

République Algérienne Démocratique et Populaire  
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
وزارة التعليم والعالي والبحث العلمي  
Université Amar Thelidji- Laghouat  
جامعة عمار تليجي بالاغواط  
FACULTE DES SCIENCES  
كلية العلوم  
DEPARTEMENT : Biologie  
قسم البيولوجيا



## Mémoire

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

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

## Thème

# Etude de la cinétique de biodégradation de Phénol sous différentes conditions Physico-chimiques

Présenté par :

Mlle. LAHRECHE Fatima zahra et Mlle. ZEGHOUDI Sara

### Jury de soutenance:

|                                 |            |                                   |
|---------------------------------|------------|-----------------------------------|
| Président : M .CHAIBI Rachid    | MCA        | Université Amar Thelidji-Laghouat |
| Examineur : M.CHETATHA Mohamed  | MAA        | Université Amar Thelidji-Laghouat |
| Promoteur : M.BENACEUR farouk   | MCA        | Université Amar Thelidji-Laghouat |
| Co-promotrice: Mme REZZOUG Asma | Doctorante | Université Amar Thelidji-Laghouat |

Promotion juin 2020

## *Dédicaces*

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide*

*De Dieu*

*Tout puissant*

*A*

*Celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années  
D'études.*

*Merci pour ton amour et ta confiance totale...A toi très  
Cher Père. Ce travail est le tien.*

*A*

*Ma très chère mère celle qui m'a transmis l'a vie, le courage, et  
L'amour Pour leur soutien moral et matériel, pour ça tendresse,  
Que dieu tout puissant garde mes parents et les protège.*

*A*

*Mes très chers frères : Amine et Youcef*

*A*

*Mes très chères sœurs : fatiha, cherifa, hadjer.  
Pour leur soutien et leur patience, Vous avez toujours ma  
Gratitude éternelle.*

*A*

*Mon fiancé et sa famille*

*A*

*Mes chères amies, pour tous les  
Moments que nous avons partagés.*

*Zeghoudi sara*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail accompagné  
D'un profond amour.*

*À*

*Celle qui m'arrosé de tendresse et d'espoir, à la source  
d'amour incessible, à la mère des sentiments fragiles qui ma  
bénie par ces prières..... Maman*

*À*

*Mon support et l'exemple de ma vie, qui m'a appris m'a  
supporté et vers la gloire .... Papa*

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

*À*

*Mon frère Abdelaziz, ainsi qu'à leur femme et leur enfant.*

*A mes sœurs Souad, Wahiba, ainsi qu'à leurs maris et leurs  
enfants... et chère petite sœur ma poupé Houria.*

*À*

*A l'héros de cette pièce, mon fiancé Hocine, source de ma joie et  
d'espoir, ainsi que leur famille.*

*À*

*Toute ma grand famille, mes amies et tous ceux qui ont  
contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.*

*Je vous aime tous.*

*LAHRECHE fatima zahra*

## **Remerciement**

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Docteur Benaceur farouk pour avoir orienté, dirigé ce travail.*

*Nous remercions aussi très sincèrement la Co-promotrice madame Rezzoug Asmaa pour ses précieuses orientations, son aide, ses conseils dans l'élaboration et la conception de ce mémoire.*

*Mes remerciements s'adressent aux membres de jury. Le président Monsieur CHAIBI Rachid ainsi que l'examineur Monsieur CHETATHA Mohamed d'avoir accepté d'examiner ce travail et de nous avoir honorées par leur présence le jour de la soutenance.*

*Nous voudrions aussi témoigner notre reconnaissance et exprimer toute notre gratitude à tous nos enseignants de département de Biologie et à tous les personnels de laboratoire biologique, Amar Tledji-Laghout qui ont participé pour une grande part dans notre formation.*

# **Etude de la cinétique de biodégradation de phénol sous différentes conditions**

## **Physico-chimiques**

**Résumé :** Ce travail s'inscrit dans le cadre de la dégradation des polluants. Il a pour but d'étudier et d'évaluer les conditions physico-chimiques optimales. Pour cette étude, le phénol a été choisi comme polluant organique modèle. Nous avons donc deux objectifs à atteindre. Premièrement, il s'agissait de sélectionner les souches capables de dégrader le phénol d'une part et d'étudier la cinétique la biodégradation, d'une autre part.

Dans un premier temps, nous avons isolés des bactéries à partir d'un échantillon du sol contaminé par les dérivés pétrolier, le sol est prélevé au niveau d'un fourrage de la zone Hassi Messaoud de la Wilaya d'Ouaregla. Des isolats bactériens ont été obtenus à partir d'un repiquage successif sur milieu Luria-Bertani, après purification, et la réalisation de test de la biodégradabilité, plusieurs souches sont capables d'utiliser le phénol comme seul source de carbone pour leurs croissances. Cinétiquement les résultats obtenus on permit de montrer que le phénol est dégradé complètement au bous de 24 heures aux concentrations allant jusqu'à 1000 mg/L, à PH optimale de milieu est de l'ordre de 7 et de température de 37°C, sous l'effet d'agitation 250 rmp.

**Mots clés :** Sol, Polluant organique, dégradation, phénol, cinétique.

## Table des matières

Résumé

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

### Partie 1 : Synthèse bibliographique

#### 1. La pollution de l'environnement

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 1.1 Définition                        | 03 |
| 1.2 Les différents types de pollution | 03 |
| 1.2.1 Pollution atmosphérique         | 03 |
| 1.2.2 Pollution d'eau                 | 05 |
| 1.2.3 Pollution de sol                | 05 |
| 1.3 Les microorganismes du sol        | 06 |

#### 2. Les grands groupes des polluants de sol et leur impact dans l'environnement

|  |    |
|--|----|
| 2.1 Polluants inorganique                        | 07 |
| 2.1.1 Les métaux lourds                          | 07 |
| 2.1.2 Les composés azotés                        | 07 |
| 2.1.3 Les composés soufrés                       | 08 |
| 2.2 Polluants organique                          | 08 |
| 2.2.1 Les hydrocarbures                          | 08 |
| 2.2.2 Hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) | 08 |
| 2.2.3 Polychlorobiphényles (PCB)                 | 09 |
| 2.2.4 Les composés organiques volatiles (COV)    | 09 |
| 2.2.5 Les pesticides                             | 10 |

#### 3. L'impact des polluants organiques sur l'environnement

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Sur les sols et les eaux souterraines     | 10 |
| 3.2 Sur les végétaux et la chaîne alimentaire | 10 |
| 3.3 Sur les milieux marins                    | 11 |

#### 4. Généralité sur les phénols

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 4.1 Définition du phénol        | 12 |
| 4.2 Origine de phénol           | 12 |
| 4.3 Propriétés physico-chimique | 12 |
| 4.4 Application du phénol       | 13 |
| 4.5 Toxicité du phénol          | 14 |
| 4.5.1 Effet sur l'homme         | 14 |
| 4.5.2 Effet sur l'environnement | 14 |

|   |    |
|---|----|
| <b>5. Les procédés d'élimination des polluants</b>  | 15 |
| <b>5.1 Les procédés physico-chimiques d'élimination des polluants des sols</b>                    | 15 |
| 5.1.1 Les procédés par évacuation ou entrainement   | 15 |
| 5.1.2 Les procédés thermiques   | 15 |
| 5.1.3 Les procédés électriques  | 15 |
| <b>5.2 Les procédés physico-chimiques d'élimination des polluants des eaux</b>                    | 16 |
| <b>5.3 Les procédés biologiques</b>   | 16 |
| <b>5.4 La biodégradation du phénol</b>  | 16 |
| 5.4.1 Les voies de dégradation de phénol  | 16 |
| 5.4.2 Principales enzymes impliquées dans le catabolisme de phénol                                | 18 |
| 5.4.3 Les Microorganismes dégradant les phénols   | 18 |
| <b>6. Application de la biodégradation dans le traitement de l'eau saline contenant du phénol</b> | 20 |
| 6.1 Technologie d'immobilisation cellulaire   | 20 |

## **Partie 2: Matériel et méthode**

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Site de prélèvement du sol</b>                                | 21 |
| <b>2. Technique d'échantillonnage</b>                               | 21 |
| <b>3. Enrichissement</b>  | 22 |
| <b>4. Préparation des dilutions et mise en culture</b>              | 22 |
| <b>5. Isolement et purification des souches bactériennes</b>        | 23 |
| <b>6. Sélection des souches susceptible de dégrader le phénol</b>   | 24 |
| 6.1 La culture minérale   | 24 |
| 6.2. Test de dégradation de phénol                                  | 24 |
| <b>7. Etude morphologique d'isola capable à dégradé le phénol</b>   | 26 |
| 7.1. Aspect macroscopique   | 26 |
| 7.2. Aspect microscopique   | 27 |
| <b>8. Conservation des souches</b>                                  | 28 |
| <b>9. Etude de la cinétique de biodégradation de phénol</b>         | 29 |
| 9.1. Étude de la dégradation en fonction du PH                      | 29 |
| 9.2. Étude de la dégradation en fonction de température             | 30 |
| 9.3. Étude de la dégradation en fonction de concentration du phénol | 31 |
| 9.4. Étude de la dégradation en fonction de l'agitation             | 31 |
| 9.5. Étude de la dégradation en fonction des cultures mixtes        | 31 |

## **Partie 3 : Résultats et discussion**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I Étude de la cinétique de biodégradation de phénol</b> | <b>33</b> |
| I .1 Effet de PH   | 33        |
| I .2 Effet de température                                  | 34        |
| I .3 Effet de concentration de phénol                      | 35        |
| I .4 Effet d'agitation                                     | 36        |
| I .5 Effet des cultures mixtes                             | 36        |

**Conclusion**

**Références bibliographiques**

**Annexe**

## Liste d'abréviation

A : Absorbance

BN : Bouillon Nutritif

CFC : chlorofluorocarbure

COV : Composés Organiques Volatils

DO : Densité optique

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HCFC : Hydro chlorofluorocarbure

HFC : Hydrofluorocarbure

LB : Luria Bertani

MM : Milieu Minérale

NB : Nutrient Broth

PCB : Polychlorobiphényles

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

Rmp : Rotation Par Minute

T : Témoin

UFC : Unités Formants Colonies

µl : Microlitre

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 01 :</b> Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants dans l'environnement | 09 |
| <b>Figure 02 :</b> La structure de la molécule de phénol  | 12 |
| <b>Figure03 :</b> Voie ortho de la dégradation du phénol  | 17 |
| <b>Figure04 :</b> Voie méta de dégradation du phénol  | 17 |
| <b>Figure 05 :</b> Localisation de site des prélèvements  | 21 |
| <b>Figure06:</b> Les échantillons du sol prélevé  | 22 |
| <b>Figure07:</b> Les cultures dans le bouillon de phénol des échantillons                                       | 22 |
| <b>Figure08 :</b> Schéma représentatif de la technique des dilutions décimales                                  | 23 |
| <b>Figure09 :</b> Technique des stries  | 23 |
| <b>Figure10 :</b> Résultat du dosage colorimétrique de phénol   | 25 |
| <b>Figure11 :</b> L'aspect macroscopique des colonies de quelques souches Bactérienne                           | 26 |
| <b>Figure 12 :</b> Aspect microscopique des isolas capables a dégradé le phénol                                 | 28 |
| <b>Figure 13 :</b> Conservation des souches dans des tubes inclinés   | 28 |
| <b>Figure14 :</b> La souche référencé SE1 sur un milieu solide (LB)   | 29 |
| <b>Figure15 :</b> La culture minérale avec des différentes températures d'incubation                            | 31 |
| <b>Figure16 :</b> Effet de pH sur la biodégradation de phénol   | 33 |
| <b>Figure 17 :</b> Effet de température sur la biodégradation de phénol   | 34 |
| <b>Figure 18 :</b> Effet de concentration de phénol sur la cinétique de biodégradation                          | 35 |
| <b>Figure 19 :</b> Effet de l'agitation sur la biodégradation de phénol   | 36 |
| <b>Figure 20 :</b> Effet de cultures mixtes sur la vitesse de dégradation de phénol                             | 37 |

## Liste des tableaux

|  |          |
|--|----------|
| <b>Tableau 01</b> : Principaux effets des polluants atmosphériques sur la santé et l'environnement et leur origine | 04       |
| <b>Tableau 02</b> : Abondance des micro-organismes dans les sols   | 06       |
| <b>Tableau 03</b> : Les principaux genres bactériens dégradants isolés à partir du sol                             | 07       |
| <b>Tableau 04</b> : Propriétés physico-chimiques du phénol   | 13       |
| <b>Tableau 05</b> : Divers microorganismes eucaryotes capables de dégrader les phénols                             | 19       |
| <b>Tableau06</b> : Divers microorganismes procaryotes capables de dégrader les phénols                             | 24       |
| <b>Tableau07</b> : Les différents isolats obtenus pour effectuer le test biodégradation                            | 24       |
| <b>Tableau08</b> : Dosage colorimétrique de test biodégradation  | 25       |
| <b>Tableau09</b> : Les souches obtenus à partir les échantillons du sol pollué                                     | 27       |
| <b>Tableau 10</b> : Résultat de coloration de Gram de quelque isolas obtenu  | Annexe03 |

*Introduction*  
*générale*

La pollution s'impose aujourd'hui comme un sujet qui préoccupe de plus en plus toutes les domaines sociaux. C'est un problème d'actualité qui à des effets néfastes sur l'environnement qui constitué la terre, l'eau, la plante et l'air est un ensemble très important pour notre bien et pour l'équilibre naturel. Cette pollution peut être d'origine naturelle, mais principalement issue de l'activité humaine qui conduit à la dispersion de quantité nocive de matériaux naturelle et chimique dans l'environnement. **(Jensen, 1966).**

Le sol est un milieu biologique, dans et sur lequel se développent des organismes vivants, est un habitat généralement favorable à la prolifération des microorganismes. Il est constitué aussi des composés minéraux et matières organiques en proportion variable. Les bactéries sont les plus abondants et les plus actifs du sol ou ils sont les principaux responsables de la dégradation des polluants organiques. **(Calvet, 2000).**

Plusieurs travaux ont montré que les bactéries isolées du sol à titre d'exemple ; *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus lentus*, *Ralstonia* ...etc sont capables de dégrader plusieurs types de polluants organiques avec une certaines variabilité de préférence **(Heinaru et al., 1999 ; Sahar zaki, 2006 ; Daffri et al., 2014 ; Opere et al., 2013).**

La pollution porte des différents types des polluants organiques qui sont des molécules qui posent un grave problème environnemental à cause de leurs propriétés toxiques et cancérigènes, ayant des effets sur les êtres vivants (animaux et plantes) et sur la santé humaine. Ils œuvrent également à la perte de la biodiversité dans de nombreux écosystèmes. Parmi ces polluants organiques on peut citer Les polychlorobiphényle (PCB), les composés organiques volatils, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), et principalement le phénol qui est considéré comme un polluant majeur du sol. **(Norway, 2012).**

Le phénol est un produit de synthèse. Pur, il se présente à la température ordinaire comme un solide blanc cristallisé. C'est un composé de famille d'hydrocarbure aromatique, il est toxique, peut provoquer des brûlures graves sur la peau. Il doit être manipulé en utilisant des gants et des lunettes de protection. Les solutions (acide phénique) ont été parmi les premiers antiseptiques utilisés en médecine **(Lister 1867)**. De nombreux efforts ont été faits pour réduire et éliminer ce polluant, grâce à une gamme importante de technologies physico-chimiques qui sont disponibles pour décontaminer l'environnement. Ces techniques, souvent très coûteux, induisent d'importantes modifications des propriétés du milieu, ce qui a incité à développer des méthodes biologiques curatives **(Agarry et Ogunleye, 2012).**

Les méthodes biologiques de décontamination basée sur l'utilisation des microorganismes pour éliminer les polluants en raison de leurs diverses capacités métaboliques; c'est l'un des principaux mécanismes par lesquels le phénol et les autres polluants hydrocarbonés peuvent être éliminés de l'environnement (**Das et Chandran, 2011; Kumar et al., 2011**). Cette technique très prometteuse et efficace qui est simple et peu coûteuse.

L'étude de la croissance bactérienne en présence d'un mélange de substrats est un des domaines les plus riches de la biologie expérimentale. Ce phénomène présente aussi un grand intérêt écologique et technologique. Dans la nature ou dans plusieurs environnements engendrés par les activités humaines tels que les systèmes de traitement des eaux usées et les fermenteurs commerciaux, les microorganismes se développent en présence de divers mélanges de substrat (**Narang et al, 1997**).

Dans notre étude on s'intéresse en premier lieu aux microorganismes qui sont responsables de ce traitement, en particulier les bactéries qui ont la capacité de dégradation du phénol par l'action enzymatique ou métabolique. Par l'application de plusieurs paramètres étudiés. Pour cela l'objectif de notre travail est d'étudier la cinétique de dégradation in vitro de ce polluant par les bactéries isolées à partir d'un échantillon du sol contaminé par les dérivés pétrolier, avec l'optimisation des différentes conditions physico-chimiques pour promouvoir les utiliser dans les procédés biologique de décontamination d'autre milieu pollué.

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

- La première partie présente un rappel bibliographique est dédié à la description de la pollution ainsi que les principaux polluants majeurs et leur impact environnementaux.
- Dans la deuxième partie, nous décrirons les procédures expérimentales mises en jeu dans cette étude.
- En fin, dans La troisième partie on synthétise le travail par une discussion des résultats expérimentaux obtenus.

**Partie 1 :**

**Synthèse bibliographique**

## 1. Pollution de l'environnement

### 1.1 Définition

Un écosystème est un ensemble dynamique au sein duquel interagissent à divers degrés des facteurs biotiques (individu, population, communauté) et abiotiques (facteurs physico-chimiques). Les sols avec les milieux aquatiques et l'atmosphère sont les composants majeurs de la biosphère. A ce titre, ils jouent en permanence un rôle déterminant dans l'apparition et le maintien de l'activité biologique et de la biodiversité à la surface de la planète (Yadav et Hassanizadeh, 2011, Lipińska et al, 2014). Lors d'un déséquilibre de ces derniers il apparaît l'un des grands problèmes de notre jour appelé la pollution. (Bogan et al., 1995).

Il est défini comme une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement et pourrait être un phénomène ou élément perturbateur d'un équilibre établi. L'effet de la pollution sur les différents compartiments environnementaux de la biosphère (sol, eau, air) constitue aujourd'hui un thème d'actualité touchant les domaines sociaux. (Perfumo et al., 2010)

### 1.2 Les différents types de pollution et leur effet toxique

#### 1.2.1 Pollution atmosphérique

D'origine naturelle ou anthropique, les substances émises peuvent être de nature physique (radioactivité, énergie. . .), chimiques (gaz, particules, aérosols. . .) ou biologiques (pollens, acariens, moisissures. . .). Ces pollutions sont dites primaires lorsqu'elles s'échappent directement des pots d'échappements, des cheminées ou des surfaces agricoles, etc. Elles vont ensuite se disperser, se diluer, se transporter voire se transformer en d'autres composés dits « secondaires » comme l'ozone ou le nitrate d'ammonium, la pollution de l'air touche tout le monde et tous les secteurs (Jean et al., 2016). Elle a un impact majeur sur le processus d'évolution des plantes en empêchant la photosynthèse dans de nombreux cas, avec de graves conséquences sur la purification de l'air que nous respirons.

# Synthèse bibliographique

**Tableau 01:** Principaux effets des polluants atmosphériques sur la santé et l'environnement (Jean et al., 2016).

| Polluants   | Origines   | Effets sur la santé  | Effets sur l'environnement   |
|---|--|--|--|
| <b>Ozone troposphérique (O3)</b>  | est une forme particulière de l'O <sub>2</sub> . Résulte de la transformation photo-chimique de certains polluants de l'atmosphère (NO <sub>x</sub> et COV) en présence de rayonnements UV-solaires.       | C'est un gaz agressif qui provoque des migraines, des irritations des yeux et de gorge, de la toux et une altération pulmonaire.   | En quantité très élevée, l'ozone contribue à l'acidification de l'environnement qui perturbe la composition de l'air, des eaux de surface et du sol, ainsi porte préjudice aux écosystèmes et dégrade les bâtiments et les cultures. |
| <b>Oxydes d'azote (NH<sub>x</sub>)</b>  | Proviennent surtout des véhicules et des installations de combustion. Ces émissions ont lieu principalement sous la forme de NO(90%) et dans une moindre mesure sous la forme de NO <sub>2</sub>           | N'est pas toxique pour l'homme au contraire du NO <sub>2</sub> qui peut entraîner une altération de la fonction respiratoire et une hyper activité bronchiques. Chez les enfants et les asthmatiques, peut augmenter la sensibilité des bronches.. | Les NO <sub>x</sub> interviennent dans la formation d'ozone troposphérique et contribuent au phénomène des pluies acides qui attaquent les végétaux et les bâtiments.  |
| <b>Composés organiques volatils (COV)</b>   | Les COV hors méthane (NMVOC) sont gazeux et proviennent du transport routier ou l'utilisation des solvants ou dans les colles, vernis, peinture,.. Les plus connus sont les BTX(benzène, toluène, xylène). | Les effets divers selon les polluants et l'exposition. Ils vont de la simple gêne olfactive et une irritation, à une diminution de la capacité respiratoire. Le benzène est un composé cancérogène reconnu.  | Il intervient dans la formation d'ozone troposphérique et contribue au phénomène des pluies acides qui attaquent les végétaux et les bâtiments.  |
| <b>Dioxydes de carbone (CO<sub>2</sub>)</b>   | provient de la combustion de carburant fossile pour le transport, chauffage les activités industrielles.   | Il n'a pas d'effet connu sur la santé.   | Effet de serre et contribue à une modification du climat planétaire.   |
| <b>Dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>)</b>   | Combustion des matières fossiles contenant le soufre   | Peuvent provoquer des affections respiratoires   | En présence de l'eau il forme de l'acide sulfurique qui contribue à l'acidification de l'environnement.  |
| <b>Amoniac (NH<sub>3</sub>)</b>   | Polluants liés aux activités agricoles. En milieu urbain sa présence liée à l'utilisation de produits de nettoyage, aux processus de décomposition de la matière organique                                 | N'a pas d'effet toxique dans l'air mais sous la forme liquide(NH <sub>3</sub> OH) se révèle très corrosif.   | Contribue à l'acidification de l'environnement.  |
| <b>Polluant organique persistant ( POP) incluant les dioxines les HAP, les pesticides....</b> | Due aux activités humaines et sont rejetées dans l'environnement comme sous-produit de procédés industriels. Les HAP sont rejetées dans l'atmosphère comme sous-produit de la combustion incomplète        | Effet cancérogènes, et perturbateurs endocriniens, ils interviennent dans les processus hormonaux.   | Résistent à la dégradation biologique donc dans l'environnement sont caractérisés par une faible solubilité dans l'eau   |

## 1.2.2 Pollution d'eau

La pollution hydrique c'est introduction, directe ou indirecte, par l'activité humaine, des substances ou de chaleur dans l'eau, susceptibles de contribuer ou de causer : un danger pour la santé de l'homme, des détériorations aux ressources biologiques, aux écosystèmes ou aux biens matériels, une entrave à un usage de l'eau. En général, les eaux souterraines sont moins vulnérables à la pollution que les eaux de surface (**Fawell et. Nieuwenhuijsen, 2003**).

La pollution par les composés organiques est causée principalement par une forte industrialisation qui rejette des polluants toxiques dans l'environnement. Comme la majorité des polluants, les composés phénoliques sont nocifs, et ils se trouvent dans les effluents de nombreuses industries, telles que les industries chimiques et pétrochimiques, celles des résines et des cokeries, des pesticides, du textile, du papier et même dans l'industrie pharmaceutique et beaucoup d'autres.

Avec l'augmentation marquée de la population et l'industrialisation, un nouvel ensemble des polluants est apparus. (**Goldstein, 2002.**)

## 1.2.3 Pollution Sol

La pollution des sols est le résultat des activités minières et d'industries lourdes, comme l'industrie pétrolière ou l'industrie chimique (**Calvet R., 2000**). Les polluants sont majoritairement des composés organiques (hydrocarbures, composés phénolés et chlorés,...) et des métaux lourds (**Yadav et Hassanizadeh, 2011, Lipińska et al, 2014**), elle provoque une intoxication des organismes affectés en perturbant une fonction vitale pouvant entraîner la mort à la diversité bactérienne des sols qu'elle est difficilement quantifiable (**Janssen, 2006; Sait et al., 2002**).

La dépollution des sols vise à diminuer la biodisponibilité des polluants, en évitant leur transfert vers les nappes phréatiques ou les chaînes alimentaires par l'implication des trois processus: physiques, chimiques et biologiques (**Yadav et Hassanizadeh, 2011, Lipińska et al, 2014**). La pollution des sols est principalement issue d'une extraction, transformation et utilisation des produit pétroliers dans des différentes domaines (industrielle, pharmaceutique, agroalimentaire.. etc.) (**Janssen, 2006; Sait et al., 2002**).

Le milieu urbain est en effet à l'origine de plusieurs sources de pollution des sols et consiste un des risques majeur pour l'environnement (**Piedrafita et victoria, 2007**), donc l'exploitation d'une station-service 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. Ce dégât et/ou phénomène de pollution des sols et sous-sols provenant des stations-service se décline en deux principales catégories :

- Une pollution chronique produisant en langue période due le plus souvent à la corrosion des cuves et des canalisations entrées.
- Une pollution accidentelle due au déversement d'hydrocarbure lors du remplissage du stockage de la station ou de la distribution de carburant. (**Jeannot, R et al., 2001**).

### 1.3. Les microorganismes du sol :

**Tableau 02:** Abondance des micro-organismes dans les sols (**Bonneau et Souchier, 1994**).

| Organismes    | Nombre (UFC/g de sol sec) |
|---------------|---------------------------|
| Bactéries     | $10^8$                    |
| Actinomycètes | $10^5$ à $10^6$           |
| Algues        | $10^4$ à $10^5$           |
| Protozoaires  | $10^4$                    |

Est une mosaïque de micro habitat placés dans des conditions physico-chimique différentes qui peuvent agir sur les végétaux soit en synthétisant des composés phytotoxique ou bien détoxifiant les sols contaminé (**Aron, 1998**).

Parmi les microorganismes les plus important les algues, les bactéries et les champignons qui sont des médiateurs primaires dans la dégradation des hydrocarbures, les plus étudiés et semblent les plus efficaces. En effet, ils sont capables de métaboliser une large gamme des hydrocarbures, les transformant partiellement en métabolites ou en les minéralisant complètement (**Chikere, 2011**). Les bactéries se sont avérées plus polyvalentes et actives que les champignons et peuvent donc jouer un rôle plus important au cours de la biodégradation des hydrocarbures (**Rahman et al, 2003, Brooijmans et al, 2009**).

**Tableau 03** : Les principaux genres bactériens dégradants isolés à partir du sol

| Gram     | Classe                  | Genre  | Références  |
|----------|-------------------------|--|---|
| Gram (-) | $\alpha$ Proteobacteria | Sphingomonas, Agrobacterium, Achromobacter.                              | (haritash et kaushik2009 ;Romie et al.,1999)  |
|          | $\beta$ proteobacteria  | Alcalines, Bulkhorderia, Comonas, Rastonia, Rhizobium, Polaromonas.      | (Daane et al.,2001 ;Goyal et zystra,1997 ;Jeon et al .,2006_).  |
|          | $\gamma$ Proteobacteria | Pseudomonas, Acinetobacteria, Klebsiella, Stenotrophomonas, Haemophylus. | (Adb-Esalam et al.,2006 ; Haritash et Kaushik,2009 ; Kim et al.,2009 ; Simon et., 1993)                                       |
|          | Bateroidetes            | Flvobacterium  | (Adb-Esalam et al.,2006)  |
|          | Actinobacteria          | Arthrobacter, Rhodococcus, Mycobacterium, Terrabacter, Gordonia.         | (Heitkamp et al.,1988;kästner et al.,1994 ; khan et al., 2001 ;Krivobok et al.,2003 ;Larkin et al.,1999 ;Timmis et al.,2010). |
|          | Nocardiodes             | Nocardia   | (Krivobok et al.,2003 ;Saito et al.,1999 ;Zeinali et al.,2007).   |
| Gram (+) | Firmicutes              | Bacillus, Paenibacillus.   | (Bossert et Bartha, 1986 ;Daane et al.,2002 ;Rochelle et al.,2005)  |

## 2. Les grands groupes des polluants et leur effet toxique

### 2.1 Les polluants inorganiques

#### 2.1.1 Les métaux lourds

Il s'agit d'un ensemble d'éléments ou de composés dont l'accumulation est responsable d'une pollution du sol (**Chassin et al., 1996**). Les éléments métalliques sont sous différentes formes, toujours présents au sein de l'environnement. A l'état de traces, ils sont nécessaire voir indispensables aux êtres vivants. A concentration élevée, en revanche, ils présentent une toxicité plus au moins grave. La présence de métaux dans l'environnement résulte de causes naturelles et des activités humaines. Ils posent un problème réel, car ils s'accumulent et ne sont pas biodégradables, et donc persistent pendant de longues périodes dans des sols (**Huynh, 2009**). Les métaux lourds ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. (**Kabata-Pendias et Pendias ; 2001; Migeon, 2009**). Signalant que les plus dangereux pour l'homme et les écosystèmes sont le plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd), l'arsenic, le titane et le chrome (**Forbes et al., 1997**).

#### 2.1.2 Les composés azotés (NOx)

L'azote (N) est un nutriment indispensable à la croissance des plantes, mais lorsqu'il est présent en excès dans l'écosystème, des contaminations ont lieu vers les hydrosystèmes sous forme de nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ou vers l'atmosphère sous forme de protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O), Il a été considéré comme le principal élément qui limite la croissance du phytoplancton dans les lacs tropicaux. (**Benoit, 2013**).

Les composés azotés regroupent le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>). Ces polluants sont dispersés plus ou moins efficacement dans l'air. Le NO, principalement émis par la circulation automobile, provient des réactions de combustion. Il est ensuite oxydé en NO<sub>2</sub> dans l'atmosphère. Les oxydes d'azote sont des irritants respiratoires qui peuvent entraîner une altération de la fonction respiratoire, et des perturbations du transport de l'oxygène dans le sang. (Henry et al, 1985),

### 2.1.3 Le dioxyde de soufre ( SO<sub>2</sub>)

Le dioxyde de soufre est un gaz incolore, plus lourd que l'air, d'odeur piquante très irritante, Ce polluant, d'origine principalement industrielle, provient des installations de combustion (charbon, gasoil...). Il est irritant pour les muqueuses et les voies respiratoires. Il peut provoquer des œdèmes du poumon et des bronchites. Il est en partie responsable des pluies acides. (Farcy M., Malard S., 2005).

## 2.2 Les polluants organiques

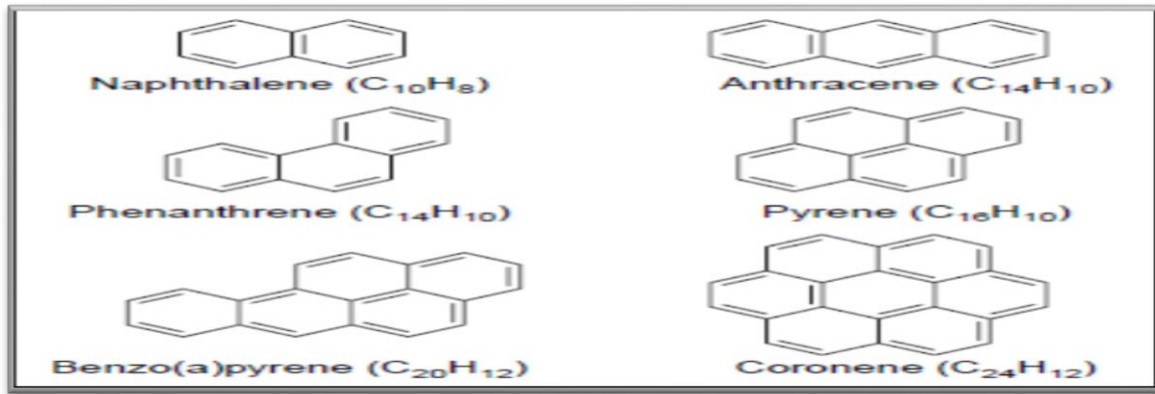
Ce sont en grande majorité des produits de synthèse issus de l'activité anthropique. Ils proviennent principalement de trois ensembles d'activités industrielles (production d'énergie, métallurgie, industries chimiques...), urbains (transport, traitement des déchets,...) et agricoles (utilisation de produits phytosanitaires) (Chu W et al., 2005 ).

### 2.2.1 Les hydrocarbures

Les hydrocarbures diffèrent par leur sensibilité aux attaques microbiennes. Ils contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il s'agit d'alcane acycliques (ou paraffines), des cycloalcanes (ou naphtènes), d'alcènes (ou oléfines) et d'hydrocarbures aromatiques (Harayama et al, 1999). D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et les composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les molécules polaires de faible masse moléculaire sont appelées des résines, les plus lourdes étant regroupées sous l'appellation d'asphaltènes (Balba et al, 1998).

### 2.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

sont des composés chimique porte plusieurs cycle aromatiques juxtaposés plus ou moins substitués (Costes et al., 1997). Les principaux types de sources des HAP sont: anthropique (pétrole et combustibles) et naturelles (Wakleham et al, 1980). Ils résultent de la combustion incomplète de la matière organique à des températures très élevées, de l'ordre de 1000°C, lors de phénomènes de combustions incomplètes (Leozgarziandia, 2000). Quelques exemples de HAP parents sont présentés dans la figure 01.



**Figure 01** : Structure de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques abondants (HAP) dans l'environnement (Sudip *et al.*, 2002)

A l'état pur les HAP sont solides souvent colorés et cristallins à température ambiante. Ils sont peu solubles dans l'eau et s'adsorbent fortement sur les particules organiques du sol, ce qui diminue considérablement leur biodisponibilité. Ils se bioaccumulent aussi dans les graisses, notamment chez les poissons et les mollusques (Gabet, 2004).

Ils ont tendance à s'adsorber sur les sols et les sédiments à cause de leur caractère hydrophobe, la persistance environnementale et la génotoxicité augmentent avec la taille des HAP. Les problèmes de toxicité vont de la toxicité chronique à la cancérogénèse (Christine Bidaud, 1998).

### 2.2.3 Polychlorobiphényles (PCB)

Ce sont des substances chlorées très stables insolubles dans l'eau (Dutta *et al.*, 2004), et ont une forte affinité pour les matières en suspension et les lipides, Ils s'accumulent donc dans le milieu naturel et se bioaccumulent fortement dans la chaîne alimentaire, par exemple dans les graisses des poissons et d'autres organismes vivants. (Boucheseiche C *et al.*, 2002).

les PCB sont largement utilisées dans la production des condensateurs, transformateurs, fluides hydrauliques, lubrifiants, pesticides (Dutta S. K *et al.*, 2004). Ils peuvent être dégradés à haute température (1200°C), leur combustion peut générer des dioxines et des furanes, substances cancérigènes et mutagènes (Barriuso E *et al.*, 1996).

### 2.3.3 Les composés organiques volatils (COV)

Ce terme englobe un grand nombre de composés appartenant à différentes familles chimiques: alcanes, alcanes substitués, alcènes, alcools, composés aromatiques (benzène), esters, cétones. Les COV font l'objet de nombreuses utilisations en tant que solvants, dégraissants, dissolvants, conservateurs, agents de nettoyage.

Ils entrent donc, seuls ou en mélange, dans un grand nombre de procédés d'industries manufacturières utilisatrices de solvants, d'application et de fabrication de peinture, de

préparation de caoutchouc, les imprimeries, les papeteries, la pharmacie, la parfumerie, les industries agro alimentaires. ( **Lalanne ., 2006**).

### 2.3.5 Les Pesticides

Appelés aussi produits phytosanitaires ou bien des produits desynthèse introduits dans l'environnement par l'homme pour des raisons déterminées soit (**Fdil .,2004**) :

- ✚ Pour protéger les récoltes et les denrées stockées
- ✚ Pour protéger les différents secteurs de l'agriculture intensive
- ✚ Pour lutter contre les vecteurs de maladies.

Actuellement ils ont classées en fonction de leur cible biologique (**Kankou Mohamed Ould Sid Ahmed., 2004**):

- Les insecticides contre les insectes.
- Les herbicides contre les mauvaises herbes.
- Les fongicides contre les champignons.

Une fois dans l'environnement, les pesticides peuvent être transformés en un grand nombre de produits de dégradation, aussi sont présent dans les eaux souterraines (**Bottoni et Funari., 2005**)

## 3. L'impact des polluants organiques sur l'environnement

### 3.1 Sur les sols et les eaux souterraines

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

Les fuites de réservoirs de stockage constituent un problème environnemental majeur notamment terme de risque de transfert d'hydrocarbures vers les nappes phréatiques et l'humanité. Il résulte de l'infiltration à partir de la surface ou de l'enfouissement de produits pétroliers ou de résidus hydrocarbonés (**Gautier, 2007**).

Aux polluants transitant par les cours d'eau s'ajoutent ceux provenant des territoires proches de la mer. Ils peuvent avoir une origine diffuse (principalement agricole) ou ponctuelle (stations d'épuration industrielles ou urbaines) (**Gabet., 2004**).

### 3.2 Sur les végétaux et la chaîne alimentaire

Les conséquences dépendent des organismes eux-mêmes et de la structure chimique des hydrocarbures. Parlent sur les concentrations des PCB totales semblaient être plus élevées

dans les huiles extraites des plantes que dans les tissus végétaux (**Stevcevska et Jovanovic, 1974**).

Cette constatation, aurait des répercussions sur certaines cultures qui poussent près des sources d'HAP, parce que les organes végétaux tels que les graines sont importants dans l'alimentation humaine (**Kveseth et al., 1981**). Ont suggéré que les HAP de poids moléculaire faible sont adsorbés sur les feuilles, tandis que les composés particuliers de plus haut poids moléculaire sont éliminés par la pluie (**Kolar et al., 1975**).

### 3.3 Sur les milieux marins

Le principal danger localisés dans les certitudes du transport maritime tout au long de la chaîne d'activité pétrolière, de l'exploitation, production jusqu'au transport de pétrole, à la pétrochimie et au raffinage. (**DeLestrage et al, 2005**).

En termes quantitatifs, le pétrole est l'un des polluants organiques les plus importants dans les milieux marins et il est estimé que dans le monde entier, entre 1,7 et 8,8×10<sup>6</sup> tonnes d'hydrocarbures pétroliers ont un impact annuel sur les eaux marines et les estuaires (**National Research Council, 2002**). Parmi ces polluants les "produits blanc" sont impliqués dans 40 % des pollutions d'hydrocarbures, avec notamment le gazole qui à lui seul représente 27 % des déversements d'hydrocarbures en eaux continentales. Les produits bruts viennent en deuxième position avec 21 % des pollutions. Enfin, les produits raffinés lourds représentent 14 % des pollutions (**Cedre, 2012**). L'impact environnemental à court terme peut être grave et frapper sérieusement les écosystèmes et les populations qui vivent à proximité du littoral contaminé, du point de vue tant de leurs moyens de subsistances que de leur qualité de vie (**Soltani, 2004**).

## 4. Généralités sur les phénols

En 1650 Johann Rudolf Glauber, un scientifique allemand découvre le phénol à l'état - impur à partir de la distillation du goudron de houille, et en 1834 Friedrich Ferdinand Runge parvient à l'isoler pour la première fois le phénol et il le nomme "acide carbonique". Il fut synthétisé et manufacturé en 1889 par la firme BASF (Badische Anilinund Soda-Fabriken) qui est un groupe chimique allemand parmi les plus grands groupes de chimie au monde. Depuis ce temps, le phénol est devenu l'objet de nombreuses études (**Vermerris et Nicholson, 2006**). Ce composé est classifié par Harborne and Simmonds (1964) selon le nombre de carbones dans la molécule (**Ralph et Wilfred, 2006**).

Le phénol est un polluant très répandu dans de nombreux effluents industriels on le trouve dans les eaux usées des usines de transformation du charbon, des raffineries du pétrole, des

industries papetières, des usines de fabrication de résines, de peintures, de textiles, de pesticides, des industries pharmaceutiques. (Bakas et al., 2014).

## 4.1. Définition du phénol

Le phénol de formule brute  $C_6H_6O$ , est un composé organique aromatique composé de noyau benzénique relié avec un groupement hydroxyle ( $-OH$ ). Il porte aussi les noms d'hydroxyle-benzène, acide phénique ou acide carbonique. (Nair et al., 2008).

### • Structure



Figure 02 : La structure de la molécule de phénol

## 4.2. Origine du phénol

Le phénol est produit à la fois naturellement et synthétiquement par des procédés chimiques :

- Naturellement, le phénol est extrait par distillation de goudron de houille. où il est formé durant la décomposition des matières organiques.
- synthétiquement, par l'oxydation de cumène représente 95% de la production de phénol dans le monde (Busca et al., 2008). Il provient également des activités anthropogéniques telles que : l'extraction de combustibles fossiles, la fabrication des matières plastiques, du papier, des pesticides, des produits chimiques organiques, des produits pharmaceutiques, la transformation du bois, le raffinage du charbon et du pétrole, ainsi que des eaux de ruissellement agricoles. (Kumaran et Paruchuri, 1997).

## 4.3 Propriétés physico-chimique

Le phénol est l'unité structurelle de base pour une variété de composés organiques de synthèse. Dans les conditions normales de température et de pression, le phénol est un solide qui se présente sous la forme d'une masse cristalline ou d'aiguilles incolores (INRS, 2011). Il est modérément volatile à la température ambiante et très inflammable (Clabruse et Kenyon, 1991). Il a une odeur caractéristique, à la fois âcre et douceâtre. (Amoore et Hautala, 1983). En présence d'impuretés, d'eau ou de lumière, le phénol se teint en rose ou rouge (INRS, 2011). Il est :

- Soluble dans la plupart des solvants organiques comme les hydrocarbures aromatiques, les alcools, les cétones, les éthers, les acides et les hydrocarbures halogènes. (INRS, 2011).
- Partiellement soluble dans l'eau, il devient entièrement soluble dans cette dernière au-delà de 68°C.
- Il est modérément volatile à la température ambiante, et très inflammable (Clabrassé et Kenyon, 1991).

Tableau 04 : Propriétés physico-chimique du phénol(Clabrassé et Kenyon, 1991).

| Propriétés               | Phénol                    |
|--------------------------|---------------------------|
| Masse molaire            | 94,14 g.mol <sup>-1</sup> |
| Diamètre moléculaire     | 0.55 nm                   |
| Pka                      | 9.99 (phénol/phénolate)   |
| T°fusion                 | 41°C                      |
| T°ébullition             | 182°C                     |
| Solubilité dans l'eau    | 88.360 mg/L               |
| Tension de vapeur à 20°C | 47 A                      |

#### 4.4 Application du phénol

Le phénol constitue un des grands produits intermédiaires de l'industrie chimique. Environ huit millions de tonnes de phénol sont utilisés dans le monde annuellement. (Senthivelan et al., 2014). En tant que substance pure, le phénol est utilisé dans la fabrication de produits anti moisissures, de désinfectants, d'antiseptiques et de préparations médicinales diverses, telles que des bains de bouche, des gouttes nasales et auriculaires et des pastilles pour maux de la gorge, on le trouve comme antiseptique interne et anesthésique gastrique. Le phénol est un produit majeur dans la synthèse de produits pharmaceutiques, dont l'aspirine (Busca et al., 2008).

Il est également utilisé dans la fabrication des divers produits mais principalement en synthèse organique tels que :

- ✓ Le raffinage des pétroles.
- ✓ L'industrie des matières en plastiques.
- ✓ Les matières explosives (mélinite à base d'acide picrique).
- ✓ La fabrication de détergents, pesticides, colorants, etc. (Busca et al., 2008).

## 4.5. Toxicité du phénol

La majorité des phénols et de leurs dérivés sont des substances toxiques. Beaucoup d'entre eux sont classés comme des déchets dangereux, et certains d'entre eux sont connus d'être cancérogènes. (INRS, 2008). comme il est rapidement éliminé par les reins sous forme libre est conjuguée (80 à 90% sont excrétés en 24 heures). Les manifestations toxiques sont dues au phénol libre. L'ingestion accidentelle, l'absorption cutanée massive entraînent par fois la mort. (INERIS, 2005).

### 4.5.1. Effet sur les êtres vivants

Le phénol est rapidement absorbé (70 à 80% en 6 heures). Il dénature les protéines et détruit les parois cellulaires. Les organes ciblés sont (le cerveau, les reins, le foie, le pancréas, le sang, les poumons et la muqueuse gastro-intestinale). L'ingestion de 1g de phénol est létale pour les humains (Kumaran et Paruchuri, 1997). il peut provoquer :

- Les maux de tête et vomissements.
- La faiblesse musculaire et l'étourdissement.
- Les troubles de la vision et de l'audition.
- la respiration rapide et irrégulière e
- les brûlures de peau,
- une dépression cardiaque, (Tziotzios et al., 2005 ; Chakraborty et al., 2010).
- lésions hépatiques et rénales.
- des troubles du système nerveux central (Olujimi et al., 2010).

### 4.5.2. Effet sur l'environnement

Le rejet du phénol dans la nature, sans traitement et sans contrôle peut modifier les écosystèmes aquatiques et causer des dommages, Dans l'eau, le phénol forme des solutions toxiques. En raison de sa forte toxicité, sa solubilité dans l'eau, ils peuvent causer de graves odeur et un goût désagréables et posent des risques pour les populations même à une faible concentration (Adak et Pal, 2006; Huang et al., 2008). La présence de ces composés dans les eaux usées entraîne une diminution de la concentration en oxygène dissous, ce qui rend l'environnement irrespirable. Ce phénomène entraîne une dégradation de la qualité des eaux de surface en inhibant le développement des microorganismes (Capasso, 1997). Ce qui entraîne le déséquilibre du biotope aquatique. Il est prouvé qu'il peut également causer des dommages génétiques pour les poissons car ces derniers sont très sensibles.

## 5. Les procédés d'élimination des polluants

### 5.1. Les procédés physico-chimiques d'élimination des polluants des sols

L'objectif final étant de faire disparaître les naissances et de minimiser les risques vis-à-vis de l'environnement (Goyer, 1995).

#### 5.1.1. Les procédés par évacuation ou entraînement

Le mécanisme est de transfert d'un polluant de phase liquide ou solide vers une phase gazeuse par l'injection de l'air ou de la vapeur sous pression dans le sol grâce à des puits d'injection afin de vaporiser des composés volatils, des puits d'extraction permettent de récupérer les vapeurs toxiques qui sont traitées par un filtre ou par autre procédé.

(khodadoust et al., 2004).

#### 5.1.2. Les procédés thermiques

L'incinération ; se fait toujours hors-site, elle s'adapte à tous les polluants organiques avec un excellent rendement, elle se fait très utilisée, la température de traitement de 1000 à 1100°C, est obtenue par chauffage direct du sol à traiter, les gaz et les poussières produits doivent être traités impérativement. (khan et al., 2004).

#### 5.1.3. Les procédés électriques

le principe repose sur la circulation d'un courant électrique dans le sol par l'intermédiaire d'électrodes poreuses (des anodes et des cathodes), ainsi les particules chargées se déplacent vers les électrodes de charge opposées à la leur et ils peuvent alors être récupérés par pompage (Stegmann et al., 2001).

Il existe d'autres techniques chimiques qui ont pour but de détruire les polluants ou de transformer en une forme moins nocive, le principe consiste à injecter dans le sol un réactif chimique approprié au type de polluant afin de former des produits moins nocifs. (Chu et Kwan, 2003).

### 5.2. Les procédés physico-chimiques d'élimination des polluants des eaux

✓ La décantation : l'objectif est d'éliminer les particules dont la densité est supérieure à celle de l'eau par gravité. La base de ces procédés de séparation solide liquide est la pesanteur. L'usage de réactifs coagulants ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , etc.), bien qu'ils ne soient pas souvent employés, peut favoriser l'agglomération des petites particules et faciliter leur séparation par décantation. Cette méthode permet d'éliminer 60 % des MES.

✓ La coagulation : a pour but principale de déstabiliser les particules en suspension. En pratique, ce procédé est caractérisé par l'injection et la dispersion rapide de produits chimiques : sels minéraux cationiques (sels de fer ou d'aluminium). (Faby., 1997).

✓ La floculation : a pour objectif de favoriser, à l'aide d'un mélange lent, les contacts entre les particules déstabilisées. Ces particules s'agglutinent pour former un floc qu'on peut facilement éliminer par les procédés de décantation et de filtration (**Lazarova, 2003**).

✓ L'adsorption sur charbons actifs : Le charbon est dit actif après avoir subi diverses opérations telles que la pyrolyse. Ces opérations permettent de le rendre poreux et d'augmenter sa surface d'échange avec l'eau (**Farhadian et al. 2008**). Ses propriétés ont été largement utilisées pour la purification de l'air et la dépollution des eaux potables, en particulier pour le traitement des polluants organiques et inorganiques (**Jayson et al., 1982**).

### **5.3. Les procédés biologiques**

Est une technique efficaces et moins coûteuses basées sur un principe général qui repose sur la capacité et le pouvoir des microorganismes existent naturellement dans le milieu pour la dégradation des polluants (**Amrouche et al., 2011**). Mais la croissance des bactéries (et donc l'efficacité de la méthode) demande des conditions physiques et chimiques très strictes (PH proche de 7 ; température optimale ; ne doit pas y avoir des produits toxiques pour les bactéries) (**wilson et al., 1993**).

### **5.4. La biodégradation du phénol**

La biodégradation est la décomposition des contaminants organiques complexes, éventuellement toxiques, en éléments non toxiques et plus simples par l'activité microbienne. Ces contaminants peuvent être considérés comme source nutritive ou substrat de croissance. Ils sont l'objet d'une série de réactions biochimiques conduisant généralement à la formation d'eau et de gaz carbonique (**Parales et al., 2002**). Certains microorganismes ont acquis la faculté d'utiliser les phénols en tant que source de carbone et d'énergie et sont de plus capables de résister à des concentrations toxiques pour les autres organismes (**Goudar et al., 2000**).

Plusieurs facteurs peuvent limiter le taux de biodégradation des phénols. Ces facteurs peuvent inclure la température, le pH, la teneur et la disponibilité de l'oxygène, la concentration du substrat et les propriétés physiques des contaminants.

#### **5.4.2. Les voies de dégradation des phénols**

- **Biodégradation aérobie**

En condition aérobie, les microorganismes utilisent l'énergie d'oxydation des phénols pour se multiplier grâce au processus de respiration.

La dégradation implique une série d'actions enzymatiques spécifiques qui font partie de la voie catabolique (**Chandana et Sridevi, 2009**).

La première étape du métabolisme aérobie est l'hydroxylation des phénols en catéchol par la phénol-hydroxylase, une enzyme dépendante du NAD(P)H (Chandana et Sridevi, 2009). Cette enzyme incorpore un atome d'oxygène dans le cycle aromatique pour former le catéchol qui subit alors un clivage du noyau par une dioxygénase (Beadle et Smith, 1982). Le catéchol est dégradé par ortho- ou meta-fission en intermédiaires du métabolisme central. (Seo et al., 2009). Après plusieurs étapes ultérieures, les produits des deux voies ortho et meta sont incorporés en tant qu'intermédiaires du cycle de Krebs. (Chandana et Sridevi, 2009).

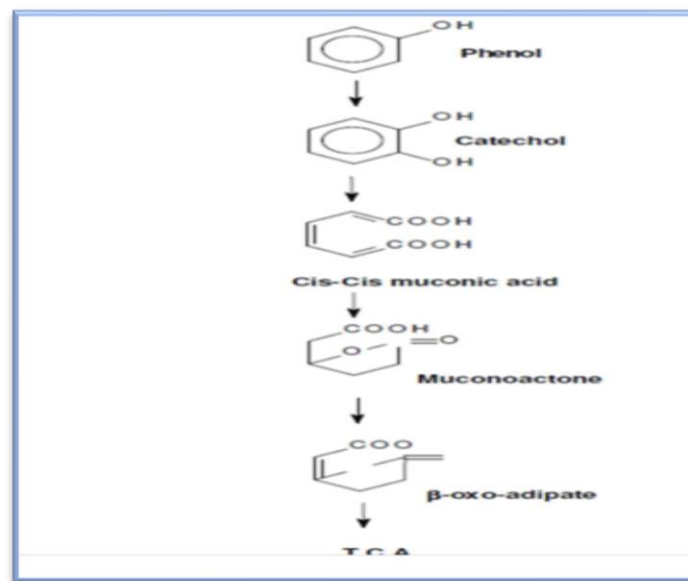


Figure03 : Voie ortho de la dégradation du phénol.

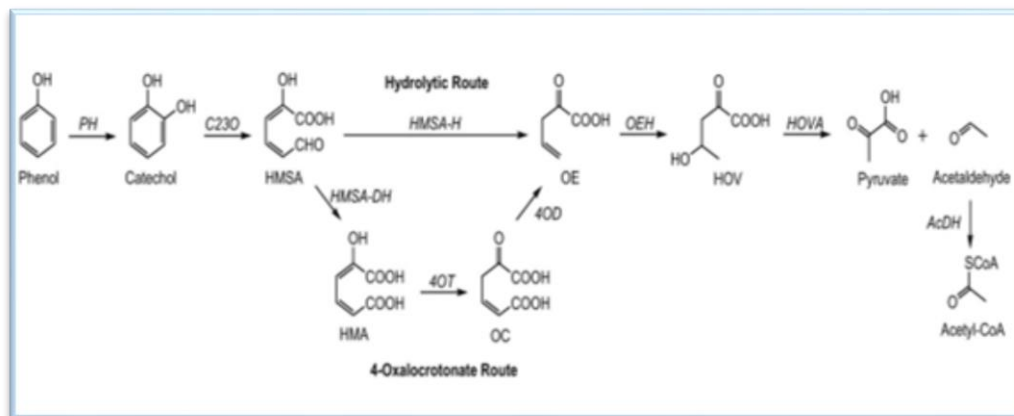


Figure04 : Voie méta de dégradation du phénol

## • Dégradation anaérobie

La dégradation anaérobie est initiée par carboxylation des phénols qui s'effectue en deux étapes. La première étape implique la phosphorylation des phénols par l'addition d'un groupe phosphate, à partir d'un donneur de phosphoryle, catalysée par une enzyme appelée phénylphosphate-synthase (kinase) pour former le phosphate de phényle comme premier

intermédiaire (**Lack et Fuchs, 1992**). La seconde étape implique la carboxylation du phosphate de phényle, catalysée par l'enzyme phényl-phosphatecarboxylase pour former le 4-hydroxybenzoate. Elle est extrêmement sensible à l'oxygène. (**Breining et al., 2000**).

Les organismes capables de dégrader le phénol dans des conditions anaérobies sont principalement *Thauera aromatica* et *Desulphobacterium phenolicum* (**Basha et al., 2010**). Cependant, la biodégradation anaérobie est plus lente et moins efficace.

### 5.4.3 Principales enzymes impliquées dans le catabolisme des phénols

Il est bien établi dans la littérature que, le phénol est métabolisé par un mécanisme ortho. Ce mécanisme catabolique implique six enzymes cytoplasmiques. Les quatre premières enzymes de dégradation du phénol par un ortho-mécanisme sont : la phénol-hydroxylase, la catéchol 1,2-dioxygénase, l'enzyme de lactonisation cis,cis-muconate et la 3-oxoadipate éno-lactone-hydrolase (**Schie et Young, 2000**). La phénol-hydroxylase et la catéchol dioxygénase sont décrites ci-dessous

#### ➤ Phénol-hydroxylases

Les phénol-hydroxylases des bactéries appartiennent principalement à la classe des oxygénases aromatiques multicomposantes (à trois composants) et sont responsables de l'oxydation du phénol et de certains dérivés phénoliques substitués par un méthyle aux catéchols correspondants (**Hanson et Berliner, 2009**). Ces enzymes sont utilisées par un grand nombre de bactéries pour dégrader les composés toxiques au dioxyde de carbone et à l'eau, en tant que partie de leurs voies cataboliques.

#### ➤ Catéchol dioxygénases

Le premier produit intermédiaire de la dégradation du phénol est le catéchol. L'enzyme dioxygénase catalyse le clivage du noyau aromatique du catéchol et de ses dérivés. Elle réalise l'étape critique dans la dégradation aérobie des composés aromatiques chez les microorganismes. (**Vaillancourt et al., 2006**).

### 5.4.4. Les Microorganismes dégradant les phénols

En raison de la dissémination des phénols dans l'environnement, de nombreux microorganismes les utilisent comme seule source de carbone et d'énergie (**Basha et al., 2010**). Ces microorganismes peuvent se ranger en deux catégories,

les procaryotes (les bactéries dont les actinomycètes) et les eucaryotes (les champignons et les algues) (comme le montre les tableaux ci-dessous) (**Chandana et Sridevi, 2009**).

**Tableau 05:** Divers microorganismes eucaryotes capables de dégrader les phénols.

| Moisissures                            | Références   |
|--|--|
| <i>Aspergillus niger</i>               | Garcia et al(2000)   |
| <i>Aspergillus terreus</i>             | Garcia et al. 1997   |
| <i>Coprinus sp</i>                     | Guiraud et al. 1999  |
| <i>Coprinus cinereus</i>               | Masuda et al. 2001   |
| <i>Geotrichom candidum</i>             | Santos et Linardi 2004 ; Weijan cai et al .2007                    |
| <i>Mycelia sterilia</i>                | Francis Fitz Gibbon et al. 1998                                    |
| <i>Penicillium AF2, AF4, F1B9</i>      | Santos et Linardi 2004   |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>             | Fountoulakis et al. 2002   |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i>     | Francis Fitz Gibbon et al. 1998 ; Garcia et al 2000                |
| <i>Rhizobium sp. CCNWTB 701</i>        | Gehome wei et al . 2007  |
| Levures                                | Références   |
| <i>Candida maltosa</i>                 | Ariana Fialova et al. 2004   |
| <i>Candida tropicalis</i>              | Salmeron- alcoceret al. 2007                                       |
| <i>Dabaromyces subglobosus</i>         | Chai et al. 2004   |
| <i>Rhodotorula glutinis ATCC 28052</i> | Katayama- Hirayama et al. 1994                                     |
| <i>Rhizobium.Sp.,CCNWTB 701</i>        | Gehomg wei et al 2007  |
| <i>Trichosporun cutaneum R57</i>       | Alexeiva et al. 2004 ; chai et al. 2004                            |
| Algues                                 | Références   |
| <i>Ankistrodesmus brainii</i>          | Gabriel pinto et al. 2002  |
| <i>Ochromonas danica</i>               | Semple et cain, 1995   |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i>         | Gabriel pinto et al. 2002  |
| Bactéries                              | Références   |
| <i>Acinetobacter sp</i>                | Tibbles et Baecker, 1989a, Oliver et al. 2002                      |
| <i>Acinetobacter sp W-17</i>           | Usama Beshay et al. 2002   |
| <i>Achromobacter sp. E1</i>            | Watanabe et al. 1996   |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i>       | Kowanlska et al. 1998  |
| <i>Alcaligenes faecalis</i>            | Bastos et al. 2000   |
| <i>Arthrobacter sp.</i>                | . Kar et al. 1996  |
| <i>Azoarcus sp.</i>                    | Shinoda et al. 2000  |
| <i>Azospirillum brasilense</i>         | Barkovskii et al. 1985 ; Arutchelvanet al. 2005                    |
| <i>Bacillus brevis</i>                 | Arutchelvan et al. 2006  |
| <i>B. thermoleovorans A2</i>           | Mutzel et al. 1996 Burkholderia cepacia G4 Moustafa El-Sayed, 2003 |
| <i>Comamonas testosterone P15</i>      | Yap et al. 1999  |
| <i>Comamonas testosterone E23</i>      | Yap et al. 1999  |
| <i>Halomonas sp.</i>                   | Hinteregger et Streichsbier, 1997                                  |
| <i>Magnetospirillum sp.</i>            | Shinoda et al. 2000  |
| <i>Micorbacterium phyllosphaerae</i>   | Salmeron-Alcocer et al. 2007                                       |
| <i>Micrococcus sp.</i>                 | Tibbles et Baecker, 1989   |

### 6. Application de la biodégradation dans le traitement de l'eau saline contenant du phénol

#### 6.1 Technologie d'immobilisation cellulaire

C'est avérée plus avantageux utilisant des cellules en suspension libre pour la biodégradation des matières organiques. Parmi ces avantages :

- L'augmentation du taux de biodégradation par une charge cellulaire plus élevée
- Protéger les micro-organismes des conditions environnementales difficiles
- Permettant une densité de biomasse plus élevée
- Offrant une plus grande opportunité pour réutilisation et récupération, et réduction du volume du réacteur (Kumar et al., 2012; Tsekova et al., 2010; Zhang et al., 2007).

Les méthodes sont variées : couplage covalent, réticulation, piégeage physique, et le processus naturel d'adhésion (El-Naas et al., 2014). Les cellules immobilisées peuvent s'adapter rapidement à un environnement hypersaline, cette condition de dégradation est la plus favorable. L'immobilisation peut également être utilisée comme méthode de biorestauration in situ dans les zones d'eau polluée. Un réacteur d'oxydation biologique par contact (BOCR) utilisant des cellules immobilisées de *Oceanimonas* a été appliqué pour traiter des eaux usées salines avec du phénol à 1,5 g / L et NaCl à 6% (p / v). Les résultats ont montré que 99% du phénol était supprimé (Tan et al., 2017 ;Jiang et al., 2016).

L'utilisation ainsi d'un système de *Comamonas sp* par le couplage des leurs cellules avec des électrodes pour traiter les eaux usées phénoliques et comme résultats ils ont suggérés 1000 mg / L de phénol a été complètement dégradé.

Bien qu'il existe de nombreux d'autres méthodes qui joue un rôle important dans notre vie, juste nécessite la bon pratique et la responsabilité de l'humanité pour éviter la participation direct ou indirect dans la pollution de notre planète.



# **Partie 2**

## **Matériels et méthodes**

## 1. Site de prélèvement d'échantillon (sol)

8 échantillons de sol contaminé ont été prélevés à partir d'un forrage de pétrole de la zone Hassi Messaoud à Ouregla (Figure 06).

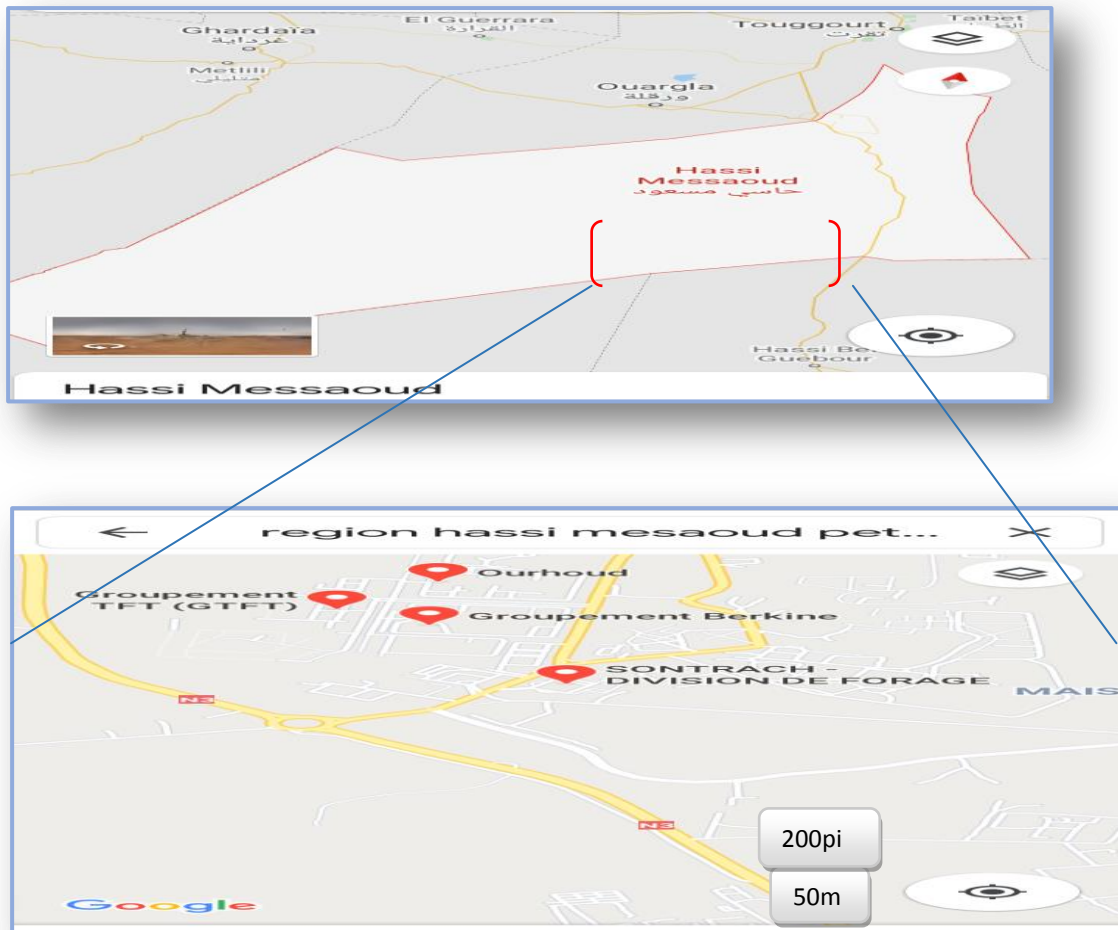


Figure 05 : localisation de site des prélèvements (google maps)

## 2. Technique d'échantillonnage

Un point essentiel pour la valeur des résultats de l'analyse est celui du choix des échantillons représentatifs de l'état microbiologique régnant dans le sol étudié, avant de commencer l'échantillonnage nous avons examiné le terrain du point de vue de son uniformité, genre de sol, disponibilité de matière organique (Simonart, 1957).

Les échantillons ont été exécutés en 2019, à partir d'un forrage de pétrole de la région Hassi Messaoud –wilaya d'Ouregla (fig06). Huit prélèvements de sol pollué de différentes profondeurs (3712- 3795m) ont été réalisés avec une technique bien déterminée et sont faits dans les mêmes conditions physiques (température et humidité) et dans le même jour.

Les échantillons sont transportés vers le laboratoire avec soin et puis ils ont été conservés dans des pochettes en plastique stérile à 4°C pour garder leur humidité pour réaliser après les analyses microbiologique (Itab, 2002). Les échantillons de sol portent une forte odeur avec une couleur marron foncé (Patil, 2012).



**Figure 06:** Les échantillons du sol prélevé

### 3. Enrichissement

Une étape primordiale qui précède l'isolement est l'enrichissement, cette étape a pour but de fournir les éléments nutritifs nécessaire à la croissance bactérienne vu la pauvreté des sols de la matière organique. Dans des conditions d'asepsie on a pris les 8 échantillons des sols contaminés, nous avons préparé huit solutions mères en mettant 5g du sol sec dans 45 ml de bouillon nutritif stérile (noté les volumes de milieu et les profondeurs des échantillons de sol sur les flacons), A l'aide d'un agitateur vortex, les 8 flacons ont été bien homogénéisés. Ensuite on a ajouté au niveau de chaque flacon un volume de 200ml de phénol à 0,1 % pour avoir un bouillon de phénol, les cultures ont été par la suite incubées pendant 24h à 30 C°.



**Figure 07:** Les cultures dans le bouillon de phénol des échantillons (Originale Lahreche et Zeghoudi 2019).

### 4. Préparation des dilutions et mise en culture

Après l'incubation, les cultures dans le bouillon ont subi une série de dilution décimale, la verrerie utilisée dans la dilution a été autoclavé à 1 bar pendant 20 min. Ensuite à partir de chaque dilution nous avons réalisé un étalement sur un milieu gélosé (LB) (Annexe1) (Meyer et al., 2004) avec des 2 techniques d'isolement :

1. **Ensemencement en masse** : Un volume de 1 ml de la dilution est versé dans une boîte de pétrie vide, après on ajoute un volume de 20 ml de milieu LB en surfusion, ensuite on a réalisé des mouvements en 8 pour bien mélanger l'inoculum avec le milieu gélosé.

## 2. Ensemencement en surface

Dans des boîtes de pétries gélosés par la gélose LB, nous avons mis un volume de 0,2 ml de la suspension sur la surface de la gélose, ensuite et à l'aide de la pipette pasteur en verre et la flamme de bec bunsen on a construit un râteau pour l'étalement de l'inoculum sur la totalité de la surface de la gélose.

✓ Incubation des boîtes a été faite à une température de 30C° pendant 48h

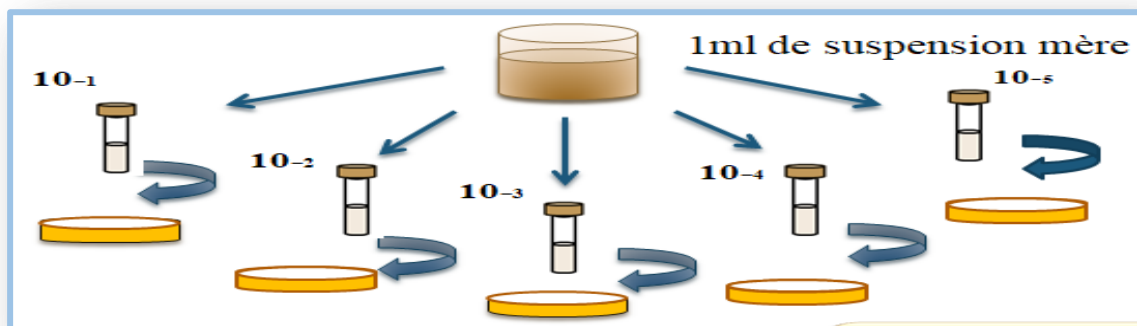


Figure 08 : Schéma représentatif de la technique des dilutions décimales

## 5. Isolement et purification des souches bactériennes

Un seul type de microorganismes ne peut pas être étudié dans une culture mélangée, donc on a besoin d'une culture pure, une population de cellules provenant d'une seule cellule pour caractériser une espèce individuellement (Lansing et al., 2010).

Après 48h d'incubation on a purifié les souches obtenues par un repiquage successif selon la méthode des stries. La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité (Matter, 2001).

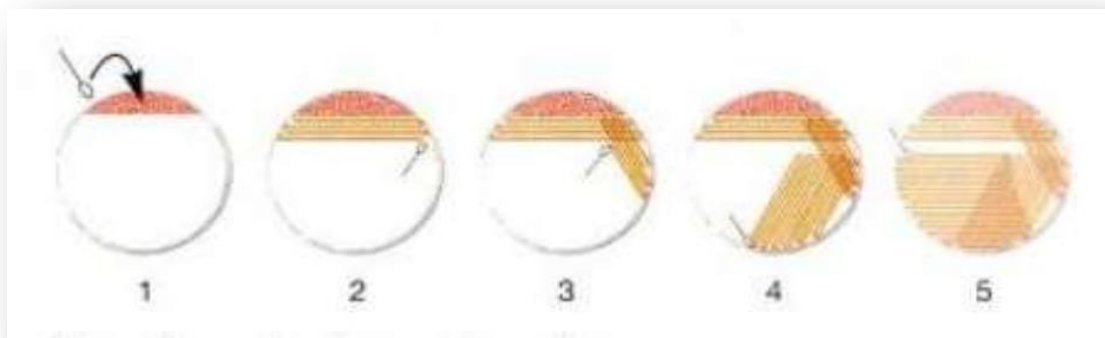


Figure09 : technique des stries (Lansing et al., 2010)

- ✓ Finalement on a eu des isolats différentes et répétés (Tableau 11), donc en a choisis les souches suivantes pour faire un test de biodégradation parce qu'ils sont les plus dominantes dans le sol pollué.

**Tableau06** : Les différents isolats obtenus pour effectuer le test biodégradation.

| Echantillon   | Isolas        |
|---------------|---------------|
| Echantillon 1 | SE1. SE1. SE2 |
| Echantillon 2 | SED2. SED2F   |
| Echantillon 3 | C2. C8        |
| Echantillon 4 | SE1/95        |
| Echantillon 5 | SE2/95        |
| Echantillon 6 | SE1/71        |
| Echantillon 7 | SE2/71        |
| Echantillon 8 | SE66          |

## 6. Sélection des souches susceptible de dégrader le phénol

### 6.1. La culture minérale

A pour but de mettre le phénol comme la seule source de carbone pour la croissance microbienne (Bared et al., 2010), nous avons utilisé un milieu minéral (Annexe 1) (Yi Li et al., 2010) qui contient les sels minéraux nécessaire à la croissance des bactéries (Bared et al., 2010), le milieu doit ajuster avec une solution de NaOH à 1N ou le HCl jusqu'à un pH de 7,2 car c'est le pH optimal de la biodégradation (Daffri et Bousseboua, 2014). Dans des flacons contenant un volume de 45ml de milieu minérale (MM) autoclavé à 1B pendant 20 min, on ajoute aseptiquement une concentration de phénol de 200µl et les isolas purifiées obtenu (SE1, SE2, S1.3771, S2.3771, S1.3795, S2.3795, S3766). Les flacons sont incubés à 37°C et la lecture des résultats se fait après 24h (Bared et al., 2010).

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

### 6.2. Test de dégradation de phénol

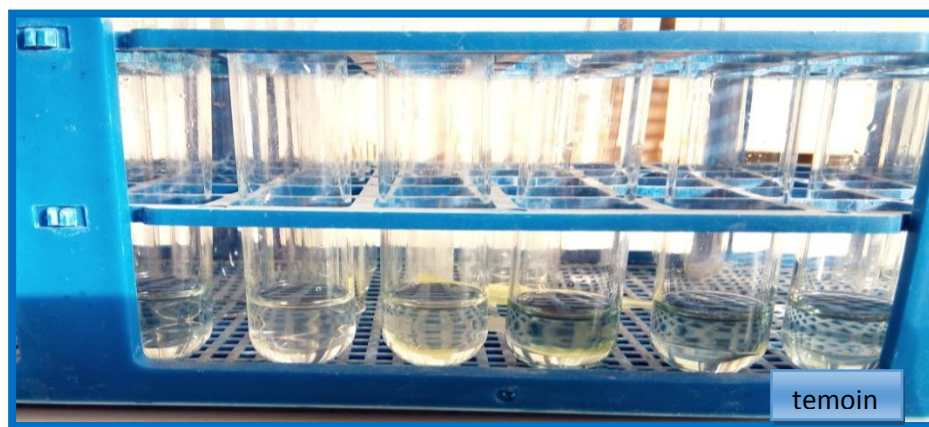
La lecture des résultats de biodégradation se fait par le dosage colorimétrique de phénol avec une solution de carbonate de sodium (600 µl) (Annexe 01) et le réactif folin-ciocalteu (200 µl) (Annexe 1), qui est une méthode habituellement utilisé pour mesurer les phénols totaux dans une solution. Lorsqu'ils sont en présence de phénols, les acides présents dans le réactif sont réduits en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (Waterhouse, 2010).

### ➤ Méthode

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

Dans des tubes à essai, un volume d'eau distillé stérile ajouté à un volume de 100µl d'échantillon d'inoculum et 200µl de folin-ciocalteu après 3 min on ajoute (600µl) de carbonate de sodium, un témoin et préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesurée à 760nm (Kylli, 2011 ;Mangwani et al,2014).

On a obtenu plusieurs isolats qui dégrade le phénol complètement avec la disparition de la couleur bleu et devient un mélange transparent para rapport au témoin (fig10). En revanche il y à des autres isolats capable de dégradé le phénol partiellement, ainsi d'autre son incapable de faire la dégradation de phénol.



**Figure10 : Résultat du dosage colorimétrique de phénol**

**Tableau07 : Dosage colorimétrique de test biodégradation**

| <b>Les isolas</b>               | <b>Résultat de test biodégradation</b>     |
|---------------------------------|--|
| Témoin                          | Couleur bleu clair (négative)              |
| SE/SEϕ/SE1/SE1ϕ/ SE2/SED2/SED2ϕ | Couleur transparent (dégradation complète) |
| S1 et S2 (3795) m               | Couleur bleu (négative)                    |
| S1 et S2 (3771) m               | Couleur bleu (négative)                    |
| S (3766) m                      | Couleur bleu (négative)                    |
| S (3791) et S (3791ϕ) m         | Couleur bleu (négative)                    |
| C2 et C8                        | Couleur transparent (dégradation complète) |

## 7. Etude morphologique d'isola capable à dégradé le phénol

### 7.1. Aspect macroscopique

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

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



**Figure 11** : L'aspect macroscopique des colonies de quelques souches bactériennes (Originale Lahreche et zeghoudi, 2019).

**Tableau08** : Les souches obtenus à partir les échantillons du sol pollué.

| Numéro de la souche           | Leur aspect et couleur  |
|-------------------------------|---|
| ✓ <b>S1 profondeur 3795 m</b> | ✓ Colonies transparentes de couleur vert clair /plate avec une pigmentation verte   |
| ✓ <b>S2 profondeur 3795 m</b> | ✓ Colonies transparentes brillantes de petite taille                                |
| ✓ <b>S.E1'</b>                | ✓ Petite colonies bambée et lisse avec des bords régulière et de couleur blanchâtre |
| ✓ <b>S3771 :</b>              |   |
| - <b>S1-3771m</b>             | - Transparente de couleur blanchâtre, plate avec entoure en dentelle                |
| - <b>S2-3771m</b>             | - Couleur blanchâtre et transparente avec une aspect visqueuse lisse et bambée      |
| ✓ <b>SE2</b>                  | ✓ Des petites colonies avec des formes rondes bambée lisse avec une couleur beige   |
| ✓ <b>S3766</b>                | ✓ Des colonies plates d'un bord irrégulier, opaque de couleur beige                 |
| ✓ <b>ES.D2</b>                | ✓ Des colonies aspect opaque et visqueuse d'une grande taille                       |
| ✓ <b>ESD2'</b>                | ✓ Des colonies jaunes avec un aspect dentelle et petite taille.                     |
| ✓ <b>ESD2F</b>                | ✓ Des colonies lisses d'une couleur verte   |
| ✓ <b>C2</b>                   | ✓ Des colonies blanchâtres d'une grande taille et bambée                            |

## 7.2. Aspect microscopique

### ➤ *Coloration de Gram*

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

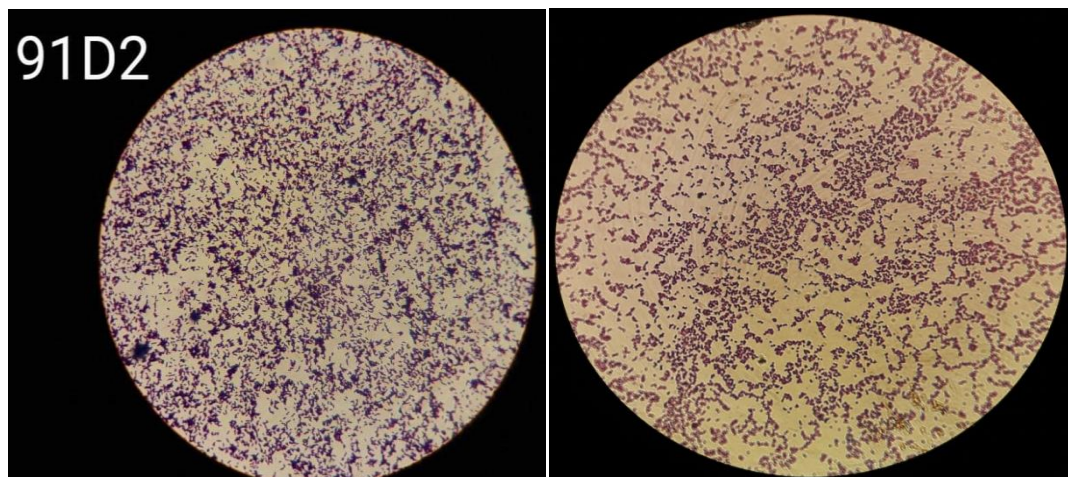
La coloration de Gram utilise 4 réactions :

- Le Cristal Violet (**Annexe 2**) qui colore tout en violet.
- Le Lugol (**Annexe 2**) faible qui se complexe au cristal violet, formant un colorant violet soluble

dans l'alcool.

- L'Alcool (**Annexe 2**) ou l'Alcool/Acétone qui décolore certaines bactéries (celles dont la paroi est perméable à l'alcool), mais pas d'autres (celles dont la paroi est imperméable à l'alcool).

- La Safranine (ou la Fuch sine de Ziehl, diluée 10 x v/v)(**Annexe2**), qui colore en rouge/rose les bactéries décolorées par l'alcool, sans modifier la couleur des autres bactéries (violet foncé/bleu) (**Galet et al., 2009**).



**Figure 12** : aspect microscopique des isolas capables de dégrader le phénol

### 8. Conservation des souches

Les souches isolées capables de dégrader le phénol sont conservées dans des tubes à essai contenant de la gélose nutritive LB (**Annexe1**) inclinée. Donc sont ensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries, puis incubées à 37C° pendant 24h. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront bouchés et conservés à 4C° pour une durée de 4 à 6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit être faite tous les mois (**Marchal et Bourdon, 1982**).



**Figure 13:** Conservation des souches dans des tubes inclinés

### 9. Étude de la cinétique de biodégradation de phénol

Généralement, le phénol est toxique pour les organismes mais Certaines bactéries dégradant le phénol peuvent les utiliser à faible concentration comme source de carbone, et lorsqu'il y a une bonne adaptation au phénol, la bactérie profite dans leur métabolisme ou co-métabolisme d'une telle sorte.

La biodégradation de phénol peut être affectée par une variété de facteurs physicochimiques, et les conditions biologiques tels que la concentration en phénol, la température, le pH, la salinité, des sources supplémentaires de carbone et d'azote, l'immobilisation et les additifs (**Hao Li et al., 2019**) et même l'influence de la densité cellulaire et la vitesse d'agitation et les cultures mixtes.

Pour cela en exploite la capacité enzymatique de la dégradation de nos souches bactériennes obtenu pour suivez la cinétique de biodégradation de phénol sous différentes conditions physicochimique, ainsi déterminé les paramètres optimaux qui accélère la bio-processus de dégradation, et même profité le potentiel biologique naturel de cette dernière.

Etude sur la croissance des bactéries à différentes variable ont été effectués pour l'optimisation des conditions physicochimique de la dégradation de phénol. Alors l'augmentation de phénol est estimée par l'augmentation de la densité optique, en parallèle l'augmentation de croissance cellulaire indique l'augmentation de taux de dégradation.



**Figure 14 :** la souche référencé SE1 sur un milieu solide (LB) (originale Lahreche et Zaghoudi 2020)

#### 9.1. Étude de la dégradation en fonction du pH

Un pH neutre compris entre 6,0 et 8,0 est approprié pour la plupart des souches bactériennes dégradant les phénols. Le la variation du pH peut affecter la croissance microbienne et l'activité enzymatique (**Kuang et al., 2013 ; Ucun et al., 2010**).

Afin d'évaluer l'effet du pH sur le taux de dégradation de phénol, les cellules de notre souche bactérienne SE1. Ont été cultivées dans PH différents (5 ; 6,08 ; 6,5 ; 7,04 ; 8 ; et 9,1) ajusté par l'addition de l'HCl, KOH ou bien NaOH , ajouté à un volume de 45 ml de milieu minimal (**Bhavna et al, 2011**) HAYAT, contenant 200 mg/L tout fois la densité cellulaire bactérienne initial (DO 620nm 0,013A) (**Khleifat, 2006 ; Agarry et al., 2008 ; Velluru et al.,2011 ; Sivasubramanian et Namasivayam 2015**).

Le flacon est incubé à 30°C sous agitation à 250 rpm pendant 24 heures. Des prélèvements sont effectués chaque 2 heures par le spectrophotomètre a une longueur d'onde 620 nm pour estimer la biomasse et à 760 nm pour la concentration du phénol résiduel à l'aide de la méthode de Folin-Ciocalteu (**Wilfred et Ralph, 2006**).

### 9.2. Étude de la dégradation en fonction de température

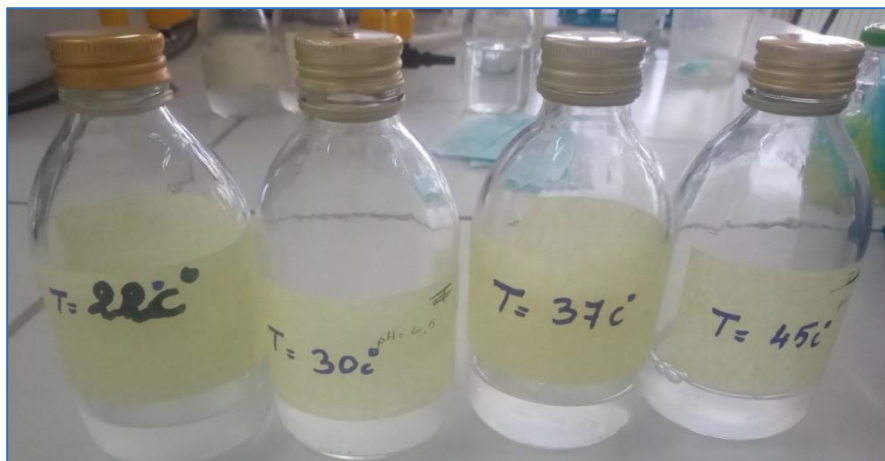
La température est un facteur important affectant les taux de dégradation. Elle est liée à la biodisponibilité et à la solubilité du substrat, l'étendue et le taux métabolique de dégradation microbienne. (**El-Naas et al., 2014; Margesin et Schinner, 2001; You et al., 2013**).

De plus, une température optimale est nécessaire pour que les enzymes clés de la biodégradation jouent un rôle dominant.

La température appropriée pour la biodégradation de la plupart des bactéries varie de 25 ° C à 37 ° C. Mais dans les températures les plus élevées ou plus les basses peuvent avoir des effets néfastes sur les enzymes responsables sur le clivage des noyaux aromatiques (**El-Naas et al., 2009; Levén et al., 2012**).

Pour étudier l'effet de la température sur la vitesse de dégradation, la souche SE1 été cultivé dans 45 ml de milieu minéral contenant 200 mg/l de phénol dans des différentes températures d'incubation (22, 30, 37, 47 C°) (**El-Naas et al., 2009 ; Lakshmi et Sridevi, 2009 ; Khazi et al., 2014**). En revanche la densité cellulaire à été fixé à (DO 620 nm 0,01A). D'autre coté le pH à été ajusté à 7 et ce qui concerne l'agitation seulement à température 30C° car la disponibilité d'un seul appareil de shaker. Tout fois notre expérience ont été effectué pour chaque une indépendamment de la détermination, de la biomasse bactérienne et le phénol résiduel.

Toujours, les prélèvements effectués chaque 2 heures suivant les mêmes étapes précédentes



**Figure15** : la culture minérale avec des différentes températures d'incubation (Original Lahreche et Zaghoudi)

### 9.3 Étude de la dégradation en fonction de concentration du phénol

La tolérance et la capacité d'enlèvement du phénol sont diverses de différentes bactéries. Ils sont des bactéries qui peuvent éliminer efficacement le phénol à une concentration varié de 100 à 1 500 mg / L. Parmi eux, *Rhodococcus sp.* Et *Oceanimonas sp.* Pourrait être considérée comme bactérie la plus efficace dans la dégradation de phénol, qui peut métaboliser les concentrations de phénol à 1500 mg/L (Wei et al., 2016; Tan et al., 2017). En outre, d'autres des souches telles que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter* et *Halomonas* peuvent dégradent également efficacement des concentrations élevées de phénol (Li et al., 2019)

Alors pour détermine la capacité de dégradation de SE1, elle à été cultivé dans 45ml de milieu minéral avec les concentrations suivantes (200, 500, 700, 1000) mg/l (Heinaru et al., 2005 ; Rivera et al., 2008 ; Firozjaee, et al., 2011 ; Aravindhhan et al., 2014), avec une densité cellulaire initial dans chaque flacon était constant (DO 620nm 0,01A).

Les flacons est incubé à 30°C sous agitation à 250 rpm pendant 24 heures et bien sûr le temps de prélèvement et lecture est constant (2heurs), 1ml de milieu mesuré à l'aide de spectrophotomètre à DO620nm pour déterminer l'augmentation de biomasse bactérienne dans chaque concentration avec le mélange aseptiquement des flacons pour l'homogénéisation (Doumandji et al., 2011). 1ml de milieu de culture a été centrifugé à 3500 rpm pendant 10min pour récupérer juste le surnageant dans des tubes à essai propres pour évaluer le phénol résiduel (fig19) et faire un dosage biochimique colorimétrique après mesuré l'absorbance à DO760nm (Shourian et al., 2009 ; Kylli, 2019 ; Mangwan et al., 2014).

#### 9.4. Étude de la dégradation en fonction de l'agitation

Lorsque l'agitation à un effet important d'homogénéisation de milieu et l'accélération de bioprocessuce de dégradation, la souche E1 mis en 45ml de culture minérale de pH 7 avec une concentration de phénol 200 mg/l et une densité cellulaire bactérienne initial (DO620nm 0,01).

Les deux flacons préparés ont été incubés à une température 37C°, l'un subit une agitation avec une vitesse de 250rpm, l'autre est laissé sans agitation pour étudier la différence entre eux. (Khleifat, 2006 ; Razika et al., 2010 ; Velluru et al., 2011).

### 9.5 Étude de la dégradation en fonction des cultures mixtes

Afin de déterminer la synergie bactérienne dans la dégradation de phénol de nos souches bactériennes isolées et l'effet de l'utilisation des deux souches bactériennes aptes à dégrader le phénol sur la rapidité du processus, les isolats (SE1, SED2, SE1+SED2) ont été cultivés dans 45 ml de milieu minéral et ont reçu la même concentration de phénol pour chaque culture, tandis que la densité cellulaire à t<sub>0</sub> est constante (DO<sub>620nm</sub> 0,01).

Ensuite les flacons ont été secoués à une vitesse constante de 250rpm et une température de 37C° ; la lecture est faite chaque 2 heures avec les mêmes étapes précédentes.

# **Partie 3**

## **Résultats et Discussion**

## I Étude de la cinétique de biodégradation de phénol

Nos résultats représentent le profil de biodégradation de phénol au cours du temps par une souche bactérienne capable d'assimiler le phénol comme seule source de carbone, et la vitesse de dégradation dépend étroitement de la concentration de phénol présent dans le milieu.

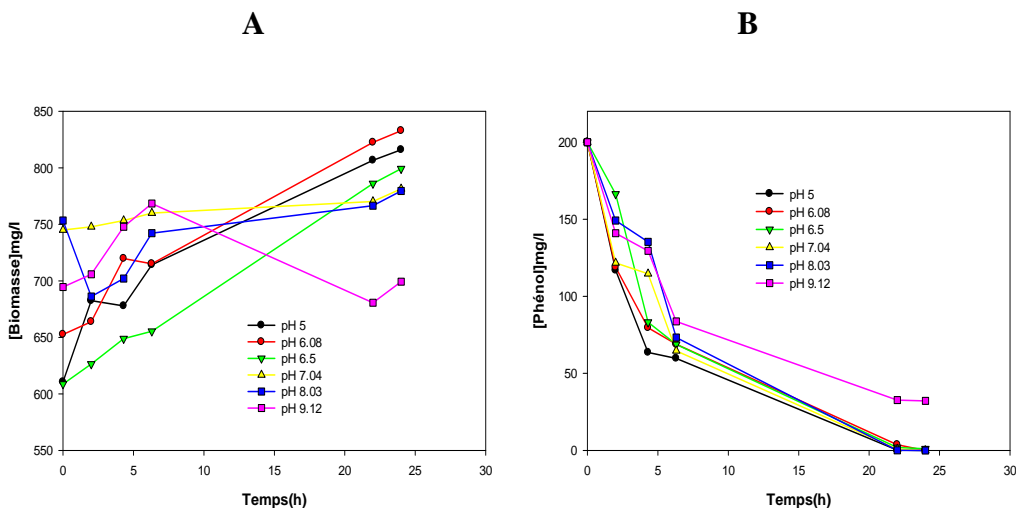
L'amélioration de la capacité des microorganismes adaptés au phénol à le biodégrader se manifeste par l'amélioration de la cinétique de croissance des cellules bactériennes.

Alors, la cinétique de biodégradation est plus rapide et le phénomène de biodégradation se déclenche immédiatement après la mise en culture des cellules adaptées, contrairement aux cellules non adaptées. (Shimp *et al.*,1987). Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature.

### I.1 Effet de pH

D'après la figure (16) qui représente le profil d'évolution de la concentration du phénol (200mg/l) résiduel et de l'augmentation de biomasse en fonction de temps, on remarque que le pH initial de milieu à un effet direct sur la vitesse de dégradation de phénol. Le taux de dégradation du phénol et la biomasse augmentent de manière significative au pH compris entre 6,08 et 8,03 ou la concentration de phénol du milieu est complètement épuisé pendant 24 heures de culture de la bactérie.

Aussi nous avons remarqué que la croissance et la vitesse de dégradation du phénol sont un peu lentes à 9,12 car le milieu est basique pour la souche bactérienne.



**Figure 16 :** Effet de pH sur la biodégradation de phénol ; (A) augmentation de la biomasse microbienne présentée par l'absorbance à (DO620nm), (B) évolution de phénol résiduel en fonction du temps.

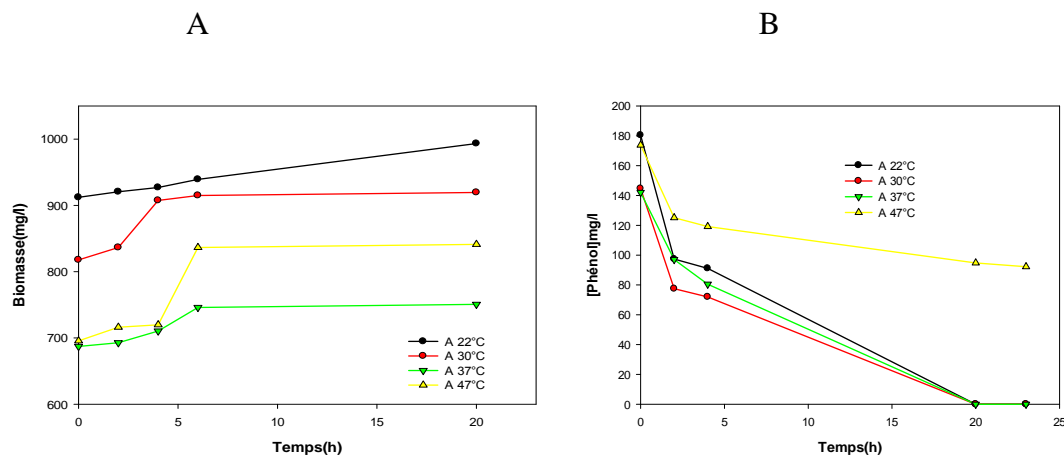
Un pH neutre compris entre 6,0 et 8,0 est approprié pour la plupart des souches bactériennes dégradant les phénols en raison de l'utilisation maximale de la source de carbone. La variation du pH peut affecter la croissance microbienne et l'activité enzymatique (Kuang *et al.*, 2013; Ucun *et al.*, 2010).

Aussi 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 chimique 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). Donc, le pH optimal pour l'activité de catéchol 2,3-dioxygénase est de 8,0 (Hupert Kocurek et al., 2012; Acikgoz et Ozcan, 2016).

## I.2 Effet de température

L'expérience de dégradation du phénol à température ambiante 22°C et à une température plus élevée de 30 ° C, ont été effectuées pour explorer l'effet de température sur la biodégradation en présence de 200mg/L de phénol par la souche SE1 cultivée.

La figure (17) montre la concentration de phénol résiduel et de l'augmentation de biomasse en fonction de temps à différentes température d'incubation (22, 30, 37, 47°C) Le phénol à était complètement biodégradé dans les différentes températures (22, 30, 37°C) entre 20 à 24 heures. Mais à 47°C, un grand ralentissement de dégradation de phénol à était remarquée. Ce qui concerne la croissance bactérienne il y'a une clair augmentation de biomasse pendant le temps avec une phase de latence d'un premier lieu courte entre 30 à 47°C, et d'autre long a 22°C.



**Figure 17:** Effet de température sur la biodégradation de phénol ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO620nm), (B) évolution de phénol résiduel en fonction du temps.

D'après les travaux de ( Paraskevi et al.,2005 ; Shourain et al.,2009 ;wenlai et al.,2012 ;Awa et al.,2013). Aussi Selon Khleifat(2006), El-Naas et al,(2008) et Li(2010), la température optimale de dégradation du phénol et de la croissance bactérienne est 37°C, qu'elle est nécessaire pour que les enzymes clés de la biodégradation jouent leur rôle dominant. Des températures plus élevées ou plus basses peuvent avoir des effets néfastes sur les enzymes responsables pour le clivage du cycle aromatique (El-Naas et al., 2009; Levén et al., 2012).

Par conséquent la température affecte les activités enzymatiques microbienne ainsi la voie métabolique et provoque la diminution de dégradation de phénol.

Cependant, certains rapports font référence à une plus grande efficacité de la biodégradation du phénol sous températures plus élevées. Par exemple, (Duan, 2011). La différence des caractéristiques des communautés microbiennes peuvent expliquer les différences dans les résultats de la littérature (Nuhoglu et al., 2005).

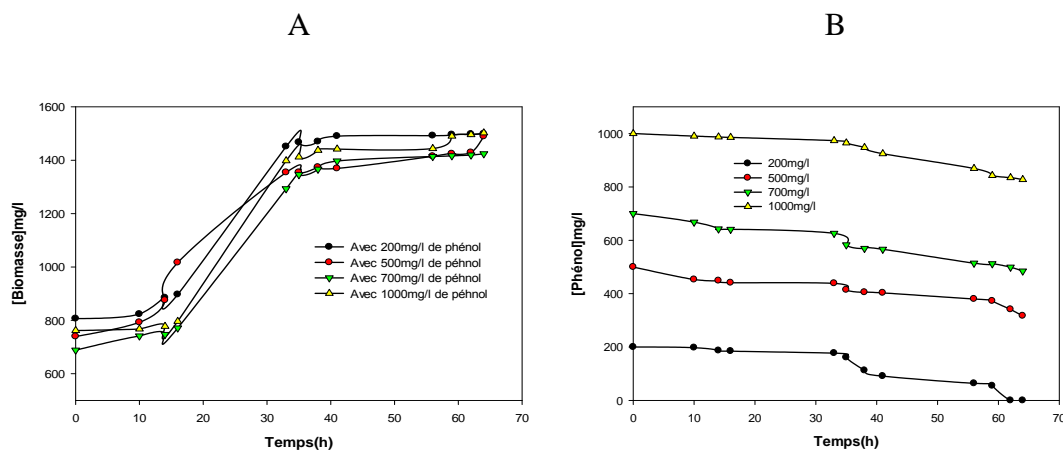
Ces résultats montrent que la souche SE'1 est une espèce mésophile qui prospère au mieux dans des conditions de température modérée. L'inhibition de la croissance totale de cette souche a eu lieu à 47°C, elle a été une influence néfaste sur la multiplication cellulaire.

### I.3 Effet de concentration de phénol

La figure (18) représente la cinétique de biodégradation de concentrations croissantes de phénol, 200, 500, 700 et 1000 mg/l à pH ~ 6 et conditions de température ambiante

Il existe une augmentation significative de biomasse jusqu'à 40 heures de culture. Pour la concentration de 200 mg/L, et une dégradation presque complète de phénol dans 60 heures.

Aux des concentrations supérieures à 200 mg/l, la biodégradation du phénol diminue avec une augmentation des concentrations initiales respectivement pour les concentrations de 500, 700 et 1000 mg/L pour une durée de temps entre 60 à 70heures ( Saravanan et al., 2008).



**Figure 18 :** Effet de concentration de phénol sur la cinétique de biodégradation ;( A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO620nm), (B) évolution de phénol résiduel en fonction de temps.

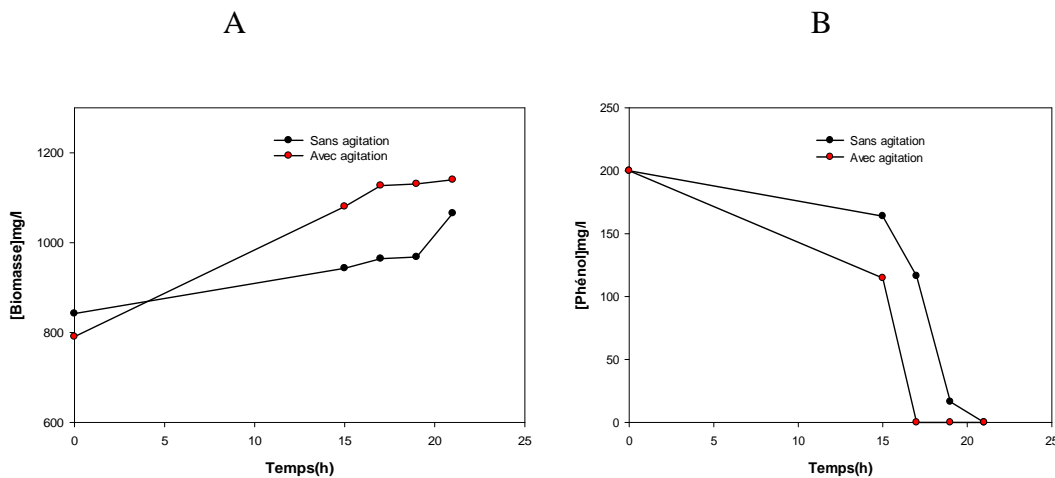
Le temps de dégradation observé dans cette étude est bien inférieur à celui rapporté dans la littérature jusqu'à présent. Par exemple,( Duan ,2011) a atteint presque dégradation complète du phénol avec une concentration initiale de 200 mg / L ; après 5 heures de dégradation, aussi (Hussain et coll ,2015), ont utilisé une boue acclimatée pour la biodégradation du phénol (mg / L) et atteint une dégradation complète seulement après 18 heures.

Ces résultats suggèrent que la concentration de phénol plus élevée plus de 400 mg/L de phénol (obtenu à l'aide du modèle cinétique) pourraient inhiber la biodégradation des micro-organismes non adaptées.

## I.4 Effet d'agitation

L'agitation agit sur l'homogénéisation du milieu de culture, la croissance en biomasse et le taux de dégradation du phénol par les bactéries en mode batch (discontinu).

D'après la figure (19), on constate qu'en absence d'agitation du milieu la bactérie dégrade difficilement le phénol en solution pendant 24 heures, cette dégradation s'accompagne avec une augmentation remarquable de biomasse. D'autre coté en présence d'agitation d'une vitesse de 250 rpm on observe une augmentation rapide de biomasse ce qui peut être expliqué par une rencontre rapide de l'enzyme avec leur substrat et une métabolisation aussi rapide de phénol par la souche SE1. (Khazi et al., 2011).



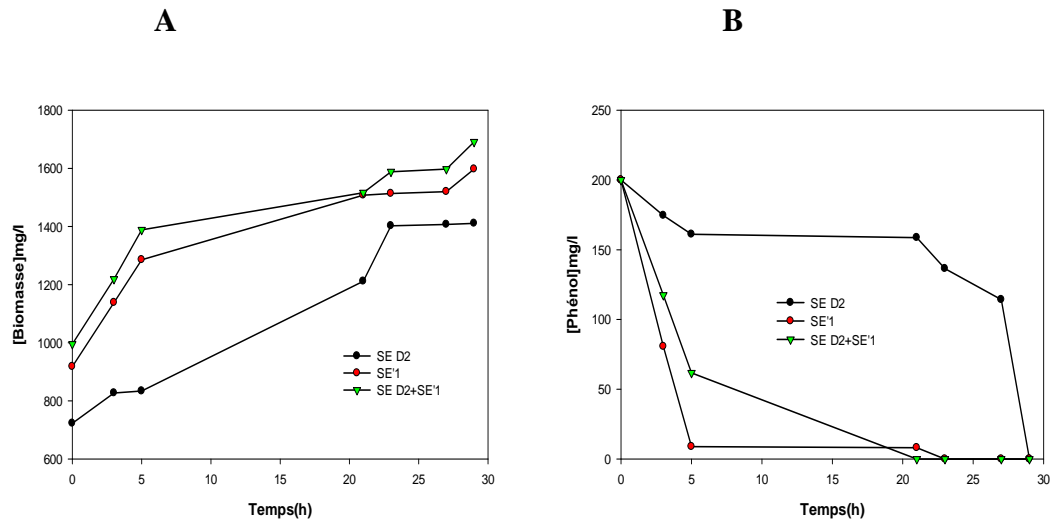
**Figure 19:** L'effet de l'agitation sur la biodégradation de phénol ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance (DO620nm), (B) l'évolution de phénol en fonction du temps.

La vitesse d'agitation affecte aussi la cinétique de biodégradation de phénol car elle assure l'homogénéisation du milieu et par conséquent l'augmentation de contact entre l'enzyme et le substrat. (Shourian et al., 2008) et (Kang 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 .

## I.5 Effet des cultures mixtes

La figure (20) donne une idée principale de l'effet des cultures mixtes sur la vitesse de biodégradation de phénol.

Une dégradation rapide et complète de phénol pour la souche SE1 et l'ensemble de culture (SE1+SE D2) ainsi qu'une augmentation maximale de biomasse, mais par rapport à la souche SED2 seul, la dégradation de phénol la croissance microbienne était trop lente à cause de leur faible capacité de biodégradation dans une concentration 200mg/l de phénol.



**Figure 20 :** effet de cultures mixtes sur la vitesse de dégradation de phénol ; (A) augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO620nm), (B) l'évolution de phénol résiduel aux fonctions de temps.

L'effet de la culture mixte montre que Cette biodégradation prend place après une période d'adaptation du microbiote au phénol, relativement courte. Cela pourrait s'expliquer par un synergisme présent entre les populations microbiennes. De plus, le sol, d'où provient l'inoculum, contient déjà des phénols. Certains échanges génétiques ou induction de système enzymatique pourraient être effectués et sont probablement responsables de l'adaptation rapide au phénol.

Notre souche SE1 isolée à partir du sol contaminé par les dérivés pétroliers est une souche bactérienne tolérante au phénol puisqu'il a la capacité de dégrader des concentrations relativement élevées de ce polluant à des conditions physicochimique étudiée. Ce phénomène de biodégradation est lié principalement aux propriétés physiologiques et un système enzymatique approprié, grâce aux enzymes phénol-hydroxylase et Catéchol dioxygénase, le phénol à était assimilé par la bactérie sous forme de biomasse et d'énergie. La première réaction dans la voie oxydative de la biodégradation du phénol est l'hydroxylation en catéchol. L'étape suivante est le clivage du cycle benzénique de la liaison 1,2, appelé voie-ortho ou clivage de 2,3 liaisons, c'est-à-dire voie-méta (Ailijiang N et al., 2016).

# *Conclusion générale*

Le fourrage de la zone de Hassi Messaoud constitue un milieu naturel pour l'isolement des bactéries capables de dégrader les polluants organiques tels que les phénols.

Ce travail nous a permis d'explorer et d'avoir une meilleure connaissance sur la diversité des bactéries impliqués dans la dégradation du phénol dans un sol pollué par des dérivés pétroliers aux cours du temps, et en fonction de différents facteurs environnementaux comme la concentrations en substrat phénolique, la disponibilité en nutriments, température, PH du milieu, etc.

La souche isolée prouve leur grande capacité à utiliser le phénol comme élément nutritionnel et source d'énergie pour la croissance bactérienne, ils permettent également d'envisager avec plus d'optimisme, l'atteindre de l'objectif d'une dégradation complète et rapide. D'un point de vue plus appliqué, les résultats que nous avons obtenus à partir de l'étude de la cinétique ainsi que les différents facteurs qui influencent sur l'efficacité de la dégradation pourraient permettre de développer et d'améliorer le potentiel d'élimination des polluants par les microorganismes qui existe naturellement dans l'endroit pollué, et les appliqués comme un moyen important par lequel les substances nocives sont éliminées ou bien transformés en sous-produits moins toxiques et par conséquent en réduisant la pollution de l'environnement.

Afin de déterminer le genre et l'espèce bactérienne et de compléter cette étude, il serait envisageable d'identifier à l'échelle moléculaire par la méthode de PCR (ARN16s).

*Références*  
*Bibliographiques*

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Agarry, S.E., Solomon, B.O., 2008.** Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas* fluorescence. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 5, 223–232.
- ✚ **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
- ✚ **Ahmadi, M., Jorfi, S., Kujlu, R., Ghafari, S., Soltani, R.D.C., Haghifard, N.J., 2017b.** A novel salt-tolerant bacterial consortium for biodegradation of saline and recalcitrant petrochemical wastewater. *J. Environ. Manag.* 191, 198–208.
- ✚ **Ailijiang N, Chang J, Liang P, Li P, Wu Q, Zhang X, Huang X (2016).** Electrical stimulation on biodegradation of phenol and responses of microbial communities in conductive carriers supported biofilms of the bioelectrochemical reactor. *Bioresour Technol* 201:1– 7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech>
- ✚ **Al-Khalid, T., El-Naas, M.H., 2012.** Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42, 1631–1690.
- ✚ **Amrouche, F., Namane, A., Hellal, A., 2011.** Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones librement suspendus dans un réacteur batch. *Rev. Energ. Renouvelables* 14, 533–541.
- ✚ **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.*
- ✚ **Arinjay Kumar<sup>1</sup>, Shashi Kumar, Surendra Kumar.,2005.** Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal* 22 151–159
- ✚ **Bakas, I., Elatmani, K., Qourzal, S., Barka, N., Assabbane, A., Aît-Ichou, I., 2014.** A comparative adsorption for the removal of p-cresol from aqueous solution onto granular activated charcoal and granular activated alumina. *J. Mater. Env. Sci.* 5, 675–682.
- ✚ **Balba M.T., Al-Awadhi N. et Al-Daher R. (1998).** Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods.* 32 : 155–164.
- ✚ **Bandyopadhyay, D. Das, B.R. Maiti. (1998):** Kinetics of phenol degradation using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Springer-Verlag. Bioprocess Engineering* 18 373 – 377.

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Bared Razika., Boucheta Abbes., Chaib Messaoud., Kacimi Soufi., 2010.** Phenol and Benzoic Acid Degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Water Resource and Protection pp 788-791.
- ✚ **Barkat, H., et Kired, O. (2015).** Etude cinétique de la dégradation du phénol par *Bacillus sp.* I2 isolée à partir du sol contaminé par les dérivés du pétrole. Mémoire de master. Université Amar Thelidji-Laghouat, p42.
- ✚ **Barrios-Martinez, A., Barbot, E., Marrot, B., Moulin, P., Roche, N., 2006.** Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. J. Membr. Sci. 281, 288–296. doi:10.1016/j.memsci.2006.03.048.
- ✚ **Barriuso E., Calvet R., Schiavon M & Soulas G., 1996.** Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformation et dissipation. Forum le sol, un patrimoine menacé Paris (France), 279-292.
- ✚ **Basha, K.M., Rajendran, A., Thangavelu, V., 2010.** Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. Asian J. Exp. Biol. Sci. 1, 219–234.
- ✚ **Beadle, C.A., Smith, A.R.W., 1982.** The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of *Acinetobacter* species. Eur. J. Biochem. 123, 323–332. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb19771.x.
- ✚ **Beens J. et Brinkman U.A.T. (2000).** The role of gas chromatography in compositional analyses in the petroleum industry. *TrAC. Trends in Analytical Chemistry*. 19:260– 275.
- ✚ **Benchouk A and Chibani A. (2017).** Petroleum-hydrocarbons biodegradation by *pseudomonas* strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil. J. Fundam. Appl. Sci., 2017, 9(2), 713-726.
- ✚ **Bertrand J.C. et Mille G. (1989).** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les Hydrocarbures. Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Bianchi M., Marty D., Bertrand J.C., Caumette P., Gauthier M.J. et al.éds. Masson publ., Paris: 343-385.
- ✚ **Beta, T., Nam, s., Dexter, J.E., et Sapirstein, H.D., 2005.** Phenolic content and antioxydants Activity of Pearled wheat and Roller-Milled. Fractions. Cereal chem.82 (4), Pp 390- 393.
- ✚ **Bidaud, C. (1998).** Biodégradations des hydrocarbures aromatiques polycyclic Approche Microbiologique et Application au traitement d'un sol pollué. Thèse de doctorat.Génie des procédés, Ecole nationale superieur des mines de sait-etienne-France,p229.
- ✚ **Blifert., et Perraud. (2004).** Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchet. De Boeck université, P396, 372-375.

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Bogan B.W., Lamar R.T., 1995**, Appl. Environ. Microbiol.: One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. Vol.61, n07, 2631-2635.
- ✚ **Bonneau M., Souchier B., 1994**, Masson, Paris, "Pédologie. 2 - Constituants et propriétés du sol ", 2ème édition
- ✚ **Bousseboua H., 2002**. Microbiologie générale. Ed. Université Mentouri Constantine, P. 240.
- ✚ **Breinig, S., Schiltz, E., Fuchs, G., 2000**. Genes involved in anaerobic metabolism of phenol in the bacterium *Thauera aromatica*. J. Bacteriol. 182, 5849–5863.
- ✚ **Brijesh, K., Yadav, Shristi R. Shrestha and S. Majid Hassanizadeh, 2012**. Biodegradation of Toluene Under Seasonal and Diurnal Fluctuations of Soil-Water Temperature. Water Air Soil Pollut., 223: 3579-3588.
- ✚ **Brooijmans R.J.W., Pastink M.I. et Siezen R.J. (2009)**. Hydrocarbon-degrading bacteria: The oil-spill clean-up crew. *Microbial biotechnology*. 2(6): 587–594. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00151.x
- ✚ **Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C., Arrighi, L., 2008**. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments. J. Hazard. Mater. 160, 265– 288. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.03.045.
- ✚ **Calabrese, E.J., Kenyon, E., 1991**. Air Toxics and Risk Assessment. CRC Press.
- ✚ **Calvet R., 2000**. Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France Agricole. Paris (France), 83-90
- ✚ **Capasso, R., 1997**. The chemistry, biotechnology, and ecotoxicology of the polyphenols naturally occurring in vegetable wastes. Curr. Top. Phytochem. 1, 145–156.
- ✚ **Cedre. (2012)**. Gouriou V analyse réglementaire de l'alerte et de la gestion des crises liées aux déversements accidentels d'hydrocarbures dans les eaux continentales et estuariennes en Europe". Technical Report.
- ✚ **Chandana Lakshmi, M.V.V., Sridevi, V., 2009**. A review on biodegradation of phenol from industrial effluents. J. Ind. Pollut. Control 25, 13–27.
- ✚ **Chang, J.S., Chang, C.Y., Chen, A.C., Erdei, L., Vigneswaran, S., 2006**. Long-term operation of submerged membrane bioreactor for the treatment of high strength acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS) wastewater: effect of hydraulic retention time. Desalination 191 (1–3), 45–51.

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Chassin P., Baize D., Cambier Ph. & Sterckeman T., 1996.** Les éléments traces métalliques et la qualité des sols : impact à moyen et à long terme. Forum « le sol un patrimoine menacé ? ». Paris (France), 297-303.
- ✚ **Chikere Chioma Blaise, Gideon Chijioke Okpokwasili and Blaise Ositadinma Chikere, 2011.** Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. 3 Biotech., 1: 117-138.
- ✚ **Chu W., Kwan C. Y., Chan K. H. & Kam S. R., 2005.** Kinetics modeling and reaction pathway of 2, 4-dichlorophenol transformation by photo-fenton-like oxydation. *Journal of Hazardous Materials*, **121**: 119-126.
- ✚ **CHU.W.AND.C.Y.KWAN , 2003** .remediation of contaminated soil by a solvent , surfactant system chemosphere , vol. 53.pp.9-15.
- ✚ **Costes J.M., Druelle V., (1997).** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : la réhabilitation des anciens sites industriels, *Revue de l'institut Français du Pétrole*, Vol. 52, No. 4, P.425-440.
- ✚ **Daffri Amel., Harzallah Besma., et Bousseboua Hacène., 2014.** Biodegradation of High Concentration of *p*-Nitrophenol (PNP) by Wastewater Microflora, *Journal of Agricultural Science and Technology A* 4 .P .300-306.
- ✚ **Danne, L., Harjono, I., Zylstra, G.j., Haggblom., M.M. (2001).** Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plant.*App.Environ.Mirobiol*,V67, p2683-2691.
- ✚ **De Lestrangé C., Paillard C.A. et Zelenko P. (2005).** Géopolitique du pétrole: un nouveau marché, de nouveaux risques, des nouveaux mondes. Éditions Technip, Paris. Pages : 233.
- ✚ **Divari, S., Valetti, F., Caposio, P., Pessione, E., Cavaletto, M., Griva, E., Gribaudo, G., Gilardi, G., Giunta, C , 2003.** The oxygenase component of phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* S13. *Eur. J. Biochem.* 270, 2244–2253. doi:10.1046/j.1432- 1033.2003.03592.x.
- ✚ **Djoumandji. A, Boutekrabt. L, Saidi. N, Dhoumandji. S, Hamerouch. D et Haouari. S., 2011.** Etude de l'impact de l'incorporation de la spiruline sur les propriétés nutritionnelles, technologiques de couscous artisanal. *Revue Nature & Technologie* 41, N° 6, p40-50.
- ✚ **Dobbins, D.C., Thornton-Manning J., Jones D.D. & Federle T.W., 1987.** Mineralization potential for phenol in subsurface soils. *Journal of Environmental Quality*, 16: 54–58.

## Références bibliographiques

---

- ✚ El-Naas, M., Al-Muhtaseb, S.A., Makhoulf, S., 2009. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *J. Hazard Mater.* 164, 720–725.
- ✚ El-Naas, M.H., Acio, J.A., El Telib, A.E., 2014. Aerobic biodegradation of BTEX: progresses and prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2 (2), 1104–1122
- ✚ Eppink, M.H., Cammaart, E., van Wassenaar, D., Middelhoven, W.J., van Berkel, W.J., 2000. Purification and properties of hydroquinone hydroxylase, a FAD-dependent monooxygenase involved in the catabolism of 4-hydroxybenzoate in *Candida parapsilosis* CBS604. *FEBS J.* 267, 6832–6848.
- ✚ Escobar M., Márquez G., Azuaje V., Da Silva A., Tocco R. (2012). Use of biomarkers, porphyrins, and trace elements to assess the origin, maturity, biodegradation, and migration of Alturitas oils in Venezuela. *Fuel* . 97: 186-196.
- ✚ Eshighi Malayri B., (1995). Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de plantes et de microorganismes. Thèse de Doctorat. Université de Nancy1 (France).
- ✚ F. Amrouche, A. Namane et A. Hellal ., 23 Mai 2016. Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones librement suspendus dans un réacteur batch. *Revue des Energies Renouvelables Vol. 14 N°3 (2011) 533 – 541*
- ✚ Faby J.A et Brissaud F, 1997. L'utilisation des eaux usées épurées en irrigation. Office International de l'Eau, 76 p.
- ✚ Fang, H.H.P., Liang, D.W., Zhang, T., Liu, Y., 2006. Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. *Water Res.* 40, 427–434. doi:10.1016/j.watres.2005.11.025.
- ✚ Farhadian, D. Duchez, C. Vachelard, C. Larroche ,2008. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors—A review, *Water Res.*, 42, 1325 – 1341.
- ✚ Fawell John et Nieuwenhuijsen Mark J. (2003 ). Impact of environmental pollution on health: balancing risk : Contaminants in drinking water. *British Medical Bulletin.* 68:199–208
- ✚ Fdil F. 2004. Etude de la biodégradation des herbicides chlorophenoxy alcanoïques par des procédés photochimiques et électrochimiques, applications environnementales. Thèse de Doctorat. Université de Marne-La-Vallée (France).
- ✚ Ferrer-Polonio, E., García-Quijano, N.T., Mendoza-Roca, J.A., Iborra-Clar, A., PastorAlcañiz, L., 2016b. Effect of alternating anaerobic and aerobic phases on the

## Références bibliographiques

---

- performance of a SBR treating effluents with high salinity and phenols concentration. *Biochem. Eng. J.* 113, 57–65.
- ✚ **Ferro-García, J. Rivera-Utrilla, J. Rodríguez-Gordillo and I. Bautista-Toledo, 1988** Adsorption of zinc, cadmium, and copper on activated carbons obtained from agricultural byproducts, *Carbon*, 26, 363–373.
  - ✚ **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, P68-73.
  - ✚ **Gaamoune sofiane. (2010) :** Le role des biofilms d'algues dans les traitements des Eaux. Mémoire de master, **Université Farhat Abbas-Setif**.p96.
  - ✚ **Gabet S. (2004).** Remobilisation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'université de Limoges. Pages : 177.
  - ✚ **Gautier Céline. (2007).** Biodégradation Des Hydrocarbures En Milieu Poreux Insaturé. Thèse de Doctorat de l'université de Pau Et Des Pays De L'ADOUR Institut Français Du Pétrole. Pages : 248.
  - ✚ **Goldstein Bernard D. (2002).** *Encyclopedia of Public Health*. Ed. Lester Breslow. New York, macmillan Reference USA, 4:936 – 941
  - ✚ **Goudar, C.T., Ganji, S.H., Pujar, B.G., Strevett, K.A., 2000.** Substrate inhibition kinetics of phenol biodegradation. *Water Environ. Res.* 72, 50–55.
  - ✚ **Goyal, A.K., Zylstra, G.J. (1997).** Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni J.Indus. Microbiol. Biotechnol*, V19,P401-407.
  - ✚ **GOYER S, 1995.** techniques de restauration de sites contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). 1-procédés physiques, physicochimiques et thermiques, vecteur Environnement, vol.8, n°1, pp.57-68.
  - ✚ **Grekova-Vasileva, M., Topalova, Y., 2009.** Enzyme activities and shifts in microbial populations associated with activated sludge treatment of textile effluents. *Biotechnol. Equip.* 23, 1136–1142. doi:10.1080/13102818.2009.10817628.
  - ✚ **Haborne, J.B. 1980.** Plant phenolics in *Encyclopedia of plant physiology*, vol 8, Bell EA, Charlwood BV, eds Springer-Verlag, Berlin; Pp 329-402. In: Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Macheix, J.J., Fleriet, A., and Christian, A. 2005.

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Hamdi, B., et Rezzoug, A. (2015).** Isolement et identification des bactéries à partir d'un site contaminé par les dérivées pétroliers. Mémoire de mater. Université Amar Thelidji-Laghouat, p46.
- ✚ **Hanson, G., Berliner, L., 2009.** High Resolution EPR: Applications to Metalloenzymes and Metals in Medicine. Springer Science & Business Media.
- ✚ **Hao Li, Fanping Meng, Weiyang Duan, Yufei Lin, Yang Zheng., 2019):** Biodegradation of phenol in saline or hypersaline environments by bacteria:A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.P :9 : 0147-6513.
- ✚ **Harayama Shigeaki, Kishira Hideo, Kasai Yuki et Shutsubo Kazuaki.(1999).** Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* 1(1): 63-70.
- ✚ **Haritash, A.K. et Kaushik, C.P.(2009).** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Mterials*, V169,p1-15.
- ✚ **Hasanoğlu, A., 2013.** Removal of phenol from wastewaters using membrane contactors: comparative experimental analysis of emulsion pertraction. *Desalination* 309, 171–180.
- ✚ **Hassan. S. A et Jabeen. S., 2015.** Degradation Kinitics and pathway of phenol by *Pseudomonas and Bacilus* species. Article *Biodegradation & Biotechnological Equipment*, Vol. 29, N°1, P45.53.
- ✚ **Heinaru. E, Merike. M, Signe. V, Merit. La. Ivo. L, Trunu. J et Heinaru. A., 2005.** Biodegradation efficiency pf functionally imprtant populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. *FEM Microbiology Ecology* N°51,P 363-373.
- ✚ **Heitkamp, M.A., Franklin, W., Cerniglia, C.E. (1988).** Microbiolmetabolic of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl.Environ.Microbiol*, V54,p2549-2555.
- ✚ **Heitkamp, M.A., Freeman, J.P., Miller, D.W., Cerniglia, C.E., (1988).** Pyrene degradation by a Mycobacterium identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ.Mircobiol*, V54,P2556-2565.
- ✚ **Herbert, R.B. 1989.** The Biosynthesis of secondary metabolites. 2éme edition Chapman and Halle p 2, 11-115.
- ✚ <https://www.futura-sciences.com/planete/questions-reponses/pollution-effets-environnementaux-pollution-1386/>
- ✚ **Institut National de l'Environnement Industriel et des risques (INERIS), 2005.** Phénol: Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Institut National de l'EnviRonnement Industriel et des riSques (INERIS ),2005.** “ Phénol Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques–DRC01-25590-01DR021. N°2-1 , 1-47.
- ✚ **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), 2004.** Crésols: Fiche Toxicologique N° 97.
- ✚ **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), 2011.** Phénol: Fiche Toxicologique N° 15
- ✚ **Itab, 2002.** Activités biologique et fertilité du sol, P .23.
- ✚ **Jansson JK, Hjort K, Lembke A, Speksnijder A, Smalla K (2007).** Community structure of actively growing bacterial populations in plant pathogen suppressive soil. *Microbial Ecol.* 53: 399-413.
- ✚ **Jayson, T.A. Lawless and D. Fairhurst,1982.** The adsorption of organic and inorganic phosphates onto a new activated carbon adsorbent , *J. Colloid Interface Sci.*, 397-410.
- ✚ **Jeannot, R. (2001).** Guide méthodologique pour l’analyse des sols pollués, édition BRGM-France.
- ✚ **Jeon CO, Park M, Ro HS, Park W, Madsen EL (2006).** The naphthalene catabolic (nag) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: Evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. *Appl Environ Microbiol* 72: 1086-1095.
- ✚ **Jiang, B., Shi, S., Song, L., Tan, L., Li, M., Liu, J., Xue, L., 2016a.** Efficient treatment of phenolic wastewater with high salinity using a novel integrated system of magnetically immobilized cells coupling with electrodes. *Bioresour. Technol.* 218, 108–114.
- ✚ **Jiang, B., Tan, L., Ning, S., Shi, S., 2016c.** A novel integration system of magnetically immobilized cells and a pair of graphite plate-stainless iron mesh electrodes for the bioremediation of coking wastewater. *Bioresour. Technol.* 216, 684–690.
- ✚ **Jiang, Y., Wei, L., Zhang, H., Yang, K., Wang, H., 2016b.** Removal performance and microbial communities in a sequencing batch reactor treating hypersaline phenolladen wastewater. *Bioresour. Technol.* 218, 146–152.
- ✚ **Kankou Mohamed Ould Sid Ahmed., 2004.** Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mautitanie-Etude en laboratoire du comportement de deux pesticides. Thèse Doctorat. Université de Limoges (France).
- ✚ **Kästner, M., Breuer-jammali, M., Mahro, B. (1994).** Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol*, P41: 267-273.

## Références bibliographiques

---

- ✚ Khan, A.A., Wang, R.F., Cao, W.W., Doerge, D.R., Wennerstrom, D., Cerniglia, C.E. (2001). Molecular cloning nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium sp.* Strain PYR-1. *Appl. Environ Microbiol*, p67: 3577-3585.
- ✚ KHAN, F., HUSAIN, T., HEJAZI, R, 2004. an overview and analysis of site remediation technology journal of Environment Management, vol. 71, pp,95.122.
- ✚ Khazi. M. Aravindan, R., 2010. Recent advances in the biodegradation of phenol: A review. *ASIAN J. EXP. BIOL.SCI.*, N°2, p219-234.
- ✚ KHODADOUST, A., RAJESH, BAGHVHI, SUIDAN, RICHARD, BRENNER AND NEAL G. SELLERS, 2004. effet of NAPL entrapment conditions on air sparging remediation efficiency. *Journal of Hazardous materials*, vol. 110, pp, 173.183.
- ✚ Kim, S.J., Kweon, O., Freeman, J.P., Jones, R.C., Adjei, M.D., Jhoon, J.W., Edmondson, R.D., Cerniglia, C.E. (2006). Molecular Cloning and Expression of Genes Encoding a Novel Dioxygenase Involved in Low- and High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, p72: 1045-1054.
- ✚ Kita, A., Kita, S., Fujisawa, I., Inaka, K., Ishida, T., Horiike, K., Nozaki, M., Miki, K., 1999. An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure* 7, 25–34. doi:10.1016/S0969-2126(99)80006-9.
- ✚ Klein, J.A.; Lee, D.D. (1978). : Biological treatment of aqueous wastes from usual conversion processes, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 8 379–390
- ✚ Kolar L., Ledvina R., Ticha J., and Hanus F. (1975). Contamination of soil, agricultural crops, and vegetables by 3,4-benzopyrene in the vicinity of Ceske Budejovice. *Cesk. Hyg.* 20(3): 139.
- ✚ Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J.C., Jouanneau Y. (2003). Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium sp.* Strain 6PYI: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenase. *J. Bacteriol.*, p185: 3828-3841.
- ✚ Kuang, Y., Zhou, Y., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R., 2013. Impact of Fe and Ni/Fe nanoparticles on biodegradation of phenol by the strain *Bacillus fusiformis* (BFN) at various pH values. *Bioresour. Technol.* 136, 588–594.
- ✚ Kumar, S.S., Kumar, M.S., Siddavattam, D., Karegoudar, T.B., 2012. Generation of continuous packed bed reactor with PVA-alginate blend immobilized *Ochrobactrum sp.*

## Références bibliographiques

---

- DGVK1 cells for effective removal of N, N-dimethylformamide from industrial effluents. *J. Hazard Mater.* 199, 58–63.
- + **Kumaran, P., Paruchuri, Y.L., 1997.** Kinetics of phenol biotransformation. *Water Res.* 31, 11–22.
  - + **Kveseth K., Sortland B. et Stobet M.B. (1981).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in leafy vegetables, a comparison of the Nordic results. Nordic PAH-project. Report no. 8. Central Inst. for Industrial Research, Oslo, Norway.
  - + **Kylli.P.,2011.** Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties. **Academic Dissertation, Unoversité de Helsinki, P90.62.**
  - + **Lack, A., Fuchs, G., 1992.** Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism. *J. Bacteriol.* 174, 3629–3636.
  - + **Lack, A., Fuchs, G., 1994.** Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.* 161, 132–139. doi:10.1007/BF00276473.
  - + **Lakshmi. C, Sridevi. V.,2009.** Effect of ph and inoculums size on phenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa* (Ncim 2074). *Int. J. Chem. Sci.* Vol.7, N°4, P 2246.2252.
  - + **Lalanne F. 2006.** Etude des potentialités du lavage biologique pour le traitement d'un mélange complexe de composés volatils. Thèse de Doctorat. L'université de Pau et des Pays de l'Adour (France).
  - + **Lansing. M, Prescott. L, Klein. M, Sherwood. C, Woolverton., 2010.**
  - + **Larkin, M.J., Allen, C.R., Kulakov, L.A, Lipscomb, D.A. (1999).** Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. Strain NCILB12038.*J.Bacteriol*, p181: 6200-6204.
  - + **Lazarova V ; Gaid A ; Rodriguez-Gonzales J ; Alday Ansola J, (2003).** L'intérêt de la réutilisation des eaux usées : analyses d'exemples mondiaux. *Techniques, Sciences et Méthodes*, N 9, p 64-85.
  - + **Lazarova V,(1999).** (CIRSEE - Lyonnaise des Eaux), « Rôle de réutilisation des eaux usées pour la gestion des ressources: coûts, bénéfices et déficits technologiques » ; « L'eau, l'industrie, les nuisances », n°227, pp.47-57, août.
  - + **Lazrak, A., Mandi, L., Djani, T.N., Neffa, M., Ouazzani, N., 2018.** Assessing biomass diversity and performance of an activated sludge process treating saline table olive processing wastewater. *Environ. Technol.* 1–12.
  - + **Le-Clech, P., Chen, V., Fane, T.A., 2006.** Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *J. Membr. Sci.* 284 (1–2), 17–53

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Lefebvre Gilles., (1978).** Chimie des hydrocarbures. Cours de l'Ecole Nationale Supérieure du Pétrole et des Moteurs. *Edition Technip, Paris*. P. 13-60
- ✚ **Levén, L., Nyberg, K., Schnürer, A., 2012.** Conversion of phenols during anaerobic digestion of organic solid waste—a review of important microorganisms and impact of temperature. *J. Environ. Manag.* 95, 99–103.
- ✚ **Li, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Mei, R., Zhang, Y., Hashmi, M., Lim, H., Su, X., 2018.** A new approach of Rpf addition to explore bacterial consortium for enhanced phenol degradation under high salinity conditions. *Curr. Microbiol.* 75, 1046–1054.
- ✚ **Lipińska Aneta, Jan Kucharski and Jadwiga Wyszowska, 2014.** Activity of Arylsulphatase in Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Water Air Soil Pollut.* DOI 10.1007/s11270-014-2097-4. 225: 2097.
- ✚ **Liu, J., Shi, S., Ji, X., Jiang, B., Xue, L., Li, M., Tan, L., 2017.** Performance and microbial community dynamics of electricity-assisted sequencing batch reactor (SBR) for treatment of saline petrochemical wastewater. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 24 (21), 17556–17565.
- ✚ **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,P1364-5072.
- ✚ **Marchal N., j.l. Bourdon., cl. Richard., 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 4 ème édition, p 32, 39, 264, 293, 294, 269, 270, 261, 262, 263, 265, 266, 230, 117, 118, 104, 105.
- ✚ **Margesin, R., Schinner, F., 2001.** Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (5–6), 650–663
- ✚ **Melo, J.S., Kholi, S., Patwardhan, A.W., D'Souza, S.F., 2005.** Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. *Process. Biochem.* 40, 625–628. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.02.
- ✚ **Mérian E., 1991.** Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance. Wiley-VCH, Weinheim (Allemagne).
- ✚ **Meyer Alphones., Deiana. J, Bernard. A., 2004.** Cours de microbiologie générale ; 2 ème édition ; p 118.
- ✚ **Microbiologie 3 ème édition ; p 113.**

## Références bibliographiques

---

- # **Moussavi, G., Barikbin, B., Mahmoudi, M., 2010.** The removal of high concentrations of phenol from saline wastewater using aerobic granular SBR. *Chem. Eng. J.* 158 (3), 498–504
- # **Nair, C.I., Jayachandran, K., Shashidhar, S., 2008.** Biodegradation of phenol. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 4951–4958.
- # **National Research Council. 2002.** Oil in the Sea III: Inputs, Fates and Effects. National Academy of Sciences Washington DC.
- # **Nowee, S.M., Taherian, M., Salimi, M., Mousavi, S.M., 2017.** Modeling and simulation of phenol removal from wastewater using a membrane contactor as a bioreactor. *Appl. Math. Model.* 42, 300–314.
- # **Nuhoglu, A., Yalcin, B., 2005.** Modelling of phenol removal in a batch reactor, *Process Biochem* 40:1233–1239, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.003>.
- # **Olujimi, O.O., Fatoki, O.S., Odendaal, J.P., Okonkwo, J.O., 2010.** Endocrine disrupting chemicals (phenol and phthalates) in the South African environment : a need for more monitoring : review. *Water SA* 36, 671–682.
- # **P. Saravanan, K. Pakshirajan and P. Saha., 2008.** ‘Growth Kinetics of an Indigenous Mixed Microbial Consortium during Phenol Degradation in a Batch Reactor’, *Journal of Bioresource Technology*, Vol. 99, N°1, pp. 205 - 209.
- # **Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A., Wackett, L.P., 2002.** Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4699–4709. doi:10.1128/AEM.68.10.4699-4709.2002.
- # **Paraskevi, N., Polymenakou, G., Euripides, F. et Stephanou, G., 2005,** effect of temperature and additional carbon source on phenol degradation by an indigenous soil pseudomonas .
- # **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 Technologie, Rourkela Odisha, India, P50.56.59.58.
- # **Perfumo A., Ann . Smyth. T.J.P., Marchant R. et Banat, I. M., 2010.** Production and roles of biodegradation and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1501-1512.
- # **PETERS, C , A., LUTHY, R.G. COAL, 1993 .** tar dissolution in water-miscible solvents experimental evaluation, *Environment science and technology*, vol. 27. pp.2831-2843.

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Piedrafito. C et Victoria. M., 2007.** La pollution ponctuelle des sols : Le cas des stations-sérvices dans la Région de Bruxelles-Capitale. Etude spécialisées en Gestion de l'Environnement. **Université Libre de Bruxelles, P17.18.19.20.**
- ✚ **Praveen, P., Loh, K.C., 2016.** Osmotic membrane bioreactor for phenol biodegradation under continuous operation. *J. Hazard Mater.* 305, 115–122
- ✚ **Praveen, P., Nguyen, D.T.T., Loh, K.C., 2015.** Biodegradation of phenol from saline wastewater using forward osmotic hollow fiber membrane bioreactor coupled chemostat. *Biochem. Eng. J.* 94, 125–133.
- ✚ **R.J. Shimp and F.K. Pfaender., 1987.** 'Effect of Adaptation to Phenol on Biodegradation of Monosubstituted Phenols by Aquatic Microbial Communities', *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, N°7, pp. 1496 - 1499, 1987.
- ✚ **Rahman K.S.M., Rahman T.J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R. et Banat I.M. (2003).** Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology.* 90(2) : 159–168.
- ✚ **Ramos, C., Suárez-Ojeda, M.E., Carrera, J., 2015.** Long-term impact of salinity on the performance and microbial population of an aerobic granular reactor treating a highstrength aromatic wastewater. *Bioresour. Technol.* 198, 844–851.
- ✚ **REZZOUG Asmaa, GOUZI Hichama, BENACEUR Farouk, MESSAHLI Ilhama ,ROUARI Lindaa., (2019).** Etude de l'Effet D'agitation et D'oxygène sur la Biodégradation de phénol "in vitro" par *Bacillus sp* isolée à partir des sols pollués. Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Amar Telidji 03000 Laghouat
- ✚ **Rivera. C, Guez. V, Roux. G, Vilanova. W et Eng. C., 2008.** Modélisation de la cinétique de biodegradation de phénol par granules aérobie. *Can. J. Chem* N° 86, P15.22.2008.
- ✚ **Romine, M.F., Stillwell, L.C., Wong, K.K., Thurston, S.J., Sick, E.C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J.K., Saffer, J.(1999).** Complete sequence of a 184-Kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199; *J.Bacteriol* ,P181:1585-1602
- ✚ **Saito, A., Iwabuchi, T., Haarayama. (2000).** A novel phenanthrenen dioxygenase from *Naocardiodides sp* strain KP7: Expression in *Esherichia coli* .*J.Bacteriol*,p182:2134-2141.
- ✚ **Schaechter. M, Medoff. G, Eisenstein. B., 1993.** microbiologie et pathologie infectieuse ; 2 ième édition. P 32.

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Senthilvelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R.C., Mandal, A.B., 2014.** Biodegradation of phenol by mixed microbial culture: an eco-friendly approach for the pollution reduction. *Clean Technol. Environ. Policy* 16, 113–126. doi:10.1007/s10098-013-0598-2.
- ✚ **Seo, J.S., Keum, Y.S., Li, Q.X., 2009.** Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 6, 278–309. doi:10.3390/ijerph6010278.
- ✚ **Sgountzos, N., Pavlou, S., Paraskeva, C., Payatakes, A., 2006.** Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* in sand beds during biodegradation of phenol. *Biochemical Engineering Journal* N°30, P164-173.
- ✚ **Shourian, M., Noghabi, K., Zahiri, T., Karaballaei, 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, P577-594.
- ✚ **Simonart, P., (1957).** Symposium sur les Méthodes d'Etude Microbiologique du Sol, p 208.
- ✚ Site web: <https://WWW.google.dz/maps>
- ✚ **Sivasubramanian, S., Namasivayam, K., 2015.** Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from environment sources. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3, P243-252.
- ✚ **Soltani M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6. Pages : 284.
- ✚ **Speight J.G. (2004).** Petroleum asphaltenes - part 1 - asphaltenes, resins and the structure of petroleum. *Oil & Gas Science and Technology - Rev.IFP*, 59(5):467–477.
- ✚ **STEGMANN, R., BRUNNER, G., CALMANOW, MATZ G. ( EDS), 2001 .** treatment of contaminated soil fundamentals analysis application berlin : springer-verlag, 658p.
- ✚ **Stevcevska V., et Jovanovic-Kolar J. (1974).** Influence of air pollution on the content of 3,4- benzopyrene in non-refined oil obtained from sunflower seeds grown in differently polluted areas. *Arh. Hig. Rada.* 23:191-196.
- ✚ **Sudip K. Samanta, Om V. Singh et Rakesh K. Jain. (2002).** Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology.* 20(6):243-248.

## Références bibliographiques

---

- ✚ **Tan, S., Chen, X., Cui, C., Hou, Y., Li, W., You, H., 2017b.** Biodegradation of saline phenolic wastewater in a biological contact oxidation reactor with immobilized cells of *Oceanimonas* sp. *Biotechnol. Lett.* 39 (1), 91–96.
- ✚ **Tan, S., Cui, C., Hou, Y., Chen, X., Xu, A., Li, W., You, H., 2017a.** Cultivation of activated sludge using sea mud as seed to treat industrial phenolic wastewater with high salinity. *Mar. Pollut. Bull.* 114 (2), 867–870.
- ✚ **Tan, X., Acquah, I., Liu, H., Li, W., Tan, S., 2019.** A critical review on saline wastewater treatment by membrane bioreactor (MBR) from a microbial perspective. *Chemosphere* 220, 1150–1162
- ✚ **Taouti, K., Terbah, K., et Zeghoudi, B., (2019).** Isolement et identification des bactéries à partir d'un sol pollué par les dérivés du pétrole et biodégradation de phénol. Mémoire de master. Université Amar Thelidji-Laghouat, p39.
- ✚ **Tay, J.-H., Tay, S.T.-L., Liu, Y., Show, K.Y., Ivanov, V., 2006.** *Biogranulation Technologies for Wastewater Treatment: Microbial Granules.* Elsevier.
- ✚ **Tsekova, K., Todorova, D., Ganeva, S., 2010.** Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64 (6), 447–451.
- ✚ **Tziotzios, G., Teliou, M., Kaltouni, V., Lyberatos, G., Vayenas, D.V., 2005.** Biological phenol removal using suspended growth and packed bed reactors. *Biochem. Eng. J.* 26, 65– 71. doi:10.1016/j.bej.2005.06.006.
- ✚ **Ucun, H., Yildiz, E., Nuhoglu, A., 2010.** Phenol biodegradation in a batch jet loop bioreactor (JLB): kinetics study and pH variation. *Bioresour. Technol.* 101 (9), 2965–2971.
- ✚ **Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T., Eltis, L.D., 2006.** The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 241–267. doi:10.1080/10409230600817422.
- ✚ **Wakleham S.G., Schaffner C. et Giger W. (1980a).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments-I. Compounds having anthropogenic origins. *Geochim. Cosmochim. Acta* 44,403-413.
- ✚ **Wang, W., Wu, B., Pan, S., Yang, K., Hu, Z., Yuan, S., 2017.** Performance robustness of the UASB reactors treating saline phenolic wastewater and analysis of microbial community structure. *J. Hazard Mater.* 331, 21–27.
- ✚ **Wang, Y., Song, J., Zhao, W., He, X., Chen, J., Xiao, M., 2011.** In situ degradation of phenol and promotion of plant growth in contaminated environments by a single

## Références bibliographiques

---

- Pseudomonas aeruginosa* strain. J. Hazard. Mater. 192, 354–360. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.05.031.
- ✚ **Wang, Y., Wang, X., Li, H., Lin, K., Wang, P., Yang, J., Liu, Y., Sun, Z., Fan, L., Wu, Z., 2014.** Treatment of high salinity phenol-laden wastewater using a sequencing batch reactor containing halophilic bacterial community. Int. Biodeterior. Biodegrad. 93, 138–144
  - ✚ **Waterhouse Andrew., 2010.** Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine, Methods in Enzymology pp 152-178.
  - ✚ **Wei, X., Zhou, J., Xie, L., Zhao, Y., Yang, Y., 2016.** Isolation, identification and characterization of phenol-degrading strain CM-HZX1. Acta Scientiae Circumstantiae 36 (09), 3193–3199 (in Chinese).
  - ✚ **Wilfred Vermerris., Ralph Nicholson., 2006.** Phenolic Compound Biochemistry, edition 01 springer Netherlands, Copyright Holder Springer Science+Business Media B.V.
  - ✚ **WILSON S.C., JONES K.C ,1993.** bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbon (PAHs): a review, Environnement pollution .vol.,81.pp,299-249.
  - ✚ **Xia, S., Zhou, L., Zhang, Z., Hermanowicz, S.W., 2015.** Removal mechanism of low concentration Cr (VI) in a submerged membrane bioreactor activated sludge system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99 (12), 5351–5360.
  - ✚ **Yadav, B.K et Hassanizadeh, M.S. An Overview of Biodegradation of LNAPLs in Coastal (Semi)-arid Environment. Water Air Soil Pollut., 2011, 220:225–239. DOI 10.1007/s11270-011-0749-1.**
  - ✚ **Yi Li. , Jing Li., Chao Wang., Peifang Wang., 2010.** Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1, Bioresource Technology xxx–xxx.
  - ✚ **You, Y., Shim, J., Cho, C.H., Ryu, M.H., Shea, P.J., Kamala-Kannan, S., Chae, J.C., Oh, B.T., 2013.** Biodegradation of BTEX mixture by *Pseudomonas putida* YNS 1 isolated from oil-contaminated soil. J. Basic Microbiol. 53 (5), 469–475.
  - ✚ **Yusoff, N., Ong, S.A., Ho, L.N., Wong, Y.S., Saad, F.N.M., Khalik, W., Lee, S.L., 2016.** Evaluation of biodegradation process: comparative study between suspended and hybrid microorganism growth system in sequencing batch reactor (SBR) for removal of phenol. Biochem. Eng. J. 115, 14–22.

## *Références bibliographiques*

---

- ✚ **Yusoff, N., Ong, S.A., Ho, L.N., Wong, Y.S., Saad, F.N.M., Khalik, W., Lee, S.L., 2019.** Performance of the hybrid growth sequencing batch reactor (HG-SBR) for biodegradation of phenol under various toxicity conditions. *J. Environ. Sci.* 75, 64–72.
- ✚ **Z. Duan,** Microbial degradation of phenol by activated sludge in a batch reactor, *Environ Prot. Eng.* 37 (2011).
- ✚ **Zhang, J., Zhang, Y., Quan, X., 2012b.** Electricity assisted anaerobic treatment of salinity wastewater and its effects on microbial communities. *Water Res.* 46 (11), 3535–3543.
- ✚ **Zhang, J., Zhang, Y., Quan, X., Li, Y., Chen, S., Zhao, H., Wang, D., 2012a.** An anaerobic reactor packed with a pair of Fe-graphite plate electrodes for bioaugmentation of azo dye wastewater treatment. *Biochem. Eng. J.* 63, 31–37.
- ✚ **Zhang, L.S., Wu, W.Z., Wang, J.L., 2007.** Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *J. Environ. Sci.* 19 (11), 1293–1297.
- ✚ **ZHU L., FRENG S, 2000** .Removal of PAHs from highly contaminated soils found at prior manufactured gas operations, *journal of Hazardous Materials*, vol. 80,pp.159-174.

# *Annexes*

➤ **Composition de Milieu LB (*luria bertani*) :** (En raison de gramme par litre d'eau distillé stérile

|                        |     |
|------------------------|-----|
| Peptone.....           | 10  |
| Extrait de levure..... | 5,0 |
| NaCl.....              | 10  |
| Agar.....              | 15  |

➤ **Composition de Bouillon nutritif (Nutrient Broth) sans agar:** (En raison de gramme par litre d'eau distillé stérile

|                            |      |
|----------------------------|------|
| Nutrient Broth .....       | 8,0  |
| Eau distillée stérile..... | 1000 |
| ✓ Composition :            |      |
| - <b>Biokar</b>            |      |
| Tryptone .....             | 10,0 |
| Extrait de viande .....    | 5,0  |
| Chlorure de sodium.....    | 5,0  |
| - <b>Difco</b>             |      |
| Extrait de viande .....    | 3,0  |
| Peptone .....              | 5,0  |

PH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2 (Biokar) - 6,8 ± 0,2 (Difco).

➤ **Composition du milieu minéral Mm :** (En raison de gramme par litre d'eau distillé stérile

|              |       |
|--------------|-------|
| Na Cl .....  | 1, 0  |
| Mg So4.....  | 0, 2  |
| KH2Po4.....  | 1, 7  |
| NH4cl .....  | 0, 1  |
| HK2PE4.....  | 4, 35 |
| Ca cl2 ..... | 0, 03 |

**PH final doit être 7,2**

➤ **Réactifs de la coloration de Gram**

**Cristal Violet (Violet de gentiane)**

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| Phénol.....             | 2.0g  |
| Violet de gentiane..... | 1.0g  |
| Éthanol à 90°.....      | 10g   |
| Eau distillé.....       | 100ml |

**Lugol**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Iodure de potassium..... | 2.0g  |
| Iode métalloïde.....     | 1.0g  |
| Eau distillé.....        | 300ml |

**Alcool (éthanol)**

**Fuschine de ziehl**

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| Fuschine de ziehl.....    | 1.0g  |
| Phénol.....               | 5.0g  |
| Ethanol à 90°.....        | 10ml  |
| Eau distillé stérile..... | 100ml |

➤ **Solution de phénol**

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

➤ **Solution de carbonate de sodium  $\text{NaCO}_3$**

A l'aide d'une balance mesurer 20g de poudre  $\text{NaCO}_3$  et mettre dans un flacon stérile contenant 100ml d'eau physiologique stérile, après mélanger cette préparation a l'aide d'un vortex, puis emballer le flacon par papier aluminium pour éviter la dégradation ou la réaction de cette suspension car leur sensibilité a la lumière.

➤ **Réactif de folin ciocalteu**

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

**Tableau 10:** Résultat de coloration de Gram de quelque isolas obtenu

| <b>Les isolas</b> | <b>Resultat de coloration de Gram</b> |
|-------------------|---------------------------------------|
| SE1 et SE2        | Cocci en chainette à Gram +           |
| SE                | Coccobacille en amas à Gram+          |
| SE'1              | Cocci à Gram +                        |
| ESD2/C2           | Cocci à Gram +                        |
| SE1D1             | Bacille à Gram +                      |
| S (3791') m       | Cocci en chainette a gram +           |
| S (3791) m        | Bacille en chainette a gram +         |
| SD2(3712) m       | Cocci à Gram –                        |
| SD4(3712) m       | Bacille à Gram +                      |

## Etude de la cinétique de biodégradation de phénol dans différentes conditions Physico-chimiques

**Résumé:** Ce travail s'inscrit dans le cadre de la dégradation des polluants. Il a pour but d'étudier et d'évaluer les conditions physico-chimiques optimales. Pour cette étude, le phénol a été choisi comme polluant organique modèle. Nous avons donc deux objectifs à atteindre. Premièrement, il s'agissait de sélectionner les souches capables de dégrader le phénol d'une part et d'étudier la cinétique la biodégradation, d'une autre part.

Dans un premier temps, nous avons isolés des bactéries à partir d'un échantillon du sol contaminé par les dérivés pétrolier, le sol est prélevé au niveau d'un fourrage de la zone Hassi Messaoud de la Wilaya d'Ouaregla. Des isolats bactériens ont été obtenus à partir d'un repiquage successif sur milieu Luria-Bertani, après purification, et la réalisation de test de la biodégradabilité, plusieurs souches sont capables d'utiliser le phénol comme seul source de carbone pour leurs croissances. Cinétiquement les résultats obtenus on permit de montrer que le phénol est dégradé complètement au bous de 24 heures aux concentrations allant jusqu'à 1000 mg/L, à PH optimale de milieu est de l'ordre de 7 et de température de 37°C, sous l'effet d'agitation 250 rmp.

**Mots clés :** sol, polluant organique, dégradation, phénol, cinétique.

### Study of the biodegradation kinetics of pollutants under different physico-chemical conditions

**Abstract:** This work is part of the degradation of pollutants. Their purpose is to study and assess the optimal physico-chemical conditions. For this study, phenol was chosen as the model organic pollutant. So we had two goals to achieve. First, it involved determining the best conditions for degradation of phenol, on the one hand, and study kinetics, on the other.

First we isolated bacteria from a sample of soil contaminated with petroleum derivatives, the soil is taken from a forage in the Hassi Messaoud area of Ouargla. Bacteria isolates were obtained from a successive subculturing on Luria-Bertani medium, after purification, and carrying out a biodegradability test, only 2 stains are capable of using phenol as the only carbon source for their growth. Kinetically, the results obtained show that the phenol is completely degraded over 24 hours at concentrations up to 1000 mg/L, at an optimal PH of the medium is around 7 and at a temperature of 37°C, under the effect of agitation 250 rmp.

**Keywords :** soil, organic pollutant, degradation phenol, kinetics.

### دراسة حركيات التحلل الحيوي للملوثات تحت ظروف فيزيائية كيميائية مختلفة

**ملخص** هذا العمل هو جزء ضمن اطار تحلل الملوثات. الغرض منه هو دراسة و تقييم الظروف الفيزيائية و الكيميائية المثلى. لهذه الدراسة تم اختيار الفينول كنموذج للملوثات العضوية. لذلك كان لدينا هدفين لتحقيقه. اولا تضمن تحديد افضل الظروف لتحلل الفينول من ناحية. ودراسة الحركية من ناحية اخرى

اولا قمنا بعزل البكتيريا من عينة من التربة الملوثة بالمشتقات البترولية. وهي مأخوذة من منطقة حاسي مسعود بالولاية ورقلة تم الحصول على العزلات البكتيرية من زراعة متتالية على وسط لوريا-برتاني بعد التنقية. و اجراء اختبار التحلل البيولوجي. فقط سلالتان قادرتان على استخدام الفينول كمصدر الوحيد لنموها. حركيا. اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان الفينول يتحلل تماما في غضون 24 ساعة بتركيزات تصل الى 1000 ملغ/ل. عند درجة حموضة مثالية للوسط حوالي 7. وعند درجة حرارة 37 درجة مئوية. تحت تأثير التحريض 250 دورة في الدقيقة

**الكلمات المفتاحية :** التربة. ملوث عضوي. تحلل. فينول. حركية