

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT  
كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

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

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Microbiologie Appliquée*

### THEME

---

# Isolement et identification des bactéries à partir du sol pollué par les dérivés du pétrole et biodégradabilité du phénol

---

### Présenté par :

M<sup>me</sup>. TAOUTI Khadidja

M<sup>lle</sup>. TERBAH Kaouther

M<sup>lle</sup>. ZEGHOUDI Bouchra

### Devant le jury composé de :

Président :	M. BENACEUR Farouk	MCB	Université Amar Télidji-Laghouat
Examineur :	M. MESSAOUDI Omar	MAA	Université Amar Télidji-Laghouat
Rapporteur :	M. GOUZI Hicham	Prof	Université Amar Télidji-Laghouat
Co-Rapporteur :	M <sup>me</sup> REZZOUG Asma	Doctorante	Université Amar Télidji-Laghouat

Soutenu publiquement le, 20 Juin 2019

## *Dédicaces*

*J'ai l'honneur de dédier ce travail :*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir,*

*à toi mon père.*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.*

*Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

*A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon mari AILAL LACHKHEM , et bien sur A mes frères MOHAMED et KHALIL,*

*Et a mes sœurs AICHA HIBA AYA ANFAL sans oublié ma grand-mère ;et mes beaux-parents que j'aime. A toute ma famille ( TAOUTI. GUEDDOUDA .LACHKHEM ),*

*A mon trinôme kaouthar et bouchra et à mes amies abir imane Et a toute mes amis de la promotion Microbiologie Appliquée*

*Khadija*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A celui qui l'a créé, ALLAH, le tout puissant, le miséricordieux.*

*A*

*Mes très chers parents.*

*En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect.*

*Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien tout au long de ma scolarité, pour tous vos sacrifices.*

*A*

*Mon fiancé M'hammed ,*

*Pour son soutien et son amour indéfectible. Je leur dédie cette thèse.*

*A*

*Mes proches, toute ma famille , mes soeurs Dehiba ,Souad ,Nourelhouda et mes frères Atalla et Abdelkader .*

*Merci d'être toujours à mes côtés.*

*A*

*Mes amies*

*Kadidja ,Bochra ,Fadhila ,Aicha ,Siham reçoivent à travers ce travail tout mon respect, ma gratitude et ma profonde reconnaissance.*

*Kaouthar*

## *Dédicaces*

*J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail à  
À toute ma grande famille sans exception  
À toutes mes amies sans exception.  
Egalement à tous ceux qui ont une place dans mon cœur*

*Bushra*

## Remerciements

**A**vant tout, nous remercions **ALLAH** de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour achever ce modeste travail.

En guise de reconnaissance, nous voudrions remercier toutes les personnes qui, par leurs conseils, leur collaboration, leur soutien moral et leur amitié, ont contribué à la réalisation et à l'achèvement de ce travail.

Nous voudrions dire un grand merci à notre directeur de thèse Monsieur **GOUZI Hicham**, Enseignant-Chercheur à l'Université Amar Tlidi, pour son aide précieuse, sa présence et sa compréhension.

Nous tenons à remercier chaleureusement Messieurs Benaceur Farouk et Messaoudi Omar d'avoir accepté de présider et d'examiner notre travail.

Merci à tous les membres de laboratoire de microbiologie et à M<sup>me</sup> **REZZOUGUE Asma** et M<sup>lle</sup> **Bouchouireb Hasna** et M<sup>me</sup> **KHACHBA** pour donner un environnement de travail agréable grâce à leur présence, leur bonne humeur et leur soutien.

Au personnels du laboratoire de Biologie, du Département de Biologie de l'Université Amar Tlidi Laghouat, qui nous ont donné la chance de travailler sous sa direction, dont les encouragements et les conseils nous ont permis de réaliser ce travail.

Enfin, nous remercions toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

*Merci à toutes et à tous*



## **Isolement et identification des bactéries à partir du sol pollué par les dérivés du pétrole**

**Résumé.** Le sol constitue un milieu naturel d'isolement de microorganismes ayant des applications biotechnologiques très intéressantes à savoir la dégradation des polluants chimique. Pour cela, l'objectif de ce travail est de connaître la flore bactérienne du sol contaminé par les dérivés du pétrole pour les utiliser dans la dégradation du phénol en solution. Le sol est prélevé au niveau de quelques stations de service des carburants situées dans la Wilaya de Laghouat. Des isolats bactériens ont été obtenus après repiquage successif sur milieu Muller-Hinton Agar. Sur l'ensemble des bactéries purifiées seulement (63%) sont capables d'utiliser le phénol comme source de Carbone pour leur croissance.

Les bactéries ont été identifiées grâce à leur caractéristiques morphologiques et biochimiques. *Pseudomonas sp.* (57%) est le genre le plus abondant suivi celui de *Klebsiella Pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Serratia sp* (14%).

Les résultats du test de la biodégradabilité du phénol montrent que *Pseudomonas sp.* Possède le pouvoir de gradation du phénol le plus élevé par rapport aux autres bactéries. Les bactéries du sol en particulier *Pseudomonas sp.* peuvent être utilisées au niveau des stations d'épuration des eaux et des sols contaminés par le phénol.

**Mots clés :** Sol, Station de service, *Pseudomonas*, identification, dégradation, phénol.

## **Isolement et identification des bactéries à partir du sol pollué par les dérivés du pétrole**

**Résumé.** Le sol constitue un milieu naturel d'isolement de microorganismes ayant des applications biotechnologiques très intéressantes à savoir la dégradation des polluants chimique. Pour cela, l'objectif de ce travail est de connaître la flore bactérienne du sol contaminé par les dérivés du pétrole pour les utiliser dans la dégradation du phénol en solution. Le sol est prélevé au niveau de quelques stations de service des carburants situées dans la Wilaya de Laghouat. Des isolats bactériens ont été obtenus après repiquage successif sur milieu Muller-Hinton Agar. Sur l'ensemble des bactéries purifiées seulement (63%) sont capables d'utiliser le phénol comme source de Carbone pour leur croissance.

Les bactéries ont été identifiées grâce à leur caractéristiques morphologiques et biochimiques. *Pseudomonas sp.* (57%) est le genre le plus abondant suivi celui de *Klebsiella Pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Serratia sp* (14%).

Les résultats du test de la biodégradabilité du phénol montrent que *Pseudomonas sp.* Possède le pouvoir de gradation du phénol le plus élevé par rapport aux autres bactéries. Les bactéries du sol en particulier *Pseudomonas sp.* peuvent être utilisées au niveau des stations d'épuration des eaux et des sols contaminés par le phénol.

**Mots clés :** Sol, Station de service, *Pseudomonas*, identification, dégradation, phénol.

# Table des matières

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	IV
Liste d'abréviations .....	V
Liste des figures .....	VII
Liste des tableaux .....	VIII
Introduction .....	1
<b>Partie I : Synthèse Bibliographique</b>	
1. Pollution des sols .....	2
2. Les microorganismes du sol.....	2
2.1 Les champignons.....	3
2.2 Algues et protozoaires.....	3
2.3 Bactéries.....	3
2.3.1 Les Gammaprotéobactéries.....	4
2.3.2 Les Sphingomonades.....	4
2.3.4 Les Betaprotéobactéries .....	5
2.3.5 Les Actinobactéries.....	5
3. Exemples de polluants organiques dans les sols.....	7
3.1 Les hydrocarbures.....	7
3.1.1 Impact des hydrocarbures sur l'environnement.....	7
3.2 Le phénol.....	7
3.2.1 Utilisation.....	8
3.2.2 Toxicologie aigue.....	9
4. Biodégradation du phénol et autres polluants organiques.....	9
4.1 Principe de la biodégradation.....	9
4.1.1. Les facteurs influençant la biodégradation.....	9
4.1.2. Structure et nature du sol.....	9
4.1.3. Composition chimique des hydrocarbures.....	10
4.2 Les différents types de biodégradation des polluants organiques.....	10
4.2.1 Biodégradation aérobie.....	10
4.2.2 Biodégradation anaérobie .....	11
4.3. Biodégradation des hydrocarbures .....	12
4.3.1..Biodégradation aérobie du phénol .....	13
4.3.2.Biodégradation anaérobie du phénol.....	14
<b>Parti II : Matériel et Méthodes</b>	
1. Matériel.....	16
1.1 Site du prélèvement des échantillons .....	16
2. Analyse microbiologique .....	18
2.1. Préparation de la solution mère .....	18
2.2 Isolement et purification des souches bactériennes .....	18
2.3 Purification.....	18
2.4 Conservation des souches purifiées.....	19
3. La Biodégradation.....	19
3.1 Etude de la biodégradation du phénol dans une culture minérale.....	19
3.2 Lecture des résultats .....	20
4. Identification.....	21
4.1 Etude morphologique.....	21
4.1.1 Aspect macroscopique.....	21
4.1.2 Aspect microscopique .....	21
4.1.2.1 Coloration de Gram.....	21
4.1.2.2 Test à la potasse (solution aqueuse à 3 % de KOH).....	22

# Table des matières

4.2 Analyses biochimiques.....	22
4.2.1 Etude des enzymes respiratoires.....	22
4.2.1.1 Recherche de la cytochrome-oxydase.....	22
4.2.1.2 Recherche de la catalase.....	22
4.2.2 Métabolisme des glucides.....	23
4.2.2.1 Production de la B-galactosidase.....	23
4.2.2.2 Recherche de Citrate perméase.....	23
4.2.2.3 L'étude de la voie d'attaque des glucides.....	24
4.2.2.4 Hydrolyse de l'esculine.....	24
4.2.3 Test Mannitol mobilité.....	24
4.2.4 Étude du métabolisme protéique.....	24
4.2.4.1 Recherche des décarboxylases (ODC, LDC, ADH).....	24
4.2.4.2 Recherche de l'uréase.....	24
4.2.4.3 Milieu TSI (glucose-lactose –saccharose –H <sub>2</sub> S).....	25
4.2.4.4 Production d'indole.....	25
4.2.4.5 Recherche de la tryptophane-désaminase (TDA).....	25
5 Sélection des bactéries par utilisation de milieux de culture spécifiques.....	26
5.1 Croissance sur Cétrimid agar.....	26
5.2 Mise en évidence de la production de pigments spécifiques.....	26
5.3 Milieu de Chapman .....	26
6. Test coagulase.....	26
7. API20E (bioMérieux).....	26
<b>Partie III : Résultats et discussion</b>	
1. Test de biodégradabilité du phénol .....	28
2. L'étude morphologique.....	29
2.1 Aspect macroscopique.....	29
2.2 Aspect microscopique des souches isolées.....	30
2.3. Caractéristiques biochimiques des bacteries isolées.....	32
2.3.1. <i>Pseudomonas</i> .....	33
2.3.2. <i>Klebsiella</i> .....	35
2.3.3. <i>Serratia</i> .....	36
2.3.4. <i>Staphylococcus</i> .....	37
<b>Conclusion</b> .....	39
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>40</b>
<b>Annexe</b>	

## Liste des abréviations

ADH : Arginine Dihydrolase.

API 20 E: Appareillage et Procédé d'identification 20 test des Entérobactéries.

ATCC : American type cultur collection.

CIT : Citrate perméase.

COV : Les composés organiques volatils .

DO : Densité optique.

Glu : Glucose .

GN : Gélose Nutritive.

HAP : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques .

H<sub>2</sub>S : Hydrogen Sulfide .

IND : INDOLE .

ISO : Organisation internationale de normalisation.

KOH :Potassium Hydroxide .

LDC : Lysine Décarboxylase.

MEVAG : Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides .

MH : Mulleur-Hinton .

Ml : millilitre.

Mg : milligramme.

MM : Milieu Minerale agar .

ODC : Orthinine Décarboxyalase.

ONPG : Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside.

PCB :Les polychlorobiphényles.

PCDD : Les polychlorodibenzo-dioxines .

## Liste des abréviations

PCDF : polychlorodibenzo-furanes.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

S : Souche.

TCA : Acide tri-carboxylique.

TDA : Tryptophane Desaminase.

TINIA : Turbidimetric Inhibition ImmunoAssay .

TSI : Triple Sugar Iron.

t/m : Tour par Minute.

μL : Microlitre.

VP : Voger- PoosKauer.

## *Liste des figures*

---

<b>Figure01</b> : Structure chimique du phénol.....	7
<b>Figure02</b> : Dégradation aérobie de la matière organique .....	11
<b>Figure03</b> : Dégradation anaérobie de la matière organique.....	11
<b>Figure 04</b> :Principe de la biodégradation aérobie des hydrocarbures.....	12
<b>Figure 05</b> : Mécanismes de dégradation des HAP.....	13
<b>Figure 06</b> : Voie métabolique de dégradation du phénol via une phosphorylation.....	14
<b>Figure 07</b> : La biodégradation de phénol par <i>Pseudomonas putida</i> en condition aérobie..	15
<b>Figure0 8</b> : Localisation de site des prélèvements.....	16
<b>Figure 09</b> : Les solutions mères des sols prélevés.....	18
<b>Figure 10</b> : Méthode d'ensemencement des bactéries sur milieu solide en suivant Les étapes dans l'ordre 1, 2, 3,4. ....	19
<b>Figure 11</b> : Agitation des flacons au niveau d'un agitateur placé dans une étuve à 37°C..	20
<b>Figure 12</b> : Résultats du dosage colorimétrique du phénol après incubation des bactéries isolées à 37°C pendant 48 heures. ....	27
<b>Figure 13</b> : Résultats de tolérance des bacteries au phénol (200 mg/L).....	27
<b>Figure 14</b> : Aspect macroscopique des colonies isolées.....	28
<b>Figure15</b> :Aspects macroscopiques (a) et microscopiques (b) des souches S1, S2 ,S7et S8.....	30
<b>Figure16</b> :Aspects macroscopiques (a) et microscopiques (b) des souches S9, S10 et S11.....	30
<b>Figure 17</b> : L'aspect macroscopique (a : King A, b : King B) et (c )microscopique (d) de l'isolat S1.....	32
<b>Figure 18</b> : L'aspect macroscopique (a : King A, b : King B) et C microscopique (d) de <i>P. fluorescens</i> .....	33
<b>Figure 19</b> : l'identification de <i>P.f fluorescens</i> par galerie API 20 E.....	33
<b>Figure 20</b> : l'aspect macroscopique(a) et microscopique (b) de <i>klebsiella pneumoniae</i> ....	34
<b>Figure21</b> : Confirmation les résultats d'identification <i>Klebsiella pneumonia</i> par logicielle LABO EN LINGE2009.....	35
<b>Figure22</b> : l'identification de souche 10 par galerie classique de <i>Serratia</i> .....	36
<b>Figure 23</b> : Aspect des colonies microscopique (a) et macroscopique (b) de <i>S. aureus</i> sur milieu Chapman et Résultat du test de coagulase libre (c).....	37

## *Liste des tableaux*

---

<b>Tableau01</b> : Principaux genres bacteriens degradants isoles a partir du sol. ....	6
<b>Tableau02</b> : Les caracteristiques des echantillons des sols prelevés...	17
<b>Tableau 03</b> : Aspect macroscopique des colonies isolees.....	28
<b>Tableau 04</b> : Aspects microscopiques des souches isolees.....	29
<b>Tableau 05</b> : Resultats des tests biochimiques de l'isolat S1, S2, S7, S8, S9, S11.....	31

# Introduction

Le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux. Le rejet des hydrocarbures d'origine pétrolière entraîne le plus souvent la prolifération des microorganismes aptes à dégrader les hydrocarbures, de plus la communauté microbienne du sol semble présenter de fortes capacités de résistance et/ou d'adaptation : elle supporte souvent l'arrivée de polluants toxiques (**Amellel et al., 2001**). Les bactéries ont un pouvoir de synthétiser des biomolécules appelées biosurfactants, qui ont des propriétés fonctionnelles, leur permettant d'utiliser ces hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Ces biosurfactants servent à plusieurs applications comme la remédiation biologique, les applications cosmétiques, détergentes ou émulsifiantes pour l'industrie alimentaire ainsi que dans beaucoup d'applications industrielles et environnementales grâce à leur biodégradation et l'absence de toxicité.

Plusieurs espèces microbiennes sont recensées et qualifiées aptes à dégrader des hydrocarbures telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium spp*, *Haemophilus spp*, *Rhodococcus spp*, *Paenibacillus spp* (**Haritash et Kaushik , 2009**). Il est donc nécessaire de trouver des outils capables d'aborder de manière aussi globale et intégrée que possible ces problèmes, dans le souci d'améliorer les connaissances et le contrôle des phénomènes mis en cause. L'étude de la biodégradation des hydrocarbures dans le sol est essentielle pour déterminer son potentiel polluant et donc son impact sur l'environnement. Un grand nombre de méthodes physiques, chimiques et biologiques sont utilisées pour éliminer ces polluants à partir de sites pollués. Ces méthodes ont prouvé leur efficacité mais elles peuvent générer des sous produits indésirables, en plus elles deviennent de plus en plus chères. Par contre, les méthodes biologiques sont généralement plus efficaces et relativement moins chères que les méthodes chimiques. Cette étude a pour objectif dans un premier temps d'isoler et d'identifier des bactéries à partir du sol contaminé par les dérivés pétroliers. Ensuite, d'évaluer leur capacité de dégradation du phénol en solution.

Ce manuscrit est composé de trois principales parties et est séquencé comme suit :

- La première partie concerne une synthèse bibliographique sur la pollution du sol et les microorganismes du sol ainsi que la biodégradation de certains polluants organiques ;
- La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées lors de cette étude ;
- La dernière partie relate la description des résultats avec une discussion ;

Le manuscrit est achevé par une conclusion en résumant les principaux résultats obtenus avec suggestion de quelques perspectives.

*Partie I :*

*Synthèse  
bibliographique*

## **1. Pollution des sols**

Le sol est un milieu dynamique (vivant) et complexe. Soumis à des influences climatiques différenciées et à des processus chimiques, physiques et biologiques (**Pansu et al., 1998 ; Bliefert et Perraud, 2004**) .Il représente une interface entre les différents milieux et est un lieu de transfert de particules et de polluants vers les hydro systèmes (**Lecoz et al., 1998**) . **Wild et Jones (1995)** estiment que 90% des HAP émis dans l'environnement sont stockés dans les sols .Ce chiffre ne prenant pas en compte les sites contaminés suite à des activités industrielles (usines à gaz , raffineries de pétrole ou usines de traitement de bois ) .

Dans ce cas , la pollution s'étend vers les horizons les plus profonds du sol . La rétention des polluants organiques par le sol est le résultat impliquant des interactions avec les constituants organiques et minéraux des sols (**Calvet, 1989**) .Dés leur arrivée au sol . les polluants organiques se distribuent dans trois phases : solide, liquide et air . Selon des constantes d'équilibre d'adsorption de désorption et de volatilisation. Le sol occupe une position centrale dans la régulation des pollutions avec un double role d'épuration et de Stockage des polluants , Il peut participer à leur élimination , ou diminuer ou retarder leurs impacts sur les différentes cibles (**Barriuso et al., 1996**). Les polluants organiques des sols proviennent de trois ensembles d'activités : industrielles, urbaines , et agricoles , les polluants organiques des sols les plus couramment impliqués sont : (**Barriuso et al., 1996**) .

- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).
- Les composés organiques volatils (COV).
- Les polychlorodibenzo-dioxines (PCDD) et polychlorodibenzo-furanes (PCDF).
- Les polychlorobiphényles (PCB).
- Les pesticides.

## **2. Les microorganismes du sol**

Le sol est constitué en fait par une mosaïque de micro habitats hébergeant des microorganismes différents, placés dans des conditions physico-chimiques également différentes (**Aron, 1968**) . Les microorganismes peuvent aussi agir sur les végétaux soit en synthétisant des composés phytotoxiques , soit au contraire en détoxifiant les sols contaminés .Enfin la microflore du sol peut protéger les plantes contre les microorganismes pathogènes ou parasites des racines (**Aron, 1968**) .

La détermination des caractéristiques biologiques du sol, repose sur : Un isolement et un dénombrement des souches autochtones du sol :

Une identification des souches isolées à partir de l'observation macroscopique des colonies, et l'observation microscopique après coloration gram (Jeannot et al.,2001) .

## **2.1 Les champignons**

En général, les champignons du sol forment une biomasse aussi importante que celle des bactéries. Leurs activités métaboliques sont multiples et fondamentales à l'équilibre écologiques des sols, par : leurs interactions avec les systèmes racinaires des plantes, leur aptitude de colonisation et de dégradation des débris organiques de grande taille et des composés de structures complexes. De nombreux travaux indiquent la prédominance de : *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus*, alors que *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium* et *Verticillium* sont couramment isolés.

## **2.2 Algues et protozoaires**

Les algues sont considérées comme relativement peu abondantes dans le sol. Mais leur présence est ne cependant commune. Les algues du sol incluent des espèces *coccoïdes* ou filamenteuses. Les groupes les plus courants sont des *Chlorophyceae*. Parmi les microorganismes photosynthétiques du sol, les Cyanobactéries sont dominantes dans les sols neutres et alcalins, alors que les algues sont les plus communes dans les sols acides.

Les protozoaires isolés des sols sont variés et se développent dans les zones superficielles humides, au niveau des films d'eau entourant les particules.

## **2.3 Bactéries**

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés: autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies. On estime d'ailleurs que tous les groupes de bactéries connus pourraient être isolés d'un échantillon du sol, si les techniques et les milieux adéquats sont utilisés. Ce qui ne signifie pas que le sol soit le milieu naturel de toutes les bactéries. Par sa nature de milieu ouvert et sensible aux facteurs de l'environnement, le sol est le réceptacle d'apport continus de microorganismes exogènes qui disparaissent ou survivent en situation de dormance, en raison des conditions défavorables d'un milieu qui n'est pas le leur. Mais certains d'entre eux peuvent ponctuellement s'implanter. Les bactéries du sol sont à dominante GRAM positif, avec comme groupes principaux : les Corynébactéries, les Actinomycètes, les Mycobactéries et les Nocardiformes.

Les genres les plus communément isolés sont : *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Bacillus*, dans les couches aérobies alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies. Les variations du potentiel nutritionnel du sol favorisent l'apparition de bactéries autotrophes du cycle de l'azote : *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* et du soufre : *Thiobacillus*.

Les premières bactéries étudiées, isolées sur naphthalène, appartenaient au genre *Pseudomonas* (Grund and Gunsalus, 1983; Kurkela et al., 1988; Simon et al., 1993; Yang et al., 1994). Par la suite, d'autres bactéries appartenant aux genres *Sphingomonas* et *Mycobacterium* ont largement été étudiées après isolement sur différents HAP (Kim et al., 2007; Krivobok et al., 2003; Shi et al., 2001; Willison, 2004). Plus récemment, des méthodes indépendantes de la culture ont permis d'enrichir nos connaissances sur des microorganismes actifs dans les sols contaminés aux HAP (Jeon et al., 2006; Ono et al., 2007; Singleton et al., 2009).

### 2.3.1 Les Gammaprotéobactéries

Des bactéries du genre *Pseudomonas*, appartenant à la classe des Gammaprotéobactéries, ont servi de modèles pour étudier le métabolisme du naphthalène et du phénanthrène. Les opérons cataboliques de *P. putida* G7 et *P. stutzeri* AN10 ont été caractérisés après isolement sur naphthalène (Bosch et al., 1999; Menn et al., 1993). De même, *P. aeruginosa* a été isolée pour ses capacités à dégrader le phénanthrène (Romero et al., 1998). *P. putida*, et *P. aeruginosa* sont aussi connues pour leur faculté de chimiotactisme vis à vis des HAP (Grimm and Harwood, 1999). D'autres *Pseudomonas* ont été détectées dans des sols contaminés par une pollution diffuse (Johnsen et al., 2002). Une autre Gammaprotéobactérie, *Stenotrophomonas*, est capable de dégrader le phénanthrène ainsi que des HAP de haut poids moléculaire comme le benzo [a]anthracène, le benzo[a]pyrène, le fluoranthène et le pyrène (Juhász et al., 2000). En milieu marin, des bactéries du genre *Cycloclasticus*, d'autres Gammaprotéobactéries, ont été identifiées comme acteurs de la dégradation du naphthalène et du phénanthrène notamment (Geiselbrecht et al., 1996).

### 2.3.2 Les Sphingomonades

Ce sont des microorganismes capables de dégrader un large spectre de composés aromatiques (Leys et al., 2004). Ils ont été isolés ou détectés dans des sols fortement contaminés aux hydrocarbures. Les Sphingomonadaceae comprennent plusieurs genres appelés *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, et *Sphingopyxis* (Bastiaens et al., 2000).

*Sphingobium yanoikuyae* sp. B1 (anciennement *Beijerinckia* sp. B1) a été isolé pour ses capacités à utiliser le naphthalène comme unique source de carbone et d'énergie (Zylstra et al., 1997). *Sphingomonas* sp. LH-128 a été isolé sur le phénanthrène (Schuler et al., 2009), tout comme *Sphingomonas paucimobilis* TNE12 (Shuttleworth and Cerniglia, 1996). *Sphingomonas* sp. CHY-1, bien que préférant le naphthalène, a été isolé sur chrysène (Willison, 2004). Certains Sphingomonades, tels que *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505, dégradent le fluoranthène et co-métabolisent le benzo[a]pyrène (Ye et al., 1996).

#### 2.3.4 Les Betaprotéobactéries

Plusieurs espèces de Betaprotéobactéries sont aussi capables de se développer sur naphthalène ou phénanthrène (Johnsen et al., 2002). La famille des Burkholderiales est la plus représentée à ce jour. *Burkholderia* sp. C3 (Seo et al., 2007) et *Burkholderia* sp. RP007 (Laurie and Lloyd-Jones, 1999) ont été isolées sur phénanthrène. La souche RP007 est aussi capable de minéraliser le naphthalène et l'anthracène. *Ralstonia* sp. U2, isolée par enrichissement sur naphthalène, (Fuenmayor et al., 1998) métabolise ce HAP par une voie particulière impliquant le gentisate comme intermédiaire. *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, possédant des gènes cataboliques similaires à ceux de *Ralstonia* sp. U2, minéralise le naphthalène (Jeon et al., 2006). *Alcaligenes* sp. AKF2 dégrade le phénanthrène par la voie du phtalate mais ne minéralise pas le naphthalène (Kiyohara et al., 1982). Bien que les gènes cataboliques de *Acidovorax* sp. NA3 soient très proches de ceux de la souche AKF2, cette bactérie minéralise les HAP de 2-3 cycles tels que le naphthalène ou le phénanthrène, ainsi que certains HAP de haut poids moléculaire tels que le chrysène, le benzo[a]anthracène ou le benzo[a]pyrène (Singleton et al., 2009).

#### 2.3.5 Les Actinobactéries

Les bactéries Gram(+), et plus particulièrement celles appartenant au phylum des Actinobactéries, sont aussi impliquées dans la dégradation des HAP. Les mycobactéries, genre le plus étudié, sont capables de se développer en utilisant le phénanthrène, l'anthracène ou le pyrène comme uniques sources de carbone et sont aussi impliquées dans la dégradation d'HAP de haut poids moléculaire, comme le fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Ces microorganismes ont été détectés dans des environnements à pollution diffuse, avec une faible concentration et une faible biodisponibilité en HAP. Ils produisent dans leur paroi externe des acides mycoliques, acides gras alkylés et hydroxylés, qui forment une couche quasi cristalline protégeant la cellule de la toxicité des polluants. La présence de cette barrière de protection associée à la fluidité de leur bicouche lipidique sert aussi à l'internalisation des HAP (Jouanneau et al., 2011; Leys et al., 2005).

*Mycobacterium* sp. 6PY1, isolée sur pyrène, est aussi capable de dégrader le phénanthrène et le fluoranthène (Krivobok et al., 2003). *Mycobacterium* sp. RJGII-135 est capable de dégrader le pyrène, le benzo[a]pyrène et le benz[a]anthracène (Grosser et al., 1991; Schneider et al., 1996). La voie de dégradation du pyrène de *Mycobacterium* sp. PYR-1 a été particulièrement documentée (Heitkamp et al., 1988; Kim et al., 2008; Kim et al., 2007; Rafii et al., 1992; Stingley et al., 2004). D'autres actinobactéries, du genre *Arthrobacter* ou *Nocardioïdes*, sont capables de dégrader les HAP de faible poids moléculaire tels que le naphthalène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluorène. *Nocardioïdes* sp. KP7 dégrade le phénanthrène par la voie phtalate, mais pas le naphthalène (Saito et al., 2000). *Janibacter* sp. YY1, isolé sur dibenzofurane peut utiliser le fluorène et le dibenzothiophène comme sources uniques de carbone et d'énergie, et peut co-métaboliser le naphthalène et le phénanthrène (Yamazoe et al., 2004). La souche *Rhodococcus* sp. UWI, isolée sur pyrène, utilise quant à elle, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le chrysène comme sources uniques de carbone et d'énergie. Cette souche est aussi capable de co-métaboliser le naphthalène et le fluorène notamment (Walter et al., 1991).

**Tableau 1** : Principaux genres bactéries dégradants isolés à partir des sols .

Gram	Clades	Genres	Références
Gram (-)	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i> , <i>Agrobacterium</i> <i>Achromobacter</i> ,	(Haritash&Kaushik,2009 ;Romi e et al .,1999)
	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Alcaligenes</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Polaromonas</i> .	(Daane et al .,2001;Goyal &Zyistra,1996 ; Jeon et al.,2006 ;Larkin et al .,1999)
	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Haemophilus</i> .	(Abd-Elsalam et al .,2006 ; Haritash &Kaushik , 2009 ;Kim et al.,2009 ; Simon et al .,1993)
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	(Abd-Elsalam et al.,2006)
Gram (+)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter</i> ; <i>Rhodococcus</i> ; <i>Mycobacterium</i> <i>Terrabacter</i> , <i>Gordonia</i>	(Heitkamp et al., 1988 ;Kastner et al .,1994 ; Khan et al .,2002 ; Krivobok et al.,2003 ; Larkin et al .,1999 ; Timmis et al .,2010)
	<i>Nocardioïdes</i>	<i>Nocardia</i>	(Krivobok et al .,2003 ; Saito et al.,1999 ; Zeinali et al.,2007 )
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i>	(Bossert &Bartha , 1986 ; Daane et al.,2002 ; Rochelle et al.,2005)

Les actinomycètes semblent jouer un grand rôle et sont particulièrement aptes à dégrader des substances organiques difficilement décomposables, et produisent des vitamines et des antibiotiques (Clement et Lozet, 2011). Ils seraient susceptibles de décomposer les composés aromatiques de la matière organique fraîche (lignine, certains tannins) (Duchaufour, 2001). Ils sont indice d'un sol à bonne structure et/ou bonne aération (Clement et Lozet, 2011).

### **3. Exemples de polluants organiques dans les sols**

#### **3.1 Les hydrocarbures**

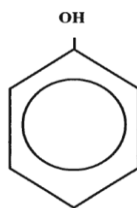
Les hydrocarbures se rencontrent essentiellement dans les produits complexes formés lors de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de matériaux organiques. Ainsi, ils sont présents dans les suies et fumées de toutes origines, dans les gaz d'échappement des moteurs à explosion, dans la fumée de cigarette, etc ... On les trouve à des concentrations très diverses dans le goudron de houille et ses dérivés (huiles anthracéniques et brai), dans les huiles minérales, les extraits aromatiques, le bitume et les paraffines brutes tirés du pétrole, dans le noir de carbone, dans les huiles de schiste et dans l'asphalte naturel. Cette liste n'est pas exhaustive (Inrs, 1979, 1984).

##### **3.1.1 Impact des hydrocarbures sur l'environnement**

Les impacts environnementaux, sanitaires et économiques de la pollution par les hydrocarbures sont de plus en plus importants en premier lieu la pollution du milieu souterrain par les hydrocarbures concernent la qualité des eaux souterraines, les rendant impropres pour certaines utilisations (eau potable en particulier) (Scriban, 1999). Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'Homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans la chaîne alimentaire. Au niveau de la phase gazeuse du sol, les risques sont réels avec la présence de substances volatiles: émanations toxiques, incendies et explosions avec des produits inflammables et explosifs en atmosphère confinée (Scriban, 1999). Il est donc nécessaire de décontaminer des milieux pollués, la bioremédiation s'avère être une alternative très intéressante.

#### **3.2 Le phénol**

Le phénol est le composé aromatique le plus simple de la famille des composés phénoliques. Il a été découvert en 1834 par Runge dans le goudron de houille. Il est composé d'un seul noyau aromatique (Figure 1) et a un poids moléculaire de 94.11 g/mol.



**Figure 1** : Structure chimique du phénol.

Son point de fusion est de  $43^{\circ}\text{C}$  (EPA ,1998). C'est un composé relativement soluble dans l'eau .Bien que présent naturellement, sa présence est due en grande partie à l'activité humaine (Montizaan,1994) .Le phénol est un des composés aromatiques le plus produit et utilisé au monde .Chaque années, $1,25 \times 10^9$  Kg de phénol Sont produits ou rejetés par les industries (Boopathy , 1997 ; Boyd et al., 1983) . Il entre dans la fabrication de résines synthétiques, de teintures chimiques, de désinfectants, d'antiseptiques et de plusieurs autres composés chimiques (Montizaan, 1994) . De plus, les effluents des raffineries de pétrole , des papetières et des industries pharmaceutiques et métallurgiques contiennent une quantité importante de phénol (Babich et Davis,1981).

En agriculture, il entre dans la composition de plusieurs pesticides et herbicides chimiques (Davi et Gnudi,1999) . D'autres sources de phénol telles la combustion du bois , les émanations des voitures et la fumée de cigarette contribuent à la pollution de l'environnement (Montizaan ,1994) .De plus , il est un intermédiaire de la dégradation de plusieurs composés aromatiques comme le benzoate et plusieurs composés phénoliques (Paula Schie et Young , 1998) . Sa grande solubilité dans l'eau ainsi que sa forte toxicité (Boyd et al .,1983 ;Powlowski et Shingler ,1994) font en sorte qu'il est un des plus importants polluants des eaux souterraines .Sa présence dans plusieurs environnements constitue un véritable danger pour la santé humaine .Une exposition des voies cutanées , buccales Et respirations peut entraîner divers symptômes . Tout dépendant de la durée d'exposition et de la dose , les problèmes engendrés vont de la simple irritation de la peau à des complications plus sévères comme des dommages cardio-vasculaires , neurotoxiques ainsi qu'au foie et aux reins pouvant entraîner la mort dans certains cas . étant donné que le phénol est toxique pour l'humain , la faune et la flore , il a été désigné comme étant un polluant prioritaire et est soumis à une législation très stricte (EPA , 1998).

### 3.2.1 Utilisation

Mais aussi est largement employé dans l'industrie, on le rencontre dans :

- L'industrie des matières plastiques.

- L'industrie des fibres synthétiques.
- L'industrie pétrolière.
- L'industrie pharmaceutique.
- L'industrie des détergents.
- L'industrie des pesticides
- L'industrie des colorants et des additifs pour huiles.

### **3.2.2 Toxicologie aigue**

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

Le phénol a également été utilisé pour des techniques de chirurgie plastique pendant 30 ans. Le mélange utilisé était classiquement constitué de 3 ml de phénol à 50% de 2 ml d'eau et de 8 gouttes de savon et 8 gouttes d'huile de croton .En application cutanée . Ce mélange permettait une dépigmentation. Dans ce type d'utilisation, il a été rapporté que plus de 30% des adultes présentaient des *dysrythmies* (**Morrison et al., 1991**) .Le seul cas publié dans la littérature correspond à l'utilisation d'un mélange de composition voisine (40% de phénol, 0,8% d'huile de croton dans du savon à base d'hexachlorophène et d'eau ) chez un enfant âgé de 10 ans . Ce mélange a été appliqué sous anesthésie sur 1,9 % de la surface corporelle.

Cinquante cinq minutes après le traitement, des extrasystoles ventriculaires polymorphes sont observées en l'absence de modification de la pression artérielle et des concentrations en sodium et potassium plasmatiques (**Warner et Harper, 1985**).

## **4. Biodégradation du phénol et autres polluants organiques**

### **4.1 Principe de la biodégradation**

La biodégradation est un phénomène naturel. Elle est le résultat de la dégradation de molécules organiques par les microorganismes (bactéries, champignons...) dont la croissance effectue par l'oxydation du carbone qui est utilisé comme source d'énergie. Cette réaction met en jeu deux autres éléments, l'azote et le phosphore, qui participent à la synthèse protéique ; lorsque l'oxydant est représenté par l'oxygène, on parle de condition d'aérobiose. Dans le cas d'anaérobiose, l'oxygène est remplacé par les nitrates, sulfates ou méthane.

#### **4.1.1. Les facteurs influençant la biodégradation**

Les micro-organismes ont la capacité à dégrader les dérivé pétrolier grâce à la production des enzymes capables de le décomposer, beaucoup plus rapidement dans des conditions

environnementales optimales. Certains facteurs influençant cette activité enzymatique parmi les quels :

#### **4.1.2. Structure et nature du sol**

Les bioprocédés s'appliquent à une grande variété de sol. Pour cela, il est important de connaître la structure et la nature de sol. **NAM et al., (2003)** ont observé que les agrégats de sols réduisaient la biodégradation.

#### **4.1.3. Composition chimique des hydrocarbures**

Les hydrocarbures pétroliers diffèrent par leur susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légères, les aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible

**L'humidité** : est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Il est connu que les faibles humidités inférieures à 2% limitent la vitesse de biodégradation. Inversement, des teneurs trop élevées vont influencer sur la perméabilité des sols aux gaz et générer des conditions de limitations de transfert d'oxygène et donc de limitation de métabolisme microbien aérobie.

**Température** : La température influence profondément la multiplication microbienne et sur leurs métabolismes. Les températures optimales de la croissance et de l'activité des réactions chimiques des microorganismes du sol varient selon l'espèce. L'intervalle de température favorable à la bonne activité microbienne se situe entre 20 et 37°C.

**Salinité** : La salinité diminue le nombre de micro-organismes dans le sol. Elle ralentit les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO<sub>2</sub>. Les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation.

**Potentiel d'hydrogène (pH)** : L'activité microbienne est largement influencée par le pH. Il doit être situé entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7. Si le pH est acide, il peut favoriser la solubilisation des métaux lourds qui sont très toxiques pour les bactéries

**Taux d'oxygène** : Le processus biologique aérobie est souhaitable pour la bioremédiation de sol pollué par le diesel. Ainsi, la respiration aérobie semble être le mécanisme primaire pour la biodégradation des hydrocarbures. Plusieurs auteurs montrent que la biodégradation anaérobie est plus lente que la biodégradation aérobie

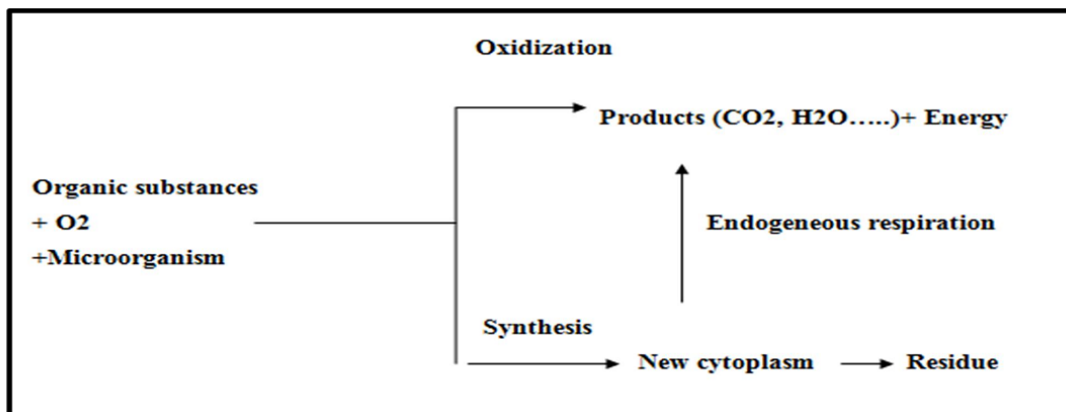
**Contenu en nutriments** : Les nutriments sont indispensables à l'activité et au développement des micro-organismes. Ce sont des corps simples qui peuvent être assimilés,

sans transformation digestive par les organismes et favoriser la croissance des populations de bactéries. Les plus importants sont l'azote et le phosphore.

## 4.2 Les différents types de biodégradation des polluants organiques

### 4.2.1 Biodégradation aérobie

La biodégradation aérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en présence d'oxygène. La première étape dans la dégradation aérobie de ces composés est l'introduction dans le substrat d'un atome d'oxygène dérivé de l'oxygène moléculaire. Cette étape critique est effectuée par les oxygénases (Olivier et al., 2005). La figure 2 illustre les processus de biodégradation d'une substance organique en condition aérobie.



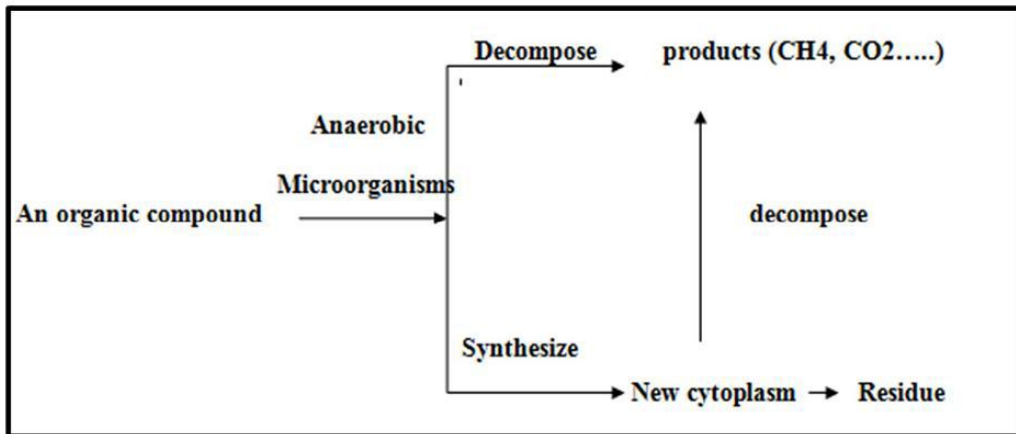
**Figure 2:** Dégradation aérobie de la matière organique (Bouderhem, 2011).

Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants :

- vitesse de dégradation des composés organique,
- quantité de l'oxygène consommée,
- produits résultant de la dégradation,
- activité microbienne.

### 4.2.2 Biodégradation anaérobie

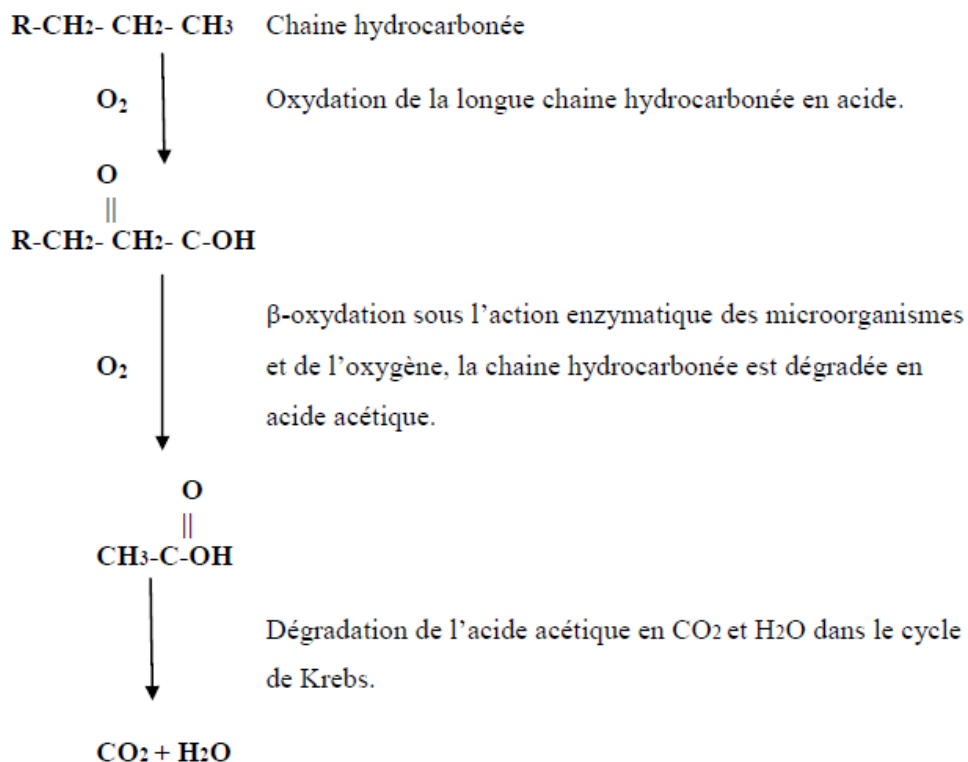
La biodégradation anaérobie d'une substance organique est le degré de modification physique et chimique que subit cette matière organique par les microorganismes en conditions d'anaérobiose (Bouderhem, 2011). La figure 3 illustre les processus de biodégradation que subit la matière organique en condition anaérobie.



**Figure 3:** Dégradation anaérobie de la matière organique (Bouderhem, 2011).

### 4.3 Biodégradation des hydrocarbures

L'utilisation des méthodes biologiques dans la dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures se basant sur le phénomène de la biodégradation par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes a été mise en évidence dès 1946 par **ZoBell**. Le mécanisme de dégradation des chaînes hydrocarbonées a été initialement proposé par **Lecomte**,(1995) (Figure 4).



**Figure 4 :** Principe de la biodégradation aérobie des hydrocarbures (Lecomte, 1995).

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes est indéniablement le processus le plus abouti dans l'élimination des polluants d'origine pétrolière. Même s'il est relativement lent, ce processus permet une dégradation quasi-complète (transformation en CO<sub>2</sub>) des hydrocarbures. Neuf genres de cyanobactéries, 103 de champignons et 14 d'algues sont connus à ce jour pour être capables de dégrader les hydrocarbures. Mais il a été établi que les bactéries (79 genres recensés en 2005) étaient qualitativement et quantitativement les plus efficaces dans cette fonction (Prince, 2005). Ce processus (Figure 5) naturel a pour nom la bioremédiation. Tout l'enjeu est de composer et les contraintes qui en modifiant l'efficacité de manière à l'influencer favorablement lors de pollutions importantes et ainsi contribuer activement à l'élimination des contaminants (Sauret, 2011).

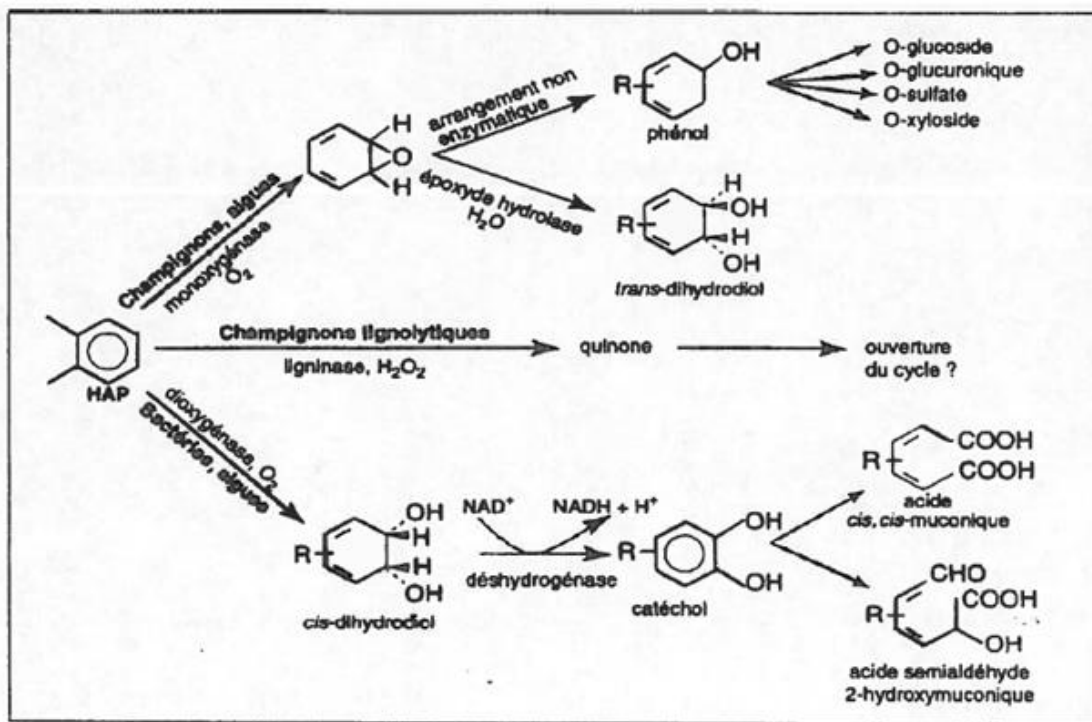


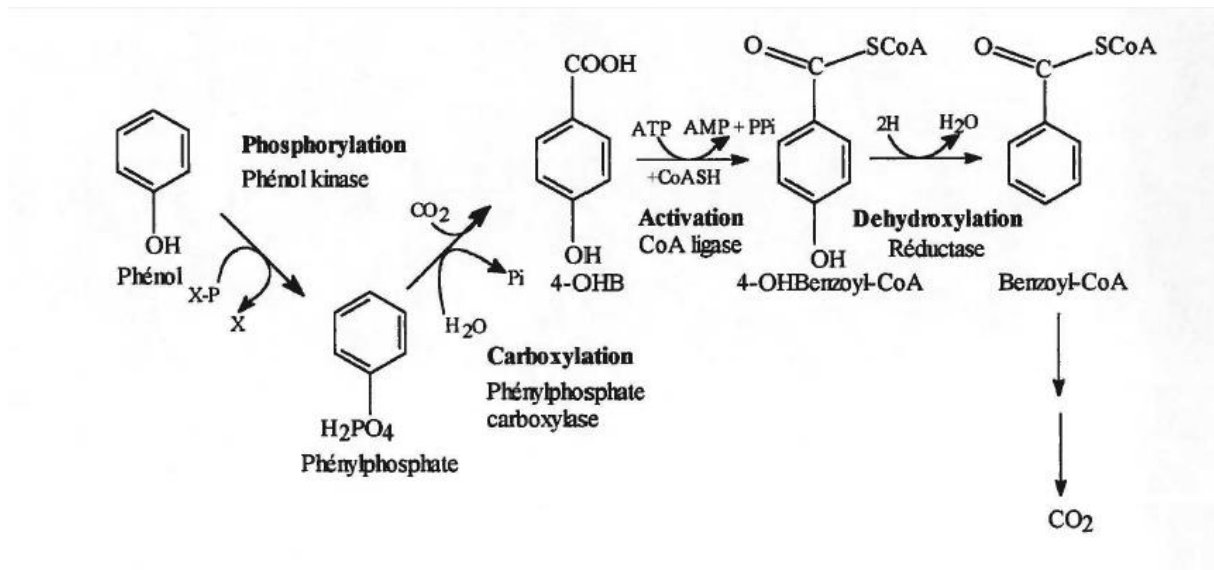
Figure 5 : Mécanismes de dégradation des HAP (Bouchez et al., 1996).

#### 4.3.1 Biodégradation aérobie du phénol

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

Les composés aromatiques simples tels que le phénol et le benzène sont typiquement dégradés selon la voie méta tandis que les plus complexes comme les chlorophénols sont généralement dégradés selon la voie ortho (Figure 6).

Deux types d'ortho clivage existent : l'ortho clivage type 1 et l'ortho clivage type 2 modifié, spécifique à la dégradation des composés aromatiques chlorés via le chlorocathécol.



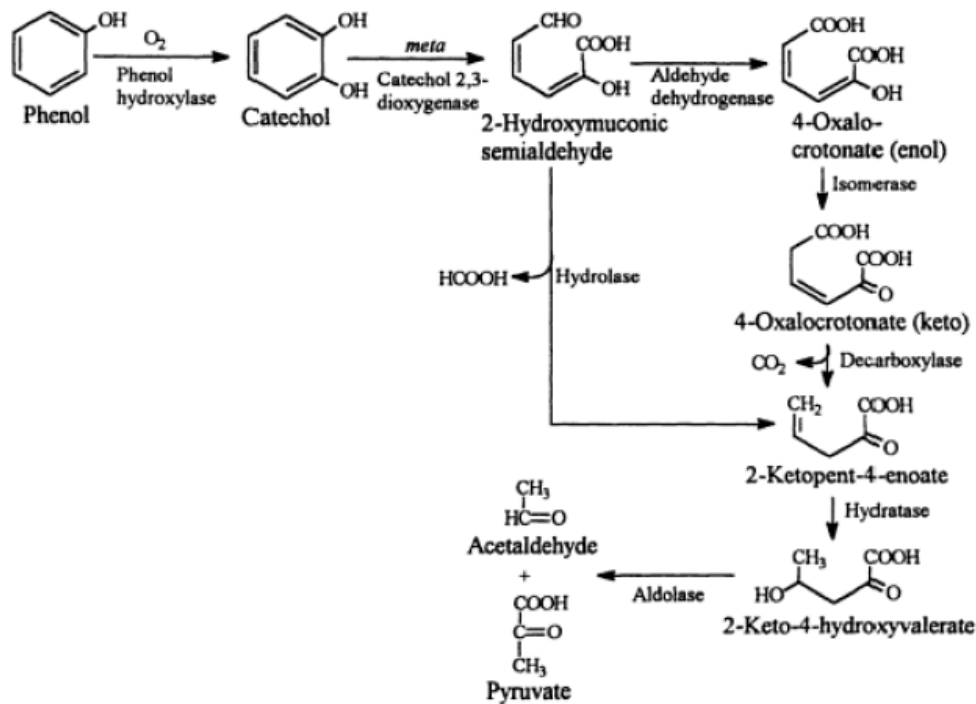
**Figure 6 :** Voie métabolique de dégradation du phénol via une phosphorylation (Lack et Fuchs, 1994).

#### 4.3.2. Biodégradation anaérobie du phénol

Plusieurs composés aromatiques chlorés résistent aux métabolismes microbiens aérobies car les atomes du chlore bloquent l'attaque de l'oxygénase. Mais ces composés halogènes peuvent être dés halogénés par des microorganismes anaérobies. En anaérobiose, la biotransformation de la plupart des composés aromatiques halogénés est initiée par une déshalogénéation réductive. L'élimination de substituant halogéné s'avère nécessaire avant le clivage du cycle aromatique. Ainsi la biodégradation anaérobie des phénols se fait par dé chloration réductive au cours de la quelle l'atome de chlore est remplacé par un hydrogène. Les microorganismes utilisent ces composés comme accepteurs terminaux d'électrons. (Joce, 2004). La Figure7 présente la biodégradation de phénol par *Pseudomonas putida* en conditionaérobie, qui commence par la formation de catéchol après une rupture par l'enzyme hydroxylase. Le catéchol peut encore être dégradée par l'intermédiaire de méta

(rupture d'une liaison entre un carbone portant un groupement hydroxyle et le carbone immédiatement voisin ne portant pas de groupement hydroxyle) ou le clivage ortho (rupture de la liaison entre les deux groupements hydroxyle) par le catéchol 2,3-di-oxygénase.

Donne un aldéhyde semi-2- Hydroxymuconique. Cependant, une série d'activités enzymatique a lieu. Tels que hydrolase, aldéhyde déshydrogénase, l'isomérase, décarboxylase, hydratase et aldolase, arrivant au pyruvate comme un produit final qui va être entré dans le cycle d'acide tricarboxylique TCA.



**Figure 7 :** La biodégradation de phénol par *Pseudomonas putida* en condition aérobie (Agteren et al., 1998).

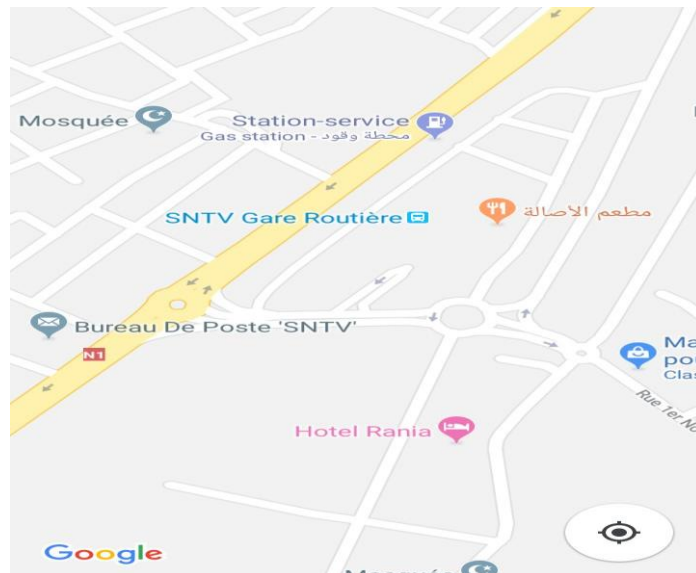
# **Partie II :**

**Matériel et méthodes**

## 1. Matériel

### 1.1 Site du prélèvement des échantillons

Les échantillons ont été pris à partir de différents endroits au niveau d'une station de service située dans la wilaya de Laghouat (Figure 8). Des échantillons sont prélevés dans la couche superficielle du sol (0-20 cm) où l'activité biologique est normalement maximale dans l'horizon de surface et décroît plus ou moins rapidement avec la profondeur (Itab, 2002). La prise des échantillons est faite dans les mêmes conditions physiques (température, humidité) et dans le même jour (Simonart, 1957). Six échantillons sont récupérés aseptiquement dans des flacons stériles qui sont ensuite acheminés jusqu'au laboratoire, Est conservés au frais (environ 4°C) car un stress peut perturber les mesures biologiques (Chaussod et al., 1992 ; Fardoux et al., 2000).









**Figure 8:** localisation de site des prélèvements (Google maps).

Les échantillons prélevé est un sol contaminés par les dérivés pétroliers (essence, huiles..etc.). La caractérisation des six échantillons du sol a porté essentiellement sur la couleur, la texture. (Tableau 2) en raison de la différence d'endroit de prélèvement et de la nature du polluant.

**Tableau 02 :** Les caractéristiques des échantillons des sols prélevés.

+ : présence d'odeur. ++ : odeur forte

Sol	couleur/odeur
Echantillon 1 	Noir/ odeur
Echantillon 2 	Marron / odeur
Echantillon 3 	Noire / odeur
Echantillon 4 	Marron / odeur
Echantillon 5 	Marron foncé / odeur
Echantillon 6 	Noire + les déchets /odeur forte

## 2. Analyse microbiologique

### 2.1. Préparation de la solution mère

Des solutions mères à partir des six échantillons de sol polluée. 5 g du sol sont introduits dans un flacon contenant 45 ml d'eau physiologique stérile (Figure 9) (Xiaojun *et al.*, 2008). Après agitation mécanique pendant 5 min, les flacons sont laissé à température ambiante jusqu'à la formation d'une couche plus ou moins homogène (Meyer *et al.*, 2004).



**Figure 9:** Les solutions mères des sols prélevés.

### 2.2 Isolement et purification des souches bactériennes

Cette étape permet de mettre en évidence la flore microbienne totale existante dans les six échantillons de sol. Nous procédons à l'ensemencement sur un milieu de culture solide le milieu utilisé est la gélose Muller-Hinton. (Annexe 1)

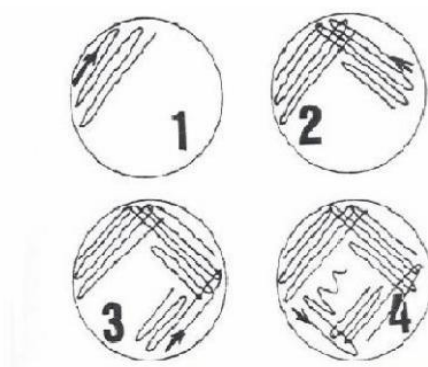
La technique d'ensemencement utilisé est un ensemencement en surface par écouvillonnage et la technique des stries à l'aide d'une anse de platine. Environ six boîtes ont été ensemencées à partir de chaque échantillon, ensuite incubé à 37°C pendant 24h pour laisser pousser que les bactéries.

### 2.3 Purification

Un seul type de microorganisme ne peut pas être étudié dans une culture mélangée. On a besoin d'une culture pure, une population de cellules provenant d'une seule cellule pour caractérisé une espèce individuellement (Lansing *et al.*, 2010). Après 24 heures d'incubation, les colonies suspectes ont été sélectionnées par rapport à leur aspect morphologique pour être purifiées sur des milieux sélectifs (Annexe1).

La technique de purification procédée est la technique d'épuisement par quatre quadrants (Figure 10 ). Les boîtes de pètri sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures (Rejsek, 2002).

Cette étape est réalisée deux fois à trois pour assurer la purification des souches, ensuite la purification est confirmée par la coloration de Gram et observation microscopique.



**Figure 10** : Méthode d'ensemencement des bactéries sur milieu solide en suivant Les étapes dans l'ordre 1, 2, 3,4. (Quatre cadrans) (Somsegaran et Hoben, 1994).

#### **2.4 Conservation des souches purifiées**

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

### **3. La Biodégradation**

Les souches bactériennes isolées à partir d'un site contaminé par les dérivés pétroliers, ont la capacité de dégrader quelques polluants organiques comme source de carbone pour leur croissance (Seo et al., 2008). Pour cela on a effectué le test de biodégradation pour déterminer les capacités de dégradation des dérivés pétroliers et diesel de nos isolats indigènes qui ont été isolés à partir de sol contaminé.

#### **3.1 Etude de la biodégradation du phénol dans une culture minérale**

L'étude de la biodégradation du phénol est effectuée à partir de nos isolats bactériennes pures pour mettre en évidence la capacité des souches bactériennes d'utiliser le phénol comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance (Maulin, 2018).

Des études préliminaires de dégradation est réalisée dans un milieu minérale (Annexe 1) (Kystyna et al., 2005) qui contient les sels minéraux nécessaires à la croissance des bactéries

(Bared et al., 2010), le milieu doit ajuster avec une solution de NaOH à 1N ou le HCl jusqu'à un pH de 7,2 car c'est le pH optimal de la biodégradation (Daffri et Bousseboua, 2014).

Les souches bactériennes sont cultivées dans des flacons contenant un volume de 45ml de milieu minérale autoclavé à 120°C /1B pendant 20 min, la bactérie est introduite dans la culture minérale à une densité optique (DO) de 0.2 UFC par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 620 nm, et finalement on additioné aseptiquement phénol.

Les différentes concentrations de phénol ajouté sont : 120mg/L, et une concentration de 200mg/l est incubé pendant une semaine (Jiang et al., 2007 ; Garcia et al., 1998 ; Calvario-Rivera et al., 2008 ).

Parallèlement on a mis deux témoins l'un sans l'ajout de la bactérie mais contient seulement le phénol et le second contient seulement la bactérie dans le milieu minérale.

La biomasse à été estimé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 620 nm, Finalement Les flacons de la culture minérale ont été incubé pendant 72 heures à 37°C sous agitation à 130 tr /min. La lecture des résultats se fait chaque 24h (Figure 11) ( Maulin , 2018).



**Figure 11** : Agitation des flacons au niveau d'un agitateur placé dans une étude à 37°C.

### **3.2 Lecture des résultats**

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

## **4. Identification**

Les souches microbiennes isolées sont identifiées par les méthodes classiques, par la détermination de leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

### **4.1 Etude morphologique**

#### **4.1.1 Aspect macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première Caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

D'après **Joffin et Leyral, (2006)**, les éléments d'identifications macroscopiques

Sont :

- **La forme des colonies** : rondes, irrégulières,...etc.
- **La chromogénèse**: couleur de la colonie.
- **L'élévation**: convexe, concave, plate.
- **L'opacité**: opaque, translucide ou transparente.
- **La surface**: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

#### **4.1.2 Aspect microscopique**

##### **4.1.2.1 Coloration de Gram**

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisé systématiquement sur les différentes colonies purifiés pour préciser le caractère Gram(+) ou Gram(-). Avec cette coloration double, les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatives sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2008**).

La coloration de Gram utilise 4 réactions :

- ❖ Le Cristal Violet qui colore tout en violet.
- ❖ Le Lugol faible qui se complexe au cristal violet, formant un colorant violet soluble dans l'alcool.
- ❖ L'Alcool ou l'Alcool/Acétone qui décolore certaines bactéries (celles dont la paroi est perméable à l'alcool), mais pas d'autres (celles dont la paroi est imperméable à l'alcool).
- ❖ La Safranine (ou la Fuchsine de Ziehl, diluée 10 x v/v), qui colore en rouge/rose les bactéries décolorées par l'alcool, sans modifier la couleur des autres bactéries (violet foncé/bleu) (**Galet et al., 2009**).

#### **4.1.2.2 Test à la potasse (solution aqueuse à 3 % de KOH)**

Test KOH est effectuée en utilisant une goutte de 3 % d'hydroxyde de potassium sur une lame de verre. Une anse visible de cellules à partir d'une seule colonie bien isolée est mélangée dans la goutte.

Si le mélange devient visqueux et filant dans les 60 secondes de mélange (KOH positif), alors la colonie est considérée comme Gram- négatifs. La réaction dépend de la lyse de la cellule gram-négative dans la solution alcaline diluée libérer l'ADN cellulaire pour transformer la suspension aqueuse en une solution visqueuse.

Cette méthode a été montrée efficace pour *Bacillus spp* (Carlone et al., 1983 ;Gregersen, 1978). Cela peut servir comme un complément précieux à la méthode classique de la coloration de Gram (Von Graevenitz et Bucher, 1983)..

### **4.2 Analyses biochimiques**

Bien que les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces de bactéries phytopathogènes .Grâce à ces testes, il possible de connaître certaines caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées.

#### **4.2.1 Etude des enzymes respiratoires**

##### **4.2.1.1 Recherche de la cytochrome-oxydase**

Ce test met en évidence l'existence de la Cytochrome Oxydase, enzyme caractéristique d'un métabolisme respiratoire aérobie, spécifique de la réduction de l'oxygène moléculaire. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl-paraphénylène diamine qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme. Ce réactif peut se trouver sous forme d'un disque pré-imprégné par ce dernier (Denis et al., 2011).

##### **- Technique :**

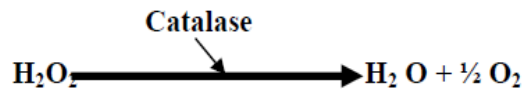
Ecraser avec une pipette pasteur une colonie à étudier sur le disque d'oxydase. La présence d'une Cytochrome Oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration violette.

##### **4.2.1.2 Recherche de la catalase**

La catalase (Ferro porphyrine de poids moléculaire élevé) à la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène .C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne.

On prend une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 10 volumes qu'on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune de 24 h, le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase.

La réaction se fait selon l'équation :



Ce test, peut être réalisé en tube contenant 0.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

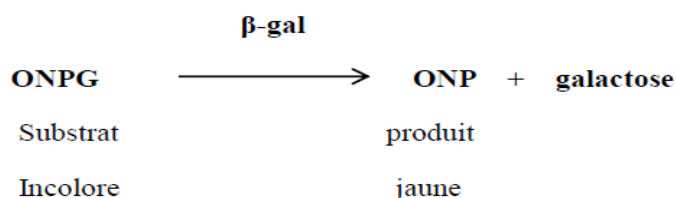
On prélève des colonies et introduites dans le tube. Le résultat est identique à celui obtenu lors du test sur lame (Aouati, 2009 ; Chaala, 2013).

#### 4.2.2 Métabolisme des glucides

##### 4.2.2.1 Production de la B-galactosidase (Disques ONPG)

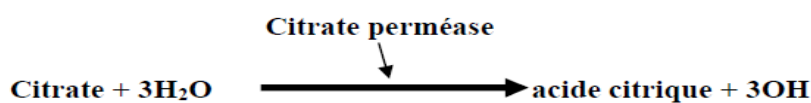
Le test est pratiqué en réalisant une suspension dense de la bactérie testée dans l'eau distillée puis à l'aide d'une pince flambée et refroidie nous avons ajouté un disque imprégné d'ONPG et nous avons mis le tube dans l'étuve pendant 15 à 20 minutes.

La présence d'une bêta-galactosidase se traduit par la libération de l'orthophényle soluble de couleur jaune qui apparaît après la durée d'incubation. (Delarras, 2007)



##### 4.2.2.2 Recherche de Citrate perméase

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons (de couleur verte), qui ne contient que le citrate (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) comme seule source de carbone qui est le citrate de sodium. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu. L'utilisation de citrate provoque l'alcalinisation du milieu selon la réaction suivante (Marchal et Bourdon, 1982).



##### 4.2.2.3 L'étude de la voie d'attaque des glucides

Ce test est effectué sur le milieu MEVAG (Annexe 2) afin de déterminer le type de métabolisme glucidique (fermentaire ou oxydative). La lecture se fait après 24h d'incubation à 30°C.

#### 4.2.2.4 Hydrolyse de l'esculine

Ce test a été réalisé sur le milieu gélosé contenant la bile à esculine. Après incubation de la culture à 30°C pendant 24 heures, l'hydrolyse de l'esculine libère l'aglycone qui est décelé par une réaction chimique en présence de sel de fer et donne une couleur noire au milieu de culture (De vos *et al.*, 2009).

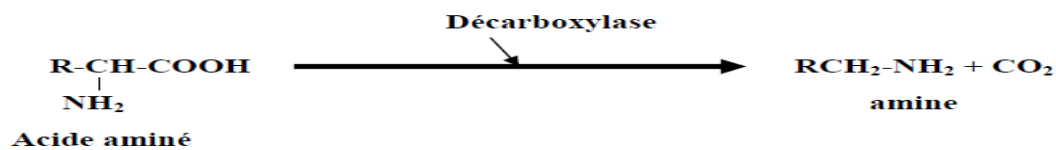
#### 4.2.3 Test Mannitol mobilité

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol, et du rouge de phénol comme indicateur de pH. Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol est utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale (Denis *et al.*, 2011).

#### 4.2.4 Étude du métabolisme protéique

##### 4.2.4.1 Recherche des décarboxylases (ODC, LDC, ADH)

Les décarboxylases scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO<sub>2</sub> selon la réaction suivante:



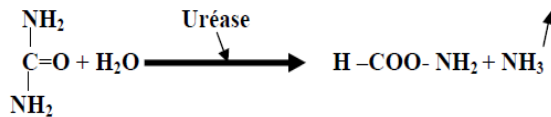
Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH entre 3.5 et 5.5) et des conditions d'anaérobiose (Marchal et Bourdon, 1982).

Les décarboxylases sont:

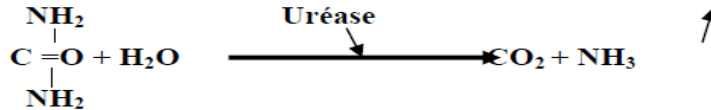
- Lysine décarboxylase (LDC):  $\text{Lysine} \xrightarrow{\text{LDC}} \text{Cadavérine} + \text{CO}_2.$
- Ornithine décarboxylase (ODC):  $\text{Ornithine} \xrightarrow{\text{ODC}} \text{Putricine} + \text{CO}_2.$
- Argénine dihydrolase (ADH):  $\text{Argénine} \xrightarrow{\text{ADH}} \text{Agmatine} + \text{CO}_2.$

##### 4.2.4.2 Recherche de l'uréase

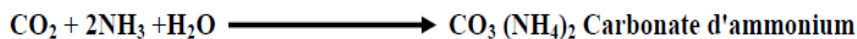
Toutes les bactéries hydrolysent l'urée grâce à la réaction suivante:



Seule, une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



Le CO<sub>2</sub> et le NH<sub>3</sub> en présence d'eau se combinent en donnant le carbonate d'ammonium selon la réaction:



un précipité noire de sulfure de fer. Le précipité peut être redissous en milieu acide (**Joffin et Lyerl, 2006**).

#### 4.2.4.3 Milieu TSI (glucose-lactose –saccharose –H<sub>2</sub>S)

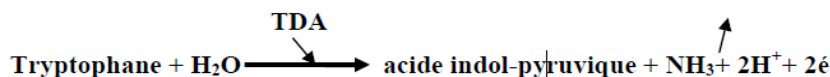
A l'aide d'une anse contenant des colonies prélevées, on ensemence la pente, puis le culot du tube par piqûre centrale. L'incubation se fait à 37°C ± 1°C pendant 48 à 72 heures. Une coloration jaune de la pente, indique un lactose positif. Une coloration jaune du culot montre un glucose positif. Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique un saccharose positif. Ce test permet également la production de H<sub>2</sub>S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de gaz (bulles dans la gélose) (**Marchal et al.,1991**).

#### 4.2.4.4 Production d'indole

Ce test s'effectue en utilisant un milieu riche en tryptophane exempt d'indole (ou milieu urée-indole). L'indole produit par la bactérie est mis en évidence par le réactif de Kovacs (**Marchal et Bourdon, 1982**)

#### 4.2.4.5 Recherche de la tryptophane-désaminase (TDA)

La désaminase agit sur le L- tryptophane en donnant l'acide indol-pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brune (**Marcaal et Bourdon,1982**) selon la réaction:



## 5 Sélection des bactéries par utilisation de milieux de culture spécifiques

### 5.1 Croissance sur Cétrimid agar

Le milieu de gélose au Cétrimid agar est un milieu sélectif pour *P.aerogénosa*. Lorsqu' il est incubé à 42°C, les colonies apparaissent muqueuses et vertes (Joffin et Lyerl, 2006).

### 5.2 Mise en évidence de la production de pigments spécifiques

Les milieux King A et King B permettent de distinguer les espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigments spécifiques. La production des pigments est favorisée par la composition du milieu (Marchal et Bourdon, 1982). Ensemencer une boîte de milieu King A et une boîte de milieu King B, en réalisant des stries puis les Incuber à 30 °C pendant 24 h. Sur le milieu King A, le pigment pyocyanine produit permet l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert. Alors que sur le milieu King B la production du pigment pyoverdine est favorisé, ce pigment jaune verdâtre fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*). La pyoverdine se manifeste par une coloration vert fluorescent du milieu de culture.

### 5.3 Milieu de Chapman

Le milieu de Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse croître au bout de 24 à 48 heures que les staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de NaCl jusqu'à 7,5% (qui inhibe pour cette raison, la plupart des autres germes). Ce milieu sélectif est rendu différentiel par l'addition de Mannitol à 1% et d'un indicateur d'acidité, le rouge de phénol. Ce dernier permet à la fois d'isoler les staphylocoques fermentant le Mannitol à partir d'un prélèvement contenant un mélange de germes et nous oriente vers *S. aureus* ou une autre espèce de *staphylococcus* fermentant le Mannitol (Couture,1990).

### 6.Test coagulase

L'identification de staphylocoque est basée sur la mise en évidence de la coagulase à partir de plusieurs colonies prélevées sur milieu MH.On ajoute 0,5 ml de plasma de lapin et le mélange est incubé à 37 °C puis examiné périodiquement jusqu'à 24 heures d'incubation. La présence de coagulase se traduit par une prise en masse du milieu . (Michel,2005).

### 7. API20E (bioMérieux)

La galerie API 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) composée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée est utilisée selon les recommandations décrite par le fabricant . Les microtubes de la galerie API 20E sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 30°C à un intervalle temps de 48 h. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages

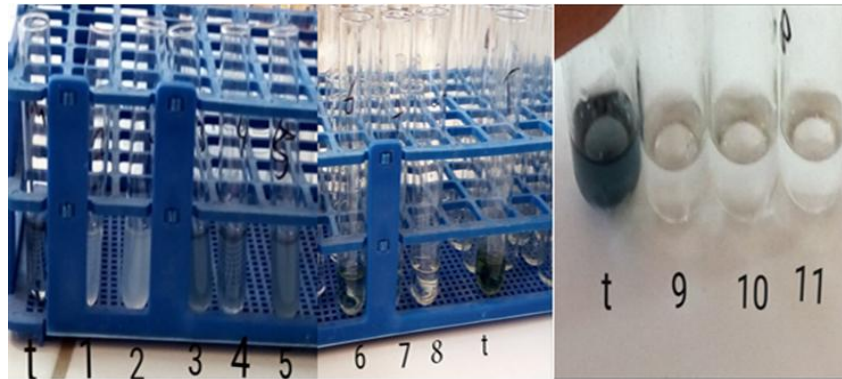
colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (**Emanuel et Lorrence, 2009**). L'identification se fait à l'aide d'un Logiciel d'identification microbienne. **LABO EN LIGNE, 2009**.

## **Partie II:**

### **Résultats et discussion**

### 1. Test de biodégradabilité du phénol

Les résultats de la culture des bactéries isolées à partir du sol contaminé par les hydrocarbures dans un milieu minéral additionné de phénol à 120 mg/L comme source de carbone et d'énergie montre que seulement sept souches bactériennes sont capables de pousser dans ce milieu. Le dosage colorimétrique du phénol par la méthode de Folin Ciocalteu montre que les bactéries transforment totalement le phénol qui se trouve dans le milieu minéral (Figure 12).



**Figure 12:** Résultats du dosage colorimétrique du phénol après incubation des bactéries isolées à 37°C pendant 48 heures.

Nous avons montré également que les bactéries isolées sont capables aussi de croître dans un milieu contenant des teneurs élevées en phénol (200 mg/L). On peut dire qu'il s'agit de souches bactériennes hypertolérantes.

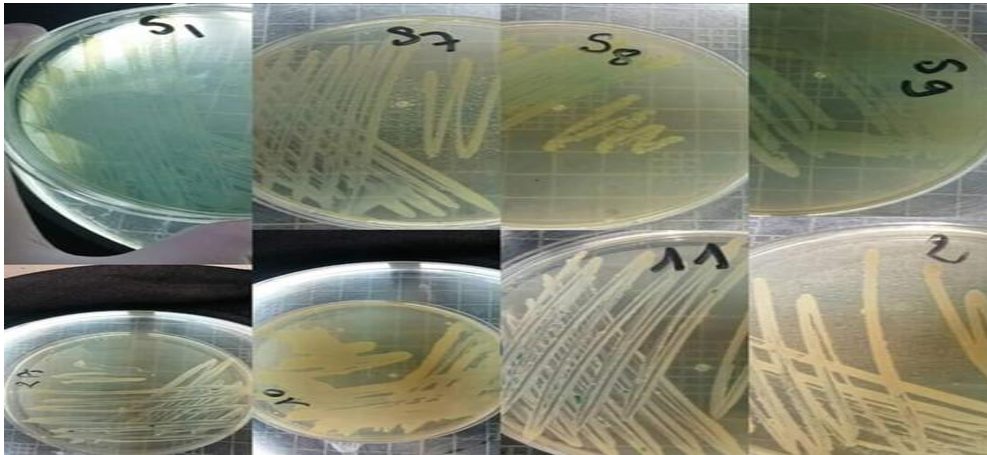


**Figure 13 :** Résultats de tolérance des bactéries au phénol (200 mg/L).

## 2. Etude morphologique

### 2.1 Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des colonies a permis d'effectuer une première caractérisation. Le repiquage des 7 isolats sur le MH (Figure 14), nous a permis aussi d'étudier l'aspect des colonies. Après ensemencement des bactéries purifiées sur MH, on a observé une variabilité au niveau de la couleur, de la forme, de la surface (Tableau 3).



**Figure 14 :** Aspect macroscopique des colonies des bactéries isolées.

**Tableau 3 :** Aspect macroscopique des colonies des bactéries isolées.

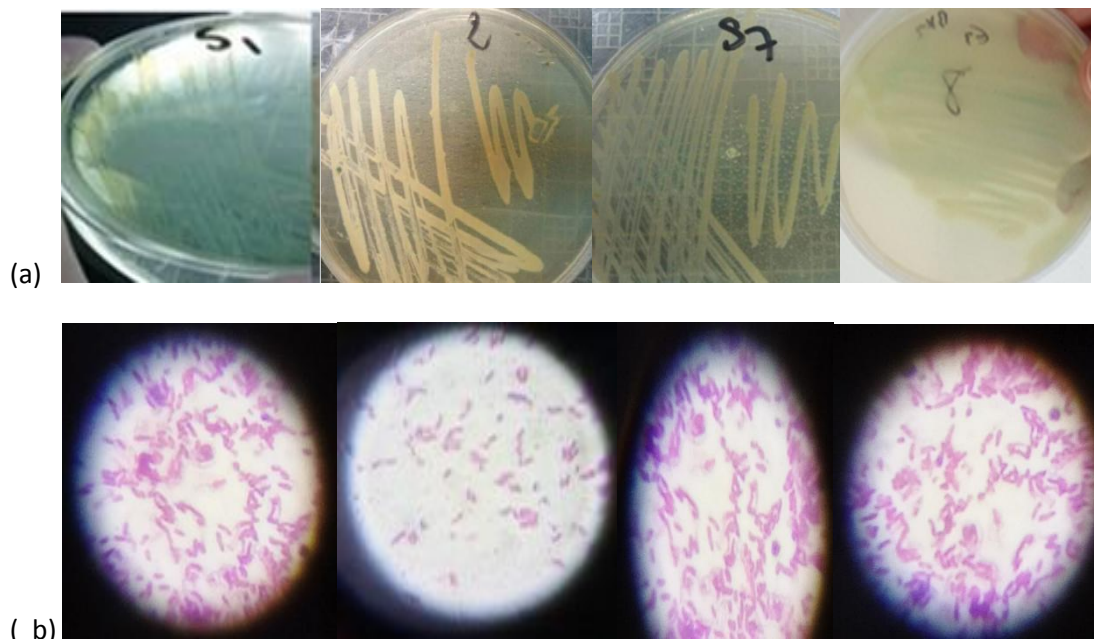
<i>Critère</i>							
<i>Souche</i>	<i>Chromogénèse</i>	<i>Forme</i>	<i>Elévation</i>	<i>Contour</i>	<i>Opacité</i>	<i>Surface</i>	<i>Consistance</i>
<i>S1</i>	Vert	Ovale	Convexe	Irrégulier	Translucide	Brillante	Muqueuse
<i>S2</i>	Beiges	Ronde	Bombée	Irrégulier	Opaque	Lisse	Muqueuse
<i>S7</i>	Beiges	Ronde	Convexe	Irrégulier	Translucide	Brillante	Muqueuse
<i>S8</i>	Vert	Ovale	Convexe	Irrégulier	Translucide	Brillante	Muqueuse
<i>S9</i>	Vert	Ovale	Convexe	Irrégulier	Translucide	Brillante	Muqueuse
<i>S10</i>	Beiges	Circulaire	Bombée	Régulier	Opaque	Lisse	Crémeuse
<i>S11</i>	Beiges	Ronde	Bombée	Irrégulier	Opaque	Brillante/ Lisse	Crémeuse

## 2.2 Aspect microscopique des souches isolées

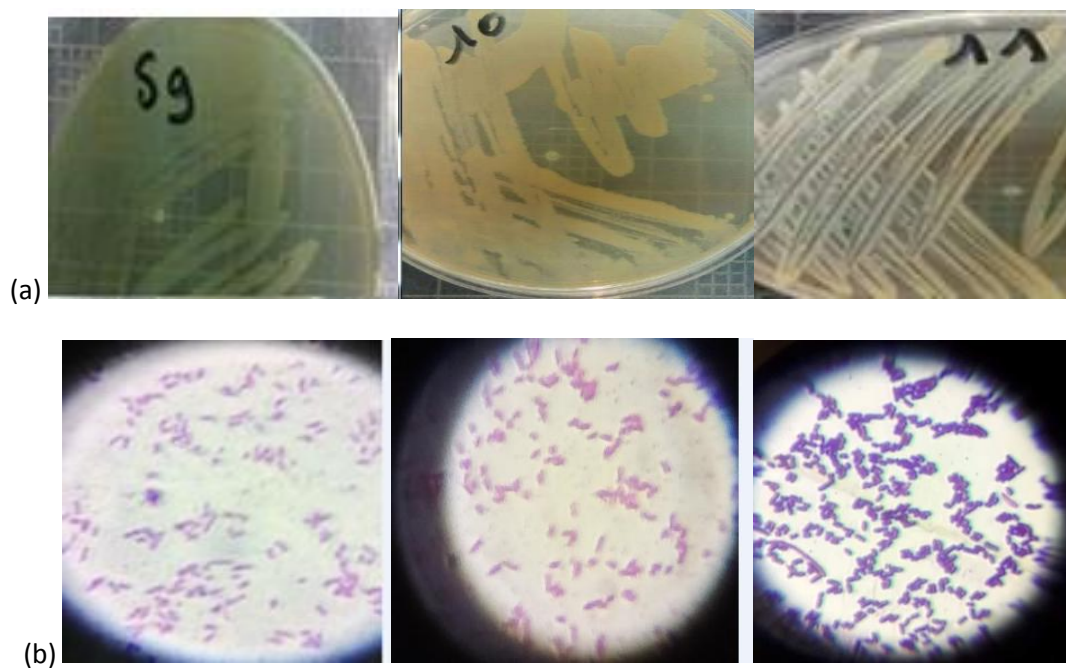
Les résultats de la coloration du Gram sont consignés dans le tableau (4). Les bactéries isolées appartiennent aux groupes des bactéries à Gram (+) et à Gram (-) ayant des formes différentes : bacille, coccobacille ou cocci (Figures 15 et 16). Elles sont assemblées en différents arrangements soit en paire, en amas, en chaînettes en grappe de raisin, ou même isolées.

**Tableau 04 :** Aspects microscopiques des souches isolées.

<b>Isolat</b>	<b>Gram</b>	<b>Test KOH</b>	<b>Forme</b>	<b>Arrangement</b>
<b>S1</b>	-	+	Coccobacille	en amas
<b>S2</b>	-	+	Bacille	
<b>S7</b>	-	+	Coccobacille	en amas
<b>S8</b>	-	+	Coccobacille	en amas
<b>S9</b>	-	+	Coccobacille	en amas
<b>S10</b>	-	+	Bacille	En amas, en paire
<b>S11</b>	+	-	Cocci	en amas ou en grappe de raisin.



**Figure15** :Aspects macroscopiques (a) et microscopiques (b) des souches bactériennes S1, S2, S7et S8.



**Figure16** :Aspects macroscopiques (a) et microscopiques (b) des souches bactériennes S9, S10 et S11.

### 2.3. Caractéristiques biochimiques des bactéries isolées

Les résultats des tests biochimiques effectués sur sept isolats bactériens sont regroupés dans le Tableau 5.

**Tableau 5 :** Résultats des tests biochimiques réalisés sur les isolats bactériens S1, S2, S7, S8, S9, et S11.

S1	S2	S7	S8	S9	S10	S11	Souches/test	
-	-	-	-	-	-	+	Gram	
+	+	+	+	+	+	+	Catalase	Enzymes respiratoires
+	-	+	+	+	-	-	Oxydase	
-	+	+	-	-	-	+	Mannitol	Métabolismes glucidique
+	-	+	+	+	+	-	Mobilité	
+	+	+	+	+	+	/	Citrate Perméase	
+	/	/	+	+	+	/	Glu	
-	-	-	-	-	-	/	H <sub>2</sub> S	
-	/	-	-	-	/	/	Saccharose	
-	+	-	-	-	+	/	(ONPG)	
-	-	/	-	-		/	Lactose	
-	/	-	-	-	+	/	LDC	
+	/	+	+	+	+	/	ADH	
+	/	-	+	+	+	/	ODC	Métabolisme protéique
+	+	-	+	+	-	/	Uréase	
+	/		+	+	-	/	TDA	
-	/	-	-	-	-	/	IND	
-	/	-	-	-	/	/	MEVAG	
-	/	-	-	-	/	/	TINIA	
-	/	-	-	-	/	/	ESCULINE	
/	/	/	/	/	/	+	Coagulase	
+	/	-	+	+	-	/	King A	Milieux Spécifique
+	/	+	+	+	-	/	King B	
+	/	-	+	+	/	/	Cétrimid	
/	/	/	/	/	/	+	Chapman	

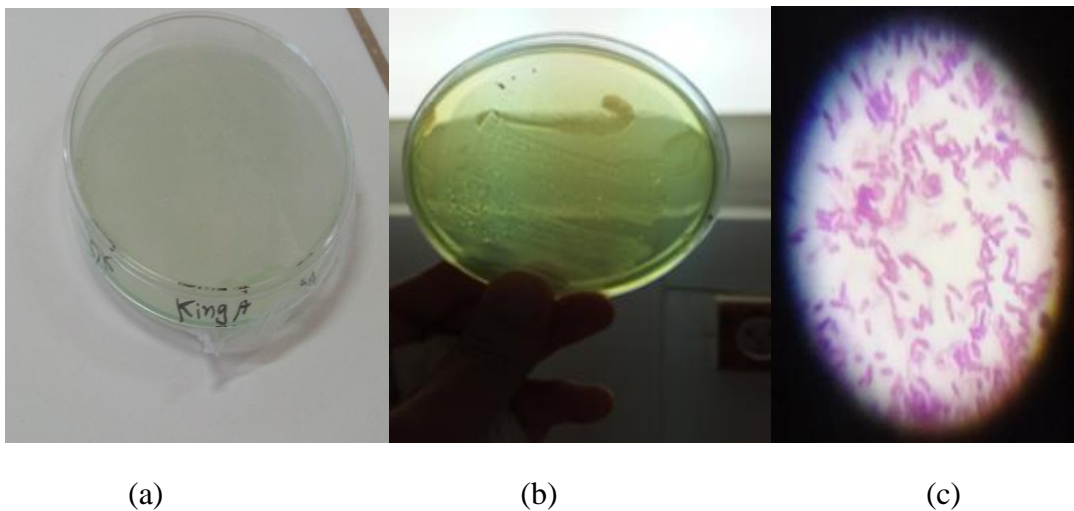
+ :résultat positif , - : résultat négatif , / : non effectué

L'identification biochimique a pu être réalisée à l'échelle du genre ou de la familles selon Bergey's Manual of Determinative Bactériology (Brenner et al., 2009; De Vos et al., 2009) comme appartenant aux genres suivants :

### 2.3.1. *Pseudomonas*

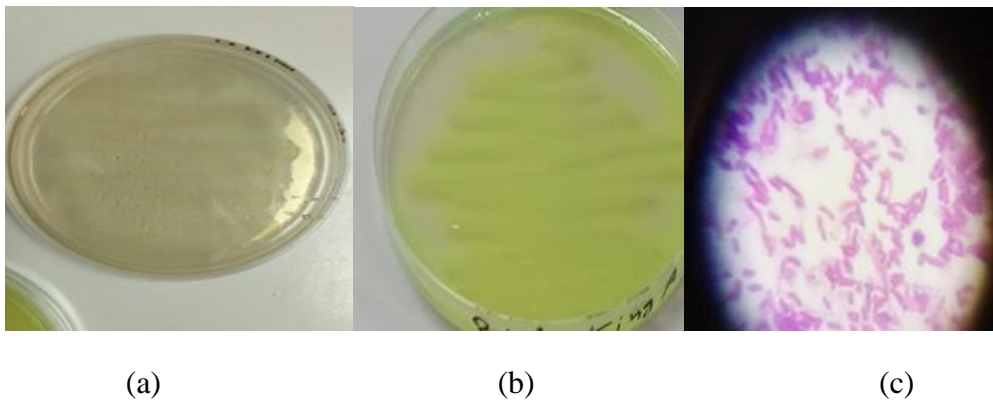
D'après les examens macroscopique et microscopique, les souches S1, S7, S8, S9 sont translucides lissent et brillantes et donnent une pigmentation verte sur milieu MH, avec une forme coccobacilles (Figure17), isolées ou en amas avec les caractéristiques suivantes : Gram négatif, oxydase positive et catalase positive. Ces résultats nous ont orientés vers la culture des souches spécifiques de *Pseudomonas* (Madigan et Martinko, 2010 ; Singleton, 1999).

Le repicage de ces souches sur milieu King A et King B, donnent respectivement une couleur bleu verte et un jaune verdâtre fluorescent. Ces bactéries ont un ADH et citrate positif et une ODC positives et produit de la pyocyanine et de la pyoverdine. Ces caractères nous suggèrent qu'il s'agit de *P.aerogenosa* (souches S1, S8, S9) (Marchal et al., 1991 ; Singleton, 1999).



**Figure 17** : L'aspect macroscopique (a : King A, b : King B) et (c) microscopique de l'isolat S1.

Permet de dévoiler un caractère distinctif d'espèce chez l'isolat S7. Cette dernière est incolore dans le milieu King A et elle a une couleur jaune dans le milieu King B (Figure 18). A côté de ce paramètre, les caractères biochimiques permettent de déduire que cette souche correspondrait à *P. fluorescens* (Marchal et al., 1991 ; Singleton, 1999). Les résultats des tests biochimiques obtenus suite par l'isolat S7 de la galerie API 20 E (Figure 19) montrent que cette souche appartient à *P. fluorescens*.



**Figure 18:** Aspect macroscopiques (a : King A, b : King B) et C microscopie (d) de *P. fluorescens*



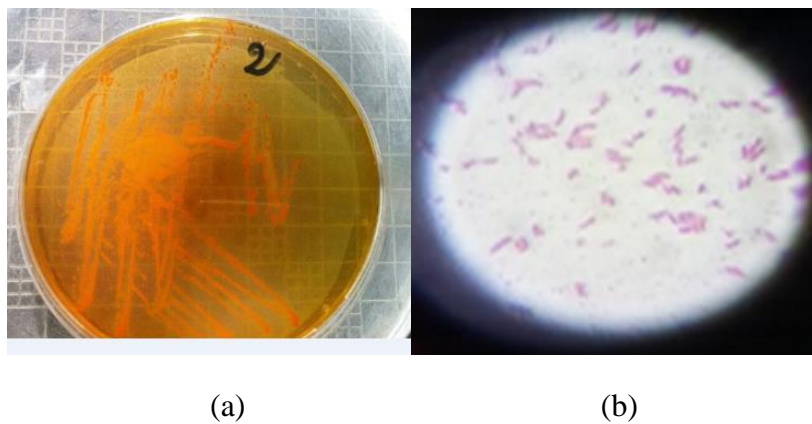
**Figure 19:** L'identification de *P. fluorescens* par galerie API 20 E

Les principaux microorganismes ainsi identifiés et qui seront étudiés dans la dégradation du phénol sont : *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas corrugata* (Heinaru et al., 1999). *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Ralstonia*, (Sahar zaki, 2006).

### 2.3.2. *Klebsiella*

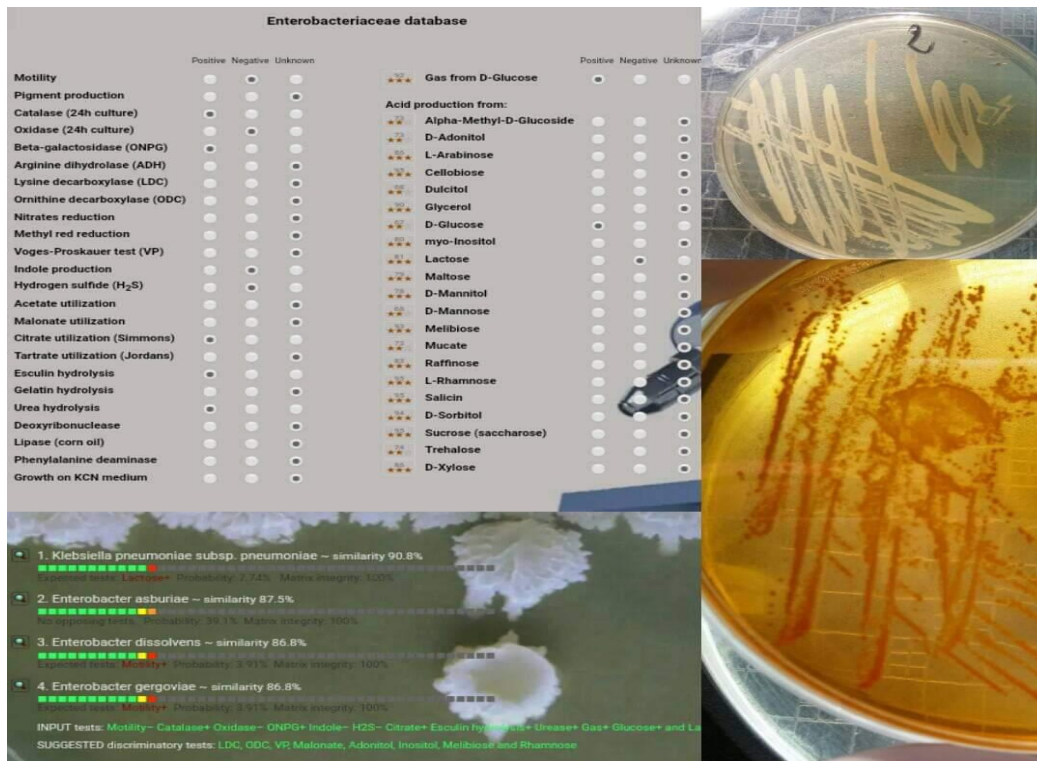
L'aspect des colonies sur milieu Hektoen sont paraissent un couleur vert au jaune-oronge, sous formes de grosses colonies muqueuses, bombées, ayant un aspect d'une goutte de miel, Les résultats obtenus par observation microscopique après coloration de Gram (Figure20), montre que la souche est de bacille à Gram négatif. D'après l'examen microscopique cette souche se présente sous forme de bacille coloré en rose. Donc c'est un bacille à Gram négatif, oxydase négative, catalase positive.

Il est possible de connaitre certaines caractéristiques du métabolisme de la bactérie analysée grâce aux galeries biochimiques classiques. Les résultats qu'on a obtenus montrent qu'après l'incubation de Milieu TSI, et du milieu citrate de Simmons. Il c'est avéré que la souche 2 dégrade le lactose, le saccharose, glucose, l'urée et produit le gaz H<sub>2</sub>S, avec utilisation du citrate comme seule source de carbone. De plus, cette souche est indole négatif, ODC négative, ADH négative, citrate perméase positive, ONPG positive, immobile.



**Figure 20:** l'aspect macroscopique(a) et microscopique (b) de *Klebsiella pneumoniae*.

D'après les résultats précédent et ceux trouvé part plusieurs auteurs (Alves et al., 2006 ; Nkang et al., 2009 ; Gueye, 2007) la souche S2 est *Klebsiella pneumoniae*.



**Figure 21 :** Confirmation les résultats d'identification *Klebsiella pneumonia* par logicielle LABO EN LINGE 2009.

Farshid et Sedigheh (2013) ont trouvé aussi que les bactéries *Klebsiella pneumoniae* et *pseudomonas aeruginosa* isolées à partir du sol tolèrent des concentrations élevées en phénol (1000 mg/l).

### 2.4.3. Serratia

En se basant sur les tests biochimiques et l'observation microscopiques, la souche S10 est un bacille à Gram négatif, oxydase négative et catalase positive. Elle est positive pour la réaction de ONPG (+) mais elle ne possède pas l'arginine dihydrolase (ADH), la Tryptophan Deaminase (TDA), et l'uréase. Elle ne peut pas produire le gaz d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) (Figure 22). Il s'agit donc d'une bactérie du genre *Serratia* (Washington, Winn et al., 2005).

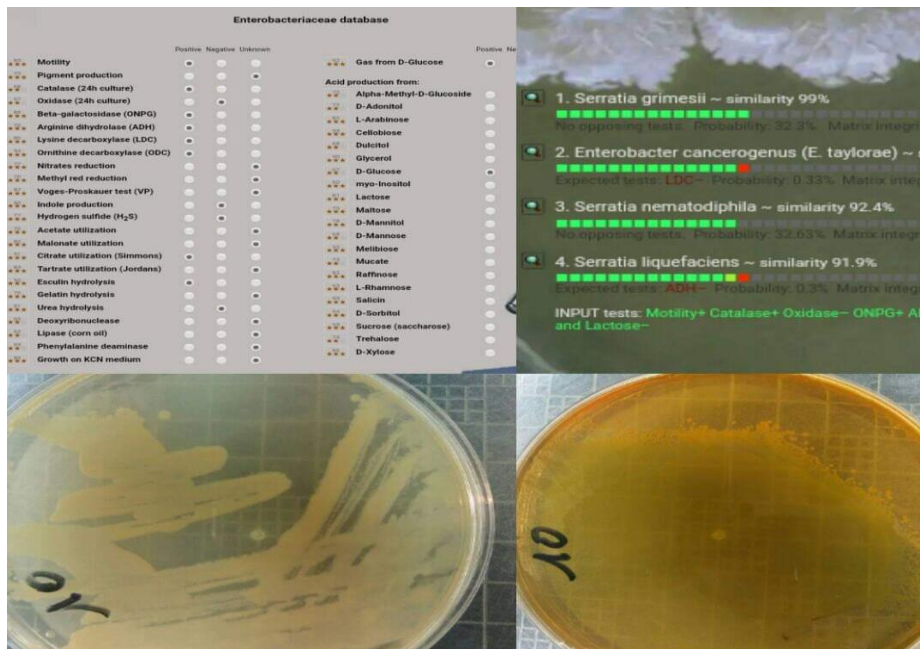
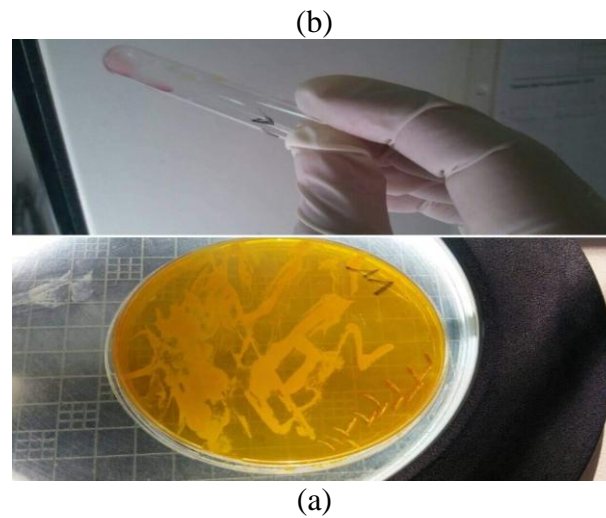


Figure22 : L'identification de souche 10 par galerie classique de *Serratia*

D'après **Zhang et al. (2010)** les *Enterobactériacaea* notamment *Enterobacter sp.* et *Serratia sp.* isolées à partir du sol contaminé par les hydrocarbures peuvent dégradées les hydrocarbures pétroliers.

#### 2.4.4. *Staphylococcus*

Sur le milieu de culture Chapman les colonies de la S11 apparaissent pigmentées de couleur dorée et de forme arrondies à bords réguliers des cocci. Gram positif en grappe de raisin Sur ce milieu, catalase +, et oxydase -. Cette souche a un aspect macroscopique caractéristique du genre *Staphylococcus* (Figure23). Le développement bactérien sur le milieu de Chapman ne constitue qu'une indication d'autres bactéries (Entérocoques) peut y cultiver. (**Carbonnelle, 1990**). Cette souche est capable de produire une coagulase avec un phénotype variable (Figure23). **D'après Alidjinou (2008)** ces caractéristiques correspondent parfaitement à celles de *Staphylococcus aureus*.



**Figure 23:** Aspect des colonies macroscopique de *S. aureus* sur milieu Chapman (a) et (b) Résultat du test de coagulase libre.

D'après les données cités dans la littérature, plusieurs espèces bactériennes isolé à partir d'un site contaminé par le pétrole et les dérivés pétroliers sont capables de dégrader le phénol comme seule source de carbone et d'énergie (**Emtiazi et al., 2005 ; Sahar zaki, 2006 ; Varma et al.,2008 ; Zlatka et al., 2007 ; Sgountzos et al., 2006**). Dans une étude menée par **Naresh et al. (2012)** rapportent que l'isolement de *Staphylococcus aureus* dans un effluent dégrade totalement le phénol à 1000 mg/L pendant 7 jours . **Prasanna et al. (2008)** ont noté que la dégradation de 43,94 % de 100 mg /l de phénol en 120 heures (**Ahmad et al., 2016**).

*Conclusion*

La pollution des sols est principalement issue d'une extraction, transformation et utilisation des produits pétroliers dans des différents domaines (industrielle, pharmaceutique, agroalimentaire.. etc). La station de service des carburants constitue un milieu naturel pour la recherche d'une nouvelle flore bactérienne capable de dégrader les polluants organiques tels que les hydrocarbures aromatiques.

Durant cette étude, nous avons pu isoler et identifier des bactéries à partir d'un sol fortement pollué par les hydrocarbures. Ces bactéries peuvent être exploitées dans la remédiation des eaux et des sols contaminés par des polluants organiques.

En se basant sur les caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques nous avons présumé les genres bactériens suivants, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *K. pneumoniae*, *Serratia sp*, *S. aureus*.

Le test de biodégradation a révélé que *Pseudomonas aeruginosa* est la souche la plus dominante qui possède le pouvoir de dégradation le plus élevé.

Notre travail de recherche, est très pertinent et mérite d'être complété par d'autres activités de recherches, telles que :

- Identification moléculaire des espèces microbiennes peuplant un site pollué par les hydrocarbures.
- L'identification des souches responsables de la biodégradation des hydrocarbures parmi les communautés naturelles totales et y identifier les enzymes impliqués .
- La détermination des gènes codant les enzymes impliquées dans la dégradation du phénol ceci grâce à l'application des méthodes de biologie moléculaire (PCR).

*Références  
bibliographique*

- Abraham, A.J. (1972).** A casa of carbollic acid gangrene of the thumb. *Br J Plast S Urg* , V25, p282-284.
- Afissa, H. (2014).** Etude de l'antibiorésistance des souches de Staphylocoques isolées à partir des dispositifs médicaux à l'hôpital de Mohamed Boudiaf Ouargla. Mémoire Master.Université Kasdi Merbah-Ouargla,P31.
- Ahmad, N., Ahmed, I., Idbal, M., Khalid, N., Abbas, S., Mehboob, F., Ahad, K. (2016).** Biodegradation of phenol by *Stenotrophomonas sp* and *Staphylococcus sp.* isolated from contaminated sites. *Applied Ecology and Environmental research* ,V14,p107-120.
- Alidjinou, E.K. (2008).** Caractérisation des souches de *Staphylococcus* isolées dans les infections cutanées de l'enfant à Abidjan .Mémoire en vue de l'obtention du Certificat d'études spéciales de Cocody .Abidjan Cote d'Ivoire,p52.
- Alves, M.S., Rubens, C.S.D., De Castro, A.C.D., Riley, L.W., Moreira, B.M. (2006).** Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella spp.* *Journal of Clinical Microbiology*,V44,p3640-3646.
- Amellel, N., Berthelin, J., Porta, J.-M., and Vogel, T. (2001).** Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. Biodegradation.
- Ansart, S., Xavier, N., Yvon, L., Pennec, Michel, G. (2005).** Quand - utiliser une fluoroquinolone systémique , Revue 29609 Brest Cedex.
- Ansu. (1998).** L'Analyse du sol , échantillonnage , instrumentation et contrôle. Editions Masson -Paris .
- Aouati, H. (2009).** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* resistances à la méthicillines: etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Département De Biochimie et De Microbiologie-algerie,p94.
- Baek, K.H., Yoon, B.D., Kim, B.H., Cho, D.H., Lee, I.S., Oh, H.M. et Kim, H.S. (2007).** Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude OH-contaminated soil with different treatments. *J Microbiol Biotechnol*,V17,p67-73.
- Bankolé, H.S., Dougnon, T.V., Fiogbé, E.P., Amoussou, A.N., Baba-Moussa, L. (2014).** Identification de *Staphylococcus aureus* : es t-il possible de réduire le volume de plasma de lapin sans influencer la recherche de la Saphylocoagulase libre ?
- Bared, R., Boucheta, A., Chaib, M., Kacimi, S. (2010).** Phenol and Benzoic Acid Degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Water Resource and Protection* ,pp788-791.
- Barriuso. (1996).** Les pesticides et les polluants organiques des sols : transformation et dissipation , Forum le sol un patrimoine menace - Paris,pp 279-295 .
- Batah, R. (2016).** Identification et profil de résistance de *Serratia marcescens* aux antibiotiques.Thèse de doctorat ,Université Badji Morkhtar -Annaba.
- Bekenniche, N. (2014).**Caractérisation des activités de biodégradation des hydrocarbures par différents genre microbiens isolés de sites contaminés .Mémoire de Magister.Université Ahmed benbella-Oran,p102.
- Belmenai, M., et Benhafed , N. (2015).** Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes .Mémoire de Master.Université des frères Mentouri-Constantine ,p66.
- Benchouk, A. (2017).** Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les micro-organismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir.Mémoire de doctorat.Université Ibn badis –Mostaganem,p135.
- Bidaud, C. (1998).** Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques Approche Microbiologique et Application au Traitement d'un sol pollué.Thèse de

- doctorat.Génie des procédés , Ecole nationale supérieure des mines de saint-etienne-France,p229.
- Blifert., et Perraud. (2004).** Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchet. De Boeck université,P369 ,372-375.
- Bosch, R., Garcia-Valdes, E., Moore, E.R. (1999).** Genetic characterization and evolutionary implications of a chromosomally encoded naphthalene –degradation upper pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN10.Gene,V236,p149-157.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Haeseler., F, et Vandecasteele, J.P. (1996).** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement – Propriétés , origines , devenir .Revue de l'Institut Français du pétrole ,V51, p3.
- Bouderhem, A. (2011).**Utilisation des souches bactériennes autochtones dans la biodégradation et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Magister. Université Kasdi Merbah-Ouargla,p49
- Boughachiche, R., et Sebais., S. (2016).**Caractérisation morphologique, biochimique et mutagénèse des *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine .Mémoire de Master .Université Mentouri -Constantine.
- Brenner, Don, J., Noel, R., Krieg., et James., T. Staley. (2009).** Bergey's Manual of systematic bacteriology (2 ed., Vol. II), Springer Dordrecht Heidelberg London New York, p1106.
- Calvario-Rivera, C., Gabriela, A., Va'zquez-Rodri'guez., Gilles, R., Julio Weissman-Vilanova. (2008).** Modélisation de la cinétique de biodégradation de phénol par granules aérobies, the canadian journal of chemical engineering, V86,p15–22.
- Calvet. (1980).** Adsorption of organic chemicals in soils , Environmental Health Perspectives ,V83,p145-177 .
- Carbannelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., and Vargues., R. (1990).** Bactériologie médicale «Techniques usuelles» 3ème tirage SIMEP-Paris,P105-108.
- Carleen, M.C., Delia, M.G., Heike, L. (2006).** Identification of a nitrogen-regulated promoter controlling expression of *Klebsiella pneumoniae* urease genes. Molecular Microbiology ,V8, P187-198.
- Carlone, GM. (1983).** Methods for Distinguishing Gram-Positive from Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol*, p1157-1159.
- Chaala, W. (2013).** Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* isolée de produits alimentaires. université d'Es-senia Oran-Algerie.
- Chibi, A. (2015).** Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen.Mémoire de Master ,Université Aboubekr belkaid-Tlemcen,p62.
- Couture., B. (1990).** Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot-Paris. p15-32.
- Daane, L., Harjono, I., Zylstra, G.J., Haggblom., M.M. (2001).** Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants .*Appl. Environ. Microbiol*, V67,p2683-2691.
- Daffri, A., Harzallah, B., et Bousseboua, H. (2014).** Biodegradation of High Concentration of *p*-Nitrophenol (PNP) by Wastewater Microflora, Journal of Agricultural Science and Technology A ,V4 ,P300-306.
- Delarras, C. (2007).** Microbiologie Pratique Pour Le Laboratoire D'analyses Ou de Contrôle Sanitaire, 1ère édition, Paris : Edition tec et doc, p476.
- Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C.É., Bingen., et Quentin., R. (2011).** Bactériologie médicale. 2eme édition. Elsevier Masson-Paris, p191.

- De Vos, P.G.M., Garrity, D., Jones, N.R., Krieg, W., Ludwig, F.A., Rainey, K.H., Schleifer, et W.B. Whitman. (2009).** Bergey's manual of systematic bacteriology (2 ed., Vol. III). Springer Dordrecht Heidelberg London New York, p1422.
- Dreisbach, R. H. (1983)-** Handbook of poisoning : prevention , diagnosis and treatment , Lange Medical Publication .Los Altos , California, p: 401-405.
- Duchaufour, P. (2001).** Introduction à la science du sol – Sol , Végétation ,Environnement , 6ème Edition de l'Abrégé de pédologie , DUNOD sciences -Paris , p331 .
- Emanuel, G., et Lorrence, H. G. (2009).** Practical handbook of microbiology. CRC press. USA, p853.
- Foughali, O., et Chial, H. (2016).** Isolement et caractérisation de microorganismes capables de dégrader l'herbicide Apyros (sulfuron) à partir d'un sol agricole contaminé par le même herbicide.
- Fuenmayor, S.L., Wild, M., Boyes, A.L., Williams, P.A. (1998).** A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas sp* . strain U2.*J.Bacteriol*, V180,p2522-2530.
- Galet, P., Luc, B., JAN, J. (2009).** Bactériologie médicale tropicale, P8.
- Goyal, A.K., Zylstra, G.J. (1997).** Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni* .*J.Indus .Microbiol .Biotechnol*,V19,P401-407.
- Gregersen, T. (1978).** Rapid Method for Distinction of Gram-negative From Gram- positive Bacteria. *Appl Microbiol Biotech*, p123-127.
- Grimm, A.C., Harwood, C.S. (1999).** NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene .*J.Bacteriol* ,V181,p3310-3316.
- Grosser, R.J., Warshawsky, D., Vestal, J.R. (1991).** Indigenous and enhanced mineralization of pyrene,benzo(a)pyrene and carbazole in soils. *Appl Environ. Microbiol*, V012,p3462-3469 .
- Grund, A.D., Gunsalus, I.C. (1983).** Cloning of genes for naphthalene metabolism in *Pseudomonas putida* .*J.Bacteriol*,V156,p89-94.
- Guergouri, I. (2010).** Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de skikda) et productrices des biosurfactants .Mémoire de Magistère .Université Mentouri -Constantine ,p74.
- Guermouche, M'rassi, A. (2014).** Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures . Thèse de doctorat.Université Ahmed ben bella-Oran,p153.
- Gueye, O. (2007).** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles a Gram négatif, V27,p 28-44.
- Haddad, N., et Boudjada, Y. (2015).** Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes à partir de sols pollués dans la région de Hassi Messaoud .Mémoire de Master .Université des frères Mentouri –Constantine,p61.
- Hamdi, B., et Rezzoug, A. (2015).** Isolement et identification des bactéries à partir d'un site contaminé par les dérivées pétroliers.Mémoire de Master.Université Amar thelidji-Laghouat,p46.
- Haritash, A. K. et Kaushik, C. P. (2009).** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*,V169,p1–15.
- Heitkamp, M.A., Franklin, W., Cerniglia, C.E. (1988).** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium.*Appl.Environ.Microbiol*,V54,p2549-2555.
- Heitkamp, M.A., Freeman, J.P., Miller, D.W., Cerniglia, C.E. (1988).** Pyrene degradation by a *Mycobacterium* identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ.Microbiol* , V54 ,P2556-2565 .

- Illiaquer, M. (2010).** Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches cliniques de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération, hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U. de Nantes.
- Itab. (2002).** Activités biologique et fertilité du sol, P23.
- Jarlier, V., Nordmann, P. (2000).** Entérobactéries et bêta-lactamines. In Freney J, Renaud F, Hansen W, Botler C. Précis de bactériologie clinique. Ed -Paris; ed ESKA ,p649-665.
- Jeannot, R. (2001).** Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués , édition BRGM -France .
- Joce. (2004).** Commission Directive 2004/73/EC , 29th time Council directive 67/548EEC. *Official Journal of the European Communities* .
- Joffin, J.N., et Leyral, G. (2006).** Microbiologie technique, Tome1 : Dictionnaire des techniques, 4ème édition. Edition CRDP d'aquitaine,P368.
- Johnsen, A. R., Bendixen, K., Karlson, U. (2002).** Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-*Appl.Environ.Microbiol*,V68,p2683-2689.
- Joly, B., et Reynaud, A. (2002).** Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic,P79-80-83.
- Juhasz, A.L., Naidu, R. (2000).** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons : a review of the microbial of benzo [a]pyrene .*International Biodeterioration and Biodegradation* ,p45: 57-88.
- Kafilzadeh, F., and Mokhtari, S. (2013).** Isolation and identification of phenol degrading bacteria from mangrove sediments in the Persian gulf ( Asaluyeh) and their growth kinetics assay .*Biomedical & Pharmacology Journal*,p6: 189-196.
- Kästner, M., Breuer-jammali, M., Mahro, B. (1994).** Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol*,p 41: 267-273.
- Khan, A.A., Wang, R.F., Cao, W.W., Doerge, D.R., Wennerstrom, D., Cerniglia, C.E. (2001).** Molecular cloning.nucleotide sequence , and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium sp* .strain PYR-1.*Appl.Environ Microbiol*,p67: 3577-3585.
- Kim, S.J., Kweon, O., Freeman, J.P., Jones, R.C., Adjei, M.D., Jho,J,W., Edmondson R.D., Cerniglia, C.E. (2006).** Molecular Cloning and Expression of Genes Encoding a Novel Dioxygenase Involved in Low- and High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR- 1.*Applied and Environmental Microbiology*,p72: 1045-1054 .
- Kiyohara, H., Nagao, K., Yana, K. (1982).** Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol*,p43: 454-457.
- Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C., Jouanneau Y. (2003).** Identification of pyrene -induced proteins in *Mycobacterium sp* .strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases .*J.Bacteriol*,p185: 3828-3841 .
- Kurkela, S., Lehvaslaiho, H., playa, E.T. (1988).** Cloning , nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816.*Gene*,p 73: 355-62.
- Lansing, M., Prescott, L., Klein, M., Sherwood, C., Woolverton. (2010).** Microbiologie 3 ème édition , p113.
- Larkin, M.J., Allen, C.R., Kulakov, L.A., Lipscomb, D.A. (1999).** Purification and characterisation of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus sp* .Strain NCILB12038.*J.Bacteriol*,p181: 6200-6204.

- Laurie, A.D., Lloyd-Jones, G. (1999).** The phn genes of Burkholderia sp . strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *J.Bacteriol*,p181: 531-540.
- Lecomte, P. (1995).** Les sites pollués , traitement des sols et des eaux souterraines .Edition Lavoisier ,TEC &DOC ,p198.
- Lecoz. (1998).** Transfert des polluants dans les hydrosystèmes .Edition Presse de l'école nationale des ponts et chaussées -Paris .
- Lefebvre, G. (1978).** Chimie des hydrocarbures. Cours de l'Ecole Nationale Supérieure du Pétrole et des Moteurs. *Edition Technip-Paris*,P13-60.
- Madigan, M., et Martinko, J. (2007).** Biologie des microorganismes 11e édition Pearson education, traduction française coordonnée par Daniel prieur, P269.
- Marchal, N., et Bourdon, J.L. (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin-Paris.
- Marchal, N., et Bourdon, J.L., Richard. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries, 4 ème édition, p32, 39, 264, 293, 294, 269, 270, 261, 262, 263, 265, 266, 230, 117, 118, 104, 105.
- Marchal, R., Peet, S., Solano-Serena, F., and Vndecastelej, P. (2003).** Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science and technology*,p58: 441-448.
- Meyer, A., Deiana, J., Bernard, A. (2004).** Cours de microbiologie générale ; 2ème édition ,p118.
- Meziani, M. (2012).** Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentes phylogénétiques : cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. P: 39-41-45.
- Morrison, J.E., Matthews, D., Washington, R., Fennessey, P.V., and Harrison, M. (1991)-** Phenol motor blacks in children : plasma concentrations and cardiac dysrhythmias. *Anesthesiology* , p75: 359-362 .
- Nauciel, C. ( 2000).** Bctériologie médicale,P55-64 .Ed Masson.
- Nkang, A.O., Okonko, O.I., Fowotade, A., Udeze, A.O., Ogunnusi, T.A., Fajobi, E.A. (2009).** Antibiotics susceptibility profales of bacteria from clinical samples in Calabar, Nigeria. *J. Bacteriol. Res* 1,P89-96.
- Noumeur, S. (2008).** Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna).Mémoire de Magister. Université Mentouri -Constantine.
- Olivier, B., et Magot, M. (2005).** Petroleum Microbiology, Edition illustrée, Edition ASM Press.
- Ouladrabeh, N. (2012).** Essai de phytoremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures.Mémoire de Magister.Université Mouloud mammeri-Tizi-Ouzou,p115.
- Perfumo, A., Smyth, T.J.P., Marchant, R., Et Banat, I.M. (2010).** Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UWI. *Appl. Microbiol. Biotechnol*,p34: 671-676.
- Prince, R.C. (2005).** The microbiology of marine oil spill bioremediation .Petroleum microbiology,P317-336.
- Przybulewska, K., Wiczorek, A., Nowak, A., Pochrzaszcz, M. (2006).** The isolation of microorganisms capable of phenol degradation.*Polish journal of Microbiology* ,p55: 63-67.
- Rejsek, F. (2002).** Analyse des eaux ; aspects règlementaires Et techniques. Sceran-Paris.360.
- Romero, M.C., Cazau, M.C., Giorgieri, S., Arambarri, A.M. (1998).** Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream .*Environ Pollut*,p101: 355-359 .
- Romine, M.F., Stillwell, L.C., Wong, K.K., Thurston, S.J., Sisk, E.C., Sensen, C., Gaasterland, T., Fredrickson, J.K., Saffer, J. (1999).** Complete sequence of a 184-

- kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J. Bacteriol.*, p181: 1585-1602.
- Saharzaki. (2006).** Detection of meta- and ortho-cleavage dioxygenases in bacterial phenol-degraders. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.*, p10 : 75 – 81.
- Saito, A., Iwabuchi, T., Haarayama, S. (2000).** A novel phenanthrene dioxygenase from *Naocardiodides* sp strain KP7 : Expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, p182: 2134-2141.
- Sanchez, J., Luis, G., Kamp, B., Kira, A., Onysko, H., Budman., Campbell, W., Robinson. (1998).** Double Inhibition Model for Degradation of Phenol by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Bioeng.*, p60 : 560–567.
- Sauret. (2011).** Isolement et caractérisations des enzymes responsables de l'oxydation des hydrocarbures.
- Selmoun, M., et Benkhebcheche, D. (2016).** Contribution à l'étude de biodégradation des hydrocarbures dans les boues de forage par des bactéries productrices de biosurfactants. Mémoire de Master. Université des frères Mentouri –Constantine, p46.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Hu, Y., Lee, S.E., LiQ, X. (2007).** Degradation of phenanthrene by *Burkholderia sp*. C3: initial 1,2- and 3,4-dioxygenation and meta- and orthocleavage of naphthalene -1,2-diol. *Biodegradation*, p18: 123-131 .
- Seo, Jong-Su., Young-Soo, K., Qing, X., Li. (2008).** Bacterial Degradation of Aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, p6: 278-309.
- Schmidt, R., and Maibach, H. (1981).** Immediate and delayed onset “skip area” dermatitis presumed secondary to topical phenol exposure. *Contact Dermatol*, p 7,4,199-202 .
- Schuttleworth, K.L., Cerniglia, C.E. (1995).** Environmental aspects of PAH biodegradation. *Applied. Biochem. and Biotechnol.*, p54: 291-302.
- Scriban, R. (1999).** Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols contaminés par les polluants organiques. Edition Lavoisi.
- Shah, MP. (2018).** Microbial Degradation of phenol by an Application of *Pseudomonas mendocina*. *Austin J Microbiol*, p4: 1022.
- Simonart, P. (1957).** Symposium sur les Méthodes d'Etude Microbiologique du Sol. p : 208.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J., Valérie, C. (1994).** Caractérisation de la souche LR7.2 impliquée dans la transformation anaérobie du phénol et du 4-hydroxybenzoate en benzoate. *Handbook for Rhizobia*. Springer verlage New York. Mémoire de doctorat. Université du Québec INRS-Institut Armand- Frappier.
- Warner, M.A., and Harper, J.V. (1985).** Cardiac dysrhythmias associated with chemical peeling with phenol. *Anesthesiology*, p 62: 366-367.
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., Ladow, K., Schneider, J. (1995).** Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. Weinberg S.R., St(tzky G., 1972, *Soil. Chem. Biol. Int.*, p97:131-148
- Washington, C., Winn, S.D., Allen, S.A., William, M., Janda, E., Koneman, W. (2005).** *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6 ed., Lippincott Williams & Wilkins.
- Waterhouse, A. (2010).** Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine, *Methods in Enzymology*, p152-178.
- Wild, S. R. (1995).** Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long term experiments amended with sewage sludge. *Environ Pollut*, p76: 25-32.
- Willison, J.C., Jouanneau, Y., Demaneche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M. (2004).** Identification and functional analysis of two aromatic –ring –hydroxylating

- dioxygenas froma *Sphinogomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons .*Applied And Environmmental Microbiology* ,p70 : 6714-6725.
- Xiaojun, D .,Qing ,H.,Lijuan,H.,Xin,J.,Shunpeng,L.(2008).**Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil .*International biodeterioration&biodegradation* ,p62: 257-262.
- Yan, J., Jianping, W., Jing, B., Xiaoqiang, J., Zongding, H. (2007).** Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. (2007) *Journal of Hazardous Materials*,p147: 672–676.
- Ye D., Siddiqi, M.A., Maccubbin, A.E., Kumar S., Sikka H.C. (1996).** Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ .Sci .Technol*,p30:13-142 .
- Zhang, Z., Gai, L., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Ma, C., Wang, Z., Sun, B., He, X., Tang, H., Ping, X. P. (2010).** Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresour. Technol*,p101: 8452-8456.
- Zobell, S. (1946).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons an environmental perspective,p108-119.

# *Annexe*

➤ **Milieu minérale agar (MM)**

composition (en raison de gramme par litre d'eau distillé) (Przybulewska et *al.*, 2006 )

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	4.35
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1.7
NH <sub>4</sub> Cl.....	2.1
Sulfate de magnésium héptahydraté( Mg SO <sub>4</sub> ).....	0.2
SO <sub>4</sub> Mn.....	0.05
FeSO <sub>4</sub> .....	0.01
CaCl <sub>2</sub> .....	0.03
pH.....	7.3

➤ **Mulleur-Hinton agar (MH)**

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

Infusion de viande de bœuf.....	300
Hydrolysate de caséine.....	17,5
Amidon.....	1,5
pH.....	7.4

Pour la préparation de 1L on prend 38g de Muller Hinton en poudre

Une fois les géloses préparées, elles sont versées dans des flacons puis stérilisées à 121°C pendant 15 minutes ; avant d'être coulées dans des boîtes de pétri.

➤ **Composition de milieu de conservation**

MgSO <sub>4</sub> .....	2,46g/l
Tris-HCl.....	2,42g/l
Glycerol à 100%.....	32,5 ml
pH.....	8

MgSO<sub>4</sub> à 1M, tris : hydroxyméthyl-amino-méthane.

➤ **Composition du milieu Chapman**(en raison de g/L d'eau distillé) (Marchal *et al.*, 1991)

Peptone.....	11
Extrait de viande.....	1
Chlorure de sodium.....	75
Mannitol.....	10
Agar.....	15
Rouge de phénol.....	0,025
pH.....	7,4
	7,5

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

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

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

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

**➤ Gélose Hektoen**

Protéose-peptone.....	12g/l
Extrait de levure.....	3 g/l
Lactose .....	12g/l
Saccharose.....	12g/l
Salicine.....	2 g/l
Citrate de fer III et d'ammonium.....	1,5g/l

**➤ Solution de carbonate de sodium**

200 g de carbonate de sodium anhydre est ajoutés Dans 800mL d'eau distillée.

**➤ Réactif de folin ciocalteu**

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

- **Composition du milieu TSI (Triple Sugar Iron Bio-Rad)** (en raison de gramme par litre d'eau distillé) (Marchal et *al.*, 1991)

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

**N.B.** L'ajustement des pH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou une solution d'HCl 1N selon le cas.

- **La composition du milieu mannitol-mobilité**

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

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

➤ **Milieu Citrate de Simmons**

Citrate de sodium.....	1g/L
Chlorure de sodium.....	5g/L
Sulfate de magnésium.....	200mg/L
Dihydrogenophosphate d'ammonium.....	1g/L
Monohydrogénophosphate de potassium.....	1g
Bleu de bromotymol.....	80mg/L
Agar.....	13g/L
Eau distillée.....	1000mL
pH.....	6,8

➤ **Milieu urée- indole**

Tryptophane.....	3g
Phosphate monopotassique.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g/L
Urée.....	20g/L
Rouge de phénol.....	0.025 g/L
Alcool à 95°.....	0.01mL/L
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....	6,7

➤ **Plasma de lapin****Composition :**

Plasma de lapin lyophilisé 1 flacon.....	10 ml
Diluant (oxalate de sodium) 1 ampoule.....	10 ml

**Préparation :**

10 ml de solvant additionné stérilement dans le flacon de plasma de lapin lyophilisé.

Agiter pour favoriser la dissolution en évitant la formation de mousse.

## ➤ Réactifs de la coloration de Gram

**Violet de gentiane**

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

**Lugol**

Iodure de potassium.....	2.0g
Iode métalloïde.....	1.0g
Eau distillée.....	300ml

**Alcool (éthanol)****Fuschine de ziehl**

Fuchine basique.....	1.0g
Phénol.....	5.0g
Éthanol à 90°.....	10ml
Eau distillée.....	100ml

➤ **Solution de phénol**

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

## Lecture des tests biochimique

**Tableau 6 : Tests biochimique effectués (joffin et layral,2006)**

Milieux de culture	Teste recherché	Ensemencement	Incubation	Réactifs ajouter	Résultat +	Résultat –
Mannitol-mobilité	Fermentation du Mannitol	Piqure central	24 h à 37°C		Rouge → jaune	Rouge
	Mobilité				Formation d'un axe centrale	Absence de voile
Citrate de Simmons	Utilisation du citrate de sodium comme source de carbone et d'énergie	Stries longitudinale pente	24 h à 37°C	/	Vert → bleu	Vert
TSI gélose Glucose Lactose Saccharose	Fermentation de lactose glucose saccharose	Stries serres pour la pente simple piqure pour le culot	24 h à 37°C		Rouge brun → Pente jaune Culote jaune Pente rouge Culote rouge	Rouge brun
	Production de gaz				Bulles d'air a l'intérieur de la gélose ou fissure de la gélose	Pas de changement de l'aspect de la gélose
					Production de l'H <sub>2</sub> S	Noircissement
	Eau peptone exempte d'indole				Production d'indole à partir du tryptophane	Quelques gouttes de la suspension bactérienne
Recherche de la catalase	Enzyme catalysant l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène formé lors de réactions en aérobiose .	Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame et émulsionner directement une partie de la colonie prélevée avec l'anse .			Dégagement de gaz	Pas de dégagement de gaz
Recherche de l'oxydase	Détection de la phénylénediamine-oxydase enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction	Un disque d'oxydase contenant de léoxalate Ndimethylparanitrop hényléne-diamine est déposé une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée ou bien en contact avec le bouillon.		/	Apparition d'une coloration Violette	Absence d'une coloration Violette
Urée-indole	Hydrolyse de l'urée	Quelques gouttes de suspension bactérienne	24h à 37°C	/	Orange → rouge violet	Orange



## Isolement et identification des bactéries à partir du sol pollué par les dérivés du pétrole

**Résumé.** Le sol constitue un milieu naturel d'isolement de microorganismes ayant des applications biotechnologiques très intéressantes à savoir la dégradation des polluants chimiques. Pour cela, l'objectif de ce travail est de connaître la flore bactérienne du sol contaminé par les dérivés du pétrole pour les utiliser dans la dégradation du phénol en solution.

Le sol est prélevé au niveau de quelques stations de service des carburants situées dans la Wilaya de Laghouat. Des isolats bactériens ont été obtenus après repicage successif sur milieu Muller-Hinton Agar. Sur l'ensemble des bactéries purifiées seulement (63%) sont capables d'utiliser le phénol comme source de carbone pour leur croissance.

Les bactéries ont été identifiées grâce à leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques. *Pseudomonas sp.* (57%) est le genre le plus abondant suivi celui de *Klebsiella Pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *Serratia sp* (14%).

Les résultats du test de la biodégradabilité du phénol montrent que *Pseudomonas sp.* possède le pouvoir de dégradation du phénol le plus élevé par rapport aux autres bactéries. Les bactéries du sol en particulier *Pseudomonas sp.* peuvent être utilisées au niveau des stations d'épuration des eaux et des sols contaminés par le phénol.

**Mots clés :** Sol, Station de service, *Pseudomonas*, identification, dégradation, phénol.

## Isolation and identification of bacteria from a soil contaminated with petroleum derivatives

**Abstract.** Soil constitutes a natural environment for the isolation of microorganisms with very interesting biotechnological applications, namely the degradation of chemical pollutants. For this, the objective of this work is to know the bacterial flora of soil contaminated by petroleum derivatives for used in the degradation of phenol in solution. The soil is taken from a few fuel service stations located in the state of Laghouat. Bacterial isolates were obtained after successive replanting on Muller-Hinton Agar medium. Of all purified bacteria only (63%) are able to use phenol as a source of carbon for growth. Bacteria have been identified by their morphological and biochemical characteristics. *Pseudomonas sp.* (57%) is the most abundant genus followed by *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* et *serratia sp* (14%). The results of phenol biodegradability show that *Pseudomonas sp.* has the highest degradation power of phenol compared to other bacteria. Bacteria of the soil parentally *Pseudomonas sp.* can be used at water treatment plants and soils contaminated with phenol.

**Keywords:** soil, service station, *pseudomonas sp.*, identification, degradation, phenol.

### عزل وتحديد البكتيريا من تراب ملوث بالمشتقات النفطية

**ملخص .** تشكل التربة بيئة طبيعية لعزل الكائنات الحية الدقيقة ذات تطبيقات حيوية للغاية ، وهي تحليل الملوثات الكيميائية لهذا ، فإن الهدف من هذا العمل هو معرفة البكتيريا الموجودة في التربة الملوثة بمشتقات البترول لاستخدامها في تحليل الفينول في المحلول تؤخذ التربة من بعض محطات خدمة الوقود الموجودة في ولاية الأغواط. تم الحصول على عزلات بكتيرية بعد إعادة زرع متتالية

في وسط Muller-Hinton Agar . تم التعرف على البكتيريا من خلال خصائصها المورفولوجية والكيميائية الحيوية. من بين

كل السلالات البكتيرية معزولة 63% فقط لها القدرة على استخدام الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة *Pseudomonas sp.*

هي سلالة سائدة 57% ، تليها *Klebsiella Pneumoniae* و *Serratia sp* و *Staphylococcus aureus* (14%) نتائج دراسة تحليل الفينول تدل على أن استخدامها في *Pseudomonas sp.* لديها أعلى قدرة تحليل للفينول مقارنة بالبكتيريا الأخرى *Pseudomonas sp.* يمكن استخدامها في محطات معالجة المياه و التربة الملوثة بالفينول

**الكلمات المفتاحية.** التربة ، محطة الخدمة ، *Pseudomonas sp.* ، التعرف ، تحليل الفينول.