



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



**Université Amar Telidji- Laghouat**

**FACULTE des Sciences**  
**DEPARTEMENT de Biologie**

## **MEMOIRE DE MASTER**

**Présentées par :**

- M<sup>lle</sup>. Chellali Ikram
- M<sup>elle</sup>. Cheniba Zineb
- M<sup>elle</sup>. Djaid Oum el Saad

**DOMAINE :** Science de la Nature et de la Vie

**FILIERE:** Biologie

**OPTION:** Microbiologie Appliquée

**Thème :**

Etude de la biodégradation de phén1 par  
*Pseudomonas* sp et *Bacillus* sp et évaluation  
de la formation d'un biofilm

**Jury de soutenance:**

<b>Mr. BENACEUR Farouk</b>	<b>Promoteur</b>	<b>MCA</b>
<b>Mrs. REZZOUG Asmaa</b>	<b>Co-Promoteur</b>	<b>Doctorante</b>
<b>Mr. BENAMER Ibrahim</b>	<b>Examineur</b>	<b>MAB</b>
<b>Mr. DJEBLI Ahmed</b>	<b>Président</b>	<b>MCB</b>

**Promotion Juin 2022**

## الملخص:

تحتوي التربة على كائنات حية دقيقة قادرة على تحليل المركبات العضوية المختلفة، حيث يمكن تواجدها هذه الأخيرة في المواقع الملوثة بالنفط ومشتقاته (محطات البنزين) وبهذا يتشكل وسط مناسب لعزل سلالات يمكن استخدامها لمعالجة المناطق الملوثة.

الهدف من دراستنا هو عزل البكتيريا الموجودة في محطة خدمة الوقود في منطقة الاغواط، حيث أجرينا تحديد السلالات المستهدفة وهما: الزائفة والعصوية باستخدام عدة خصائص (الشكلية والكيميائية الحيوية). وقد أجريت بعض الاختبارات على الملوثة العضوية الفينول، حيث تبين ان البكتيريا المستهدفة قادرة على استخدام الملوثة العضوية كمصدر وحيد للكربون والطاقة للتكاثر، بينما أظهرت عدم قابليتها على تشكيل الغشاء الحيوي البكتيري. يمكن استغلال هذه البكتيريا في معالجة التلوث او استخدامها كمنشطات حيوية، كما انه لا يمكن الجزم ان هذه البكتيريا قادرة على تشكيل الغشاء الحيوي.

**الكلمات المفتاحية:** كائنات حية دقيقة، مركبات عضوية، عزل، الزائفة، العصوية، ملوث عضوي، غشاء حيوي بكتيري.

## Résumé :

Le sol contient des micro-organismes capables de dégrader différents composés organiques, ces derniers pouvant se trouver dans les sites contaminés par le pétrole et ses dérivés (stations essence), constituant ainsi un milieu approprié à l'isolement des souches utilisables pour traiter les zones polluées.

Le but de notre étude est d'isoler les bactéries présentes dans la station-service Aiouaze de la région de Laghouat, où nous avons identifié les souches cibles : *Pseudomonas* et *Bacillus*, en utilisant plusieurs caractéristiques (morphologiques et biochimiques). Certains tests ont été menés sur le polluant organique phénolique, où il a été constaté que les bactéries cibles sont capables d'utiliser le polluant organique comme seule source de carbone et d'énergie pour la croissance, alors qu'il a été démontré qu'elles étaient incapables de former le biofilm bactérien.

Ces bactéries peuvent être exploitées dans le traitement de la pollution ou utilisées comme biostimulants, et il n'est pas possible d'être certain que les bactéries forment un biofilm.

**Mots clés :** micro-organismes, composés organiques, isolat, *Pseudomonas*, *Bacillus*, polluant organique, biofilm bactérien.

**Abstract:**

The soil contains microorganisms capable of degrading various organic compounds, these microorganisms has the ability to be existed in sites contaminated by petroleum and its derivatives (petrol stations), thus constituting an appropriate medium for the isolation of strains that can be used to treat areas polluted.

Our study aims to isolate the bacteria present in the Aiouaze service station in the Laghouat region, where we identified the target strains: *Pseudomonas* and *Bacillus*, using several characteristics (morphological and biochemical). Some tests was conducted on the phenolic organic pollutant, where it has been found that the target bacteria can utilize the organic pollutant as the sole source of carbon and energy for growth, while it has been shown that they were unable to form the bacterial biofilm.

We can exploited these bacteria in the treatment of pollution or used as bio-stimulants, and it is not possible to be certain that the bacteria form a biofilm.

**Keywords:** microorganisms, organic compounds, isolate *Pseudomonas*, *Bacillus*, organic pollutant, bacterial biofilm.

*Dédicaces*

*Je dédie ce travail  
À tous ceux que j'aime*

*Chellali Ikram*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*À ceux que j'aime du fond de mon cœur, à qui je dois la vie et qui n'ont cessé, à aucun moment, de me soutenir et de m'encourager par*

*leurs prières : Mes cher parents,*

*À mes frères et mes sœurs pour leurs amours et leurs aides...*

*À toute ma famille et à toute mes amies...et à toutes les personnes qui j'aime.*

*Cheniba Zineb*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents.*

*A mes frères (Mohamed, Ahmed, Idris et Taha El Amin)  
et à mes sœurs (Maroua et Khadidja).*

*A toute ma famille*

*A mon binômes Zineb et Ikram*

*Djaid Oum el Saad*

## *Remerciements*

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

*Nous tenons à exprimer notre remerciements pour notre respectueux, enseignante, Madame REZZOUM Asma, d'avoir accepté d'encadrer-nous pour notre projet de fin d'études, ainsi que son soutien, ses remarques pertinentes et son encouragement.*

*Nous remercions aussi à tous notre professeurs de département de*

*Biologie, Amar Telidji-Laghout, de leurs générosités ainsi leurs soutiens de leurs témoigner notre profond respect. À notre enseignant, le chef département CHAÏBO Rachid, et l'adjoint BENCHEUR Farouk.*

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

*Enfin un grand merci à tous mes camarades de Master de la promotion 2021-2022*

## SOMMAIRE

Sommaire :.....

..... I

Listes des tableaux:

.....V

Listes des figures :

.....VI

### Partie I : Synthèse bibliographique

I. Introduction :.....	4
II. La pollution : .....	4
III. Les polluants : .....	4
a) Polluants organiques : .....	5
b) Polluants inorganiques : .....	5
IV. Méthodes de dépollution du sol :.....	6
1) Définition des sols : .....	6
2) Pollution du sol : .....	7
3) Dépollution du sol : .....	8
V. Le phénol :.....	10
□ Définition .....	10
V.1. l'intérêt : .....	11
V.2. Propriétés physico-chimiques : .....	11
V.2.1. Propriétés physiques : .....	11
V.2.2. Propriétés chimique : .....	12
V.3. Toxicité : .....	12
V.3.1. L'effet sur l'homme : .....	12
V.3.2. L'effet sur l'environnement : .....	13
VI. Biodégradation de phénol :.....	13
VI.1. Biodégradation aérobie : .....	14
VI.2. Biodégradation anaérobie : .....	15
VII. Facteurs affectant la biodégradation de phénol : .....	16
VIII. Les voies biologiques de la biodégradation des polluants :.....	16
IX. Biofilm : .....	18

IX.1. Les étapes principales pour la formation d'un biofilm :.....	18
IX.2. les différents types de biofilm bactérien : .....	20
a) Biofilm multi-espèce : .....	20
b) Biofilm mono-espèce :.....	20
IX.3. Facteurs affectant la formation d'un biofilm :.....	20
IX.4. Microorganismes produits le biofilm : .....	22
IX.5. Biodégradation des polluants organique par le biofilm des bactéries d'intérêts : .....	22
1) Pseudomonas :.....	23
2) Bacillus :.....	23

## Partie II: Matériels et Méthodes

I. Echantillonnage :.....	26
I.1. site de prélèvement : .....	26
I.2. Méthode d'échantillonnage : .....	26
I.3. Analyse macroscopiques : .....	26
II. Analyses microbiologiques : .....	27
II.1. Isolement de la flore bactérienne cultivable des sols : .....	27
II.1.1 Préparation des délutions :.....	27
II.1.2. Purification : .....	28
II.1.3. Identification : .....	28
III. Sélection des souches susceptible de dégrader le phénol : .....	30
III.1. Culture minérale : .....	30
III.3. Dosage colorimétrique : .....	31
IV. Cinétique de la biodégradation de phénol : .....	31
IV.1. La cinétique de phénol : .....	32
IV.2. La cinétique de la biomasse : .....	32
V. Formation de biofilms par les souches d'intérêt : .....	33
V.1. Préparation de milieu NB :.....	33

## Partie III: Résultats et discussion

I. Evaluation et étude de la flore microbienne :.....	36
I.1. Etude qualitative de la flore microbienne : .....	36
I.1.1. Aspect macroscopique des colonies isolées :.....	36
I.1.2. Aspect microscopique des souches isolées :.....	36
I.2. Analyses biochimiques : .....	37
I.4. Croissance sur les milieux sélectifs : .....	37

I.4.1. La croissance sur le milieu King A et King B : .....	38
I.5. Identification des souches isolées : .....	39
I.5.1. Les souches ES01 et ES04 : .....	39
I.5.2. La souche ES02 : .....	39
II. étude de la biodégradation de phénol : .....	39
II.1. le test de la biodégradation de phénol : .....	39
III. Etude de la cinétique de la biodégradation de phénol : .....	40
IV. Test de biofilm : .....	42
CONCLUSION .....	44
BIBLIOGRAPHIE .....	46
ANNEXE .....	51

## **Liste des abréviations :**

**EPS** : extracellular polymeric substances

**ES** : Echantillon du sol

**HAP** : hydrocarbures aromatiques polycycliques

**LB** : Luria Bertani

**MM** : milieu minéral

**NB** : nutritif broth

**PCB** : polychlorobiphényle

**QQ**: quorum quenching

**QS**: quorum Sensing

## LIST TABLEAUX

<b>Table 1:</b> Polluants inorganiques classer en deux categories. ....	<b>6</b>
<b>Table 2:</b> Propriété physique du sol .....	<b>7</b>
<b>Table 3:</b> Propriété physico-chimique du sol .....	<b>7</b>
<b>Table 4:</b> Classification de principales méthodes de décontamination des sols (Gauthier-Dion, 2016).....	<b>9</b>
<b>Table 5:</b> Propriétés physique du phénol (Haddoum Zahira, 2015).....	<b>11</b>
<b>Table 6:</b> Les microorganismes qui contribuent dans la dégradation de phénol (Khazi Mahammedilyas Basha, 2015) .....	<b>14</b>
<b>Table 7:</b> Les voies biologiques de la biodégradation des polluants. ....	<b>17</b>
<b>Table 8:</b> les microorganismes forment le biofilm.....	<b>22</b>
<b>Tableau 9:</b> Caractéristiques physiques du sol prélevé.....	<b>27</b>
<b>Tableau 10 :</b> Caractéristiques de l'espèce de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	<b>30</b>
<b>Table 11:</b> Aspect macroscopique des colonies isolées .....	<b>36</b>
<b>Table 12:</b> Résultats de coloration de Gram.....	<b>37</b>
<b>Table 13:</b> Résultats de tests des enzymes respiratoires : .....	<b>37</b>
<b>Table 14:</b> Résultats de dosage colorimétrique de phénol .....	<b>40</b>
<b>Table 15:</b> Résultats de coloration de Gram.....	<b>54</b>

## List des figures :

Figure 1: la structure chimique de phénol .....	10
Figure 2: la biodégradation aérobie de phénol .....	15
Figure 3: Modèle de formation d'un biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Vallet, 2003).....	19
Figure 4 : Localisation de site de prélèvements (Google maps) .....	26
Figure 5: Les échantillons du sol prélevé.....	27
Figure 6: Dilution décimale des trois échantillons.....	28
Figure 7: Etalement par technique des cadrans .....	28
Figure 8: l'ensemencement sur le milieu minéral .....	31
Figure 9: Préparation de dosage colorimétrique (Chellali, 2022).....	31
Figure 10: élimination de la biomasse par la centrifugation pour le dosage colorimétrique de surnageant .....	32
Figure 11: La technique de préparation d'un biofilm (Chellali, 2022).....	33
Figure 12: La préparation d'un biofilm .....	1
Figure 13: Aspect microscopique et macroscopique des colonies isolées (Chellali Ikram, Cheniba zineb et Djaid oum el saad, 2022) .....	36
Figure 14: Aspect cultureux des souches bactérienne sur le milieu Chapman et Hektoen (Chellali Ikram, Cheniba zineb et Djaid oum el saad, 2022) .....	38
Figure 15: Résultats de dosage colorimétrique de phénol. ....	40
Figure 16: A : la dégradation de phénol au cours de temps par des cultures bactériennes ES02, ES04 et FSE. B : l'augmentation de la biomasse bactériennes au cours du temps des cultures ES02, ES04 et FSE. ....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 17: Test de formation d'un biofilm microbien (par le cristal violet) .....	42

# **INTRODUCTION GENERALE**

La pollution et l'influence de l'homme sur l'environnement est le grand problème mondial, et le développement considérable des activités industrielles provoque une augmentation importante des pollutions et des nuisances. Cependant, les rejets de composés toxiques qui sont libérés dans l'écosphère, créent un déséquilibre de l'environnement et cela crée un thème d'actualité.

Le sol est la plus importante des quatre ressources naturelles qui forment un environnement de 20% des espèces vivantes. La pollution du sol peut apparaître de différentes façons : directement de l'air, de l'agriculture par l'épandage de fertilisants ; mais la pollution la plus intéressante celle qui est associée aux polluants provient des déchets (sites industriels, décharges...etc.). (Koller E. , 2009)

Facteurs de pollutions ou bien les polluants, ce sont des composés ont des caractéristiques physico-chimiques, extrêmement nombreux et d'autant plus difficiles à cerner que leurs nature, intensités et leurs effets dangereux sont changeants, dans le temps comme dans l'espace. (Koller , 2009 A)

La biodégradation c'est un procédé de remédiation biologique visent la dégradation de la matière organique essentiellement par l'activation des bactéries déjà présentes dans le sol parmi ces bactéries sont les *Pseudomonas* et les *Bacillus*, ou encore par des bactéries spécialement cultivées et l'optimisation de leurs conditions de prolifération.

Le développement des méthodes biologiques curatives pour l'optimisation de la biodégradation a conduit à la recherche des études plus efficaces et plus rapides comme l'utilisation des biofilms bactériennes.

Un biofilm est un assemblage de microorganismes englobés dans une matrice constituée des substances polymériques extracellulaires « SPE » sécrétée par les cellules elles-mêmes. Les bactéries peuvent appartenir à la même espèce ou à des espèces différentes, donnant naissance à des biofilms mono- ou multi-espèces, ce dernier étant prédominant dans la nature. (Elkhoury, 2021)

Les biofilms peuvent aussi être utilisés pour la production ou l'élimination de molécules (par fixation ou biodégradation) ou leurs propriétés sont mises à profit. C'est aussi pour cette raison que la formation du biofilm dans les milieux poreux (ex : la plaque dentaire) représente un domaine précieux pour la recherche scientifique en raison de sa

pertinence pour de nombreux processus industriels, tels que le traitement des eaux, la bioremédiation des sols, la récupération du pétrole et le stockage du dioxyde de carbone. (Cecilia, 2017)

Le premier chapitre présente le cadre général de l'étude notamment des rappels bibliographiques sur le sol, la pollution, les types de polluants (organique, inorganique) et les différentes techniques de dépollution du sol.

Dans le deuxième chapitre est une présentation de phénol. Leur effet, types et propriété physico-chimiques. La biodégradation de phénol et les différents types (aérobie et anaérobie) et aussi les factures affectant.

Le troisième chapitre présenté la biodégradation de phénol par Biofilm des microorganismes intérêt *Pseudomonas* et *Bacillus*.

Le quatrième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus, leur interprétation et les discussions éventuelles.

Nous terminons notre travail par une conclusion générale.

**Partie I :**  
**Synthèse bibliographique**

### **I. Introduction :**

De point de vue écologique, l'environnement est l'ensemble des facteurs physiques, chimiques et biologiques dont dépendent la vie et la postérité d'une population végétale, animale ou humaine. Avec cela, la terre est considérée comme un système clos, en ce qui concerne les échanges de matière, appelé écosphère qui comprend quatre compartiments caractérisés par l'état physique selon leurs composants : solide pour lithosphère (la terre), liquide pour l'hydrosphère (l'eau), gazeux pour l'atmosphère (air) et la matière vivante pour la biosphère (le lieu où se déroulent les cycles vitaux dans lequel évoluent les organismes vivants). (Koller , 2009 A)

Jusqu'à maintenant la pollution et l'influence de l'homme sur l'environnement c'est le grand problème mondial, et le développement considérable des activités industrielles provoque une augmentation importante des pollutions et des nuisances.

Parmi les types de la pollution de l'environnement, il y a la pollution qui provoquée par les substances (air, eau, sol) qui distingué selon la manière dont elles sont répandues géographiquement autour du monde. (Koller , 2009 A)

Cependant, les rejets de composés toxiques qui est libère dans l'écosphère, crée un déséquilibre de l'environnement, et cela génère du problème de la pollution.

### **II. La pollution :**

C'est une modification défavorable du milieu naturel qui apparait en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les critères de répartition des flux d'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. (Koller , 2009 A)

### **III. Les polluants :**

Un polluant est une substance présente dans des concentrations susceptibles de nuire à des organismes (humains, plantes et animaux) ou dépasser une norme de qualité environnementale. Le terme est fréquemment utilisé de manière synonyme avec contaminant. (Glossary of environment statistic , 2001)

### **a) Polluants organiques :**

Les composés organiques sont caractérisés par des molécules possédant principalement du carbone, de l'hydrogène et d'autres éléments appelés hétéro-atomes : oxygène, azote, soufre, phosphore, chlore...etc., La présence d'hétéroatomes dans des groupements aux propriétés physico-chimiques particulières confère aux substances organiques certaines fonctions qui sont utilisées pour les classer par familles :

- Hydrocarbures aliphatiques (alcanes, alcènes).
- Hydrocarbures aromatiques monocycliques (benzène, toluène, xylènes).
- Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).
- Les phénols.
- Hydrocarbures halogènes (solvants chlores, chlorobenzènes, PCB, dioxines, furannes).
- Hydrocarbures oxygènes (acides, esters, aldéhydes, alcools),
- Hydrocarbures azotes (pesticides).
- Hydrocarbures soufre (pesticides). (Jullien et Dominique, 2014)

### **b) Polluants inorganiques :**

Les substances minérales formées à partir de l'ensemble des éléments chimiques (une centaine environ) ne forment, malgré leur diversité, qu'un nombre beaucoup plus restreint de composés et dont les masses moléculaires restent limitées. Ces composés peuvent se classer en deux catégories en fonction de leur polarité (Jullien et Dominique, 2014) :

**Table 1:** polluants inorganiques classer en deux catégories (Jullien et Dominique, 2014).

<b>Catégorie</b>	<b>Polarité</b>	<b>Type des composants</b>
<b>Anion</b>	Négative	les chlorures, les phosphates, les nitrates, les nitrites, les cyanures, et les Sulfates
<b>Cation</b>	Positive	Les me les métaux lourds comme le plomb, le mercure, le cadmium, le chrome ou le nickel lourds comme le plomb, le mercure, le cadmium, le chrome ou le nickel

#### **IV. Méthodes de dépollution du sol :**

##### **1) Définition des sols :**

Le sol est le plus importante des quatre ressources naturelles renouvelables sur lesquelles se fonde l'activité humaine de production. (Koller , 2009 B)

D'une manière très générale, on peut définir le sol : est constitué de la couche superficielle qui recouvre l'écorce terrestre. Il se forme sous l'effet de l'altération de la roche-mère (ou minéraux primaires) soumise à des agressions physico-chimiques, mécaniques et climatiques (température, humidité...) et biologiques.

Le sol est un milieu constitué de trois fractions dont les proportions, la structure et l'organisation sont variables :

1. une fraction solide composée de minéraux (sables, limons, argiles, oxydes et hydroxydes métalliques).
2. une fraction liquide représentant l'eau.
3. une fraction gazeuse de composition très proche de celle de l'atmosphère terrestre. (Hanna, 2004)

Le sol constitue de moins 5 % de matière organique et aussi de matière inorganique (Les minéraux). Du point de vue de l'écosystème le pont entre le règne minéral et le monde vivant. On trouve dans le sol tout un série d'êtres vivants (en virons 80000 dans 1 dm<sup>3</sup> de

terre) vivent en interaction interspécifique sont les relations qui existent entre les êtres vivants d'espèces différentes. Elles peuvent être bénéfique (commensalisme, symbiose) ou négatives (parasitisme, prédation). (Koller , 2009 B).

**Table 2:** Propriété physique du sol (Koller , 2009 B).

<b>Propriété physiques</b>	
<b>Texture</b>	La texture précise la proportion des divers éléments physiques du sol. Le triangle de texture (argile-limon) indique à quel type appartient le sol considéré.
<b>Structure</b>	Présentant une structure grumeleuse contient des cavités vides remplies d'eau ou d'air. On peut distinguer à la vue et au la touche diverse types : structure fragmentaire, structure élémentaire ou particulaire et structure compacte ou massive.
<b>Aération</b>	L'aération a d'importantes conséquence sur la plupart des phénomènes biologiques du sol, qu'il s'agisse de l'implantation et du fonctionnement du système racinaire ou de l'activité des micro-organismes.
<b>Température</b>	T° influence la vitesse et l'intensité de nombreux processus biologiques et physiques.
<b>Perméabilité</b>	L'aptitude du sol à laisser passer l'eau vers la couche inférieure : elle dépend de la texture et la structure.
<b>Circulation d'eau</b>	Le fait sous l'influence de la gravité. Le débit Q (m <sup>3</sup> /s) est donné par la loi de Darcy : $Q=K (H.S/L)$

**Table 3:** Propriété physico-chimique du sol (Koller , 2009 B).

<b>propriété physico-chimique</b>	
<b>Pouvoir adsorbant</b>	Les colloïdes du sol argile et de l'humus qui possèdent le pouvoir adsorbant
<b>PH</b>	Varié entre 6 à8

## 2) Pollution du sol :

Les pollutions du sol peuvent apparaitre de différents façon directement de l'aire par déposition sèches ou avec les précipitations (déposition humides), de l'agriculture par l'épandage de fertilisant ; mais la pollution la plus importante est celle qui associée aux polluants provenant des déchets.

S'il y a un ou plusieurs composés toxiques dont la concentration varie peu, la contamination est appelée diffuse :

- à partir de sources non stationnaires comme les automobiles.
- à partir de sources très étendues (dépôts de produits en agriculture et sédiments lors d'inondations).
- à partir d'une grande source comme les foyers domestiques.

Le sol riche en polluants ou facteurs : sont extrêmement nombreux et d'autant plus difficiles à cerner que leur nature, leur intensité et leur effet sont changeants, dans le temps comme dans l'espace. Parmi les plus répandus, on trouve des hydrocarbures, des métaux lourds, des solvants divers et les pesticides. (Koller, 2009 B).

### 3) Dépollution du sol :

Ces dernières années, le développement de techniques efficaces pour décontaminer les sites pollués est devenu indispensable. Puisque, Le problème des sols contaminés est aujourd'hui très préoccupant pour les pays émergents et un grand risque sur la santé humaine et l'environnement. (Abdelmajid, 2016) Il y a plusieurs voies d'élimination des polluants du sol étudiées.

Les traitements proposés peuvent être définis en trois grandes familles :

- 1- Les procédés «*in situ*», réalisés dans le sol en état.
- 2- Les procédés «*on site*» ou «*sur site*», traitements sur place des sols excavés.
- 3- Les procédés «*hors site*» ou «*off site*» ou «*ex situ*», nécessitant l'évacuation.

Ces différents procédés sont dépendants d'un facteur de temps, sachant que les traitements «*in situ*» demandent un temps plus long que ceux réalisés hors site. Enfin, le type de traitement choisi dépendra également de la nature du ou des polluants, certains d'entre eux présentant la caractéristique d'être biodégradables et d'autres non.

Ainsi trois méthodologies peuvent s'appliquer pour le traitement de polluants non biodégradables sont présentées dans le tableau 04. (Abdelmajid, 2016)

**Table 4:** classification de principales méthodes de décontamination des sols (Gauthier-Dion, 2016)

	<b>Immobilisation</b>	<b>Extraction</b>	<b>Dégradation</b>
<b>Physique</b>	Solidification Isolation /confinement Excavation/enfouissement	Séparation physique	Broyage
<b>Chimique</b>	Stabilisation Redox	Lixiviation Electrocinétique	Oxydation
<b>Thermique</b>	vitricification	Désorption thermique	Incinération pyrolyse
<b>Biologique</b>	Bio stabilisation Phyto stabilisation	Phyto extraction Bio extraction	Biodégradation

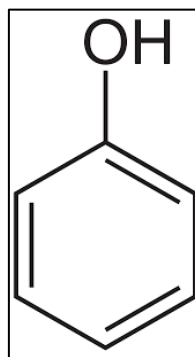
### V. Le phénol :

Le phénol est un composé organique le plus largement utilisé dans l'existence et est unité de structure de base pour une variété de composés organiques synthétiques, y compris les produits chimiques agricoles et les pesticides. Le phénol se trouve naturellement dans les matières organiques mortes en décomposition comme les légumes en décomposition et dans le charbon.

Le chimiste allemand Runge a isolé le phénol du goudron de houille en 1834 et l'a nommé karbolsaure (acide ou huile de charbon Carbolique), bien que sa composition n'ait été connue qu'en 1841. (Khazi et *al.*, 2015)

#### Définition

Phénol (hydroxy benzène) formule brute  $C_6H_6O$  (Figure 1) est un composé aromatique à la fois synthétique et naturel. Il a d'abord été utilisé à l'état brut, comme la créosote, pour empêcher l'altération des traverses de chemin de fer et du bois des navires, et pour réduire l'odeur de décomposition dans les eaux usées. A température ambiante, le phénol est une masse cristalline translucide, incolore, poudre blanche ou liquide sirupeux lorsqu'il est mélangé avec de l'eau. Les cristaux sont hygroscopiques et virent au rose rouge dans l'air. Le phénol a une douce odeur de goudron et est soluble dans l'alcool, le glycérol, le pétrole et l'eau pour une moindre mesure. (Young et *al.*, 2007)



**Figure 1:** la structure chimique de phénol

### V.1. l'intérêt :

Le phénol est principalement utilisé en tant qu'intermédiaire :

- a. dans l'industrie des matières plastiques (pour la production de bisphénol A utilisé dans la fabrication de résines phénoliques) ;
- b. pour la fabrication d'alkyl phénols, caprolactame, d'acide salicylique, de chlorophénols, de nitrophénols, d'acide picrique, d'acide adipique... ;
- c. pour la fabrication de plastifiants, d'adhésifs, de durcisseurs, de dissolvants, d'isolants...

Il est également utilisé dans l'industrie pharmaceutique (désinfectant, antiprurigineux, anesthésique local...). Depuis 2006, le phénol ne peut plus être utilisé comme substance active biocide et il est interdit depuis 2005 dans les cosmétiques. (Bonnard et *al.*, 2021)

### V.2. Propriétés physico-chimiques :

#### V.2.1. Propriétés physiques :

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, hygroscopique et d'odeur caractéristique à la fois âcre et douceâtre (limite olfactive : 0,05 ppm). En présence d'impuretés, d'humidité ou de lumière, le phénol se teinte en rose ou rouge. Le phénol se liquéfie en présence de quelques pourcents d'eau (environ 8 %). Les mélanges contenant plus de 10 % d'eau sont commercialisés sous forme de phénol liquide. À 25 °C, le phénol est modérément soluble dans l'eau (environ 80 g/L) ; il l'est en toute proportion à partir de 65 °C. Il est également très soluble dans de nombreux solvants organiques usuels tels l'acétone, l'éthanol, l'oxyde de diéthyle. (Bonnard et *al.*, 2021)

**Table 5:** Propriétés physique du phénol (*Haddoum et Maouche, 2015*)

<b>T° ebullition</b>	182°C
<b>T° fusion</b>	43°C
<b>Masse volumique</b>	1,073 g cm-3
<b>T° auto- inflammation</b>	715°C
<b>Solubilité</b>	à20°C97gl-1

## Biodégradation de phénol

<b>Point d'éclair</b>	79°C
<b>Temps de demi-vie dans l'air</b>	env.20h
<b>Temps de demi-vie dans l'eau</b>	env.55h
<b>Point critique</b>	61.3 bar à 421.05°C
<b>Pression de vapeur saturante à 20°C</b>	47 Pa
<b>Limites d'explosivité dans l'air</b>	1.36-10% vol

### V.2.2. Propriétés chimique :

Le phénol peut réagir vivement avec les oxydants puissants. La réaction entre le phénol et de nombreuses substances (formaldéhyde, chlorure d'aluminium, nitrobenzène, nitrate de sodium, 1,3-butadiène...) peut-être violente. À chaud, le phénol liquide attaque certains métaux (plomb, zinc, aluminium...) ainsi que certains plastiques, notamment le polyéthylène. (Bonnard et *al.*, 2021)

### V.3. Toxicité :

Il pénètre rapidement dans l'organisme par toutes les voies. Les intoxications industrielles résultent de contact cutanés et d'exposition aux vapeurs, qui pénètrent dans l'organisme non seulement par voie pulmonaire mais également à travers la peau intacte. Le phénol est rapidement éliminé par les reins sous forme libre est conjuguée (80 à 90% sont libre) l'ingestion accidentelle, l'absorption cutanée massive entraînent par fois la morte. (Toxicological profile for phenol, 2008).

#### V.3.1. L'effet sur l'homme :

La plupart du phénol qui peut être inhalé ou ingérer entre dans la circulation sanguine, une moindre dose peut circuler dans le sang s'il y'a un contact avec la peau. Une exposition de courte durée au phénol dans l'air peut causer une irritation respiratoire, des maux de tête et des brûlures aux yeux. Les gens qui ont été exposés à de fortes doses de phénol sur la peau ont des brûlures dermiques, une altération du foie, un changement de couleurs des urines, des battements de cœur irréguliers et certains meurent. L'ingestion d'une concentration élevée de phénol peut résulter en brûlures internes et aussi la mort. Une dose orale de 140 mg/kg est considérée comme la dose létale minimale (Toxicological profile for phenol, 2008).

### V.3.2. L'effet sur l'environnement :

Les phénols synthétiques étant plus toxiques que ceux existant à l'état naturel, une réduction des émissions s'impose. Les personnes manipulant du phénol doivent notamment éviter le contact cutané et l'inhalation de ces produits.

#### ❖ dans le milieu aquatique :

Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer. Il se dissout lentement et, même dilué, continue de former des solutions toxiques. En raison de sa forte toxicité dans l'eau, le phénol figure dans la catégorie de risque de pollution de l'eau.

#### ❖ dans les sols :

Le phénol peut rester dans le sol 2 à 5 jours, le phénol subit une dégradation microbienne aérobie ou anaérobie, de sorte que l'effet d'accumulation reste limité. L'accumulation est fonction de la présence de minéraux argileux (forte affinité avec l'oxyde d'aluminium).

#### ❖ Dans l'atmosphère :

Le phénol est rapidement éliminé de l'atmosphère (généralement la moitié est éliminée en moins d'une journée). Les vapeurs de phénol sont plus lourdes que l'air et forment des mélanges explosifs sous l'effet de la chaleur. Le phénol s'oxyde à l'air, et ce processus d'oxydation est accéléré par la lumière ou par des impuretés à effet catalytique. (Bonnard et *al.*, 2021)

## VI. Biodégradation de phénol :

Le phénol, un hydrocarbure aromatique, est dégradé par divers micro-organismes qui utilisent le phénol comme seule source de carbone pour la croissance. Parmi les divers micro-organismes, *Pseudomonas putida* est le plus populaire pour la dégradation du phénol, car cette espèce utilise le phénol comme source de carbone. (Kumar et *al.*, 2017)

Les micro-organismes capables de dégrader le phénol sont courants et comprennent à la fois des aérobies et des anaérobies. De nombreuses applications pratiques existent pour la dégradation microbienne du phénol. Celles-ci comprennent l'utilisation des bactéries

## Biodégradation de phénol

anaérobies indigènes dégradant le phénol dans la bioremédiation *in situ* des environnements souterrains contaminés par la créosote, et l'utilisation du phénol comme Co-substrat pour les bactéries aérobies indigènes dégradant le phénol pour améliorer la biodégradation *in situ* des solvants chlorés.

Certains des composés phénoliques, tels que le 4-hydroxybenzoate et les acides férulique, p-coumarique, vanillique et cinnamique, peuvent agir comme chimioattractant pour les microbes du sol comme les espèces *Pseudomonas* et *Rhizobium*. (Khazi et al., 2015)

**Table 6:** Les microorganismes qui contribuent dans la dégradation de phénol (Khazi et al., 2015)

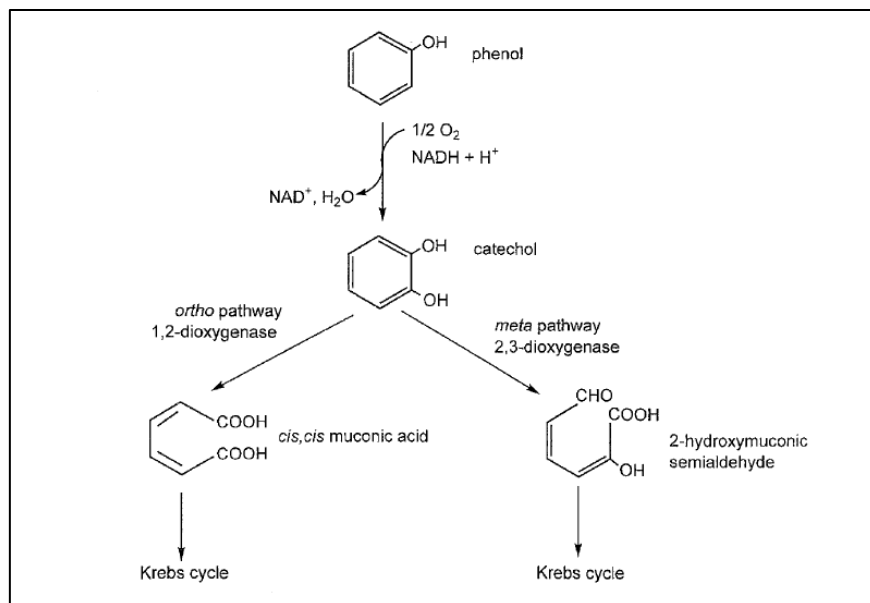
Micro-Organismes	Genre	Espèce
<b>Bactéries</b>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Alcaligenes xylooxidans</i> Y234
	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter species</i> <i>Arthrobacter citreus</i> <i>Arthrobacter chlrophenolicus</i> A6
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas pictorum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 4996 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Cyanobacterium</i>	<i>Cyanobacterium synechococcus</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus species strain PHN 1</i> <i>Bacillus brevis</i>

### VI.1. Biodégradation aérobie :

Au cours de la première étape de la voie aérobie de biodégradation du phénol, la molécule de l'oxygène est utilisée par l'enzyme phénol hydroxylase pour ajouter un deuxième groupe hydroxyle en position ortho à celui déjà présent. La réaction nécessite un nucléotide pyridine réduit (NADH<sub>2</sub>). La molécule de catéchol (1,2-dihydroxybenzène)

## Biodégradation de phénol

résultante peut ensuite être dégradée par deux voies alternatives, en fonction de l'organisme responsable. Dans la voie ortho- ou bêta-cétoadipate, le cycle aromatique est clivé entre le catéchol hydroxyle par une catéchol 1,2 dioxigénase (fission de l'intradiol) Preuve préliminaire de la production de bêta-cétoadipate lors de la dégradation du phénol par la souche '*Vibrio* 01' a été présenté pour la première fois par Evans (1947) et Kilby (1948). Le muconate cis, cis résultant est ensuite métabolisé, via le bêta-cétoadipate, en intermédiaires du cycle de Krebs. Dans la voie méta, la fission de l'anneau se produit à côté des deux groupes hydroxyle du catéchol (fission de l'extradiol). L'enzyme catéchol 2,3-dioxigénase transforme le catéchol en 2 semi aldéhyde hydroxymuconique. Ce composé est ensuite métabolisé en intermédiaires du cycle de Krebs. (Fig. 1) (Khazi et al., 2015)



**Figure 2:** la biodégradation aérobie de phénol

### VI.2. Biodégradation anaérobie :

Le phénol peut également être dégradé en l'absence d'oxygène. Le premier rapport de dégradation du phénol en l'absence d'oxygène concernait la dégradation de ce composé dans des conditions méthanogènes et, par la suite, la dégradation du phénol a également été signalée dans des conditions de réduction des nitrates, des sulfates et du fer.

Les premières voies proposées pour la dégradation anaérobie du phénol étaient basées sur l'analogie avec la voie anaérobie du benzoate proposée pour *Paracoccus*

*denitrificans* dans les années 1970. La réduction du cycle aromatique en cyclohexanol a été proposée pour précéder la fission du cycle dans des conditions dénitrifiantes et méthanogènes. Bien que cette voie de réduction du cycle soit encore souvent citée dans la littérature, aucun rapport ne confirme son absence. (Young et *al.*, 2007)

### **VII. Facteurs affectant la biodégradation de phénol :**

Le phénol inhibe l'activité innée de la plupart des types de micro-organismes à des concentrations plus ou moins élevées, donc il n'est pas facilement biodégradable. De plus, les contributions à l'efficacité totale de la biodégradation dans la flore autochtone mixte ne peuvent pas être bien décrites. Par conséquent, des études métaboliques et cinétiques de cultures mixtes pures ou définies avec précision sont nécessaires pour estimer le paramètre cinétique de la croissance et modéliser le bioprocédé fonctionnant dans un type de bioréacteur approprié. De plus, les performances des systèmes de traitement biologique dépendent largement de la compréhension fondamentale du substrat toxique. Utilisation essentielle pour définir les conditions opératoires pour des composés efficacement éliminés lors de la bioremédiation. Divers facteurs sont connus pour influencer la cinétique des micro-organismes, notamment la température, le pH, la disponibilité de l'oxygène dissous et la force toxique. (Young et *al.*, 2007)

### **VIII. Les voies biologiques de la biodégradation des polluants :**

L'action des microorganismes dans la défense de l'environnement relève d'une constatation ancienne. En effet, la microbiologie du sol peut contribuer efficacement à accélérer la transformation de la plupart des polluants inorganiques et organiques. Pour ce dernier, la bioremédiation consiste en une élimination complète d'un composé (biodégradation). (Koller, 2009 D )

En plus de la biodégradation, le terme de "biotransformation" est plus précis car, beaucoup de substances sont transformé en produits de structure moléculaire comparable au lieu d'être dégradés.

La transformation ou la destruction par la voie biologique des polluants implique trois principaux processus :

## Biodégradation de phénol

**Table 7:** Les voies biologiques de la biodégradation des polluants(Koller, 2009 D) .

<b>Voie biologique</b>	<b>Processus</b>
<b>Minéralisation (dégradation direct)</b>	Le polluant joue le rôle de substrat pour la croissance des microorganismes. Dans le cas optimal, les molécules organiques polluants sont transformées en CO <sub>2</sub> et en eau ; il y a minéralisation. Les microorganismes récupèrent de l'énergie.
<b>Co-métabolisme (dégradation indirect)</b>	Ce processus concerne notamment les hydrocarbures polycycliques, les composés halogénés aliphatiques et les pesticides. Donc cette voie permet de transformer des polluants réfractaires en substrat qui pourront eux être minéralisés.
<b>Accepteur d'électron</b>	Comme l'oxygène dans la respiration classique, le polluant peut aussi devenir un accepteur d'électron.

### **IX. Biofilm :**

L'origine de la recherche en microbiologie est souvent associée aux observations d'Antone Van Leeuwenhoek qui, au XVIIe siècle et grâce à un microscope de son invention, mit en évidence la présence d'organismes microscopiques à la surface de ses dents.

En 1933, Arthur Henrici plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement. En 1943, Claude Zobell montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension.

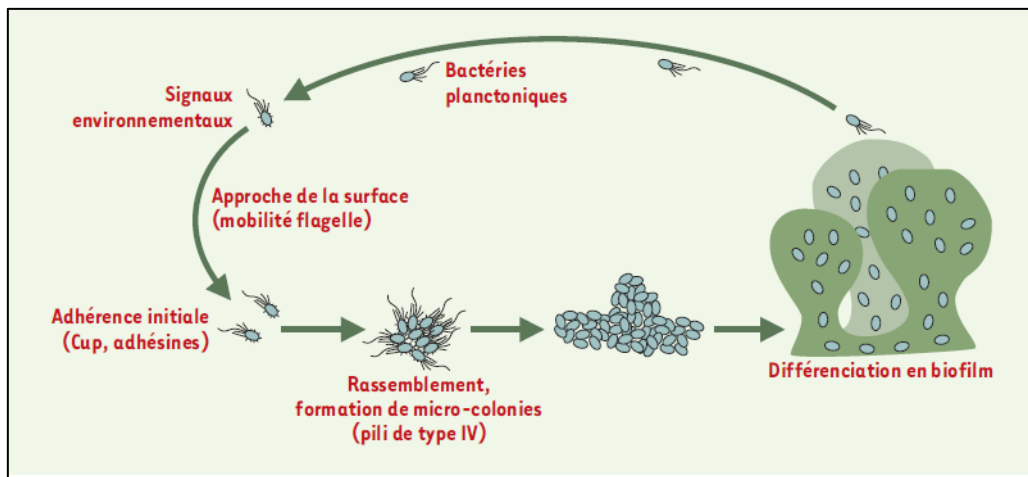
En fin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines. Présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (surface des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires etc.), elles sont appelées biofilms (Roux et Ghigo, 2006).

#### **❖ Définition :**

Biofilm est une communauté de microorganismes (bactéries, champignons, autres) fixée à une surface et maintenue par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. Les biofilms sont ubiquitaires, ils concernent le monde animal, végétal, minéral, aquatique, technologique. C'est une structure vivante, dynamique, en perpétuel remaniement. Leur effet est souvent perçu comme délétère car les aspects médicaux (infections nosocomiales sur dispositifs invasifs) et technologiques (**sludge** = obstruction des tuyauteries, perte de glisse des coques de bateaux) sont mis au premier plan. Ils ont aussi des effets positifs. (Sansone et Philippe, 2017)

### **IX.1. Les étapes principales pour la formation d'un biofilm :**

L'accumulation d'un biofilm sur une surface est le résultat de processus physiques, chimiques et biologiques nécessitant quelques heures à quelques semaines selon le système. Cinq étapes, se distinguent sur la Figure 3. (Delille, 2007)



**Figure 3:** Modèle de formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (Vallet et al., 2003)

➤ **1<sup>ère</sup> étape:**

Conditionnement de la surface : la phase de transport et d'attachement des cellules vers un substrat, ainsi que la création de ce qu'on appelle un film de conditionnement.

➤ **2<sup>ème</sup> étape:**

Mouvement bactérien vers la surface conditionnée : l'adhésion des cellules de façon réversible avec la production d'EPS.

➤ **3<sup>ème</sup> étape:**

Adhérence à la surface : le début de la croissance microbienne et de l'évolution de l'architecture du biofilm avec le développement des micro-colonies primaires.

➤ **4<sup>ème</sup> étape:**

Ancrage à la surface : la maturation du biofilm avec le développement des colonies.

➤ **5<sup>ème</sup> étape:**

Détachement /planctonisation : le détachement microbien ou le détachement de colonies de biofilm en réponse aux conditions hydrodynamiques.

Suite au détachement, les microorganismes (ou colonies) sont dispersés à nouveau dans le milieu environnant, où ils peuvent coloniser d'autres portions de la surface. (Cecilia, 2017) (Sansonetti et Philippe, 2017)

## IX.2. les différents types de biofilm bactérien :

### a) Biofilm multi-espèce :

La plaque dentaire est un modèle de biofilm multi-espèce, largement étudié, et qui met en évidence le rôle indispensable du recrutement des bactéries planctoniques dans le développement de certains biofilms. En effet, la constitution de la plaque dentaire est conditionnée, en premier lieu, par l'adhésion de bactéries pionnières, capables d'adhérer au niveau de l'email dentaire conditionné par des sucres (streptococcies et actinomyces), puis du recrutement séquentiel d'espèces colonisatrices secondaires puis tardives. L'ordre de cette succession est rendu possible grâce à des interactions cellule-cellule spécifiques qui induisent la congrégation intra-, inter- ou multi-espèce. (Elkhoury, 2021)

### b) Biofilm mono-espèce :

Contrairement aux biofilms multi-espèces, les mécanismes moléculaires impliqués dans le recrutement des cellules planctoniques dans un biofilm mono-espèce sont moins connus. Les études menées par (Houry, Briandet et al. 2010, Houry, Gohar et al. 2012) sur la formation du biofilm en flow-cell par *Bacillus cereus*, ont montré que la mobilité est indispensable pour que les bactéries planctoniques puissent pénétrer dans un biofilm.

L'intégration dans le biofilm dépend de l'âge du biofilm. Un biofilm âgé de 24 h est capable de recevoir huit fois plus de bactéries planctoniques par rapport à un biofilm de 72 h. L'accroissement de la densité des exo-polysaccharides et donc de la viscosité de la matrice, entre 24 h et 72 h, peut expliquer ce résultat. (Elkhoury, 2021)

## IX.3. Facteurs affectant la formation d'un biofilm :

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux Facteurs :

### ✓ Caractéristiques de la surface :

Le contact d'un matériau avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm .La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la

## **Biodégradation de phénol par le biofilm des *Pseudomonas* et *Bacillus***

---

présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface.

➤ **La rugosité** : plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies.

➤ **Propriétés physico-chimiques de la surface :**

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Téflon ou d'autres matières plastiques.

➤ **la présence préalable de films protéique :**

La présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilm (Bellifa, 2014).

✓ **Caractéristiques du milieu :**

Le mode de culture est une caractéristique importante qui peut modifier fortement l'adhésion des organismes ainsi que les conditions environnementales telles que :

➤ **la température :**

Est importante parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes.

➤ **Concentrations en nutriments :**

Dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm.

c-Composition de milieu : présence de calcium, magnésium, phosphate, glucose ...etc., semble faciliter l'adhésion à un support (Marie, 2010).

#### **IX.4. Microorganismes produits le biofilm :**

**Table 8:** les microorganismes forment le biofilm

<b>Types</b>	<b>espèces</b>
<b>Bactéries</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Staphylococcus epidermis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>

#### **IX.5. Biodégradation des polluants organique par le biofilm des bactéries d'intérêts :**

Le composant microbien du sol joue un rôle essentiel dans le maintien du sol vivant et fonctionnel, exerçant plusieurs fonctions indispensables telles que la formation du sol, la décomposition de la matière organique morte, le cycle des macro/micronutriments et l'élimination/la transformation des produits chimiques toxiques en formes non toxiques. (A.K. Saxena *et al.*, 2019)

La bioremédiation est le processus d'utilisation de micro-organismes in situ ou ex situ pour nettoyer un site contaminé (sol, eau ...etc.). Les micro-organismes décomposent les composés nocifs à l'aide des enzymes, qui sont des protéines spécifiques qui contrôlent les réactions dans les cellules vivantes. Les micro-organismes qui produisent des enzymes capables de dégrader les dériver pétrolés sont utiles pour décontaminer les déversements de pétrole. Certains micro-organismes courants capables de dégrader ce type de polluant sont *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Rhodococcus* et *Bacillus*. Nous avons observé que le *B. thermoleovorans* obligatoirement aérobie et thermophile, capable de dégrader les alcanes à longue chaîne à 80°C, ne se développait pas dans un système de culture secoué et défavorable au biofilm. (Morikawa, 2005)

### 1) *Pseudomonas* :

Le genre *Pseudomonas* et les espèces voisines comprennent des bactéries largement distribuées dans l'environnement, et dont certaines sont d'importants pathogènes pour l'homme. Ce sont des germes résistants à de nombreux antibiotiques. *P. aeruginosa* est responsable de toute une gamme d'infections, en particulier de plaies de l'arbre urinaire, ou septicémiques. (shears et Paul, 1997)

*Pseudomonas aeruginosa* a été un organisme modèle pour l'étude de la formation de biofilm. De plus, d'autres espèces de *Pseudomonas* utilisent la formation de biofilm pendant la colonisation des plantes et la persistance environnementale. Les *Pseudomonas* produisent plusieurs molécules de matrice de biofilm, notamment des polysaccharides, des acides nucléiques et des protéines. Les composants de matrice accessoires qui facilitent la formation de biofilm et l'adaptabilité dans des conditions variables sont également produits par les *Pseudomonas*. L'adaptation facilitée par la formation de biofilm permet la sélection de variantes génétiques avec une morphologie de colonie unique et distincte. (Wozniak et al., 2015).

### 2) *Bacillus* :

Les espèces du Genre *Bacillus* appartiennent au *phylum* des firmicutes et à la famille des *Bacillaceae*. Ce groupe comprend 8 espèces génétiquement très proches : *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. cytotoxicus*. Parmi ces espèces, quatre sont pathogènes : *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. cytotoxicus*. Ce sont des bactéries en forme de bacille, sporulantes, flagellées, ubiquitaires et aérobies facultatifs. Leur température de croissance optimale varie de 25°C à 37°C, sachant que des membres psychrophiles ou thermophiles sont capables de croître à des températures de 4°C ou 53°C. La plupart des souches sont catalase positive et possèdent une flagellation péritriche. (ElKhoury, 2021)

Le genre *Bacillus* est l'un des genres bactériens prédominants trouvés dans le sol, et plusieurs espèces de ce genre ont été signalées dans diverses niches écologiques et sont dotées d'une énorme diversité génétique et métabolique, *Bacillus* spp. remplissent de multiples fonctions environnementales dans l'écosystème du sol. (A.K. Saxena et al., 2019)

Plusieurs espèces de *Bacillus* peuvent se détériorer matières premières, par exemple les machines de la fabrication du papier. Ils sont fréquemment le contaminant microbien

## **Biodégradation de phénol par le biofilm des *Pseudomonas* et *Bacillus***

---

dominant parce que leurs spores résistantes à la chaleur. *B. cereus* est capable d'intoxication alimentaire et classé dans la catégorie des risques biologiques (Kolari et *al.*, 2001). La formation de biofilm protège les bactéries contre les agents antimicrobiens. Les bacilles peuvent former des biofilms sur les surfaces qui sont riches en nutriments. (Kolari et *al.*, 2001)

En raison de leur grande polyvalence physiologique, les espèces de *Bacillus* peuvent survivre dans divers environnements comme les usines de fabrication, le sol et l'eau...etc., ce qui entraîne un risque élevé de détérioration de l'environnement et de propagation potentielle des maladies. (Ostrov, 2020)

**Partie II :**  
**Matériels et Méthodes**

## I. Echantillonnage :

### I.1. site de prélèvement :

Dans la région d'une station de service de la ville de Laghouat, trois échantillons ont été prélevés à partir d'un sol contaminé par les dérivés pétrolier (huiles, gasoil...etc.) (fig. 4).

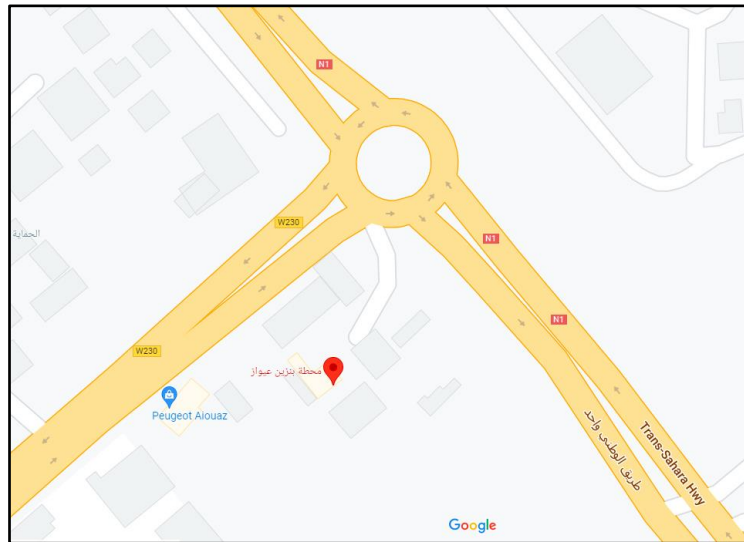


Figure 4 : Localisation de site de prélèvements (Google maps)

### I.2. Méthode d'échantillonnage :

Il existe plusieurs méthodes et normes d'échantillonnage des sols peut être adapté ou simplifier, pour l'étude des sols polluée par les dériver pétroliers .l'échantillonnage des sols doit donc être spécifique car il s'adresse des voies d'expositions qui ne sont pas le même (Laperche, 2004).

Les échantillons ont été exécuté en 2022, à partir d'une station de service de la région Trans-Sahara Hwy, Laghouat, trois prélèvements du sol polluée ont été réalisé à l'aide d'une spatule stérile à une profondeur de 3 à 5 cm, les échantillons sont transporté au laboratoire dans des pots stérile (fig. 5)

### I.3. Analyse macroscopiques :

Les caractéristiques des trois échantillons des sols prélevés sont groupées dans le tableau suivant :

Tableau 9: caractéristiques physiques du sol prélevé

Echantillon	Odeur	Couleur
A	forte	Marron foncé
B	forte	marron
C	modéré	Marron claire



Figure 5: Les échantillons du sol prélevé

## II. Analyses microbiologiques :

### II.1. Isolement de la flore bactérienne cultivable des sols :

#### II.1.1 Préparation des dilutions :

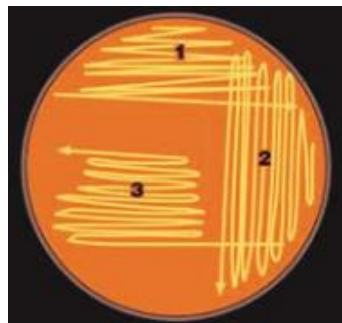
A partir des trois échantillons de sol polluée, nous avons préparé **3** solutions mère, en mettant 1g du sol sec dans **9** ml de l'eau physiologique stérile, les trois solutions mère en subit une série de dilution de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  (fig. 6) .pour l'homogénéisation des suspensions, une agitation par vortex est faite pour un maximum de libération de cellules dans la suspension et de précision. L'étalement sur le milieu gélosé est réalisé avec le milieu Luria Bertani (annexe 01), un volume de **100**  $\mu$ l de suspension est déposé sur la surface de la gélose, ensuite étalé par un râteau construit à l'aide d'une pipette pasteur (technique d'inondation). Les boites ont été mises en incubation à **30°C** pendant 24 à 48 heures.



**Figure 6:** Dilution décimale des trois échantillons

### II.1.2. Purification :

Après incubation, des cultures bactériennes hétérogènes ont été obtenus avec des différents aspects de colonies. Afin d'obtenir des cultures pures, et de récupérer les bactéries d'intérêt, nous avons procédé à la technique d'épuisement pour la purification des souches bactériennes (fig. 7). Le milieu utilisé pour la purification c'est le milieu LB et les boites de pétrie sont incubées à 30°C pendant 24h.



**Figure 7:** Etalement par technique des cadres

### II.1.3. Identification :

#### ➤ Ensemencement en King A et King B :

Le milieu de **King A** permet la détection de la synthèse de pyocyanine, pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique). Utilisé en parallèle avec le milieu de **King B** (détection de la pyoverdine), il permet d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* (KING E.O., 1994). A partir des colonies bactériennes pures

suspecté *Pseudomonas*, nous avons ensemencé chaque type dans des tubes contenant les milieux sélectif King A et King B, l'ensemencement est fait selon la technique des stries sur la pente de la gélose King A et B (Annexe 01). Les tubes sont incubés à 30°C pendant 7 jours jusqu'à apparition des colonies et de pigmentation.

### ➤ **Ensemencement en milieu Chapman :**

Le milieu de Chapman est utilisé pour l'isolement des Staphylocoques pathogènes qui donnent des colonies jaunes par fermentation du mannitol et virage du rouge de phénol. Sa forte teneur en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des autres espèces (Laboratoire Humeau, 2012). L'ensemencement se fait par la technique encadrant et les boîtes ont été incubées pendant 24h à 30°C.

### ➤ **Ensemencement en milieu Hektoen :**

La gélose Hektoen est un milieu sélectif différentiel des bactéries entéro-pathogènes, particulièrement de *Salmonella* et de *Shigella*. La composition du milieu permet la différenciation des colonies fermentant rapidement un des 3 sucres (virage du bleu au rouge-saumon) et/ou produisant de l'H<sub>2</sub>S (centre noir) (Laboratoire Humeau, 2010). L'ensemencement se fait par la technique encadrant et les boîtes ont été incubées pendant 24h à 30°C.

### ➤ **Coloration de Gram :**

La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- est un critère systématique important pour la classification des bactéries. En outre, la coloration de Gram reste une étape essentielle dans la distinction des gram + et les gram – ainsi elle nous a permis de visualiser facilement les bactéries en terme de leur forme et leur mode de regroupement et leurs tailles.

### ➤ **Test catalase :**

Le test catalase se fait à partir de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il facilite la détection de l'enzyme catalase chez les bactéries. Et principalement utile pour différencier entre les genres et les bactéries aérobies et anaérobies strict, car les anaérobies sont généralement connue pour manquer de cette enzyme (Reiner, 2010).

### ➤ **test oxydase :**

C'est une réaction biochimique tester la présence de cytochrome oxydase, un enzyme parfois appelé indophénol oxydase. En présence d'un organisme qui contient l'enzyme de cytochrome oxydase, le réactif incolore réduit devient un produit coloré oxydé (violet) (Cathcart, 2010).

### III. Sélection des souches susceptible de dégrader le phénol :

#### III.1. Culture minérale :

Le phénol c'est un hydrocarbure aromatique qui peut être dégradé par des différents microorganismes. Ces derniers utilisent le phénol comme source de carbone (Viraj krishna Mishra, 2017).a pour but de sélectionner les bactéries qui utilise le phénol comme seule source de carbone pour leur croissance, Nous avons utilisé un milieu minéral (annexe 01) pour la culture des bactéries en mettant le phénol comme seul substrat.

Dans des conditions d'asepsie, un volume de phénol de 200 µl prélevé d'une solution de (0.1%) (Annexe) et qui correspond à une concentration de 44 mg/L, est ajouté dans des flacons contenant un volume de 45 ml de milieu minérale (MM), ensuite, chaque isolas bien purifier (**ES01- ES02- ES03- ES04- ES05- ES06- ES07- ES08- ES09- ES10**) est mis seul dans chaque flacon 100µl de la suspension. Des flacons témoin ont été préparés avec les mêmes étapes sans l'ajout de bactéries pour la comparaison des résultats. Les flacons ont été incubés à 30° C pendant 3 jrs.

Pour des résultats propres et pour obtenir des cultures variées de bactérie d'intérêt, nous avons utilisé dans cette étude une souche bactérienne nommée FSE (Tableau 10) et identifiée *Pseudomonas stutzeri*. Cette souche a été isolé à partir d'un sol d'un gisement pétrolier de la région de Hassi Messaoud en 2019 ; cette souche a été conservé à -20°C. Une revivication a été réalisé sur le milieu de culture riche LB pour l'obtention d'une biomasse microbienne.

Après l'ensemencement dans un milieu minéral en présence de 44 mg/L de phénol avec concentration de 0.1% à pH 7.

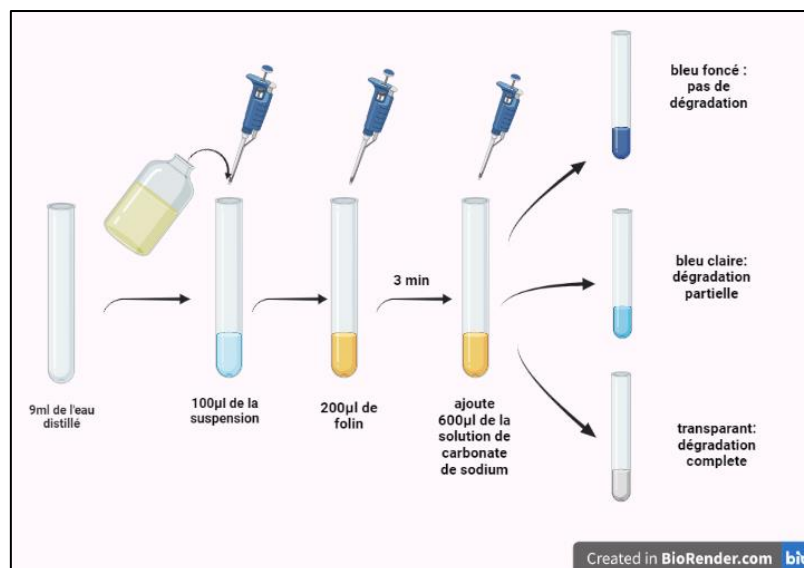
**Table 10:** Caractéristiques de l'espèce *Pseudomonas stutzeri*

Code	Identification	Aspect de colonie	Aspect microscopique	Pouvoir de dégradation de phénol
FSE	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	colonie sèche et ridée	Bacille à gram négative	Une capacité considérable de dégrader le phénol (Cafaro et al., 2004)



**Figure 8:** l'ensemencement sur le milieu minéral

### III.3. Dosage colorimétrique :



**Figure 9:** Préparation de dosage colorimétrique (Chellali, 2022)

## IV. Cinétique de la biodégradation de phénol :

Le phénol peut être affecté par plusieurs facteurs physico-chimique et biologique tel que la concentration de phénol. Dans notre étude on a essayé d'optimiser la capacité enzymatique de la dégradation de nos souches bactériennes qui sont obtenu à partir de repiquage des cultures jeune.

#### IV.1. La cinétique de phénol :

La première étape a été réalisée par la préparation des flacons qui contiennent le MM, les souches bactériennes bien purifiées ont été ajoutées avec une concentration de 44 mg/L de phénol, pour le but d'obtenir la valeur initiale de la concentration de phénol présente dans le surnageant et on a éliminé la biomasse bactérienne par la centrifugation pendant 15min. (fig.10)

Après les étapes de dosage colorimétrique on met les tubes dans un bain marie pendant 3min à 90°C. Ensuite les cuves ont été remplies par le surnageant pour la mesure de l'absorbance de phénol. D'un autre côté on a gardé un tube blanc à partir d'un flacon témoin de la première étape pour le calibrage du spectrophotomètre et un tube témoin pour le dosage colorimétrique.

A la fin on a fait la lecture des résultats dans une spectrophotométrie à DO 765nm. Cette étape pour la  $T_0$ , les étapes précédentes sont répétées chaque deux heures et les flacons ont été incubés à 30°C après chaque centrifugation.



**Figure 10:** élimination de la biomasse par la centrifugation pour le dosage colorimétrique de surnageant

#### IV.2. La cinétique de la biomasse :

Pour l'estimation de la biomasse microbienne issue de la dégradation de phénol, un volume de 2 ml de la culture minérale bien homogénéisée a été ajouté dans une cuve et placée dans le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm. Le calibrage a été fait à partir d'un blanc de milieu minéral seul.

Cette étape pour la  $T_0$ , les étapes précédentes sont répétées chaque deux heures.

## V. Formation de biofilms par les souches d'intérêt :

Les expériences de croissance du biofilms nécessitent de passer par des étapes principale

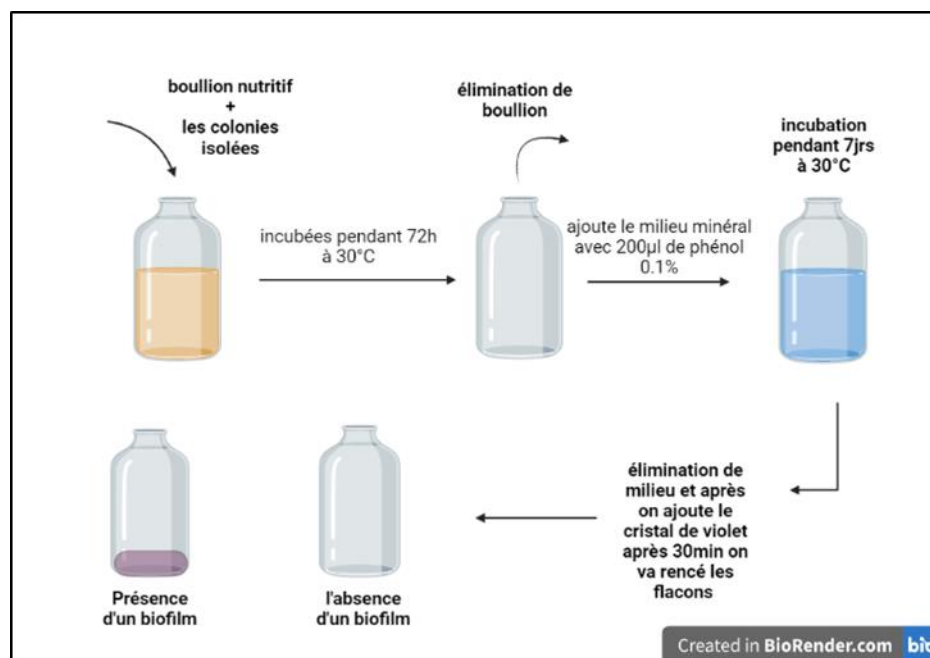
- La préparation des cultures bactériennes à partir des cultures (ES01+FSE) et (ES02+ES04) ure mixtes qui donne des résultats positive sur le test de la biodégradation de phénol
- La croissance du biofilms dans le bouillon (nutritif broth). (Cecilia, 2017).

### V.1. Préparation de milieu NB :

Après les résultats de test de biodégradation de phénol on a obtenir des colonies bien choisi (**ES02+ ES04** pour le genre *Bacillus*) + (**ES01+FSE** pour le genre *Pseudomonas*) ces souches sont hétérogènes isolées à partir des sites du sol différent.

Nous avons pris des colonies à partir des boites de milieu LB, en addition en prenant la biomasse de même échantillon à partir le milieu minérale après la centrifugation et en mettant dans des flacons contient le NB et en ajoute 200µl de phénol 0,1%.

Les flacons ont été incubé pendant 7jrs à 30C° Pour la formation d'un biofilm.



**Figure 11:** La technique de préparation d'un biofilm (Chellali, 2022)



**Figure 12:** La préparation d'un biofilm

**Partie III :**  
**Résultats et Discussion**

## I. Evaluation et étude de la flore microbienne :

### I.1. Etude qualitative de la flore microbienne :

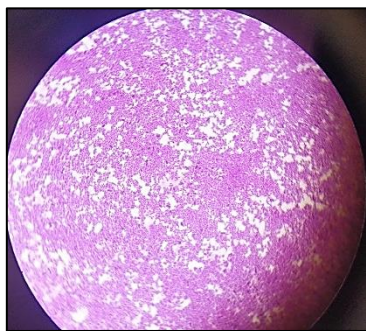
#### I.1.1. Aspect macroscopique des colonies isolées :

Le Tableau (8) regroupe les résultats de l'examen macroscopique des différentes colonies isolées à partir du sol contaminé par les dérivés du pétrole.

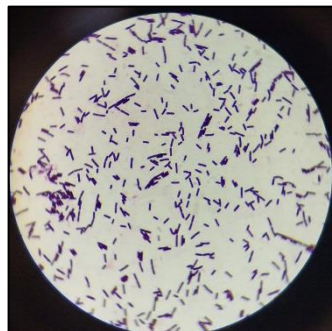
**Table 11:** Aspect macroscopique des colonies isolées

Souches	Chromogènes	contour	Surface	Consistance	forme
ES01	jaune	régulière	lisse	Crémeuse	Rond
ES02	beige	régulière	lisse	Crémeuse	Rond
ES04	beige	régulière	lisse	Crémeuse	Rond
<i>Pseudomonas stutzri</i>	jaune	régulière	lisse	Crémeuse	Rond

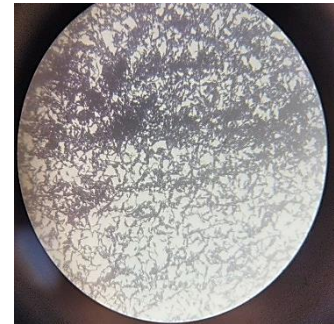
#### I.1.2. Aspect microscopique des souches isolées :



ES01



ES02



ES04



ES01



ES02



ES04

**Figure 13:** Aspect microscopique et macroscopique des colonies isolées  
(Réalisé par nous-même)

L'observation microscopique (figure 14) a été réalisée après une coloration de Gram. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 11 (annexe 02). Et les résultats des souches d'intérêt ont été dans le tableau

Les résultats montrent une variété de type bactérien, les souches isolées ont des formes différentes : des bacilles, des coccobacilles et des Cocci. Elles sont assemblées en différents arrangements soit en amas, en paires, ou isolées. Elles présentent aussi une paroi de Gram positive ou négatives.

**Table 12:** Résultats de coloration de Gram

souches	Coloration de Gram
ES01	Négative
ES02	Positive
ES04	négative

Les souches les plus fréquemment décrites dans la biodégradation des hydrocarbures appartiennent aux genres de Gram négative comme les *Pseudomonas*. D'autres souches Gram positive comme les *Bacillus* ont la capacité de dégradation des hydrocarbures assez large (Vandercasteele, 2005 ; Boudierhem, 2011).

## **I.2. Analyses biochimiques :**

Le Tableau (09) regroupe les résultats tests biochimiques qui ont été réalisés sur les trois souches bactériennes ES01, ES02 et ES04.

**Table 13:** Résultats de tests des enzymes respiratoires :

Souches bactériennes	Test catalase	Test oxydase
ES01	Positive	Positive
ES02	Positive	Négative
ES04	Positive	Positive

## **I.4. Croissance sur les milieux sélectifs :**



**Figure 14:** Aspect cultureux des souches bactérienne sur le milieu Chapman et Hektoen (Réalisé par nous-meme)

Les bactéries à Gram positives comme bacille peuvent se développer sur milieu Chapman (Shears et Paul, 1997).

Le milieu Hektoen est utilisé pour inhiber la croissance des bactéries à Gram positives. Les souches sont présentées sur la figure (15) ES01, ES02 et ES04 respectivement. Les souches ES02 et ES04 ont la capacité de se développer sur le milieu Chapman, par contre ils n'ont pas poussés sur le milieu Hektoen.

La souche ES01 a pu pousser sur le milieu Hektoen, et ne pousse pas sur le milieu Chapman.

#### **I.4.1. La croissance sur le milieu King A et King B :**

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

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

On observe la formation de colonies non pigmentées sur King a et King b pour la souche ES04 ce résultat ne peut pas totalement éliminer la possibilité la présence d'un *Pseudomonas aeruginosa*. Et pour la souche ES01 pu pousser sur les deux, par contre la souche ES02 pousse sur le King a et ne pousse pas sur le King b. Donc il est nécessaire de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce précise. (KING E.O., 1994)

## **I.5. Identification des souches isolées :**

### **I.5.1. Les souches ES01 :**

En raison de leur morphologie de forme de Cocco bacille, Gram négative, catalase positive, oxydase positive, sur les milieux King a et King b, la souche ES01 se développe sur les deux milieux ; et elle a la capacité de dégrader le phénol, donc ce souche peut être affiliée au genre *Pseudomonas*, espèce non identifié, *Pseudomonas* a la capacité de se développer sur milieu Hektoen. (Madigan et Martinko, 2010 ; Singleton, 1999).

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est caractérisée par la production des pigments de pyocyanine et pyoverdine sur milieu King A et King B. Ces pigments diffusent dans les cultures sur gélose et les colonies colorent le milieu en bleu verdâtre ou jaune verdâtre (Marchal et al., 1991 ; Singleton , 1999).

Elle est connue par sa capacité à biodégrader les composés hydrocarbonés. En effet, plusieurs chercheurs l'ont isolé à partir des sols contaminés par les hydrocarbures (Sifour et al. 2007 ; Chabouni ; 2008 ; YIN et al., 2009 ;Lotfabad et al., 2009 ).

### **I.5.2. Les souches ES02 et ES04 :**

Après l'examen microscopique, leur morphologie de forme de grande bacille, Gram positive, catalase positive, oxydase négative, la souche ES02 qui pousse juste sur le milieu King A par contre la souche ES04 ne se développe pas sur les deux milieux ; ces souches elles ont la capacité de dégrader le phénol, peuvent-être affiliée au genre *Bacillus*, espèce non identifié (Lotfabad et al., 2009). Selon Marchal et Boudron, *Bacillus* a la capacité de se développer sur milieu Chapman.

## **II. étude de la biodégradation de phénol :**

### **II.1. le test de la biodégradation de phénol :**

*Pseudomonas. Sp* et *Bacillus. Sp* ont la capacité de dégradé le phénol comme une source de carbone et d'énergie pour leur croissance. Le résultat a été confirmé par la disparition des traces de phénol en présence de la bactérie dans la culture minérale de phénol. Ce résultat est révélé par le dosage colorimétrique de phénol (figure 16).



**Figure 15:** Résultats de dosage colorimétrique de phénol.

**Table 14:** Résultats de dosage colorimétrique de phénol

Echantillons	Résultats
ES01	Bleu clair (dégradation incomplète)
ES02	transparent (dégradation complète)
ES04	Bleu clair (dégradation incomplète)

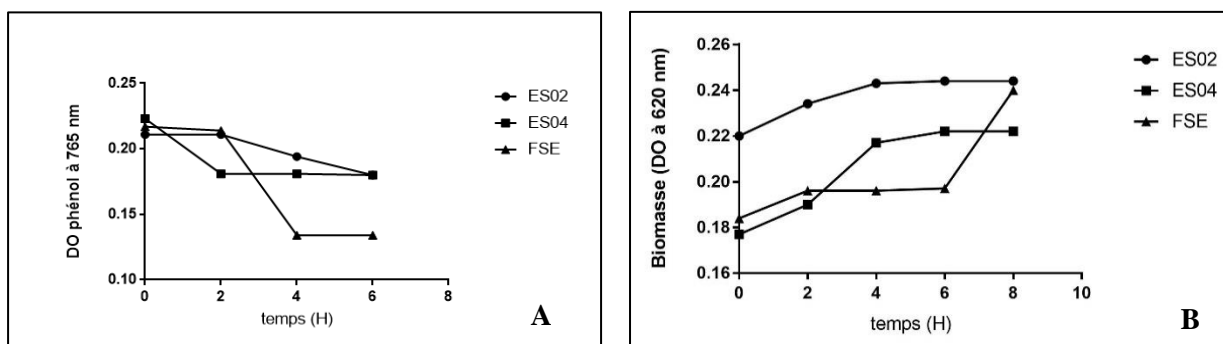
Selon les travaux des chercheurs (Emtiazi et *al.*, 2005 ; Sahar zaki, 2006 ; Varma et *al.*, 2008 ; Zlatka et *al.*, 2007 ; Sgountzos et *al.*, 2006) plusieurs espèces bactériens isolé à partir d'un site contaminé par le pétrole et les dérivés pétroliers ont capable de dégradé le phénol comme seule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

Les principaux microorganismes isolés et étudiés dans la dégradation du phénol sont : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas corrugata* (Heinaru et *al.*, 1999). *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Ralstonia*, (Zaki, 2006). Ces microorganismes ont des propriétés physiologiques et un système enzymatique approprié.

### III. Etude de la cinétique de la biodégradation de phénol :

Nous avons observé que ces souches bactériennes : ES01, FSE, ES02, ES04 sont capable d'assimiler parfaitement le phénol comme seule source de carbone. Pour l'étude de la cinétique de la dégradation de phénol, le suivie de l'assimilation de phénol et le développement de la biomasse microbienne est fait chaque 2 heures (voir la partie matériels et méthodes).

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de graphes qui montrent la dégradation de phénol et l'augmentation de la biomasse au cours de temps.



**Figure 16:** **A** : la dégradation de phénol au cours de temps par des cultures bactériennes ES02, ES04 et FSE. **B** : l'augmentation de la biomasse bactériennes au cours du temps des cultures ES02, ES04 et FSE.

Le résultat obtenu de la métabolisation de phénol par les bactéries compétentes montre que la concentration initiale de 44 mg/L de phénol a été directement assimilée par la souche ES04 dans les premières heures mais il y avait un arrêt de dégradation au bout de 2h (une dégradation incomplète),

Pour la souche *Pseudomonas strutzeri* (FSE) la dégradation est initiée après une phase de latence de 2h ensuite il y avait une dégradation rapide de phénol et un arrêt de métabolisation après 4h d'incubation.

Pour la souche ES02, la dégradation de phénol est commencée après une phase de latence de 2h, ensuite on a remarqué une dégradation très lente et non complète.

Pour la biomasse bactérienne des 3 cultures bactériennes, on remarque qu'il y a une corrélation négative entre la consommation de phénol et l'augmentation de biomasse.

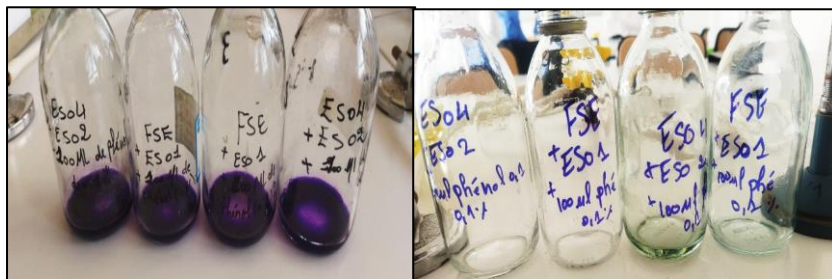
L'expérience de la biodégradation de phénol par l'espèce *Pseudomonas putida F1* selon (F. Reardon et al., 2000), a montré que la biodégradation ça a pris longtemps ; car la consommation de phénol 50 mg/L elle été très lente en même temps avec la biomasse. Aussi selon (F. Amrouche et al., 2011) la biodégradation des différentes concentrations de phénol (100 à 800 mg/L) par des cellules non adaptées prennent plus de temps, et la vitesse de biodégradation maximale a été observée pour une concentration en phénol de 100 mg/L ; et ça dû à l'inhibition de souche bactérienne autochtone qui ne tolère pas la toxicité du phénol.

En comparaison avec notre étude il y a plusieurs possibilité pour la biodégradation de phénol sont suivant :

- Nos bactéries sont non adaptées et demandent une phase d'adaptation qui participe à la préparation enzymatique et l'activation ce certains gènes.
- Les facteurs physico-chimiques de cette étude par exemple l'absence d'agitation mécanique, ou l'exigence de d'autre facteur comme la température, le pH...etc.

#### IV. Test de biofilm :

Le test de la formation de biofilm à partir des cultures mixtes de *Pseudomonas* (ESO1+FSE) et de *Bacillus* (ES02+ES04) (voir la partie matériels et méthodes), nous avons eu un résultat négatif après l'ajout de cristal violet, qui est traduit par le non formation d'un biofilm microbien par les souches bactériennes isolés (fig.18).



**Figure 17:** Test de formation d'un biofilm microbien (par le cristal violet)

La majorité des bactéries sont capables de se développer dans des biofilms adhérant aux surfaces abiotiques et biotiques. Un biofilm est défini comme une communauté microbienne structurée, dont le développement nécessite un changement significatif de la physiologie bactérienne et se traduit par une tolérance accrue aux stress exogènes. Les biofilms bactériens peuvent former une monocouche ou, le plus souvent, des multicouches dans lesquelles les bactéries sont fixées à la surface et aux bactéries voisines par une matrice extracellulaire constituée de polysaccharides, de protéines et d'ADN (Wolska, 2015) par exemple les *Pseudomonas* et les *Bacillus* produisent plusieurs molécules de matrice de biofilm, notamment des polysaccharides, des acides nucléiques et des protéines. Les composants de matrice accessoires sont également produits par ces bactéries qui facilitent la formation de biofilm et l'adaptabilité dans des conditions variables. (Wozniak, 2015).

Dans des conditions défavorables, la synthèse des composés de la matrice diminue et la matrice est clivée par voie enzymatique, conduisant à la dispersion du biofilm. (Wolska et *al.*, 2015)

L'activation de certaines voies de stress a été associée à des fonctions telles que la détection de surface par la perception d'une perturbation membranaire. Le stress membranaire, déclenché par les interactions **bactérie-surface** et **bactérie-bactérie** pourrait donc constituer un signal naturel pour l'activation de plusieurs voies de régulation qui favoriseraient la stabilisation et/ou la maturation du biofilm (GHIGO et *al.*, 2005). Cependant, le rôle exact de ces réponses au stress dans la formation et la physiologie des biofilms matures reste une question ouverte. Parmi les facteurs affectant la formation d'un biofilm sont :

- Influences environnementale (température, pH...etc.)
- Influence microbienne (interaction entre les populations bactériennes, Quorum Sensing)
- Influence des substrats (la composition chimiques des surfaces)
- La régulation Quorum Sensing QS des gènes liés au biofilm chez *P. aeruginosa* dans l'environnement naturel et lors d'infections persistantes est considérée comme l'exemple le plus connu parmi toutes les espèces bactériennes. (Wolska et *al.*, 2015)
- L'inhibition du QS, également appelée quorum quenching, QQ, est considérée comme l'une des stratégies anti-biofilm prometteuses. (Wolska et *al.*, 2015)
- L'absence de certains éléments nutritifs et conditions physiques.

# CONCLUSION

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

Parmi les sites naturels qui contiennent des bactéries capables de dégrader les polluants organiques (hydrocarbures, phénol...etc.), la station de service de gasoil constitue un milieu important pour l'isolement des bactéries d'intérêt.

A partir de notre résultats il y a quelques souche (ES01, ES02, ES04 et FSE) qui sont capable de dégradé le phénol et utilisé le comme source de carbone.

L'étude cinétique de dégradation du phénol et l'augmentation de la biomasse, indiquée que ces souches utilisent le phénol comme source d'énergie pour leurs croissances.

A travers cette étude on ne peut pas montre que ces souches sont incapable de former un biofilm pour la biodégradation de phénol, donc les possibilités de la formation d'un biofilm peut affecter par divers facteurs biotiques et abiotiques comme par exemple les paramètres physico-chimiques (T°, PH ...etc.)

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

Il est envisageable de tester les bactéries isolés sur d'autres type de polluants organiques.

Il est possible d'utiliser les bactéries dans les procédés biologiques de la décontamination des milieux naturels tels que les eaux usées.

# BIBLIOGRAPHIE

- A.K. Saxena, M. K. (2019). Bacillus species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, p1583.**
- Abdelmajid, N. M. (2016). Les techniques de dépollutions des sols contaminées par les métaux lourds : une revue (the remediation techniques of heavy metals contaminated soils: review). *Maghrebian journal of pure and applied science*, P47-P49.**
- Agnès Roux, J.-M. G. (2006, Mars 16). Bacterial biofilm. paris.**
- Bouderhem Amel., 2011 utilisations des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodetection et la bioremediation des sols pollués par les hydrocarbures thèse de magister, spécialité Microbiologie, université d'Ouargla Kasdi Merbah.**
- Bidaud Christine., 2013. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques Polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué. Chemical and Process Engineering. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint- Etienne, 1998. French. NNT : 1998INPG4205.P. 39.**
- Cafaro, V., Izzo, V., Scognamiglio, R., Notomista, E., Capasso, P., Casbarra, A., ... & Di Donato, A. (2004). Phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2211-2219.**
- Cecilia, A. (2017, Mars 4). Etude expérimentale de la formation de biofilm sous conditions hydrodynamique contrôlée. Mécanique des fluides, France.**
- Chabouni S., 2008. Essai d'utilisation des souches bactériennes dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures « pétrole ». Mémoire de DES Microbiologie. Université Kasdi Merbah Ouargla. P. 78.**
- Chellali Ikram, Cheniba zineb et Djaid oum el saad. (**
- Chellali, I. (2022).**
- Delille, A. (2007, Novembre 15). Etude in situ, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premiers étapes de la formation d'un biofilm de pseudomonas fluorescens et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous. Nancy , département de formation doctorale, France.**
- Elkhoury, N. (2021, Mars 10). Intégration des bactéries planctonique dans le biofilm et étude fonctionnelle des gènes plasmidiques Bthur62720 chez *Bacillus thuringiensis*. Paris, Faculté des sciences d'orsay, France.**
- ElKhoury, N. (2021, Avril 16). Intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm et étude fonctionnelle du gène plasmidique Bthur62720 chez *Bacillus thuringiensis*. Paris, Bactériologie, France.**

- Emtiazi, G., Shakarami, H., Nahvi, I. and Mirdamadian, S. H. 2005. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *Escherichia* African Journal of Biotechnology Vol. 4 (2), pp. 172-176.
- F. Amrouche, A. N. (2011, Septembre 26). Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones librement suspendus dans un réacteur batch. Division Hydrogène, Centre de Développement des Energies Renouvelables, B.P. 62, Route de l'Observatoire, Bouzaréah, Alger, Algérie. Laboratoire des Sciences et Technique de l'Environnement, Ecole Nationale Polytechnique, B.P. 182, Avenue Hassen Badi, Alge, Alger.
- Gauthier-Dion, C. (2016, Janvier). Décontamination d'un sol pollué par des métaux lourds par des procédés de traitement physique et chimique. Québec, institut national de la recherche scientifique, Canada.
- Glossary of environment statistic . (2001, september 25). new york, USA.
- Haddoum Zahira, M. O. (2015). Adsorption de phénol sur le mésoporeux LaNiO<sub>3</sub>/SBA-15. Béjaia, Génie des procédés, Algerie.
- Hanna, K. (2004, Novembre 18). etude de la faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols : Solubilisation et l'extraction de polluants organiques par des cyclodextrines. lyon, laborator d'analyses environnementale des procédés et système industriels de l'INSA de Lyon, France.
- Heinaru Eeva., Jaak Truu., Ulrich Stottmeister et Ain Heinaru., 1999. Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds FEMS Microbiology Ecology 31 pp 195-205.
- Jullien, D. (2014, apr 3). La recherche des polluants dans les sols. Paris, INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques), France.
- Kenneth F. Reardon, D. C. (2000, August 20). Biodegradation Kinetics of Benzene, Toluene, and Phenol as Single and Mixed Substrates for *Pseudomonas putida* F1. Department of Chemical and Bioresource Engineering, Colorado State university, Colorado .
- Khazi Mahammediyas Basha, A. R. (2015). Recent advances in the Biodegradation of Phenol: A review. *Society of Applied Sciences*, P219.
- Koller, E. (2009 A). Environnement et pollution industrielle. Dans E. Koller, *Traitement des pollutions industrielles* (p. P4). Paris: Dunod.
- Koller, E. (2009 B). Pollution des sols. Dans E. Koller, *Traitement des pollutions industrielles* (pp. P365-P368). Paris: Dunod.
- Koller, E. (2009 C). Techniques de dépollution des sols. Dans E. Koller, *Traitement des pollutions industrielles* (pp. P357-P362). Paris: Dunod.

- Koller, E. (2009 D).** Techniques de dépollution des sols. Dans E. Koller, *Traitement des pollutions industrielles* (pp. p384-p385). Paris: Dunod.
- Koller, E. (2009 E).** *Traitement des pollutions industrielles*. paris: Dunod.
- Kumar, V. K. (2017).** Microbial Degradation of Phenol: A Review. *Journal of Water Pollution & Purification Research*, P 18.
- Lotfabadt. B., Shourianm., Roostaazadr., Najafabadia. R., Laurent P., Buchon L., Guespin-michel J. F. et Orange N., 2000.** Production of pectatylases and cellulases by *Chryseomonas luteola* strain MFCL0 depends on the growth temperature and the nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 1538-1543.
- M Kolari, J. N.-S. (2001).** Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, p344.
- Madigan. M., et Martinko. J., 2007.** Biologie des microorganismes 11<sup>e</sup> édition Pearson education, traduction française cordonnée par Daniel prieur. P 269.
- Marchal N., j.l. Bourdon., cl. Richard., 1991.** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 4<sup>ème</sup> édition, p 32, 39, 264,293, 294, 269, 270, 261, 262, 263, 265, 266, 230, 117, 118, 104, 105.
- marie, M. (2010, Novembre 17).** Etude des biofilm bactérienne arsénite -oxydants . Strasbourg, Science de vie, France.
- Morikawa, M. (2005).** Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, p1-p4.
- N. Bonnard, M.-T. B.-P. (2021, October).** Phénol.
- SAHAR ZAKI., 2006.** Detection of *meta*- and *ortho*-cleavage dioxygenases in bacterial phenol-degraders *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* 10 : 75 – 81.
- Samia, B. (2014, Juin 21).** Evaluation de la formation de biofilm de souche de *klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHT . Telemcen, Biologie, Algerie.
- Sansonetti, P. (2017).** L'union fait la force: les biofilms.
- Sifour M., Al-jilawi M. H. et Aziz J. M., 2007.** Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pak. J. Biol. Sci.*, 10 (8) : 1331-1335.
- Sgountzos I.N., S. Pavlou., C.A. Paraskeva et A.C. Payatakes., 2006.** Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* in sand beds during biodegradation of phenol *Biochemical Engineering Journal* 30 pp164–173.

- Toxicological profile for phenol. (2008, Septembre). Atlanta, Department of health and human services, USA.**
- Wozniak, E. E. (2015, april 25). *National Library of Medicine*. Récupéré sur NIH: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4409827/>**
- Vandecasteele J.P., Hermann M., 2005. Regulation of a Catabolic Pathway Lysine Degradation in *Pseudomonas putida* European Journal of Biochemistry Volume 31, Issue 1, p 80–85.**
- YIN H., QIANG J., JIA Y., YE J., PENG H., QIN H., ZHANG N. et HE B., (2009). Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry* 44 : 302–308.**
- Young, P. M. (2007). Biodegradation of Phenol: Mechanisms and applications. *Bioremediation Journal*, P 3.**
- Zlatka Alexieva., Maria Gerginova ., Plamena Zlateva. , Jordan Manasiev., Danka Ivanova et Nely Dimova., 2007. Monitoring of aromatic pollutants biodegradation *Biochemical Engineering Journal* 40 pp 233–240.**

# ANNEXE

## I. Annexe :

### I. Composition des milieux des cultures :

Milieu	PRODUIT	QUANTITE
<b>Milieu LB (Luria Bertani)</b>	<b>peptone</b>	<b>10g</b>
	<b>Extrait de levure</b>	<b>5g</b>
	<b>Na Cl</b>	<b>10ml</b>
	<b>agar</b>	<b>18g</b>
	<b>Eau distillée</b>	<b>1l</b>
	<b>ph</b>	<b>6,9-7,1</b>

<b>Milieu Minéral (MM)</b>	<b>Na CL</b>	<b>1g</b>
	<b>Mg so4</b>	<b>0.2g</b>
	<b>KH PO4</b>	<b>1.7g</b>
	<b>NH4cl</b>	<b>0.1g</b>
	<b>HK2po4</b>	<b>4.35g</b>
	<b>Ca Cl 2</b>	<b>0.03g</b>
	<b>Eau distillée</b>	<b>1L</b>
	<b>Ph</b>	<b>7,4</b>
<b>milieu Bouillon Nutritif (Nutritif Broth) :</b>	<b>Peptone</b>	<b>5g</b>
	<b>Extrait de levure</b>	<b>2.5g</b>
	<b>Na Cl</b>	<b>5ml</b>
	<b>Eau distillée</b>	<b>500ml</b>
<b>milieu Hektoen</b>	<b>Milieu déshydraté</b>	<b>19g</b>
	<b>L'eau distillée</b>	<b>250ml</b>

<b>milieu King A</b>	Milieu déshydrate de King A	<b>22.5g</b>
	Glycérol	<b>5ml</b>
	Eau distillée	<b>500ml</b>
<b>milieu King B</b>	Milieu déshydrate de King B	<b>18.5g</b>
	Glycérol	<b>5ml</b>
	Eau distillée	<b>500ml</b>
<b>Milieu Chapman</b>	Extrait de levures	<b>2.5g</b>
	Peptone de caséine	<b>10g</b>
	Gélatine	<b>30g</b>
	Lactose	<b>2g</b>
	Chlorure de sodium	<b>75g</b>
	Phosphate di potassique	<b>5g</b>
	Gélose	<b>12g</b>
	Eau distillée	<b>1L</b>
<b>Stérilisation 120C° Pendent 20 min</b>		

## **ANNEX : 02**

### **1. Test biochimique :**

#### **1.1. Solution de phénol :**

La solution de phénol utilisé dans l'étude de biodégradation est en raison **1%** en mettent 1g du phénol dans 100ml d'eau distillé stérile.

#### **1.2. Solution de carbonate de sodium Naco3 :**

20g de Naco3 ajouté dans 100ml de l'eau distillé stérile.

#### **1.3. Solution de cristal violet :**

La solution de cristal violet utilisé dans l'étude de biofilms est en raison 0,1% en mettent 1g du cristal violet dans 100ml de eau distille stérile avec agitation pendant 30min.

**Table 15: Résultats de coloration de Gram**

<b>Echantillons</b>	<b>La forme</b>	<b>Gram</b>
<b>ES01</b>	Coco bacille	-
<b>ES02</b>	Bacille	+
<b>ES03</b>	Bacille en chênette	+
<b>ES04</b>	Bacille	+
<b>ES05</b>	Bacille	-
<b>ES06</b>	Bacille	+
<b>ES07</b>	Bacille	-
<b>ES08</b>	Coco bacille	-
<b>ES09</b>	Bacille	-
<b>ES10</b>	Cocci	-