

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثلجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
LABORATOIRE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET AGRONOMIQUES



*Thèse*  
Présentée en vue de l'obtention du diplôme de  
Doctorat LMD  
Spécialité : Microbiologie de l'environnement

**THEME**

**Etude de la biodégradation du phénol par les bactéries  
isolées à partir du sol contaminé par les dérivées  
pétrolières**

Présentée par :  
REZZOUG Asma

**Devant le jury :**

Benaceur Farouk	Directeur de thèse	<b>MCA</b>
Gouzi Hicham	Co-directeur de thèse	<b>Professeur</b>
Chaibi Rachid	Président	<b>Professeur</b>
Berrabah Fathi	Examineur 1	<b>MCA</b>
Ziane Mohammed	Examinatuer 2	<b>Professeur</b>
Zerrouk Salim	Examineur 3	<b>Professeur</b>
Toumatia Omrane	Examineur 4	<b>Professeur</b>

Soutenu publiquement le : 10/12/2022

## REMERCIEMENT

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de pédagogie de département de biologie, faculté des Sciences, Université Ammar Telidji, Laghouat.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par **Dr. Farouk BENNACEUR**, et **Pr. Hicham GOUZI**. Je tiens vivement à leurs exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour leurs disponibilités, leurs patiences, et leurs intérêts portés à ce sujet de recherche.

Mes remerciements les plus chaleureux au président du jury, **Pr. Rachid CHAIBI** d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury.

Je tiens à remercier également **M. Mohammed ZIANE**, Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Ain Temouchent, et **M. Omrane Toumatia** Maître de Conférences classe A à l'université d'Alger 1, et **M. Salim ZERROUK**, Professeur au, département de biologie, faculté des sciences à l'université d'Ammar Telidji, Laghouat d'avoir accepté, malgré leurs préoccupations et leurs tâches d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Que **M. Fathi Berrabah**, Maître de Conférences classe A au département de biologie à la Faculté des Sciences de l'Université d'Ammar Telidji, Laghouat, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont à **M. Amine DRICI** Maître de Conférences classe A en Biologie cellulaire, à L'université Djillali Liabes, Sidi Belabbes et Directeur de l'entreprise Gene Life Science, pour son accueil et son aide pour l'accomplissement de la partie biologie moléculaire.

Mes sincères remerciements vont aux ingénieurs de Laboratoire pédagogique de département de biologie et d'agronomie, Université d' Ammar Telidji, Laghouat, pour leur aide et serviabilité tout au long de la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail à mes parents, mon mari, ma fille et ma famille en espérant qu'ils oublieront vite les heures soustraites à leur joie.

## Résumé

En tant que l'un des polluants organiques des eaux usées industrielles, le phénol menace gravement l'environnement et la santé humaine. Parmi diverses méthodes, la dégradation microbienne du phénol possède les avantages de la non-toxicité et de l'absence de pollution secondaire. Par conséquent, la recherche de ressources microbiennes capables de dégrader efficacement le phénol est devenu un enjeu important. Dans la présente étude, des souches bactériennes capables de dégrader efficacement le phénol ont été isolées à partir d'un sol pollué par les hydrocarbures d'un champ pétrolier situé dans le bassin Berkine, région d'Hassi Messaoud en Algérie. L'identification des souches bactériennes est réalisée par l'analyse des séquences ARNr 16S. La comparaison des séquences avec la base de données GenBank a montré des similitudes avec les souches : *Pseudomonas stutzerii*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Kocuria sp*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus Valensensis* et *Bacillus sp*. A fin d'optimiser les conditions physico-chimiques de la dégradation de phénol, une étude cinétique de dégradation est réalisée avec la souche compétente *Bacillus sp* sous plusieurs fluctuations de température, concentration de substrat, pH, agitation et d'aération. Cette étude est faite dans une culture minérale non renouvelable, en aérobiose, en mettant le phénol comme seule source de carbone. *Bacillus sp* a métabolisée complètement 200 mg/L de phénol en 50 h, comme elle a montré une tolérance significative à une variété de conditions physico-chimiques de croissance, cependant, l'optimum de dégradation est maintenu à 37 °C et un pH alcalin de 9, sous agitation mécanique d'une vitesse de 250 rpm et avec aération. Aussi, et à fin d'améliorer encore plus la dégradation de phénol et de cibler les concentrations élevées de ce dernier, nous avons utilisé un consortium composé des 3 souches compétentes *Bacillus sp*, *Pseudomonas stutzeri* et *Kocuria sp*, et un mécanisme d'adaptation successive à des concentrations relativement faibles. La culture mixte a dégradée  $96.43 \pm 4.50$  (%) de 1300 mg/L en 24h après des adaptations successives à 500 mg/L → 1000 mg/L → 1200 mg/L. Cette étude montre une voie de biodégradation utile pour le traitement des eaux usées dans des conditions environnementales larges et de concentration élevée de phénol, offrant des alternatives pour les procédés biologique de bioremediation.

**Mots clés :** Phénol, hydrocarbures, Bactéries, biodégradation, sol, ARNr 16S.

باعتباره أحد الملوثات العضوية لمياه الصرف الصناعي ، فإن الفينول يهدد البيئة وصحة الإنسان بشكل خطير .من بين الطرق المختلفة ، يمتلك التحلل الميكروبي للفينول مزايا عدم السمية وعدم وجود تلوث ثانوي .لذلك ، أصبح البحث عن الموارد الميكروبية القادرة على تحطيم الفينول بكفاءة قضية مهمة .في هذه الدراسة ، تم عزل السلالات البكتيرية القادرة على تحلل الفينول بكفاءة من التربة الملوثة بالهيدروكربون في حقل نفط يقع في حوض بركين بمنطقة حاسي مسعود في الجزائر .يتم تحديد السلالات البكتيرية عن طريق تحليل بيانات ARNr S16 أظهرت مقارنة التسلسل مع قاعدة بيانات GenBank وجود أوجه تشابه مع السلالات *Pseudomonas stutzeri* و *Pseudomonas aeruginosae* و *Kocuria sp* و *Kocuria rhizophila* و *Bacillus Valensensis* و *Bacillus sp* .

من أجل تحسين الظروف الفيزيائية والكيميائية لتدهور الفينول ، تم إجراء دراسة للتحلل باستخدام السلالة المختصة *Bacillus sp* تحت العديد من التقلبات في درجة الحرارة ، وتركيز الفينول ، ودرجة الحموضة ، والتحرك الميكانيكي والتهوية .أجريت هذه الدراسة في وسط غير متجدد هوائي ، باستخدام الفينول كمصدر الكربون الوحيد .

استهلك *Bacillus sp* تمامًا 200 جم / لتر من الفينول في 50 ساعة ، حيث أظهر تحملاً كبيراً لمجموعة متنوعة من الظروف ، ومع ذلك ، فإن التحلل الأمثل عند درجة حرارة 37 درجة مئوية ودرجة الحموضة قاعدية 9 ، مع تحريك ميكانيكي بسرعة 250 دورة في الدقيقة وتهوية .أيضاً ، ومن أجل زيادة تحسين تحلل الفينول واستهداف التركيزات العالية لهذا الأخير ، استخدمنا اتحاداً مكوناً من 3 سلالات و التي تتمثل في *Bacillus sp* و *Pseudomonas stutzeri* و *Kocuria sp* ، وآلية للتكيف المتتالي عند مستويات منخفضة نسبياً للفينول .تدهورت ( $96.43 \pm 4.50$  %) من 1300 مجم / لتر في 24 ساعة بعد التكييف المتتالية على 500 مجم / لتر / 1000 → 1200 مجم / لتر .تظهر هذه الدراسة مساراً مفيداً للتحلل الحيوي في معالجة مياه الصرف الصحي في ظل ظروف بيئية واسعة وتركيز عال من الفينول ، مما يوفر بدائل لعمليات المعالجة البيولوجية البيولوجية.

**الكلمات المفتاحية:** الفينول، البكتيريا ، التحلل البيولوجي، التربة ، ARNr 16 S ، *Bacillus sp* ، *Pseudomonas stutzeri* و *Kocuria sp*.

## Summary

As one of the organic pollutants of industrial wastewater, phenol seriously threatens the environment and human health. Among various methods, microbial degradation of phenol owns the advantages of non-toxicity and no secondary pollution. Therefore, the search for microbial resources capable of efficiently degrading phenol has become an important issue. In the present study, bacterial strains capable of efficiently degrading phenol were isolated from hydrocarbon-polluted soil of an oil field located in the Berkine basin, Hassi Messaoud region in Algeria. The identification of bacterial strains is carried out by the analysis of 16S rRNA sequences. Sequence comparison with the GenBank database showed similarities with the strains: *Pseudomonas stutzerii*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Kocuria sp*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus valensensis* and *Bacillus sp*. In order to optimize the physico-chemical conditions of phenol degradation, a kinetic study of degradation is carried out with the competent strain *Bacillus sp* under several fluctuations of temperature, concentration of substrate, pH, agitation and aeration. This study is carried out in a non-renewable mineral culture, in aerobiosis, using phenol as the only carbon source. *Bacillus sp* completely metabolized 200 mg/L phenol in 50 h, as it showed significant tolerance to a variety of conditions, however, optimum degradation is maintained at 37°C and an alkaline pH of 9, with agitation mechanical with a speed of 250 rpm and with ventilation. Also, and in order to further improve the degradation of phenol and to target the high concentrations of the latter, we used a consortium composed of the 3 competent strains *Bacillus sp*, *Pseudomonas stutzeri* and *Kocuria sp*, and a mechanism of successive adaptation at relatively low concentrations. The mixed culture degraded  $96.43 \pm 4.50$  (%) of 1300 mg/L in 24 hours after successive adaptations to 500 mg/L → 1000 mg/L → 1200 mg/L. This study shows a useful biodegradation pathway on wastewater treatment under broad environmental conditions and high phenol concentration, providing alternatives for biological bioremediation processes.

**Key words:** Phenol, Hydrocarbons, Bacteria, biodegradation, soil, 16S rRNA.

## Liste d'abréviation

**12DO** : 1-2Dioxygénase

**ADN**: Acide DésoxyriboNucléique.

**ARNr**: Acide ribonucléique ribosomique

**C23O** : Catéchol 2-3 Oxygénase

**CaCl<sub>4</sub>** : Tétrachloromethane

**CD12O** : Cathécol 1-2 Dioxygénase

**EPA** : Environmental Protection Agency

**g**: gravité « unité d'accélération »

**HCl**: acide chlorhydrique

**HK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Hydrogénophosphate De  
Potassium

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**: dihydrogénophosphate de  
potassium

**MgCl<sub>2</sub>**: chlorure de magnésium

**MgSO<sub>4</sub>**: sulfate de magnésium

**N**: normale

**NH<sub>4</sub>Cl**: Chlorure d'ammonium

**nm**: nanomètre

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**Rpm**: Rotations par minute

**SBR** : Réacteur biologique séquentiel

## Liste des figures

<b>Figure 01 :</b> Le champ de Hassi Messaoud	<b>06</b>
<b>Figure 02 :</b> Le positionnement et la complexité externe et interne du sol	<b>08</b>
<b>Figure 03</b> Structure chimique de la molécule de phénol	<b>16</b>
<b>Figure 04:</b> Voie aérobie pour le métabolisme des phénols	<b>22</b>
<b>Figure 05:</b> Premières étapes de la dégradation du phénol par la bactérie dénitrifiante <i>Thauera aromatica</i> .	<b>23</b>
<b>Figure 06 :</b> Localisation de site d'échantillonnage	<b>26</b>
<b>Figure 07 :</b> Aspect de sol récolté à partir du forage de pétrole à Hassi Messaoud : Bassin de Berkine	<b>27</b>
<b>Figure 08 :</b> Schéma représentatif de la technique d'isolement des bactéries telluriques.	<b>28</b>
<b>Figure 09 :</b> Une présentation sous forme d'organigramme du protocole universelle ; à partir d'une culture bactérienne pure ou d'ADN, se terminant par l'alignement de l'ADN (BLAST) et l'identification bactérienne.	<b>31</b>
<b>Figure 10:</b> Confirmation de la présence d'amplicons sur gel d'agarose sous une lampe Ultraviolette.	<b>34</b>
<b>Figure 11 :</b> Principes du séquençage selon la méthode de Sanger	<b>36</b>
<b>Figure 12:</b> Présentation des pics d'une partie de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S avec le programme ChromasPRO.	<b>37</b>
<b>Figure 13 :</b> L'interface de BLAST de l'identification des séquences d'ADN par le calcul de pourcentage d'homologie	<b>38</b>
<b>Figure 14:</b> Schéma représentatif des étapes de dosage colorimétrique de phénol par la méthode de folin-ciaucalteau, les tubes transparents indique l'absence de phénol après dosage.	<b>40</b>
<b>Figure 15 :</b> Schéma représentatif des voies d'adaptation cellulaire aux concentrations d'ordre croissant de phénol.	<b>45</b>
<b>Figure 16:</b> Aspect microscopique des bacilles à Gram positif.	<b>46</b>
<b>Figure 17:</b> Aspect de colonies des bacilles à Gram positif, Colonie rugueuse (E1) ; colonie muqueuse (S19).	<b>47</b>
<b>Figure 18:</b> Aspect macroscopique et microscopique (G ×1000) des coccobacilles à Gram négatifs, les isolats S4 et S14.	<b>48</b>

<b>Figure 19:</b> Aspect microscopique (G ×1000) et macroscopique des isolats de forme Cocci à Gram positives, S9 et	<b>49</b>
<b>Figure 20:</b> Arbre phylogénétique basé sur les séquences de 16S montrant les liens de parenté avec les 20 homologues les plus proches de l'isolat E1 (identifiée <i>Bacillus sp</i> ), selon la topologie de Neighbor-Joining.	<b>52</b>
<b>Figure 21:</b> Arbre phylogénétique basé sur les séquences de 16S montrant les liens de parenté avec les 20 homologues les plus proches de l'isolat S4 (identifiée <i>Pseudomonas stutzeri</i> ), selon la topologie de Neighbor-Joining.	<b>53</b>
<b>Figure 22:</b> Arbre phylogénétique basé sur les séquences de 16S montrant les liens de parenté avec les 20 homologues les plus proches de l'isolat S9 (identifiée <i>Kocuria sp</i> ), selon la topologie de Neighbor-Joining.	<b>54</b>
<b>Figure 23:</b> Effet de concentration de phénol sur la cinétique de biodégradation	<b>58</b>
<b>Figure 24 :</b> Effet de température sur la cinétique de biodégradation de phénol.	<b>60</b>
<b>Figure 25 :</b> Effet de pH sur la cinétique de biodégradation de phénol	<b>62</b>
<b>Figure 26 :</b> Effet d'agitation sur la cinétique de biodégradation de phénol	<b>64</b>
<b>Figure 27 :</b> Effet d'oxygénation (aération) sur la cinétique de biodégradation de Phénol.	<b>64</b>
<b>Figure 27 :</b> Effet d'oxygénation (aération) sur la cinétique de biodégradation de phénol	<b>65</b>
<b>Figure 28 :</b> Taux de phénol consommé par consortium à différents pH, et différentes température.	<b>67</b>
<b>Figure 29:</b> Biodégradation des concentrations initiales de 300 mg/L, 500 mg/L, 700 mg/L, 1000 mg/L 1200 mg/L et 1300 mg/L par culture mixte non adaptée en fonction du temps.	<b>68</b>
<b>Figure 30:</b> Le graphique montre la proportion d'une concentration de 1000 mg/L épuisée en fonction du temps.	<b>69</b>
<b>Figure 32:</b> Le graphique montre la proportion d'une concentration de 1200 mg/L épuisée en fonction du temps.	<b>70</b>
<b>Figure 34:</b> Le graphique montre la proportion d'une concentration de 1300 mg/L épuisée en fonction du temps.	<b>71</b>

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 01 :</b> Genres de bactéries qui utilisent les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie.	<b>10</b>
<b>Tableau 02 :</b> Propriété physico-chimique de phénol.	<b>17</b>
<b>Tableau 03 :</b> les composants et les quantités de Mix de la PCR.	<b>32</b>
<b>Tableau 04:</b> Test préliminaire de la dégradation de phénol en comparaison avec la littérature.	<b>55</b>
<b>Tableau 05 :</b> Variation du taux de phénol métabolisé par le consortium au cours du temps à différentes températures et différents pH exprimés en pourcentage.	<b>67</b>
<b>Tableau 06:</b> temps de dégradation complète des concentrations élevées de phénol des différentes voies d'adaptations.	<b>72</b>
<b>Tableau 07:</b> Quelques exemples de bactéries et leur taux de dégradation de phénol.	<b>77</b>

## Table de matière

<b>i. Résumé</b>	
<b>ii. Remercîments</b>	
<b>iii. Liste des tableaux</b>	
<b>iv. Liste des figures</b>	
<b>v. Liste d'abrèviations</b>	
<b>vi. Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique</b>	
1. Champ de Hassi Messaoud « réservoir naturel de pétrole »	4
2. Pollution de l'environnement	6
2.1 Définition	6
2.2 Les différents types de pollution et leur effet toxique	7
2.2.1 Pollution atmosphérique	7
2.2.2 Pollution d'eau	7
2.2.3 Pollution de sol	8
2.2.3.1 Les microorganismes des sols pollués	9
3. Les grands groupes des polluants et leur effet toxique	11
3.1 Les polluants inorganiques	11
3.1.1 Les métaux lourds	11
3.1.2 Les composés azotés (NO <sub>x</sub> )	11
3.1.3 Le dioxyde de soufre (SO <sub>2</sub> )	11
3.2 Les polluants organiques	12
3.2.1 Le pétrole brut	12
3.2.2 Les hydrocarbures	12
3.2.3 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	12
3.2.4 Polychlorobiphényles (PCB)	13
3.2.5 Les composés organiques volatils (COV)	13
3.2.6 Les Pesticides	13
3.2.7 Impact des polluants organiques sur l'environnement	14
3.2.8 Généralités sur le phénol	15
3.2.8.1 Définition de phénol	16
3.2.8.2 Origine de phénol	16
3.2.8.3 Propriété physico-chimique	16
3.2.8.4 Application de phénol	17
3.2.8.5 Toxicité du phénol	17
4. Les procédés d'élimination des polluants	18
4.1 Les procédés physico-chimiques d'élimination des polluants des sols	18
4.1.1 Les procédés thermiques	18
4.1.2 Les procédés électriques	19
4.1.3 Les procédés par évacuation ou entrainement	19
4.2 Les procédés physico-chimiques d'élimination des polluants des eaux	19
4.3 Les procédés biologiques	20
4.3.1 La biodégradation de phénol	20
4.3.1.1 Les microorganismes dégradant le phénol	20
4.3.1.2 Les voies de dégradation de phénol	21
4.3.1.4 Applications des microorganismes dans la dépollution des eaux	23
<b>Matériels et méthodes</b>	
1. Le support d'isolement des bactéries d'intérêt (sols pollués par les hydrocarbures, le cas d'un gisement pétrolier à Hassi Messaoud)	26
Échantillonnage	26
2. Etude de la biodiversité microbienne des sols pollués	27
2.1 Isolement de la flore totale des bactéries cultivables	27

2.1.1	Enrichissement	27
2.1.2	Préparation des dilutions décimale	28
2.1.3	Culture solide (ensemencement en surface)	28
2.1.4	Purification des isolats bactériens	29
2.1.5	Conservation des souches	30
2.1.5.1	Conservation à longue durée	30
2.1.5.2	Conservation à courte durée	30
2.1.6	Identification préliminaire des souches bactériennes	30
2.2	Caractérisation et identification des bactéries isolées par séquençage de gène 16S « approche génomique »	30
2.2.1	Extraction des acides nucléiques	31
2.2.2	Amplification de gène d'ARNr 16s par PCR	32
2.2.2.1	Préparation de Mix	32
2.2.2.2	PCR	33
2.2.2.3	Vérification de la présence d'amplicons sur gel d'agarose	33
2.2.3	Séquençage d'amplicons par la méthode Sanger	34
2.2.4	Comparaison et identification des séquences génomiques par « Gene Bank »	36
2.2.5	Phylogénie	37
3.	Etude de la biodégradation de phénol	37
3.1	Présélection des souches d'intérêts et évaluation de leurs capacités bioremediatrices au phénol	38
3.1.1	test de biodégradation	38
3.1.2	Dosage colorimétrique	38
3.2	Etude des conditions physico-chimique optimales de la dégradation de phénol « cinétique de dégradation de la souche compétente E1»	40
3.2.1	Effet de concentration	40
3.2.2	Effet de pH	41
3.2.3	Effet de température	41
3.2.4	Effet d'agitation	41
3.2.5	Effet d'aération	42
3.3	Etude de la dégradation de phénol par une culture mixte	42
3.3.1	Optimisation des conditions physico-chimiques (pH et température) de dégradation de phénol par la culture mixte	43
3.3.3	Effets des adaptations successives par la culture mixte	43
4.	Valorisation statistique des résultats	44
<b>Résultats et discussion</b>		
1.	Isolement et caractérisation des souches isolés	46
1.1	Caractérisation morphologique des isolats	46
1.2	Caractérisation génétique (séquençage de l'ARNr 16S)	49
1.3	Phylogénie	50
2.	Etude de la biodégradation de phénol	55
2.1	Etude de la biodégradation du phénol par des cultures uniques	55

2.1.1	Présélection des souches dégradatrices du phénol	55
2.1.2	Étude des conditions physico-chimiques optimales de la dégradation de phénol par <i>Bacillus sp</i>	55
2.1.2.1	Effet de dégradation des différentes concentrations initiales de phénol par <i>Bacillus sp</i>	56
2.1.2.2	Effet de température sur la dégradation de phénol par <i>Bacillus sp</i>	59
2.1.2.3	Effet de pH sur la dégradation de phénol par <i>Bacillus sp</i>	61
2.1.2.4	Effet d'agitation sur la dégradation de phénol par <i>Bacillus sp</i>	63
2.1.2.5	Effet d'oxygénation sur la dégradation de phénol par <i>Bacillus sp</i>	65
2.2	Etude de la dégradation de phénol par une culture bactérienne mixte	66
2.2.1	Optimisation des conditions physico-chimique de la dégradation de phénol par la culture bactérienne mixte	66
2.2.2	Effet d'adaptations successives pour la dégradation du phénol par la culture mixte	68
2.2.3	Effet de l'adaptation successive sur la dégradation de forte concentration de phénol	68
	Discussion	73
	<b>Conclusion Perspectives</b>	<b>84</b>
vii.	<b>Références bibliographiques</b>	
viii.	<b>Annexe 01</b>	
ix.	<b>Annexe 02</b>	
x.	<b>Production scientifique</b>	

# Introduction générale

Aujourd'hui, l'un des principaux problèmes environnementaux auxquels le monde est confronté est la dépollution des espaces naturels (Busca et *al.*, 2008). Les processus industriels créent une variété de molécules qui peuvent polluer le sol, l'air et les eaux, et la gestion des eaux usées contenant de fortes concentrations de polluants, représente des enjeux économiques et environnementaux majeurs pour la plupart des industries (Al-Khalid et El-Naas, 2012).

Le phénol a été classé comme polluant hautement prioritaire par l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA) (Subramaniam et *al.*, 2020), il est un hydrocarbure chimique aromatique avec un groupe hydroxyle (OH) couplé au cycle benzénique, et c'est le plus simple des phénols. C'est également une unité structurelle centrale pour une large gamme de composés chimiques synthétiques (Li et *al.*, 2019) ; c'est une substance toxique à des concentrations élevées et peut être assimilée par les poumons par inhalation, et pénètre la peau et le tube digestif (Zhao et *al.*, 2010).

Le phénol ou hydroxybenzène, est un composé aromatique à la fois synthétique et naturel (Van Schie et Young, 2000), il est nocif non seulement pour l'homme mais aussi pour d'autres organismes, animaux et plantes terrestres et aquatiques (Wang et *al.*, 2011). le phénol est présent dans l'environnement à des niveaux élevés qui dépassent les normes, la concentration maximale autorisée de phénols dans l'eau est de 0,1 mg/L (Ucun et *al.*, 2010), mais des études montrent que les phénols libres sont habituellement libérés par les processus industriels et présents dans les eaux usées comme les raffineries à des valeurs de 6 à 500 mg/L, la cokéfaction : de 28 à 3900 mg/L, fabrication de la pétrochimie : de 2,8 à 1220 mg/L, et de la transformation du charbon : de 9 à 6800 mg/L. Les autres origines des eaux usées contenant des phénols sont les industries des plastiques, des résines, des produits pharmaceutiques, des produits du bois, des teintures et du papier qui contiennent de 0,1 à 1600 mg/L des phénol (Kumaran et Paruchuri, 1997 ; González-Muñoz et *al.*, 2003).

En général, deux types d'approche de décontamination sont disponibles pour le phénol, l'une est basée sur la régénération et l'autre sur la destruction qui englobe le traitement biologique par des microorganismes, mais lorsque la teneur en phénol dépasse 1000 mg/L dans les eaux usées, le schéma de récupération devient préférable car les microorganismes ne peuvent pas tolérer des concentrations supérieures à 3000 mg/L de phénol car celui-ci devient toxique pour les cellules vivantes (Ucun et al ; 2010 ; Shahryari et al., 2018).

A ce jour, plusieurs travaux sont en cours pour isoler de nouvelles souches microbiennes efficaces qui ont la capacité de dégrader le phénol, car le traitement biologique s'est avéré être l'approche la plus prometteuse et la plus économique pour l'élimination de nombreux polluants organiques de l'eau (Rai et al., 2021 ; Yotinov et al., 2022). De nombreuses études ont été publiées dans la littérature traitant de la biodégradation des phénols utilisant différents types de biomasses et différents types de réacteurs. Les auteurs offrent un examen complet de la recherche actuelle sur la biodégradation des phénols et présentent les tendances pour la recherche et le futur développement (Al-Khalid et El-Naas, 2012).

La dégradation microbienne des phénols a été examinée par les scientifiques du domaine, y compris les facteurs affectant la dégradabilité en mettant l'accent sur la cinétique de croissance en présence de phénol, le mécanisme de dégradation microbienne dépend des conditions environnementaux tels que la température, le pH, la salinité, l'oxygénation, la disponibilité de deuxième source nutritive ... etc (Onaizi et al., 2021).

Néanmoins, peu d'études portent sur la biodégradation microbienne de fortes concentrations de phénol et leur utilisation en bioremédiation, *Pseudomonas putida*, *Candida tropicalis*, *Rhodococcus*, *Trichosporon dulcimum*, *Acinetobacter* et *Alcaligenes faecalis* ont montré une grande capacité et efficacité à biodégrader une forte concentration de phénol (Margesin et al., 2004 ; Yan Jiang et al., 2007 ; Shahryari et al., 2018 ; Abarian et al., 2019 ; Basak et al., 2019), mais diverses méthodes ont été suggérées pour surmonter l'inhibition du substrat afin de traiter concentration de phénol (Kwon et al., 2009), ces méthodes consistent à adapter les cellules à une concentration plus élevée de substrat (Yang et al., 1975 ; Kwon et al., 2009) ; à utiliser des micro-organismes immobilisés réalisés dans des réacteurs à lit fixe (PBR) (Basak et al., 2019), par des cultures mixtes bactériennes (Marrot et al., 2005), et par l'ajout d'autres types de sources de carbone telles que le glucose ou l'extrait de levure (Loh et al., 2000), ainsi il s'est révélé qu'une adaptation à de faibles concentrations de phénol augmente la capacité microbienne à dégrader les fortes concentrations de ce dernier (Kwon et al., 2009) mais aussi une pré-adaptation à d'autres polluants comme le toluène et le benzène conduit à une meilleure dégradation des fortes concentrations de phénol beaucoup plus que la pré-adaptation au phénol (Yeom et al., 1997).

En outre; la culture mixte a une plus grande capacité métabolique que la culture pure, ce qui la conduit à se dégrader plus rapidement ; plusieurs études soutiennent cette affirmation, cela

est expliquer principalement en termes biochimiques par les interactions commensales et synergiques et le co-métabolisme (**Subramaniam et al., 2020**).

Les investigations sur la spécificité de la biodégradation du phénol par différentes souches microbiennes sont significatives pour l'invention de technologies de remédiation efficaces pour les déchets industriels où les substrats phénoliques les plus abondants. Les approches génomique et métagénomique pour l'analyse de l'activité catabolique spécifique gagnent reconnaissance plus large dans l'étude des systèmes enzymatiques et les capacités de dégradation des microorganismes, ceci ouvre des portes sur des perspectives plus larges pour des applications technologiques directes et pertinentes. L'actualité de la littérature est évidente, et c'est en témoigne le nombre croissant de recherches et de publications sur l'identification, la caractérisation et l'analyse des souches microbiennes connues et nouvelles ayant la capacité métabolique dégrader et utiliser les composés aromatiques (**Krastanov et al., 2013 ; Ordoñez et al., 2022**).

# Synthèse bibliographique

## **1. Champ de Hassi Messaoud « réservoir naturel de pétrole »**

La ville de Hassi-Messaoud est située à environ 80 kms du chef-lieu de la wilaya d'Ouargla, le long de la Route Nationale n°3, de Skikda à Ain Amenas (Province d' Illizi). Le tissu urbain couvre une superficie de 880 hectares (1432 hectares y compris la zone industrielle) avec une population d'environ 75 000 habitants en 2016.

Le gisement de Hassi Messaoud est l'un des plus grands des gisements du monde, il a été découvert le 16 janvier 1956 par le premier forage MD1, Il se situe à 650 km Sud-Sud-Est d'Alger, à 350 km de la frontière tunisienne, à 80 Km au Nord Est du gisement Rhourde El Baguel et à 280 Km du gisement de gaz de Hassi R'Mel.

Durant l'histoire géologique, ce gisement a subi une évolution tectonique sévère lors de son enfouissement jusqu'à ce que le gisement a pris la forme présente. Ce champ s'étend sur une superficie voisine de 4200 km<sup>2</sup>.

Le gisement pétrolier de Hassi Messaoud est mis en production en 1958 et continu jusqu'à date, de fournir à l'Algérie cette ressource naturelle qu'est le pétrole brut. Le gisement de Hassi Messaoud a une profondeur qui varie entre 3100 et 3380 m, son épaisseur va jusqu'à 200 m.

En 1969, l'Algérie a extrait plus de 43 800 000 tonnes de pétrole et près de 3 milliards de m<sup>3</sup> de gaz naturel. Elle vient au dixième classement dans le monde pour l'alimentation de brut et, malgré la faiblesse de sa production de gaz naturel, elle a été le premier état à se tourner vers l'expédition de ce combustible, sous forme liquéfiée.

L'exploitation du naphte et du gaz naturel contribue à équilibrer largement la balance commerciale algérienne par les revenus de la Société Nationale Algérienne de Transport et de Raffinage des Hydrocarbures (SONATRACH) (**Lerat, 1971**).

### **Exploitation pétrolière en Algérie**

Les travaux de recherche et de fouille ont débuté en Algérie en 1948 dans le bassin du Chélif à Oued Guetrini. Depuis cette date, le groupe n'a pas cessé de chercher de nouveaux

gisements pétroliers sur la totalité du pays. Les forages d'exploration en 2019 ont atteint 80 puits, parmi 71 puits en effort propre.

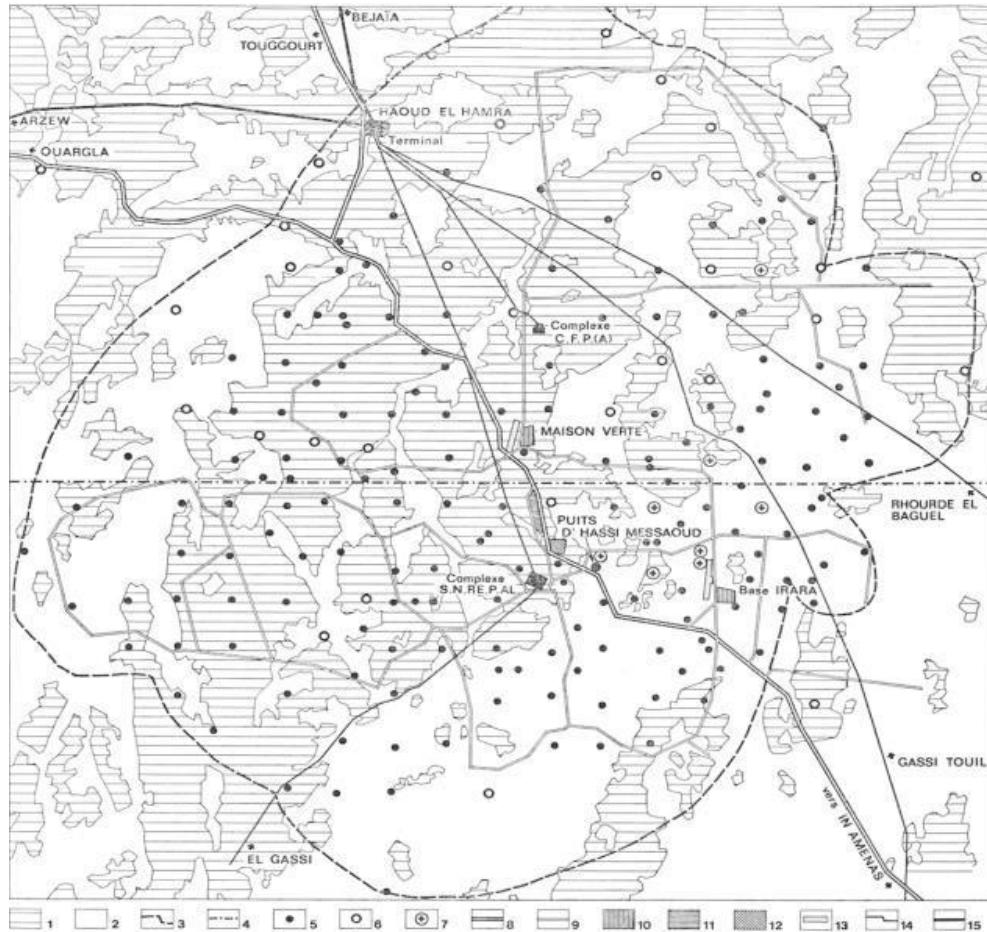
Le bassin Berkine a vu la découverte de 17 puits, Le bassin Amguid Messaoud 15 puits, et le bassin Oued Mya 11 puits, La production de pétrole brut, atteint les 48,3 Millions Tonnes en 2019. La contribution des gisements exploités en partenariat représente 40% de ce volume, soit 19,6 Millions Tonnes.

La production primaire d'hydrocarbures à été estimé 186,8 Millions TEP durant l'année 2019, dont 25% réalisée en Association (**Rapport annuel SONATRACH, 2019**).

Entre le 31° 30 et le 32° de latitude Nord et par 6° de longitude Est, à l'extrémité méridionale de la dépression des grands chotts algérotunisiens, la région d'Hassi Messaoud se détermine avec l'interfluve admis entre l'ample vallée de l'Oued Mya, où est bâtie Ouargla, à l'Ouest, et celle, plus étroite, de l'Oued Irharrha, à l'Est. C'est un plateau désertique et peu aérien (de 130 à 170 mètres) ; il est morcelé en de nombreuses unités à relief de faibles superficies, voire en buttes ruiniformes, par un réseau de vallées sèches, étroites et sinueuses, et aéré par des dépressions plus amples, les haouds.

Les portions de plateau portent des petits regs, formés de cailloux de faibles épaisseurs, sur lesquels la circulation est aisée ; ces plateaux sont surmontés par quelques dunes isolées, voire par des ergs de très faible superficie, notamment sur les confins occidentaux du champ. L'ensemble plonge doucement vers l'Est, sous les amas de sable du Grand Erg oriental. Cela veut dire qu'aucun indice n'a attiré l'attention des chercheurs, la découverte du pétrole a nécessité l'application des méthodes modernes.

Un équipage de sismique-réfraction fut entrepris sur 150 km selon un axe Nord Ouest-Sud-Est, passant par Ouargla et Hassi Messaoud. Cette campagne ayant accordé, entre autres, de déterminer l'existence d'une structure éventuel de contenir des hydrocarbures au voisinage du point d'eau dit Hassi Messaoud, un forage y fut entrepris par la Société nationale de Recherche des Pétroles en Algérie.



**Figure 01 : Le champ de Hassi Messaoud (Lerat, 1971).**

1. Plateaux. /2. Vallées et dépressions (haouds)/ 3. Limite de champ pétrolifère. / 4. Limite des concessions de la C.F.P. (A) au Nord, de la S.N.RE.P.AL., au Sud. /5. Puits producteur. / 6. Puits sec. / 7. Puits de réinjection. / 8. Grande route. / 9. Route ou piste d'exploitation. / 10. Base des compagnies pétrolières. / 11. Quartier industriel d'Hassi Messaoud. / 12. Quartier résidentiel et administratif d'Hassi Messaoud. / 13. Aéroport. / 14. Oléoduc de collecte du brut. / 15. Oléoduc d'évacuation du brut.

## 2. Pollution de l'environnement

### 2.1 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 de constance un rôle important sur l'apparition et la préservation de l'activité biotique et pour la biodiversité biologique 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 un dommage ou un risque pérenne pour 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).

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

### 2.2.1 Pollution atmosphérique

La pollution atmosphérique est d'origine naturelle ou anthropique, les produits émis dans l'air peuvent être de nature physique (radioactivité, énergie), chimiques (gaz, particules, aérosols) ou biologiques (pollens, acariens, moisissures). Ces pollutions sont dites primitives lorsqu'elles s'échappent directement des pots d'échappements, les cheminées ou les espaces agricoles, elles vont ensuite se disséminer, 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. Elle a un impact majeur sur la marche d'évolution des plantes en empêchant la photosynthèse dans de nombreux cas, avec de graves effets sur la purification de l'air que nous respirons (Al Barakh, 2012).

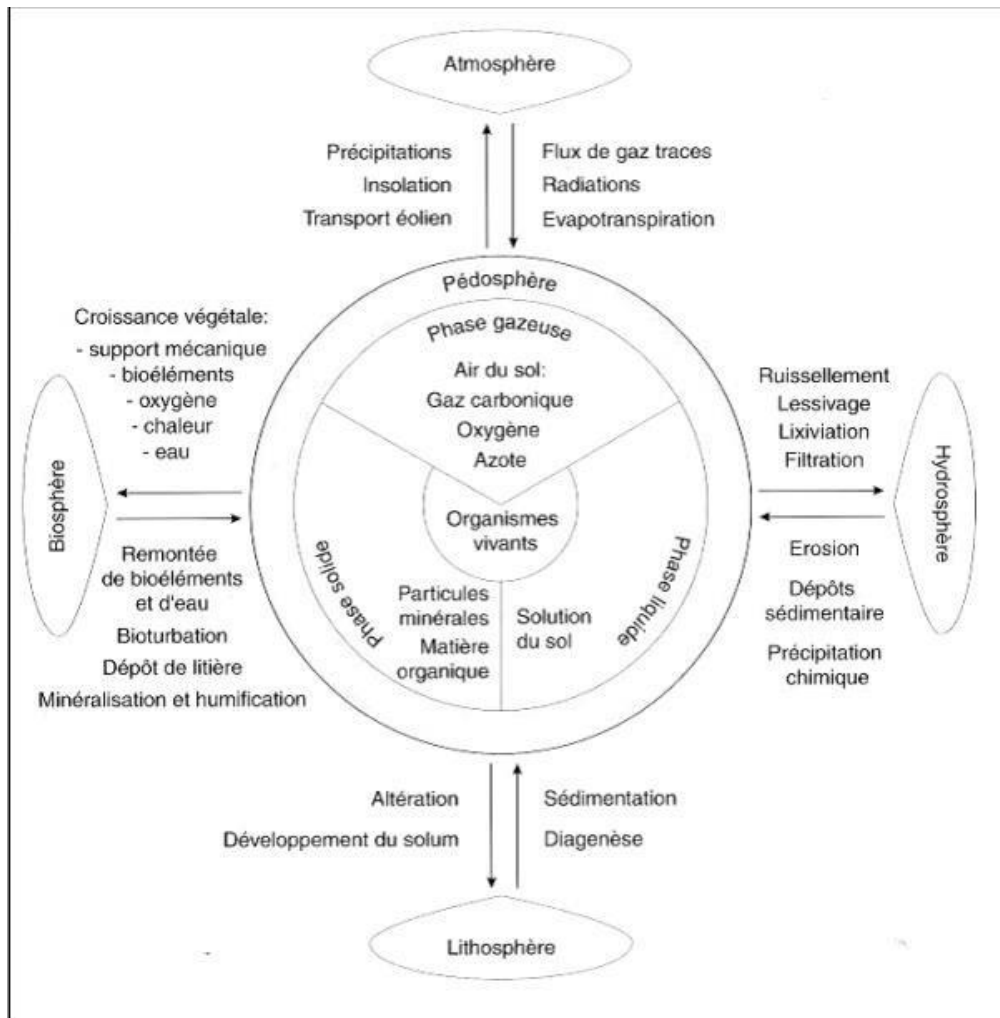
### 2.2.2 Pollution d'eau

La pollution hydrique est une admission, directe ou indirecte, par l'activité humaine, des substances dans l'eau, capables de contribuer ou de causer un danger pour la santé de l'homme, des atteintes aux ressources biologiques et aux écosystèmes ou bien 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).

Avec l'accroissement marqué de la population et l'industrialisation, un nouvel ensemble des polluants est apparu. La pollution par les composés organiques est causée essentiellement par une forte industrialisation qui dissimule des polluants toxiques dans l'environnement. Comme la majorité des polluants, les composés phénoliques sont nuisibles, 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 (Goel, 2006).

### 2.2.3 Pollution de sol

Le sol est considéré comme l'un des environnements les plus complexes et hétérogène de la biosphère et est à ce titre un réservoir principal de la diversité microbienne. Il est à la liaison entre la lithosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère et sert de support à une partie de la biosphère (**Figure 02**) (**Gobat et al., 2003**).



**Figure 02** : Le positionnement et la complexité externe et interne du sol (**Gobat et al., 2003**)

La pollution des sols est le produit des activités minières et d'industries lourdes, comme l'industrie pétrolière ou l'industrie chimique (**Calvet, 2000**). Les polluants sont essentiellement des composés organiques (hydrocarbures, composés phénolés et chlorés ...etc) et des métaux lourds (**Yadav et Hassanizadeh, 2011, Lipińska et al, 2014**), elle engendre 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**).

La dépollution des sols vise à baisser la biodisponibilité des polluants, en évitant leur transfert vers les nappes phréatiques ou les chaînes alimentaires par l'association 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 l'usage des produit pétroliers dans des différentes domaines (industrielle, pharmaceutique, agroalimentaire.. etc.) (**Janssen, 2006**).

Le milieu urbain est en effet le point de départ de plusieurs fondement de pollution des sols, et consiste un des risques principal pour l'environnement (**Carnicer et victoria, 2007**). Par exemple l'exploitation d'une station-service représente une source potentielle de dommage (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**).

### 2.2.3.1 Les microorganismes des sols pollués

Les microorganismes du sol est une mosaïque d'habitat placés dans des circonstances physico-chimique différentes qui peuvent aider les végétaux soit en synthétisant des composés phytotoxique ou bien détoxifiant les sols contaminé (**Balba et al., 1998**).

Parmi les microorganismes les plus importants sont les bactéries, les algues et les champignons qui sont des ambassadeurs primaires dans la dégradation des hydrocarbures, les plus étudiés et semblent les plus efficaces. En effet, ils sont apte de métaboliser une large gamme des hydrocarbures (**Tableau 01**), les transformant partiellement en métabolites ou en les minéralisant complètement (**Chikere, 2011**).

Les bactéries se sont reconnues plus polyvalentes et actives que les champignons et peuvent donc jouer un rôle plus important au cours de la biodégradation des hydrocarbures dans les milieux naturels (**Rahman et al., 2003, Brooijmans et al., 2009**).

**Tableau 01 :** Genres de bactéries qui ont la capacité d'utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie (Bekkenich, 2021).

Genre	Substrat	Gene/enzyme de dégradation
<i>Aeromonas</i>	Diesel	Alcane hydroxylase
<i>Bacillus</i>	Toluène, pétrole brut,	Alcane hydroxylase, gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Pseudomonas</i>	Gasoil, pétrole brut	Alcane hydroxylase, gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Serratia</i>	pétrole brut	Alcane hydroxylase
<i>Stenotrophomonas</i>	Pyrène,	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Enterobacter</i>	Alcane,	Alcane hydroxylase
<i>Nocardia</i>	Alcane,	pétrole brut Alcane hydroxylases
<i>Acidecella</i>	Naphtalène,	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Acidovorax</i>	Phénanthrène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Agrobacterium</i>	Essence aromatiques	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Micrococcus</i>	Héxadécane	Alcane hydroxylases
<i>Xanthobacter</i>	Dibenzothiophène	Gènes transmis par les plasmides pour les dioxygénases étroitement liées à NAH7
<i>Terrabacter</i>	Fluorène	gènes plasmidiques pour les dioxygénases
<i>Desulfobacterium</i>	Xylène	Benzyl succinate synthase chromosomique
<i>Streptomyces</i>	Pétrole, Naphtalène ...etc	Des enzymes extracellulaire (keratinases et peroxidases) (Feradji et al., 2014)

### **3. Les grands groupes des polluants et leur effet toxique**

#### **3.1 Les polluants inorganiques**

##### **3.1.1 Les métaux lourds**

Ce sont des éléments ou de composés dont leurs accumulation est responsable d'une pollution du sol (**Chassin et al., 1996**).

Les composés métalliques sont sous différentes formes, toujours présents au sein de l'environnement. A des quantités minimales dites traces, ils sont indispensables aux êtres vivants. A concentration élevée, ils présentent une toxicité plus au moins alarmante. La présence de métaux dans l'environnement est le résultat d'actions naturelles et des activités humaines. Ils posent un souci réel, car ils s'accumulent d'une manière persistante et ne sont pas biodégradables (**Huynh, 2009**).

Les métaux lourds ont un comportement toxique pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénin connu pour la cellule (**Kabata-Pendias et Szteke 2001; Migeon et al., 2009**). Il faut noter, 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**).

##### **3.1.2 Les composés azotés (NO<sub>x</sub>)**

L'azote (N) est un nutriment essentiel à la croissance des plantes, mais lorsqu'il est présent en excès dans l'écosystème, ils peuvent contaminer les hydrosystèmes sous forme de nitrate (NO<sup>3-</sup>) ou vers l'atmosphère sous forme de protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O). Les composés azotés réunissent le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>). Ces éléments sont dispersés plus ou moins activement dans l'air. Le NO, principalement émis par la circulation automobile, remonte des réactions de combustion, il est ensuite oxydé en NO<sub>2</sub> dans l'atmosphère. Les oxydes d'azote sont des irritants respiratoires, et des perturbatrices du transport de l'oxygène dans le sang (**Henry, 1999**).

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

Le dioxyde de soufre est un gaz incolore, plus lourd que l'air, d'odeur aigue très irritante, Ce polluant est d'origine industrielle principalement, venant des installations de combustion (charbon, gasoil...etc). Il est irritant pour les voies respiratoires et les muqueuses.

Il peut causer des œdèmes du poumon et des bronchites. Il est en partie responsable des pluies acides (**Falcy et Malard, 2005**).

### 3.2 Les polluants organiques

Ce sont, dans la plupart des cas les produits de synthèse originaire de l'activité anthropique. Ils proviennent principalement de trois ensembles d'activités industrielles (production d'énergie, métallurgie, industries chimiques...), agricoles (utilisation de produits phytosanitaires) et urbains (transport, traitement des déchets,...) (Ma *et al.*, 2005).

#### 3.2.1 Le pétrole brut

Le pétrole brut est la formule utilisé pour décrire une grande variété de fluides riches en hydrocarbures dont la plupart sont constitués d'hydrogène et de carbone. Les hydrocarbures représentent 50 à 98 % du pétrole brut et sont considérés comme un composant majeur selon la source de pétrole. Le pétrole brut est extrait des forages pétrolières n'est d'aucune utilité directe, il doit subir un raffinage pour une variété d'applications.

Les méthodes et processus de raffinerie, les produits du pétrole sont par exemple l'essence, le diesel, le carburacteur, l'asphalte, la cire, l'huile lubrifiante, le goudron, le kérosène et le gaz de pétrole liquéfié (Al-Dhabaan, 2019).

#### 3.2.2 Les hydrocarbures

Ils contiennent particulièrement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il s'agit d'alcane acycliques (ou paraffines), des cycloalcane (ou naphènes), d'alcènes (ou oléfines) et d'hydrocarbures aromatiques (Harayama *et al.*, 1999).

D'autres composants mineurs sont aussi présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et les composés polaires qui contiennent de l'azote, de l'oxygène ou du soufre. Les molécules polaires de faible masse moléculaire sont appelées des résines, les plus complexes étant regroupées sous le nom des asphaltènes (Balba *et al.*, 1998).

#### 3.2.3 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Ce sont des composés chimique porte plusieurs cycle aromatiques assemblés plus ou moins substitués (Costes *et al.*, 1997). Les principaux types de sources des HAP sont: anthropique (pétrole et combustibles) et naturelles. Ce sont le résultat de la combustion inachevée de la matière organique à des températures très hautes, de l'ordre de 1000°C (Wakleham *et al.*, 1980).

Ils ont tendance à s'adsorber sur les sols et les sédiments en fonction de leur caractère hydrophobe. Les problèmes de toxicité viennent de la toxicité chronique à la cancérogénèse (**Christine Bidaud, 1998**).

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

### 3.2.4 Polychlorobiphényles (PCB)

Ce sont des composés chlorés, très stables insolubles dans l'eau, ils ont une forte cohésion pour les lipides et les matières en suspension, Ils se ressemblent dans le milieu naturel et se bio-accumulent dans la chaîne alimentaire, par exemple dans les graisses des poissons et d'autres organismes vivants (**Pereira et al., 2004**).

les PCB sont abondamment utilisées dans la fabrication des condensateurs, transformateurs, fluides hydrauliques, lubrifiants, pesticides (**De et al., 2004**). Ils se dégradent être à haute température (1200°C), leur combustion peut engendrer des dioxines et des furanes, éléments cancérogènes et mutagènes (**Barriuso E et al., 1996**).

### 3.2.5 Les composés organiques volatils (COV)

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

Ils participent, seuls ou en mélange, dans un grand nombre de pratiques d'industries manufacturières utilisatrices de solvants, d'application et de fabrication de peinture, de préparation de caoutchouc, la pharmacie, les imprimeries, les papeteries, la parfumerie, les industries agro alimentaires (**Lalanne, 2006**).

### 3.2.6 Les Pesticides

Connues aussi sous le nom des produits phytosanitaires ou bien des produits desynthèse introduits dans l'environnement par l'homme pour plusieurs raisons soit (**Fdil, 2004**): protéger les récoltes et les denrées stockées, protéger les différents secteurs de l'agriculture intensive ou lutter contre les vecteurs de maladies.

A présent, ils ont classées en fonction de leur cible biologique, insecticide, herbicide ou fongicide (**Kankou, 2004**).

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

### **3.2.7 Impact des polluants organiques sur l'environnement**

#### **➤ Sur les sols et les eaux souterraines**

La pollution organique est un danger lors d'un contact direct avec les organismes vivants ou lors de leur transfert dans les chaînes alimentaires. Ce phénomène est dit la bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs dérivés de dégradation jusqu'aux teneurs atteignant les seuils de la toxicité (**Gabet., 2004**).

Les fuites de réservoirs de stockage posent un problème environnemental majeur en termes de risque de transfert d'hydrocarbures vers les nappes phréatiques et les êtres humains. Ils se produisent 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**).

#### **➤ Sur les végétaux et la chaîne alimentaire**

Les conséquences varient selon les organismes eux-mêmes et de la structure chimique des hydrocarbures. A titre d'exemple 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 conséquences sur certaines cultures qui poussent près des sources d'HAP, parce que les organes végétaux tels que les graines occupent une place importante dans l'alimentation humaine (**Kveseth et al., 1981**).

les HAP de poids moléculaire faible sont adsorbés sur les feuilles, cependant que les composés particuliers de plus haut poids moléculaire sont supprimés par la pluie (**Kolar et al., 1975**).

### ➤ Sur les milieux marins

Le pétrole est considéré comme l'un des polluants organiques les plus importants dans les milieux marins. Le principal danger est cerné dans le 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 (**Lestrangle et al., 2005**).

Les produits pétroliers 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 constituent 14 % des pollutions. L'impact environnemental à court terme peut être alarmant et touche sérieusement les écosystèmes et les populations qui vivent à proximité du littoral contaminé, du point de vue économique que de leur qualité de vie (**Soltani, 2004**).

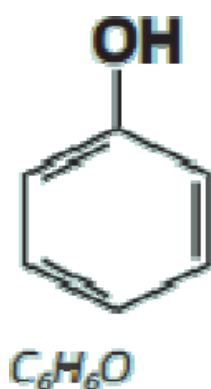
### 3.2.8 Généralités sur le phénol :

#### 3.2.8.1 Définition de phénol :

En 1650 Johann Rudolf Glauber, un scientifique allemand découvre le phénol à partir de la distillation du goudron de houille, en 1834 Friedrich Ferdinand Runge fini par 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 une équipe chimique allemande parmi les plus grands groupes de chimie au monde. Depuis ce temps, le phénol est devenu l'objet de multiples études. Le phénol est classé par Harborne and Simmonds en 1964 selon leur nombre de carbones dans la molécule (**Vermerris et Nicholson, 2007**).

C'est un polluant très répandu dans les effluents industriels, on le trouve dans les eaux usées des usines de transformation du charbon, des industries papetières, des raffineries du pétrole, des usines de fabrication de résines, de peintures, de textiles, de pesticides, des industries pharmaceutiques...etc. (**Mohammadi et al., 2015**).

La formule brute de phénol est  $C_6H_6O$ , c'est un composé organique aromatique composé de noyau benzénique associé avec un groupement hydroxyle ( $-OH$ ). Il est nommé aussi hydroxyle-benzène, acide phénique ou acide carbonique (**Nair et al., 2008**).



**Figure 03** Structure chimique de la molécule de phénol (Bonnard *et al.*, 2011).

### 3.2.8.2 Origine de phénol :

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

### 3.2.8.3 Propriété physico-chimique :

Le phénol est l'unité structurelle de base pour beaucoup de composés organiques de synthèse, c'est un solide sous forme d'une masse cristalline ou d'aiguilles incolores dans les conditions normales de température et de pression. Il est modérément volatile à la température ambiante et très inflammable (Clabrassé et Kenyon, 1991). Il a une odeur caractéristique plus au moins forte (Amoore et Hautala, 1983).

En présence d'impuretés, d'eau ou de lumière, le phénol se teint en rose ou rouge, 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.

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 (Clabrassé et Kenyon, 1991).

**Tableau 02** : Propriété physico-chimique de phénol (Calabrese et Kenyon, 1991).

Propriétés	Phénol
Masse molaire	94,14 g.mol <sup>-1</sup>
Diamètre moléculaire	0.55 nm
Constante d'équilibre (Pka)	9.99 (phénol/phénolate)
Température de fusion	41°C
Température d'ébullition	182°C
Solubilité dans l'eau	88.360 mg/L
Tension de vapeur à 20°C	47 A

#### 3.2.8.4 Application de phénol

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

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

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

#### 3.2.8.5 Toxicité du phénol

##### ➤ Sur l'environnement :

Le rejet du phénol dans la nature, sans traitement peut modifier les écosystèmes aquatiques et causer des dommages. Dans l'eau, et en raison de sa forte toxicité, sa solubilité, 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).

La présence de ces composés toxiques dans l'eau entraîne une baisse 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, ce qui entraîne un handicap du biotope aquatique.

Il est confirmé qu'il peut également causer des dommages génétiques pour les poissons.

La majorité des phénols et leurs dérivés sont des substances toxiques, beaucoup d'entre eux sont arrangés comme des déchets dangereux, et certains d'entre eux sont connus d'être cancérogènes. Le phénol est rapidement éliminé par les reins sous forme libre et conjuguée (80 à 90% sont excrétés en 24 heures), les manifestations toxiques sont dues au phénol libre non éliminés. L'ingestion accidentelle, l'absorption cutanée massive entraînent par fois la mort (**Michalowicz et Duda, 2007**).

### ➤ **Sur l'Homme :**

Le phénol est rapidement absorbé (70 à 80% en 6 heures), il cause une dénaturation des protéines et détruit ainsi les parois cellulaires. Les organes ciblés sont les reins, le cerveau, le foie, le sang, le pancréas, les poumons et la muqueuse gastro-intestinale.

L'ingestion de 1g de phénol est considéré comme létale pour les humains, au dessous de ca peut provoquer :

- des maux de tête et vomissements.
- une faiblesse musculaire et l'étourdissement.
- des troubles de la vision et de l'audition.
- une respiration rapide et irrégulière.
- des brûlures de peau (**Kumaran et Paruchuri, 1997**)
- une dépression cardiaque (**Chakraborty et al., 2010**).
- des lésions hépatiques et rénales.
- des troubles du système nerveux central (**Olujimi et al., 2010**).

## **4. Les procédés d'élimination des polluants**

### **4.1 Les procédés physico-chimiques d'élimination des polluants des sols**

#### **4.1.1 Les procédés thermiques**

La technique la plus utilisé, avec un excellent rendement est l'incinération, elle se fait toujours hors-site, elle s'adapte à tous les polluants organiques. La température de traitement est varié de 1000 à 1100C°, est obtenue par chauffage direct du sol à traiter, les gaz et les poussières produits doivent être traités impérativement. L'objectif final étant de faire disparaître les naissances et de minimiser les risques vis-à-vis de l'environnement (**khan et al., 2004**).

#### **4.1.2 Les procédés électriques**

Le principe des procédés électriques repose sur la circulation d'un courant électrique dans le sol par le médiateur d'un 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 rattrapés par pompage (**Stegmann et al., 2001**).

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

#### **4.1.3 Les procédés par évacuation ou entrainement**

Le mécanisme est consiste a un transfert d'un polluant de phase liquide ou solide vers une phase gazeuse par l'inoculation 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 vapeur toxique qui sont ensuite traitées par un filtre ou par autre procédés (**khodadoust et al., 2004**).

#### **4.2 Les procédés physico-chimiques d'élimination des polluants des eaux**

- La décantation : fondée sur l'élimination les particules dont la densité est supérieure à celle de l'eau par gravité. La base de ces procédés de séparation solide liquide est l'attraction. L'usage de réactifs coagulants ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  ... etc.), bien qu'ils ne soient pas souvent employés, elle favorise 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 fragiliser les particules en suspension. En pratique, ce procédé est caractérisé par l'introduction et la dispersion rapide de produits chimiques : sels minéraux cationiques (sels de fer ou d'aluminium) (**Faby., 1997**).
- La floculation : a pour but de favoriser, à l'aide d'un mélange lent, l'adhérence entre les particules déstabilisées. Ces particules s'agglutinent pour former un joint qu'il peut être facilement éliminé par les procédés de décantation et de filtration (**Lazarova, 2003**).

- L'adsorption sur charbons actifs : Le charbon est dit actif après avoir subi multiple opérations telles que la pyrolyse, ces modifications permettent de le rendre poreux et d'augmenter sa surface d'échange avec l'eau (**Farhadian et al. 2008**).
- Les propriétés du charbon actif 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**).

### 4.3 Les procédés biologiques

Le traitement de l'environnement par les procédés biologique demeure une technique puissante et moins coûteuses basées sur la capacité et le pouvoir des microorganismes existent naturellement dans le milieu pour la métabolisation des polluants (**Amrouche et al., 2011 ;** ).

#### 4.3.1 La biodégradation de phénol

La biodégradation désigne la décomposition des contaminants organiques complexes, potentiellement toxiques, en composés non toxiques et plus simples par l'activité microbienne. Ces contaminants peuvent être considérés comme élément nutritive ou substrat de croissance. Ils font l'objet d'une série de réactions biochimiques aboutissant 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 aptes de résister à des concentrations toxiques pour les autres organismes (**Goudar et al., 2000**).

##### 4.3.1.1 Les microorganismes dégradant le phénol

Un grand nombre de micro-organismes, dont des bactéries, des champignons et des algues, sont capables de dégrader le phénol. La biodégradation du phénol et ses dérivés par des bactéries a été largement étudié et un grand nombre de bactéries dégradant le phénol ont été isolées et caractérisées physiologiquement et génétiquement. Les cultures pures et mixtes du genre *Pseudomonas* sont la biomasse la plus couramment utilisée pour la biodégradation des phénols, et les chercheurs pensent qu'elles ont un bon potentiel pour différentes applications biotechnologiques. Plus précisément, *Pseudomonas putida* a été couramment utilisé pour la biodégradation du phénol en raison de son efficacité d'élimination élevée. Les réponses de *P. putida* aux stress chimiques ont indiqué que ses cellules pourraient utiliser divers mécanismes de protection pour survivre dans divers environnements extrêmes (**Lakshmi et Sridevi, 2015 ; Loh et Cao, 2008 ; Mizzouri, 2017 ; Khalid et El-Naas, 2012**). Des résultats similaires ont été montrés pour les souches de *Bacillus*, une bactérie à haut potentiel de

dégradation du phénol et à haute **tolérance** (Arora, 2020 ; Hassan et al., 2016 ; Banerjee et Ghoshal, 2010 ; Tam et al., 2006).

Ces études pourraient aider à synthétiser de nouvelles bactéries souches avec une capacité de dégradation accrue et une tolérance améliorée aux substances toxiques polluantes. Les champignons ont une part importante dans le recyclage des composés aromatiques dans la biosphère et plusieurs études ont montré que divers champignons sont capables de la minéralisation des phénols. Ils sont capables de consommer une grande variété des sources de carbone par des mécanismes enzymatiques, offrant ainsi des possibilités métaboliser les phénols et autres dérivés aromatiques (Basha et al., 2010 ; Chandana et Sridevi, 2009 ; Al-Khalid et El-Naas, 2012 ).

La bioélimination des phénols par les bactéries et les champignons a été largement étudié, cependant, la recherche s'est intéressé à la capacité de certaines algues pour la biodégradation du phénol. La biodégradation de phénol par les microalgues ne se produit que dans des conditions aérobies. Tandis que certaines les algues ont une faible tolérance à la toxicité aiguë des phénols, à la fois des cyanobactéries et des microalgues eucaryotes (par exemple, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Selenastrum capricornutum*, *Tetraselmis marina*, *Ochromonas danica*, *Lyngbya gracilis*, *Nostoc punctiforme*, *Oscillatoria animalis*, *Phormidium foveolamm* sont capables de biotransformer les composés phénoliques (Al-Khalid et El-Naas, 2012).

#### 4.3.1.2 Les voies de dégradation de phénol

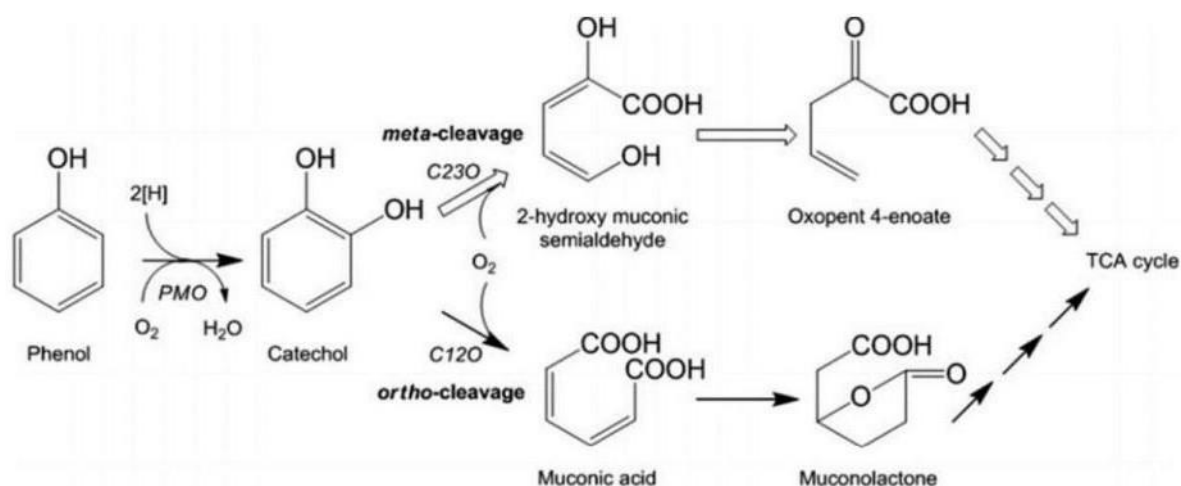
##### ➤ Voie de biodégradation aérobie

En condition aérobie, les microorganismes se multiplie grâce au processus de respiration en utilisant l'énergie d'oxydation des phénols. La dégradation entraîne une série d'actions enzymatiques spécifiques qui font partie de la voie catabolique. La première étape du métabolisme aérobie est l'hydroxylation des phénols en catéchol par la phénol-hydroxylase, qui est une enzyme dépendante du NAD(P) H (Chandana et Sridevi, 2009).

Cette enzyme ajoute un atome d'oxygène dans le cycle aromatique pour former le catéchol qui subit alors un clivage du noyau par la dioxygénase (Beadle et Smith, 1982).

Le catéchol est dégradé soit par ortho- ou meta-fission en intermédiaires du métabolisme central (Seo et al., 2009)(figure 04).

Après plusieurs étapes ultérieures, les sous produits des deux voies ortho et meta sont incorporés en tant qu'intermédiaires du cycle de Krebs (Chandana et Sridevi, 2009).



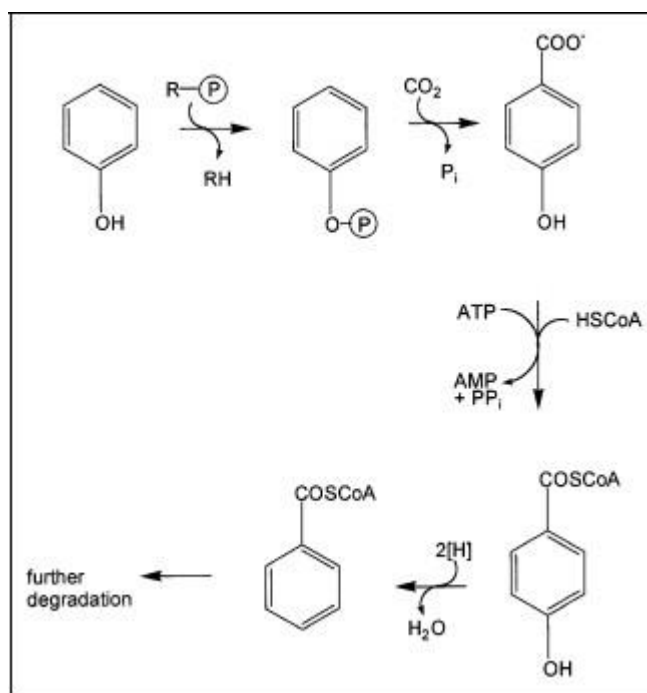
**Figure 04:** Voie aérobie pour le métabolisme des phénols (Subramaniam *et al.*, 2020).

➤ **Voie de biodégradation anaérobie**

La dégradation anaérobie des phénols est initiée par carboxylation qui s'effectue en deux grandes étapes, la première consiste à impliquer la phosphorylation des phénols par l'addition d'un groupe phosphate, à partir d'un donneur de phosphoryle, ensuite catalysée par une enzyme appelée phénylphosphate-synthase (kinase) pour arranger le phosphate de phényle comme premier intermédiaire (Lack et Fuchs, 1992)(Figure 05).

La seconde étape implique la carboxylation du phosphate de phényle, catalysée par l'enzyme phényl-phosphatecarboxylase pour former le 4-hydroxybenzoate. Cette étape est extrêmement sensible à l'oxygène. (Van shie et Yong, 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 moins efficace et plus lente.



**Figure 05:** Premières étapes de la dégradation du phénol par la bactérie dénitrifiante *Thauera aromatica* (Schink et al., 2000).

#### 4.3.1.4 Applications des microorganismes dans la dépollution des eaux

Le traitement biologique des eaux usées exploite de la matière vivante telle que des microorganismes qui habitent naturellement dans le milieu, des cellules animales et végétales. Deux types de traitement existent dans le traitement des eaux usées, le premier consiste à dégrader les déchets organiques en milieu aérobie, en libérant du gaz carbonique. Le deuxième, en milieu anaérobie mène à une fermentation, libérant ainsi du gaz carbonique et du méthane. Lors de la dégradation aérobie du phénol, l'oxygène moléculaire extrêmement réactif est utilisé pour la décomposition initiale du noyau aromatique (Tay et al., 2006).

L'utilisation de boues activées est la solution la plus attrayante en raison de ses multiples avantages (Barrios-Martinez et al., 2006; Tziotziou et al., 2007). Ce bioprocédé consiste essentiellement en une attaque aérobie qui oxyde les matières organiques et autres contaminants des eaux usées en dioxyde de carbone, eau et biomasse. L'air est servi par l'aération par diffusion ou mécanique et les microorganismes forment des boues activées qui sont traitées dans un clarificateur secondaire. Plusieurs types de réacteur existent dans la décontamination des eaux usées, les réacteurs de type films suspendus, lit fixe et lit panier mais divers problèmes apparaissent lors du traitement de solutions phénolées ayant un taux élevé de charge organique. Le SBR est un réacteur biologique séquentiel.

Des études signalent que l'utilisation des SBR pour l'élimination du phénol convient seulement pour des taux de charge modérée. Une étude avec des solutions de phénol, ayant une concentration initiale égale à 120 mg/L, montre qu'un 18 réacteur discontinu séquentiel SBRensemencé avec une culture d'halophile permettent d'éliminer 99,5% de phénol (**Woolard et Irvine, 1995**). Cependant, pour des charges élevées en phénol, les systèmes SBR classiques ont une faible efficacité et conduisent à des conséquences techniques, tels que la production de boues en excès. A pour but d'améliorer l'efficacité de ces processus, des études faites sur l'intégration de lit mobile à un système SBR, (MSBR) développant ainsi une technologie plus efficace et fiable pour la purification des flux d'eaux usées contenant des concentrations élevées de phénol (**Moussavi et al., 2009**). Ainsi, le réacteur MSBR peut purifier des solutions ayant des concentrations de phénol jusqu'à 3103 mg/L. Il conduit à une efficacité d'élimination presque complète de phénol (**Ehtash, 2011**).

Les procédés de biosorption apparaissent comme une technologie alternative pour l'élimination des polluants présents dans l'environnement. Une application du mécanisme de biosorption se trouve dans l'immobilisation des cellules microbiennes pour l'élimination des polluants toxiques dans les eaux usées industrielles. L'immobilisation de micro-organismes sur des nano-soutports magnétiques est une récente technique pertinente appliquée pour obtenir des biocatalyseurs pour le contrôle de la pollution de l'environnement, Considérant l'application pertinente des nanoparticules magnétiques comme support pour l'immobilisation de micro-organismes dans l'élimination des métaux lourds de l'environnement (**Alver et Metin, 2017 ; Liu et al., 2005 ; Wang et al., 2012 ; Escobedo-Morales et al., 2022**). La biosorption présente des avantages par rapport aux techniques conventionnelles, tels que de faibles coûts d'exploitation, aucune production de composés secondaires et des temps d'opération courts (**Giese et al., 2020**).

Une autre méthode très connue dans les bioprocédés des traitements des eaux usées, c'est l'utilisation des bio-surfactants ou les bio-tensioactifs, ces derniers sont des produits naturels synthétisés par des bactéries, des levures ou des champignons provenant de différents substrats, y compris les sucres simples, les huiles, les alcanes ou des hydrocarbures provenant d'un environnement contaminé. Ils ont la capacité de réduire la tension de la surface et de l'interface entre les substances liquides et solides (**Cherif, 2016**). Les bio-surfactants sont des composés amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire.

Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di), le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés (Cherif, 2016). Les bio-surfactants sont classés en différents classe selon leur nature biochimique, et chaque type de microorganisme synthétise un bio-surfactant de nature précise, par exemple, la bactérie *Pseudomonas aeruginosae* produise des rhamnolipides de la classe des glycolipides, *Bacillus subtilis* produise de la surfactine du groupe lipopeptide et lipoprotéine, *Acinetobacter calcoaceticus* synthétise des emulsan qui sont classés dans les lipopolysaccharides ou polymériques (Cherif, 2016).

# Matériels et méthodes

## 1. Le support d'isolement des bactéries d'intérêt (sols pollués par les hydrocarbures, le cas d'un gisement pétrolier à Hassi Messaoud)

### 1.1 Échantillonnage

Le site d'échantillonnage de choix de cette étude, est un puits de pétrole exploité par l'entreprise SONATRACH (Entreprise Pétrolière et Gazière Algérienne) de la région de Hassi Messaoud, wilaya d'Ouargla (**Figure 06**).



**Figure 06** : Localisation de site d'échantillonnage (**google Earth**).

Le gisement pétrolier se situe dans le bassin de Berkine et qui atteints une profondeur de 3795 mètres, le type d'échantillon prélevé est un sol qui présente le support principal d'isolement des bactéries.

Huit prélèvements de sol (**Figure 07**) ont été pris à des profondeurs différentes : 13 cm (nommé E), 3712m, 3766m, 3769m, 3771m, 3791m et 3795m.

Les différents échantillons de sols contaminés ont été récupérés en mois de mars 2019. L'échantillonnage a été réalisé sous un conditionnement microbiologique strict, en utilisant des instruments stériles et les différents échantillons ont été mis dans des boîtes en plastique stériles et conservés à l'abri de la lumière à 4°C pour garder l'humidité à fin d'éviter la perte des cellules vivantes et les transformations abiotiques (**Razan, 2011**).

Les sols prélevés ont été directement transporté par véhicule dans une glacière au laboratoire (Le laboratoire pédagogique de l'Université Ammar Telidji, Laghouat).

Une fois au laboratoire les échantillons ont été examinés par leur aspect physique, la couleur et l'odeur. Tous les échantillons ont présentés une très forte odeur d'hydrocarbures, une couleur plus au moins foncé entre le marron et le noir, et une humidité considérable.



**Figure 07** : Aspect de sol récolté à partir du forage de pétrole à Hassi Messaoud : Bassin de Berkine  
(Originale, 2022).

## 2. Etude de la biodiversité microbienne des sols pollués par le pétrole

### 2.1 Isolement de la flore totale des bactéries cultivables

Les communautés bactériennes des sols bruts SE1, S3712m, S3766m, S3769m, S3771m, S3791m et S3795m ont été extraites par une approche classique de microbiologie par étalement, d'un échantillon issu de sol sur un milieu de culture qui a été utilisées pour favoriser la croissance cellulaire et permettre ainsi la multiplication clonale des différentes bactéries cultivables.

#### 2.1.1 Enrichissement

Vu la pauvreté des sols pollués en matière organique, et à fin d'apporter les éléments nutritifs nécessaires pour la croissance bactérienne, nous avons opté pour un enrichissement dans un bouillon nutritif (**composition en annexe 01**).

Dans des conditions d'asepsie strictes, 5 g de sol sont mis dans 45 ml de bouillon nutritif stérile, et puis chaque flacon est ensuite additionné d'un volume de 100  $\mu$ l de phénol à 0,1 % (**annexe 01**)

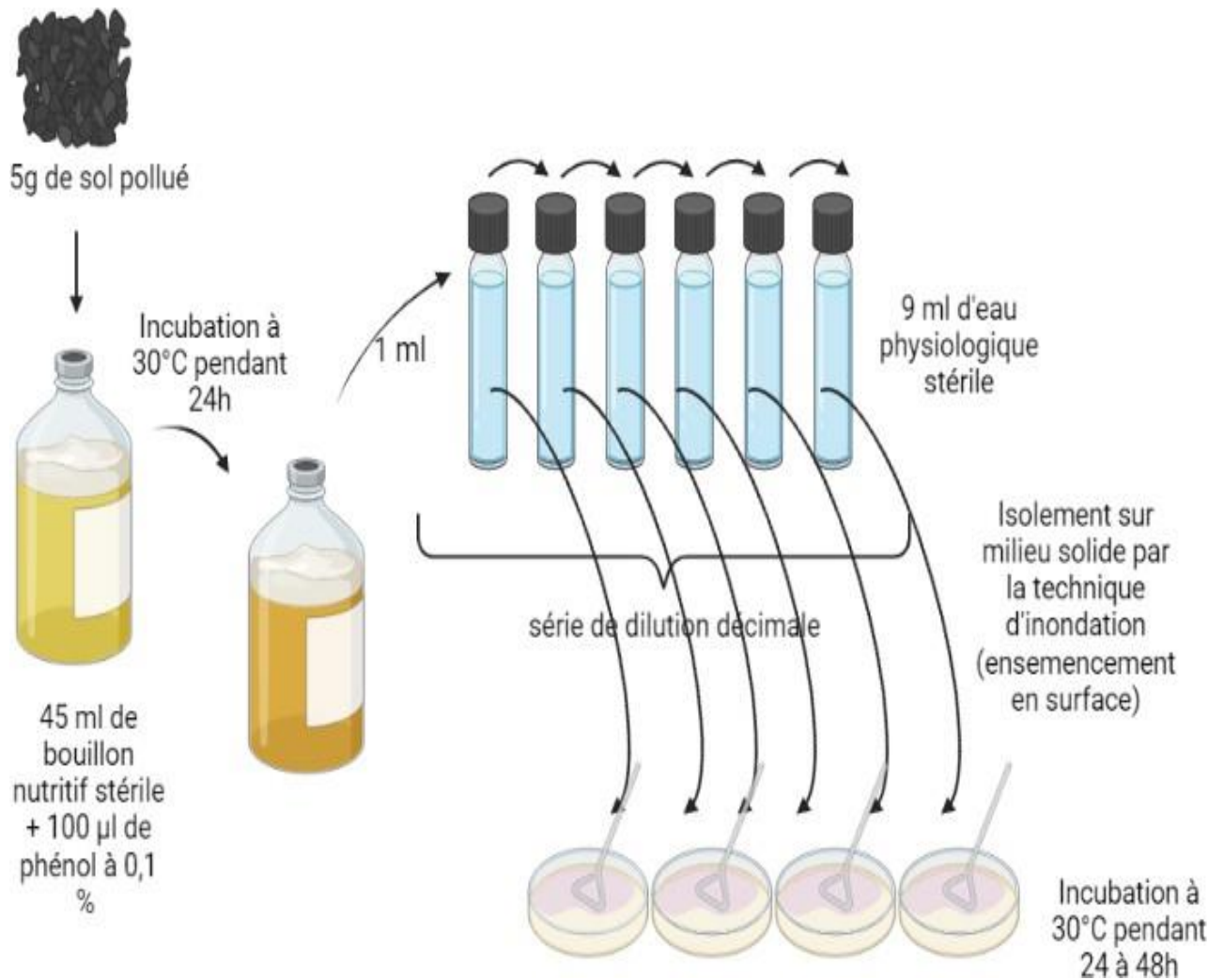
comme une deuxième source carbonée, cette stratégie est faite pour favoriser le co-métabolisme de phénol avec les composés facilement assimilables de bouillon nutritif (Técher, 2011). Ensuite, et à l'aide d'un agitateur vortex, les flacons ont été bien homogénéisés, les cultures ont été par la suite incubées pendant 24 h à 30° C en aérobiose.

### **2.1.2 Préparation des dilutions décimale**

Après incubation pendant 24H, les cultures dans le bouillon ont subi des séries de dilution décimale de  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$  (Figure 08) dans l'eau physiologique stérile (0,9%, m/v, NaCl). Cette étape est requise pour avoir un bon isolement des germes dans le milieu gélosé et pour une meilleure détermination qualitative des microorganismes cultivables des différents échantillons des sols contaminés (Técher, 2011).

### **2.1.3 Culture solide (ensemencement en surface)**

À partir de chaque dilution, un volume de 100 µl de chaque dilution a été prélevé et mis sur la surface de la gélose Luria Bertani (composition en annexe 01), ensuite le dépôt est inondé par la technique de râteau, les boites ont été ensuite incubés à 30°C pendant 24 à 48 H (Kivisaar et al., 1990 ; Polymenako et Stephano, 2005 ; Basak et al., 2014).



**Figure 08 :** Schéma représentatif de la technique d'isolement des bactéries telluriques.

#### 2.1.4 Purification des isolats bactériens

Un seul type de microorganismes ne peut pas être étudié dans une culture hétérogène, la purification des bactéries est réalisée sur le même milieu solide d'isolement (gélose LB) par la technique d'épuisement (des quadrants). Les isolats obtenus ont été repérés par leur aspect de colonie, et chaque type de colonie est ensuite transféré dans une culture unique, et les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 à 48 H. La vérification de la pureté des isolats est assurée par un triple repiquage successif et une observation microscopique après une coloration de Gram (**Benmouna, 2012**).

## **2.1.5 Conservation des souches**

### **2.1.5.1 Conservation à longue durée**

Une culture de 24 heures des isolats purifiés dans le milieu LB ont été récupérée et mise dans un milieu de conservation préalablement autoclavé à base de LB bouillon et de glycérol à 20% (v/v) dans des tubes Eppendorf stériles à -20 °C (**Djahnit et al., 2019**).

### **2.1.5.2 Conservation à courte durée**

Les différentes isolats pures en phase de croissance exponentielle sont mises dans un réfrigérateur à 4 °C pour un usage quotidien, les boîtes de culture doivent être entourées d'un film et stockées à l'envers pour minimiser le risque de contamination et pour conserver une hydratation suffisante. Pour une utilisation ultérieure et une conservation de 1 à 3 mois, les isolats purs ont été mis en culture dans des tubes contenant le milieu LB incliné, l'ensemencement se fait sur la pente. Les cultures obtenues après incubation doivent être conservé à 4°C.

## **2.1.6 Identification préliminaire des souches bactériennes**

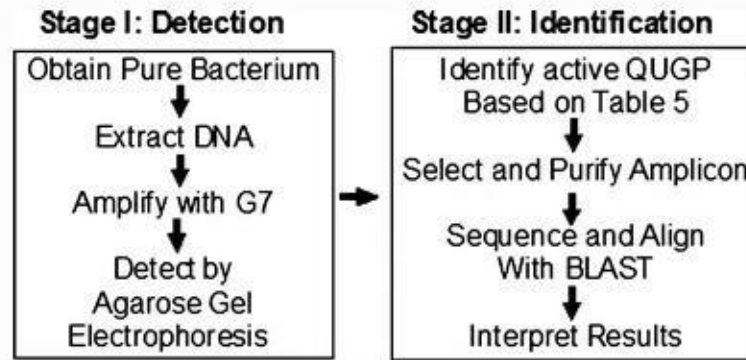
Les genres de microorganismes ont été pré-identifiés grâce à leurs caractéristiques morphologiques et chimiques et leur capacité à se développer en milieu sélectif. Les paramètres testés comprenaient la morphologie coloniale, la forme microscopique, la réaction de Gram, l'enzyme respiratoire, la résistance naturelle aux antibiotiques et certains tests biochimiques utilisant API 20<sup>E</sup> de biomérieux (France). Les résultats de l'identification préliminaire ont été comparés au *Bergey's Manual of Determinative Bacteria* (**Bergey, 1994**).

## **2.2 Caractérisation et identification des bactéries isolées par séquençage de gène 16S**

### **« Approche génomique »**

Cette étape est réalisée au niveau de la faculté des sciences (le laboratoire de biologie moléculaire) de l'Université Djillali LIABES Sidi-Bel-Abbès par Dr. Drici Amine et Dr. Tifrit Abdelkarim.

Chaque espèce possède dans son génome au moins une séquence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) qui lui est propre et qui la distingue des autres espèces. L'identification moléculaire fait appel à des techniques fondées sur, la détection des séquences bien précise, dans notre cas nous avons identifié nos isolats par leur gène 16S. Cette approche est réalisée selon la méthode universelle d'identification des bactéries (**Figure 09**).



**Figure 09** : Une présentation sous forme d'organigramme du protocole universelle ; à partir d'une culture bactérienne pure ou d'ADN, se terminant par l'alignement de l'ADN (BLAST) et l'identification bactérienne (Barghouthi, 2011).

### 2.2.1 Extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN génomique bactérien de nos isolats a été réalisée avec le kit commercial NucleoSpin® Microbial DNA.

À partir d'une culture pure sur milieu solide, une colonie bien isolée de chaque souche a été mise dans un tube Eppendorf contenant 200 µl d'eau ultra pure, ensuite, la suspension est bien homogénéisée par un agitateur Vortex et centrifugée à 1300 g pendant 3 minutes pour la récupération de culot.

Pour la dénaturation de la membrane cellulaire, un tampon de lyse qui contient le SDS a été ajouté à un volume de 200 µl et la protéinase K pour la dénaturation des protéines à un volume de 50 µl à partir d'une solution mère d'une concentration de 20 mg/L.

Ensuite, les échantillons ont été mis dans un bain marie sec (hot bloc) pour éviter la contamination avec de l'eau pendant 15 minutes. Après la lyse cellulaire, un volume de 280 µl d'éthanol pure a été ajouté et les eppendorf ont été bien vortexés.

A pour but de séparer les acides nucléique, une chromatographie miniaturisé à été faite dans des tubes qui contient une couche de silice pour l'emprisonnement de l'ADN, les contenu des Eppendorf a été versé dans les tubes à chromatographie miniature, et ces dernier ont été placé dans une centrifugeuse a 10000 g pendant 1 minute.

Ensuite une série de lavage est faite pour la purification des ADN, 500 µl de tampon (wash bath 1) à été ajouté et les tubes seront mis dans la centrifugeuse pour une centrifugation de 10000 g pendant 1 min. Le surnageant de la solution est jeté, après une deuxième solution de lavage a été ajouté (wash bath 2) à un volume de 500 µl et on refait la centrifugation avec la même

étape précédente et on jette le surnageant.

L'éthanol est considéré comme un inhibiteur de la PCR, alors l'élimination de ce dernier est faite par une troisième centrifugation à vide à pendant 2 minutes à une rotation de 10000g.

Ensuite, la colonne de la chromatographie miniature a été récupéré et introduite dans un Eppendorf vierge pour l'élution, 50 µl de tampon d'élution a été ajouté et laissé pendant 5 minute pour la libération d'ADN. Après le repos de 5 minutes, une centrifugation est faite à 10000g pendant 2 minutes (Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2001 ; McKew *et al.*, 2007).

### 2.2.2 Amplification de gène d'ARNr 16S par PCR

#### 2.2.2.1 Préparation de Mix

Une solution de Master Mix a été préparé selon les composants cités dans le **Tableau (03)**, les volumes et les quantités ont été déterminé en calculant sur le logiciel Excel les quantités suffisante pour l'ensemble des échantillons. Une fois le Master Mix est préparé, les dNTP sont ajouté minutieusement à la préparation et la solution de MgCl<sub>2</sub> a subie une bonne homogénéisation à fin d'éviter le gradient de pH.

**Tableau 03** : les composants et les quantités de Mix de la PCR (Etablie par l'entreprise Gène Life Science)

Composants	Volume pour une réaction (µl)
Eau stérile	11,56
Tampon de Taq	4
Mg <sup>++</sup> Cl <sub>2</sub>	1,20
dNTP	0,48
Amorce 1	0,5
Amorce 2	0,5
Taq	0,16
ADN	2
Volume finale	20,4

#### **2.2.2.2 PCR**

Cette étape est élaborer après l'extraction des acides nucléique des bactéries, elle consiste à amplifier le gène qui code pour le ARNr 16S.

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR (réaction en chaîne par polymérase), sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique.

Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable qui est le Thermocycleur.

Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur (effectuer automatiquement les cycles de chauffage).

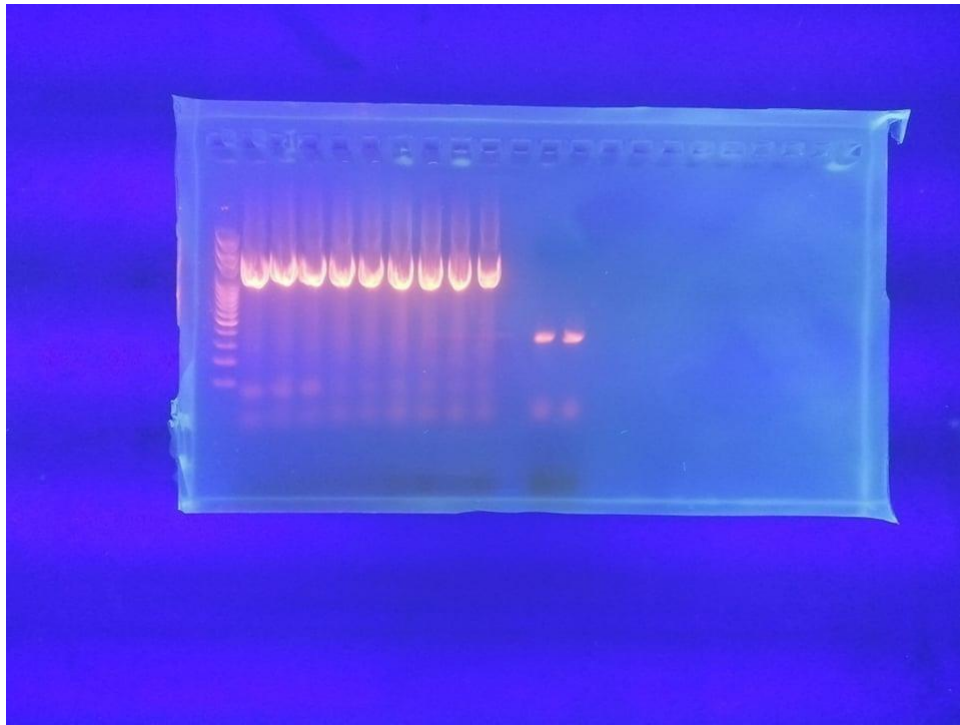
Le secret de la PCR est que le produit d'un cycle d'extension sert de matrice pour le suivant, ainsi la technique PCR est remarquable par le fait que l'ADN cible se double à chaque cycle. En pratique 20 à 40 cycles sont habituellement réalisés, ils génèrent 106 à 109 fois la séquence cible (**Larzul, 1989**).

L'amplification du gène de l'ARNr 16S à partir de l'ADN génomique a été réalisée avec les amorces universelles suivantes: amorce sens 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 ') et amorce antisense 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT -3' (**Hou et al., 2018 ; Akhmaloka et al., 2006 ; Hayashi et al., 2004**).

Les réactions d'amplification par PCR ont été réalisées par suivant un cycle commençant par une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivies de 35 cycles d'une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'une hybridation à 55°C pendant 45 secondes et extension à 72°C pendant 90 secondes. La procédure a été complétée par une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 10 min (**Barghouthi, 2011**) (Protocole légèrement modifié).

#### **2.2.2.3 Vérification de la présence d'amplicons sur gel d'agarose**

La taille attendue des répliques de notre gène 16S était autour de 1100 paires de bases et a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v) coloré au bromure d'éthidium (BET) (**Ibrahim, 2017**). Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous une lampe de lumière ultraviolette (**Figure 10**), Une bande d'amplification unique à 1100 paires de bases on été obtenues pour tous les isolats.



**Figure 10:** Confirmation de la présence d'amplicons sur gel d'agarose sous une lampe Ultraviolette (originale, 2022).

### **2.2.3 Séquençage d'amplicons par la méthode Sanger**

Un séquençage à bas débit a été réalisé après amplification du gène codant pour l'ARNr 16S. La méthode de séquençage de l'ADN de Sanger utilise des terminateurs aléatoires qui bloquent la polymérisation de l'ADN par l'ADN polymérase. Pour la technique de séquençage, d'abord, à partir des produits de la PCR on extrait un échantillon à analyser et on récupère un fragment d'ADN, ensuite on force l'ADN à se dérouler par un chauffage et les deux brins de la double hélice se séparent en brins individuels. La prochaine étape consiste à abaisser la température et à ajouter l'amorce d'ADN, cette amorce d'ADN s'attache au brin d'ADN à séquencer. Elle signale le début du séquençement. Ensuite, on augmente légèrement la température. Puis, on ajoute des nucléotides libres et l'ADN polymérase.

Les nucléotides libres contiennent l'une des quatre bases suivantes : cytosine, thymine, guanine ou adénine. En commençant par la séquence d'amorce, l'ADN polymérase construit un brin d'ADN complémentaire. Elle le fait en ajoutant un nucléotide à la fois.

Quatre réactions de séquençage différentes doivent se produire, une pour chacun des quatre types de nucléotides. Pour obtenir ces réactions, on ajoute au mélange des versions chimiquement modifiées

de chacun des nucléotides. Ces versions indiquent la terminaison d'une chaîne. Chacun de ces nucléotides spéciaux est étiqueté avec un fluorophore différent.

Lorsque l'ADN polymérase atteint un nucléotide de terminaison de chaîne, elle arrête la séquence d'ADN qu'elle était en train de construire. L'ADN polymérase ajoute les nucléotides modifiés de façon aléatoire. De nombreuses séquences d'ADN de différentes longueurs sont donc formées.

Ensuite, les segments d'ADN subissent l'électrophorèse en gel. Celle-ci permet de séparer les fragments d'ADN de différentes longueurs. Pour ce faire, on ajoute les fragments d'ADN à un excipient de gel, puis y faire passer un courant électrique. Cela fait en sorte que les segments s'alignent dans le gel en fonction de leur taille. Les petits fragments se déplacent davantage que les gros. Lorsque les fragments ont fini de se déplacer, on examine le gel à l'aide d'un appareil de radiographie ou d'une lumière UV. Ainsi, chaque segment devient visible.

On peut « lire » le gel en regardant les bandes foncées dans chaque colonne. Il y a une colonne pour chaque type de nucléotide (G, C, A, T). En examinant la séquence des bandes, on peut déterminer la séquence des nucléotides (**Figure 11**) (Lamoril et al., 2008).

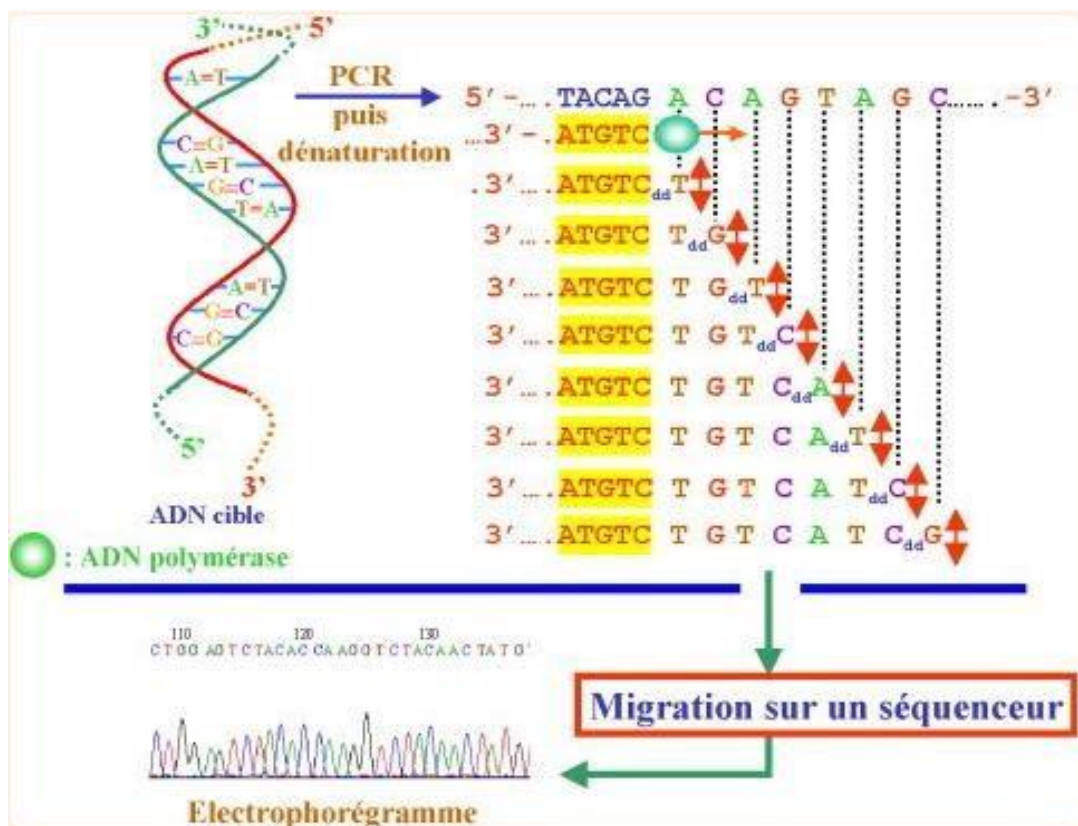
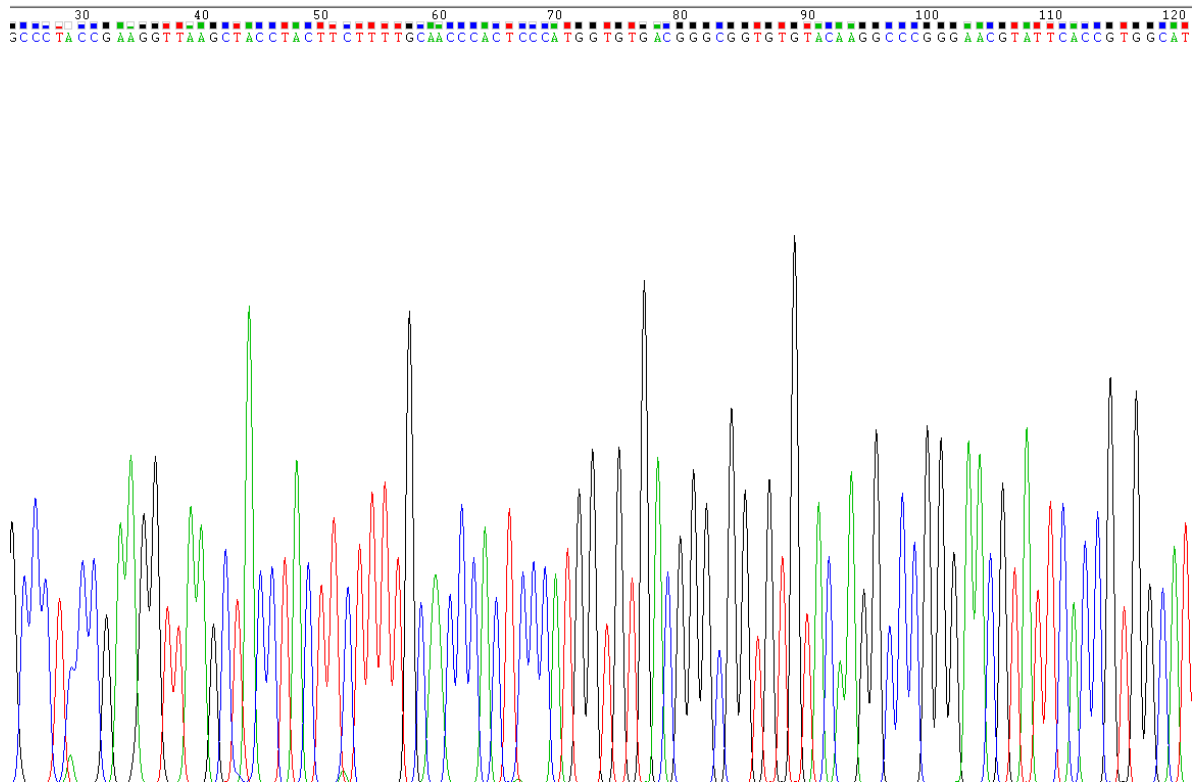


Figure 11 : Principes du séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril et al., 2008).

Les fragments produits d'amplification sont séquencés dans un séquenceur Sanger 3730 XL d'ABI en utilisant les mêmes amorces d'amplification. Les séquences d'ADN obtenues sont présentées sous forme de pics colorés (**figure 12**) avec 4 couleurs différentes correspondant chacune à une base d'ADN, cette étape est réalisée pour la vérification de la pureté des séquences.



**Figure 12:** Présentation des pics d'une partie de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S avec le programme ChromasPRO.

#### 2.2.4 Comparaison et identification des séquences génomiques par « Gene Bank »

La détermination des similitudes et l'identification des séquences obtenues sont réalisés par le biais de BLAST nucléotide [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (**Figure 13**) qui consiste à faire des comparaisons non due au hasard mais par le calcul d'une matrice de score d'alignement pour identifier les homologues par les régions les plus longues qui présentent une homologie.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<a href="#">Kocuria sp. strain D32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria sp.</a>	2097	2097	85%	0.0	96.98%	1440	<a href="#">MG594849.1</a>
<a href="#">Bacterium ST22-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">bacterium ST22-2</a>	2097	2097	85%	0.0	96.98%	1442	<a href="#">KP985683.1</a>
<a href="#">Kocuria sp. strain HY2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria sp.</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1466	<a href="#">MT568619.1</a>
<a href="#">Kocuria sp. strain L14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria sp.</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1408	<a href="#">MT516480.1</a>
<a href="#">Bacterium strain BH8S7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">bacterium</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1318	<a href="#">MT254882.1</a>
<a href="#">Kocuria rosea strain ER51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria rosea</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1392	<a href="#">MT124576.1</a>
<a href="#">Kocuria rosea strain JH-47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria rosea</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1409	<a href="#">MT102999.1</a>
<a href="#">Kocuria rosea strain QT-159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria rosea</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1437	<a href="#">MT081097.1</a>
<a href="#">Kocuria rosea isolate SH1-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria rosea</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1401	<a href="#">MG788298.1</a>
<a href="#">Kocuria rosea strain EH15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria rosea</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1392	<a href="#">MN750770.1</a>
<a href="#">Kocuria rosea strain PA-A-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria rosea</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1410	<a href="#">MN524175.1</a>
<a href="#">Bacterium strain MTL7-70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">bacterium</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1429	<a href="#">MH151293.1</a>
<a href="#">Kocuria sp. strain XIXJ027 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria sp.</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1458	<a href="#">MH801122.1</a>
<a href="#">Kocuria rosea strain IMR16-109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Kocuria rosea</a>	2095	2095	85%	0.0	96.97%	1398	<a href="#">MG190715.1</a>

**Figure 13** : L'interface de BLAST de l'identification des séquences d'ADN par le calcul de pourcentage d'homologie.

### 2.2.5 Phylogénie

Pour l'étude phylogénétique et la construction d'un arbre phylogénétique, les séquences ont été alignées avec l'ADN codant de l'ARNr bactérien 16s connu obtenu à l'aide du programme MEGA-11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, disponible sur <https://www.megasoftware.net/>. Les distances ont été calculées en utilisant la méthode : « The Neighbor-Joining Method » de Jukes-Cantor (Saitou et Nei, 1987).

Un test de robustesse à été intégré pour mesurer la robustesse des arbres construits avec le programme Mega11 (Daubin et Gouy, 2001 ; Castro et al., 2000).

## 3 Etude de la biodégradation de phénol

Diverses études et recherches scientifiques ont approuvé la capacité des bactéries isolées à partir des sols pollués par le pétrole ou ses dérivées, à métaboliser le phénol comme seule et unique source de carbone (Shradha et Ankush, 2010 ; Polymenako et Stephano, 2005 ; Balachandran et al., 2012 ; Mailin et Firdausi, 2006).

Les sols pollués sont considérés comme des milieux naturels qui demandent une autoépuration par leurs microorganismes autochtones ; ces derniers jouent un rôle majeur de nos environnements en dégradant les composés xénobiotiques, les déchets chimiques qui sont toxiques (Shradha et Ankush, 2010)

Dans la présente étude, la biodégradation de phénol est réalisée sur les souches qui présentent une capacité remarquable de métaboliser ce dernier comme étant la seule source de carbone et d'énergie, pour cela, une étape de sélection est faite à fin de cibler les souches bactériennes d'intérêt.

### **3.1 Présélection des souches d'intérêts et évaluation de leurs capacités bioremediatrices au phénol**

#### **3.1.1 Test de biodégradation de phénol**

Dans cette étude, seules les bactéries ayant la capacité de dégrader le phénol comme seule source de carbone et d'énergie ont été criblés en milieu minéral avec la composition suivante : 1000 mg NaCl ; 200 mg de MgSO<sub>4</sub> ; 1700mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 100 mg de NH<sub>4</sub>Cl ; 4 350 mg de HK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 30 mg de CaCl<sub>4</sub> et 1000 ml d'eau distillée. Le pH du Milieu minimum minérale a été ajusté à pH 7 par une solution de NaOH à 1N et HCl à 1N et réparti dans des flacons de 250 ml, puis autoclavé à 120°C/1B pendant 20 min (**Abd-El-Haleem et al., 2003**) (Composition légèrement ajustée).

Toutes les cultures minérales ont été réalisées en batch et incubées en aérobiose à 30°C sous agitation à 250 rpm pendant plusieurs jours.

La concentration de phénol était à l'ordre de 100 mg/L pour le test primaire de dégradation. Sous les mêmes conditions, d'autres flacons de cultures ont été faites avec la même concentration de phénol sans l'ajout des bactéries (des cultures témoins) pour la confirmation des résultats de la biodégradation.

La sélection des souches susceptibles de métaboliser le phénol a été déterminé par la disparition des traces de phénol dans les cultures bactériennes après dosage colorimétrique de phénol.

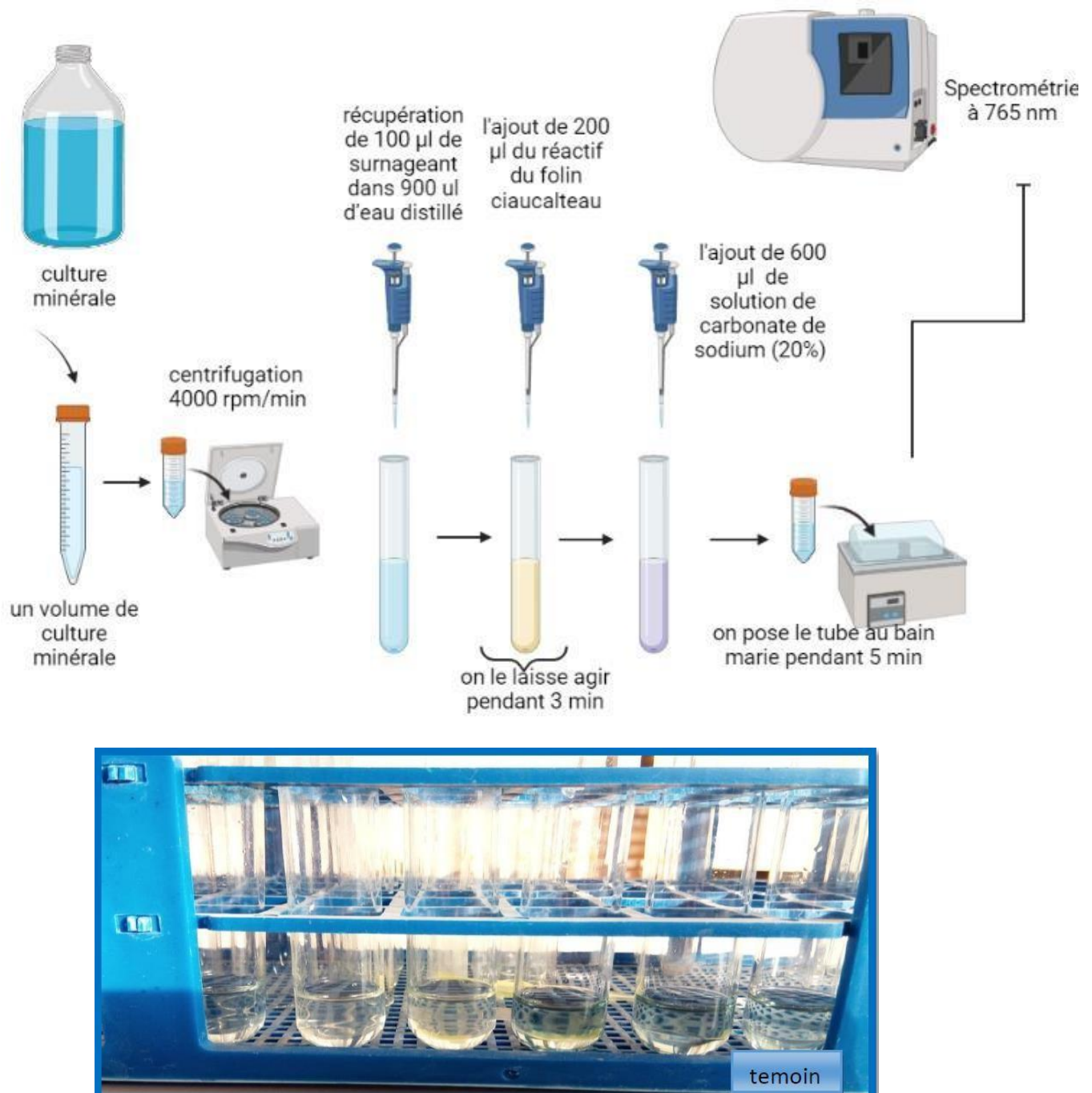
#### **3.1.2 Dosage colorimétrique**

La concentration en phénol résiduel a été estimée avec la méthode de Folin-ciocalteu qui est une méthode habituellement utilisée 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 tungstènes (**Waterhouse, 2010**).

Le dosage colorimétrique de phénol est réalisé à partir du surnageant après centrifugation de 5 ml d'une culture minérale à 4000 rpm pendant 10 min. Cette opération est requise pour la récupération du liquide qui contient le phénol seulement (**Figure 14**)

Ensuite, dans un tube à essai qui contient 900 µl d'eau distillé on ajoute 100 µl de surnageant de la

culture et 200  $\mu\text{l}$  du réactif du Folin-Ciocalteu, et on laisse le mélange agir pendant 3 minutes, après on rajoute 600  $\mu\text{l}$  de solution de carbonate de sodium (20%) et les tubes seront mis au bain marie pendant 3 à 5 minute. L'absorbance a été mesurée à 765 nm (DO 765) dans le spectrophotomètre UV OPTIMA (SP- 3000nano) et les résultats ont été confirmés avec le flacon témoin dans les mêmes conditions.



**Figure 14:** Schéma représentatif des étapes de dosage colorimétrique de phénol par la méthode de Folin-Ciocalteu, les tubes transparents indique l'absence de phénol après dosage.

### **3.2 Etude des conditions physico-chimique optimale de la dégradation de phénol**

#### **« Cinétique de dégradation de phénol de la souche E1 »**

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

L'étude des conditions physico-chimiques de la dégradation de phénol à été réalisée pour la souche bactérienne isolé et nommée E1, cette dernière a montré une capacité considérable de minéraliser le phénol comme seule source de carbone dans l'étape précédente de sélection, et elle a été choisie pour l'optimisation des conditions physico-chimiques de dégradation de phénol.

#### **3.2.1 Concentration initiale de phénol**

La tolérance et la capacité de dégradation de phénol sont diverses selon les différentes types de bactéries (Der Yang et Humphrey, 1975 ; El-Naas et al., 2009 ; Ahmed et al., 2011). Les bactéries peuvent éliminer efficacement le phénol à une concentration varié de 50 à 500 mg / L.

A pour but de déterminer la capacité de dégradation et la tolérance physiologique de la souche E1, cette dernière a été cultivé dans 45ml de milieu minéral avec les concentrations suivantes (50 mg/L, 100mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L et 500 mg/L) (Chen et al., 2013 ; Heinaru et al., 2005 ; Aravindhnan et al., 2014 ; Girish et Ramachandra, 2014 ; Khessairi et al., 2014). La densité cellulaire initiale dans chaque flacon à été fixé à (DO 620nm 0,01A) (Gallizia et al., 2003).

Les flacons ont été incubés à 30°C sous agitation à 250 rpm pendant 24 heures et le prélèvement pour les lectures des résultats de dégradation est fait chaque 2 heures. Pour la lecture des résultats (**figure 14**) Un volume de 1ml de culture minérale bien homogénéisé est mesuré à DO620nm pour déterminer l'augmentation de biomasse bactérienne dans chaque concentration (Doumandji et al., 2011 ; Rivero, 2016).

Un volume de 1ml de milieu de culture a été centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min pour la récupération du surnageant dans des tubes à essai propres pour mesurer le phénol résiduel par dosage biochimique colorimétrique et l'opacité est mesuré à une longueur d'onde DO760nm cette opération est répétée chaque deux à quatre heures jusqu'à épuisement totales de phénol (Shourian et al., 2009 ; Kylli, 2019 ; Mangwan et al., 2014).

### **3.2.2 pH**

La variation du pH peut affecter la croissance microbienne et l'activité enzymatique (**Kuang et al., 2013 ; Uzun et al., 2010**).

Afin d'évaluer l'effet du pH sur le taux de dégradation de phénol de la souche E1, les cellules bactériennes ont été cultivées dans des pH différents (5 ; 6 ; 7 ; 8 et 9) ajusté par des solutions de HCl à 1N et KOH ou bien NaOH à 1N.

Dans un volume de 45 ml de milieu minérale contenant une concentration de phénol de 200 mg/L, et une densité cellulaire bactérienne initiale (DO 620nm 0,013A), nous avons réalisé plusieurs cultures avec les différents pH, tout en mettant un flacon témoin pour chaque pH pour la comparaison des résultats (**Khleifat, 2006 ; Priyadarshini et al., 2021**)

Les flacons sont incubés à 30°C sous agitation à 250 rpm pendant 24 heures. Les prélèvements sont effectués chaque 2 heures pour l'estimation de la concentration du phénol résiduel à l'aide de la méthode de dosage déjà décrite, et des biomasses issues de dégradation par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 620 nm.

### **3.2.3 Température**

La température est un facteur important affectant les taux de dégradation des polluants organiques. L'effet de la température est lié à la biodisponibilité et à la solubilité du substrat. De plus, une température optimale est nécessaire pour que les enzymes clés de la biodégradation jouent un rôle important (**Li et al., 2019**).

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

Pour étudier l'effet de la température sur la vitesse de dégradation, la souche E1 a été cultivé dans 45 ml de milieu minéral contenant 200 mg/L de phénol dans des différentes températures d'incubation (20, 25, 30, 37 et 49 C°) (**Margesin et al., 2013**).

En revanche la densité cellulaire à été fixée à 0,01 DO (620 nm). Le pH a été ajusté à pH 7 et toutes les cultures ont été mises sous agitation mécanique à 250 rpm. Les prélèvements sont effectués chaque 2 heures suivant les mêmes étapes précédentes.

### **3.2.4 Agitation**

La vitesse d'agitation à un effet important sur l'homogénéisation de milieu liquide et l'accélération de bio-processus de la dégradation (**Velluru et al., 2011**). La souche E1 est mise dans des cultures minérales de pH 7 contenant des concentrations de 50 mg/L de phénol et une densité cellulaire bactérienne initiale de 0,01DO (620nm) pour chaque culture. Pour les vitesses d'agitation nous

avons introduit les flacons dans un agitateur mécanique du type Shaker réglés à 150 rpm, et d'autres à 250 rpm. Les derniers sont incubés sans agitation pour la comparaison des taux de dégradation. La lecture des résultats est faite selon les méthodes déjà décrites.

### 3.2.5 Aération

Pour l'étude de l'effet d'aération (l'oxygénation), la souche E1 a été cultivé en 45 ml de milieu minéral avec une concentration de 50 mg/L et une densité cellulaire initiale de (DO 620nm 0.01A), le processus d'aération se déroule dans un flacon de 250 ml corrélé a une pompe d'air injecté dans le flacon après filtration par une pièce perméable qui a été stérilisée, l'air pompé a l'intérieur de flacon par la pompe traverse un capillaire en plastique qui a été aussi autoclavé à la préalable **(Khleifat, 2006)**.

Deux cultures liquides ont été incubés, l'une avec aération et l'autre sans aération, les autres paramètres sont maintenus constants (pH 7, 30°C). Les résultats ont été estimé avec de la même manière des étapes précédentes.

### 3.3 Etude de la dégradation de phénol par une culture bactérienne mixte

Ces dernières années, des études sur les communautés bactériennes mixtes et sur une seule espèce ont attiré l'attention de nombreux chercheurs en raison de leurs avantages. Cependant, récemment, la recherche sur ce domaine a confirmé que la capacité de biodégradation de la culture mixte est beaucoup plus efficace, qualitativement comme quantitativement, que la culture unique, qui peut être principalement interprétée dans termes biochimiques tels que le commensalisme, interactions synergiques, et aussi le co-métabolisme. La dégradation complète des polluants dus aux interactions synergiques entre les membres des associations bactériennes mixtes et sa capacité à évoluer en fonction de sa condition environnementale **(Subramaniam et al., 2020)**.

Sur cette logique, nous avons construit un consortium bactérien de nos isolats aptes de métaboliser le phénol comme seul substrat, le consortium comprend les souches E1, S4 et S9.

### **3.3.1 Optimisation des conditions physico-chimiques (pH et température) de la dégradation de phénol par la culture mixte**

A partir des isolats bien purifiés, nous avons transféré une colonie de chaque bactérie dans une seule culture minérale, et puis, une concentration à l'ordre de 100 mg/L de phénol a été ajustée. Les autres paramètres de pH et de température changent pour voir la tolérance de la culture mixte aux changements environnementaux, les températures testées sont : 20°C, 30°C, 37°C et 47°C.

Le pH changeant dans les valeurs de 5, 6.5, 7, 8 et 9 (Veenagayathri et Vasudevan, 2010 ; Sivasubramanian et Namasivayam, 2015).

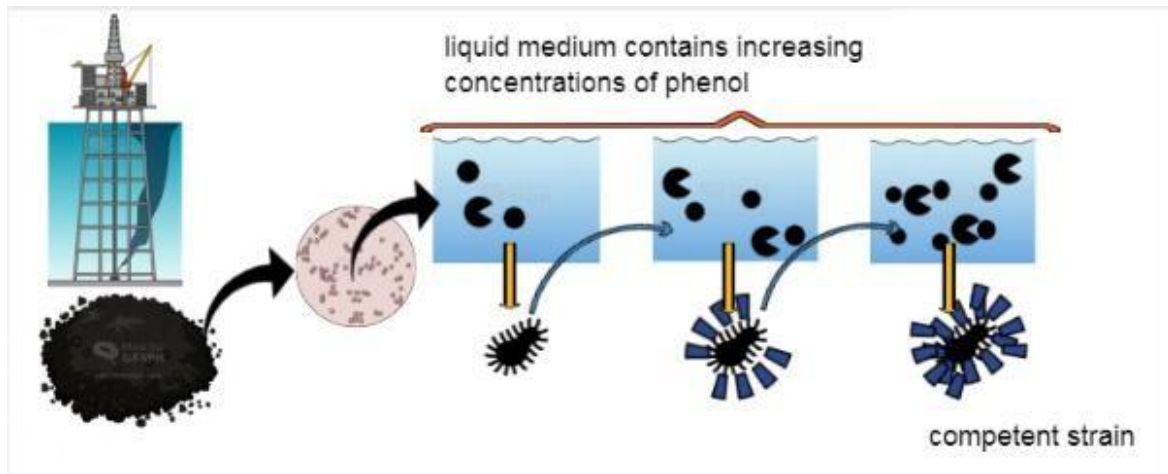
### **3.3.2 Adaptations successives par la culture mixte**

Afin d'étudier la procédure d'adaptation sur la biodégradation de phénol, des expériences ont été réalisées sur la culture mixte pour la dégradation des concentrations élevées de phénol. Une suspension d'un mélange bactérien des trois souches bactériennes (E1+S9+S4) a été préparée avec le milieu minéral, les colonies ont été directement prélevées de la culture solide, à ce stade ils sont considérés comme étant des biomasses non-adaptées. La densité de cette suspension a été ajustée à 1,08 densité optique mesurée à une longueur d'onde de 620 nm. Ensuite, dans des flacons, qui contiennent 45 ml de milieu minéral, 3 ml d'inoculum ont été complétés à chaque flacon pour avoir une densité microbienne égale dans tous les flacons, la densité optique obtenue est à l'ordre de 0.1 DO. Les concentrations initiales de phénol changeant dans la gamme 300-700 mg/L pour les premières cultures des cellules non-adaptées.

La biomasse microbienne issue de la dégradation de faible concentration a ensuite été récupérée par centrifugation à 4000 rpm pendant 15 minutes et lavée à l'eau distillée stérile deux fois ; le culot microbien formé, correspond à notre biomasse adaptée avec laquelle nous avons créé une seconde culture selon le même procédé en élevant les concentrations initiales de phénol.

Des tests colorimétriques au phénol sont effectués toutes les deux heures jusqu'à complète dégradation du phénol afin de déterminer le temps nécessaire pour une dégradation complète de chaque niveau d'adaptation (Abuhamed et al., 2004 ; Kwon et Yeom, 2009)

Les cultures ont été effectuées plusieurs fois pour s'assurer que les résultats étaient corrects. Les densités optiques ont été converties en concentration puis en pourcentage pour l'analyse des résultats.



**Figure 15 :** Schéma représentatif des voies d'adaptation cellulaire aux concentrations d'ordrecroissant de phénol.

#### **4. Valorisation statistique des résultats**

Chaque expérience a été répétée deux fois et les données numériques sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  ET. Pour déterminer l'effet des conditions physico-chimique sur la dégradation de phénol par la souche E1, et des voies d'adaptation sur le taux de dégradation du phénol par la culture mixte, une ANOVA unidirectionnelle a été appliquée (**Barik et al., 2022 ; Iqbal et al., 2018 ; Zambrano et al., 2018 ; Pandian et al., 2022**), suivie de la comparaison multiple de Tukey entre les groupes à l'aide d'IBM SPSS Statistics version 21 (**Spss Inc. Chicago, Illinois, États-Unis, 2012**) et Graph Pad prism ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

# Résultats et discussion

## Résultats

### 1. Isolement et caractérisation des souches isolés

#### 1.1 Caractérisation morphologique des isolats

Parmi les huit échantillons de sol, seulement l'échantillon E (13 cm de profondeur) est considéré comme riche en microorganismes.

Les autres échantillons des sols pollués des profondeurs importantes (3712m, 3766m, 3769m, 3771m, 3791m et 3795m) sont presque dépourvus de cellules cultivables dans les conditions de culture classique, et qui demandent peut-être d'autres techniques d'enrichissement et d'isolement ou une approche génomique ou méta génomique.

L'examen morphologique des différents isolats purifiés, révèle une diversité importante avec une abondance relative de trois genres bactériens

La distinction entre les différents genres bactériens est réalisée en premier lieu selon leur aspect de colonie et aspect microscopique.

Au nombre de 20 isolats, on distingue 3 variétés de formes micromorphologiques :

#### ➤ Bacilles à Gram positifs

Six isolats bactériens portent la forme bacillaire à Gram positif. La taille cellulaire varie entre 10 à 5  $\mu\text{m}$  de long et 1 à 2  $\mu\text{m}$  de large. Les majorités ont des bords parallèles et des extrémités rondes et quelques souches possèdent des spores et se regroupent en amas ou en chainettes.

Les bacilles à Gram positif sont caractérisés par un aspect de grandes colonies opaques de couleur beige à blanchâtre à bords irrégulier et de colonies rugueuses ou muqueuses (Figure 17).

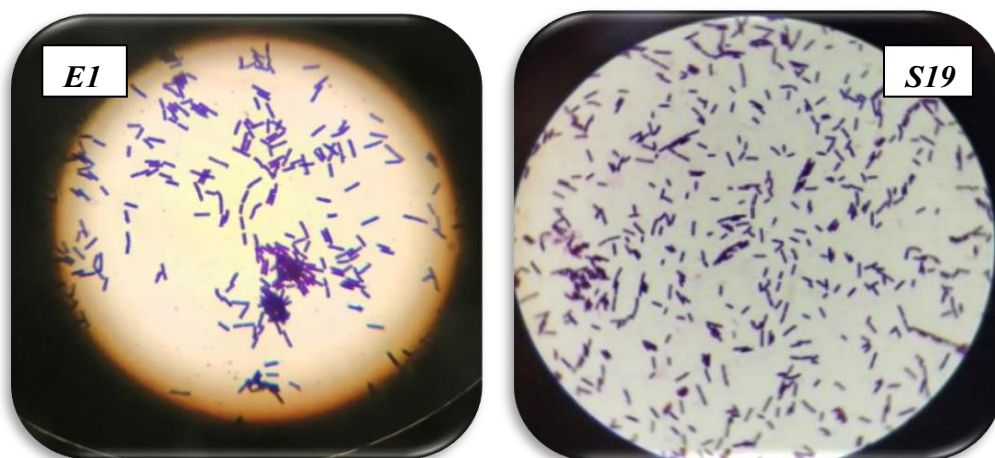
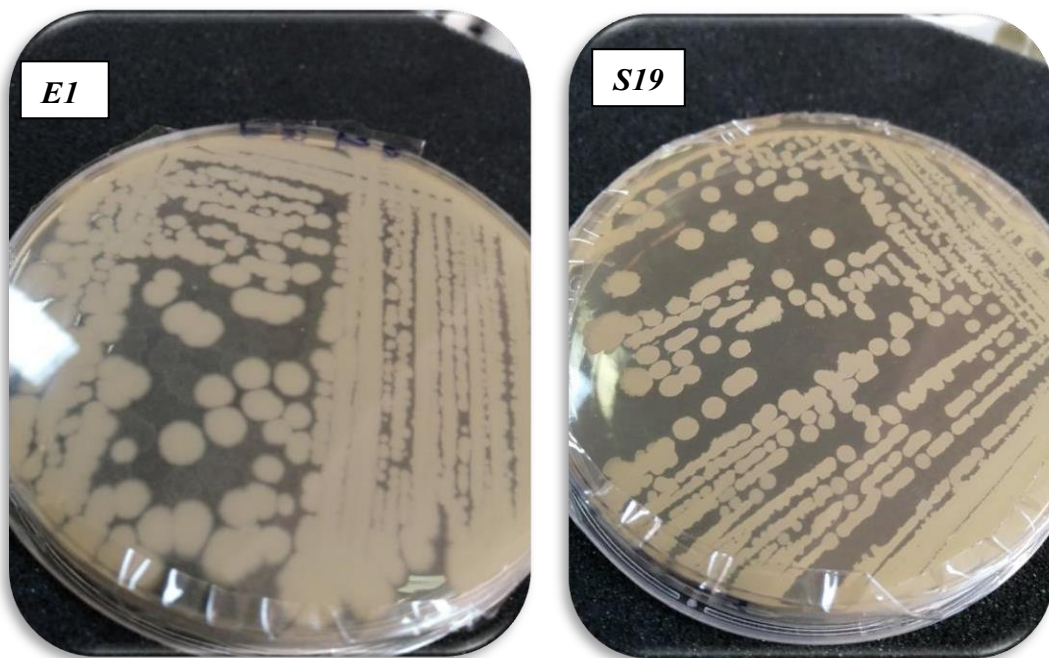


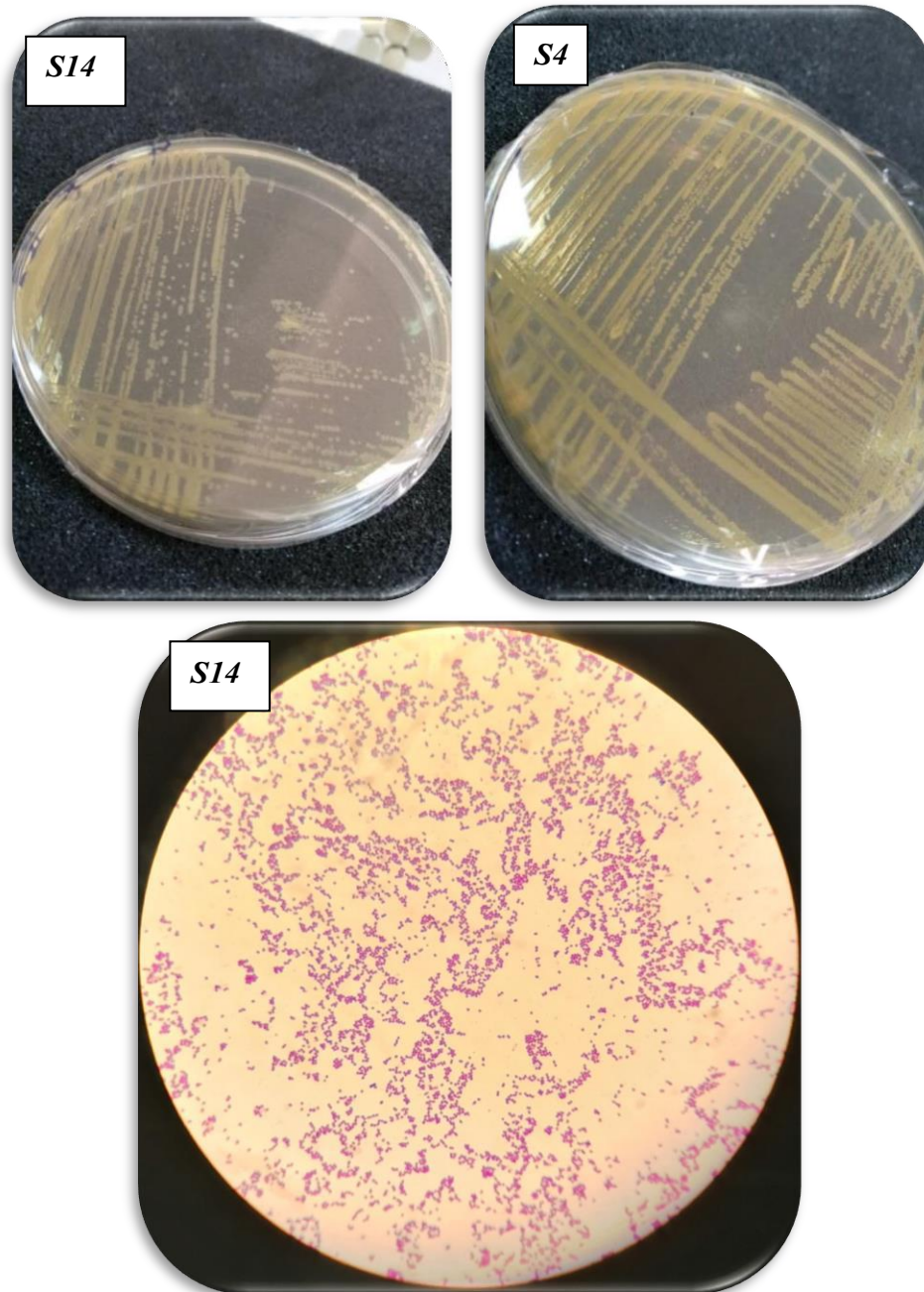
Figure 16: Aspect microscopique des bacilles à Gram positif (originale, 2022).



**Figure 17:** Aspect de colonies des bacilles à Gram positif, Colonie rugueuse (E1) ; colonie muqueuse (S19).

➤ **Coccobacilles à Gram négative**

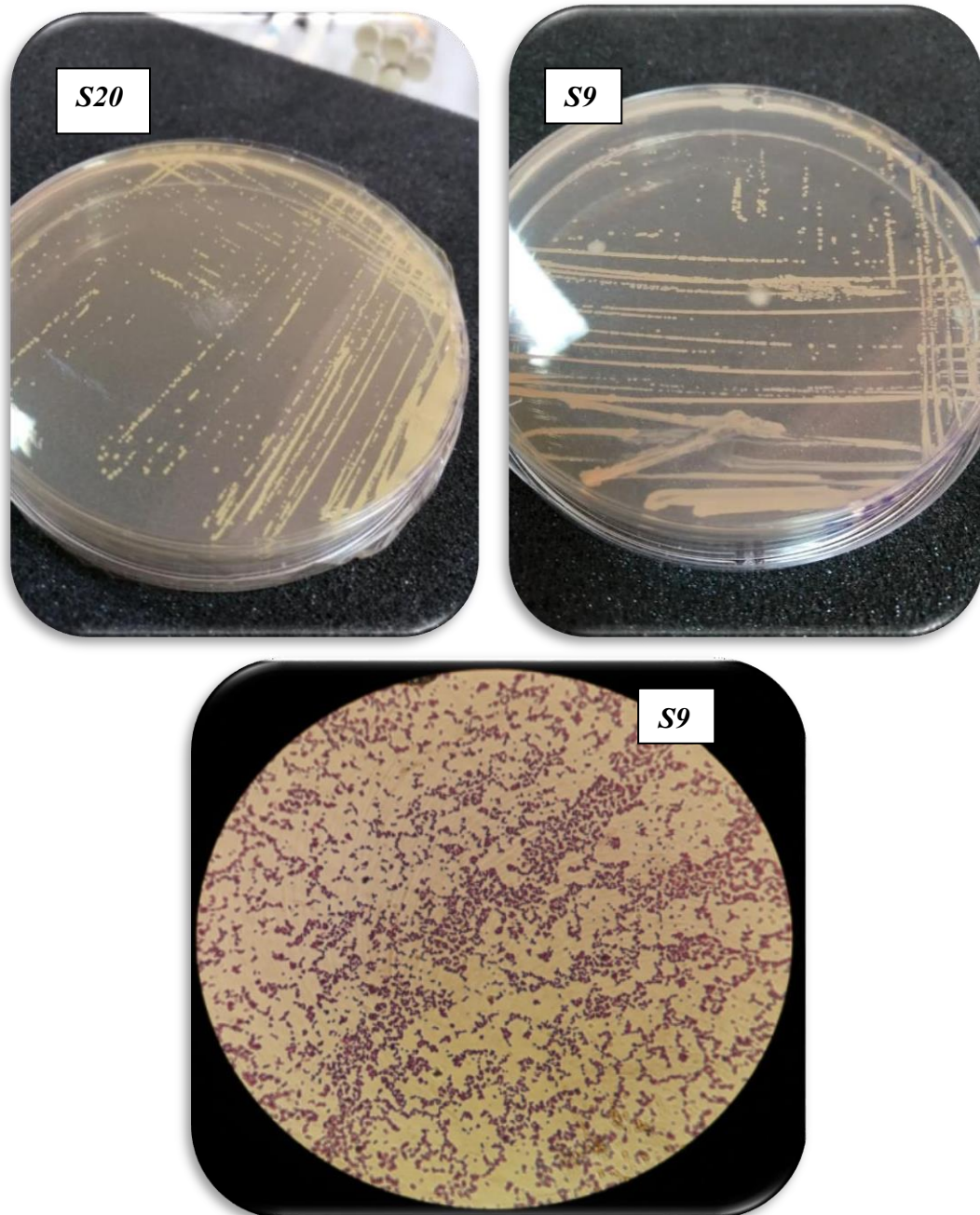
Les isolats de forme coccobacilles à Gram négative sont caractérisés par leurs formes cellulaires de petite taille non sporulée et qui se regroupent en amas. Les colonies se caractérisent par un aspect translucide, plates à bord irrégulier et une pigmentation jaune à verdâtre qui pigmente toute la gélose chez certains isolats (**Figure 18**).



**Figure 18:** Aspect macroscopique et microscopique ( $G \times 1000$ ) des coccobacilles à Gram négatifs, les isolats S4 et S14 (originale, 2022).

➤ **Cocci à Gram positives**

Deux formes coloniales de morphologie typique ont été distinguées parmi les isolats de sol pollué, l'une se caractérise par des petites colonies crèmeuses, opaques à bord régulier et de couleur rose, la deuxième est une bactérie de colonies jaunes crèmeuses, bombée, lisse à contour régulier. Les cellules sont de petite taille et qui se réarrange en amas ou en tétrade (**Figure 19**).



**Figure 19:** Aspect microscopique ( $G \times 1000$ ) et macroscopique des isolats de forme Cocci à Gram positives, S9 et S20 (originale, 2022).

### 1.2 Caractérisation génétique (séquençage de l'ARNr 16S)

Les séquences 16S de l'ARNr des isolats ont été alignées en utilisant le programme MEGA11 et identifiées sous leurs formes brutes sur le programme BLAST de la base de données NCBI, par référence à des données de séquence 16S de l'ARNr bactériennes préalablement alignées. L'analyse de la fraction 16S de l'ARNr a confirmé l'appartenance

des isolats S19, E1 et S3 aux Bacilli genre *Bacillus*, plus précisément au *Bacillus valenzensis* (S19) avec un pourcentage d'homologie de 97.38 % ; et *Bacillus sp* (E1) avec une homologie de 98.82 %, respectivement.

Les deux souches bactériennes de forme coccobacilles à Gram négatifs font parties aux  $\gamma$  protéobactéria genre *Pseudomonas*, la souche S4 porte une similitude de 95.83 % avec l'espèce *Pseudomonas stutzeri*, et l'isolat S14 est identifié comme étant *Pseudomonas aeruginosa* avec un pourcentage d'homologie de 99.15%.

La souche S9 est apparentée à 96.98 % aux espèces de *Kocuria sp*, la souche S20 présente une homologie de 99.28 % avec l'espèce *Kocuria rhizophila*.

### 1.3 Phylogénie

L'analyse évolutive a été déduite en utilisant la méthode Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987). Les arbres comprennent chaque isolat avec ses homologues les plus proches de la base de données GeneBank. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode du composite maximum de vraisemblance (Tamura et al., 2004) et sont en unités du nombre de substitutions de base par site (Tamura et al., 2007).

A cette méthode, nous avons associé un test de robustesse qui est le Bootstrap, qui permet de mesurer si les propositions obtenus à partir de la méthode Neighbor-Joining sont solide ou pas. La robustesse est testée à un taux de Bootstrap de 100 répliquats.

Dans cette logique nous avons construit 3 arbres représentatifs des souches qui portent un intérêt métabolique et qui ont été utilisés dans cette étude (*Bacillus sp*, *Pseudomonas stutzeri* et *Kocuria sp*), voir les figures 14, 15 et 17.

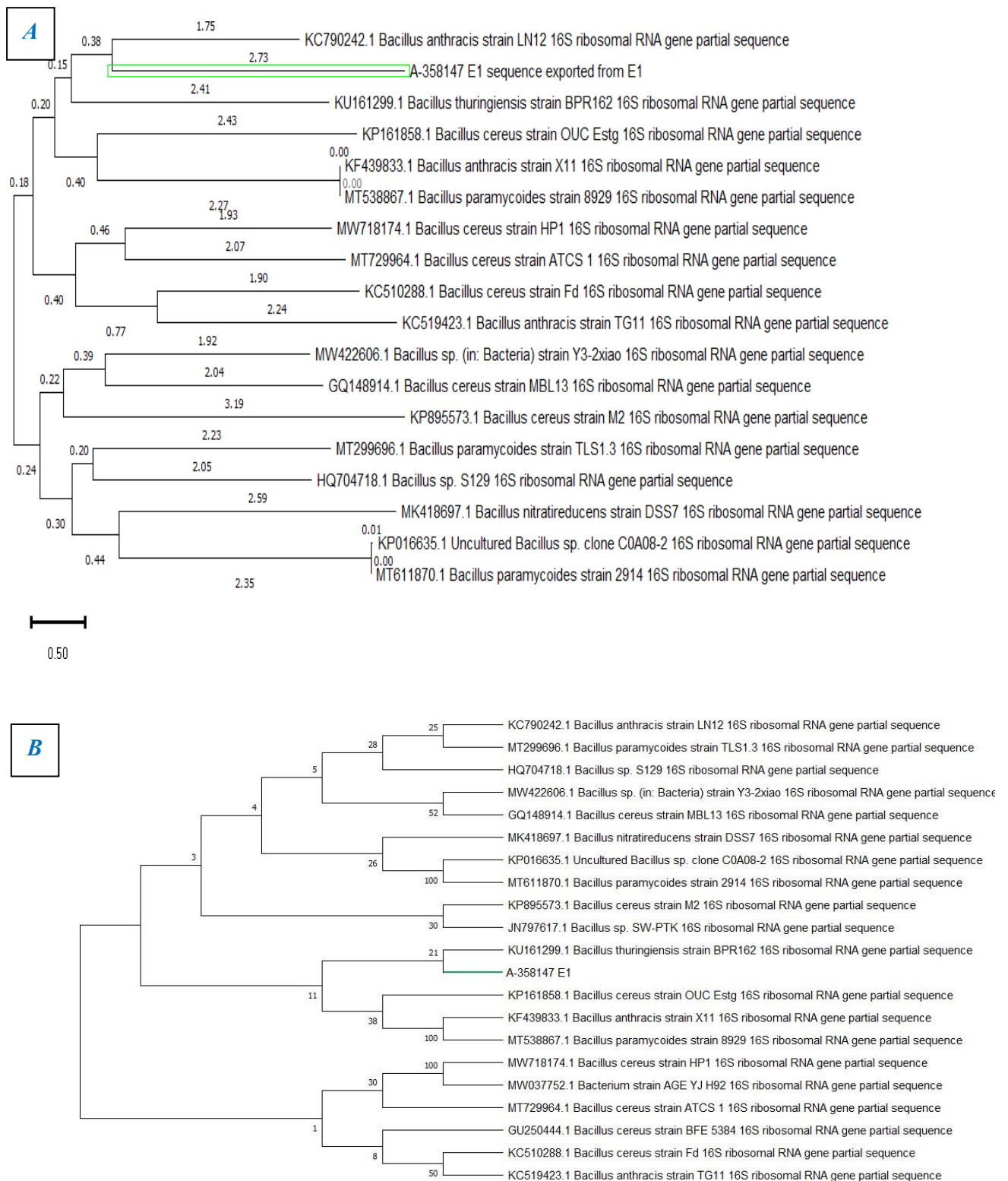
La figure 20 (A) représente l'isolat E1 identifié *Bacillus sp* avec ses homologues, l'arbre regroupe des clades avec des sous branches de différentes espèces de genre *Bacillus*, la plus proche à l'isolat E1 est la souche *Bacillus anthracis* LN12 dans la deuxième sous branche du premier clade de l'arbre, la valeur de bootstrap formé entre les deux souches est 21%, on remarque aussi que la plus part des valeurs de bootstrap sont inférieures à 70%, ce qui signifie que l'arbre formé est peu robuste et qui ne sont pas réelles.

La Figure 21 regroupe la souche identifiée *Pseudomonas stutzeri* et les souches proches en terme de ressemblance de gène 16S, cette souche est proche de la souche *Stutzerimonas stutzeri* ANABFPS, dont le taux de bootstrap est 100 % sur le nœud de notre isolat et

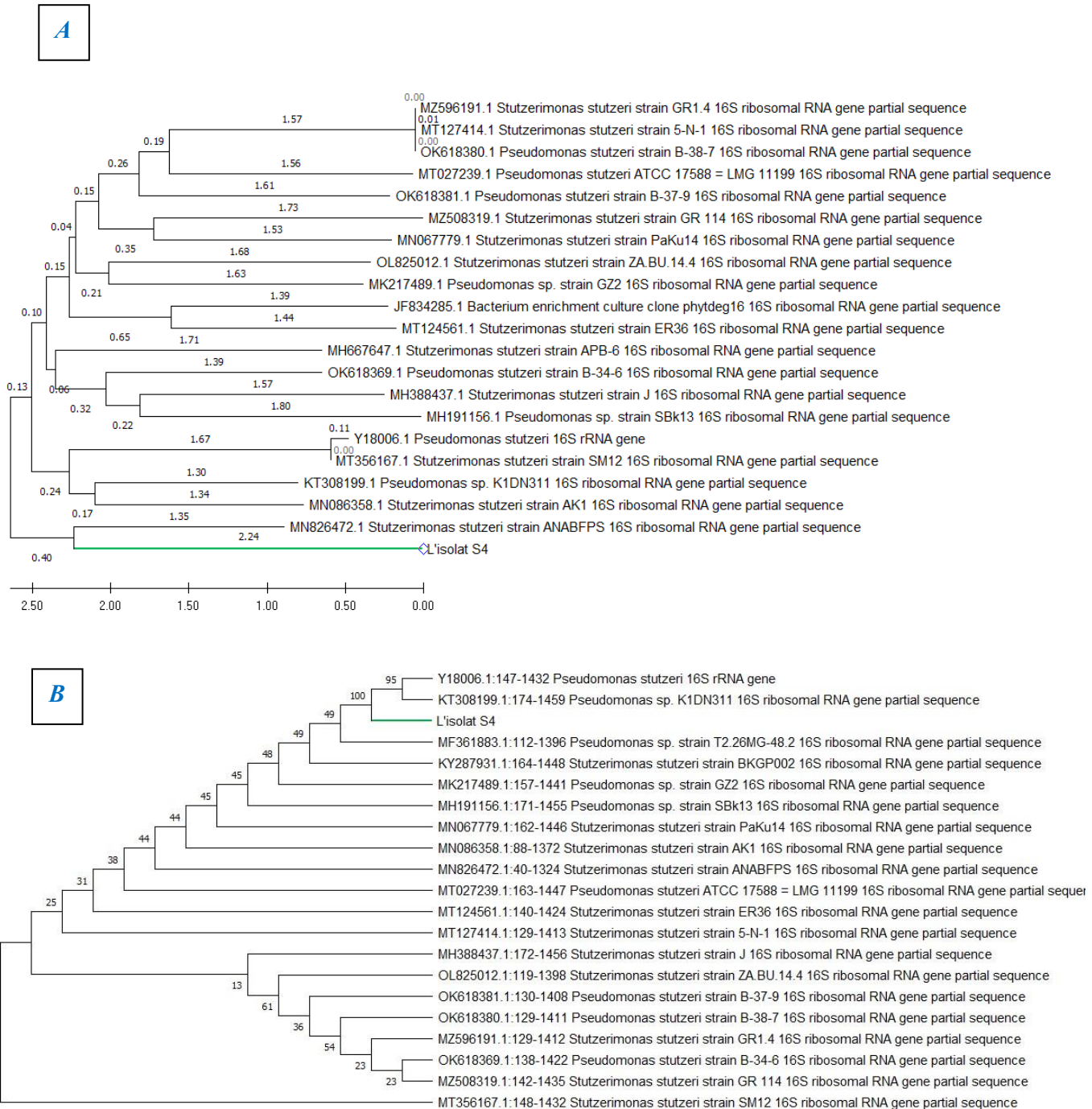
les souches *Pseudomonas sp* K1DN311 et *Pseudomonas stutzeri* ce qui reflète la robustesse de la sous branche, les autres bootstrap sont inférieure à 70% ce qui signifie que l'arbre dans son intégralité est peu significatif et qu'il présente une grande variabilité.

Selon la **Figure 22**, qui représente l'isolat S9 identifié *Kocuria sp*, cette souche se présente avec ses homologues *Kocuria rosea* D32 et la bactérie BH8H7 qui sont présentés identiques sur l'arbre, le test de robustesse figure un taux de 57% sur le nœud de la sous branche de notre souche, et un taux de 24% sur le clade, ce qui signifie que l'arbre est peu robuste et qu'il présente une grande variabilité.

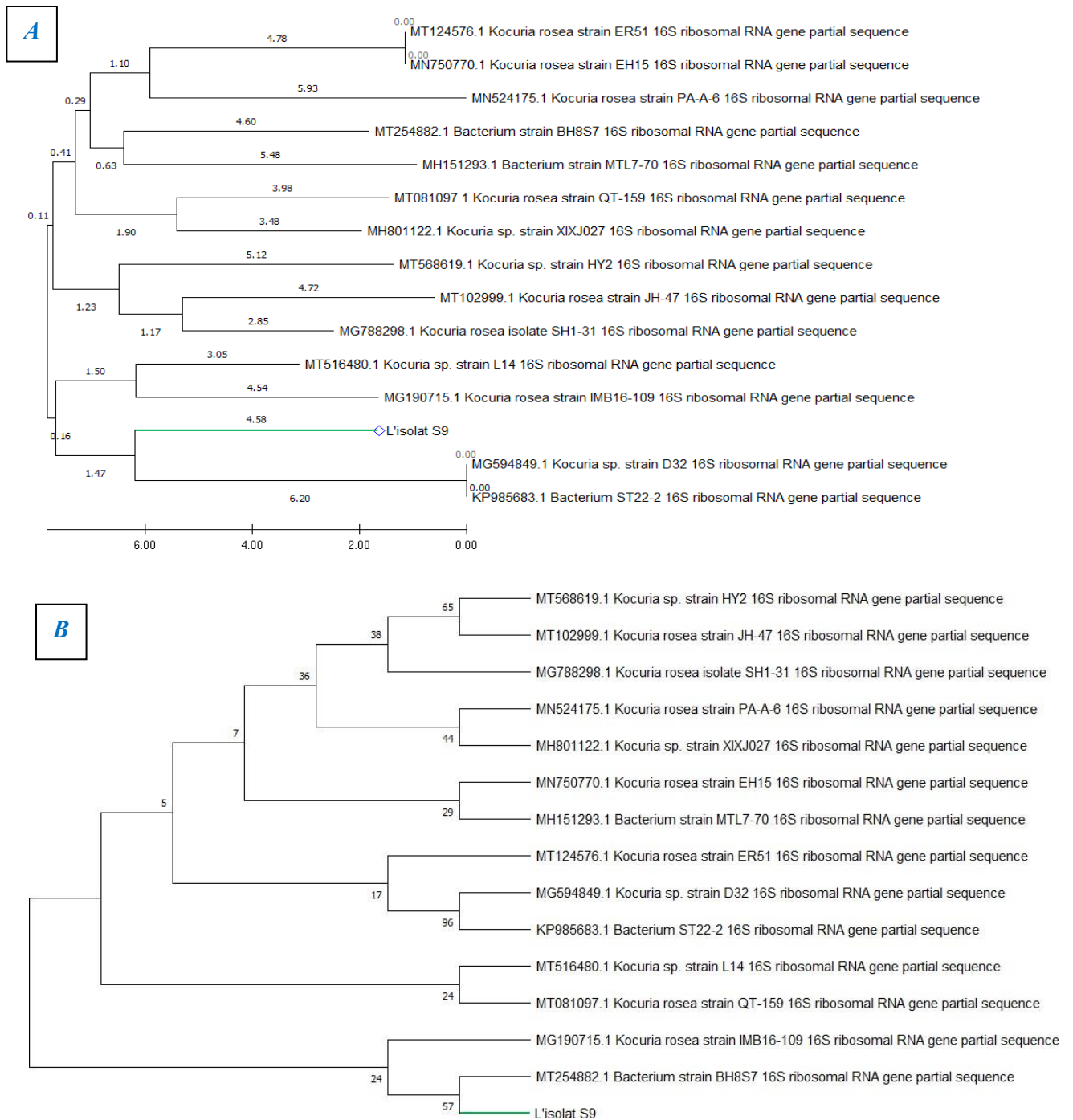
L'analyse phylogénétique sur la base des séquences du gène ARNr 16S, selon la méthode Neighbor-Joining a accordé de mettre en évidence les affinités phylogénétiques entre les isolats bactériens de sol pollué par les hydrocarbures avec les genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Kocuria*, respectivement.



**Figure 20:** Arbre phylogénétique basé sur les séquences de 16S montrant les liens de parenté avec les 20 homologues les plus proches de l'isolat E1 (identifiée *Bacillus* sp), selon la topologie de Neighbor-Joining. La barre 0.50 indique le nombre de substitution par position de nucléotide (A) ; les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent le taux de bootstrap de 100 répliquats (B).



**Figure 21:** Arbre phylogénétique basé sur les séquences de 16S montrant les liens de parenté avec les 20 homologues les plus proches de l'isolat S4 (identifiée *Pseudomonas stutzeri*), selon la topologie de Neighbor-Joining. La barre indique le nombre de substitution par position de nucléotide (A) ; les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent le taux de bootstrap de 100 répliqués (B).



**Figure 22:** Arbre phylogénétique basé sur les séquences de 16S montrant les liens de parenté avec les 20 homologues les plus proches de l'isolat S9 (identifiée *Kocuria* sp.), selon la topologie de Neighbor-Joining. La barre en bas indique le nombre de substitution par position de nucléotide (A) ; les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent le taux de bootstrap de 100 réplicats (B).

## 2. Etude de la biodégradation de phénol

### 2.1 Etude de la biodégradation du phénol par des cultures uniques

#### 2.1.1 Présélection des souches dégradatrices du phénol

Dans un but de sélectionner les souches qui ont un pouvoir de dégradation, les souches bactériennes pures ont été mises dans une culture minérale contenant le phénol comme seule source de carbone et d'énergie.

Le résultat obtenu est présenté dans le tableau suivant :

**Tableau 04:** Test préliminaire de la dégradation de phénol en comparaison avec la littérature.

L'isolat pur (code)	Dégradation de phénol (mg/L par heures)	Références bibliographiques
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (S14)	Dégradation complète de 200 mg/L phénol en 48	(Liu et al., 2022 ; Ivanova et al., 2022 ; Jain et al., 2022)
<i>Kocuria sp</i> (S9)	Dégradation complète de 200 mg/L de phénol en 50h	(wu et al., 2017)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (S4)	Dégradation complète de 200 mg/L de phénol en 48h	(Kujur et al., 2020)
<i>Bacillus sp</i> (E1)	Dégradation complète de 200 mg/L en 24H	(Swain et al., 2022)
<i>Kocuria rhizophila</i> (S20)	Dégradation partielle	(Satapathy et al., 2022)
<i>Bacillus sp</i> (S3)	Pas de dégradation	/
<i>Bacillus valensis</i> (S19)	Pas de dégradation	/

#### 2.1.2 Étude des conditions physico-chimiques optimales de la dégradation de phénol par *Bacillus sp*

Dans la présente étude, nous avons sélectionné l'espèce *Bacillus sp* (isolat E1) qui dégrade parfaitement le phénol comme seule source de carbone et d'énergie pour l'étude de leurs conditions physico-chimiques optimales de dégradation.

Le principal but de cette partie est d'étudier la cinétique de biodégradation en ce qui concerne l'effet de concentration ; les conditions environnementales telles que le pH, la température, l'effet d'aération et l'effet d'agitation.

### 2.1.2.1 Effet de dégradation des différentes concentrations initiales de phénol par *Bacillus sp*

Comme mentionné dans la section matériel et méthodes, les expériences de dégradation du phénol ont été réalisées dans des conditions aérobies en milieu non renouvelable avec une pure souche de *Bacillus sp*, et cela pour une large gamme de son initiale concentration de phénol et une biomasse microbienne de DO 0.1 à 620 nm.

D'après les observations, il est clair que la bactérie utilise le phénol pour son développement avec une différence significative entre les taux de dégradation et les temps requis pour une dégradation complète de phénol, la vitesse de dégradation et de croissance microbienne change avec la concentration initiale de substrat ; La **Figure 23 (A)** illustre les données de dégradation de phénol à des concentrations croissantes de 50 mg/L à 500 mg/L ; on remarque que la voie de métabolisation de phénol nécessite une phase de latence microbienne marquée 10 h pour toutes les concentrations.

Sur la même figure on peut remarquer que la phase exponentielle de croissance commence après 10 h d'incubation et dure entre 6 et 10h selon la concentration initiale de substrat, cela est traduit par une diminution rapide de phénol résiduel et production importante de biomasse, respectivement.

En 24 h, la souche *Bacillus sp* est capable de dégrader  $65.15 \% \pm 2.3$  ;  $43.1 \% \pm 2.3$  et  $34.05 \% \pm 3.4$  % de phénol lorsque les concentrations initiales de phénol étaient de 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L.

En 48h,  $75.27 \% \pm 2.1$  ;  $83.60 \% \pm 0.18$  et  $84.69 \% \pm 0.61$  de phénol ont été métabolisés à partir de 200 mg/L, 300 mg/L et 500 mg/L, respectivement. [**Tableau 02 (annexe 02)**].

La souche *Bacillus sp* nécessite 30 h pour dégrader 100 % de phénol lorsque sa concentration initiale est de 50 mg/L, et 48h pour compléter 100 mg/L et 50h pour une dégradation complète des deux concentrations de 150 mg/L et 200 mg/L.

Quant aux deux concentrations plus au moins élevées de 300 mg/L et 500 mg/L de phénol, *Bacillus sp* a pris entre 50 et 52h pour une complète dégradation.

D'après la figure 17 (B), la charge microbienne produite à partir de la biodégradation de phénol est associée à la concentration initiale de ce dernier, on remarque clairement que les biomasses cellulaires importantes sont liées aux concentrations plus élevées, les résultats de la

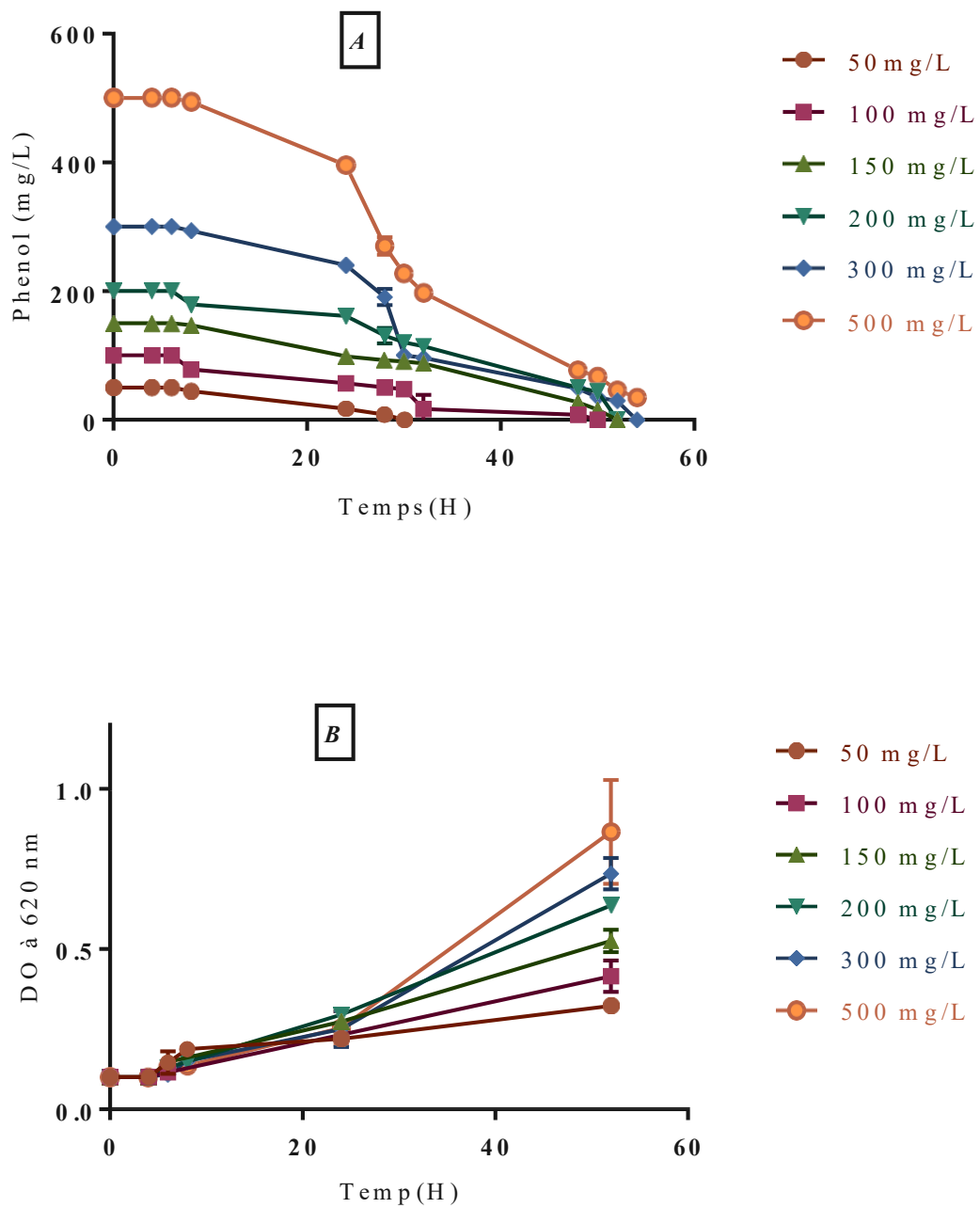
mesure d'absorbance à 620 nm montrent que  $0,323 \text{ DO} \pm 0,004$  ;  $0,415 \text{ DO} \pm 0,049$  ;  $0,525 \text{ DO} \pm 0,035$  ;  $0,636 \text{ DO} \pm 0,023$  ;  $0,733 \text{ DO} \pm 0,05$  et  $0,86 \text{ DO} \pm 0,16$  ont été produites à partir de 50 mg/L ; 100 mg/L ; 150 mg/L ; 200 mg/L ; 300 mg/L ; et 500 mg/L après épuisement totale de substrat, respectivement.

Une corrélation négative importante est signalée entre la concentration de phénol et le nombre de cellules mesurée par DO pour toutes les concentrations comprises entre ( $R^2 = [0,88$  et  $0,9]$ ; P-value  $<0,0001$ ).

Les analyses statistiques de l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) et qui ont été effectuées sur deux répétitions de données pour chaque test, ont donné des différences significatives de dégradation de phénol sur l'ensemble des concentrations initiales avec un P-value  $<0,0001$  et F-value = 6,84.

Le test de la comparaison multiple de Tukey, a signalé qu'il y a une différence significative entre la dégradation de [50 mg/L vs 500 mg/L] ; [100 mg/L vs 500 mg/L] ; [150 mg/L vs 500 mg/L] et [200 mg/L vs 500 mg/L] avec P-value  $0,0002^{***}$ ,  $0,0002^{***}$ ,  $0,0021^{**}$  et  $0,21^*$  et aucune autre différence significative n'a été signalée. Cela est interprété par la grande différence entre les temps de dégradation des concentrations faibles comprises entre 50 mg/L et 200 mg/L par rapport aux concentrations élevées comprises entre 200 mg/L et 500 mg/L.

Les traitements d'ANOVA à un facteur des DO de biomasse ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes biomasses issues des concentrations croissantes de phénol avec un P-value 0,981 et la même chose pour le test de comparaison multiple il n'y a aucune différence significative qui a été signalée.



**Figure 23:** Effet de concentration de phénol sur la cinétique de biodégradation ; **(A)** évolution de phénol résiduel (mg/L) en fonction de temps ; **(B)** augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO 620nm).

### 2.1.2.2 Effet de température sur la dégradation de phénol par *Bacillus sp*

Afin d'examiner l'effet de la température sur la dégradation du phénol par *Bacillus sp*, la souche bactérienne a été incubée avec du phénol à une concentration de 200 mg/L à différentes températures allant de 20° C à 49° C pendant 48 heures.

La température d'incubation s'est avérée avoir un effet clair sur le niveau de formation de la masse cellulaire, comme c'est également évident sur le taux de dégradation du phénol.

Les résultats expérimentaux ont montré une différence dans le niveau de dégradation du phénol, en fonction de la variation des températures d'incubation [Figure 24 (A)].

Il est évident que le facteur de température se caractérisait par le fait qu'il était vital lorsqu'elle était inférieure à 37° C, et que toute élévation supplémentaire à une température supérieure à 40°C a entraîné une diminution de croissance.

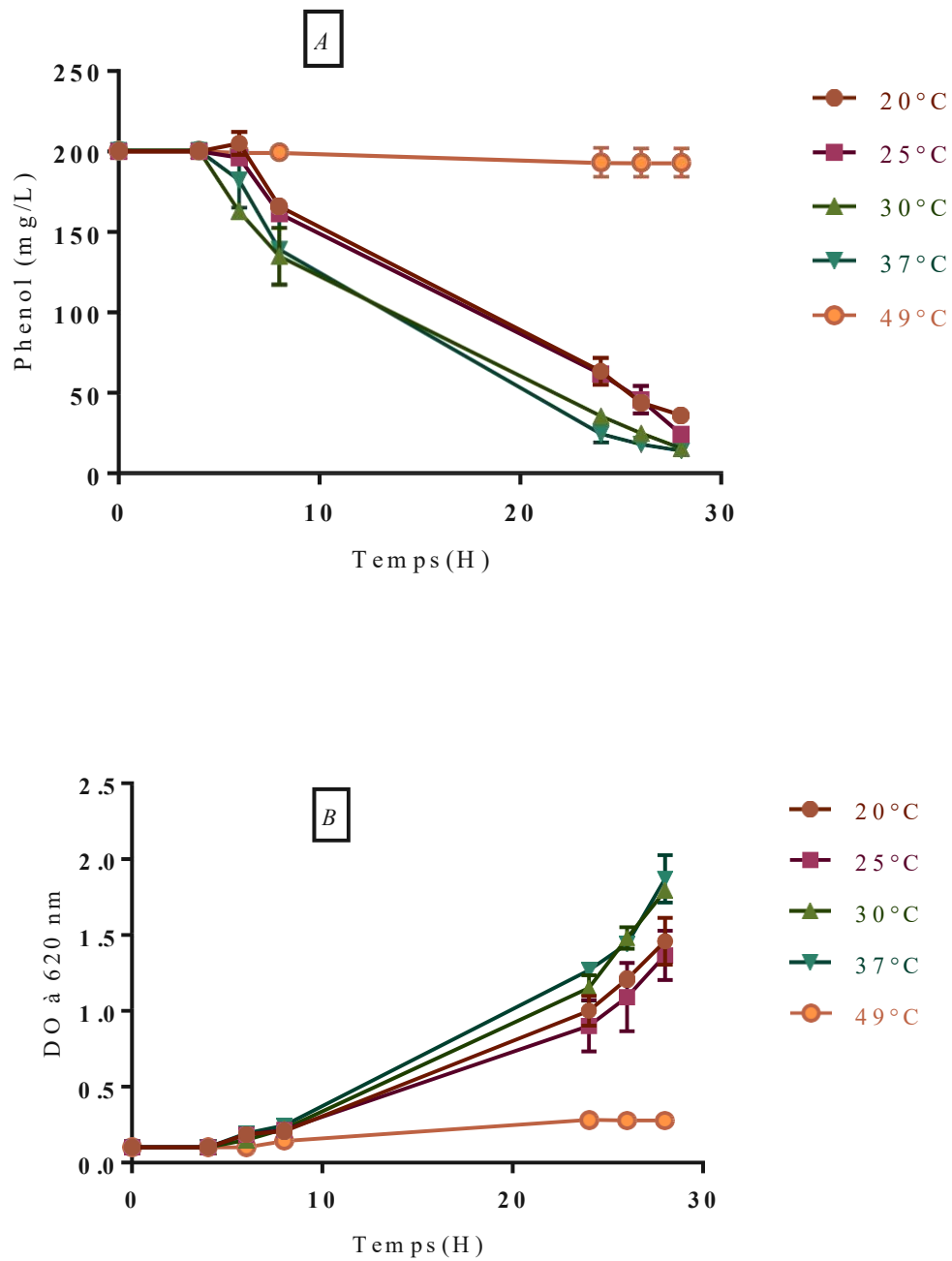
Ainsi, il tourne que la dégradation biologique du phénol semble se produire à des températures qui varie entre 20°C et 37°C, avec un optimum de dégradation et de croissance à 37°C.

En fait, d'après les résultats de la dégradation 81.87 % ± 1.58 ; 87.89 % ± 2.06 ; 92.09 % ± 0.2 ; 92,84 % ± 1.18 ; 6.80 % ± 6.80 de phénol ont été métabolisés à partir des cultures minérale incubé à 20°C, 25°C, 30°C, 37°C et 49°C, respectivement [Tableau 03 (annexe 02)].

Le traitement statistique effectué sur les résultats de la dégradation de phénol en fonction de différentes températures à montré qu'il ya une différence significative entre les taux de dégradation avec une valeur de P-value inférieur à 0.0001 et F-value 2.258.

Les biomasses bactériennes qui ont été produite sont corrélées négativement avec les taux de dégradation, les masses cellulaires plus importantes proviennent des cultures ou la température est adéquate à la dégradation, après 28h d'incubation, 1.46 ± 0.15 DO ; 1.36 ± 016 DO; 1.79 DO ; 1.87 ± 0.15 DO et 0.29 ± 0.03 DO sont mesuré à partir des cultures incubés à 20°C, 25°C, 30°C, 37°C et 49°C respectivement.

Statistiquement parlant, l'analyse de la variance à un facteur a révélé qu'il ya aussi une signification entre les biomasses bactérienne avec un P-value = 0.0002\*\*\*.



**Figure 24 :** Effet de température sur la cinétique de biodégradation de phénol ; **(A)** évolution de phénol résiduel (mg/L) en fonction de temps ; **(B)** augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO 620nm).

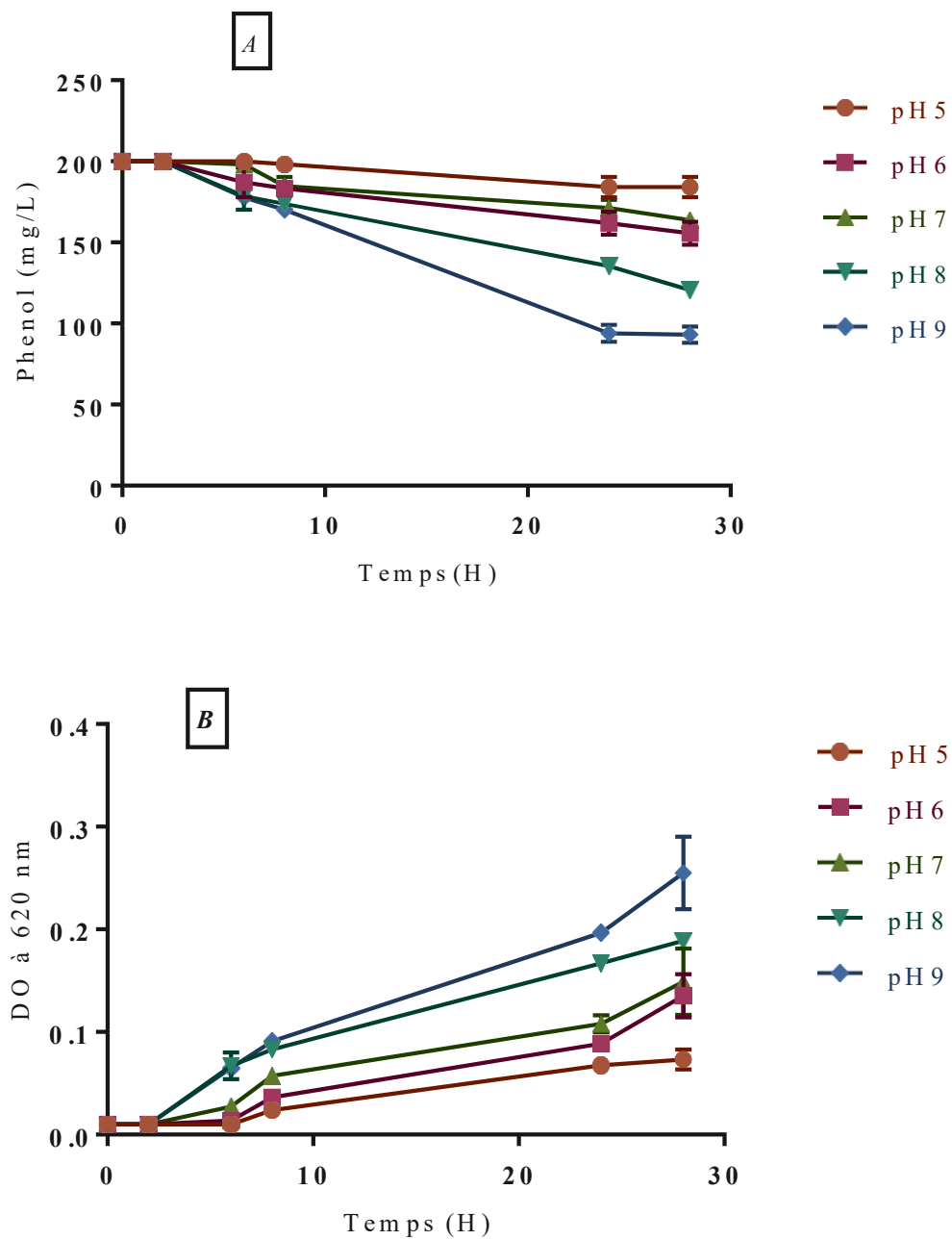
### 2.1.2.3 Effet de pH sur la dégradation de phénol par *Bacillus sp*

Pour examiner le potentiel de dégradation du phénol de *Bacillus sp*, la souche a été incubée avec du phénol à une concentration de 200 mg/L à 37°C avec diverses valeurs de pH allant de 5 à 9.

Les données obtenues (**Figure 25**) ont indiqué que cette souche bactérienne présente une forte activité de dégradation en milieu légèrement alcalin avec une activité considérable en pH neutre et pas de tolérance à un pH acide ou l'activité était presque nulle.

À pH 6, 7 et 8, le taux de dégradation était modérément inférieur à celui de pH 9, les résultats montrent qu'après 28h d'incubation 7.81 % ± 3.18 ; 22.08 % ± 3.56 ; 18.11 2.14 ; 39.65 % ± 1.37 et 53.38 % ± 2.45 ont été dégradé à partir des cultures à pH 5, 6, 7, 8 et 9, respectivement. Les résultats de la dégradation de phénol sont en accord avec le suivie de la biomasse bactérienne, la culture la plus riche en terme de biomasse cellulaire est celle obtenue à pH 9, respectivement [**Tableau 04 (annexe 02)**].

Le traitement statistique de l'effet de pH sur la cinétique de dégradation signale qu'il n'ya pas de différence significative entre les taux de dégradation avec une valeur de P-value de 0.1901 et F= 1.662 et pas de différences significatives aussi avec les comparaisons multiple ce qui confirme que la souche *Bacillus sp* à une grande tolérance aux différents pH. Pour les donnés de la biomasse, ANOVA a signalé qu'il n'ya pas de différence significative avec un P-value 0.3698 et F=1.119.



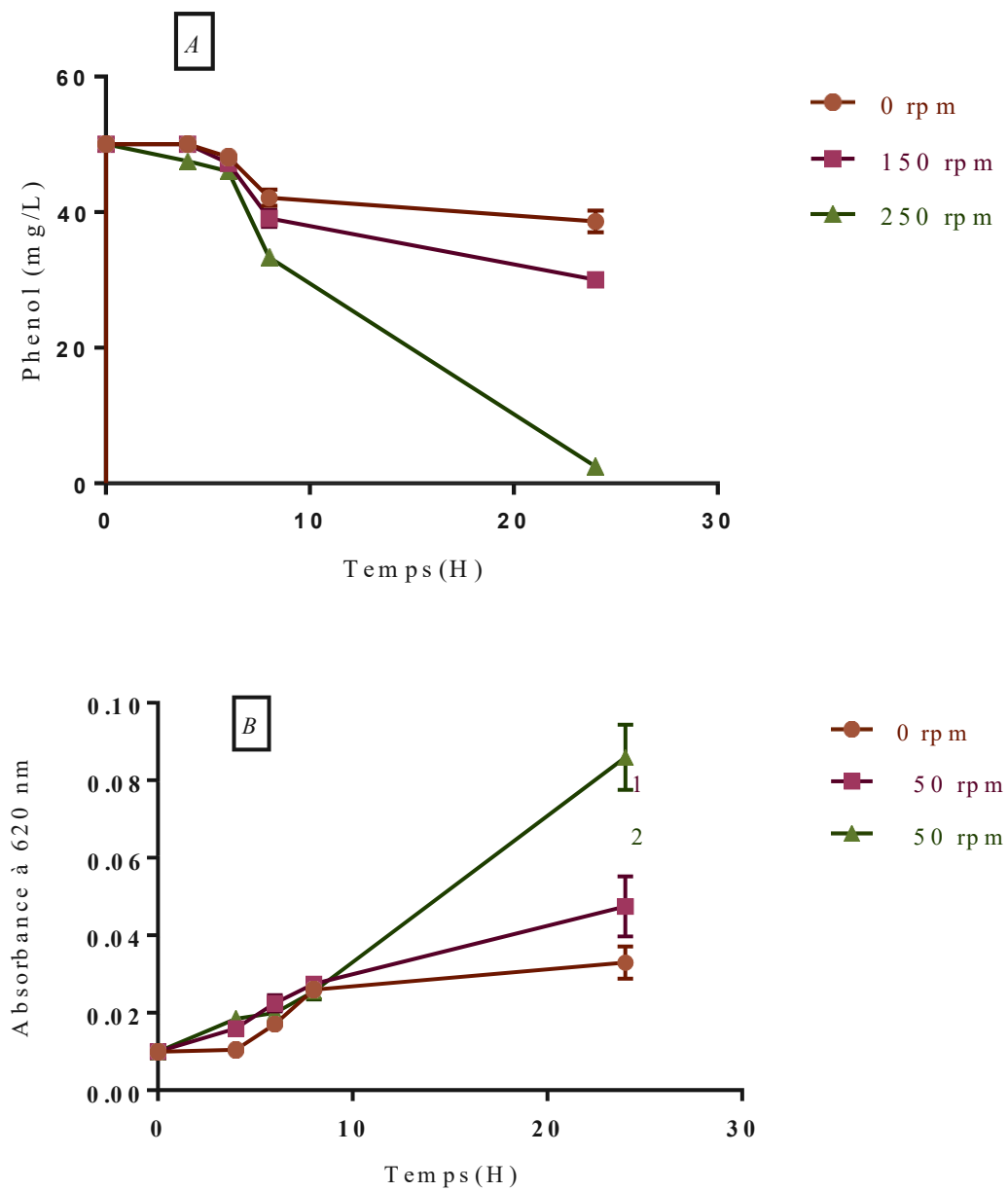
**Figure 25 :** Effet de pH sur la cinétique de biodégradation de phénol ; **(A)** évolution de phénol résiduel (mg/L) en fonction de temps ; **(B)** augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO 620nm).

#### 2.1.2.4 Effet d'agitation sur la dégradation de phénol par *Bacillus sp*

La souche bactérienne de *Bacillus sp* a été incubée sous différentes vitesses d'agitation de 0 rpm, 150 rpm et 250 rpm, cette agitation mécanique agit directement sur l'homogénéisation de milieu et renforce la vitesse de croissance et de dégradation de phénol comme montré dans la **Figure (26)**.

D'après les résultats montrés sur le graphe, on remarque qu'en absence d'agitation de milieu la bactérie dégrade difficilement le phénol en solution et en présence d'agitation le phénol se dégrade plus rapidement tandis que le taux de dégradation importante appartient à la vitesse d'agitation la plus élevée. Après 24h d'incubation, on trouve que  $22.79 \pm 3.21$  % [**Tableau 05 (annexe 02)**].de phénol a été dégradé dans la culture sans agitation et pour la biomasse microbienne seulement  $0.033 \pm 0.004$  de DO a été produite. Quant aux cultures incubées avec agitation on trouve  $39.90 \pm 1.69$  % et  $95.10 \pm 1.32$  % ont été dégradé à partir des cultures agitées à 150 rpm et 250 rpm, avec production de  $0.048 \pm 0.008$  DO et  $0.086 \pm 0.008$  DO, respectivement.

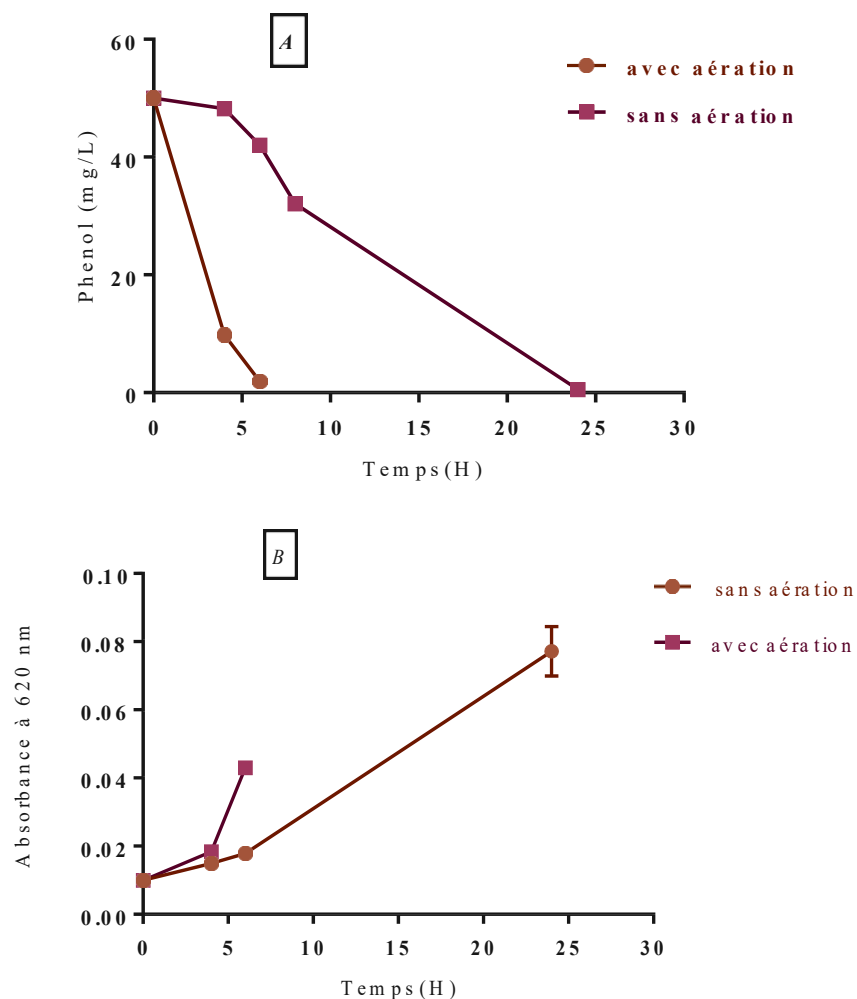
L'ANOVA à un facteur n'a pas donnée de différence significative pour l'effet d'agitation avec des valeurs de P-value= 0.46 et F=0.81 pour la dégradation de phénol et P=0.62, F=4.88 pour les DO de la biomasse cellulaire. On conclut que la vitesse d'agitation agit sur la vitesse de dégradation mais ne conditionne pas le processus de dégradation en générale.



**Figure 26 :** Effet d'agitation sur la cinétique de biodégradation de phénol ; **(A)** évolution de phénol résiduel (mg/L) en fonction de temps ; **(B)** augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO 620nm).

### 2.1.2.5 Effet d'oxygénation sur la dégradation de phénol par *Bacillus sp*

La biodégradation de phénol est le plus souvent une réaction d'oxydation ou l'oxygène dissous est le facteur clé qui arbitre le processus de dégradation de la matière organique dans les conditions de croissances aérobies (Amrouche et al., 2011). Pour cela, nous avons étudiée l'effet d'aération sur l'assimilation du phénol par *Bacillus sp*. D'après la **Figure (27)**, on constate que l'aération de milieu accélère de manière très significative la vitesse de dégradation du phénol, on remarque que la concentration initiale de 50 mg/L a été presque épuisée dans 6h tandis que dans une condition normale sans aération cette concentration est dégradé dans 24h avec une production plus importante de biomasse pour cette culture non aéré.



**Figure 27 :** Effet d'oxygénation (aération) sur la cinétique de biodégradation de phénol ; **(A)** évolution de phénol résiduel (mg/L) en fonction de temps ; **(B)** augmentation de biomasse présentée par l'absorbance à (DO 620nm).

## **2.2 Etude de la dégradation de phénol par une culture bactérienne mixte**

Après avoir examiné les différentes conditions physico-chimique de la culture unique de l'isolat *Bacillus sp*, nous avons procédé à une technique qui consiste à l'utilisation de plusieurs souches bactériennes qui ont une capacité de biodégradation à la fois, cette approche est connue pour son effet d'améliorer la dégradation, cela est due à la relation synergique présente entre les populations microbiennes. La culture mixte utilisée dans cette étude est formée des isolats de notre sol pollué par les hydrocarbures, nous avons utilisé dans la combinaison bactérienne trois souches proviennent des trois genres retrouvés dans le sol, *Bacillus sp*, *Pseudomonas stutzeri* et *Kocuria sp* L'un des principaux objectifs de cette étude est de cibler les concentrations élevées de phénol (supérieure à 200 mg/L) par un consortium construit de nos isolats bactériens, et puis pour rendre la dégradation encore plus efficace nous avons adopté des adaptations successives pour la dégradation des concentrations encore plus élevées (1000 mg/L, 1200 mg/L et 1300 mg/L).

### **2.2.1 Optimisation des conditions physico-chimique de la dégradation de phénol par la culture bactérienne mixte**

La culture mixte de *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp* et *Kocuria sp* a montré une grande efficacité à dégrader le phénol comme seule source de carbone et d'énergie dans des conditions physico-chimiques standardisées.

Le tableau 05 et **la Figure 28**, représentent les variations du taux de phénol consommé par le consortium au cours du temps à différentes températures et différents pH, quoique ; la meilleure dégradation s'est produite à pH 7 et aucune différence marquée n'a été observée dans la plage 5-9.

L'effet de la température sur la dégradation a également été analysé. La phase de diminution du phénol maximale a été observée à 30°C et 37°C, cependant, la culture mixte a pu se développer à haute et basse température, et le taux de dégradation du phénol diminue à une température supérieure à 37°C. Le résultat du test ANOVA à un facteur montre qu'il n'y a pas d'effet significatif du changement de pH sur la consommation de taux de phénol par le consortium (P-value = 0,56). Le test de Tukey a classé l'ensemble de la donnée dans une classe (a) comme le montre **la Figure 28**. L'analyse ANOVA à un facteur confirme que le taux de phénol consommé par le consortium au cours du temps n'est pas non plus significatif

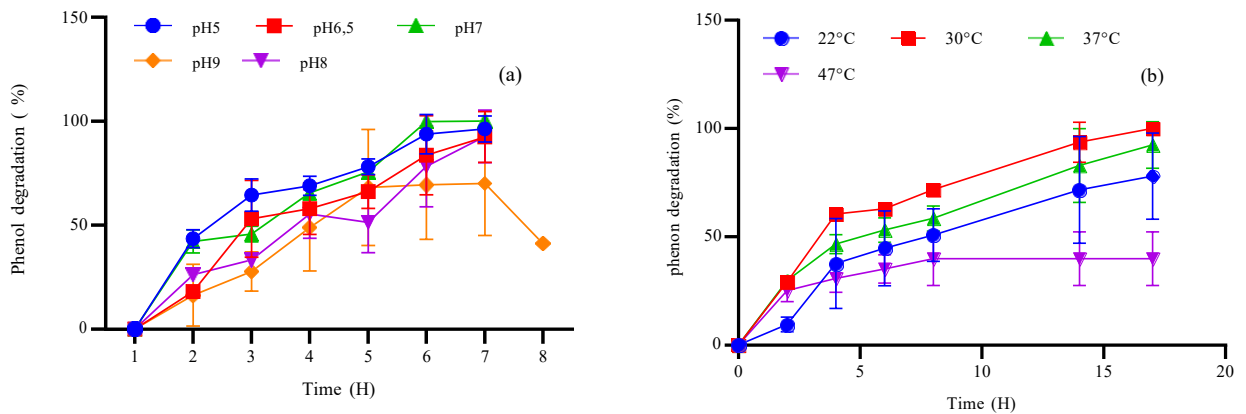
(valeur  $P = 0,27$ ), et le test post-hoc (test de Tukey) regroupe également les variables en un seul groupe (**Tableau 05**).

D'après les résultats et les tests statistiques, la culture bactérienne mixte s'adapte mieux aux changements de pH et de température.

**Tableau 05** : Variation du taux de phénol métabolisé par le consortium au cours du temps à différentes températures et différents pH exprimés en pourcentage.

Variables	Modalités	Moyenne $\pm$ écart type	<i>p</i> -value
pH	pH = 5	63.61 $\pm$ 33.34 (a)	0.56
	pH = 6.5	46.55 $\pm$ 31.37 (a)	
	pH = 7	65.16 $\pm$ 34.66 (a)	
	pH = 8	46.26 $\pm$ 29.81 (a)	
	pH = 9	44.86 $\pm$ 27.87 (a)	
T°	T = 22°	42.82 $\pm$ 30.75 (a)	0.27
	T = 30°	59.74 $\pm$ 35.20 (a)	
	T = 37°	54.02 $\pm$ 32.52 (a)	
	T = 47°	30.14 $\pm$ 14.41 (a)	

*P*-value d'ANOVA a un facteur:  $P > 0.05$ : non significatif, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  and \*\*\*:  $P < 0.001$



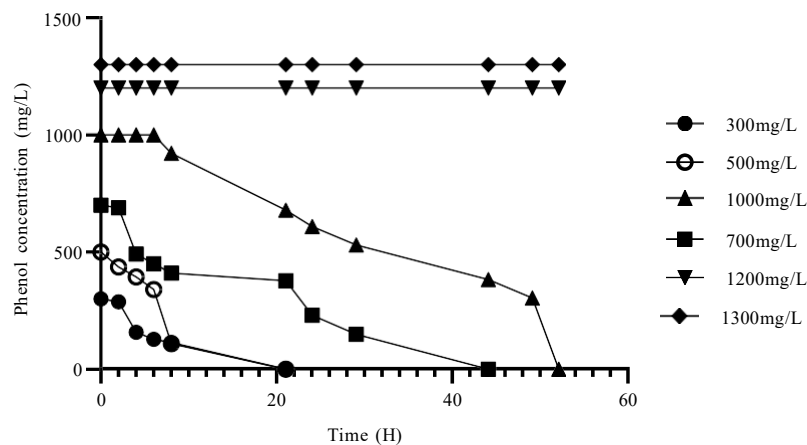
**Figure 28** : Taux de phénol consommé par consortium à différents pH (**a**), et différentes température (**b**), la concentration initiale en phénol est de 100mg/L et les cultures ont été incubées à 30°C pendant 48h ; écart-type de conception des lignes verticales (moyenne  $\pm$  ET,  $n = 3$ ).

### 2.2.2 Effet d'adaptations successives pour la dégradation du phénol par la culture mixte

#### ➤ Biodégradation du phénol avec des cellules non adaptées (effet de concentration)

Dans la présente étude, la culture mixte bactérienne non adaptée a totalement digéré des concentrations de phénol de 300 mg/L, 500 mg/L, 700 mg/L et 1 000 mg/L, entraînant une large plage de temps pour la dégradation complète du phénol, avec longtemps pour des concentrations plus élevées (**Figure 29**). Cependant ; le consortium a commencé à dégrader 1000 mg/L après 7 heures d'adaptation, la dégradation de 300 mg/L, 500 mg/L et 700 mg/L n'a nécessité aucune période d'adaptation.

Pour les temps de la période de dégradation complète (période d'adaptation et de dégradation réelle) 1000 mg/L ont été complètement dégradés en 54 heures, 700 mg/L ont été terminés en un temps de 29 heures, 300 mg/L et 500 mg/L ont été épuisés en 21 heures, respectivement. De plus, aucune dégradation n'a été observée à des quantités supérieures à 1000 mg/L (**Tableau 06**).



**Figure 29:** Biodégradation des concentrations initiales de 300 mg/L, 500 mg/L, 700 mg/L, 1000 mg/L, 1200 mg/L et 1300 mg/L par culture mixte non adaptée en fonction du temps (H).

### 2.2.3 Effet de l'adaptation successive sur la dégradation de forte concentration de phénol

#### ➤ Biodégradation de 1000 mg/L

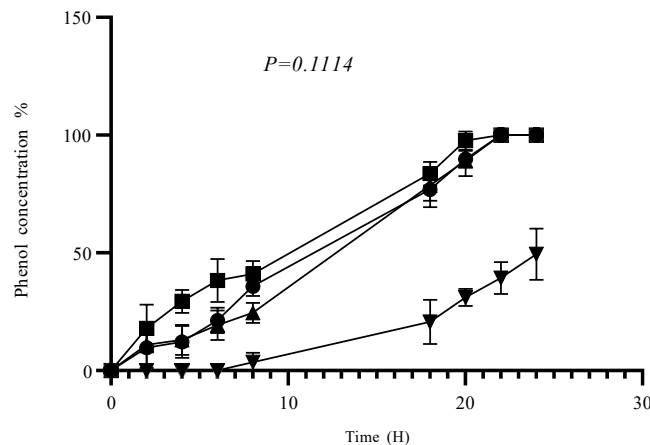
Comme le montre la **Figure 30**, après une pré-adaptation à 300 mg/L, 500 mg/L et 700 mg/L, les cellules ont commencé la biodégradation immédiatement sans recours au temps

d'adaptation (phase de latence), mais les cellules non adaptées ont eu besoin de 7 heures pour commencer la métabolisation, respectivement.

Après 8 heures d'incubation, les cellules qui s'étaient déjà adaptées à 300 mg/L ont consommé  $35,85 \pm 4,16$  (%) du phénol, les cellules adaptées à 500 mg/L ont consommé  $41,07 \pm 5,56$  (%), et les cellules adaptées à 700 mg/L ont dégradé  $24,54 \pm 4,33$  (%) ; cependant, après 8 heures, les cellules n'ayant reçu aucune pré-adaptation ont métabolisé seulement  $3,94 \pm 3,6$  (%) de phénol.

Après 24 heures d'incubation, les biomasses qui s'étaient précédemment adaptée à 300 mg/L, 500 mg/L et 700 mg/L avait entièrement utilisé la concentration initiale de phénol, alors que la biomasse qui ne s'était pas adaptée en avait consommé près de la moitié à un taux de  $49,48 \pm 10,88$  (%).

Le résultat de l'ANOVA à un facteur et le test de comparaison multiples de Tukey ont révélé qu'il n'y a pas d'effet significatif du niveau d'adaptation pour la métabolisation de 1000 mg/L par la culture mixte de *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp* et *Kocuria sp* avec une valeur de  $P = 0,1114$ ).

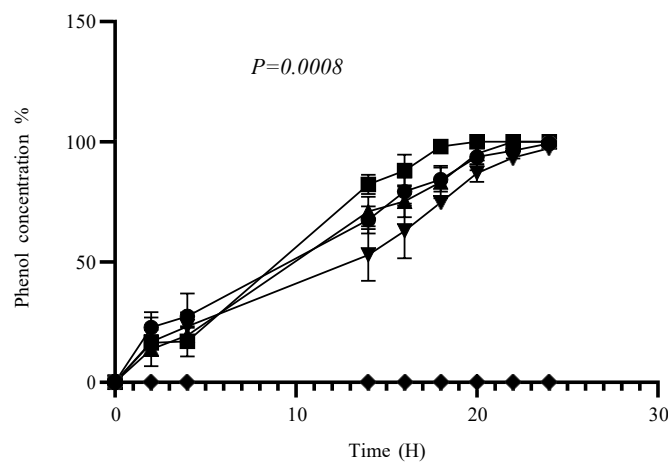


**Figure 30:** Le graphique montre la proportion d'une concentration de 1000 mg/L épuisée en fonction du temps ; le symbole représente : (▼) des cellules non adaptées, (●) des cellules adaptées pour 300 mg/L (■) des cellules adaptées pour 500 mg/L, (▲) des cellules adaptées pour 700 mg/L, ; écart-type de conception des lignes verticales (moyenne  $\pm$  ET,  $n = 3$ ).

➤ **Biodégradation de 1200 mg/L :**

Après deux adaptations successives, la culture mixte a pu initier la dégradation de 1200 mg/L de phénol ; le point de départ de l'adaptation est toujours une concentration relativement faible, les cellules qui ne se sont pas adaptées sont incapables de commencer la métabolisation de cette concentration de phénol comme indiqué sur **la Figure 31** ; celles qui ont suivi la voie 300→1000 ont dégradées  $93,64 \pm 5,52$  (%), les cellules de la voie 500→1000 ont métabolisées 100 (%), les cellules de la voie 700→1000 ont dégradées  $95,02 \pm 4,43$  (%) et celles adaptées à 1000 ont dégradées  $86,97 \pm 3,65$  (%) de phénol après 20 heures d'incubation, respectivement.

L'analyse de la variance (ANOVA) a indiqué qu'il existe une grande différence statique entre toutes les cultures de cellules adaptées et non adaptées avec une valeur P de (0,0008\*\*\*). Les résultats de la comparaison multiple de Tukey fournissent qu'il y a une différence significative entre les moyennes des valeurs obtenues des cultures convenables et non convenables pour la dégradation de 1200 mg/L, cependant les stades d'adaptation de départ à faibles concentrations n'ont montré aucune différence significative entre eux avec p -valeurs > 0,05.



**Figure 32:** Le graphique montre la proportion d'une concentration de 1200 mg/L épuisée en fonction du temps; le symbole représente : (◆) cellules non adaptées, (●) biomasse de la voie 300→1000 (■) 500→1000, (▲) 700→1000, (▼) cellules adaptées pour 1000 ; écart-type de conception des lignes verticales (moyenne  $\pm$  ET, n = 3).

➤ **Biodégradation de 1300 mg/L :**

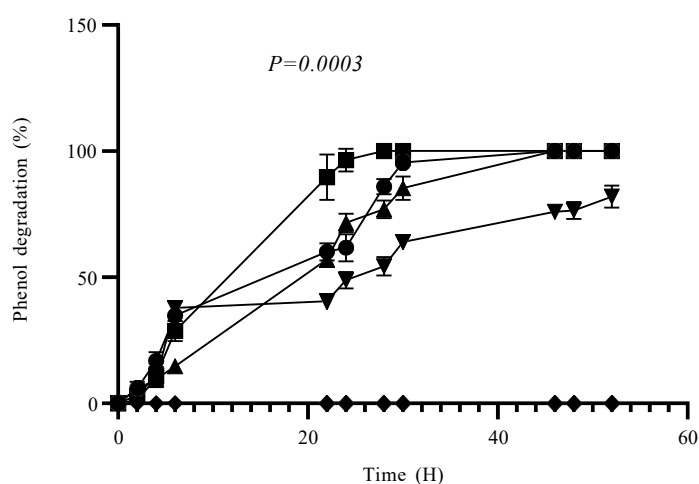
Les résultats obtenus lors de l'étude de la biodégradation de 1300 mg/L, tels que tracés dans **la Figure 33**, ont montré un temps record de 22 heures pour les cellules ayant subi la voie 500→1000→1200, en revanche, les cellules ayant déjà passé par la voie 300→1000→1200 et

celles de la voie 700→1000→1200 ont montré une vitesse de dégradation basse et un temps plus long noté 46 heures pour une dégradation complète. Pour les cellules du parcours 1000→1200, elles ont montré une dégradation encore plus longue et incomplète, cela dure près de 50 heures.

Après 24 heures d'incubation, la biomasse correspondant à la voie 300→1000→1200 a métabolisé  $61,72 \pm 5,38$  (%), de la voie 500→1000→1200 a métabolisé  $96,43 \pm 4,50$  (%), et de la voie 700→1000→1200 a métabolisé  $71,60 \pm 3,69$  (%), et celle du parcours 1000→1200 a métabolisé  $48,87 \pm 3,26$  (%) de phénol.

L'analyse ANOVA à un facteur, a donné une différence significative marquée  $P = 0,0003^{***}$ , la différence est due au temps de dégradation complète entre les cellules adaptées et non adaptées et au taux de phénol dégradé à chaque temps de lecture.

Les comparaisons multiples de Tukey [Tableau 11 (annexe 02)] ont révélés qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes voies de faibles concentrations avec des valeurs de P-value  $> 0,9999$ , d'un côté, il y a toujours une distinction entre les valeurs des cultures adaptées et non adaptées avec des valeurs  $P < 0,05$ .



**Figure 34:** Le graphique montre la proportion d'une concentration de 1300 mg/L épuisée en fonction du temps; les symboles représentés : (◆) cellules non adaptées, (●) biomasse des voies 300→1000→1200, (■) 500→1000→1200, (▲) 700→1000→1200, (▼) 1000→1200 ; écart-type de conception des lignes verticales (moyenne  $\pm$  ET,  $n = 3$ ).

**Tableau 06:** temps de dégradation complète des concentrations élevées de phénol des différentes voies d'adaptations.

Concentration initiale de phénol (mg/l)	Le parcours suivie par la biomasse	Temps de la dégradation complète (heures)
<b>300</b>	Cellules non-adapté	20h
<b>500</b>	Cellules non-adapté	20h
<b>700</b>	Cellules non-adapté	28h
<b>1000</b>	Cellules non-adapté	52h
	Cellules non-adapté → 300	22h
	Cellules non-adapté → 500	21h
	Cellules non-adapté → 700	22h
<b>1200</b>	Cellules non-adapté	Pas de dégradation
	Cellules non-adapté → 300 → 1000	20h
	Cellules non-adapté → 500 → 1000	18h
	Cellules non-adapté → 700 → 1000	20h
	Cellules non-adapté → 1000	20h
<b>1300</b>	Cellules non-adapté	Pas de dégradation
	Cellules non-adapté → 300 → 1000 → 1200	46h
	Cellules non-adapté → 500 → 1000 → 1200	22h
	Cellules non-adapté → 700 → 1000 → 1200	46h
	Cellules non-adapté → 1000 → 1200	+50h

**Cellules non-adapté → 300 → 1000:** cellules non adapté qui ont subi une adaptation à 300 mg/L et transféré à 1000 mg/l

### Discussion

Certains microorganismes des sols pollués par les hydrocarbures, en particulier les bactéries, sont capables d'obtenir de l'énergie via le métabolisme des polluants du sol (**Diaz, 2004**). Ils développent des stratégies pour utiliser ces molécules comme sources de carbone et d'énergie, assurant la détoxification de l'environnement, ou pour les transformer en substrats assimilables par d'autres microorganismes (**Johnsen et al., 2005**).

Les bactéries, via des voies métaboliques spécifiques, tiennent le rôle central des phénomènes de biodégradation des polluants. Certaines d'entre elles ont développé un système de signalisation, le chimiotactisme qui favorise l'accès aux polluants et le déplacement des bactéries selon le gradient de concentration du polluant. Les bactéries s'accumulent alors à l'interface entre le polluant hydrophobe et le milieu hydrophile, provoquant une augmentation du taux de dégradation des composés et souvent une augmentation de leur désorption. Le recrutement des voies métaboliques, présentes dans le génome mais non exprimées, peut se faire par des événements de mutation ponctuelle, de réarrangement génétique ou de transposition (recrutement vertical) (**Martin, 2011**). Les microorganismes des sols pollués, peuvent aussi acquérir des groupes de gènes cataboliques via des éléments mobiles transférés d'un hôte donneur à un hôte receveur (transfert horizontal). Chez les bactéries, les phénomènes de transferts les plus connus sont la conjugaison via des plasmides, la transformation ou la transduction (**Juhas et al., 2009**). Ces phénomènes de transferts horizontaux augmentent les capacités métaboliques des bactéries, notamment en agrandissant leur gamme de substrats, et permettent l'adaptation des populations bactériennes à de nouveaux contaminants (**van der Meer et al., 1992; van der Meer and Sentschilo, 2003**).

Le classement des bactéries sur la base de leur gène ARNr 16S ne tient pas compte des variations dans l'organisation qui surviennent par suite d'échanges de gènes entre bactéries. Ainsi, l'adaptation des microorganismes à leur environnement pollué s'accompagne souvent du transfert horizontal de gènes bien que les gènes les plus affectés par ce processus codent plutôt des enzymes métaboliques (**Juhas et al., 2009**).

Ainsi, ce phénomène peut générer des taxons divergents portant un gène d'ARNr 16S similaire. Mais, et selon les recherches faites sur l'étude de la biodiversité des sols

pollués, les séquences d'ARNr 16S constituent une bonne référence d'affiliation taxonomique, mais la distinction en genres et espèces doit s'appuyer sur un séquençage plus systématique d'un type de « gènes de référence » ou de génomes entiers. La compréhension de la distribution et de l'agencement des groupes taxonomiques dans différents sols reste un déficit pour la microbiologie environnementale (Martin, 2011).

Le sol supporte une large proportion de la biodiversité terrestre (Cherif, 2014). Dans les sols, certains phylums bactériens sont capitaux, et leur abondance relative varie selon les caractéristiques environnementales et les méthodes d'analyse. En comparant 32 bibliothèques de gènes d'ARNr 16S, Janssen (Janssen, 2006) montre qu'en moyenne, 40% des séquences identifiées dans des échantillons de sol appartiennent aux Protéobactéries, 20% aux Acidobactéries et 13% aux Actinobactéries (Janssen, 2006).

D'après les résultats de l'identification de gène 16S des isolats bactériens, le sol de gisement pétrolier de Hassi Messaoud est un milieu naturel riche en termes de biodiversité avec une dominance relative des *Pseudomonas spp* et *Bacillus spp*, ces deux bactéries sont isolés principalement des sols pollués par les hydrocarbures, et dans les eaux usées, elles sont très reconnues par leur résistance et pouvoir de biodégradation de multiple polluants tels que le phénol dans des conditions aérobies (Michra et al., 2017 ; Bacha et al., 2010 ; wasi et al., 2013 ; van schi et al., 2000).

Les bactéries du genre *Pseudomonas*, appartenant à la classe des Gammaprotéobactéries, sont ubiquitaires, Il apparaît comme l'un des taxons bactériens les plus importants du sol (Garbeva et al, 2004). Ce genre joue des rôles clés dans les sols en tant qu'agent de biocontrôle (O'Sullivan & Ogara, 1992) mais aussi dans la stimulation de la croissance végétale ainsi que dans la bioremédiation (Garbeva et al, 2004). Les *Pseudomonas* ont servi de modèles pour étudier leur métabolisme de dégradation et leurs dioxygénases à partir des espèces capable de dégrader quelques polluants (Martin, 2011).

*Pseudomonas stutzeri* est une bactérie doté de capacités métaboliques particulières pour la dégradation des hydrocarbures aromatiques (Baggi et al., 1987). En effet, contrairement aux autres *Pseudomonas*, elle peut se développer sur une grande variété de molécules aromatiques dont le phénol, le crésol et le diméthylphénol, le tétrachloroéthylène, ainsi que sur des molécules non hydroxylées (Viggiani et al., 2006).

Divers travaux dans le domaine de la biodégradation ont confirmé la capacité énorme de plusieurs espèces de genre *Bacillus* de dégrader les polluants organiques tels que les

xénobiotiques, les pesticides, les phénols...etc. Ces derniers sont isolés principalement des sols pollués par les hydrocarbures, le pétrole et ses dérivés (Arora, 2020 ; Michra et al., 2017). Les *Bacillus* offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes aux changements des conditions environnementales (Cavaglieri et al., 2005).

Les caractères physiologiques des *Bacillus* sont impressionnants. Ils peuvent dégrader la plupart de la matière organique présente dans le sol (hydrocarbures, cellulose, amidon, protéines, ...) par la production d'enzymes extracellulaires. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiants, fixateurs d'azote, précepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse. Ces bactéries, sont des chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles et sont capables de croître à des valeurs de pH, de température et de concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre. A cause de cette variabilité physiologique, les connaissances sur l'écologie du *Bacillus* sont très limitées (Cherif, 2014).

Ce sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives formant des endospores. Les caractéristiques distinctives entre les membres du genre *Bacillus* et les autres bacilles sporulant sont la nature aérobie stricte ou facultative, la forme bacillaire et la production de catalase. Le genre *Bacillus* a subi des changements taxonomiques considérables. Les premières tentatives de classification des espèces de *Bacillus* sont fondées sur deux caractéristiques: la croissance aérobie et la formation d'endospores qui conduisait à la distinction de deux espèces formant des endospores, *Bacillus anthracis* et *B. subtilis*. Par la suite, le nombre de nouvelles espèces a augmenté régulièrement grâce à l'application de méthodes variées et efficaces pour l'enrichissement et l'isolement tenant compte de la diversité physiologique et des besoins nutritionnels et culturels de ces organismes et au développement de nouvelles méthodes pour la caractérisation et l'identification des espèces bactériennes, en particulier l'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S (Cherif, 2014).

L'analyse des séquences des ARNr 16S de 51 espèces de *Bacillus* permettait à Ash et al., (1991) de caractériser cinq groupes phylogénétiques. La réorganisation de ce genre a été initiée en 1992 par la création du genre *Alicyclobacillus* rassemblant 3 espèces acidophiles et thermophiles (Ash et al., 1991).

Le genre *Kocuria* qui fait partie de phylum *Actinobacteria* avec une structure de paroi cellulaire gram-positif en général, comprend plusieurs souches halotolérantes et dégradant le phénol (Takarada et al., 2008). Le gène d'une phénol monoxygénase a été détecté dans le génome d'une souche *Kocuria* isolé d'un sol autour d'un lac en Chine (Wu et al., 2018). De plus, la séquence du génome de *Kocuria rhizophila* indiquent la présence de voies métaboliques putatives pour la dégradation de composés phénoliques (Takarada et al., 2008) Cette bactérie est considérée comme un agent potentiel de bioremédiation des polluants organiques car ils peuvent prospérer dans une variété d'environnements contaminés par les composés aromatiques (Li et al., 2019).

Les autres espèces bactériennes majoritairement retrouvées dans la dégradation du phénol sont : *Pseudomonas spp*, *Bacillus spp*, *Achromobacter spp*, *Acinetobacter spp*, *Rhodococcus spp*, *Gulosibacter spp*, *Sphingomonas spp*, *Serratia spp*, *Alcaligenes spp*, *Ralstonia eutropha*,... Etc et les espèces fongiques : *Fusarium sp*, *Streptomyces sp*, *Phanerocheate chrysosporium*, ... Etc et des algues microscopiques comme : *Ochromonas danica*, *Phormidium valderianum* ... Etc (Nair et al., 2008 ; Zhai et al., 2012 ; Pradhan et al., 2007 ).

La biodégradation est un processus à multiples facettes dans lequel de nombreux éléments biotiques et abiotiques sont impliqués. De nombreux facteurs peuvent affecter la capacité de dégradation ou le métabolisme des micro-organismes en empêchant ou en stimulant la croissance des organismes. Ces facteurs peuvent inclure la température, pH, teneur et disponibilité en oxygène (aération et agitation), biodisponibilité (disponibilité de ou des microorganismes), concentration du substrat. Chacun de ces facteurs doit être optimisé pour obtenir une dégradation maximale de composé organique de choix (Al-Khalid et al., 2012 ; Bajaj et al., 2009 ; Mishra et Kumar et al., 2017 ; Singh et al., 2020). Cependant, les enzymes catalysent des réactions spécifiques et surtout exploitent dans des conditions modérées de température, de pH, de solvants et de force ionique (Pradeep et al., 2015).

En raison de l'effet toxique causé par le phénol, la concentration initiale de phénol était un facteur clé pour la vitesse de dégradation et l'élimination complète du phénol. Les temps de dégradations complètes des différents concentrations initiales de phénol change selon la tolérance physiologique de la bactérie, Plusieurs travaux sur le même

domaine confirme ceci, le tableau suivant regroupe quelques comparaisons :

**Tableau 07:** Quelques exemples de bactéries et leur taux de dégradation de phénol.

Microorganisme	Dégradation (%)	Temps (h)	Concentration initiale (mg/L)	Références bibliographiques
<i>Bacillus sp</i> (E1)	92.9	52	500	Notre étude
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	100	14	500	Peng et al., 2022
<i>Pseudomonas phenolilytica sp</i>	100	24	200	Kujir et al., 2022
<i>Bacillus cereus</i>	100	216	500	Banerjee et Ghoshal, 2011
<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	99	96	3000	Nogina et al., 2020
<i>Pseudomonas sp</i>	100	72	900	Aisami et al., 2020
<i>Bacillus cereus</i>	100	80	600	Zhang et al., 2013
<i>Stenotrophomonas sp</i>	100	50	500	Santoch et al., 2018
<i>Pseudomonas fredriksbergensis</i>	90	96	700	Aljbour et al., 2021
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	90	96	600	Almajali et al., 2021
<i>Bacillus brevis</i>	90	60	1000	Arutchelvan et al., 2006

Notre souche de *Bacillus sp* 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 et al., 2016**).

Il a été confirmé que la température joue un rôle égal voire supérieur à la disponibilité des nutriments lors de la dégradation des composés organiques dont le phénol, comme elle peut affecter significativement la cinétique de croissance (**Margesin et Schinner, 1997 ; Onysko et al., 2000**).

La souche bactérienne *Bacillus sp* est considérée comme étant une souche bactérienne mésophile car son optimum de développement et de dégradation était à des températures comprises entre 30°C et 37°C, pour cette catégorie de bactérie mésophile, les taux de croissances ne changent pas entre 35°C et 40°C mais toute élévation de température cause la dénaturation de protéine et entraîne un ralentissement de croissance (**Bacha et al., 2010**). Plusieurs travaux ont révélé que la dégradation la plus élevée de phénol a été observée entre 25°C et 35°C, ce qui est une plage idéale pour la plupart des processus de bioremédiation. (**Aisami et al., 2020**). d'après une étude récente, la souche *Bacillus thuringiensis* J20 pourrait se développer dans une culture minérale de phénol dans une plage de température de 25°C à 42°C avec un optimum de croissance à 30°C (**Ereqat et al., 2018**). Selon El-Naas et al., (2009) une exposition soudaine à des températures supérieures à 35°C peut avoir un effet néfaste sur les enzymes bactériennes qui sont généralement responsables du clivage du cycle benzénique, qui est l'étape clé dans le processus de biodégradation. En revanche, l'exposition à des températures beaucoup plus basses que 30°C devait ralentir l'activité bactérienne et renforcer l'effet inhibiteur du phénol sur les bactéries, en particulier pour les hautes concentrations de phénol. La plupart des études sur la biodégradation du phénol avaient été effectuée dans la plage de température de 25 à 35°C (**El-Naas et al., 2009**). Les très hautes températures dénaturent les enzymes et les protéines et sont la cause principale de l'arrêt de la dégradation et de la croissance bactérienne, respectivement. D'autre part une dégradation extrême du phénol à basse température a été signalée (**Margesin et al., 2005 ; Margesin et al., 2013**) tandis que la dégradation du phénol thermophile a également été signalée avec une dégradation observée à des températures aussi élevées que 70°C (**Mutzel et al., 1996 ; Feitkenhauer**

et *al.*, 2001).

Le pH affecte significativement les réactions biochimiques nécessaires à la dégradation du phénol (Chung et *al.*, 2003). Le suivi du pH du milieu peut être un indicateur de la dégradation du phénol et l'un des facteurs significatifs dans le succès du traitement biologique (Ucun et *al.*, 2010). Dans l'application pratique, la dégradation microbienne du phénol est généralement limitée car les micro-organismes ne peuvent pas résister au changement de pH dans l'environnement et entraîner leur mort. Par conséquent, les souches qui peuvent se développer dans une large gamme de pH dégradent efficacement le phénol (Zhang et *al.*, 2022). Selon Zhang et *al.*, 2022, l'étude de la dégradation du phénol de la souche ZWB3 dans différentes conditions de pH initiales que cette dernière a la capacité de dégrader le phénol dans la gamme de pH de 6 à 10, alors que son optimum de dégradation était dans la plage de pH de 7 à 9. Le résultat de cette étude est similaire à le notre ou on peut conclure que le rendement de dégradation de phénol est élevé en milieu neutre ou légèrement alcalin. Par rapport aux souches rapportées (Long et *al.*, 2019 ; Wu et *al.*, 2018 ; Lee et *al.*, 2020). Les plages de pH de la souche *Bacillus sp* est plus large, ce qui permet de mieux s'adapter au changement d'environnement, tandis que l'efficacité de la dégradation dans des conditions neutres et légèrement alcalines est meilleure. Dans le processus de dégradation microbienne, le phénol est transformé en acides organiques par ouverture de cycle, ce qui conduit à la diminution du pH dans l'environnement. Ainsi, l'environnement externe neutre ou faiblement alcalin est plus favorable à la survie microbienne (Zhang et *al.*, 2022). L'environnement interne de toutes les cellules vivantes est approximativement neutre. La plupart des organismes ne tolère pas les valeurs de pH inférieures à 4 ou supérieures à 9, à des valeurs de pH faibles ou élevées, les acides ou les bases peuvent pénétrer plus facilement dans les cellules, car elles ont tendance à exister sous forme non dissociée sous ces conditions et la force électrostatique ne peuvent pas les empêcher d'entrer dans les cellules (Bacha et *al.*, 2010).

La vitesse d'agitation affecte la cinétique de biodégradation du phénol car elle contribue à l'homogénéisation de milieu qui accélère la rencontre de l'enzyme avec son substrat comme elle facilite aussi l'entrée d'oxygène qui joue un rôle important dans la dégradation. Shourian et *al.*, (2009) ; Kang et *al.*, 1997 et Khleifat (2006) ont rapporté que la dégradation bactérienne de phénol est optimale lorsque le milieu de culture est mis

sous agitation mécanique à une vitesse de 250 rpm. De nombreuses autres études confirment que l'effet d'aération améliore la dégradation biologique des polluants organiques et notamment le phénol, cela est expliqué par le rôle essentiel de l'oxygène qui est utilisé par la phénol hydroxylase dans la première étape de dégradation aérobie de phénol (**Khleifat, 2006 ; Shourian et al., 2009**). Une étude menée par Moussavi et al., (2010), est faite pour évaluer les performances bactériennes de dégradation et d'élimination du phénol comme seul substrat dans les eaux usées salines en utilisant un consortium bactérien dans un réacteur discontinu. Les résultats de cette étude ont montré que le réacteur étudié pourrait éliminer plus de 99 % du phénol des eaux usées salines avec une concentration jusqu'à 1000 mg/L de phénol en temps de cycle total de 17 h et 15,5 h d'aération.

De multiples travaux et études ont montré une haute performance de dégradation des polluants par les cultures mixtes par rapport aux cultures simples (**Dwyer et al., 1986 ; Prpich et Daugulis, 2005 ; Pradhan et al., 2012 ; Barman et al., 2017 ; Chi et al., 2013**). Cependant, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont été digérés par un consortium de bactéries combinant *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp* et *Micrococcus sp* (**Ifeanyi et Ihenatuoha, 2011**).

Un consortium bactérien composé de *Kocuria sp*, *Bacillus pumillus* et *Pseudomonas stutzeri*, isolées des boues secondaires de l'industrie des pâtes et papiers, a complètement éliminé le 2,4,5-Trichlorophenol des boues issues de la pulpe et papeterie dans une période de 2 semaines lorsqu'il est complété à raison de 100 mg/L de substrat. Le même consortium bactérien a également assuré une réduction significative des halogènes organiques absorbables, et des halogènes organiques extractibles de 61% et 63%, à partir des boues (**Karn et al., 2013**).

Mariano et al, (2018), ont fait un travail qui visait à évaluer la capacité de différents micro-organismes à dégrader le gazole commerciale en comparaison avec un carburant diesel altéré recueilli dans les eaux souterraines d'une station-service. Un inoculum composé d'un consortium commercial de *Staphylococcus hominis*, *Kocuria palustris*, *Pseudomonas aeruginosa* LBI, *Ochrobactrum anthropi* et *Bacillus cereus*, obtenus à partir du sol et eaux souterraines contaminées par des hydrocarbures et un consortium provenant d'une zone non contaminée a été testé pour la dégradation de diesel. Les expériences sur les indicateurs redox ont montré que seuls les consortiums, même ceux

provenant d'une zone non contaminée, ont pu biodégrader le diesel altéré et qui ont assuré la suppression des hydrocarbures pétroliers totaux en 48 jours, alors que la flore microbienne indigène n'a montré aucune capacité de biodégradation. Les résultats de cette étude indiquent que la meilleure stratégie serait celle basée sur l'injection de consortiums, car même les cultures avec la capacité reconnue de biodégradation des hydrocarbures peut échouer lorsqu'elle est appliquée (**Mariano et al., 2018**).

Néanmoins, l'utilisation de la culture mixte dans la biodégradation de fortes concentrations de phénol peut être avantageuse pour plusieurs raisons, l'accessibilité d'une grande source initiale de carbone suscite une compétition entre les populations microbiennes qui déclenche un déclin rapide de cette source, de plus, ce processus de dégradation peut être assuré sous une grande variété de pH et de température en raison de l'hétérogénéité microbienne alors il ne nécessite pas un pH initial fixe au départ et le changement de pH au cours des réactions de dégradation peut être facilement supporté par une autre espèce tolérante (**Zache et Rehm, 1989**).

Un consortium bactérien constitué de deux souches de *Pseudomonas sp* et de deux souches d'*Acinitobacter sp* a dégradé une concentration qui dépasse 2000 mg/L avec une diminution du temps de latence (10H) et une augmentation du taux de dégradation du phénol (**Prpich et Daugulis, 2005**) ; Un autre consortium a isolé des eaux usées de raffinerie constituées essentiellement de *Streptocoques sp* a dégradé jusqu'à 1000 mg/L à 37°C et pH 7 passant par une phase de latence marquée 48H, alors que des concentrations inférieures à 200 mg/L n'avaient aucun effet inhibiteur sur la croissance cellulaire (**Pradhan et al., 2012**).

D'après les travaux de Know et al., (2009) le catabolisme des phénols comporte deux étapes, une période d'adaptation cellulaire liée par une période de dégradation, pour les micro- organismes la période d'adaptation sert à préparer la machinerie enzymatique, et peut modifier la membrane structure pour se protéger de la toxicité du phénol (**Heipieper et al., 1994**).

Kwon et al., (2009) ont révélé que la dégradation de moindres concentrations nécessite une pré-adaptation, par contre la dégradation de très fortes concentrations nécessite obligatoirement au moins deux pré-adaptations alors que les pré-adaptations à la même concentration n'ont pas une influence notable sur la vitesse de dégradation ; La bactérie fluorescente *Pseudomonas KNU417* a pu dégrader jusqu'à 1300 mg/L après pré-

adaptation à 100 mg/L puis à 700 mg/L, alors que notre culture bactérienne mixte a pu métaboliser 1300 mg/L en 24 heures après la voie 500→1000, tandis que le passage par les concentrations de 500 mg/L, 300 mg/L et 700 mg/L présente des résultats significatifs ; de ces deux résultats presque similaires on peut déduire que la gamme de 300 mg/L à 700 mg/L forment des stades optimale pour une meilleure adaptation.

Pour comprendre le mécanisme sous-jacent à la tolérance des bactéries et à la toxicité du phénol, Santos *et al.*, (2004) ont élaboré une carte de protéines de référence qui illustre les changements structurels et métaboliques induits chez *Pseudomonas putida* KT2440, cette dernière a été exposée à deux concentrations de phénol de 600 mg/L et 800 mg/L. Les résultats de la croissance bactérienne ont montré une inhibition d'au moins 4 heures avant la reprise de la croissance cellulaire ; cette exposition soudaine à ces deux concentrations entraîne une expression accrue de 68 protéines ; ces protéines sont impliquées dans la réponse au stress oxydatif, la réponse générale au stress, le métabolisme énergétique, la biosynthèse des acides gras, l'inhibition de la division cellulaire, la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire, la régulation de la transcription et le transport des molécules protéiques ; d'autre part 13 protéines réduites impliquées dans la biosynthèse des nucléotides et la mobilité cellulaire ces stratégies adoptées par *Pseudomonas putida* lui ont conférée une grande tolérance aux phénols.

Parmi les mécanismes d'adaptations, figuraient un processus évolutif qui allait de la tolérance à la dégradation rapide après l'expression d'un gène spécifique plus précisément, l'expression des gènes de stress basal, la réparation de l'ADN, la pompe à efflux, la membrane, et les gènes codant pour les protéines antioxydantes (Ma *et al.*, 2020). La perméabilité de la membrane cellulaire pour le phénol augmente avec l'augmentation de la concentration en phénol qui dépasse 1g/L et la taille de l'inoculum n'a pas de relation avec la dégradation cellulaire (Shahryari *et al.*, 2018), à partir de ces données, on conclut que le mécanisme d'adaptation cellulaire implique une tolérance à une dégradation positive rapide. Néanmoins, une dégradation positive accélérée a été expliquée par la production accrue d'enzymes cataliques de métabolisation, notamment la phénol hydroxylase (PH) et la catéchol 2,3-dioxygénase (C23O).

Les travaux d'Arai *et al.*, en 1998, suggèrent que le phénol a été dégradé par une souche de *Comamonas testosteroni* adaptée via une méta-voie induite par des gènes de structure codant pour le multicomposant PH et C230 et un gène régulateur transcrit de

manière divergente (aphR). Il a été décrit précédemment que la dégradation du phénol comprend également la voie d'ortho-clivage par l'activité de la catéchol 1,2-dioxygénase (12DO) ; cependant, l'action de ces deux enzymes augmente significativement la vitesse de dégradation du phénol. Dans l'étude précédente, *Pseudomonas* KNU417 s'est avérée utiliser l'ortho-clivage, le niveau de CD12O détecté est essentiellement dépendant des deux étapes de dégradation et de la concentration initiale de phénol, pas d'activité enzymatique au début de la dégradation, très forte activité dans le milieu et une diminution d'activité en fin de dégradation. *Pseudomonas* a dégradé 1000 mg/L en 20 h par des cellules adaptées à 300 mg/L et 500 mg/L alors que des cellules préadaptées à 100 mg/L ont dégradé 1000 mg/L en 40h. Sur ces résultats, on peut former l'hypothèse sur le fait que les cellules ont besoin d'une période d'adaptation pour une activité enzymatique suffisante pour franchir le seuil, sachant que l'adaptation aux fortes concentrations est obligatoire pour franchir les seuils élevés de polluants (**Kwon et al., 2009**). Dans des conditions aérobies, la voie de clivage ortho ou méta dépendait du type de bactérie, les catéchols subissent alors un clivage circulaire en position ortho, commençant la voie ortho pour la formation d'acétyl Co-A et de succinyl Co-A, ou en méta position, amorçant la méta- voie de formation de l'acétaldéhyde et du pyruvate (**Singh et al., 2020**).

Des recherches plus approfondies doivent être proposées pour concevoir plus logiquement les réactions enzymatiques catalytiques responsables de la transformation et de la dégradation des phénols, avant, pendant et après l'adaptation cellulaire.

# Conclusion et perspectives

Le gisement pétrolier de bassin Berkine, de la zone d'Hassi Messaoud, constitue un milieu naturel pour l'isolement des bactéries capables de dégrader le phénol. Ce travail nous a permis d'explorer et d'avoir une connaissance sur la diversité des bactéries impliquées dans la dégradation du phénol dans un sol pollué par les hydrocarbures, plus précisément le pétrole brut.

Une approche génotypique par le séquençage de gène qui code pour l'ARNr 16S a été utilisée pour identifier les isolats obtenus, par la méthode d'isolement microbiologique classique. Nous avons pu isoler et identifier les souches bactériennes suivantes : *Pseudomonas stutzerii*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Kocuria sp*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus Valensensis* et *Bacillus sp*. Ces bactéries ont montré une capacité considérable à minéraliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie. En fonction de différents facteurs environnementaux comme la concentration en substrat phénolique, la température, le pH du milieu, la souche *Bacillus sp* prouve une grande capacité à utiliser le phénol comme élément nutritif et source d'énergie avec un optimum de dégradation à 30°C et 37°C à pH alcalin. Ces données doivent être exploitées par l'utilisation de *Bacillus sp* dans les pratiques des procédés biologique de dépollution des milieux naturels alcalins.

Dans la présente étude nous avons mis en considération l'utilisation des cultures mixtes pour une dégradation rapide et complète des concentrations élevées de phénol. Le consortium constitué de *Bacillus sp*, *Pseudomonas stutzeri* et *Kocuria sp*, a augmenté l'efficacité de dégradation de phénol dans des conditions physico-chimiques plus vaste. Par le même consortium, il y avait une différence considérable dans les durées de dégradation ; cette différence est liée à la voie de biodégradation et d'adaptation cellulaire, avec des cellules non adaptées, la culture mixte était capable de décomposer des degrés relativement faibles de phénol, mais des stades élevés de substrat nécessitaient plusieurs pré-adaptations.

Il y a une richesse de littérature relative au traitement biologique des eaux usées industrielles, y compris la bioremédiation des sites pollués par les composés phénoliques, pour cela, nos bactéries peuvent être l'objet d'une valorisation pratique dans la bioremédiation in situ des sites pollués, ou par la technique d'immobilisation enzymatique ou même, pour la production d'éléments dépolluants comme les biosurfactants. D'autre part, les souches bactériennes doivent être évaluées pour leurs capacités à dégrader d'autres polluants organiques tels que le benzène, le toluène, le para-nitrophénol ... Etc.

De plus, une extraction enzymatique est prévue pour déterminer le type et la structure des enzymes engagées dans le processus de dégradation, ainsi que leur chronologie, afin d'acquérir une connaissance complète et logique de ce qui se passe pendant la biodégradation et les phases d'adaptations.

Pour plus de précision, les isolats bactériens font l'objet d'un séquençage à haut débit de génome complet ou d'une identification de l'espèce par le séquençage des gènes spécifiques, aussi, on peut faire une détection des voies métaboliques par l'outil de la biologie moléculaire en ciblant les gènes qui codent pour les enzymes catalytiques. Ainsi, une meilleure connaissance de patrimoine génétique des bactéries, va nous permettre de créer des souches modifiées génétiquement, des bactéries modèles, ou des consortiums commercialisés.

# Références bibliographiques

## Bibliographie

### A

**Abarian, M., Hassanshahian, M., Esbah, A. (2019).** Degradation of phenol at high concentrations using immobilization of *Pseudomonas putida* P53 into sawdust entrapped in sodium-alginate beads. *Water Science and Technology*, 79:1387-1396.

**Abd-El-Haleem, D., Beshay, U., Abdelhamid, A. O., Moawad, H., & Zaki, S. (2003).** Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter* sp. strain W-17. *African Journal of Biotechnology*, 2(1), 8-12.

**Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetoğlu, T., & Mehmetoğlu, Ü. (2004).** Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry*, 39(8), 983-988.

**Adak, A., Pal, A., & Bandyopadhyay, M. (2006).** Removal of phenol from water environment by surfactant-modified alumina through adsolubilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 277(1-3), 63-68.

**Ahmed, S., Rasul, M. G., Brown, R., & Hashib, M. A. (2011).** Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: a short review. *Journal of environmental management*, 92(3), 311-330.

**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. *Bioresource technology*, 201, 1-7.

**Aisami, A., Yasid, N. A., Johari, W. L. W., Ahmad, S. A., & Shukor, M. Y. (2020).** Effect of temperature and pH on phenol biodegradation by a newly identified *Serratia* sp. AQ5-03. *Open Journal of Bioscience Research (ISSN: 2734-2069)*, 1(1), 28-43.

**Akhmaloka, A., Suharto, A., Nurbaiti, S., Tika, I. N., & Warganegara, F. M. (2006).** Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium from Papandayan Crater. *Journal of Engineering and Technological Sciences*, 38(1), 1-10.

**Al-Dhabaan, F. A. (2019).** Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1247-1252.

**Aljbour, S. H., Khleifat, K. M., Al Tarawneh, A., Asasfeh, B., Qaralleh, H., El-Hasan, T., & Al-Limoun, M. O. (2021).** Growth Kinetics and Toxicity of *Pseudomonas fredriksbergensis* Grown on Phenol as Sole Carbon Source. *Journal of Ecological Engineering*, 22(10).

**Al-Khalid, T., & El-Naas, M. H. (2012).** Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(16), 1631-1690.

**Almajali, I. S., Al-Tarawneh, A., Qaralleh, H., Al-Limoun, M., Al-Sarayrah, M. M., Alqaraleh, M., ... & Dmour, S. M. (2021).** Biodegradation of Phenol by *Curtobacterium flaccumfaciens*: Optimization of Growth Conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(6), 5435-5442.

**Alver, E., & Metin, A. Ü. (2017).** Chitosan based metal-chelated copolymer nanoparticles: laccase immobilization and phenol degradation studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 125, 235-242.

**Amrouche, F., Namane, A., & Hellal, A. (2011).** Cinétiques de biodégradation du phénol par des bactéries autochtones librement suspendus dans un réacteur batch. *Journal of Renewable Energies*, 14(3), 533-541.

**Anupama, S., Pradeep, N.V., Hampannavar, U.S. (2013).** Anaerobic followed by aerobic treatment approaches for Spentwash using MFC and RBC. *Sugar Tech*, 15:197-202.

**Arai, H., Akahira, S., Ohishi, T., Maeda, M., Kudo, T. (1998).** Adaptation of *Cornamonas testosteroni* TAM1 to utilize phenol: organization and regulation of the genes involved in phenol degradation. *Microbiology*, 144:2895-2903.

**Aravindhan, R., Naveen, N., Anand, G., Rao, J. R., & Nair, B. U. (2014).** Kinetics of biodegradation of phenol and a polyphenolic compound by a mixed culture containing *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Applied Ecology and Environmental Research*, 12(3), 615-625.

**Arora, P. K. (2020).** Bacilli-mediated degradation of xenobiotic compounds and heavy metals. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 570307.

**Arutchelvan, V., Kanakasabai, V., Elangovan, R., Nagarajan, S., & Muralikrishnan, V. (2006).** Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*. *Journal of hazardous materials*, 129(1-3), 216-222.

**Arutchelvan, V., Kanakasabai, V., Nagarajan, S., Muralikrishnan, V. (2005).** Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 127:238-243.

**Ash, C., J.A.E. Farrow, S. Wallbanks, et M.D. Collins (1991).** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit – ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13:202–206.

## ***B***

**Baggi, G., Barbieri, P., Galli, E., Tollari, S., 1987.** Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2129–2132.

**Bajaj, M., Gallert, C., & Winter, J. (2009).** Phenol degradation kinetics of an aerobic mixed culture. *Biochemical Engineering Journal*, 46(2), 205-209.

**Balachandran, C., Duraipandiyar, V., Balakrishna, K., & Ignacimuthu, S. (2012).** Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource Technology*, 112, 83-90.

**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.

**Banerjee, A., & Ghoshal, A. K. (2010).** Isolation and characterization of hyper phenol tolerant *Bacillus* sp. from oil refinery and exploration sites. *Journal of hazardous materials*, 176(1-3), 85-91.

**Barghouthi, S. A. (2011).** A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. *Indian journal of microbiology*, 51(4), 430-444.

- Barik, M., Das, C. P., Raut, S., Mahanty, B., & Sahoo, N. K. (2022).** Effect of Culture Condition and Growth Kinetics on Phenol Biodegradation by an Indigenous *Rhodococcus pyridinivorans* Strain PDB9T NS-1. *Geomicrobiology Journal*, 39(3-5), 306-315
- Barman, P., Raut, S., Sen, S.K., Shaikh, U., Bandyopadhyay, P., Mohapatra, P.K.D. (2017).** Effect of a three-component bacterial consortium in white shrimp farming for growth, survival and water quality management. *Acta Biologica Szegediensis*, 61:35-44.
- 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.
- Barriuso, E., Benoit, P., & Dignac, M. F. (2004).** Rôle des résidus liés dans le devenir des produits xenobiotiques. *CR Acad. Agric. France*, 90, 15-22.
- Basak, B., Jeon, B.H., Kurade, M.B., Saratale, G.D., Bhunia, B., Chatterjee, P.K., Dey, A. (2019).** Biodegradation of high concentration phenol using sugarcane bagasse immobilized *Candida tropicalis* PHB5 in a packed-bed column reactor. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180:317-325.
- Basak, S. P., Sarkar, P., & Pal, P. (2014).** Isolation and characterization of phenol utilizing bacteria from industrial effluent-contaminated soil and kinetic evaluation of their biodegradation potential. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 49(1), 67-77.
- Basha, K. M., Rajendran, A., & Thangavelu, V. (2010).** Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. *Asian J Exp Biol Sci*, 1(2), 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.
- Bekkeniche, N. (2021).** Exploration de la biodiversité microbienne dans des sites pollués par les hydrocarbures en Algérie. Université de Mostaganem (Thèse de doctorat).
- Benmouna, Z. (2012).** Bactériocines des bactéries lactiques: étude biochimique et génétique. Université de Mostaganem (Thèse de doctorat).
- Bergery, D. (1974).** Manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins Company.
- Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.

**Bidaud, C. (1998).** Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué (Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne).

**Bogan, B. W., & Lamar, R. T. (1995).** One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2631-2635.

**Bonnard N., M.T. Brondeau, D. Jargot, D. Lafon, S. Miraval et Schneider (2011).** Phénol, Fiche toxicologique. Fiche établie par les services techniques et médicaux, Institut national de recherche et de sécurité, Paris, France.

**Brooijmans, R. J., Pastink, M. I., & Siezen, R. J. (2009).** Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microbial biotechnology*, 2(6), 587.

**Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C., Arrighi, L. (2008).** Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments. *Journal of Hazardous Materials*, 160:265-288.

## C

**Calvet R, (2003) Le sol.** Propriétés et composition. Tom (I) constitution et structure, phénomène aux interfaces. Edition France agricole.

**Carnicer. P., 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.

**Castro, H. F., Williams, N. H., & Ogram, A. (2000).** Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(1), 1-9.

**Cavaglieri, L., Orlando, J. R. M. I., Rodriguez, M. I., Chulze, S., & Etcheverry, M. (2005).** Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 748-754.

**Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Patel, T. N., & Tiwari, K. K. (2010).** Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from coke processing wastewater. *Journal of Environmental Biology*, 31(3), 293.

**Chandana Lakshmi, M.V.V., Sridevi, V., 2009.** A review on biodegradation of phenol from industrial effluents. *J. Ind. Pollut. Control* 25, 13–27.

**Chassin, P., Baize, D., Cambier, P., & Sterckeman, T. (1996).** Les éléments traces métalliques et la qualité des sols. Impact à moyen et à long terme. *Etud. Gestion Sols*, 3, 297-306.

**Chen, F. Y., Jiang, D. D., & Tang, Y. B. (2013).** Effects of additional stimulants on phenol degradation by a halotolerant *Rhodococcus sp.* JDD1H. In *Applied Mechanics and Materials* (Vol. 253, pp. 914-920). Trans Tech Publications Ltd.

**Cherif, N. (2016).** Production des bio-surfactants par les microorganismes et leurs applications (thèse de doctorat).

**Chi, X. Q., Zhang, J. J., Zhao, S., & Zhou, N. Y. (2013).** Bioaugmentation with a consortium of bacterial nitrophenol-degraders for remediation of soil contaminated with three nitrophenol isomers. *Environmental Pollution*, 172, 33-41.

**Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C., & Chikere, B. O. (2011).** Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*, 1(3), 117-138.

**Chu, W., & Kwan, C. Y. (2003).** Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system. *Chemosphere*, 53(1), 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*, 52(4), 425-440.

## **D**

**Daubin, V., & Gouy, M. (2001).** Bacterial molecular phylogeny using supertree approach. *Genome Informatics*, 12, 155-164.

**De, S., Pramanik, S. K., Williams, A. L., & Dutta, S. K. (2004).** Toxicity of polychlorobiphenyls and its bioremediation. *International Journal of Human Genetics*, 4(4), 281-290.

**Der Yang, R., Humphrey, A.E. (1975).** Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 17:1211-1235.

**Diaz E (2004).** Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.* 7: 173-180.

**Djahnit, N., Chernai, S., Catania, V., Hamdi, B., China, B., Cappello, S., & Quatrini, P. (2019).** Isolation, characterization and determination of biotechnological potential of oil-degrading bacteria from Algerian centre coast. *Journal of applied microbiology*, 126(3), 780-795.

**Dwyer, D. F., Krumme, M. L., Boyd, S. A., & Tiedje, J. M. (1986).** Kinetics of phenol biodegradation by an immobilized methanogenic consortium. *Applied and environmental microbiology*, 52(2), 345-351.

## *E*

**Ehtash, M. (2011).** Purification des eaux polluées par du phénol dans un pertracteur à disques tournants (Thèse de doctorat, INSA de Rouen).

**El-Naas, M. H., Al-Muhtaseb, S. A., & Makhlof, S. (2009).** Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of hazardous materials*, 164(2-3), 720-725.

**EPA (Environmental Protection Agency). (2020).** A Citizen's Guide to Monitored Natural Attenuation. U.S. Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response Directive 542-F-01-004.

**Ereqat, S. I., Abdelkader, A. A., Nasereddin, A. F., Al-Jawabreh, A. O., Zaid, T. M., Letnik, I., & Abdeen, Z. A. (2018).** Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain *Bacillus thuringiensis* J20 from olive waste in Palestine. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 53(1), 39-45.

**Escobedo-Morales, G., Hernández-Beltrán, J. U., Balagurusamy, N., Hernández-Almanza, A. Y., & Luévanos-Escareño, M. P. (2022).** Immobilized enzymes and cell systems: an approach to the removal of phenol and the challenges to incorporate nanoparticle-based technology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(3), 1-20.

## *F*

**Faby J.A et Brissaud F, 1997.** L'utilisation des eaux usées épurées en irrigation. Office International de l'Eau, 76 p.

**FALCY, M., & MALARD, S. (2005).** Comparaison des seuils olfactifs de substances chimiques avec des indicateurs de sécurité utilisés en milieu professionnel. Les Cahiers de notes documentaires-Institut national de sécurité, 198, 7-21.

**Farhadian, D. Duchez, C. Vachelard, C. Larroche ,2008.** Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors—A review, *Water Res.*, 42, 1325 – 1341.

**Fathepure, B. Z. (2014).** Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in microbiology*, 5, 173.

**Fava, L., Orru, M. A., Crobe, A., Caracciolo, A. B., Bottoni, P., & Funari, E. (2005).** Pesticide metabolites as contaminants of groundwater resources: assessment of the leaching potential of endosulfan sulfate, 2, 6-dichlorobenzoic acid, 3, 4-dichloroaniline, 2, 4- dichlorophenol and 4-chloro-2-methylphenol. *Microchemical journal*, 79(1-2), 207-211.

**Fawell, J., & Nieuwenhuijsen, M. J. (2003).** Contaminants in drinking water *Environmental pollution and health*. *British medical bulletin*, 68(1), 199-208.

**Fdil, F. (2004).** Etude de la dégradation des herbicides chlorophénoxyalcanoïques par les procédés photochimique et électrochimique: applications environnementales (Thèse de doctorat, Marne-la-Vallée).

**Feitkenhauer, H., Schnicke, S., Müller, R., & Märkl, H. (2001).** Determination of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus themoleovorans* sp. A2. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(5), 744-750.

**Ferradji, F. Z., Mnif, S., Badis, A., Rebbani, S., Fodil, D., Eddouaouda, K., & Sayadi, S. (2014).** Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 300-308.

**Forbes, V. E., & Forbes, T. L. (1997).** *Ecotoxicologie: théorie et applications*. Editions Quae.

## G

**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, Limoges).

**Gallizia, I., McClean, S., & Banat, I. M. (2003).** Bacterial biodegradation of phenol and 2, 4-dichlorophenol. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 78(9), 959-963.

**Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD (2004)** Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *Fems Microbiology Ecology* 47: 51-64

**Gautier, C. (2007).** Hydrocarbons biodegradation in unsaturated porous medium (No. IFP--60453). Pau Univ. et des Pays de l'Adour.

**Giese, E. C., Silva, D. D., Costa, A. F., Almeida, S. G., & Dussán, K. J. (2020).** Immobilized microbial nanoparticles for biosorption. *Critical reviews in biotechnology*, 40(5), 653-666.

**Girish, C. R., & Ramachandra Murty, V. (2014).** Adsorption of phenol from aqueous solution using *Lantana camara*, forest waste: kinetics, isotherm, and thermodynamic studies. *International Scholarly Research Notices*, 2014.

**Gobat J, Aragno M & Matthey W. (2003).** *Le sol vivant*, second edn. Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes.

**Goel, P. K. (2006).** *Water pollution: causes, effects and control*. New age international (livre).

**González-Muñoz, M.J., Luque, S., Alvarez, J.R., Coca, J. (2003).** Recovery of phenol from aqueous solutions using hollow fibre contactors. *Journal of Membrane Science*, 213:181-193.

**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.

## ***H***

**Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., & Shutsubo, K. (1999).** Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), 63-70.

**Hassan, H., Jin, B., Dai, S., Ma, T., & Saint, C. (2016).** Chemical impact of catholytes on *Bacillus subtilis*-catalysed microbial fuel cell performance for degrading 2, 4-dichlorophenol. *Chemical Engineering Journal*, 301, 103-114.

**Hayashi, H., Sakamoto, M., & Benno, Y. (2004).** Evaluation of three different forward primers by terminal restriction fragment length polymorphism analysis for determination of fecal *Bifidobacterium* spp. in healthy subjects. *Microbiology and immunology*, 48(1), 1-6.

**Heinaru, E., Merimaa, M., Viggor, S., Lehiste, M., Leito, I., Truu, J., & Heinaru, A. (2005).** Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol-and oil-polluted area. *FEMS microbiology ecology*, 51(3), 363-373.

**Heipieper, H.J., Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H., de Bont, J.A. (1994).** Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*, 12:409-415.

**Henry, Y. (1999).** Démonstration de faisabilité de la nitrification et de la dénitrification d'un lixiviat de lieu d'enfouissement sanitaire avec de la tourbe granulaire. École Polytechnique de Montréal.

**Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. (2018).** Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2045.

**Huynh, T. M. D. (2009).** Impact des métaux lourds sur les interactions plante/ver de terre/microflore tellurique (Thèse de doctorat, Paris Est).

## ***I***

**Ibrahim, H. K., Almayah, A. A., & Issa, A. H. (2017).** Molecular Detection of Environmental *Morganella morganii* as Histamine Producing Bacteria. *Dannish Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(2), 08-13.

**Ifeanyi, V.O., Ihenatuoha, U.A. (2011).** Effects of the consortium of pseudomonas, bacillus and micrococcus spp on polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oil. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 22:28-33.

## ***J***

**Janssen, P. H. (2006).** Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1719-1728.

**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., Lemièrre, B., Chiron, S., Augustin, F., & Darmendrail, D. (2001).** Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués (Vol. 298). BRGM.

**Jiang, Y., Wen, J., Bai, J., Jia, X., Hu, Z. (2007).** Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Hazardous Materials*, 147:672-676.

**Johnsen AR, Wick LY, Harms H (2005).** Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133: 71-84.

**Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW (2009).** Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 376-393.

## **K**

**Kabata-Pendias, A., & Szteke, B. (2015).** Trace elements in abiotic and biotic environments (p. 468). Taylor & Francis.

**Kang, M. H., & Park, J. M. (1997).** Sequential degradation of phenol and cyanide by a commensal interaction between two microorganisms. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 69(2), 226-230.

**Kankou, M. O. S. A. O. (2004).** Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mauritanie: Etude en laboratoire du comportement de deux pesticides (Thèse de doctorat, Limoges).

**Karn, S. K., & Reddy, M. S. (2013).** Removal of 2, 4, 5-trichlorophenol by bacterial isolates from the secondary sludge of pulp and paper mill. *Journal of basic microbiology*, 53(9), 752-757.

**Khan, F., Husain, T ., Hejazi , R, (2004).** An overview and analysis of site remediation technology journal of *Envirennemant Managment*, vol. 71, pp,95.122.

**Khessairi, A., Fhoula, I., Jaouani, A., Turki, Y., Cherif, A., Boudabous, A., ... & Ouzari, H. (2014).** Pentachlorophenol degradation by *Janibacter sp.*, a new actinobacterium isolated from saline sediment of arid land. *BioMed Research International*, 2014.

**Khleifat, K. M. (2006).** Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. *Process Biochemistry*, 41(9), 2010-2016.

**Khoudadoust , A., Rajesh , Baghvi , Suidan, Richardc, Brenner & Neal G . Sellers, (2004).** effet of NAPL entrapment conditions on air sparging remediation efficiency. Journal of Hazardous materials, vol. 110, pp, 173.183 .

**Kivisaar, M., Ho, R., Kasak, L., Heinaru, A., & Habicht, J. (1990).** Selection of independent plasmids determining phenol degradation in *Pseudomonas putida* and the cloning and expression of genes encoding phenol monooxygenase and catechol 1, 2-dioxygenase. Plasmid, 24(1), 25-36.

**Krastanov, A., Alexieva, Z., & Yemendzhiev, H. (2013).** Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. Engineering in Life Sciences, 13(1), 76-87.

**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. Bioresource technology, 136, 588-594.

**Kujur, R. R. A., & Das, S. K. (2022).** *Pseudomonas phenolilytica* sp. nov., a novel phenol-degrading bacterium. Archives of Microbiology, 204(6), 1-10.

**Kumaran, P., & Paruchuri, Y. L. (1997).** Kinetics of phenol biotransformation. Water research, 31(1), 11-22.

**Kveseth, K., Sortland, B., & Stoebet, M. B. (1981).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in leafy vegetables, a comparison of the Nordic results.

**Kwon, K.H., Yeom, S.H. (2009).** Optimal microbial adaptation routes for the rapid degradation of high concentration of phenol. Bioprocess and Biosystems Engineering, 32:435-442.

## **L**

**Lack, A., Fuchs, G., 1992.** Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism. J. Bacteriol. 174, 3629–3636

**Lakshmi, M. C., & Sridevi, V. (2015).** A review on biodegradation of phenol from industrial effluents. *I Control Pollution*, 25(1), 1-15.

**Lalanne, F. (2006).** Etude des potentialités du lavage biologique pour le traitement d'un mélange complexe de composés organiques volatils (Thèse de doctorat, Pau).

**Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J. C., Bouizegarène, P., & Bogard, M. (2008).** Les techniques de séquençage de l'ADN: une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 23(5), 260-279.

**Larzul, D. (1989).** La PCR: principes et applications. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 4(4), 19-IN6.

**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.

**Lee, G. L. Y., Zakaria, N. N., Convey, P., Futamata, H., Zulkharnain, A., Suzuki, K., Abdul Khalil, K., Shaharuddin, N. A., Alias, S. A., Gonzalez-Rocha, G. & Ahmad, S. A. (2020).** Statistical optimisation of phenol degradation and pathway identification through whole genome sequencing of the cold-adapted antarctic bacterium, *Rhodococcus sp.* strain AQ5-07. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (24), 9363–9383.

**Lerat Serge., (1971).** Hassi Messaoud. In: *Cahiers d'outre-mer*. N° 93 - 24e année, Janvier-mars 1971. pp. 16-3.f

**Lestrangle, C., Paillard, C. A., & Zelenko, P. (2005).** Géopolitique du pétrole: un nouveau marché, de nouveaux risques, des nouveaux mondes. Editions Technip.

**Li, H., Meng, F., Duan, W., Lin, Y., & Zheng, Y. (2019).** Biodegradation of phenol in saline or hypersaline environments by bacteria: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 184, 109658.

**Lipińska, L., Klewicka, E., & Sójka, M. (2014).** The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(3), 289-299.

**Liu, Z., Liu, Y., Yang, H., Yang, Y., Shen, G., & Yu, R. (2005).** A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*, 533(1), 3-9.

**Loh, K. C., & Cao, B. (2008).** Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*—a review of proteomics studies. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(1), 1-12.

**Loh, K.C., Tan, C.P. (2000).** Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64:756-763.

**Long, X., Wang, D., Zou, Y., Tian, J., Tian, Y. & Liao, X. (2019).** Glycine betaine enhances biodegradation of phenol in high saline environments by the halophilic strain *Oceanobacillus* sp. PT-20. *Rsc Advances* 9 (50), 29205–29216.

**Lowry, M., Nagamani, A., Sreenivasulu, K., & Soligalla, R. (2009).** Isolation and characterization of phenol-degrading soil bacterium *Xanthobacter flavus*. *Bioremediation journal*, 13(1), 1-6.

## M

**Ma, L. L., Chu, S. G., Wang, X. T., Cheng, H. X., Liu, X. F., & Xu, X. B. (2005).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface soils from outskirts of Beijing, China. *Chemosphere*, 58(10), 1355-1363.

**Ma, Y., Li, L., Awasthi, M. K., Tian, H., Lu, M., Megharaj, M., ... & He, W. (2020).** Time-course transcriptome analysis reveals the mechanisms of *Burkholderia* sp. adaptation to high phenol concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(13), 5873-5887.

**Mailin, M., & Firdausi, R. (2006).** High performance phenol degrading microorganisms isolated from wastewater and oil-contaminated soil. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(2), 32-36.

**Margesin, R., & Schinner, F. (1997).** Effect of temperature on oil degradation by a psychrotrophic yeast in liquid culture and in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 24(3), 243-249.

**Margesin, R., & Schinner, F. (1999).** Biological decontamination of oil spills in cold environments. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 74(5), 381-389.

**Margesin, R., Bergauer, P., Gander, S. (2004).** Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant *Arthrobacter* sp. and mesophilic *Pseudomonas putida*. *Extremophiles*, 8:201-207.

**Margesin, R., Fonteyne, P. A., & Redl, B. (2005).** Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by *Rhodococcus* spp. and basidiomycetous yeasts. *Research in Microbiology*, 156(1), 68-75.

- Margesin, R., Moertelmaier, C., & Mair, J. (2013).** Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 185-191.
- Mariano, A. P., Bonotto, D. M., Angelis, D. D. F. D., Pirôllo, M. P. S., & Contiero, J. (2008).** Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 133-142.
- Marrot, B., Barrios, M.A., Moulin, P., Roche, N. (2005).** Experimental study of mass transfer phenomena in a cross flow membrane bioreactor: aeration and membrane separation. *Engineering in Life Sciences*, 5:409-414.
- Martin, F. (2011).** Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures: analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation (Thèse de doctorat, Université de Grenoble).
- McKew, B. A., Coulon, F., Osborn, A. M., Timmis, K. N., & McGenity, T. J. (2007).** Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental microbiology*, 9(1), 165-176.
- Michalowicz, J., & Duda, W. (2007).** Phenols--Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(3).
- Migeon, A., Richaud, P., Guinet, F., Chalot, M., & Blaudez, D. (2009).** Metal accumulation by woody species on contaminated sites in the north of France. *Water, Air, and Soil Pollution*, 204(1), 89-101.
- Mishra, V.K., Kumar, N. (2017).** Microbial degradation of phenol: A Review. *Journal of Water Pollution and Purification Research*, 4:2394-7306.
- Mizzouri, N. S. (2017).** Kinetic parameters of phenol biodegradation with different microorganisms: A review. *Journal of Duhok University*, 196-206.
- Mohammadi, S., Kargari, A., Sanaeepur, H., Abbassian, K., Najafi, A., & Mofarrah, E. (2015).** Phenol removal from industrial wastewaters: a short review. *Desalination and Water Treatment*, 53(8), 2215-2234.

**Mohammed, N., Allayla, R. I., Nakhla, G. F., Farooq, S., & Husain, T. (1996).** State-of-the-art review of bioremediation studies. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, 31(7), 1547-1574.

**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

**Mutzel, A., Reinscheid, U. M., Antranikian, G., & Müller, R. (1996).** Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* strain, that degrades phenol and cresols as sole carbon source at 70 C. *Applied microbiology and biotechnology*, 46(5), 593-596.

## N

**Nair, C.I., Jayachandran, K., Shashidhar, S. (2008).** Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology*, 7:1684-5315.

**Nogina, T., Fomina, M., Dumanskaya, T., Zelena, L., Khomenko, L., Mikhalovsky, S., ... & Gadd, G. M. (2020).** A new *Rhodococcus aetherivorans* strain isolated from lubricant-contaminated soil as a prospective phenol-biodegrading agent. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(8), 3611-3625.

## O

**O’Sullivan DJ, Ogara F. (1992).** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp involved in suppression of plant-root pathogens. *Microbiological Reviews* 56: 662-676f

**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. *Water Sa*, 36(5).

**Onaizi, S. A., & Alshabib, M. (2021).** The degradation of bisphenol A by laccase: Effect of biosurfactant addition on the reaction kinetics under various conditions. *Separation and Purification Technology*, 257, 117785.

**Onysko, K. A., Budman, H. M., & Robinson, C. W. (2000).** Effect of temperature on the inhibition kinetics of phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* Q5. *Biotechnology and bioengineering*, 70(3), 291-299.

**Ordoñez, R., Atarés, L., & Chiralt, A. (2022).** Biodegradable active materials containing phenolic acids for food packaging applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

## ***P***

**Pandian, P., Thekkumalai, M., Das, A., Goel, M., Asthana, A., & Ramanaiah, V. (2022).** Simulation of phenol and chlorophenol removal using combined adsorption and biodegradation: regression analysis and data-mining approach. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, 26(3), 04022015.

**Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A., Wackett, L.P., 2002.** Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4699–4709.

**Peng, F., Ye, M., Liu, Y., Liu, J., Lan, Y., Luo, A., ... & Song, H. (2022).** Comparative genomics reveals response of *Rhodococcus pyridinivorans* B403 to phenol after evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(7), 2751-2761.

**Pereira, M. D. S. (2004).** Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB): main sources, environmental behaviour and risk to man and biota. *Química Nova*, 27, 934-943.

**Perfumo, A., Rancich, I., & Banat, I. M. (2010).** Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. *Biosurfactants*, 135-145.

**Polymenakou, P. N., & Stephanou, E. G. (2005).** Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil Pseudomonad. *Biodegradation*, 16(5), 403-413.

**Pradeep, N.V., Anupama, S., Navya, K., Shalini, H.N., Idris, M., Hampannavar, U.S. (2015).** Biological removal of phenol from wastewaters: A mini review. *Applied Water Science*, 5:105-112.

**Pradhan, B., Murugavelh, S., Mohanty, K. (2012).** Phenol biodegradation by indigenous mixed microbial consortium: growth kinetics and inhibition. *Environmental Engineering Science*, 29:86-92.

**Pradhan, N., & Ingle, A. O. (2007).** Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. *International biodeterioration & biodegradation*, 60(2), 103-108.

**Priyadarshini, A., Sahoo, M. M., Raut, P. R., Mahanty, B., & Sahoo, N. K. (2021).** Kinetic modelling and process engineering of phenolics microbial and enzymatic biodegradation: A current outlook and challenges. *Journal of Water Process Engineering*, 44, 102421.

**Prpich, G.P., Daugulis, A.J. (2005).** Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid-liquid two phase partitioning bioreactor. *Biodegradation*, 16:329-339.

## R

**Rahman, A. S., Sugitani, N., Hatsu, M., & Takamizawa, K. (2003).** A role of xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. *Canadian journal of microbiology*, 49(1), 58-64.

**Rai, A., Gowrishetty, K. K., Singh, S., Chakrabarty, J., Bhattacharya, P., & Dutta, S. (2021).** Simultaneous bioremediation of cyanide, phenol, and ammoniacal-N from synthetic coke-oven wastewater using *Bacillus sp.* NITD 19. *Journal of Environmental Engineering*, 147(1), 04020143.

**Razan, F. (2011).** Une bactérie phytopathogène, *Pseudomonas syringae*, dans les réseaux d'irrigation de basse Durance. Isolement, caractérisation, diversité (Thèse de doctorat, Centre Universitaire de Formation et de Recherche Unimes, Nîmes, FRA.).

**Rivero, E. M. (2016).** Estudio de la expresión de proteínas de interés biotecnológico en el citoplasma y periplasma de *Escherichia coli* recombinante: utilidad de fuentes de carbono alternas.

## S

**Saitou, N., & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

**Santos, P.M., Benndorf, D., Sa• Correia, I. (2004).** Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol• jinduced stress by quantitative proteomics. *Proteomics*, 4:2640-2652.

**Santosh, K., Ramavadh, P. R., & Shanthakumar, S. P. (2018).** Isolation and characterization of phenol degrading bacteria *Stenotrophomonas sp.* SKC\_BP54. Research Journal of Biotechnology Vol, 13, 4.

**Sarwade, V. D., & Gawai, K. R. (2014).** Biodegradation of phenol by alkaliphilic *Bacillus badius* D1. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology, 8, 28-35.

**Schabereiter-Gurtner, C., Piñar, G., Lubitz, W., & Rölleke, S. (2001).** An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. Journal of Microbiological Methods, 45(2), 77-87.

**Schink, B., Philipp, B., & Müller, J. A. (2000).** Anaerobic degradation of phenolic compounds. Naturwissenschaften, 87(1), 12-23.

**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 Technologies and Environmental Policy, 16(1), 113-126.

**Seo, J.S., Keum, Y.S., Li, Q.X., (2009).** Bacterial degradation of aromatic compounds. Int. J. Environ. Res. Public. Health 6, 278–309.

**Shahryari, S., Zahiri, H.S., Haghbeen, K., Adrian, L., Noghabi, K.A. (2018).** High phenol degradation capacity of a newly characterized *Acinetobacter sp.* SA01: bacterial cell viability and membrane impairment in respect to the phenol toxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety, 164:455-466.

**Shourian, M., Noghabi, K. A., Zahiri, H. S., Bagheri, T., Karbalaee, R., Mollaei, M., ... & Abbasi, H. (2009).** Efficient phenol degradation by a newly characterized *Pseudomonas sp.* SA01 isolated from pharmaceutical wastewaters. Desalination, 246(1-3), 577-594.

**Shradha, P., & Ankush, M. (2010).** Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. Innovative Romanian Food Biotechnology, (7), 61-65.

**Singh, T., Bhatiya, A.K., Mishra, P.K., Srivastava, N. (2020).** An effective approach for the degradation of phenolic waste: phenols and cresols. In Abatement of Environmental Pollutants Elsevier, pp:203-243.

**Sivasubramanian, S., & Namasivayam, S. K. R. (2015).** Phenol degradation studies using microbial consortium isolated from environmental sources. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 243-252.

**Soltani, M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gramnégatives hydrocarbonoclastes variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie curie, Paris (France).

**Stegmann, R., Brunner, G., Calmanaw. 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.

**Subramaniam, K., Ahmad, S.A., Shaharuddin, N.A. (2020).** Mini review on phenol biodegradation in Antarctica using native microorganisms. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnolgy*, 28:77-89.

## *T*

**Takarada, H., Sekine, M., Kosugi, H., Matsuo, Y., Fujisawa, T., Omata, S., Kishi, E., Shimizu, A., Tsukatani, N., Tanikawa, S., Fujita, N. and Harayama, S. (2008).** Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. *J Bacteriol* 190, 4139–4146.

**Tam, L. T., Eymann, C., Albrecht, D., Sietmann, R., Schauer, F., Hecker, M., & Antelmann, H. (2006).** Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environmental microbiology*, 8(8), 1408-1427.

**Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004).** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30), 11030-11035.

**Tay, J.-H., Tay, S.T.-L., Liu, Y., Show, K.Y., Ivanov, V., 2006.** *Biogranulation Technologies for Wastewater Treatment: Microbial Granules*. Elsevier.

**Técher, D. (2011).** Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus X giganteus* (Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz).

**Tziotzios, G., Teliou, M., Kaltsouni, V., Lyberatos, G., Vayenas, D.V., 2005.** Biological phenol removal using suspended growth and packed bed reactors. *Biochem. Eng. J.* 26, 65–71.

## *U*

**Ucun, H., Yildiz, E., Nuhoglu, A. (2010).** Phenol biodegradation in a batch jet loop bioreactor (JLB): Kinetics study and pH variation. *Bioresource Technology*, 101:2965-2971.

## *V*

**Van der Meer JR, Devos WM, Harayama S, Zehnder AJB (1992).** Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56: 677-694.

**Van der Meer JR, Sentchilo V (2003).** Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 248-254.

**Van Schie, P. M., & Young, L. Y. (2000).** Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Bioremediation Journal*, 4(1), 1-18.

**Veenagayathri, K., & Vasudevan, N. (2010).** Effect of pH, nitrogen sources and salts on the degradation of phenol by the bacterial consortium under saline conditions. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 6(5), 783-792.

**Vermeris, W., & Nicholson, R. (2007).** Phenolic compound biochemistry. Springer Science & Business Media.

**Viggiani, A., Olivieri, G., Siani, L., Di Donato, A., Marzocchella, A., Salatino, P., ... & Galli, E. (2006).** An airlift biofilm reactor for the biodegradation of phenol by *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Journal of Biotechnology*, 123(4), 464-477.

## *W*

**Wakleham S.G., Schaffner C. et Giger W. (1980).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments-I. Compounds having anthropogenic origins. *Geochim.Cosmochim. Acta* 44,403-413.

**Wang, F., Hu, Y., Guo, C., Huang, W., & Liu, C. Z. (2012).** Enhanced phenol degradation in coking wastewater by immobilized laccase on magnetic mesoporous silica nanoparticles in a magnetically stabilized fluidized bed. *Bioresource technology*, 110, 120-124.

**Wang, W., Han, H., Yuan, M., Li, H., Fang, F., Wang, K. (2011).** Treatment of coal gasification wastewater by a two-continuous UASB system with step-feed for COD and phenols removal. *Bioresource Technology*, 102:5454-5460.

**Waterhouse A., (2010).** Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine, *Methods in Enzymology* pp 152-178.

**Woolard, C. R., & Irvine, R. L. (1995).** Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water research*, 29(4), 1159-1168.

**Wu, L., Ali, D. C., Liu, P., Peng, C., Zhai, J., Wang, Y. & Ye, B. (2018).** Degradation of phenol via ortho-pathway by *Kocuria sp.* strain TIBETAN4 isolated from the soils around Qinghai Lake in China. *Plos One* 13 (6), e0199572

## Y

**Yadav, B. K., & Hassanizadeh, S. M. (2011).** An overview of biodegradation of LNAPLs in coastal (semi)-arid environment. *Water, Air, & Soil Pollution*, 220(1), 225-239.

**Yeom, S.H., Kim, S.H., Yoo, Y.J., Yoo, I.S. (1997).** Microbial adaptation in the degradation of phenol by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 14:37-40.

**Yinghui, Ma., Lijun, Li., Mukesh Kumar, A., Haixia, T., Meihuan, L., Mallavarapu, M., Yalei, P., Wenxiang, H. (2020).** Time-course transcriptome analysis reveals the mechanisms of *Burkholderia sp.* adaptation to high phenol concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

**Yotinov, I., Belouhova, M., Foteva, A., Dinova, N., Todorova, Y., Schneider, I., ... & Topalova, Y. (2022).** Application of Nanodiamonds in Modelled Bioremediation of Phenol Pollution in River Sediments. *Processes*, 10(3), 602.

## Z

**Zache, G., Rehm, H.J. (1989).** Degradation of phenol by a coimmobilized entrapped mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30:426-432.

**Zaher AL BARAKEH., (2012).** Suivi de pollution atmosphérique par système multi-capturs – méthode mixte de classification et de détermination d'un indice de pollution. Ecole Nationale Supérieure des Mines, Saint Etienne (Thèse).

**Zambrano, C., Kotogán, A., Bencsik, O., Papp, T., Vágvölgyi, C., Mondal, K. C., ... & Takó, M. (2018).** Mobilization of phenolic antioxidants from grape, apple and pitahaya residues via solid state fungal fermentation and carbohydrase treatment. *LWT*, 89, 457-465.

**Zhai, Z., Wang, H., Yan, S., & Yao, J. (2012).** Biodegradation of phenol at high concentration by a novel bacterium: *Gulosibacter* sp. YZ4. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(1), 105-111.

**Zhang, H., Kallimanis, A., Koukkou, A.I., Drainas, C. (2004).** Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65:124-131.

**Zhang, J., Zhou, X., Zhou, Q., Zhang, J., & Liang, J. (2022).** A study of highly efficient phenol biodegradation by a versatile *Bacillus cereus* ZWB3 on aerobic condition. *Water Science and Technology*, 86(2), 355-366.

**Zhang, Y., Lu, D., Ju, T., Wang, L., Lin, S., Zhao, Y., ... & Du, Y. (2013).** Biodegradation of phenol using *Bacillus cereus* WJ1 and evaluation of degradation efficiency based on a graphene-modified electrode. *Int J Electrochem Sci*, 8(1), 504-519.

**Zhao, G., Li, Y., Liu, X., Liu, X. (2010).** Preparation of capsules containing 1-nonanol for rapidly removing high concentration phenol from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 175:715-725

### **Webographie**

**Base de donnée NCBI “nucléotides” :**

[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

**EPA:** . <https://www.epa.gov>

**Google Earth:** <https://www.google.com/intl/fr/earth/>

Programme Graph Pad: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) Programme MEGA11: <https://www.megasoftware.net/>



- **Composition du Milieu LB (Luria Bertani)** (En raison de grammes par litre d'eau distillée) :

Peptone ..... 10  
Extrait de levure .....5  
NaCl.....10  
Agar ..... 15

- Autoclavé à 120°C/1B pendant 20 à 30 min. pH ajusté à 7,4

- **Composition du bouillon nutritif** (En raison de grammes par litre d'eau distillé) :

Peptone trypsine ..... 15  
Extrait de viande..... 3  
Extrait de levure ..... 1  
Nacl..... 15

- Autoclavé à 120°C/1B pendant 20 à 30 min. pH ajusté à 7,4

- **Composition du milieu Chapman** (en raison de g/L d'eau distillé)

Peptone ..... 11  
Extrait de viande..... 1  
Chlorure de sodium ... 75  
Mannitol.....10  
Agar ..... 15  
Rouge de phénol ... 0,025

- Autoclavé à 120°C/1B pendant 20 à 30 min. pH ajusté à 7,4 - 7,5

- **Composition du milieu Héктоen** (en raison de grammes par litre d'eau distillé).

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

- Le milieu est non-autoclavable.

➤ **Composition du milieu King A** (en raison de grammes par litre d'eau distillé)

Peptone de gélatine.....	20
Glycérol .....	10
Sulfate de potassium anhydre ...	10
Agar .....	15

pH 7,2

➤ **Composition du milieu King B** (en raison de grammes par litre d'eau distillé)

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

pH 7,2

➤ **Solution de phénol**

La solution de phénol utilisée est en raison de 0,1% en mettant 0,1g du phénol dans 10 ml d'eau distillée stérile. La solution est renouvelée chaque un mois.

➤ **Réactif de folin ciocalteu**

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

➤ **Solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**

20 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans 100 ml d'eau distillée stérile, la préparation doit subir une agitation mécanique à l'aide d'un agitateur vortex jusqu'à solubilisation de la poudre. La conservation de la solution est faite dans un flacon en verre sombre ou emballé au papier aluminium. La solution est renouvelée chaque 15 jours ou en cas de précipitation.

**Tableau 01** : Résultats de l'identification préliminaire des isolats E1, S4 et S9.

Tests biochimiques		<b>E1</b>	<b>S4</b>	<b>S9</b>
	Gram	+	-	+
	Glucose	+	+	-
	Saccharose	+	-	-
	Manitol	+	-	-
	Mobilité	-	+	-
	Arabinose	/	+	/
	Melrose	/	+	/
	ONPG	-	-	-
	H <sub>2</sub> S	-	-	-
	Sorbitol	/	-	/
	CIT	+	+	+
	VP	/	-	/
	Inositol	/	-	/
	Rhamnose	/	+	/
	Amgdaline	/	-	/
	LDC	+	-	-
	ODC	+	-	-
	ADH	-	+	-
	Uréase	/	+	/
	TDA	/	+	/
	Indole	/	+	/
Enzymes respiratoires	Catalase	+	+	+
	Oxydase	-	+	-
Croissance sur milieux sélectifs	King A	/	+	/
	King B	/	+	/
	Héktoen	-	+	-
	Chapman	+	-	+

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

**Tableau 02:** Taux de biodégradation de différentes concentrations initiales de phénol exprimés en pourcentage (%). Moy: moyenne ; ET : écart type ; n=2

Temp s(h)	50 mg/L		100 mg/L		150 mg/L		200 mg/L		300 mg/L		500 mg/L		Cultures témoins	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Mo y	ET
0	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	1.91	0	0	0	0	0	0
8	10.25	4.85	21.87	4.00	1.87	0.34	10.37	3.65	2.04	2.64	1.12	0.75	0	0
24	65.15	2.36	43.1	2.34	34.05	3.45	19.27	3.98	19.84	1.15	20.81	0.14	0	0
28	83.84	4.24	49.71	0.85	38.02	0.57	34.55	6.15	36.42	4.16	45.95	2.67	0	0
30	100	0	52.24	0.70	39.35	0.075	39.8	1.29	66.64	0.24	54.60	0.67	0	0
32			83.01	22.49	41.66	0.67	42.94	1.58	67.89	0.18	60.49	0.33	0	0
48			92.03	1.01	81.91	0.72	75.21	2.12	88.37	1.28	84.69	0.61	0	0
50			100	/	89.66	2.57	78.19	0.52	90.25	0.20	86.53	0.29	0	0
52					100	4.25	100	/	92.21	5.36	90.70	0.22	0	0
54									100	/	92.91	2.80	0	0

**Tableau 03 :** Taux de biodégradation de phénol sous différentes températures d'incubations exprimés en pourcentage (%). Moy : moyenne. ET : écart type. N=2

Temps (h)	20°C		25°C		30°C		49°C		37°C		Cultures témoins	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	Moy	ET	ET	Moy	ET	Moy	ET
0	0	/	0	/	0	0	/	/	0	/	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	1.94	0.82	18.77	0.48	0.68	1.51	9.14	8.52	0	0
8	17.02	1.23	19.35	0.68	32.68	0.48	/	8.80	30.62	10.96	0	0
24	68.28	4.21	69.06	1.92	82.17	3.61	/	1.95	87.62	2.61	0	0
26	77.91	2.33	77.14	4.26	87.40	3.65	/	0.17	90.88	1.25	0	0
28	81.87	1.58	87.89	2.06	92.09	3.65	/	0.23	92.84	1.18	0	0

**Tableau 04 :** Taux de biodégradation de différentes températures d'incubations exprimés en pourcentage (%). Moy: moyenne ; ET : écart type ; n=2

Temps (h)	pH 5		pH 6		pH 7		pH 8		pH 9		Cultures témoins	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	6.36	4.66	0.90	0.38	10.63	4.23	11.08	2.14	0	0
8	0.83	0.46	8.31	1.84	7.56	2.82	13.01	2.12	14.89	0.45	0	0
24	7.81	3.18	19.06	3.54	14.28	2.51	32.25	1.60	52.98	2.61	0	0
28	7.81	3.18	22.08	3.56	18.11	2.11	39.65	1.37	53.38	2.45	0	0

**Tableau 05 :** Taux de biodégradation de phénol sous différents vitesse d'agitation exprimés en pourcentage (%). Moy: moyenne ; ET : écart type ; n=2

Temps (h)	0 rpm		150 rpm		250 rpm		Cultures témoins	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	4,93	1,51	0	0
6	3,75	0,32	5,59	0,04	7,98	0,82	0	0
8	15,73	2,39	21,82	2,51	33,35	1,28	0	0
24	22,79	3,21	39,9	1,69	95,1	1,32	0	0

**Tableau 06 :** Taux de biodégradation de phénol avec et sans aération exprimés en pourcentage (%). Moy: moyenne ; ET : écart type ; n=2

temps (H)	avec aération		sans aération		Cultures témoins	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
0	0	0	0	0	0	0
4	80,309	1,415	3,53	1,484	0	0
6	96,147	0,555	15,949	2,080	0	0
8	100	0	35,88	0,480	0	0
24	100	0	98,92	0,565	0	0

**Tableau 06 :** Phénol résiduel en (mg/L) consommé par la culture mixte sous différents pH. Moy: moyenne ; ET : écart type ; n=3

Temps(h)	pH 5		pH 6,5		pH 7		pH 8		pH 9	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
0	200	0	200	0	200	0	200	0	200	0
2	112,86	8,63	163,71	3,14	115,60	11,28	147,66	5,96	155,86	13,27
4	71,00	15,5	93,63	37,15	108,37	7,57	133,54	4,34	139,28	9,98
6	62,15	9,13	83,94	24,81	69,10	6,88	89,14	23,42	95,10	28,87
8	43,70	7,58	67,57	16,25	48,79	4,01	77,29	9,32	61,60	52,10
15	12,42	19,05	32,53	38,02	0,44	0,38	43,41	38,98	60,13	49,96
17	7,25	12,56	15,28	24,62	0	0	14,58	25,26	60,13	49,96

**Tableau 07 :** Phénol résiduel en (mg/L), consommé par la culture mixte sous différentes température. Moy: moyenne ; ET : écart type ; n=3

temps (h)	22°C		30°C		37°C		47°C	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
0	200	0	200	0	200	0	200	0
2	180,84	6,78	141,70	2,54	140,45	1,39	161,58	10,64
4	124,71	41,50	78,93	1,77	106,56	8,74	138,37	12,64
6	110,69	34,52	72,67	1,17	93,58	11,38	129,73	13,0
8	98,27	24,32	56,36	4,42	82,99	11,59	120,13	24,73
14	56,68	49,36	12,7	18,60	34,08	34,11	119,27	26,06
17	29,32	37,94	0	0	10,08	17,47	119,27	26,06

**Tableau 08 :** Phénol résiduel en (mg/L) à chaque temps de lecture, consommé par la culture mixte (cellules non-adaptés)

temps (H)	300 mg/L	500 mg/L	700 mg/L	1000 mg/L	1200 mg/L	1300 mg/L
0	300	500	700	1000	1200	1300
2	287,603	437,424	689,12	1000	1200	1300
4	158,677	394,896	491,942	1000	1200	1300
6	128,453	340,218	451,208	1000	1200	1300
8	114,049	109,67	410,474	921,82	1200	1300
21	0	0	378,13	679,6	1200	1300
24			230,304	609,2	1200	1300
29			149,462	530,4	1200	1300
44			0	382,8	1200	1300
49				304,8	1200	1300
52				0	1200	1300

**Tableau 09 :** Biodégradation de 1000 mg/L par le consortium. Moy: moyenne ; ET : écart type ; n=3.

temps (h)	Consortium adapté à 300 mg/L		Consortium adapté à 500 mg/L		Consortium adapté à 700 mg/L	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
0	1000	0	1000	0	1000	0
2	903,406	96,94	820,50	101,42	890,30	97,58
4	878,46	67,38	705,24	49,53	868,91	64,60
6	786,83	53,94	617,43	91,55	806,90	62,07
8	641,5	41,60	589,26	55,66	754,58	43,30
18	230,13	75,00	163,28	49,81	213,28	65,65
20	102,42	34,99	22,67	39,26	108,85	64,79
22	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0

**Tableau 09** : Biodégradation de 1200 mg/L par le consortium. Moy: moyenne ; ET : écart type ; n=3.

temps (h)	Voie d'adaptation 300→1000		Voie d'adaptation 500→1000		Voie d'adaptation 700→1000		Voie d'adaptation 1000→1000	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
0	1200	0	1200	0	1200	0	1200	0
2	926,301667	76,5598218	1002,80067	65,0344872	1034,66667	34,7808242	998,259	121,704632
4	870,403333	114,430725	995,852	75,9995068	964,734333	37,2955012	921,409333	70,8697033
14	388,671	68,5674381	212,700333	49,1588307	347,587	74,2316962	564,2277	130,10425
16	248,557333	71,0070415	143,683333	79,2806666	296,813	79,8699276	444,085667	137,673601
18	188,580333	60,0522431	23,14	20,7067638	199,757667	81,8578772	301,841	33,5063397
20	76,32	66,2480702	0	0	59,68	53,1980902	156,278667	43,818576
22	44,6166667	39,9134718	0	0	0	0	78,8413333	20,6645238
24	7,69666667	13,3310177	0	0			32,9206667	19,1039431

**Tableau 10** : Biodégradation de 1300 mg/L par le consortium. Moy: moyenne ; ET : écart type ; n=3.

temps (h)	Voie d'adaptation 300→1000→1200		Voie d'adaptation 500→1000→1200		Voie d'adaptation 700→1000→1200		Voie d'adaptation 1000→1000→1200	
	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
0	1300	0	1300	0	1300	0	1300	0
2	1223,655	25,8352993	1259,47667	36,603264	1228,211	39,0129273	1284,31567	17,7307345
4	1082,2	46,1077792	1157,59533	46,4886802	1176,37033	27,8790244	1168,96833	47,9585489
6	848,111667	74,4611443	926,630667	52,7800106	1108,32633	37,6995381	808,824	31,9533214
22	519,127	44,5213845	134,196667	117,007861	557,667667	34,996964	774,590667	33,6151924
24	497,601333	69,9938342	46,3966667	58,5706943	369,172	47,9813044	664,685	42,5050318
28	182,642333	39,833655	0	0	299,433333	46,3052117	593,927333	47,7297838
30	58,9196667	16,6184501	0	0	190,136667	61,0736722	468,200667	12,0052606
46	0	0	0	0	0	0	312,794333	24,6911348
48	0	0	0	0	0	0	306,045	44,6913854
52	0	0	0	0	0	0	234,666667	57,4727712

**Tableau 11:** Les résultats du test de comparaisons multiples de Tukey de différents échantillons de dégradation de fortes concentrations de phénol

	<b>Le modèle de comparaison</b>	<b>Moyenne différence</b>	<b>q</b>	<b>Résumé</b>	<b>P-value</b>
Biodégradation d'une concentration initiale de 1000mg/L	A-B	-6.937	0.5646	ns	0.9781
	A-C	1.112	0.09049	ns	>0.999
	A-D	33.51	2,727	ns	0.2366
	B-C	8.049	0.6551	ns	0.9665
	B-D	40.45	3.292	ns	0.1128
	C-D	32.40	2.637	ns	0.2632
	Biodégradation d'une concentration initiale de 1200mg/L	A-B	-3.453	0.2982	ns
A-C		1.408	0.1216	ns	>0.999
A-D		6.914	0.5970	ns	0.9931
A-E		63.42	5.476	**	0.0034
B-C		4.862	0.4198	ns	0.9982
B-D		10.37	0.8952	ns	0.9688
B-E		66.87	5.774	**	0.0018
C-D		5.506	0.4754	ns	0.9971
C-E		62.01	5.354	**	0.0043
D-E	56.50	4.879	*	0.0110	
Biodégradation d'une concentration initiale de 1300mg/L	A-B	-6.210	0.5864	ns	0.9936
	A-C	3.616	0.3415	ns	0.9992
	A-D	15.42	1.456	ns	0.8405
	A-E	60.05	5.671	**	0.0018
	B-C	9.825	0.9278	ns	0.9647
	B-D	21.63	2.042	ns	0.6027
	B-E	66.26	6.257	***	0.0005
	C-D	11.80	1.115	ns	0.9329
	C-E	56.44	5.330	**	0.0038
D-E	44.64	4.215	*	0.0343	

Remarque : ns : Non significatif  $P > 0,05$ , \* :  $P < 0,05$ , \*\* :  $P < 0,01$  et \*\*\* :  $P < 0,001$  ; A : le point de départ de l'adaptation est de 300 mg/L, B : le point de départ de l'adaptation est de 500 mg/L, C : le point de départ de l'adaptation est de 700 mg/L, D : le point de départ de l'adaptation est de 1 000 mg/L, E : Cellules non adaptées.