>al.</i> (2004)
<i>Pseudomonas</i> . Sp	0.27	56.7	Farashevi et <i>al.</i> (2005)
<i>Corynebacterium</i> sp. DJ1	0.65	33.1	Ho et <i>al.</i> (2009)

References

- Agarry. E, Solomon. B et Layokun. E., 2008. Optimization of process variables for the microbial degradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology Vol. 7 N°14, P. 2409.2416.**
- Agnieszka. M, Cyco. M et Zofia. P., 2010. Changes of FAME profiles as a marker of phenol degradation in different soils inoculated with *Pseudomonas sp.* CF600. **International Biodeterioration & Biodegradation N°64, P 86.96.**
- Agteren, M., 1998. Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds. **Springer Science and Business Media Dordrecht, P 233.234.**
- Ainon. H, Tavakoli.A et Rab. A., 2011. Detection of toluene degradation in bacteria isolated from oil contaminated soils. **Sains Malaysiana Vol. 40, N°11, P1231.1235.**
- Amrouche. F, Namane. A et Hellal. A., 2011. Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones librement suspendus dans un réacteur batch. **Article. Revue des Energies Renouvelables Vol. 14, N°3, Algérie.**
- Aouad. L et Bouziane. A., 2012. Petroleum-Oil Biodegradation by *Corynebacterium aquaticum* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains isolated from the Industrial Rejection of the Refinery of ARZEW-Algeria. **World Applied Sciences Journal N°18, P 1119.1123.**
- 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.**
- Aüllo. T., 2013. Atténuation naturelle potentielle de BTEX en aquifère de stockage de gaz naturel. **Thèse de Doctorat. Université DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR, P26.28.**
- Awa. R, Shah. A et Amjad. M., 2013. Microbial degradation of phenol by locally isolated soil bacteria. **Global Advanced Research Journal of Microbiology Vol. 2, N°4, P 72. 79.**

- Banerjee. A et Ghoshal. K., 2010.** Isolation and characterization of hyper phenol tolerant *Bacillus sp.* from oil refinery and exploration sites. **Journal of Hazardous Materials N°176, P 85.91.**
- Bared , R, Boucheta. C et Soufi, K., 2010.** Phenol and benzoic acid degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Water Resource and Protection 2, P 788-791.**
- Basha.K. H, Rajendran. A et Thangavelu. V., 2010.** Recent advances in the Biodegradation of Phenol. **Article. BIOL. SCI., Vol. 1, N° 2, P 219.234.**
- Bellebcir. L., 2008.** Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales. **Mémoire de Magister, Université Mentouri De Constantine, Algérie, P 62.**
- Botton.B, Breton. A, Ferve.M, Gauthier. S, Guy.P, Larpent.J, RYMOND. P, Sanglier.J, Vassier.Y et Veau. P., 1990.** Moisissures Utile et nuisible et importance industrielle. **2^{eme} Edition. Biotechnologi, P 28.**
- Bouazza, F., 2012.** Elimination des polluants organiques par des argiles naturelles et modifiées. **Mémoire de maîtrise. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen, Algérie, P 21.24.**
- Bouchez, M., Blanchet, D., Haeseler, F. et Vandecasteele, J.P., 1996.** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement – Propriétés, origines, devenir. **Revue de l'Institut Français du Pétrole. Vol. 51, N° 3, P13.16.**
- Calvo. O, Marchenko. J.J, Vorobyov. A.I et Borovick. R.V., 2003.** Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. **FEMS Microbiology Ecology N°44, P 373 381.**
- Catalano, L., Franco, I., De Nobili, M., and Eita, L., 1999.** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. **Agrochimica, N°43, P. 193.205.**
- Céfal. A., 2004.** La classification Décimale Universelle (CDU) est la propriété intellectuelle de L'UDC Consortium. **Editions du Céfal, P 60.63.**
- Chebli. D., 2012.** Traitement des eaux usées industrielles: Dégradation des colorants azoïques par un procédé intégré couplant un procédé d'oxydation avancée et un traitement biologique. **Thèse de Doctorat. Université FERHAT ABBAS, Algérie, P 50.52.**

- Christophe. G., 2007.** Étude de *Fibrobacter succinogenes* en bioréacteur anaérobie en vue de la dégradation de déchets végétaux. **Thèse de Doctorat. Université D'AUVERGNE, P50.58.**
- Dong. X, Hong. Q, He. L et Li. S., 2008.** Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil. **International Biodeterioration & Biodegradation N°62, P 257–262.**
- Dosemeci. M. A, Blair, Stewart. P.A, Chandler. J et Trush. M.A., 1991.** Mortality among industrial workers exposed to phenol. **Epidemiology Vol.2, N°3, P 188.193.**
- Doumandji. A, Boutekrabt. L, Saidi. N, Doumandji. S, Hamerouch. D Et Haouari. S., 2011.** Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques et organoleptiques du couscous artisanal. **Revue Nature & Technologie 41, N° 6, P 40-50.**
- Eglinton. G, Gonzalez. A.G, Hamilton.R.J and Raphael. R.A., 1962.** Hydrocarbon constituents of the wax coating of plant leaves: a taxonomic survey. **Phytochemistry N°1, P 86-102.**
- Eisenreich. S.J, Looney. B.B et Thornton. J.D., 1981.** Airborne organic contaminants in the Great Lakes ecosystem. **Environ. Sci. Technol N°15, P 30. 38.**
- El-Naas. M, Shaheen. A et Makhlof. S., 2009.** Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. **Journal of Hazardous Materials 164, P 720.725.**
- El-Naas. M, Surkatti. R., 2014.** Biological treatment of wastewater contaminated with p-cresol using *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. **Journal of Water Process Engineering N°1, P 84. 90.**
- Environnement Canada et Santé Canada(ECSC), 2003.** Rapport d'évolution pour le phénol conformément à la loi canadienne sur la protection de l'environnement. **Direction de l'hygiène de milieu intitulée En40-215/45F. P. 20.25.56.57.58.59.**
- Favennec. J-P., 1998.** Le raffinage du pétrole : 5 exploitations et gestion de la raffinerie. **Edition TECHNIP, P 15.16.**
- 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.**
- Flambeau. J.P., 1990.** Essai de biotransformation du carbazole. **Thèse de Doctorat. Université de METZ, P30.31.**

- Hank. D, Saidani. N, Namane. A et Hellal. A ., 2010.** Batch phenol biodegradation study and application of factorial experimental design. **Article. Journal of Engineering Science and Technology Review, Algérie, P 123.124.**
- Hannaford1.A , Kuek. C., 1999.** Aerobic batch degradation of phenol using immobilized *Pseudomonas putida*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 22, N° 121.26**
- Harzallah, B., 2011.** Etude de la biodégradation du 2,5-diméthylphénol par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'IBN ZIAD. **Mémoire de maîtrise. Université Mentouri Constantine, Algérie, P11.12.**
- Hassan. S. A et Jabeen. S., 2015.** Degradation kinetics and pathway of phenol by *Pseudomonas* and *Bacillus* species. **Article Biotechnology & Biotechnological Equipment, Vol. 29, N° 1, P 45.53.**
- Heinaru. E, Merike. M, Signe. V, Merit. La, Ivo. L, Truu. J et Heinaru. A., 2005.** Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. **FEMS Microbiology Ecology N°51, P 363–373.**
- Hinteregger. C, Leitner. R, Loidl. M, Ferschl. A et Streichsbier. F., 1992.** Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. **Appl Microbiol Biotechnol N°37 , P 252.259.**
- Ho. K, Lin. B, Chen. Y et Lee. D., 2009.** Biodegradation of phenol using *Corynebacterium* sp. DJ1 aerobic granules. **Bioresource Technology N° 100, P5051–5055.**
- INERIS (Institut National De L'environnement Industriel Et Des Risques), 2006.** Etude de scenarios dangereux en stations-service. **Rapport final, France, P 30.35.36.**
- Jiang. Y, Wen.J, Bai. J, Jia. X et Hu, Z., 2007.** Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Hazardous Materials N°147, P 672. 676.**
- Kafilzadeh. F, Rafiee. S et Tahery. Y., 2011.** Evaluation of Bioremediation of naphthalene using native bacteria isolated from oil contaminated soils in Iran. **Annals of Biological Research, Vol. 2, N°6, P 610-616.**
- Kamshilov. M.M et Flerov. B.A., 1978.** Experimental research on phenol intoxication of aquatic organisms and destruction of phenol in model communities. **National Technical Information Service, Springfield, Virginie, P 181.192.**

- Kang. M et Park. J., 1997.** Sequential Degradation of Phenol and Cyanide by a Commensal Interaction between Two Microorganisms. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** N°69, P 226.230.
- Khaled. M., 2006.** Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. **Process Biochemistry** N°41, P 2010.2016.
- Khazi. M, Aravindan, R., 2010.** Recent advances in the Biodegradation of Phenol: A review. **ASIAN J. EXP. BIOL. SCI., Vol. 1 , N°2, P 219-234.**
- Kishino. T et Kobayashi,. K., 1995.** Relation between toxicity and accumulation of chlorophénols at various pH, and their absorption mechanism in fish. **Water Res.** 29, P 431-442.
- Koutny. M, Ruzicka. J et Chlachula. J., 2003.** Screening for phenol-degrading bacteria in the pristine soils of south Siberia. **Applied Soil Ecology** N° 23, P79–83.
- Kylli. P., 2011.** Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties. **Academic Dissertation, Universite de Helsinki, P 90. 62.**
- Lakshmi. M. Sridevi. V. Narasimha. R. et Swamy. A., 2011.** Optimization of phenol degradation from *Pseudomonas aeruginosa* (ncim 2074) using response surface methodology. **Article. International Journal Of Research In Pharmacy And Chemistry, Andhra Pradesh, India, P 195.196.**
- Lakshmi. C, Sridevi.V., 2009.** Effect of ph and inoculum size on phenol degradation by *pseudomonas aeruginosa* (Ncim 2074). **Int. J. Chem. Sci. Vol.7, N°4, P 2246.2252.**
- Lefebvre. G., 2005.** Chimie des hydrocarbures. **Editions TECHNIP, P50.56.63.**
- Li. Y, Li. J, Wang. C et Wang. P., 2010.** Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. **Bioresource Technology, China, P 6740.**
- Malam. A, Mousbahou. M, Hassimi. S, Matejka. G et Philippe, C., 2007.** Cinétique d'élimination du phénol et de l'ortho-chlorophénol en filtration biologique lente sur sable et sur polystyrène. **Article. Universite de Niamey, France, P 74.**
- Mangwani. N, Shukla. S, Kumari. T et S. Das.S., 2014.** Characterization of *Stenotrophomonas acidaminiphila* NCW-702 biofilm for implication in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology** ISSN, P 1364-5072.

- Manju. L., 2010.** Biodegradation of phenol by bacterial strain isolated from paper sludge. **National Institute of Technology, Rourkela, India, P 30.32.35.36.**
- Marc. V, Sabate. J, Espuny. M.J, et Solanas, A., 2005.** Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology, Vol. 71, N°11, P 7008.7018.**
- Marchal .R, Penet. S, Solano-Serena. F et Vandecasteele. J.P., 2003.** Gasoline And Diesel Oil Biodegradation. Oil & Gas Science And Technology - Rev. Éditions Technip. **Ifp, Vol. 58, N°4, P 441.448,**
- Marchand, M., 1989.** La contamination des eaux continentales par les micropolluants organiques. **Revue des sciences de l'eau , Journal of Water Science, Vol. 2, n°2.**
- Martin. F., 2006.** Florence, exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures : analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation. **Thèse de doctorat. Université de GRENOBLE, P 17.18.**
- Martinez. A. B., 2005.** Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage ozonation – digestion anaérobie. **Thèse de doctorat. Université MONTPELLIER II, France, P24.**
- McLeay. D.J., 1976.** A rapid method for measuring the acute toxicity of pulp mill effluents and other toxicants to salmonid fish at ambient room temperature. **J. Fish. Res. Board Can. N°33, P1303-1331.**
- Messikh. N., 2008.** Application des réseaux de neurones pour Prédire le rendement de l'extraction Liquide- liquide du phenol. **Thèse de doctorat. Université BADJI Mokhtar-Annaba, Algérie, P 7.8.11.**
- Michałowicz. J et Duda. W., 2007.** Phenols – Sources and Toxicity. **Polish J. of Environ. Stud. Vol. 16, N°. 3, P 347.362.**
- Mitra. S, Kambiz .A, Zahiri. H, Bagheri. T, Karballaei. G, Mollaei. M, Rad. I, Ahadi. A, Jamshid.R et Abbasi. H., 2009.** Efficient phenol degradation by a newly characterized *Pseudomonas* sp. SA01 isolated from pharmaceutical wastewaters. **Desalination N° 246; P 577–594.**

- Mohite. B , Pawar. S., 2011.** Isolation, Selection and Biodegradation Profile of Phenol Degrading Bacteria from Oil Contaminated Soil. **Ankush Morankar Bull Environ Contam Toxicol N°87, P143.146.**
- Neuhauser. E.F et Callahan. C.A., 1990.** Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to sublethal concentrations of organic chemicals. **Soil Biol. Biochem, P 22. 175. 179.**
- Neuhauser. E.F, Durkin. P.R, Malecki. M.R. et Anatra. V., 1986.** Comparative toxicity of ten organic chemicals to four earthworm species. **Comp. Biochem. Physiol. N°83, P197. 200.**
- Norini. M.P., 2007.** Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatique Polycyclique (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : Influence de la rhizosphérée et de la mycorhization. **Thèse de doctorat. Université HENRI POINCARÉ, NancyI, France, P 30.**
- Ould Amar. B., 2013.** Investigation des taux de HAP dans les sols avoisinant les centres de stockage et/ou de distribution des hydrocarbures. **Mémoire de Master. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, P20. 21. 22.**
- Paraskevi. N, Polymenakou. G, Euripides. F et Stephanou. G., 2005.** Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil Pseudomonad. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology N°2, P12.15.**
- Patil. S., 2014.** Biodegradation Study of Phenol by *Burkholderia sp. PS3* and *Bacillus pumilus OSI* Isolated from Contaminated Soil. **These master de recherche technologies. National Institute of Technology, Rourkela Odisha, India, P 50.56.59.58.**
- Piedrafita. C et Victoria. M., 2007.** La pollution ponctuelle des sols: Le cas des stations-service dans la Région de Bruxelles-Capitale. Etudes Spécialisées en Gestion de l'Environnement. **Université Libre de Bruxelles, P17.18.19.20.**
- Pottern. L.M, Heineman. E.F, Olsen. J.H. Raffn. E et Blair. A., 1992.** Multiple myeloma among Danish women: employment history and workplace exposures. **Cancer Causes Control, P427. 432.**
- Ralph. V et Wilfred. N., 2006.** Phenolic compound biochemistry. **Springer, P.2.3.**

- RIMA-OIV, 2010. RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV.** Indice de Folin-Ciocalteu, Méthode OIV-MA-AS2-10.
- Rineheart. K.L.J., 1973.** Oxidation and reduction of organic compounds. **Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.**
- Rivera. C, Guez. V, Roux. G, Vilanova. W Et Eng.C., 2008.** Modelisation de la cinétique de biodegradation de phenol par granules aerobies. **Can. J. Chem N° 86, P 15.22. 2008.**
- Ronald. M., 2004.** Handbook of microbiological media. **3^{ème} Edition. CRC PRESS, P 1268.**
- Sahar. Z., 2006.** Detection of *meta*- and *ortho*-cleavage dioxygenases in bacterial phenol-degraders. **J. Appl. Sci. Environ. Mgt. September, Vol. 10 N°3, 75.81.**
- Saliot. A, Tronczynsky. J, Scribe. P and Letolle. R., 1988.** The application of isotopic and biogeochemical markers to the study of the biochemistry of organic matter in a macrotidal Eastuary, the Loire, France. **Estuarine Coastal and Shelf Science N°27, P 645-669.**
- Sangely. M., 2010.** Dégradation biologique des polychlorobiphényles. **Thèse de Doctorat. Université de TOULOUSE, France, P 40.48.49.**
- Sarwade . V. D et Gawai. K.R., 2014.** Biodegradation of phenol by alkaliphilic *Bacillus badius* D1. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, Volume 8, 2319-2399.** Neff, J.M., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : source, fate and biological effect. **Applied Science, Essex, England, P 262.**
- Sgountzos. N, Pavlou. S, Paraskeva. C et Payatakes. A., 2006.** Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* in sand beds during biodegradation of phenol. **Biochemical Engineering Journal N° 30, P164.173.**
- Shiu. W, Varhanickova. D et Mackay. D., 1994.** Chlorophenols and alkylphenols: a review and correlation of environmentally relevant properties and fate in an evaluative environment. **Chemosphere, N°29, P 1155. 1224.**
- Shourian. M, Noghabi. K, Zahiri. T, Karballaei. G, Mollaei. M, Rad. I, Ahadi. S, Raheb. J et Abbasi. H., 2009.** Efficient phenol degradation by a newly characterized *Pseudomonas* sp. SA01 isolated from pharmaceutical Wastewaters. **Desalination N°246, P 577.594.**

- Siemiatycki. J., 1991.** Risk factors for cancer in the workplace. **CRC Press, Boca Raton, Florida, P 325.**
- Sivasubramanian. S, Namasivayam. K., 2015.** Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from environmental sources. **Journal of Environmental Chemical Engineering 3, P243–252.**
- Solano-Serena. F, Marchal .R. et Vandecasteele .J.P., 2001.** Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement : de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants. **Oil & Gas Science And Technology - Rev. Éditions Technip. Ifp, Vol. 56 , N°5, P479-498.**
- 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, Université Paris 6, P 18. 19. 20.**
- Soudi. M.R et kolahcki. N., 2011.** Bioremediation potential of a phenol degrading bacterium, *Rhodococcus erythropolis* SKO-1. **Progress in Biological Sciences Q Vol. 1, N°1, P 31-40.**
- Sridevi .V, Lakshmi. C, Mahanti .V, Adimadhyam .S et Medicherla.R., 2011.** Statistical optimization of process variables by response surface methodology to enhance phenol degradation by *Pseudomonas putida* (NCIM 2102). **Advances in Bioscience and Biotechnology Vol.2 N°4, P 7.**
- Taghizade. T, Najafpour.G, Khavarpour, M et Bakhshi. Z., 2011.** Phenol Biodegradation Kinetics in an Anaerobic Batch Reactor. **Roya Pishgar and Nafise Mousavi, Iranica Journal of Energy & Environment N°2 , P 68.73.**
- Vrignaud. F., 1998.** Le monde enterré des canalisations publiques. **Mémoire de Master, Université de Picardie, Amiens, P24.23.**
- Wagenheim. J et Bolcsfoldi. G., 1988.** Mouse lymphoma L5178 thymidine kinase locus assay of 50 compounds. **Mutagenesis N°3, P 193. 205.**
- Wilcosky, T.C. et Tyroler, H.A., 1983.** Mortality from heart disease among workers exposed to solvents. **J. Occup. Med, N° 25, P 879. 885.**
- William B. W, Aidan. C.P., 2009.** BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology, The *Firmicutes*. **2^{eme} Edi, Vol (3), Springer Dordrecht Heidelberg London New York, P 21.22.**

Xiangsheng. Z, Xu. D, Zhu. C, Tserennyam. L et Scherr. K., 2012. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Chemical Engineering Journal**, N°209, P 138–146

Yan. J, Wen. J, Bai.J, Xiaoqiang, J et Hua.Z., 2007. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Hazardous Materials**, N°47, P 672.676.

Site web

<https://www.google.dz/maps>

Annexe

Tableau1 : Classification des composés phénolique

Structure	Classe
C6	Simple Phenolics
C6 - C1	Phenolic Acids And Related Compounds
C6 - C2	Acetophenones And Phenylacetic Acids
C6 - C3	Cinnamic Acids, Cinnamyl Aldehydes, Cinnamyl Alcohols
C6 - C3	Coumarins, Isocoumarins, And Chromones
C15	Chalcones, Aurones, Dihydrochalcones
C15	Flavans
C15	Flavones
C15	Flavanones
C15	Flavanonols
C15	Anthocyanidins
C15	Anthocyanins
C30	Biflavonyls
C6-C1-C6, C6-C2-C6	Benzophenones, Xanthones, Stilbenes
C6, C10, C14	Quinones
C18	Betacyanins
Lignans, neolignans	Dimers Or Oligomers
Lignin	Polymers
Tannins	Oligomers Or Polymers
Phlobaphenes	Polymérisé

Source : Ralph et Wilfred, 2006

Tableaux 3 : List des différents microorganismes inclus en dégradation de phénol

Source	Genus	Species	Reference
Bacteria	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Yan Jiang <i>et al.</i> , (2007)
		<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	Sung Ho Yeom <i>et al.</i> ,(1997)
	<i>Arthrobacter</i>	Y234	S.Kar <i>et al.</i> , (1997)
		<i>Arthrobacter species</i>	Chandrakant <i>et al.</i> , (2005)
		<i>Arthrobacter citreus</i>	Maria Unell <i>et al.</i> , (2005)
		<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	Annadurai <i>et al.</i> , 2008 ;
		A6	Bandhyopadhyay <i>et al.</i> , (1998)
		<i>Pseudomonas putida</i>	Folsam <i>et al.</i> ,1998)
		<i>Pseudomonas cepacia</i>	Annadurai <i>et al.</i> ,(1990)
		<i>Pseudomonas pictorum</i>	Kotresha <i>et al.</i> ,(2007)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ahmed, (2008)
	<i>Cyanobacterium</i>	MTCC 4996	Song <i>et al</i> (1995)
	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Wurster <i>et al.</i> ,(2009)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tallur <i>et al.</i> (2003)
		CC7CCAB919095	Arutchelvan <i>et al.</i> ,(2008)
	<i>Cyanobacterium</i>		
	<i>synechococcus</i>		
	<i>Bacillus species strain PHN 1</i>		
	<i>Bacillus brevis</i>		
Fungi	<i>Candida</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Sunil S <i>et al.</i> ,(2006) ; Yan Jiang <i>et al.</i> , [36]
	<i>Fusarium</i>	<i>Candida tropicalis NICM</i>	
	<i>Graphium</i>	3556	Varma <i>et al</i> (2007, 2008)
	<i>Ochromonas</i>	<i>Fusarium species</i>	Weijian Cai <i>et al.</i> ,(2007)
	<i>Aspergillus</i>	<i>Graphium sp.FIB4</i>	Vera L.Santos <i>et al.</i> ,(2002)
		<i>Ochromonas danica</i>	Kirk T. Semple <i>et al.</i> , (1997)
		<i>Aspergillus awamori NRRL 3112</i>	Stoilova <i>et al.</i> , (2007)
Yeast	<i>Phanerochaete</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ahmadi <i>et al.</i> , (2005)
	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Begona <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Rhodotorula</i>	UPV -1	Irina Krallish <i>et al.</i> , (2006)
	<i>Sphingomonas</i>	<i>Rhodotorula creatinivora</i>	Bielefeldt <i>et al.</i> , (2005)
	<i>Trichosporon</i>	<i>Sphingomonas chlorophenolica</i>	Vera L.Santos <i>et al.</i> , (2001)
		RA 2	Aleksieva <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Trichosporon species LE3</i>		
	<i>Trichosporon cutaneum R57</i>		

Source: Basha *et al.*, 2010

Composition de milieu de culture

Composition de milieu minéral par litre

Na ₂ HPO ₄	3.80 g/l
KH ₂ PO ₄	1.00 g/l
NaCl	1.00 g/l
MgSO ₄	0.20 g/l
NH ₄ Cl	0.10 g/l
H ₂ O	1000 ml

Le PH 7 ajusté par HCL et autoclavé à Température 120C°/ 1b, pendent 20min (Heinaru et *al.*2005 ; Li et *al.*, 2010)

Composition de milieu gélose nutritif par litre

Peptone	10 g
NaCl	5 g
Extrait de Levure	5 g
Agar	15 g
H ₂ O	1000 ml

Le pH ±7 a Température 25C°, le milieu préparé autoclavé à Température 120C°/ 1b, pendent 20min (Ronald. M., 2004)