

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Microbiologie environnementale et Infectieuse*

### THEME

---

# Isolement et Identification des bactéries du sol pollué par les hydrocarbures et essai de biodégradation du phénol

---

**Présenté par :**

M. BENADJILA Abderrahmane

**Devant le jury :**

**Président :** M. Ghermaoui Mohamed, Maitre Assistant Classe A

**Rapporteur :** M. GOUZI Hicham, Maitre de Conférences Classe A

**Examineur :** M. Benaceur Farouk, Maitre Assistant Classe B

**Soutenu publiquement le : 31 Mai 2017.**

## Remerciements

*Je souhaite avant tout remercier mon encadreur Dr GOUZI Hicham pour le temps qu'il a consacré à m'apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de ce travail. L'enseignement de qualité dispensé par le Master « microbiologie infectieuse et médicale » a également su nourrir mes réflexions et a représenté une profonde satisfaction intellectuelle, merci donc aux enseignants-chercheurs.*

*Je remercie en particulier Mr GHERMAOUI Mohamed de m'avoir donné l'honneur extrême d'accepter de présider ce travail. Un grand merci également à Mr BÉNACEUR Farouk, d'avoir eu le temps et d'accepter d'examiner ce travail.*

*Je suis également reconnaissante envers le personnel du laboratoire EPH Laghouat qui ont eu la gentillesse de participer à mon travail en réalisant certains tests et examens microbiologiques.*

*J'aimerais exprimer ma gratitude à tous les biologistes et microbiologistes, trop nombreux pour les citer, qui ont pris le temps de discuter de mon sujet. Chacun de ces échanges m'a aidé à faire avancer mon analyse.*

*Enfin, un grand merci à ma mère qui m'a apporté une aide précieuse en acceptant de relire ce mémoire.*

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

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

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

**Abstract:** as part of the environmental impact compared to the massive pollution, our approach focuses mainly on the application of biological processes on rejected organic pollutants. Indeed, the existence of this process depends on the inherent biodegradability (pollutant) but also the presence of competent-degrading microflora in soils.

During this work, we isolated strains from soils contaminated by organic pollutants (phenol), If service station. And the use of these native bacteria for assessing the biodegradability of various other organic pollutants in aerobic conditions. An identification test of dominant microorganisms is achieved.

Among thirteen isolates and eliminating those souche that are similar, one could identify three bacteria are as follows: *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Micrococcus*.

The results show the ability of microorganisms to grow by degrading phenol; the dominant microorganisms identified two bacterial genera *Pseudomonas* and *Bacillus*.

**Keywords:** biodegradation, organic pollutants, phenol, identification, isolation *Pseudomonas*, *Bacillus*.

## ملخص ;

في إطار حماية البيئة من آثار التلوث الهائل، تركزت مساعيها عموماً على تطبيق المراحل البيولوجية على الملوثات عضوية المرفوضة وبالفعل ونجاح هذه المهمة يعتمد على التحلل البيولوجي ولكن لا يتحقق ذلك إلا بوجود الكائنات الطبيعية الموجودة في الأرض القادرة على قيام بعملية التحليل.

خلال هذا العمل، عزلنا سلالات من التربة الملوثة بالملوثات العضوية (البنزين وزيت الوقود... الخ)، مثال محطة الخدمات. واستخدام هذه البكتيريا الأم لتقييم التحلل البيولوجي وتطبيقه على ملوثات عضوية أخرى مختلفة في وجود الهواء. مع الوصول إلى تحديد البكتيريا السائدة.

من بين السلالات الثلاثة عشر المعزولة، تم نزع السلالات المتشابهة وتحديد ثلاث بكتيريات وهي عصيات والزائفة والميكروكوكيس.

أظهرت النتائج المتحصل عليها قدرة هذه الكائنات الحية الدقيقة على النمو بالنسبة للفينول. في إطار البحث على هذه الكائنات الحية السائدة تم تحديد اثنين من الأجناس البكتيرية: الزائفة والعصيات.

**الكلمات المفتاحية :** التحلل البيولوجي، والملوثات العضوية، والفينول، تحديد، العزلة، الزائفة، العصوية.

## Sommaire

Remerciements .....	i
Résumé .....	ii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures .....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Introduction .....	1
<b>Rappel bibliographique.....</b>	<b>04</b>
1) Microbiologie Du Sol .....	05
1.2) La microflore du sol :.....	05
1.3) Répartition dans les sols : .....	07
1.4) Activités microbiennes dans les sols : .....	08
2) Pollution Du Sol.....	08
3)Biodépollution Par Les Microorganismes .....	09
4)Les Principaux Processus De Transformation .....	09
4.1) La minéralisation : .....	10
4.2) Le cométabolisme : .....	10
4.3) La polymérisation : .....	10
4.4) L'accumulation cellulaire .....	10
4.5) La biodégradation non-enzymatique : .....	11
5) Généralités Sur le Phénol :.....	11
5.1) Données toxicologiques .....	12
5.2) Devenir dans l'organisme .....	12
5.3) Effets cancérigènes Classification : .....	14
5.4) Caractère génotoxique : .....	14
6) Biodégradation Aérobie Du Phénol .....	14
7)Biodégradation anaérobie du phénol : .....	15
<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>18</b>
1). Prélèvement de sol .....	18
2) Préparation des milieux de culture :.....	19
2-1) Préparation de l'eau physiologique : .....	19
2-2) Préparation du milieu de culture liquide (bouillon nutritif) : .....	20
2-3) Préparation du milieu solide MH (Gélose Mueller-Hinton):.....	20

2-4) Milieu minéral pour l'étude de dégradation :	21
3) coloration de GRAM.....	21
4) Identification biochimiques des souches (étape effectuée laboratoire EPH Laghouat) :.....	22
5) Préparation de solution phénol à 10g/l :	10
6) Repiquages et essais de purification des souches .....	23
7) Préparation des inoculas pour tester la dégradation du phénol :	23
8) Estimation des taux de dégradation du phénol :	23
9) Etude de dégradation du phénol.....	24
<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>26</b>
1) Aspect des milieux après 24 h d'incubation :	26
1-1) boîtes de PETRI :	26
1-2) Aspect des tubes de cultures (milieu nutritif) :	27
1-3) Aspects des lames après coloration de GRAM :	28
2) Résultats après repiquages et isolement des colonies :	30
2.1) sur milieu MH :	30
2.2) sur milieu gélose au sang frais :	30
3) Résultats après repiquages et isolement des colonies :	31
4) Aspect des cultures après 7 jours de culture sur phénol :	31
<b>Conclusion :</b> .....	<b>35</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>36</b>

*Annexe*

## Liste des tableaux

N° du tableau	Titre du tableau	N° de pages
Tableau 01	Comparaison de la population microbienne d'un sol rhizosphérique et d'un sol non-rhizosphérique	6
Tableau 02	Ordre de grandeur des densités et biomasses de microorganismes dans les sols	7
Tableau 03	Comparaison de la population microbienne d'un sol rhizosphérique et d'un sol non-rhizosphérique	8
Tableau 04	Microorganismes dégradant des pesticides, isolés dans des sols de rizière	12
Tableau 05	Propriétés du phénol	13
Tableau 06	volumes du phénol et DO des inocula	26
Tableau 07	quelques tests biochimiques d'orientation	34

## Liste des figures

N° de la figure	Titre de la figure	N° de pages
Figure 01	Interactions entre les composantes d'un sol et un polluant	9
Figure 02	la voie Méta de la dégradation de la dégradation du phénol	17
Figure 03	La voie Ortho de la dégradation de la dégradation du phénol.	17
Figure 04	La voie anaérobie pour la biodégradation du phénol	18
Figure 05	localisation géographique de site des prélèvements	20
Figure 06	Aspect des échantillons des sols	21
Figure 07	Schéma d'isolement des bactéries	22
Figure 08	Schéma simplifié d'une coloration de GRAM	24
Figure 09	Schéma simplifié de préparation d'une solution 0,1 % de phénol	25
Figure 10	Schéma simplifié de détermination de la DO de l'inoculum	27
Figure 11	Aspect macroscopique des colonies après cultures de 24 H	29
Figure 12	L'aspect des tubes après 24 h de culture a 37C°	30
Figure 13	Aspect des tubes 4 et 3 (présence des couches blanches en surface)	30
Figure 14	Aspects des lames après coloration de GRAM (milieu liquide)	32
Figure 15	Aspects des lames après coloration de GRAM (boites de PETRI)	33
Figure 16	Séparation des colonies de l'échantillon N° 4	33
Figure 17	Séparation des colonies et culture sur gélose au sang	34
Figure 18	Aspects des cultures après 3 jours de cultures sur milieu minéral+ phénol	35
Figure 19	Aspects des cultures après 7 jours de cultures sur milieu minéral+ phénol	35
Figure 20	Test FOLIN entre les trois souches et le témoin	37

## Liste des abréviations

ADH : Arginine Di-hydrolase.

BN : Bouillon Nutritif.

DO : Densité optique.

GN : Gélose Nutritive.

HAP : Hydrocarbures Aromatique Polycyclique.

LDC : Lysine Décarboxylase.

Mg : milligramme.

MH : Muller Hinton.

Ml : millilitre.

ODC : Orthinine Décarboxylase.

t/m : tour par minute.

TSI : Triple Sugar Iron.

UFC : Unités Formants Colonies.

$\mu$ L : Microlitre.

VP : Voger- PoosKauer.

# *Introduction*

Un sol est dit pollué quand il contient un ou plusieurs polluant(s) ou contaminant(s) susceptibles de causer des altérations biologiques, physiques et chimiques. Le polluant se définit comme un altéragène biologique, physique ou chimique, qui au-delà d'un certain seuil, et parfois dans certaines conditions développe des impacts négatifs sur tout ou partie d'un écosystème ou de l'environnement en général. Autrement dit, la pollution du sol est comprise comme altération du biotope constitué par l'humus (ou tous autres types de sols) par l'introduction de substances toxiques, éventuellement radioactives ou d'organismes pathogènes entraînant une perturbation plus ou moins importante de l'écosystème. Selon le polluant et le contexte, ses impacts seront directs ou indirects ; (Zouboulis, 2004 ; J. Römbke, 2005)

À titre d'exemple, au début des années 2000, la France estime à 230 000 le nombre de sites connus pour avoir été pollués, ou pour avoir pu l'être, par l'industrie ou des services dans le pays dont près de 4 000 font l'objet de mesures de surveillance, de diagnostic ou de réhabilitation. Il faudrait y ajouter les anciennes décharges municipales (au moins une pour chacune des 36 000 communes), les pollutions d'origine militaire, agricole, cynégétique, etc. (Arrouays, 2000)

Aux États-Unis, un fonds spécial dit Superfund, avec contribution des pollueurs, est dédié au traitement des cas les plus graves, sous l'autorité directe de l'État fédéral (A. Breure, 2004).

Empiler et humidifier des résidus organiques permet la décomposition biologique : un processus connu comme le compostage de déchets organiques. La technologie a été étendue pour inclure le traitement de déchets alimentaires, des déchets agricoles et des eaux usées. Plus récemment, la bioremédiation a été appliquée au traitement des déchets dangereux. C'est-à-dire permettant la remédiation des sols pollués et des eaux usées (M.C. GIRARD, 2005)

La pollution du sol par les carburants devenus un composant épineux de développement urbain et comme un cas particulière les stations-services, qui représentent une 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 risques majeurs pour l'environnement et constitue le thème central 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

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. (Piedrafita et Victoria, 2007)

Dès les années 70, la dégradation biologique des polluants aromatiques sont établies (Baxter et al., 1975). En condition aérobie, quelques microorganismes sont capables de métaboliser des polluants aromatiques à faible concentration. Une décennie plus tard, une équipe américaine, en étudiant la contamination de la Rivière Hudson à New-York, met en évidence le phénomène de biotransformation par voie anoxique (Brown et al., 1987). Les solutions de traitement biologique deviennent alors une alternative envisageable à l'incinération ou au stockage systématique des sols contaminés par des polluants aromatiques (Adebusoye, 2008). Elles présentent plusieurs avantages. Elles sont moins onéreuses, n'émettent pas de sous-produits toxiques et nécessitent moins d'énergie fossile. Elles ont à priori un avantage environnemental.

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 (Barkat et Kired , 2015).

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 bactéries (Barkat et Kired , 2015).

Malgré tous les avantages que peuvent avoir les solutions biologiques de traitement de sols contaminés par des polluants aromatiques malgré les nombreuses études en laboratoire, aucun spécialiste de la dépollution des sols ne propose aujourd'hui une offre commerciale pour le traitement de sols contaminés par des polluants aromatiques par voie biologique (ADEME, 2009)

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.

Ce mémoire a été organisé en différentes parties décrivant les étapes successives de cette étude :

La première partie concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur les populations du sol et la toxicité des carburants et l'impact de ses derniers sur l'environnement, sur le phénol et 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

# Rappel bibliographique

### 1) Microbiologie du sol

Une grande partie des activités microbiennes dans le sol échappent encore à tout contrôle technologique; c'est seulement par la connaissance de ce monde microbien du sol qu'on peut tendre à le maîtriser dans le sens favorable, celui de la fertilité, de la détoxification des substances polluantes, de l'enrichissement en azote à partir de l'azote atmosphérique qui constitue une réserve gratuite (Gobat et *al.*, 1998).

La microflore du sol est constituée par l'ensemble des communautés de

- Bactéries
- d'Actinomycètes
- de Champignons
- et d'Algues
- protozoaires

Certains auteurs incluent également dans la microflore du sol les Protozoaires et les Virus

La petite taille des germes du sol pourrait inciter à sous estimer leur rôle, mais leur pullulation compense leurs faibles dimensions.

#### 1.2) La microflore du sol

##### a) Les algues

Les algues autotrophes (possèdent de la chlorophylle) abondent surtout dans les deux premiers centimètres du sol. Certaines espèces sont cependant hétérotrophes et vivent dans des couches plus profondes, dégradant les matières organiques.

Les algues fabriquent un mucilage qui les entoure et qui héberge de nombreuses bactéries.

##### b) Bactéries

Les bactéries sont les organismes les plus nombreux du sol (Tableau 1.1-a). Elles sont unicellulaires, parfois mobiles et leur taille peut varier de 0,2 à 10 J.1m. Des échanges de matériel génétique se produisent par conjugaison (transfert de matériel génétique d'un donneur vers un receveur avec contact direct), par transduction (transfert direct d'ADN par un virus attaquant la bactérie), ou par transformation (transfert d'un fragment de matériel chromosomique d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice, sans contact direct).

## Rappel bibliographique

Il existe plus de 200 genres bactériens différents. Parmi les plus représentés dans le sol, on peut citer (Alexander, 1977) :

- les *Arthrobacter*, Gram variables à croissance lente, qui peuvent représenter 5 à 60% des colonies,
- les *Pseudomonas*, Gram- mobiles, représentant 3 à 20% des UFC (unités formant colonie). ils utilisent une grande variété de substrats organiques: sucres, acides aminés, acides humiques, huiles et de nombreux pesticides,
- le genre *Bacillus*, bâtonnets sporulants Gram+ ou Gram variables, souvent mobiles, qui est également bien représenté dans les sols: de 7 à 67%,
- les *Clostridium*, bactéries anaérobies utilisées pour la production d'alcool et de solvants.

**Tableau 1:** Comparaison de la population microbienne d'un sol rhizosphérique et d'un sol non-rhizosphérique (Bonneau et Souchier, 1994).

	Sol rhizosphérique	Sol non rhizosphérique
<b>Micro-organismes</b>	<b>Nombre UFC/g de matière sèche</b>	
Grands groupes taxonomiques		
Bactéries	1200.10 <sup>6</sup>	50.10 <sup>6</sup>
Actinomycètes	46.10 <sup>6</sup>	7.10 <sup>6</sup>
Champignons	12.10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
Protozoaires	24.10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Algues	5.10 <sup>3</sup>	27.10 <sup>3</sup>
Groupes nutritionnels bactériens		
Ammonifiants	500.10 <sup>6</sup>	4.10 <sup>6</sup>
Anaérobies	12.10 <sup>6</sup>	6.10 <sup>6</sup>
Dénitrifiants	126.10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>

### c) Actinomycètes

Intermédiaires entre bactéries et champignons, les actinomycètes jouent un rôle important dans la décomposition des litières d'une part, dans l'humification d'autre part.

Ils semblent jouer un grand rôle dans la transformation de certains composés organiques et minéraux du sol, mais ce rôle est encore mal connu : ils seraient susceptibles de décomposer les composés de la M.O.F. tels que la lignine et certains tannins, et d'élaborer certains acides humiques.

## Rappel bibliographique

Les actinomycètes ont aussi d'autres fonctions : certaines espèces, en particulier *FRANKIA Alni*, forment des nodosités avec les racines des aulnes, et sont à l'origine d'une fixation active d'azote atmosphérique qui explique le rôle améliorant de cette espèce.

### d) Champignons

Ils résistent mieux que les bactéries à la sécheresse et à l'acidité, et constituent la microflore quasi exclusive de certains sols secs et acides. Mais à la différence des bactéries, ils sont toujours hétérotrophes et aérobies; et ne prolifèrent pas dans les milieux mal aérés.

Leur rôle dans le sol est considérable et très varié : il exerce surtout dans la phase de décomposition de la matière organique, qui précède l'humification : la plupart sont aptes à décomposer la cellulose, certains sont capables de décomposer des composés phénoliques plus résistants tels que la lignine et les tannins.

Les pourritures brunes ou molles décomposent les celluloses préférentiellement aux composés phénoliques : la lignine, libérée est peu transformée. Les pourritures blanches, au contraire, s'attaquent à la lignine et aux tannins, libérant des composés phénoliques, à petites molécules, donc solubles (appelés souvent « précurseurs » des composés humiques).

Certains champignons sont associés aux racines des plantes et des arbres, en formant des mycorhizes, à vie symbiotique, qui facilitent la croissance et la nutrition des espèces concernées.

### e) Protozoaires :

Ces organismes sont très nombreux dans le sol. Leur pullulation exige l'existence d'un haut degré d'humidité. Ils s'enkystent par sécheresse. Ils se nourrissent surtout de bactéries. A ce titre, ils jouent un rôle important dans la composition et les activités microbiologiques du sol.

**Tableau 2 :** Ordre de grandeur des densités et biomasses de microorganismes dans les sols (P. A. Roger 2006).

Organismes	Numérations	Biomasse
<b>Bactéries</b>	Numération sur milieu liquide ou solide: $10^5 - 10^8 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$ Comptage direct : $10^8 - 10^{10} \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$	100 à 4000 kg poids frais $\text{ha}^{-1}$
<b>Actinomycètes</b>	$10^5 - 10^8 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$	
<b>Champignons</b>	$10^4 - 10^6 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$	10 à 1000 m d'hyphes $\text{g}^{-1} \text{ sol}$ 50 à 5000 kg poids frais $\text{ha}^{-1}$
<b>Algues et cyanobactéries</b>	sols exondés: $10^2 - 10^4 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$ sols submergés: $10^3 - 10^8 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$	sols exondés: 0 à 500 kg poids frais $\text{ha}^{-1}$ sols submergés: 0 à 30 000 kg poids frais $\text{ha}^{-1}$
<b>Protozoaires</b>	$10^3 - 10^5 \text{ g}^{-1} \text{ sol sec}$	?

### 1.3) Répartition dans les sols

Dans les sols, les micro-organismes sont beaucoup plus nombreux dans les litières, les horizons de surface et la rhizosphère des plantes où les conditions énergétiques et nutritionnelles sont les meilleures (Tableau 2)

**Tableau 3** : Comparaison de la population microbienne d'un sol rhizosphérique et d'un sol non-rhizosphérique (Bonneau et Souchier, 1994).

Micro-organismes	Sol rhizosphérique	Sol non rhizosphérique
	Nombre UFC/g de matière sèche	
Grands groupes taxonomiques		
Bactéries	1200.10 <sup>6</sup>	50.10 <sup>6</sup>
Actinomycètes	46.10 <sup>6</sup>	7.10 <sup>6</sup>
Champignons	12.10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
Protozoaires	24.10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Algues	5.10 <sup>3</sup>	27.10 <sup>3</sup>
Groupes nutritionnels bactériens		
Ammonifiants	500.10 <sup>6</sup>	4.10 <sup>6</sup>
Anaérobies	12.10 <sup>6</sup>	6.10 <sup>6</sup>
Dénitrifiants	126.10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>

### 1.4) Activités microbiennes dans les sols

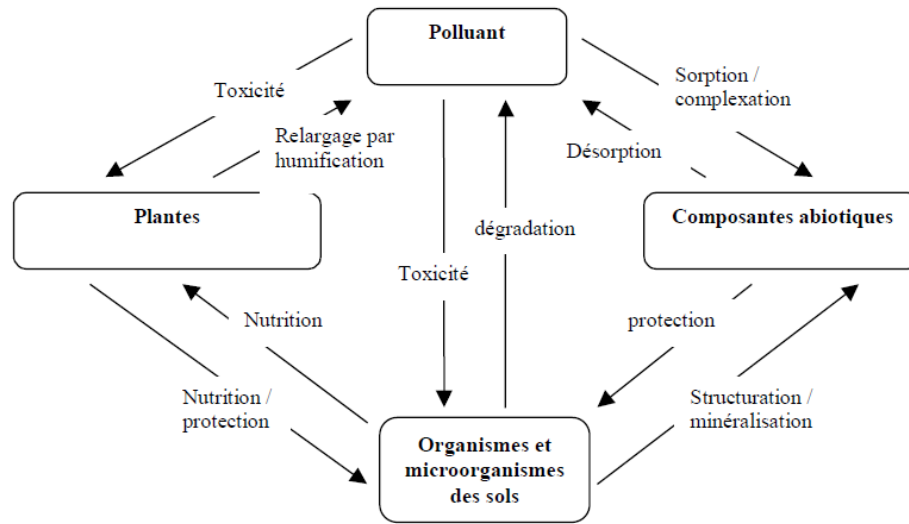
L'activité des micro-organismes du sol ne se manifeste que si les conditions énergétiques et nutritionnelles sont satisfaites. Les nutriments doivent répondre à 3 besoins : fournir de l'énergie pour la croissance cellulaire, fournir des matériaux pour la synthèse des constituants cellulaires et être utilisables comme accepteurs des électrons libérés au cours de la production d'énergie. Les écologistes microbiens ont identifié des limites de conditions environnementales critiques qui affectent l'activité des micro-organismes du sol. Beaucoup de ces conditions sont contrôlables et peuvent être modifiées pour augmenter la biodégradation des composés organiques, si cela est nécessaire.

### 2) Pollution Du Sol

Les termes "contamination" et "pollution" nécessitent d'être préalablement définis. Ils présentent une certaine nuance tout en étant couramment employés pour désigner une accumulation anormale d'éléments ou de composés minéraux, organiques ou d'agents pathogènes dans un milieu donné dont la qualité se trouve affectée (Chassin et al., 1996).

Le degré de gravité de la pollution des sols est variable. Il dépend de plusieurs facteurs, comme :

- la nature du sol, qui peut impacter, selon les cas, sur la diffusion des métaux ;
- les risques de transmission d'éléments pathogènes suite au transport de terre ;
- le niveau de dégradabilité de chaque élément perturbateur/polluant ;
- la capacité même du polluant à impacter de quelque façon que ce soit le fonctionnement de la biosphère ou d'un écosystème.



**Figure 1:** interactions entre les composantes d'un sol et un polluant (d'après Hicks *et al.*, 1990).

Bon à savoir : lorsque l'origine d'une pollution des sols est déterminée, cela peut donner lieu à la création d'un fonds spécifique permettant de traiter le problème. Une contribution peut être demandée à la tranche de population reconnue comme responsable de cette pollution.

Tout comme le degré de gravité des différentes pollutions, les causes d'une pollution des sols sont extrêmement diverses. Les pollutions sont recensées dans un registre dédié après avoir été cartographiées. Les causes d'une pollution des sols peuvent être liée à :

- Une activité : elle peut être industrielle ou agricole. Mais il peut aussi s'agir d'une guerre, de la pratique sportive, de loisirs, ou encore de certaines catégories d'accidents.

Les polluants sont de nature très diverse. Ils comprennent une grande variété de composés organiques, certains métaux et des gaz. L'importance relative accordée à un polluant a généralement été dictée par sa toxicité directe pour l'homme.

Toutefois, la nouvelle perception des problèmes planétaires liés à l'activité anthropique amène maintenant à considérer comme polluants majeurs des composés sans action directe sur l'homme, mais dont l'accumulation peut avoir des effets significatifs sur l'environnement

### **3) Biodépollution Par Les Microorganismes**

Les organismes du sol sont responsables, directement ou indirectement, de nombreuses fonctions clés du fonctionnement du sol. Celles-ci incluent la décomposition des résidus animaux et végétaux, la transformation et le stockage des nutriments, les échanges gazeux et hydriques, la formation et la stabilisation de la structure du sol, la synthèse des composés humiques et la dégradation des molécules xénobiotique (Dick, 1997 ; Paul, 2000).

De nombreux agents polluants et pesticides peuvent être transformés ou décomposés à la fois par des réactions physico-chimiques et biologiques. Toutefois décomposition et transformations sont généralement plus rapides dans des environnements comportant une microflore que dans les environnements stériles.

L'implication des microorganismes dans la dégradation des polluants est indirectement établie par l'existence d'une phase de latence suivie d'une disparition plus rapide correspondant à une adaptation de la microflore et au fait que l'application répétée d'un polluant ou d'un pesticide provoque assez fréquemment un raccourcissement de la phase de latence (Van der Meer et al., 1992 ; Gottschalk and Knackmuss, 1993).

Enfin, la démonstration du rôle des microorganismes dans la dégradation des polluants est faite par l'isolement de souches capables de décomposer ces produits en culture pure. Le tableau 02 présente une compilation des microorganismes isolés de sols de rizière, capables de décomposer des pesticides utilisés en riziculture.

### **4) Les Principaux Processus De Transformation**

Cinq processus impliqués dans les biotransformations de xénobiotiques ont été définis dans la littérature. Ce sont la minéralisation, le cométabolisme, la polymérisation, l'accumulation et les effets secondaires de l'activité microbienne (Bollag and Liu, 1990).

La biotransformation d'une molécule de polluant peut faire intervenir un ou plusieurs processus simultanément ou successivement et conduire à la formation de différents produits issus du métabolisme d'un ou plusieurs micro-organismes.

L'amplitude de la transformation dépend de différents facteurs biotiques et abiotiques, comme la température, l'humidité, le pH, la pression partielle d'oxygène dans le sol, la concentration en polluant.

### **4.1) La minéralisation**

C'est la conversion d'une molécule organique en ses constituants inorganiques (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O). C'est donc le processus le plus intéressant car il conduit à une épuration totale du milieu pollué. Le xénobiotique est utilisé comme source de carbone et d'énergie.

La minéralisation a lieu lorsqu'un composé organique est attaqué par les mécanismes cellulaires cataboliques et anaboliques centraux (Madsen, 1991).

Les organismes responsables tirent en général profit des réactions de minéralisation : une croissance microbienne est attendue et une partie du carbone initialement dans la molécule organique est en général incorporée dans la biomasse (Alexander, 1981).

### **4.2) Le cométabolisme**

Le cométabolisme est la modification fortuite d'une molécule par une enzyme qui agit sur une autre molécule (substrat primaire). Le substrat primaire est le support de la croissance de micro-organismes qui produisent une ou plusieurs enzymes de faible spécificité agissant aussi sur le substrat cométabolisé. Ce dernier est en général seulement faiblement altéré et n'entre pas dans les chemins cataboliques et anaboliques de la cellule microbienne. (Madsen, 1991). Par conséquent, l'organisme responsable ne profite pas des réactions de cométabolisme. La croissance microbienne n'est pas un corollaire et on n'attend pas d'accélération des réactions de cométabolisme (Alexander, 1981). Toutefois, d'autres organismes peuvent être capables de minéraliser les produits du cométabolisme.

### **4.3) La polymérisation :**

Les molécules xénobiotiques ne sont pas toujours dégradées directement mais polymérisées, ce qui les rend moins toxiques. Dans ce processus, les molécules de xénobiotiques s'associent avec elles-mêmes, ou d'autres composés xénobiotiques, ou des composés naturels (Bollag and Loll, 1983). Elles sont alors incorporées à la matière organique du sol et peuvent être relarguées de manière incontrôlée suivant l'activité microbienne du sol.

### **4.4) L'accumulation cellulaire**

L'adsorption des molécules xénobiotiques est généralement attribuée à des processus passifs car, dans la plupart des cas, les cellules mortes présentent un taux d'adsorption supérieur ou égal à celui des cellules vivantes.

Par exemple, le DDT et le Dieldrin peuvent être adsorbés à environ 100% en quelques minutes, parfois irréversiblement, par des micro-organismes ou des algues unicellulaires (Bollag and Liu, 1990). Cette adsorption parfois élevée n'est pas nécessairement couplée à une biodégradation. Aussi, l'accumulation cellulaire, par l'intermédiaire du mouvement microbien, peut être un mécanisme important de transport de polluants dans le sol.

#### 4.5) La biodégradation non-enzymatique

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

**Tableau 04:** Microorganismes dégradant des pesticides, isolés dans des sols de rizière (d'après Roger et Bhuiyan, 1995).

Pesticide	Microorganisme	Référence
Benzène hexachloride	<i>Clostridium</i> sp.	Sethunathan et al. 1969
Carbaryl	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Venkateswarlu et al. 1980
Carbofuran	<i>Arthrobacter</i> sp.	Rajagopal et al. 1984
"	<i>Bacillus</i> sp.	Rajagopal et al. 1984
"	<i>Micrococcus</i> sp.	Rajagopal et al. 1984
Diazinon	<i>Arthrobacter</i> sp.	Sethunathan & Pathak 1971
"	<i>Arthrobacter</i> sp.	Sethunathan et al 1982
"	<i>Flavobacterium</i> sp.	Yoshida 1971
"	<i>Flavobacterium</i> sp.	Sethunathan 1972
"	<i>Streptomyces</i> sp.	Sethunathan & MacRae 1969
γ BHC	<i>Clostridium rectum</i>	Ohisha & Yamaguchi 1978b
"	<i>Clostridium</i> sp.	Sethunathan & Yoshida 1973b
HCH	<i>Clostridium sphenoides</i>	Heritage & MacRae 1979
Heptachlor	<i>Clostridium</i> sp.	Sethunathan & Yoshida 1973b
Lindane	<i>Clostridium</i> sp.	MacRae et al. 1969
Metoxychlor	<i>Clostridium</i> sp.	Sethunathan & Yoshida 1973b
Parathion	<i>Bacillus</i> sp.	Siddaramappa et al. 1973
"	<i>Bacillus</i> sp.	Sudhakar-Barik et al. 1976
"	<i>Flavobacterium</i> sp.	Sethunathan & Yoshida 1973a
"	<i>Pseudomonas</i> sp.	Siddaramappa et al. 1973
"	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sudhakar-Barik et al. 1976
Pentachlorophenol	<i>Mycobacterium</i> sp.	Suzuki 1983a et b
"	<i>Pseudomonas</i> sp.	Watanabe 1973b
"	<i>Pseudomonas</i> sp.	Suzuki 1983a et b

#### 5) Généralités Sur le Phénol

Le phénol est un xénobiotique, appartenant aux composés aromatiques, qui représentent la deuxième classe de composés organiques les plus abondants dans la nature (M. Boll 2006). C'est un produit majeur de la grande industrie, en servant de précurseur pour la fabrication d'une variété de résines (phénolique, époxy, polycarbonate et polyamide) (S. E. Agarry, 2008). Le phénol et ses dérivés sont généralement trouvés dans les rejets d'eaux industrielles provenant des industries de produits chimiques, pesticides, conversion du charbon, papiers, raffinage du pétrole etc.

Le phénol est également présent dans les déchets ménagers puisqu'il est retrouvé dans les lixiviats générés au cours de la dégradation des déchets dans les installations de stockage de déchets non dangereux (ISDND) (A. Baun, A 2004). En raison de sa toxicité (T.P.Kauppinen, 1993 , D. A. Eastmond, 1986), il est donc important d'étudier le devenir du phénol lors de la digestion anaérobie afin de développer des procédés permettant de le dégrader au mieux afin qu'il ne se retrouve pas en quantité trop importante dans les digestats qui sont ensuite utilisés après compostage en tant qu'amendement organique. D'autre part le phénol peut inhiber certains microorganismes qui jouent un rôle important dans le processus de digestion anaérobie des déchets ménager (Y. T. Wang, 1991 -H. H. P. Fang, 1997).

Le phénol a une constante molale cryoscopique de 6,84 °C·kg/mol et une constante molale ébullioscopique de 3,54 °C·kg/mol. De couleur blanche à l'état pur, il a tendance à s'oxyder légèrement au contact de l'air pour donner des traces de quinones qui le colorent en rose, puis en rouge (Robert H. Perry 1997).

**Tableau 5 :** propriétés du phénol Perry's Chemical Engineers' Handbook, USA, McGraw-Hill, 1997

Structure chimique	Synonymes	Forme physique
<p>Phénol (forme émol)</p> <p>cyclohexa-2,4-diènone (forme cétone)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Phenol;</li> <li>2. Carbohic acid</li> <li>3. Hydroxybenzene</li> <li>4. Phenic acid;</li> <li>5. Phenylic acid</li> </ol>	

### 5.1) Données toxicologiques

L'ensemble des informations et des données toxicologiques provient de diverses monographies publiées par des organismes reconnus pour la qualité scientifique de leurs documents (OMS ICPS, 1994; ATSDR, 1998 ; IARC, 1999).

### 5.2) Devenir dans l'organisme

#### a) Etudes chez l'homme

Le phénol est rapidement absorbé par toutes les voies d'exposition. L'absorption est estimée à 70, 80 % en 6 heures pour une exposition des vapeurs de phénol A des concentrations comprises entre 6 et 20 mg/m<sup>3</sup> (1,6 et 5,2 ppm). Le phénol est ensuite rapidement distribué dans tous les tissus. Les organes cibles sont le cerveau et les reins. Le foie, les poumons et la muqueuse gastro-intestinale sont les principaux sites de métabolisation du phénol. Ceux-ci dépendent de la voie d'exposition. Le phénol se conjugue pour former des sulfo- et glucuro-conjugués. Le phénylsulfate est le principal métabolite (2/3 sont excrétés dans les urines en 24 heures). Cette sulfatation se réalise dans de nombreux tissus. Seule une petite fraction du phénol est transformée en catéchol ou en hydroquinone (Parke et Williams, 1953). La formation de métabolites réactifs comme le 4,4- biphénol ou le diphénoquinone est rapportée lors d'études réalisées *in vitro* avec des neutrophiles humains activés ou des leucocytes (Eastmond et al., 1986).

Le phénol est essentiellement éliminé par voie urinaire. On trouve du phénol normalement dans les urines des sujets sans exposition connue (Bruce et al., 1987). Cependant, il existe une corrélation entre les concentrations urinaires en phénol et l'exposition humaine. Les principaux métabolites urinaires sont le phényl glucuronide, le phényl sulfate, 1,4-dihydroxybenzène glucuronide et le 1,4-dihydroxybenzène sulfate (Tremaine et al. 1984).

#### b) Etudes chez l'animal

Chez le rat, le porc et le mouton, il a été montré que plus de 95 % de la dose administrée par voie orale sont absorbés lors d'une administration unique de 25 mg/kg de phénol 14C en solution aqueuse dans son sel de sodium (Kao et al., 1979).

#### c) Toxicologie aiguë :

Les effets locaux rapportés sont des érythèmes ou des dépigmentations cutanées (Dreisbach, 1983) et, dans les cas les plus sévères, des corrosions pouvant même atteindre le stade de nécrose (Schmidt et Maibach, 1981). L'utilisation de solutions de 5 à 10 % de phénol comme antiseptique pour les vêtements a induit de nombreuses nécroses nécessitant parfois l'amputation de doigts ou d'orteils (Abraham, 1972).

Le phénol a également été utilisé pour des techniques de chirurgie plastique pendant 30 ans. Le mélange utilisé était classiquement constitué de 3 ml de phénol à 50 %, de 2 ml d'eau et de 8 gouttes de savon et 8 gouttes d'huile de croton. En application cutanée, ce mélange permettait une dépigmentation. Dans ce type d'utilisation, il a été rapporté que plus de 30 % des adultes présentaient des *dysrythmies* (Morrisonet al., 1991).

Le seul cas publié dans la littérature correspond à l'utilisation d'un mélange de composition voisine (40 % de phénol, 0,8 % d'huile de croton dans du savon à base d'hexachlorophène et d'eau) chez un enfant âgé de 10 ans. Ce mélange a été appliqué sous anesthésie sur 1,9 % de la surface corporelle. Cinquante cinq minutes après le traitement, des extrasystoles ventriculaires polymorphes sont observées en l'absence de modification de la pression artérielle et des concentrations en sodium et potassium plasmatiques (**Warner et Harper, 1985**).

Lors de l'exposition par voie cutanée, une intoxication systémique a été observée. Il s'agit d'un choc cardiovasculaire pouvant entraîner la mort et acidose métabolique sévère. Des arythmies cardiaques (supra-ventriculaires et ventriculaires) sont rapportées chez 10 des 42 patients dans les 10 minutes qui suivent une application cutanée d'un traitement cosmétique de la face contenant 5 % de phénol (Truppmann et Ellenby, 1979). Des hyperventilations, des atteintes rénales, méthémoglobinémies sont également rapportées dans plusieurs cas d'exposition cutanée.

Un cas d'exposition accidentelle en milieu professionnel est observé chez un salarié partiellement immergé pendant quelques secondes par une solution contenant 20 % de phénol dans du dichlorométhane. Malgré les soins immédiats, un état de collapsus est observé. La victime a été brûlée à 50 %, elle présente des nausées, des vomissements, une anurie et une détresse respiratoire. Une polyurie « marginale » est encore observée un an après l'accident (Foxall, et *al.*, 1991).

### **5.3) Effets cancérigènes Classification :**

- Classe D : Substance non classifiable quant à sa cancérogénicité pour l'homme (US EPA(IRIS), 1990).
- Groupe 3 : L'agent (ou le mélange) ne peut être classé pour sa cancérogénicité pour l'homme (CIRC - IARC, 1999).
- Le phénol a été examiné par l'Union Européenne mais n'est pas classé cancérigène (JOCE, 2004).

### **5.4) Caractère génotoxique**

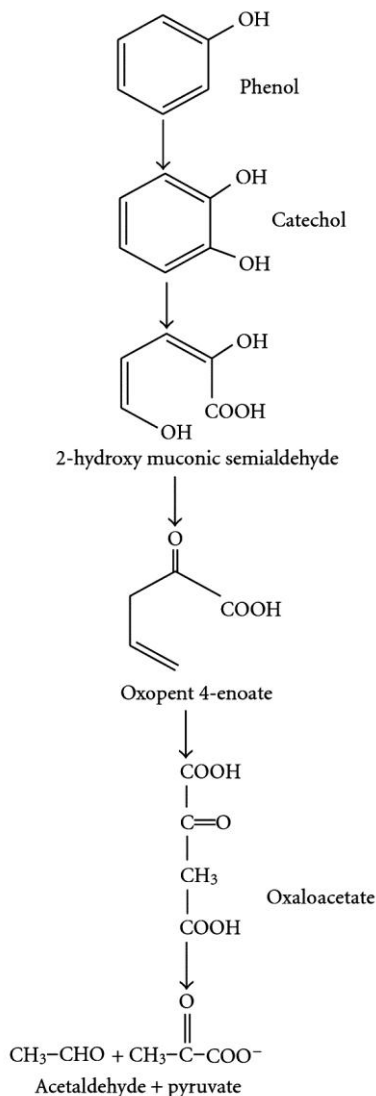
Le phénol est classé mutagène catégorie 3 (substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets mutagènes) par l'Union Européenne (Joce, 2004).

Il n'existe pas à ce jour de données relatives aux effets d'une exposition au phénol seul sur les fonctions de reproduction et le développement fœtal chez l'homme.

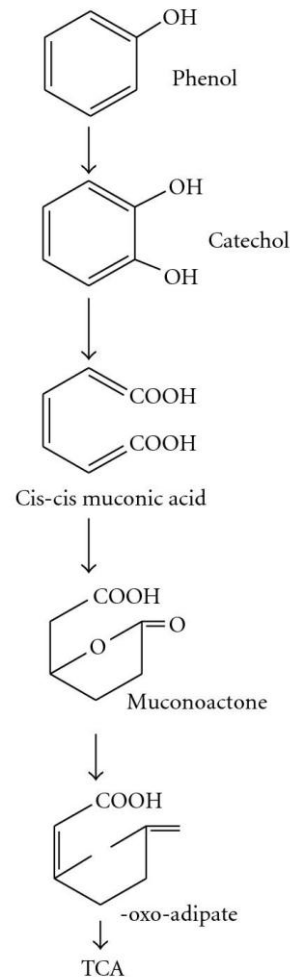
### 6) Biodégradation Aérobie Du Phénol

Différents types de microorganismes aérobies, *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., sp, *Agrobacterium* sp, *Rhodococcus* sp, *Coriulus* sp, *Cbryosporium* sp, *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., sont connus pour leur capacité à dégrader les phénols et leurs dérivés.

Les composés aromatiques simples tels que le phénol et le benzène sont typiquement dégradés selon la voie méta tandis que les plus complexes comme les chlorophénols sont généralement dégradés selon la voie ortho. (figure2, 3) Deux types d'ortho clivage existent : l'ortho clivage type 1 et l'ortho clivage type2 modifié, spécifique à la dégradation des composés aromatiques chlorés via le chlorocathécol.



**Figure2:** la voie Méta de la dégradation de la dégradation du phénol (Mahiudin et al., 2011).



**Figure3:** voie Ortho de la dégradation de la dégradation du phénol. (Mahiudin et al., 2011).

## 7) Biodégradation anaérobie du phénol

Plusieurs composés aromatiques chlorés résistent aux métabolismes microbiens aérobies car les atomes du chlore bloquent l'attaque de l'oxygénase (Figure 04). Mais, ces composés halogènes peuvent être déshalogénés par des microorganismes anaérobies. En anaérobiose, la biotransformation de la plupart des composés aromatiques halogénés est initiée par une déshalogénéation réductive. L'élimination de substituant halogéné s'avère nécessaire avant le clivage du cycle aromatique. Ainsi, la biodégradation anaérobie des phénols se fait par déchloration réductive au cours de laquelle l'atome de chlore est remplacé par un hydrogène. Les microorganismes utilisent ces composés comme accepteurs terminaux d'électrons. (Joce, 2004).

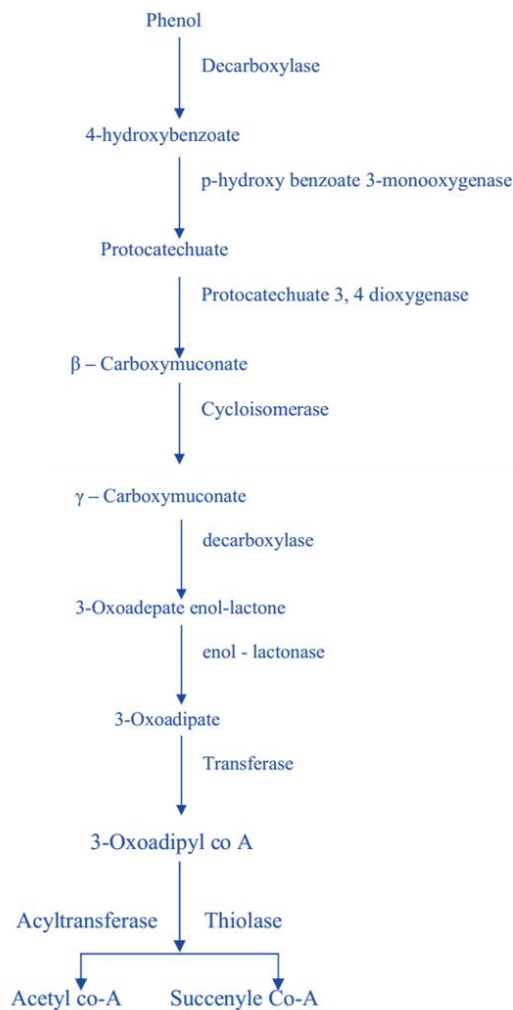


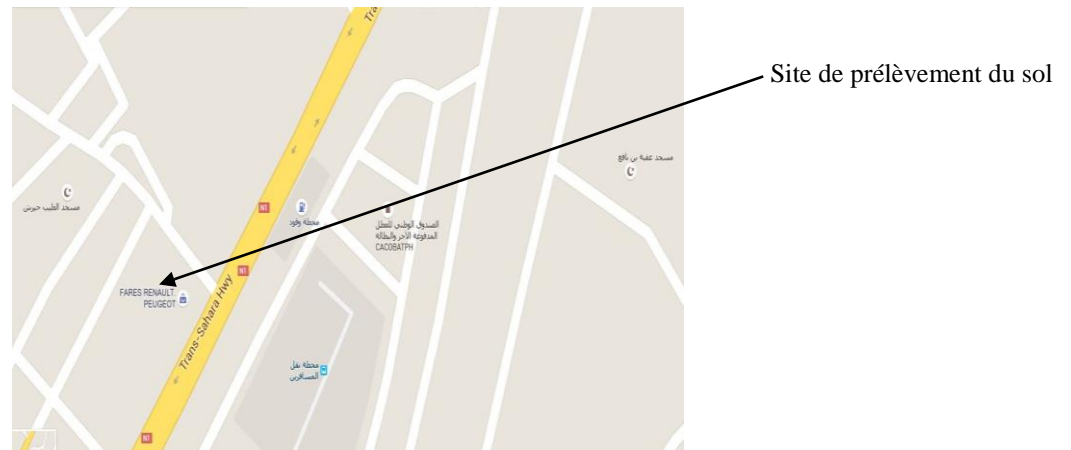
Figure 04: la voie anaérobie pour la biodégradation du phénol.

# Matériels et méthodes

### 1). Prélèvement de sol

Quatre échantillons du sol contaminé par les dérivés pétroliers (huiles, essence, gasoil) ont été prélevé à partir d'une station de service de la ville de Laghouat (Figure 05).

La station de service étudié (figure 05) est une station ancienne qui à été installé sur site de plus de 20 ans.



**Figure 05:** localisation géographique de site des prélèvements (google maps).

On fait prélever des échantillons du sol, dont ils sont prélevés à une profondeur de 10 cm d'un site contaminé par les hydrocarbures, issu d'une station de services, le protocole de prélèvement est assure a fin de respecter les conditions d'échantillonnage fait au hasard et de part et d'autre de la station.

Le protocole d'échantillonnage fait appelle à des méthodes de prélèvement aléatoire de différents endroits allant des endroits les plus contaminées par les hydrocarbures au moins polluées de la station, en prélevant des échantillons au hasard de 20 g environ de sol dans 04 flacons stériles d'échantillonnages.



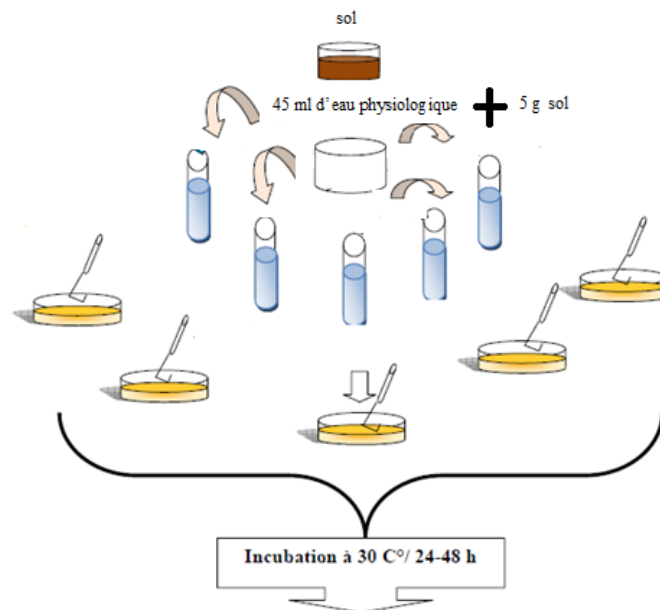
**Figure 06 :** Aspect des échantillons des sols (originale : 2017).

L'ensemble des échantillons ainsi prélevés sont numérotés de 1 à 4 identifié selon la chronologie de prélèvement. On pèse 5 g du sol de chaque échantillon et on verse cette masse dans les flacons de 45 ml d'eau physiologique préparés préalablement après homogénéisation et agitation, on prélève 100  $\mu$ l de la solution mère dans les tubes de 10 ml milieu nutritif. A partir des solutions ainsi préparé on réalise un ensemencement direct en boîte de PETRI milieu MH deux boîtes pour chaque prélèvement une boîte par des stries serrés une autre par écouvillonnage. Les tubes et les boîtes de PETRI ainsi préparés seront incubés à 37 C° pendant 24 heures, les éventuels résultats obtenus seront exploités pour une autre partie du travail.

## **2) Préparation des milieux de culture**

### **2-1) Préparation de l'eau physiologique**

On pèse une quantité de 9 g de NaCl puis on fait dissoudre cette quantité dans 1 litre d'eau distillée pour avoir une eau à 0,9 % de concentration, Le pH est ajusté à 7 par des solutions NaOH, HCl concentrées. Le milieu préparé est finalement versé dans des flacons de verre à raison de 45 ml d'eau physiologique par flacon puis on passe à l'autoclavage.



**Figure 07 :** schéma d'isolement des bactéries (Bouderhem, 2011).

### 2-2) Préparation du milieu de culture liquide (bouillon nutritif)

La pesée de 4 g et la dissolution de cette masse en poudre d'une préparation étudiée en qualité et en quantité dans un volume de 500 ml d'eau distillé en gardant le milieu sous agitation et sur une source de chaleur pour assurer la dissolution et l'homogénéisation des soluté on prend le milieu à ébullition, passons à l'ajustement du pH le milieu ainsi préparé sera versé en tubes à vis de 10 ml, la stérilisation en chaleur humide (autoclavage).

### 2-3) Préparation du milieu solide MH (Gélose Mueller-Hinton):

De la même façon de préparation précédente, on fait dissoudre 21 g de MH poudre et une masse 17g d'agar on prend le milieu ainsi préparé à ébullition en gardant l'agitation et le réchauffement pour avoir une préparation de 1 L de volume le pH est ajusté à 7,2 l'autoclavage est l'étape qui suit après cette dernière on fait couler le milieu en boîtes de Petri stérilement.

### 2-4) Milieu minéral pour l'étude de dégradation

Le choix fait entre plusieurs milieux pour déterminer le milieu Composition la plus appropriée pour l'étude de dégradation du phénol comme seule source d'énergie parmi ces milieux nous trouvons le M63 ou M9 ou BSM un milieu le choix était pour le milieu M63 (Atlas, R.M. 2005) (composition en annexe) pour l'étude de dégradation du phénol.

### 3) coloration de GRAM

Les souches isolées sont fixées et colorées selon la méthode de Gram. Cette coloration permet de différencier les bactéries en deux groupes, en fonction de la couleur obtenue: les Gram positifs et les Gram négatifs.

**Principe :**

- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincez à l'eau
- Mordantage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau déminéralisée.
- Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone) est l'étape la plus importante de la coloration : versez goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincez abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration. Attention, l'utilisation abusive de l'alcool aura pour conséquence de rendre toutes les bactéries gram négatif.
- Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Mettez de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau déminéralisée. Séchez la lame sur une platine chauffante à 50°C.
- Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement  $\times 1000$ ).

Cette étape a pour objectif de différencier la forme et l'aspect cellulaire des colonies obtenues.


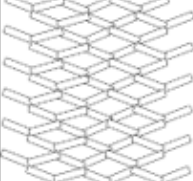
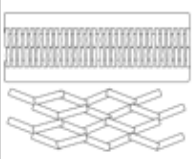

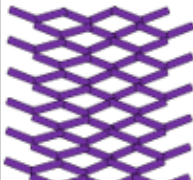


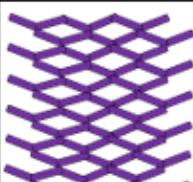

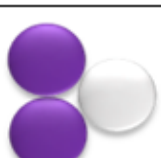
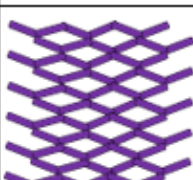
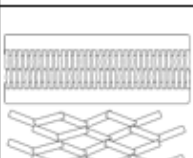
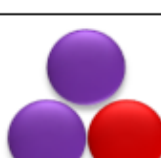
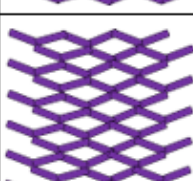
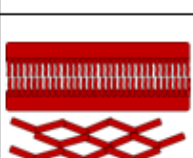
Gram Staining Procedure		Gram Positive Cell Wall		Gram Negative Cell Wall	
Process of test	Appearance of Cells	Effect of Step	Effect on Cell Wall	Effect of Step	Effect on Cell Wall
<b>Step 1:</b> Begin with heat fixed cells		<b>Step 1:</b> Cell wall remains clear.		<b>Step 1:</b> Cell wall remains clear.	
<b>Step 2:</b> Flood slide with crystal violet dye for 1 min.		<b>Step 2:</b> Peptidoglycan cell wall is flooded with crystal violet and appears purple.		<b>Step 2:</b> Cell wall is stained purple from the crystal violet dye.	
<b>Step 3:</b> Add iodine solution for 1 min.		<b>Step 3:</b> A crystal violet-iodine complex is formed within the peptidoglycan cell wall trapping the purple stain.		<b>Step 3:</b> A crystal violet-iodine complex is formed but does not adhere to the cell wall due to the thin layer of peptidoglycan.	
<b>Step 4:</b> Wash slide with alcohol for 20sec.		<b>Step 4:</b> The crystal violet-iodine complex is trapped with the peptidoglycan cell wall and doesn't wash out.		<b>Step 4:</b> The crystal violet-iodine structure is washed out of the thin peptidoglycan layer.	
<b>Step 5:</b> Counter stain with safranin.		<b>Step 5:</b> As the peptidoglycan cell wall remains stained purple the red safranin has no effect.		<b>Step 5:</b> The red safranin stains the washed gram negative cells.	

Figure 8 : Schéma simplifié d'une coloration de GRAM.

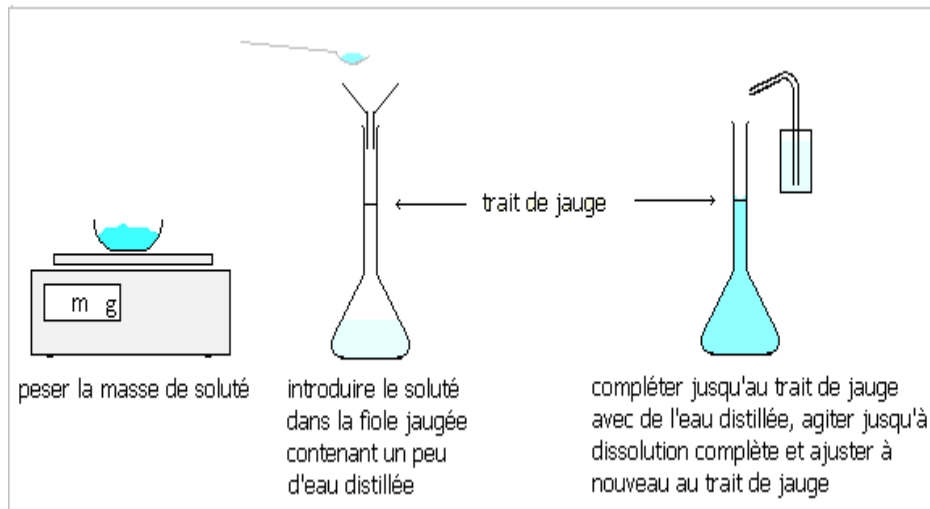
#### 4) Identification biochimiques des souches (étape effectuée laboratoire EPH Laghouat)

Les souches isolées seront identifiées partiellement, en utilisation les caractéristiques biochimiques de certaines espèces (test biochimique classique) les quatre souches isolées vont subir quelques examens chimiques facilitant l'orientation.

L'identification est basée sur les tests biochimiques de chaque genre, ces critères sont le plus identifiés dans la littérature scientifique (Dworkin et al; 2006)

#### 5) Préparation de solution phénol à 10 g/l

Une masse de 1g du phénol en poudre cristallisé de 99,98 % de pureté, est dissoute dans 0,1 L d'eau distillée pour avoir une solution à 0,1 % .



**Figure 9 :** schéma simplifié de préparation d'une solution 0,1 % de phénol.

## 6) Repiquages et essais de purification des souches

Les souches ainsi obtenues de la première partie seront repiquées à nouveau dans le milieu MH, en essayant de séparer les différentes colonies isolées chacune dans une boîte à part. L'incubation est de 24 heures à 37 °C. Le but de cette étape est de purifier les souches les plus aptes à dégrader. Sur la base de l'aspect macroscopique, différentes colonies sont prélevées et repiquées sur le même milieu, jusqu'à leur purification.

## 7) Préparation des inoculas pour tester la dégradation du phénol

L'ajout de volume  $V = 125 \mu\text{l}$  de solution phénol précédemment préparée de concentration  $C=10 \text{ g/l}$ , aux flacons de volume 50 ml du milieu minéral, des colonies bien individualisées seront inoculées dans ces flacons, une incubation à 37°C et une agitation à 250 tours par minute pendant 24 heures aura lieu.

## 8) Estimation des taux de dégradation du phénol

### 8.1) L'indice de Folin-Ciocalteu (Lowry, O.H., et al.1951)

Indice permettant de mesurer la somme des composés phénoliques. L'ensemble des composés phénoliques du vin est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). En milieu basique de Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) anhydre en solution à 20 % (m/v)

La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 750 nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques, dans notre étude l'estimation est beaucoup plus qualitative que quantitative.

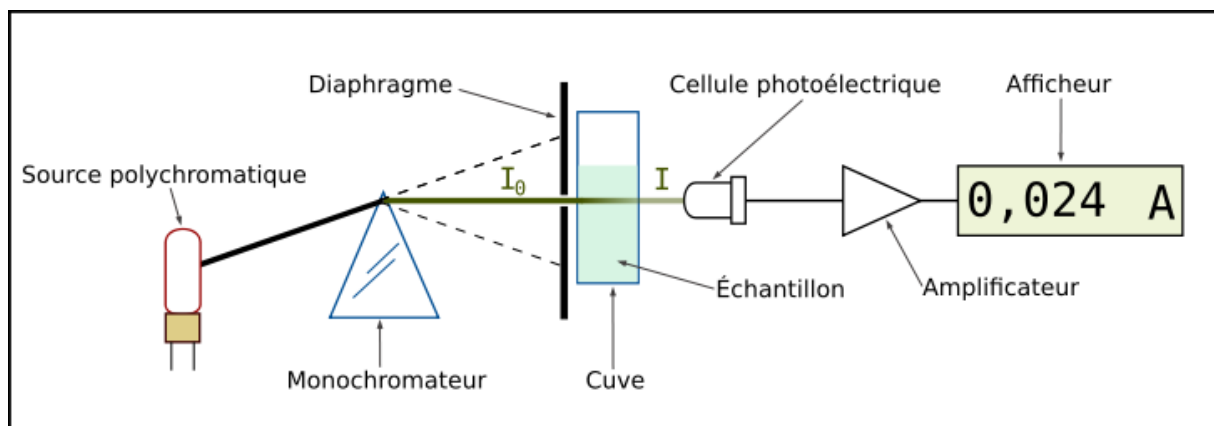
Le protocole dans cette étape est basé sur la disponibilité de l'appareillage et des réactifs adéquats pour la réalisation de cette expérience.

### 9) Etude de dégradation du phénol

Dans des volumes de 500 ml du milieu minéral précédemment préparé on procède de la façon suivante :

**Tableau 6** : volumes du phénol et DO des inocula

Echantillons	Volume de phénol à (1%) ajouté (ml)	D.O de l'inoculum
E1 (499 ml)	1	0,086
E2 (499 ml)	1	0,095
E2 (499 ml)	1	0,093
E4 (499 ml)	1	0,090



**Figure 10** : schéma simplifié de détermination de la DO de l'inoculum.

Ces dispositifs seront mis en incubation à température de la chambre à une agitation de 250 tours par minute à un temps plus important d'une durée de 7 jours (Rezzoug et Hamdi, 2015). La mesure des charges initiales par spectrophotométrie à 625 et l'étalonnage se fait à l'aide du milieu minéral préparé préalablement. Cette étape est répétée en injectant à chaque fois des concentrations plus importantes de phénol.

# Résultats et discussion

### 1) Aspect macroscopique des colonies

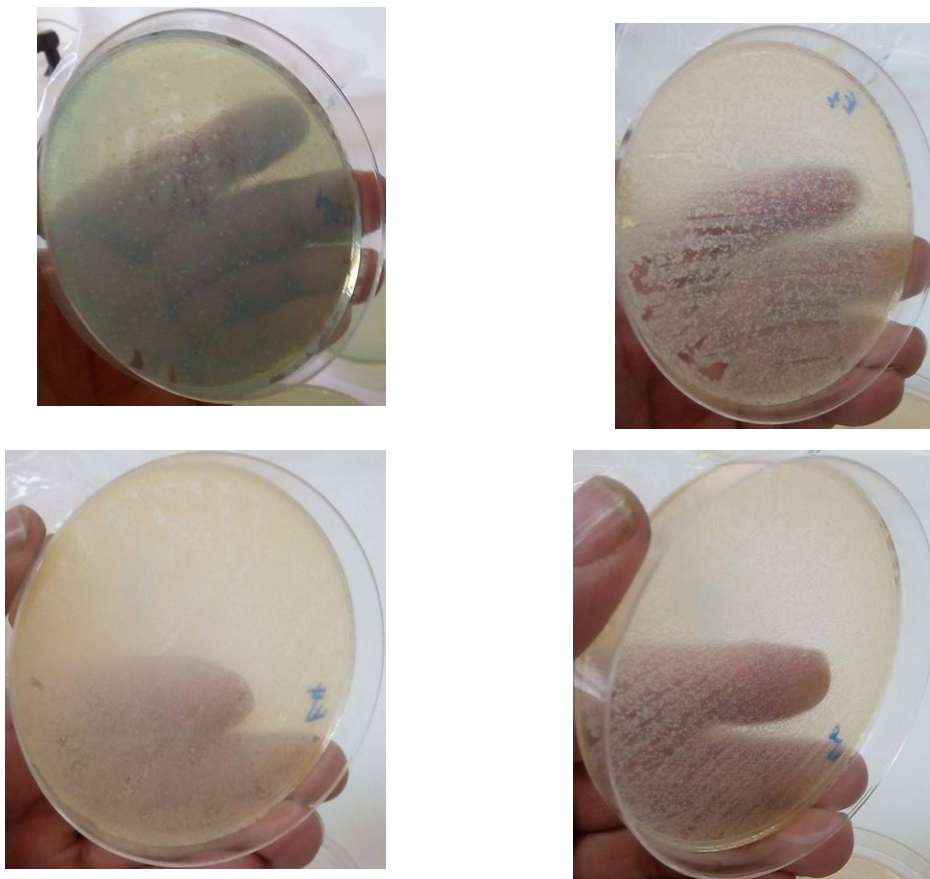
Après 24 heures d'incubation à 37°C, l'aspect macroscopique des colonies de bactéries est variable d'un échantillon à un autre.

E1 : On remarque la présence de plusieurs types de colonies, rondes amorphes de couleurs différentes (jaune ; blanche) de consistance différentes (visqueuses ; dure ...) difficiles de séparer les une des autres.

E2 : On note la présence d'une pigmentation verte, le changement de la coloration du milieu était visible à l'œil nu d'une odeur très caractéristique semblable au jasmin. On remarque un autre type de colonie blanche bien arrondi. Abondance du premier type cellulaire sur boîte

E3 : boîte peu chargée, présence de deux types de colonies, le premier visqueux opaque irrégulier, le deuxième bien arrondi peu dominant petit colonie blanche.

E4 : Des macro-colonies de type presque uniforme, avec présence d'une nappe homogène et absence d'individualisation coloniale voile d'un pigment jaune dominant.

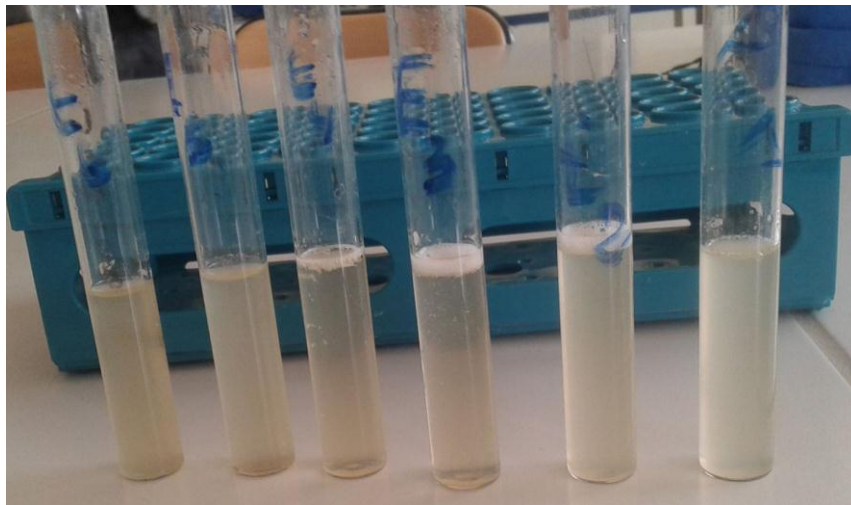


**Figure 11** : Aspect macroscopique des colonies après cultures de 24 H (originale).

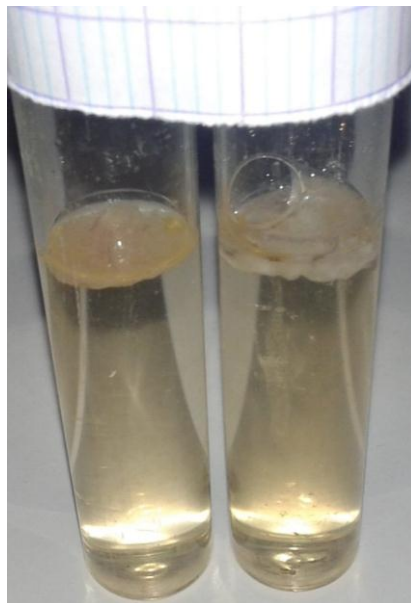
### 1-2) Aspect des tubes de cultures (milieu nutritif)

Les tubes de 1 à 4 ont présenté un différents taux de turbidité, en comparant un tube à l'autre ce qui donne une idée préliminaire de l'existence des micro-organismes en culture les figures ci-après montrent cette aptitude de croissance.

- Les tubes 2,3 et 4 ont montré la présence des gaz et une mousse à la surface
- Le tube 1 a montré le taux le moins élevé de la croissance en terme de turbidité » par rapport aux autres échantillons.
- La présence des structures similaires aux bio-films (tube 3 ; 4).



**Figure 12** : l'aspect des tubes après 24 h de culture a 37C° (original)

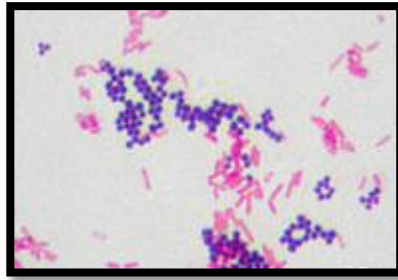


**Figure 13** : Aspect des tubes 4 et 3 (présence des couches blanches en surface) (original).

**1-3) Aspects des lames après coloration de GRAM**

**a) A partir des tubes**

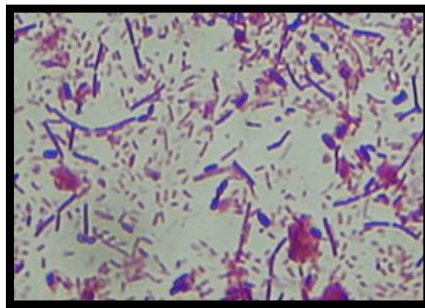
Échenillons N°1 : Coccis + Bacilles



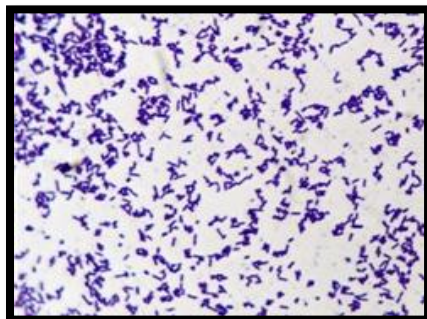
Échenillons N°2 : lame homogène petit bacilles .



Échenillons N°3 : des bacilles et des coccis.



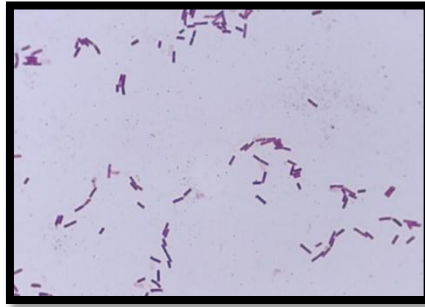
Échenillons N°4 : la présence des bacilles.



**Figure 14** : Aspects des lames après coloration de GRAM (milieu liquide) (original).

**b) A partir des boîtes :**

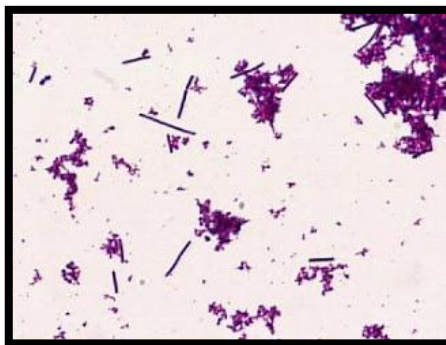
Boîte N°1 : uniquement des bacilles.



**Boîte N°2 :** bacilles gram négatif étaler le long de la lame



**Boîte N°3 :** des bacilles et la présence des cocci gram positifs



**Boîte N°4 :** des petits bacilles dominants



**Figure 15 :** Aspects des lames après coloration de GRAM (boîtes de PETRI) (original).

### 2) Résultats après repiquages et isolement des colonies

#### 2.1) sur milieu MH

Les résultats après le repiquage, ont montré une grande variété : de l'aspect des colonies ; des pigmentations ; et surtout des capacités de dégradation du phénol plus tard. D'où on peut parler des souches tolérantes ; c'est-à-dire la faculté d'éviter la toxicité du phénol sans l'utiliser, et le pouvoir de dégradation du polluant (usage du polluant comme source de carbone).

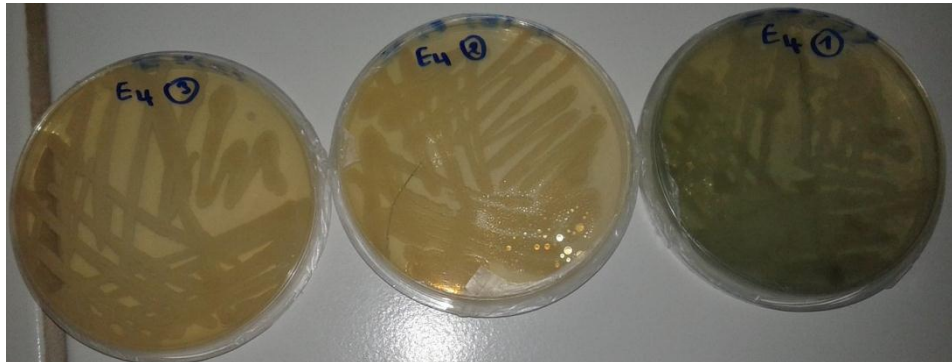


Figure 16 : séparation des colonies de l'échantillon N° 4 (original).

#### 2.2) sur milieu gélose au sang frais



Figure 17 : séparation des colonies et culture sur gélose au sang (original).

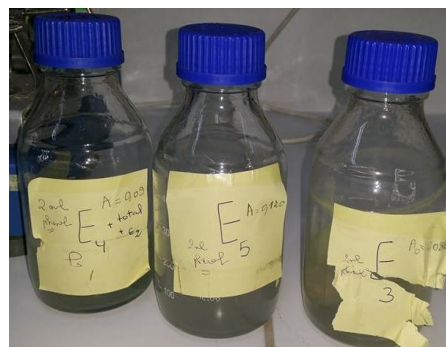
La culture sur gélose au sang frais, a essentiellement pour but l'étude du pouvoir hémolytique de ces isolats. Nous constatons que les deux souches *Pseudomonas* spp et *Micrococcus* spp n'ont pas de pouvoir hémolytique apparent. Le bacillus démontre un pouvoir hémolytique caractéristique

**3) Résultats après repiquages et isolement des colonies**

**Tableau 07** : quelques tests biochimiques d'orientation.

Caractères biochimiques	Bacillus Cereus 2	Pseudomonas sp 1+4	Microcoques sp 3
Coloration de GRAM	(+)	(-)	(+)
Type respiratoire	Aéro-anaérobie	Aérobie strict	Aérobie strict
Production des pigments	(-)	(+) pyocyanine (vert)	(+) caroténoïdes jaunes
Hémolyse	(+)	(-)	(-)
Glucose	(+)	(+)	(+) / (-)
Production du gaz (TSI)	(-)	(+)	(+)
Oxydase	(-)	(-)	(+)
ADH	(-)	(+)	(-)
Nitrates	(+)	(+)	(-)
Vp	(+)	(-)	(-)
ODH	(-)	(-)	(-)
Urée	/	(-)	(+)
Mannitol	(-)	(+)	(-)
R M	(-)	(-)	/
Indole	(-)	/	(-)
Esculine	(+)	/	/
Catalase	/	/	(+)

**4) Aspect des cultures après 7 jours de culture sur phénol**



**Figure 18** : aspects des cultures après 3 jours de cultures sur milieu minéral+ phénol (original).



**Figure 19 :** aspects des cultures après 7 jours de cultures sur milieu minéral+ phénol (original).

La vitesse de dégradation a été améliorée par l'utilisation des souches adaptées (Heinaru et al., 1999). Dans des concentrations faibles de phénol, et une adaptation répétée aux mêmes concentrations de phénol, on a observé une augmentation dans le taux et la vitesse de dégradation (Kyung et Sung, 2009).

*Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus. sp* ont la capacité de dégrader le phénol en le utilisant comme une source de carbone et d'énergie pour leur croissance, le résultat a été confirmé par la disparition des traces de phénol en présence de la bactérie dans la culture minérale de phénol, ce résultat est révélé par le test du FOLIN.

L'obtention des souches qui ont pu croître ; des primo cultures montre une grande hétérogénéité des populations bactériennes car les boîtes de PETRI ont montré une diversité remarquable c'est à dire le sol contient deux types de souches celle qui résiste aux polluants aromatiques et d'autres types qui exploitent les polluants comme source d'énergie.

Les trois échantillons ont présenté une croissance bien élucidée soit sur les milieux solides et liquides en même temps.

D'après les résultats de coloration de GRAM on arrive à dire que les souches sont très hétérogènes de point de vue forme bacilles (grand-petit) cocci (grand-petit) des gram positifs et des gram négatifs. Ce qui reflète l'abondance et la richesse en espèce du sol étudié.

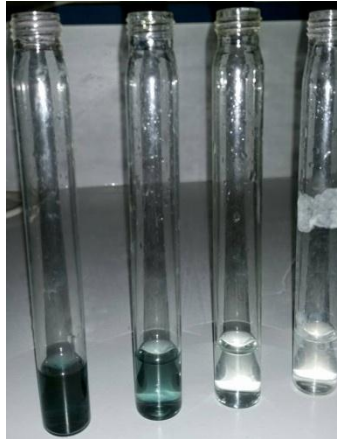
L'aspect chargé des boîtes démontre que les souches sont adaptées à la croissance sur un milieu solide contrairement dans les tubes de bouillon nutritif dont la croissance était plus ou moins ralentie.

Le lancement d'une deuxième partie pour différencier les souches utilisatrices du phénol comme source d'énergie et entre les souches réductrices et résistantes à l'action du phénol et qui ne peuvent pas assimiler ce dernier.

## Résultats et discussion

La croissance des souches sur des milieux contenant du phénol à révéler une différence significative entre les taux de croissance entre une souche et une autre ce qui augmente la première hypothèse que les souches sont de deux origines différentes.

Les différences sont révélées à l'œil nu car la turbidité diffère d'un flacon à l'autre par le taux d'opacité ce qui indique que la charge bactérienne est fonction de la concentration du phénol. L'interprétation de l'indice du FOLIN conduit à la sélection des souches les plus aptes à réaliser cette dégradation seront les souches choisies pour compléter les travaux.



**Figure 18 :** test Folin-Ciocalteu entre les trois souches et le témoin (original).

L'apparition de certains pigments verts d'une odeur très caractéristique peut être due à une *Pseudomonas*. La libération du pigment indique peut-être la capacité de la souche à consommer le phénol sans rentrer en état de stress c'est-à-dire absence de l'aspect toxique de cette molécule par rapport à cette souche, la disparition des autres souches du milieu indique le pouvoir ultime de dégradation et la destruction des autres par les agents toxiques sécrétés par la souche dominante. Cette étape repose sur la comparaison entre les trois souches prouvant la dégradation du phénol et la différence entre les taux de dégradation. Le passage d'une charge initiale de 0,1 à 0,3 indique le pouvoir élevé des souches à dégrader le phénol et de l'utiliser comme source d'énergie.

L'agitation a empêché la précipitation des bactéries ce qui est prouvé par l'amplification du nombre et le passage à trois fois la charge initiale.

La température de l'expérience était la température ambiante c'est-à-dire inférieure à 24 °C ce qui indique que ce pouvoir de dégradation était conservé même en variation importante de la température. La formation rapide des biofilms indique la rapidité de dégradation du phénol par ces bactéries.

## ***Résultats et discussion***

La pigmentation des milieux indique la dominance d'un genre unique bactérien et malgré la variation de température n'a pas influencé la croissance car les pigments sont synthétisés à la fin de la phase exponentielle de la croissance non stressé.

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

# *Conclusion*

Ces travaux ont permis la caractérisation des souches qui dégradent des polluants aromatiques tel que le phénol mais il reste beaucoup à faire à savoir :

- L'identification taxonomique classique exacte des ces souches pour identifier les espèces inclus dans ce phénomène.
- L'étude cinétique de ces phénomènes et l'effet de différents facteurs biotiques et abiotiques (température/ pH/ composition du milieu minéral)
- La caractérisation des profils métaboliques des souches pour étudier ce phénomène et la liaison entre les souches pour établir un éventuel schéma de dépollution de ces stations par des souches locales de la région contaminée, en utilisant un Co-métabolisme ou un phénomène de dégradation approprié.

L'élimination des polluants aromatiques présents dans les sols des stations de service et des sols contaminés, est assurée par un phénomène naturel dit autoépuration, par des bactéries telluriques autochtones qui sont susceptibles de métaboliser des substances toxiques en composant non toxique grâce à leur patrimoine génétique. Cependant, cette capacité de biodégradation a été montrée par des expériences de dégradation au niveau de laboratoire. Ce dernier est devenu un domaine de recherche d'actualité qui intéresse les chercheurs à pour but de comprendre la nature des interactions sols/microorganismes /polluants, ainsi que le mécanisme de la biodégradation. Les souches qui ont ce pouvoir de biodégradation devraient être identifiées à l'échelle moléculaire et exploitées leurs gènes en ingénierie. Ces connaissances devraient permettre de modéliser et d'optimiser les expériences préliminaires à toute action biologique, pour améliorer des procédés encore trop souvent conduits de manière empirique. Pour cela, les études doivent s'effectuer en synergie entre les laboratoires de recherche publique et les industriels de la dépollution.

# Bibliographie

- Adebusoye, S.A., Ilori, M.O., Picardal, F.W. and Amund, O.O.,** (2008). Extensive biodegradation of polychlorinated biphenyls in Aroclor 1242 and electrical transformer fluid (Askarel) by natural strains of microorganisms indigenous to contaminated African systems. *Chemosphere* V 23, pages 235-248.
- Ademe, K.,** (2009). Taux d'utilisation et coûts des différentes techniques et filières de traitement des sols et des eaux souterraines pollués en France.
- Agarry, S.E., Durojaiye, A.O., Solomon, B.O,** (2008) Microbial degradation of phenols. *Int. J. Environ. Pollut.* V 32. Pages 12-28.
- Alexander, M.,** (1981). Biodegradation of chemicals of environmental contamination. *Science* V 211, pages 132-138
- Arrouays, S., Baize, D., Bonneau, M., Chaussod, R., Cieselski, H., Gaultier, J.P., King, D., Lavelle, P., Legros, J.P., Leprêtre, and A. Sterckeman, T.** (2000). Observatoire de la qualité des sols. Rapport sur les travaux 1995-1998. INRA Orléans 54 pages.
- Atlas, R.M.** (2005). Handbook of media for environmental microbiology. 2nd ed. Crc Press. Boca Raton.USA
- Barkat, H., and Kired, O.,** (2015) Etude cinétique de la dégradation du phénol par *Bacillus* sp. Isolée à partir du sol contaminé par les dérivés du pétrole. Université de Laghouat pages :2-38
- Baun, A., Ledin, M.A., Reitzel, L.A., Bjerg, P. L., and Christensen, T. H.** (2004) *Water Resources.* V 38, pages 38-45.
- Boll, M., Fuchs, G., Heider, J., (2002) Current oil biodegradation *Opi. Chem. Biol.,* V 6, pages 604-617.
- Bollag, J.M., Liu, S.Y., Cheng, H.H.,** (1990). Biological transformation processes of pesticides. Pesticides in the soil environment : processes, impact and modelling V 38. Pages 678-700.
- Bollag, J.M., Loll M.J.,** (1983). Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia*, Vol.39, 1221-1231
- Bonneau, M., Souchier B.,** (1994). "Pédologie : Constituants et propriétés du sol ",E. Masson, édition Paris,2ème édition
- Bouderhem, A.,** (2011).Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 97p.
- Breure, A.,** (2004). Ecological soil monitoring and quality assessment. *Developments in Soil Science* V 29 , Pages 281-305
- Chassin, P., Baize, D., Cambier, P., Stechman, T.,** (1996) Les éléments traces métalliques et la qualité des sols. Impacts à moyen et à long terme. *Etude et Gestion des sols* V 3. Pages : 297-306
- Dick, R.P.,** (1997) Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In : *Biological indicators of soil health.* CAB International, New York pp. 121-156..
- DUESO, N; CADIÈRE, F ;** (2010) Traitabilité des sols pollués Guide méthodologique pour la sélection des techniques et l'évaluation de leurs performances. Edition DUNOD., Chapitre 7-14
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Erko, S.,** (2006) *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria . Springer Science* 6ed pages 345-657.
- Eastmond, D.A., Smith, M. T., Ruzo, L. O., Ross, D.,** (1986) *Molecular Pharmacology,* 5ed pages 674-720 .
- Escher, B. I., Schwarzenbach, R. P.,** ( 1996 ). Partitioning of substituted phenols in liposome –water, biomembrane – water, and octanol – water systems . *Environ. Sci. Tech.* V 30. pages 260 – 270
- Eugene, L.M;** (2008). *Environmental Microbiology From genomes to biogeochemistry,* édition BLACKWELL 350 Main Street, Malden USA, pages 48-70.

- Fang, H. H. P., Chan, O. C.,** (1997) Anaerobic electrochemical corrosion of mild steel in the presence of extracellular polymeric substances produced by a culture enriched in sulfate-reducing bacteria. *Water Resources.*, V 31, page : 2229-2238 .
- GIRARD, M.C., WALTER, C., REMY, J.C., BERTHELIN, J., MOREL. J.L.,** 2005 Sols et environnement. Edition DUNOD,. Chapitre 3.4,
- Gobat, JM., Aragno, M., Matthey. W.,** (1998) Le sol vivant. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
- Hamdi,B., Rezzoug,A.,**(2015) isolement et identification des bactéries a partir d'un site contaminé par les hydrocarbures. université Amar THELIDJI Laghouat
- Heinaru, E., Jaak Truu., Ulrich, Stottmeister ; et Ain, Heinaru ;** (1999). Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds *FEMS Microbiology Ecology* V 31 pp 195-205.
- Heinaru, E., Merimaa, M., Viggor, S., Lehiste, M., Leito, I., and J. Truu,** (1995). Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area *FEMS Microbiology Ecology* V 38 pp 185-195.
- Hicks RJ, Stotzky G, van Voris P** (1990) Review and evaluation of the effects of xenobiotic chemicals on microorganisms in soil. *Advances in Applied Microbiology* V 35: pages 195-253
- Kaj, O., Holben W. E. & Tiedje J. M.,** (1994). Genetic and Phenotypic Diversity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Degrading Bacteria Isolated from 2,4-D-Treated Field Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, V 60 pages : 1106-1115
- Kauppinen, T.P., Partanen, T. J., Hernberg, S. G., Nickels, J. I., Luukkonen, R. A., Hakulinen, T. R., Pukkala, E. I., Brit, J.,** 1993 fuel Biodegradation. *Int. J. Environ. Pollut* V 50, pages 131-143.
- Lowry, O.H.,** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* V 193 , pages 265-275
- Madigan, M.T., and J.M. Martinko.,** (2006) *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edn. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. Chapitres 3-9-5
- Madsen, E.L.,** (1991), Determining *in situ* biodegradation. *Facts and challenges Environ. Sci. Technol.*, Vo1.25, pages, 1663-1673
- Paul, E.A., Clark F.E.,** (1989), "Soil microbiology and biochemistry». Academic Press Inc, San Diego, Chapitre 8-9.
- Paul, EA ;** (2000) *Soil Biology and Biochemistry*. In : *Handbook of Soil Science* (ed Summer ME), CRC Press, Boca Raton. Chapitres 1-9.
- Piedrafita, Carnicer., María,V .,** (2007) La pollution ponctuelle des sols: Le cas des stations-service dans la Région de Bruxelles-Capitale, 11, 154
- Pochon,J., et Tardieux,P.,**(1962 ) *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*, Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé.
- Pretis ; et Shekhar, t.,** (2004). Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas fluorescens* for degradation of 4-chlorobenzoic acid *Biochemical Engineering Journal* V 30, pp 134-138
- Robert, H., Perry,G ; et Donald, W., Green,** (1997), *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, USA, McGraw-Hill, 7 e éd., p. 2-50
- Römbke, J., Jänsch, S., Didden,W.,** (2005) The use of earth worms in ecological soil classification and assessment concepts ; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 62 Pages 249-265
- Sahar, Z.,** (2006). Detection of *meta*- and *ortho*-cleavage dioxygenases in bacterial phenol-degraders *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* V10 : pages 75 – 81.

- Sierra-Alvarez, R., Lettinga, G.,** (1991) Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls  
Appl. Microbiol. Biotechnol V 34, pages 544-560.
- Van der Meer J.R., de Vos, W.M., Harayama S., Zehnder A.J.B.,** (1992), Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compound. Microbiol. Rev., Vo1.56, 677-694 :
- Wang, Y.T., Gabbard, H. D., Pai, P. C. J.,** (1991) Inhibition of acetate methanogenesis by phenols . J.Environ. Eng. V 117 : 487 – 496 .
- Zouboulis, AI, Loukidou, MX ; Matis, KA ;** (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. Process Biochemistry; V 39: pages 909-916

# *Annexe*

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

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

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

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

**Bouillon nutritive** (en raison de g/L d'eau distillé)

- Peptone trypsine ..... 15
- Extrait de viande ..... 3
- Extrait de levure ..... 1
- NaCl ou KCl ..... 15 à 20

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

- Peptone tryptique de viande ..... 20
- Agar ..... 4
- Mannitol ..... 2
- Rouge de phénol à 1% ..... 4
  - pH 7,6 – 7,8

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

- Peptone de gélatine ..... 20
- Glycérol ..... 10
- Sulfate de potassium anhydre ..... 10
- Gélose (Agar) ..... 15
- pH ..... 7,2

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

- Protéase peptone n°3 ou polypeptone (BBL)\* ..... 20
- Glycérol ..... 10

- Phosphate bipotassique anhydre ..... 1,5
- Sulfate de magnésium (7H<sub>2</sub>O) ..... 1,5
- Gélose (Agar) ..... 15

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

- Extrait de viande de bœuf ..... 3
- Extrait de levure ..... 3
- Peptoone ..... 20
- Chlorure de sodium ..... 5
- Citrate ferrique ..... 0,3
- Thiosulfate de sodium ..... 0,3
- Lactose ..... 10
- Glucose ..... 1
- Saccharose ..... 10
- Rouge de phénol ..... 0,05
- Agar ..... 12
- pH.....6,7

**Milieu minéral (g/l)**

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 3,8
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 1
- NaCl ..... 1
- MgSO<sub>4</sub> ..... 0,2
- NH<sub>4</sub>Cl ..... 0,1
- pH final doit être 7,2

**Réactif de folin ciocalteu**

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